

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Einfluss von Insulin und chronisch oxidativem Stress auf die endotheliale Funktion –
Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jennifer Dirzka

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Dr. rer. nat. Miriam M. Cortese-Krott

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Erkens, R., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Krause, L., Weidenbach, M., Dirzka, J., Krenz, T., Mergia, E., Suvorava, T., Kelm, M., Cortese-Krott, M. M. Left ventricular dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function. *Free Radic Biol Med*, Volume 89, Pages 906-17. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.409.

Zusammenfassung

Hintergrund und Ziel. Kennzeichnend für kardiovaskuläre Erkrankungen ist die endotheliale Dysfunktion, welche durch den Rückgang der Bioaktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), und damit eine verminderte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und erhöhten oxidativen Stress gekennzeichnet ist. Ziel des Projektes ist die *ex-vivo* und *in-vivo* Untersuchung der endothelialen Funktion anhand von Mausmodellen, die sich durch Fehlregulation der Redox-Reaktionen auszeichnen.

Mausmodelle. Bei Mäusen, die keinen Transkriptionsfaktor Nrf2 (Nrf2 *Knockout* Maus) exprimieren, kann das Modell der chronischen Adaptation an oxidativen Stress studiert werden. Fehlregulation von Redox-Reaktionen aufgrund von Typ-II-Diabetes mellitus ist ebenfalls mit der Entwicklung von endothelialer Dysfunktion assoziiert, was im Mausmodell des Typ-II-Diabetes mellitus (*New Zealand Obesity* Maus) untersucht werden kann. Es wurde weiterhin gezeigt, dass Hyperinsulinämie die eNOS-Aktivität durch Phosphorylierung von Tyrosin 657 via *proline-rich tyrosine kinase 2* (Pyk2) vermindert; es erfolgte für das Mausmodell des Typ-II-Diabetes mellitus zusätzlich die Gabe eines Pyk2-Inhibitors.

Methoden. Im Rahmen von *ex-vivo* Versuchen wurden isolierte Aorten von männlichen Nrf2 KO, NZO und Wildtyp Mäusen (WT) im Alter von 20 Wochen mithilfe eines Myographen untersucht. Konzentrationsabhängige Analysen wurden nach Gabe von Acetylcholin (ACh), Phenylephrin (PHE) und Nitroprussid-Natrium (SNP) erstellt. Insulin ELISA wurden zum Beleg der Hyperinsulinämie bei NZO verwendet und die eNOS-Expression mithilfe Western Blot Analyse ausgewertet. Die Untersuchung der endothelialen Funktion *in-vivo* erfolgte mit Ultraschall nach „ischämischer Fern(prä)konditionierung“ (*remote ischemic preconditioning*) im Rahmen von flussmediierter Vasodilatation (FMD).

Ergebnisse. In den *ex-vivo* Untersuchungen ergab sich für die Nrf2 KO eine erhaltene endotheliale Funktion. Derweil präsentierten die NZO eine verminderte endotheliale Funktion mit beeinträchtigter Vasodilatation, wohingegen die Pyk2-Inhibition in NZO in einer partiellen Wiederherstellung der endothelialen Funktion resultierte. Die Insulin Level waren bei allen NZO unabhängig von der Pyk2-Inhibitor Applikation erhöht.

Schlussfolgerung. In Nrf2 KO scheint die Fehlregulation der Redox-Reaktionen durch eine kompensatorische Hochregulation der eNOS in der Aorta ausgeglichen zu werden. Die Hyperinsulinämie in NZO korreliert mit endothelialer Dysfunktion, wohingegen die Hemmung der Pyk2 zur partiellen Wiederherstellung der endothelialen Funktion führt.

Abstract

Background and Aim. Endothelial dysfunction is regarded as a hallmark of CVD and is characterized by multifactorial changes in the vessel wall, leading to decreased bioactivity of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), reduced production of nitric oxide (NO) and increased oxidative stress. In this study we aimed to investigate the endothelial function ex vivo and in vivo in mice models of redox dysregulation. **Mice Models.** The transcription factor Nrf2 controls the expression of antioxidant and protective enzymes. Thus mice lacking the transcription factor Nrf2 (Nrf2 knock out mice) are considered as a model of chronic adaptation of the organism to oxidative stress. Redox dysregulation due to diabetes type II and the metabolic syndrome are also associated with the development of endothelial dysfunction. Further recent studies demonstrated that hyperinsulinemia inhibits eNOS activity by phosphorylation on Tyrosin 657 via proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2); therefore Pyk2 inhibitor was applied to a diabetes type II specified mouse model (NZO). **Methods.** Isolated aorta of male Nrf2 KO mice, NZO mice and wild type mice (WT) each approximately 20 weeks of age were studied ex vivo using a myograph. Concentration-response curves to acetylcholine (ACh), phenylephrine (PHE) and sodium nitro prusside (SNP) were performed. Endothelium-dependent relaxation was assessed by measuring the reactive dilatation to ACh in PHE-precontracted vessels. The effect of Pyk2 inhibitor on eNOS regulation was examined after administration of the inhibitor to NZO. To prove hyperinsulinemia in NZO insulin levels were measured with Insulin ELISA and to measure eNOS activity Western Blot analysis was used. In vivo assessment of endothelial function was done by flow-mediated dilation (FMD) by applying remote ischemic preconditioning to iliac vessels. **Results.** Nrf2 KO showed ex vivo a fully preserved endothelial function. NZO in absence of Pyk2 inhibitor presented a significantly decreased endothelial function with impaired vasodilation to ACh in comparison to WT whereas insulin levels were significantly increased. In presence of Pyk2 inhibitor NZO presented ex vivo and in vivo a regain of endothelial function. **Conclusion.** These results point to a significant role of eNOS in the regulation of endothelial function. In Nrf2 KO the endothelial function is preserved by up-regulation of eNOS in the aorta shown by our Western Blot analysis. Increased insulin levels in NZO are correlated to endothelial dysfunction whereas Pyk2 inhibition results in partial regain of endothelial function ex vivo and in vivo.

Abkürzungsverzeichnis

A

ACh	Acetylcholin
AEGs	<i>Advanced Glycation End Products</i>
Akt-1	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse
ARE	Antioxidativ empfindlicher Bereich
AT-II	Angiotensin II

B

BH₄	Tetrahydrobiopterin
-----------------------	---------------------

C

Ca²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat

D

DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid

E

EC₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDRF	<i>Endothelium Derived Relaxation Factor</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS KO	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase <i>Knockout Maus</i>
ET-I	Endothelin I

F

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FMD	Flussmedierte Dilatation
FMN	Flavinmononukleotid

G

GC	Guanylatcyclase
GLUT4	Glucose-Transporter Typ 4
GSTs	Gluthation-S-Transferase
GSH	Glutathion
GSSH	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat

I

iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3	Inositoltrisphosphat
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat

J

JAK	Januskinase
------------	-------------

K

KCl	Kaliumchlorid
------------	---------------

Keap-1 KO	<i>Kelch-Like ECH-Associated Protein Knockout</i>
L	
L-Arg	L-Arginin
L-Cit	L-Citrullin
L-NAME	L-NG-Nitroarginin Methylester
M	
MLCP	Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase
N	
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-cells</i>
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO₂⁻	Nitrit
NO₃⁻	Nitrat
Nrf2 KO	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2-Knockout (Maus)</i>
NZB	<i>New Zealand Black Maus</i>
NZO	<i>New Zealand Obesity Maus</i>
O	
O₂⁻	Superoxid-Anion
ONOO⁻	Peroxynitrit-Anion
P	
PHE	Phenylephrin
PI(3)-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PWV	Pulswellengeschwindigkeit
Pyk2	<i>Proline-Rich Tyrosine Kinase 2</i>
R	
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S	
Ser	Serin
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SNP	Nitroprussid-Natrium
T	
teNOS	totale endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
V	
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
W	
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Stimulus-bedingte NO-Synthese durch eNOS löst Vasodilatation aus
- Abbildung 2: Regulation der eNOS-Aktivität durch intrazelluläre Ca^{2+} und Phosphorylierung
- Abbildung 3: Regulation der eNOS an spezifischen Aminosäure-Bindungsstellen via Phosphorylierung
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hypothesen
- Abbildung 5: Organbadversuche mit isolierten Aorten bei myographischer Untersuchung
- Abbildung 6: Untersuchung der vaskulären Funktion im Rahmen der FMD-Versuche
- Abbildung 7: Mausstamm-spezifische EC_{50} bei PHE-Applikation
- Abbildung 8: Vitalitätsprüfung bei KCl-Applikation
- Abbildung 9: Erhaltene ACh-abhängige Vasodilatation bei Nrf2 KO
- Abbildung 10: Eingeschränkte PHE-abhängige Vasokonstriktion bei Nrf2 KO
- Abbildung 11: Erhaltene SNP-abhängige Vasodilatation bei Nrf2 KO
- Abbildung 12: Signifikant verminderte ACh-abhängige Vasodilatation bei NZO
- Abbildung 13: Erhaltene PHE-abhängige Vasokonstriktion bei NZO
- Abbildung 14: Erhaltene SNP-abhängige Vasodilatation bei NZO
- Abbildung 15: Eingeschränkte flussmedierte Vasodilatation nach Okklusion bei NZO
- Abbildung 16: Signifikant erhöhte Pulswellengeschwindigkeit bei NZO
- Abbildung 17: Signifikant verminderte teNOS bei NZO
- Abbildung 18: Partielle Wiederherstellung der Vasodilatation bei NZO+Pyk2-Inhibitor
- Abbildung 19: Erhaltene PHE-abhängige Vasokonstriktion bei NZO+Pyk2-Inhibitor
- Abbildung 20: Erhaltene SNP-abhängige Vasodilatation bei NZO+Pyk2-Inhibitor
- Abbildung 21: Partielle Wiederherstellung der Vasodilatation nach Okklusion bei Pyk2-Inhibition
- Abbildung 22: Signifikant verminderte Gefäßsteifigkeit bei NZO+Pyk2-Inhibitor
- Abbildung 23: Signifikant erhöhte Plasma-Insulinspiegel bei NZO
- Abbildung 24: teNOS Proteinanteil bei NZO unabhängig von Pyk2-Inhibition
- Abbildung 25: Schematische Darstellung der Ergebnisse
- Tabelle 1: Protokoll Messung flussmedierte Dilatation unter Okklusion und nach Öffnen des *Cuffs* in zeitlichen Abständen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung der Gefäßfunktion für kardiovaskuläre Ereignisse	1
1.2 Die Charakterisierung von Stickstoffmonoxid/ EDRF	3
1.3 NO-Synthasen und ihre Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen	5
1.4 Aufbau und Signalkaskade der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase	7
1.5 Einfluss von oxidativem Stress auf die vaskuläre Funktion	10
1.6 Einfluss von Typ-II-Diabetes mellitus auf die vaskuläre Funktion	13
1.7 Zielsetzung	16
2 Material	18
2.1 Substanzen und Lösungen	18
2.1.1 Aortenringversuche	18
2.1.2 Insulin ELISA	18
2.1.3 FMD-Versuche	18
2.1.4 Western Blot	18
2.2 Geräte	20
2.3 Software	21
3 Methoden	22
3.1 Versuchstiere	22
3.2 Verwendete Medikamente	23
3.2.1 Esketamin und Xylazin	23
3.2.2 Heparin	24
3.2.3 Acetylcholin	24
3.2.4 Phenylephrin	25
3.2.5 Nitroprussid-Natrium	25
3.2.6 PF 431396 hydrate (Pyk2-Inhibitor)	26
3.2.7 Isofluran	26
3.3 Aortenringversuche im Organbad	26
3.3.1 Versuchsübersicht	26
3.3.2 Herstellung der Krebs-Henseleit Pufferlösung	26
3.3.3 EC ₅₀ -Bestimmung für Phenylephrin	27
3.3.4 Entnahme und Präparation der Mäuseaorten	27
3.3.5 Versuchsprotokoll	28
3.3.6 Applikation des Pyk2-Inhibitors bei NZO Tieren	30
3.3.7 Blutentnahme sowie Blutaufbereitung	30
3.4 Analyse der vaskulären Funktion und Steifigkeit <i>in-vivo</i>	30
3.4.1 Flussmedierte Vasodilatation	31

3.4.2 Pulswellengeschwindigkeit	33
3.5 Plasma-Insulin ELISA	33
3.6 Western Blot Analyse zur Identifikation von totaler eNOS	35
3.6.1 Zellyse	35
3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.6.3 Versuchsprotokoll	36
3.7 Datenauswertung	37
4 Ergebnisse	40
4.1 Vorversuche: Organbad	40
4.1.1 Nrf2 KO ohne spezifische EC ₅₀ bei Phenylephrin-Applikation	40
4.1.2 Einschluss der Aortenringe nach Vitalitätsprüfung	42
4.2 Erhaltene endotheliale Funktion <i>ex-vivo</i> bei Nrf2 KO	43
4.3 Signifikante endotheliale Dysfunktion in NZO <i>ex-vivo</i> und <i>in-vivo</i>	46
4.3.1 Verminderte Endothel-abhängige Vasodilatation der NZO Aorten	46
4.3.2 Verminderte vaskuläre Funktion <i>in-vivo</i> bei NZO	48
4.3.3 Verminderte teNOS in den NZO-Aorten	50
4.4 Partielle Wiederherstellung der endothelialen Funktion bei NZO+Pyk2-Inhibitor	51
4.4.1 Verbesserte ACh-abhängige Vasodilatation bei NZO+Pyk2-Inhibitor	51
4.4.2 Verbesserte vaskuläre Funktion bei NZO+Pyk2-Inhibitor	53
4.4.3 Erhöhte Plasma-Insulinspiegel bei NZO	55
4.4.4 Expression der teNOS unabhängig von Pyk2-Inhibition	56
5 Diskussion	57
5.1 Erhaltene endotheliale Funktion bei eNOS-Hochregulation in Nrf2 KO	58
5.2 Signifikante endotheliale Dysfunktion bei metabolischem Syndrom	61
5.3 Positive Wirkung des Pyk2-Inhibitors auf die eNOS-Aktivität	64
5.4 Konzeptionelle Erwägungen	68
6 Schlussfolgerungen	68
7 Literaturverzeichnis	71
8 Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Gefäßfunktion für kardiovaskuläre Ereignisse

Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten auch weiterhin als eine der führenden Todesursachen europaweit [1]. Die Prävalenz der koronaren Herzerkrankung, des Myokardinfarkts, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und als auch der Herzinsuffizienz haben in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung für die Gesundheit der Bevölkerung. Trotz etablierter therapeutischer Meilensteine wie die interventionelle Behandlung eines akuten Myokardinfarkts, haben Herz-Kreislauf-Erkrankungen aufgrund des demographischen Wandels eine große Relevanz [2]. Nicht nur aktuell, sondern auch in Zukunft, werden die chronischen kardiovaskulären Erkrankungen die Gesellschaft als auch das Gesundheitssystem vor Herausforderungen stellen. Als klassische Risikofaktoren gelten dabei ein arterieller Hypertonus, ein altersbedingter Typ-II-Diabetes mellitus, die Dyslipidämie und ein gesundheitsbeeinträchtigendes Verhalten wie Nikotinabusus.

Unter anderem kennzeichnend für Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind eine eingeschränkte Funktionalität und reduziertes strukturelles *Remodeling* des Endothels. Es ist bekannt, dass Endothelzellen Stimulus-abhängig vasorelaxierende und vasokonstringierende Substanzen sezernieren, zu denen unter anderem Insulin, Prostazyklin, Endothelin I (ET-I) und Stickstoffmonoxid (NO) gehören. NO, welches zunächst als *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) bekannt geworden ist, wird von NO-Synthasen synthetisiert und freigesetzt [3] und führt als starker endogener Vasodilatator an glatten Gefäßmuskelzellen zur Relaxation. Zu den Faktoren, welche die Reaktivität der Gefäße beeinflussen, gehören neben endogenen Substanzen ebenso die bereits erwähnten kardiovaskulären Risikofaktoren, welche oftmals indirekt in Form von oxidativem Stress auf die Gefäßfunktion einwirken. Ab einem Substanz-spezifischen Grenzwert und einer bereits bestehenden Vorschädigung kann es durch die Noxen zu einer irreversiblen Schädigung der Gefäße, im Speziellen des Gefäßendothels, welche mit der *Response-to-Injury*-Hypothese [4] in Verbindung steht, kommen.

Im Rahmen von arteriosklerotischen Prozessen entwickelt sich zunächst eine endotheliale Dysfunktion mit Störung der funktionalen Integrität und Permeabilität des Endothels [5] sowie eine veränderte Reaktivität des Gefäßes. Diese ist unter anderem geprägt durch eine Funktionalitätsabnahme der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und somit einer

verminderten NO-Freisetzung [6, 7]. Bereits die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion korreliert mit dem Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis zu entwickeln [8]. Eine gestörte NO-Bioverfügbarkeit hat nicht nur Einfluss auf die vasodilatativen Effekte der glatten Muskelzellen der Gefäße, sondern kann weitere pleiotrope Effekte beeinflussen, welche in der Summe die Integrität des kardiovaskulären Systems beeinträchtigen (REF ARS Review Erkens 2016).

Folge der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion ist ein gestörtes *Remodeling* der Gefäße beispielsweise im Rahmen von arteriosklerotischen Umbauprozessen mit Einlagerung von Lipiden in die Intima, Expression von Adhäsionsfaktoren, Einwanderung von Entzündungszellen, Proliferation der glatten Muskelzellen und bindegewebigem Umbau mit Entstehung fibrinöser Plaques. Eine sonst physiologische Adaptation der Gefäße an endogene oder exogene Belastungssituationen ist in einem dysfunktionalen Gefäß mit gegebenenfalls Lumenverengung und verminderter Elastizität als auch endothelialer Dysfunktion deutlich eingeschränkt; Bluthochdruck ist nur eine der hieraus resultierenden Folgen. Weiterhin ist das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei hypoxischer Gewebsschädigung z.B. Koronarinsuffizienz mit Angina pectoris-Beschwerden beim akuten Myokardinfarkt möglich.

Aus diesem Grund hat die pharmakologische Therapie der endothelialen Dysfunktion bei reduzierter NO-Verfügbarkeit einen umso höheren Stellenwert, da sie Erkrankungen des kardiovaskulären Systems verhindern bzw. hinauszögern kann. Die erste bekannte Akuttherapie durch NO-Bereitstellung stellte die Gabe von organischen Nitraten mit ihrem ältesten Vertreter Nitroglyzerin [9, 10] bei Angina pectoris Ende des 19. Jahrhunderts dar. Organische Nitrate wirken dem Pathomechanismus bei Angina pectoris mit Durchblutungsstörung bei Stenosierung der Koronargefäße entgegen. Es kommt zur sofortigen Bereitstellung von exogenem NO mit Vasodilatation des arteriellen und venösen Gefäßsystems, und damit zum Ausgleich der Dysregulation von Sauerstoffbedarf und-angebot des Herzens. Die mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin von 1998 ausgezeichneten Untersuchungen über NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System wiesen die wesentliche biochemische Rolle der Endothelzellen bei der Vasodilatation endgültig nach. Diese Erkenntnis hatte starken Einfluss auf die weitere Forschung bezüglich der endothelialen Dysfunktion und steht im Mittelpunkt meiner Arbeit.

1.2 Die Charakterisierung von Stickstoffmonoxid/ EDRF

NO spielt als instabiler Mediatorstoff eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation, der Thrombozytenaggregation, der neuronalen Fortleitung, der immunologischen Abwehr und beim septischen Schock. Als wasserlösliches Radikal mit Stickstoffatom zeichnet es sich durch eine geringe Halbwertszeit (<6 s) unter physiologischen Bedingungen [11] und einer hohen Reaktivität [12] aus; daher übt NO vornehmlich seine Wirkung lokal, also am Ort der Synthese, aus. Es ist jedoch nicht so reaktiv wie andere biologische Radikale. Aufgrund von lipophilen Eigenschaften besitzt NO im ungeladenen Zustand gute Diffusions- und Resorptionseigenschaften durch Membranen z.B. bei der Aufnahme über Schleimhäute zur therapeutischen Anwendung [13]; diese Eigenschaft wird bei sublingualer Gabe oder bei oralen Sprays organischer Nitrate zur Behandlung von Angina pectoris genutzt.

Physiologischerweise ist endogenes NO an der Regulation des vaskulären Tonus und des Blutflusses mit Endothel-abhängiger Vasodilatation auf temporären intraluminalen Stress beteiligt. Auf hohe arterielle Scherbelastung [14] und Gewebshypoxie [15, 16] kommt es durch posttranslationale Aktivierung der endothelialen NO-Synthase zu einer Adaptation des Gefäßes nach NO-Freisetzung [17]. Weiterhin verhindert NO die Thrombozytenanlagerung an die Gefäßwand und wirkt somit der Thrombusausbildung, der Stenosierung sowie der lokalen Gewebshypoxie entgegen. Azuma et al. stellten fest, dass NO über die Thrombozytenguanylatzyklase mit Erhöhung des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegels eine Aggregationshemmung herbeiführt [18]. Es dient den Zellen des angeborenen Immunsystems zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies zur Immunabwehr, aber es kann auch an der Fehlregulation und Zerstörung körpereigener Zellen beteiligt sein wie beim septischen Schock [19, 20].

Vermutlich gibt es übergeordnet mindestens zwei Wege der NO-Bereitstellung, d.h. unabhängig und abhängig von NO-Synthasen. Organische Nitrate führen zur Gefäßerweiterung durch NO-Bereitstellung: Dieses geschieht bei dem Prodrug Nitroglycerin oder Isosorbiddinitrat nach Biotransformation mithilfe der Glutathion-S-Transferase (GSTs), unabhängig von NO-Synthasen, direkt an den glatten Muskelzellen. Einer der drei Nobelpreisträger für Physiologie und Medizin von 1998 Murad stellte 1977 fest, dass Nitroglycerin durch NO-Freisetzung via der Guanylatzyklase (GC) mit Anstieg von cGMP eine Vasodilatation an den Gefäßmuskelzellen herbeiführen kann [21]. Unabhängig von der NO-Bereitstellung durch organische Nitrate, ist auch die endogene

Synthese von NO aus Nitrit (NO_2^-) bekannt [22]. Nitrit kann bei Bedarf wie im Rahmen von hypoxischen und azidotischen Vorgängen in NO durch Desoxyhämoglobin [23, 24] und Myoglobin [25, 26] reduziert werden.

Furchgott und Zawadzki erkannten 1980 die Bedeutung des Endothels, die für die Acetylcholin (ACh)-induzierte Endothel-abhängige Vasodilatation sorgte, wenn auch zunächst nicht die endotheliale NO-Synthase. Ihnen gelang es den bis dahin bestehenden Widerspruch zwischen *in-vivo*-und *ex-vivo* Versuchen bei der Wirkung von ACh auf arterielle Gefäße zu klären. [27]. Es stellte sich heraus, dass die Reaktion von ACh im *ex-vivo* Versuch maßgeblich von der Umsicht beim Präparieren, vor allem im Umgang mit der Endothelschicht lag. Ohne Endothelschädigung war auf ACh-Applikation ebenfalls eine reproduzierbare Vasodilatation wie *in-vivo* Versuchen zu beobachten. Gemäß seiner erkennbaren Funktion erhielt die bis dato unbekannt Substanz, über die ACh durch Bindung an muskarinerge Rezeptoren eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur auslöst, den Namen *Endothelium Derived Relaxing Factor*. Es wurde bekannt, dass Abläufe der Vasodilatation bei EDRF ähnlich waren zu denen von Nitrovasodilatoren, auch wenn bei Letzteren der Effekt auf die Gefäße ohne die Integrität des Endothels erfolgte. Ignarro et al. und Förstermann dokumentierten, dass die Vasodilatation durch EDRF wie bei den direkten Nitrovasodilatoren über die lösliche GC verlief, was die Bildung des Botenstoffes cGMP unterstützte [28, 29]. Ignarro und Moncada identifizierten 1987 schließlich unabhängig voneinander den von Furchgott entdeckten EDRF als NO. In der Spektrophotometrie zeigt sich bei Ignarro ein ähnliches Absorptionsmaximum von NO gekoppelt an Hämoglobin wie bei EDRF [30]; hierbei wurde bewiesen, dass NO und EDRF ähnliche chemische Eigenschaften haben oder es sich um dieselbe Substanz handeln musste. Moncada konnte mithilfe des einzigartigen Chemilumineszenz-Produkts ebenso NO als EDRF identifizieren [31].

Die NO-Bereitstellung über eine NO-Synthase wurde schließlich 1989 von Moncada et al. bestätigt [32], siehe dazu die modifizierte Abbildung 1 zum *The L-arginine-nitric oxide pathway* nach Moncada: Mithilfe der NO-Synthase entsteht aus der Oxidation von L-Arginin (L-Arg) und molekularem Sauerstoff das Zwischenprodukt L-Hydroxyarginin, das in einem zweiten Oxidationsschritt wieder unter Sauerstoffverbrauch zu L-Citrullin (L-Cit) und Stickstoffmonoxid umgewandelt wird.

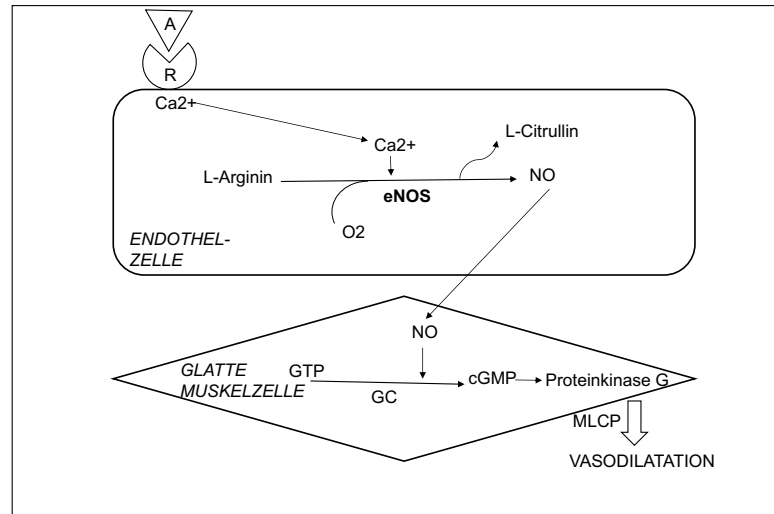


Abbildung 1: Stimulus-bedingte NO-Synthese durch eNOS löst Vasodilatation aus

Acetylcholin (A) löst in der Endothelzelle über die endotheliale NO-Synthase (eNOS) eine Aktivierung des NO-*pathway* aus, welcher in den glatten Muskelzellen zu einer Vasodilatation führt (modifizierte Abbildung) [33].

Kofaktoren dieses Syntheseweges sind FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin (BH_4) und NADPH. Die Entfernung von NO aus dem Organismus kann als Oxidation von NO zu NO_2^- schnell über die Multi-Kupfer-Oxidase und Caeruloplasmin [34] sowie relativ langsam mithilfe von Sauerstoff und Wasser erfolgen. NO kann durch die Reaktion mit Oxyhämoglobin [35] auch zu Nitrat (NO_3^-) und Methämoglobin umgewandelt werden.

1.3 NO-Synthasen und ihre Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen

Es sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt (iNOS, nNOS, eNOS), die mit den Geweben ihrer Entdeckung in Verbindung gebracht werden [36]. Die Nummerierung der NO-Synthasen basiert auf der zeitlichen Abfolge des Klonens der cDNA der drei Enzyme. Die NO-Synthasen setzen NO als initiales Produkt frei und benötigen dafür die zuvor genannten Kofaktoren. Bis auf die iNOS liegen alle NO-Synthasen im inaktivierten

Zustand als Monomere vor. Eine Konformationsänderung durch Bindung des Calcium/Calmodulin-Komplexes gewährleistet einen Elektronenfluss über den Reduktase-Anteil und führt zur Synthese von NO [37]. Die iNOS hat bereits Calmodulin gebunden und liegt somit schon in der aktivierten Form vor.

Die erste klonierte NO-Synthase ist die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1), die bei Entdeckung im Gehirn von Ratten identifiziert wurde [38, 39]. Die nNOS kommt aber auch in Kardiomyozyten [40], der Macula densa der Niere, Pankreasinzellen und glatten Gefäßmuskelzellen [41] vor. Sie gilt als konstitutive NO-Synthase, d.h. sie synthetisiert kontinuierlich Calcium-abhängig NO. Es ist bekannt, dass sie für synaptische Plastizität im ZNS [42], die zentrale Regulation des Blutdrucks [43], Relaxation von glatten Muskelzellen und mikrovaskulärem Tonus [43] sorgt. Die nNOS soll jedoch im Rahmen pathophysiologischer Vorgänge durch massiven Calcium-Ionen (Ca^{2+})-Einstrom in neuronale Zellen auch an dem N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-induzierten neuronalen Untergang bei Schlaganfällen beteiligt sein [44].

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2) kommt vor allem in Zellen der angeborenen Immunabwehr wie Makrophagen [45] vor und kann durch proinflammatorische Zytokine, bakterielle Lipopolysaccharide zur Synthese von NO angeregt werden. Sie hat Calmodulin gebunden und ist somit unabhängig von Veränderungen der zellulären Ca^{2+} -Konzentration. Bedingt durch eine Stimulus-induzierte starke Expression des Proteins, kann die iNOS hohe Mengen an NO freisetzen. NO reagiert in inflammatorischen Geweben mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Hyperoxid-Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zu Peroxynitrit (ONOO^-) und dient Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten zur bakteriostatischen und bakteriziden Immunabwehr [46]. Die induzierbare NO-Synthase steht im Zusammenhang mit inflammatorischen Erkrankungen, Transplantatabstoßung [47] und dem septischen Schock [48].

Bei der endothelialen NO-Synthase (eNOS, NOS3) sind eine Vielzahl an chemischen und physikalischen Stimuli bekannt, die die eNOS in ihrer Aktivität modulieren [49]. Die NOS3 befindet sich vornehmlich im Endothel der arteriellen Gefäße und ist dort an der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur [29], der Regulation des Blutdrucks und an vasoprotektiven und anti-arteriosklerotischen Vorgängen [50] beteiligt. Die endotheliale NO-Synthase kommt weiterhin in Kardiomyozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und

neuronalen Zellen im Gehirn vor [41]. Ihre regulatorische Bedeutung für das kardiovaskuläre System, durch ihr Vorkommen in den Erythrozyten, ist noch nicht in vollem Umfang bekannt [51], wird jedoch zunehmend Bedeutung beigemessen und mitverantwortlich für kardiovaskuläre regulatorische Prozesse gemacht.

1.4 Aufbau und Signalkaskade der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase

Die endotheliale NO-Synthase liegt an der Plasmamembran und im Golgi-Apparat in Caveolae vor und ist dort an Caveolin-1 mit inhibierender Wirkung gebunden. Darüber hinaus sind im inaktivierten Zustand die eNOS-Monomere an der Aminosäurestelle Threonin (Thr) 495 konstitutiv phosphoryliert, was eine Calcium/Calmodulin-Komplexbildung und damit Elektronenfluss mit NO-Synthese verhindert. Neben Ca^{2+} -erhöhenden Stimuli und Dephosphorylierung von Thr 495 ist jedoch auch die simultane Phosphorylierung an der Stelle Serin (Ser) 1177 von entscheidender Bedeutung für die Aktivität der eNOS; Letzteres führt zu einem verbesserten Zugang von Calmodulin zur Bindungsstelle der eNOS. Im Rahmen dieser Aktivierungskaskade wird die autoinhibitorische Schleife der eNOS entfernt und ein Elektronenfluss von NADPH in der Reduktase-Domäne des einen zum Häm des anderen Monomeranteils in der Oxygenase-Domäne ermöglicht (s. Abbildung 2).

Aus den eNOS-Monomeren entsteht im Rahmen der Aktivierung durch Konformationsänderung ein funktionaler Dimer. An der Häm-Seite reduzieren die Elektronen zusammen mit dem Kofaktor BH_4 Sauerstoff und L-Arg wird zu L-Cit und NO oxidiert. L-Arg kann durch die Umwandlung von L-Cit erneut bereitgestellt werden oder aus Proteolyse gewonnen werden [52, 53]. Das synthetisierte NO diffundiert aus der Endothelzelle in die glatten Muskelzellen des Gefäßes und führt über die Aktivierung der GC durch Bindung an die Häm-Gruppe zur Synthese von cGMP aus GTP. Das cGMP führt über die Phosphorylierung der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MCLP) zur Vasodilatation (s. Abb. 1). Zur Beendigung der Vasodilatation wird NO zu NO_2^- umgewandelt oder auch cGMP durch cGMP-abbauende Phosphodiesterasen zu GMP hydrolysiert.

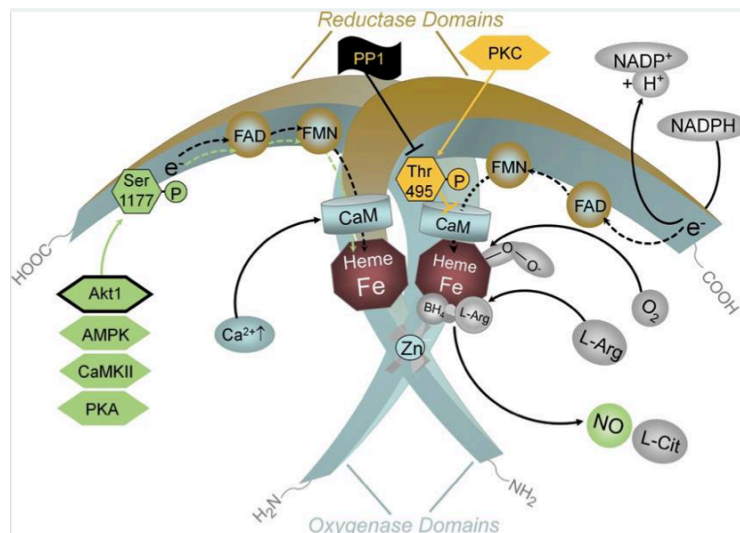


Abbildung 2: Regulation der eNOS-Aktivität durch intrazelluläre Ca^{2+} und Phosphorylierung

Intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg führt zu einer verstärkten Bindung von Calmodulin an die endotheliale NO-Synthase, was einen Elektronenfluss von der Reduktase- zur Oxygenase-Domäne mit Konformationsänderung, Oxidation von L-Arginin und die NO-Synthese induziert (modifizierte Abbildung) [54].

Neben der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung kann die enzymatische Aktivität der eNOS ebenso durch posttranslationale Stimulus-induzierte Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an ihren Serin-, Threonin-, und Tyrosin-Aminosäurestellen moduliert werden; diese Modulation wirkt sich jeweils auf die NO-Synthese des Enzyms aus. An der Regulation der eNOS-Aktivität spielen wie bereits erwähnt initial die Thr 495 und die Ser 1177 Stelle eine wichtige Rolle: Im Rahmen ihrer Bedeutung als zentrale Regulationsstellen kann es bei diesen beiden Aminosäurestellen schnell zu einer Änderung des Phosphorylierungszustandes kommen.

Bezüglich der Aminosäurestelle Ser 1177 (Ser 1176 in muriner eNOS) sind bereits viele Studien erfolgt und relevante Stimuli gut dokumentiert, die ihre Phosphorylierung und somit eine verstärkte eNOS-Aktivität herbeiführen können. Ser 1177 ist im Bereich der Reduktase-Domäne der eNOS lokalisiert und trägt im phosphorylierten Zustand zur Sensitivitätserhöhung der eNOS bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen bei und erhöht den Fluss von Elektronen über die Reduktase-Domäne, was zu einer verstärkten NO-Produktion führt. Neben erhöhter flussmediierter Scherkräfte [55, 56] haben außerdem folgende vasoaktive Substanzen Einfluss auf die Phosphorylierung an Ser 1177: Östrogen, der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), Bradykinin, Insulin und Calcium-Ionen.

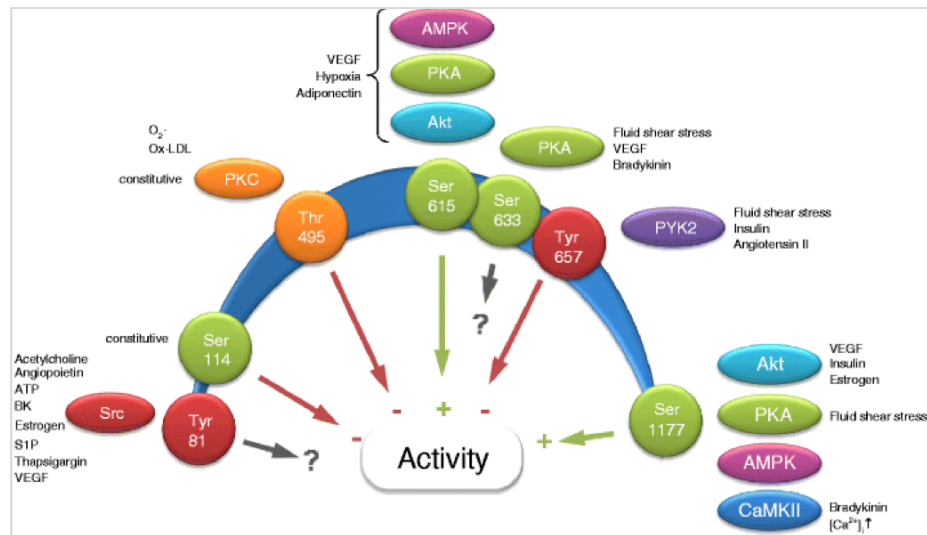


Abbildung 3: Regulation der eNOS an spezifischen Aminosäure-Bindungsstellen via Phosphorylierung

Schematische Darstellung von den identifizierten Phosphorylierungsstellen der endothelialen NO-Synthase, ihre Bedeutung für den Aktivitätszustand des Enzyms und die jeweils dokumentierten Stimuli (modifizierte Abbildung) [62].

Die Aminosäurestellen werden bedingt durch die vasoaktiven Substanzen mittels zwischengeschalteter Proteinkinasen phosphoryliert oder mittels Phosphatasen dephosphoryliert. Ser 1177 wird von Akt1-Kinase, der Proteinkinase A [57], der 5'AMP-aktivierten Proteinkinase und der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II [58] phosphoryliert. Hohe arterielle Scherkräfte modulieren über die Proteinkinase A die Phosphorylierung der eNOS. Östrogen, Insulin und VEGF wiederum aktivieren die Serin-/Threonin Proteinkinase Akt1, die einzige Proteinkinase, deren Funktion in *in-vivo* Versuchen bewiesen wurde. Der Effekt von Bradykinin und intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg führt über die Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II zur Phosphorylierung an Ser 1177.

Neben der globalen Inhibition der NO-Synthasen über pharmakologische Substanzen wie L-NG-Nitroarginin Methylester (L-NAME) kann die Signalkaskade der eNOS auch selektiv an spezifischen NOS-Aminosäure-Bindungsstellen inhibiert werden. L-NAME führt zu verminderter cGMP-Formation und unterbindet damit die Vasodilatation mit Selektivität für die neuronale und die endotheliale NO-Synthase-Isoform.

Es ist bekannt, dass Thr 495 eine zentrale negativ-regulatorische Stelle der eNOS im Bereich der Calcium/Calmodulin-Bindungsstelle ist, die bei Phosphorylierung die Aktivität des Enzyms reduziert [59]. Es herrscht Unsicherheit darüber, ob bei Thr 495 die Proteinkinase C (PKC) für die Phosphorylierung relevant ist [59, 60]. Für die PKC spricht

jedoch, dass es bei Inhibition der Kinase zu verstärkter endothelialer NO-Produktion kommt [61]. Eine Phosphorylierung an Tyr 657 (Tyr 656 für murine eNOS) zeigt ebenso eine Inhibition der eNOS-Aktivität [63]. Fisslthaler und Fleming haben festgestellt, dass die Proteinkinase *proline-rich tyrosine kinase 2* (Pyk2) eine Phosphorylierung der Tyr 657 Stelle bewirkt [62, 64]. Auf oxidativen Stress soll es über die Pyk2 zur dualen Phosphorylierung von Tyr 657 und Ser 1177 kommen [65].

Pyk2 ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die mit den höchsten Leveln im Gehirn und im hämatopoetischen System vorkommt. Pyk2 gilt als sensitiv für Redox-Stress, was die Aktivierung der Kinase auf Stimuli wie Angiotensin II (AT-II) [66], Endothelin-I (ET-I), erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen und oxidativen Stress [67] beweist. Weiterhin ist die Stimulus-induzierte Phosphorylierung von Pyk2 ebenso durch hohe arterielle Scherkräfte und Insulin [64] bekannt. Auf die Substanz PF431396 hydrate, die bei einer IC_{50} die *focal adhesion kinase* (FAK) inhibieren kann, wurde ebenso eine pharmakologische Inhibition der Pyk2 mit verminderter Tyr 657-Phosphorylierung festgestellt [65, 68]. Bei globaler Inhibition der eNOS stellt sich der genannte Effekt über Pyk2 nicht ein, was wiederum für eine selektive Wirkung von PF431396 hydrate als Pyk2-Inhibitor spricht.

1.5 Einfluss von oxidativem Stress auf die vaskuläre Funktion

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertension, Hypercholesterinämie, Typ-II-Diabetes mellitus und Nikotinabusus werden neben endothelialer Dysfunktion, ebenso mit oxidativem Stress assoziiert. Liegt ein Ungleichgewicht zwischen pro –und antioxidativem Abwehrsystem, definiert als oxidativer Stress, vor, können kardiovaskuläre Erkrankungen [69], aber auch kanzeröse Prozesse initiiert bzw. aggraviert werden. Im Rahmen von oxidativem Stress versagen die antioxidativen Abwehrsysteme mit infolgedessen vermindertem Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies, während parallel eine verstärkte Produktion von ROS im Vordergrund steht [70].

Zu den ROS zählen vor allem Radikale, Verbindungen mit einem ungepaarten und dadurch sehr reaktiven Elektron, im Besonderen Sauerstoffradikale. Radikale fallen zu einem bestimmten Anteil physiologisch als Nebenprodukt beim Purinabbau und bei der Oxidation von Fettsäuren an. Weiterhin dienen sie den Immunzellen bei der Immunantwort durch Freisetzung hoher ROS-Mengen, im Rahmen des sogenannten *respiratory burst* [71].

Im Rahmen von oxidativem Stress kann mitunter die Aktivität des zentralen Transkriptionsfaktors NF- κ B unkontrolliert verstärkt sein, welcher in Folge die Expression zahlreicher Gene wie die von VEGF, proinflammatorischen Enzymen wie die NADPH-Oxidase und Adhäsionsmolekülen induziert. Bedingt durch die NADPH-Oxidase, die als Prädiktor für Arteriosklerose gilt, kommt es zu einer sich selbst verstärkenden Entstehung von ROS wie Hyperoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) im Gefäß mit oxidativer Modifikation von Zielproteinen, sowie Apoptose und DNA-Schäden. Auf zellulärer Ebene kommt es über die ROS zu Gefäßschäden und Gefäßumbau [72]. Die NADPH-Oxidase reduziert molekularen Sauerstoff mit der Synthese von $O_2^{\cdot-}$ als Vorstufe für viele ROS-Formen und sorgt für eine erhöhte Expression von Xanthin-Oxidasen [73].

Weitere Enzyme, die ROS generieren, haben primär andere biochemische Funktionen und bilden ROS als Nebenprodukt, wie die Xanthin-Oxidase oder, im dysfunktionalen Zustand, die NO-Synthasen. Im Rahmen von NADPH-Oxidasen-mediertem oxidativen Stress wird beispielsweise der essentielle Kofaktor der eNOS, BH_4 [74], durch verstärkte Oxidation via $O_2^{\cdot-}$ und $ONOO^-$ inaktiviert. Beim Vorliegen von BH_4 -Mangel, sowie allgemein bedingt durch oxidativen Stress, läuft die Sauerstoff-Reduktion an der eNOS entkoppelt von der NO-Synthese ab; hierbei entsteht aus der eNOS ein $O_2^{\cdot-}$ produzierendes Enzym [75]. Aus der Reaktion von NO/ NO_3^- und ROS entsteht $ONOO^-$, welcher der reaktivste Vertreter unter den ROS ist.

Dementsprechend ist ein Kennzeichen von kardiovaskulären Risikofaktoren eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit, bedingt durch eine verminderte NO-Synthese und verstärkte NO-Inaktivierung durch ROS. Die verminderte NO-Synthese liegt jedoch keinesfalls an niedrigen eNOS-Proteinleveln; im Gegenteil ist die eNOS-Expression bei kardiovaskulären Erkrankungen vielfach hochreguliert [76]. ROS als Signalmoleküle modulieren die eNOS-Expression an der eNOS-Gen-Promotorregion, die Bindungsstellen für Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren besitzt. Die Hochregulation der eNOS hat jedoch keinen protektiven Charakter bei Aktivitätsabnahme der eNOS und eNOS-Entkopplung, die den bereits vorliegenden oxidativen Stress verstärkt. Im Rahmen von oxidativen Vorgängen bei inflammatorischem Milieu kommt es ebenso zur Induktion der iNOS mit einer Bereitstellung von toxischen Mengen an NO, das zu $ONOO^-$ umgewandelt werden kann.

Im Rahmen von oxidativem Stress stehen den prooxidativen Vorgängen nur eingeschränkt antioxidative Vorgänge bzw. Substanzen wie Glutathion (GSH), Superoxid-Dismutasen, Katalasen und GSH-Peroxidasen entgegen, die für den Abbau der ROS sorgen. Die Superoxid-Dismutase kann $O_2^{\cdot -}$ zu Wasserstoffperoxid umwandeln, welches von Katalasen zu molekularem Sauerstoff und Wasser abgebaut wird. Die GSH-Peroxidase katalysiert die GSH-abhängige Reduktion von Wasserstoffperoxid bei Oxidation von GSH [77]. GSH wird Glutathion-S-Transferasen (GSTs)-abhängig, die zentrale Phase-II-Detoxifikations-Enzyme darstellen, den GSH-Peroxidasen erneut bereitgestellt.

Für diese protektiven Mechanismen ist der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (im Menschen kodiert als NFE2L2), auch Nrf2 genannt, von Bedeutung, der die Expression von antioxidativen Proteinen z.B. Phase-II-Detoxifikations-Enzymen reguliert [78, 79]. Ohne prooxidative Stimuli liegt der Redox-sensitive Transkriptionsfaktor im Cytoplasma gebunden an das *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap-1) vor, wo es nach Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut wird. Infolge von oxidativem Stress kommt es zur Oxidierung von Cystein-Anteilen des Keap-1 und Nrf2 gelangt in den Nucleus, wo es an den DNA-Promotor *antioxidant response element* (ARE) bindet. Bedingt durch die Bindung an den DNA-Promotor wird die Transkription von γ -Glutanyl-Cystein-Synthase, Häm-Oxygenase 1 [80] und GSTs initiiert. Die γ -Glutanyl-Cystein-Synthase katalysiert den ersten Schritt in der Bereitstellung von GSH. Die Häm-Oxygenase 1 sorgt für eine Hemmung der eNOS-Bioaktivität bei oxidativem Stress [74] und wirkt somit der entkoppelten eNOS und ihrer ROS-verstärkenden Mechanismen entgegen. Durch die Nrf2-bedingte Genregulation kommt es ebenso zu einem Schutz vor Entkopplung der eNOS durch Bereitstellung des limitierenden Kofaktors BH_4 .

Mice lacking nuclear factor (erythroid-derived-2) -like 2, d.h. Mäuse ohne Transkriptionsfaktor Nrf2, auch Nrf2 *Knockout* (KO) Mäuse genannt, zeichnen sich durch Dysregulation des Redox-Zustandes aus und werden als Modell für die Anpassung des Organismus an chronisch oxidativen Stress gesehen [81]. Im Kontext von vaskulären Erkrankungen gilt es die antioxidativen bzw. antiinflammatorischen biochemischen

Vorgänge [82] durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 beispielhaft im Modell der Nrf2 KO auf ihren protektiven Nutzen für die Gefäßfunktion zu untersuchen.

1.6 Einfluss von Typ-II-Diabetes mellitus auf die vaskuläre Funktion

Die zwei zentralen Kriterien des Typ-II-Diabetes mellitus sind nach WHO-Definition Hyperglykämie und die eingeschränkte periphere Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme, als Insulinresistenz bezeichnet. Weiterhin sind pathophysiologisch eine transiente kompensatorische Hyperinsulinämie bei Insulinresistenz und schlussendlich ein Betazell-Untergang relevant.

Im Rahmen der Insulin-Signalkaskade bindet Insulin als physiologische Reaktion auf erhöhte Blutglucoselevel an den membranären Insulin-Rezeptor (IR), der an allen Insulin-empfindlichen Zellen wie Skelettmuskel- und Fettzellen vorhanden ist. Die Bindung von Insulin führt zur Aktivierung des Rezeptors mit nachgeschalteter Initiierung der Signalkaskade über zytosolische Insulinrezeptor-Substrate (cIRS). Im aktivierten Zustand binden Letztere Signalübertragungsproteine wie Phosphoinositid-3-Kinasen (PI 3-K), die eine Aktivierung von Genen mit Insulin-sensitiven Promotoren, eine Translokation des GLUT-4 an die Zelloberfläche und damit eine Insulin-medierte Glucoseaufnahme in die Zelle bewirken. Bei Vorliegen einer peripheren Insulinresistenz im Rahmen von Typ-II-Diabetes mellitus soll diese Signalkaskade eingeschränkt sein; man nimmt an, dass es zu einer verminderten Phosphorylierung des IR, der cIRS und verminderten PI3-K-Aktivierung kommt [83]. Sicher ist der Mechanismus hinter der peripheren Insulinresistenz jedoch noch nicht aufgeklärt. In Folge von peripherer Insulinresistenz können jedoch erhöhte Blutglukosespiegel vorliegen und die Betazellen mit überschießender Insulinsekretion reagieren.

Typ-II-Diabetes mellitus ist abschließend als Störung des Gesamtmetabolismus mit Dyslipidämie, klinisch Adipositas, gehäufte Assoziation mit dem metabolischen Syndrom und sekundären Komplikationen am Gefäßsystem anzusehen. Das metabolische Syndrom wird dabei definiert als viszerale Obesität mit mindestens 2 der folgenden 4 Faktoren, welche erhöhte Triglycerid-, verminderte HDL-, erhöhte Nüchtern-glucose-Spiegel und erhöhter Blutdruck darstellen.

Es ist bekannt, dass Typ-II-Diabetes mellitus mit der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion assoziiert ist und somit ein erhöhtes vaskuläres Risiko vorliegt, das den Hauptgrund für die Morbidität und Mortalität des Diabetikers darstellt [84]. Typ-II-

Diabetes mellitus hat ein charakteristisches Spektrum an Multiorgansystem-betreffenden mikro- und makrovaskulären Erkrankungen wie z.B. Neuropathie, Nephropathie, Retinopathie, koronare Herzerkrankung und arterielle Hypertonie zur Folge. Vaskuläre Komplikationen im Rahmen von Typ-II-Diabetes mellitus scheinen sich aus endothelialer Dysfunktion bei Vorliegen der pathophysiologischen Merkmale zu entwickeln.

Das Vorliegen von Hyperglykämie hat Einfluss auf den zellulären Redox-Status und steigert die Formation von ROS [85, 86] in Mitochondrien. Hyperglykämie führt vermehrt zu nicht-enzymatisch glykierten Endprodukten, den *advanced glycation end products* (AEGs) wie HbA1c. Die Entstehung eines RAGE-AEG-Komplexes, d.h. die Bindung der AEGs an vaskuläre Rezeptoren, führt zu oxidativem Stress durch Induktion von proinflammatorischen Genen via NFκB [87]. Die AEG-Formation hat weiterhin direkten Einfluss auf die Vasoreaktivität durch extrazellulären Elastizitätsverlust [88], Inaktivierung von Stickstoffmonoxid [89] und Inhibition der eNOS-Aktivität [90], und damit den definierenden Kriterien endothelialer Dysfunktion.

Die periphere Insulinresistenz spielt eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese von Typ-II-Diabetes mellitus; sie ist bei Vorliegen von Hyperinsulinämie für ein 2-bis 3-fach erhöhtes Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen zu versterben verantwortlich [91, 92]. In einem Insulin-empfindlichen Organismus kommt es über Insulin zur zellulären Glucoseaufnahme nach GLUT4-Translokation, ET-I-Stimulation, und letztlich ebenso zur eNOS-Genregulation mittels IR/IRS-1/PI(3)-K/Akt-1 Signalkaskade [93]. Die eNOS-Genregulation führt zur NO-Freisetzung [94] mit Endothel-abhängiger Vasodilatation [95]. Weiterhin soll die Insulin-abhängige-Regulation der eNOS-Aktivität ebenso direkt über die Phosphorylierung ausgewählter Aminosäurestellen der eNOS verlaufen, die einen regulatorischen Effekt über eine Aktivierung der Proteinkinasen Akt-1 und der Pyk2 ausüben. Es wurde festgestellt, dass über Aktivierung der Akt-1 die Ser 1177 phosphoryliert wird, was in einer eNOS-Aktivitätszunahme resultiert [96]. Fleming et al. nehmen weiterhin an, dass eine Hyperinsulinämie über eine Aktivierung der Pyk2, welche eine Phosphorylierung der Tyr 657 herbeiführt, die eNOS-Aktivität inhibiert [62]. Physiologisch ist die Insulin-medierte Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel mit einer proportionalen Zunahme der Muskelperfusion assoziiert. Eine periphere Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie soll demgegenüber in einer verminderten Insulin-medierten Vasodilatation resultieren [97]. Das Ausmaß der Insulin-bedingten Vasodilatation scheint mit der Insulin-bedingten Glukoseaufnahme in die Zelle zu korrelieren [98].

Einer der metabolischen Hauptmerkmale bei Organismen mit Insulinresistenz ist das Vorliegen einer Hyperlipidämie mit erhöhten Leveln von zirkulierenden freien Fettsäuren im Gefäßsystem. Erhöhte Level freier Fettsäuren sollen zu einer verminderten Vasodilatation bei reduzierter NO-Produktion führen [99]. Es wird angenommen, dass freie Fettsäuren ebenso durch Reduktion der PI3-K-Aktivität zu peripherer Insulinresistenz mit gestörter Insulin-mediierter Glucoseaufnahme beitragen können [100]. Eine Theorie bei der Entwicklung von Arteriosklerose ist die durch Hyperlipidämie provozierte Lipid-Einlagerung in die Gefäßwand. Infolgedessen soll sich oxidativer Stress durch den chronischen Entzündungsreiz entwickeln, welcher sich negativ-regulatorisch auf die vaskuläre Funktion auswirkt.

Die *New Zealand Obese* (NZO) Maus ist bekannt als polygenetisches Mausmodell für das humane metabolische Syndrom und für Typ-II-Diabetes mellitus, und zeichnet sich durch Insulinresistenz und einen gestörten Glucose- und Fettstoffwechsel aus; die Entwicklung der pathophysiologischen Eigenschaften stellt sich Kolonie-, Geschlechts- und Alters-abhängig dar. Es kommt nur bei männlichen NZO/Hi und NZO/HILt mit 40 bis 50% ab dem Alter von 6 Wochen zur Entwicklung der Merkmale eines Typ-II-Diabetes mellitus. Interessanterweise weisen die Tiere eine verminderte GLUT4-Expression in Insulin-sensitiven Geweben [101] und eine spontane Autoantikörper-Bildung, unter anderem gegen IR, auf [102]. Den Zusammenhang zwischen der Entwicklung bzw. dem Progress (kardio-)vaskulärer Erkrankungen und Typ-II-Diabetes mellitus gilt es mithilfe des diabetischen Mausmodells zu untersuchen.

1.7 Zielsetzung

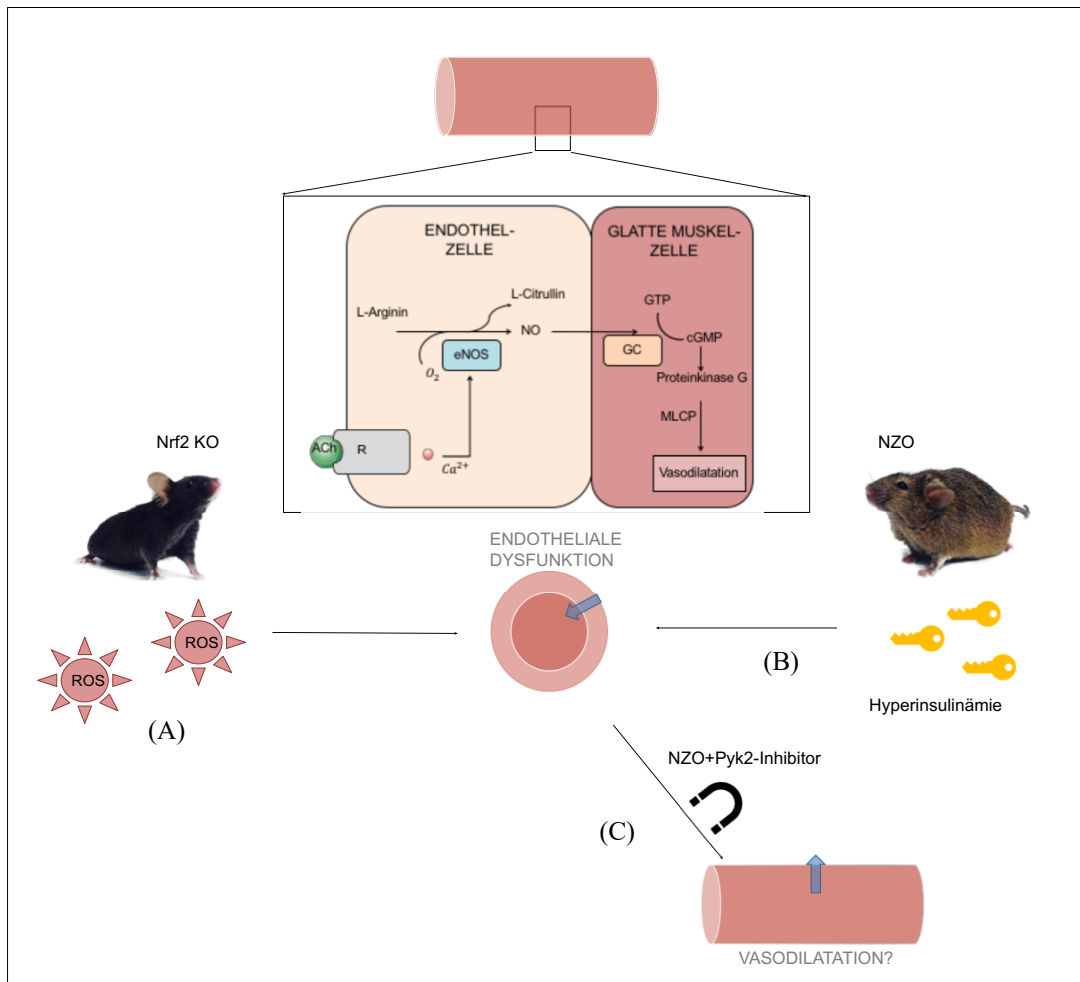


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hypothesen

Untersuchung der endothelialen Funktion bzw. eNOS anhand von Mausmodellen, die sich durch Fehlregulation der Redox-Reaktionen auszeichnen. (A) Endotheliale Dysfunktion bei Nrf2 KO bei chronisch oxidativem Stress, dargestellt durch ROS. (B) Endotheliale Dysfunktion bei NZO durch die vorliegende Hyperinsulinämie. (C) Wiederherstellung der endothelialen Funktion bei NZO+Pyk2-Inhibitor.

Ein Prädiktor für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen ist die endotheliale Dysfunktion. Sie ist geprägt durch eine verminderte Aktivität und Expression der eNOS, somit einer verminderten NO-Produktion und wirkt sich mit einer verminderten Endothel-abhängigen Vasodilatation auf die Gefäßfunktion aus. Ausgehend von der Annahme, dass Redox-Dysregulation zu einer endothelialen Dysfunktion führen kann, soll die vorliegende Arbeit die Rolle der eNOS für Zustände der Redox-Dysregulation im Mausmodell für die Adaptation an chronisch oxidativen Stress und für Typ-II-Diabetes mellitus klären. Nrf2 KO Mäuse, d.h. Mäuse ohne Transkriptionsfaktor Nrf2, wurden als

Modell für die Adaptation des Organismus an chronisch oxidativen Stress verwendet. Den Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und Typ-II-Diabetes mellitus mit Hyperinsulinämie wurde mithilfe des Mausmodells der NZO Maus untersucht. Zur Überprüfung des Einflusses von Hyperinsulinämie auf die eNOS-Aktivität wurde ein selektiver Inhibitor der Pyk2 einmalig *in-vivo* verabreicht.

Im Rahmen dieser Arbeit soll darauf eingegangen werden:

1. ob sich eine endotheliale Dysfunktion bei Nrf2 KO *ex-vivo* feststellen lässt,
2. ob im *ex-vivo* und *in-vivo* Versuch eine endotheliale Dysfunktion bei NZO durch die vorliegende Hyperinsulinämie festzustellen ist und
3. ob es nach einmaliger Gabe des Pyk2-Inhibitors PF431396 hydrate zu einer Wiederherstellung der endothelialen Funktion bei NZO kommt.

2 Material

2.1 Substanzen und Lösungen

2.1.1 Aortenringversuche

NaCl > 99,8 %	Carl Roth GmbH
KCl min. 99,5 %	KMF optiChem
MgSO ₄ min. 99,0 %	Sigma Aldrich
NaHCO ₃ 99,9 %	VWR International BVBA
KH ₂ PO ₄ min. 99,5 %	KMF optiChem
D-(+)-Glucose ACS reagent	Sigma Aldrich
CaCl ₂ > 99,0 %	Sigma Aldrich
100 % Essigsäure	Merck
Acetylcholine chloride	Sigma Aldrich
R-(-)-Phenylephrine hydrochloride	Sigma Aldrich
Sodium Nitroprusside dihydrate	Sigma Aldrich
Ketamin hydrochloride/Xylazin hydrochloride solution	Sigma Aldrich
Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm R	Ratiopharm GmbH
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	Fresenius Kabi
PF 431396 hydrate 98 % (HPLC)	Sigma Aldrich

Herstellung Pyk2-Inhibitor:

- 0,62 mg PF 431396 hydrate 98 % (HLPC)
- 1,11 ml Dimethylsulfoxid
- 9 ml NaCl-Lösung

2.1.2 Insulin ELISA

Insulin (Mouse) ultrasensitive ELISA (EIA-3440) Kit	DRG
---	-----

2.1.3 FMD-Versuche

Isofluran	Dräger
-----------	--------

2.1.4 Western Blot

Pierce™ Protease Phosphatase Inhibitor Mini Tablets	Thermo Fisher Scientific
NP-40	Abcam
Sodium deoxycholate ≥ 97 %	Sigma Aldrich

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Sigma Aldrich
<u>10 % SDS:</u>	
10 g SDS 98 %	
100 ml Millipore H ₂ O	
<u>RIPA-Puffer:</u>	
5 ml NP40	
2500 mg Sodium desoxycholate	
5ml SDS 98 %	
500 ml PBS (+)	
<u>Lyse-Puffer:</u>	
1-2 Pierce™ Protease Phosphatase Inhibitor Mini Tablets	
10 ml RIPA-Puffer	
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Puffer (20x)	Thermo Fisher Scientific
NUPAGE® Antioxidant	Thermo Fisher Scientific
SDS 98 %	Sigma Aldrich
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific
Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE™ Novex™ 7 % Tris-Acetate Protein Gel	Thermo Fisher Scientific
Nitrocellulose Membran 0,2 µm	BIO-RAD
Whatman Filter Papier	GE Healthcare Life Science
Amersham Hybond P 0,45 PVDF	GE Healthcare Life Science
Methanol ≥ 99,6 %	Sigma Aldrich
NuPAGE® Transfer Puffer (20x)	Thermo Fisher Scientific
Tris Buffered Saline (10x)	Cell Signaling Technology
ECL™ Advance Blocking Agent	Sigma Aldrich
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich
Tween® 20	Sigma Aldrich
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific
<u>Runningpuffer:</u>	
Lösung A	
50 ml NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Puffer (20x)	
950 ml Millipore H ₂ O	
Lösung B	

200 ml Lösung A
500 µl NUPAGE® Antioxidant

Transferpuffer:

100 ml Methanol
50 ml NuPAGE® Transfer Puffer (20x)
1 ml NUPAGE® Antioxidant oder SDS 98 %
849 ml Millipore H₂O

Tris Buffered Saline (1x):

100 ml Tris Buffered Saline (10x)
900 ml Millipore H₂O

Blocking solution:

Entweder 1g ECL™ Advance Blocking Reagent
oder 2,5 g Bovine Serum Albumin
50 ml Millipore H₂O

20 % Tween20:

1000 µl Tween® 20
4 ml Millipore H₂O

Antikörper:

Anti-β-Aktin <i>Rabbit</i>	Sigma Aldrich
Anti-teNOS <i>Mouse</i> mAb	BD BioScience
<i>Mouse Anti-goat</i> IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology

2.2 Geräte

Myographie-Gerät	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus
Ultraschall-Gerät	Vevo 2000
Druckkalibriergerät KAL 84	Halstrup Walcher
Okklusions-Manschette, 8mm Durchmesser	Harvard Apparatus
Mikroschere, Operationsset	F-S-T
Wage(n)	Sartorius laboratory
Mikroskope	Nikon SMZ645, Leica MZ95
Ultraschallbad	EMAG
Carbogen	Linde Laboratory
Magnetrührer Heizer	Stuart Scientific
Test Tube Heater	Stuart Scientific

Mikrozentrifuge (E2), Micro Star 17R	VWR
FLUOstar Omega	BMG LABTECH
ImageQuant LAS4000	GE Healthcare Life Science
Stromquelle POWER PAC 300	BIO-RAD
XCell II™ Blot Module, XCell SureLock invitrogen™	Thermo Fisher Scientific
iMark™ Mikroplate Absorbance Reader	BIO-RAD
„Einleitungsbox“ für Narkose	
Verstellbarer Tisch für FMD-Versuche	

2.3 Software

Software LabChart 8
VevoLab
Microplate Manager® Software
Image Studio™ Lite

GraphPad Prism 6
EndNote X8

3 Methoden

3.1 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden männliche C57BL/6J, im Folgenden als WT bezeichnet, Nrf2 KO/C57BL/6J Mäuse, NZO/HI Mäuse und eNOS KO Mäuse verwendet. Die WT dienten für die verwendeten Versuchstiergruppen als Kontrollgruppe (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA).

Die Nrf2 KO wurden von Riken (Koyadai, Tsukuba, Ibaraki, Japan) bezogen und über 10 Generationen mit C57BL/6J in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gekreuzt, bevor sie für unsere Versuche herangezogen wurden.

Die NZO wurden im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani aus dem Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf bezogen.

Bei den eNOS KO aus dem Bestand von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke handelt es sich um ein homozygoten Tier mit einem defekten eNOS Gen. Die Expression des defekten Gens führt zur Synthese einer inaktiven endothelialen NO-Synthase. Die Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke hat mithilfe von Western Blot und immunhistochemischer Analyse das Fehlen des Proteins in den eNOS KO Mäusen bestätigt. Im Rahmen der Western Blot Analysen dienten die Aortenlysate des eNOS KO Mausstamms als Negativkontrolle.

Während das Alter bei allen Mäusen ca. 20 Wochen betrug, variierte das Körpergewicht: Bei den WT und Nrf2 KO lag es zwischen 25-31 Gramm, bei den NZO bei 42-58 Gramm. Die Unterbringung, die Pflege sowie das Personal wurde im Fall der NZO durch das Deutsche Diabetes Zentrum Düsseldorf und bei den anderen Mäusen durch die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Versuchstiere wurden in Käfigen vorgeschriebener Größe (Typ 1, 2 oder 3) in Gruppen oder Einzeln auf Holzgranulat bei einer Raumtemperatur von 19-21°C und einer Luftfeuchtigkeit von etwa 50-60% bei einem 12-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere erhielten das Standardfutter, Sniff Ratte/Maus-Haltungsfutter, und keimarmes Trinkwasser ad libitum. Alle Versuche wurden durch das zuständige Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) des Landes Nordrhein-Westfalen angemeldet und gemäß des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (Aktenzeichen Tierversuchsantrag

und Organentnahme: 84-02.04.2014.A432, O47/90, O30/16) genehmigt. Die Tierversuche dieser Arbeit wurden nach Genehmigung durch das LANUV NRW in den Räumlichkeiten des Kardiologischen Labors der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Für die Durchführung dieser Arbeit erfolgte die Teilnahme an einem Versuchstierkudkurs.

3.2 Verwendete Medikamente

3.2.1 Esketamin und Xylazin

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte Gewichts-adaptiert als intraperitoneale, finale Injektion mit dem unter dem Handelsnamen bekannten Ketanest/Rompun®.

Diese Injektionslösung bestehend aus S-Ketaminhydrochlorid (60µg/g Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (10µg/g Körpergewicht) gewährleistet eine zuverlässige Relaxation, Analgesie und Sedierung.

S-Ketaminhydrochlorid ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Anästhetika, der für eine „dissoziative Anästhesie“ mit anästhetischen, analgetischen und amnestischen Eigenschaften bekannt ist. Bei S-Ketaminhydrochlorid kann es zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Halluzinationen, Sekretionssteigerung im Atemtrakt, Blutdruck- und Muskeltonuserhöhung sowie Atemdepression kommen, wobei Letzteres im Gegensatz zu anderen Anästhetika nur gering ausfällt. Die Wirkungen beruhen auf dem nicht-kompetitiven Antagonismus des N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptors und zahlreicher Interaktionen mit anderen Rezeptoren. Infolge der Reaktion am NMDA-Rezeptor kommt es zu einer zentralen Verminderung der nozizeptiven Neurotransmission. Die Verwendung dieses Anästhetikums für die Anästhesie bei Versuchstieren soll immer in Kombination mit einem Sedativum erfolgen.

Xylazinhydrochlorid, als ein α_2 -Rezeptoragonist, ist mit seinen sedativen, muskelrelaxierenden und leicht analgetischen Eigenschaften in Kombination mit S-Ketaminhydrochlorid als Injektionsnarkose geeignet, wobei es zur Wirkungsverstärkung kommt [103]. Der Wirkstoff hat Ähnlichkeiten mit dem Antisymphotonikum Clonidin und damit ähnliche Wirkungen, die auf einer Aktivierung der α_2 -adrenergen Rezeptoren im zentralen und peripheren Nervensystem beruhen. Unter der Gabe von Xylazinhydrochlorid kann es ebenso wie bei Clonidin zu Hypotonie, Bradykardie und leichter bis mittlerer Atemdepression kommen. Bei irrtümlich intravenöser Applikation

des α 2-Rezeptoragonisten gilt es zu beachten, dass es zu plötzlicher und ausgeprägter Vasokonstriktion kommen kann [104].

3.2.2 Heparin

Hierbei handelt es sich um einen Wirkstoff aus der Gruppe der Antithrombotika, der zur Prophylaxe und Therapie von thrombembolischen Ereignissen eingesetzt wird. Es kommt zur Komplexbildung mit Antithrombin III und dadurch zur Hemmung der Gerinnungsfaktoren. Der Wirkstoff wurde zur Verhinderung von Koagelbildung in den Aorten und Herzen der Versuchstiere und damit vor allem zur besseren Präparation der Gefäße für die Aortenringversuche verwendet. Im Rahmen der finalen Narkose wurde den Mäusen 0,2 ml Heparin (25.000 I.E.) nach Ausbleiben des Schmerzreflexes intraperitoneal verabreicht.

3.2.3 Acetylcholin

Bei ACh handelt es sich um den ersten identifizierten Neurotransmitter, der von Otto Loewi 1921 als sogenannter „Vagusstoff“, zur Übertragung von Nervenimpulsen an einem Froschherzen nachgewiesen wurde. Für die „Entdeckung der chemischen Übertragung von Nervenimpulsen“ mit Identifikation von ACh erhielt Henry Dale 1936 den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie.

Anders als bei den meisten Neurotransmittern handelt es sich hierbei um einen Essigsäureester, der ubiquitär an cholinergen Synapsen im zentralen, sympathischen und im parasympathischen Nervensystem wirkt. Er zeichnet sich durch eine geringe Halbwertszeit aus, da er kurz nach seiner Synthese von dem Enzym Acetylcholinesterase in Cholin und Acetyl CoA hydrolysiert wird; dieser Prozess ist für eine korrekte Signalübertragung entscheidend, da ansonsten Acetylcholin akkumulieren und zu andauernder Stimulation von Muskeln, Drüsen und dem zentralen Nervensystem führen würde. Nach seiner Freisetzung aus cholinergen Synapsen kann ACh an muskarinerge und nikotinerge Rezeptoren binden. An der intakten endothelialen Zelle führt die Bindung des Neurotransmitters an muskarinerge Rezeptoren G-Protein-vermittelt zur aktiven Relaxation. G-Protein-gekoppelt kommt es zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche die Bildung eines Calcium/Calmodulin-Komplexes unterstützt und an die endotheliale NO-Synthase bindet. Die daraufhin aktivierte NO-Synthase synthetisiert aus L-Arg, molekularem Sauerstoff und den Kofaktoren BH_4 sowie

NADPH, NO und L-Cit. NO führt in der glatten Muskelzelle über die Stimulation der GC zur Zunahme von cGMP, welche über die Proteinkinase G an der Relaxation der glatten Muskelzellen beteiligt ist. Die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führt jedoch auch G-Protein-gekoppelt zu einer Erhöhung des cAMP-Levels, welches die Proteinkinase A aktiviert. Diese ist einerseits an der Phosphorylierung der MLCP als auch an der MLCK beteiligt, welche ebenfalls Endothel-abhängig die Relaxation der Gefäßmuskelzellen auslösen. ACh kann jedoch auch direkt an der Gefäßmuskelzelle G-Protein-vermittelt über den RhoA-ROK-Weg zur Kontraktion der Zelle führen.

3.2.4 Phenylephrin

Phenylephrin (PHE) gehört als Agonist am α 1-Adrenorezeptor zur Gruppe der Sympathomimetika. Es kann aus dem Katecholamin Adrenalin synthetisiert werden und wird unter anderem als lokaler Vasokonstriktor in Form von abschwellenden Nasensprays bei Rhinitis und als Augentropfen bei Bindehautentzündungen eingesetzt. In Arzneimitteln liegt es meist als Phenylephrinhydrochlorid vor, welches gut wasserlöslich ist. Eine Bindung an dem α 1-Rezeptor in der glatten Muskelzelle führt zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C. Diese ist für die Spaltung von Phosphatidylinositol in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) zuständig. IP3 setzt Rezeptor-gekoppelt Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum frei und ermöglicht so einen initialen Kraftanstieg mit Kontraktion der glatten Muskulatur. Für eine tonische Dauerkontraktion ist jedoch ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum notwendig. DAG aktiviert wiederum die Proteinkinase C, die die aktive Form der MLCP mit Kontraktion als Folge hemmt.

3.2.5 Nitroprussid-Natrium

Nitroprussid-Natrium (SNP) gehört wie Molsidomin zu den nicht-enzymatischen NO-Donatoren und findet Anwendung in der Intensivmedizin. Dort wird es zur akuten Blutdrucksenkung bei Hochdruckkrisen und zur kurzzeitigen Entlastung des insuffizienten Herzens bei akutem Herzversagen eingesetzt. Es wirkt über die Freisetzung von NO in der glatten Gefäßmuskulatur, hauptsächlich in Arterien, jedoch auch in Venen, stark vasodilatatorisch. Durch die spontane Freisetzung kommt es cGMP-vermittelt über die Proteinkinase G zur Absenkung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration mit

aktiver Relaxation. Die Substanz trägt in ihrem Zentrum ein Eisen der Oxidationsstufe Fe^{2+} und ist von 5 Cyanid- und einer Nitrosylgruppe umgeben.

3.2.6 PF 431396 hydrate (Pyk2-Inhibitor)

Bei der Substanz PF 431396 hydrate handelt es sich um einen potenten Inhibitor der *proline-rich tyrosine kinase 2* (Pyk2), einer zytoplasmatischen, nicht-Rezeptor abhängigen Kinase, bezogen vom Hersteller Sigma Aldrich. Ein medizinischer Ansatz für die Substanz findet sich aufgrund ihrer Osteoblasten-aktivierenden Wirkung bereits bei der Therapie von Osteoporose [105].

3.2.7 Isofluran

Isofluran gehört zu der Gruppe der volatilen Anästhetika, die zur Einleitung und Erhaltung einer Allgemeinanästhesie auch bei Versuchstieren geeignet ist. Es verfügt über eine gute hypnotisierende, muskelrelaxierende und nur schwach analgetische Wirkung. Unter Isofluran kann es zu einer Vasodilatation [106] und Dosis-abhängig zu Blutdruckabfällen mit konsekutivem Anstieg der Herzfrequenz kommen. Weiterhin wirkt es wie alle volatilen Anästhetika atemdepressiv. Aufgrund seiner schleimhautreizenden Wirkung eignet es sich nur eingeschränkt zur Einleitung einer Allgemeinanästhesie.

3.3 Aortenringversuche im Organbad

3.3.1 Versuchsübersicht

Im Allgemeinen wurde nach Blutentnahme (mit und ohne vorherige Pyk2-Inhibitor-Applikation) die Aorta der Tiere entnommen und für die Messung der endothelialen Funktion im Organbad vorbereitet. Das nach der Blutentnahme gewonnene Plasma wurde mithilfe eines Insulin ELISA im Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf auf Insulin hin untersucht.

3.3.2 Herstellung der Krebs-Henseleit Pufferlösung

Zur Perfusion der Mäuseaorten während der Präparation als auch für die Lagerung im Organbad wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit Pufferlösung mit folgender Zusammensetzung hergestellt (Einwaage bezogen auf 2 L H_2O Millipore): 236,14 mmol NaCl, 9,39 mmol KCl, 3,32 mmol MgSO_4 , 49,76 mmol 3NaHCO_3 , 2,35 mmol KH_2PO_4 , 19,98 mmol Glucose, 6,67 mmol CaCl_2 . Bei der Herstellung wurde die Lösung

gleichmäßig mit dem Gasgemisch Carbogen (5% CO₂/ 95% O₂) begast. Auf den Zusatz von Indometacin als nichtsteroidaler Entzündungshemmer zur Einflussnahme auf den Prostaglandinstoffwechsel oder EDTA zur Antikoagulation wurde verzichtet. Die Pufferlösung wurde für jeweils zwei Versuchstage vorbereitet und die Menge für den nächsten Tag im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurde die Pufferlösung in ein Vorratsgefäß gefüllt, über eine Fritte mit Carbogen begast und mindestens 30 Minuten auf 38°C im Wasserbad aufgewärmt. Während der Aortenringversuche im Organbad erfolgte eine permanente Begasung der Lösung, wodurch eine annähernd konstante Sauerstoffsättigung erreicht wurde. Da die NO-Produktion über die endotheliale NO-Synthase sauerstoffabhängig ist, war die Sicherstellung einer konstanten Sauerstoffsättigung für die Reproduzierbarkeit der Messungen absolut notwendig [107].

3.3.3 EC₅₀-Bestimmung für Phenylephrin

Als mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) wird in der Pharmakologie die effektive Konzentration bezeichnet, unter der ein halbmaximaler Effekt zu beobachten ist. Diese effektive Konzentration kann nicht direkt bestimmt werden, sondern bedarf der Ableitung aus den Messungen der Dosis-Wirkungs-Kurven an einer Gruppe von Individuen. Die EC₅₀ von PHE ist Spezies-abhängig und soll sicherstellen, dass die Aortenringe ausreichend vorkontrahiert werden, um auf die anschließende kumulative ACh-Applikation möglichst vollständig zu relaxieren. Dazu wurden für die Versuchstiergruppen der WT und Nrf2 KO durch kumulative Gaben von PHE die EC₅₀ mithilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 6 bestimmt.

Versuchsablauf:

1. 60 Minuten Äquilibrationsphase
2. Aufsteigende Applikation von PHE (Konzentration im Organbad: 0,1 nM – 10 µM)

3.3.4 Entnahme und Präparation der Mäuseaorten

Nach Applikation der Gewichts-adaptierten finalen Narkose sowie gegebenenfalls des Pyk2-Inhibitors wurde im zeitlichen Abstand die Reaktion auf Schmerzreize überprüft, um die Tiefe der Narkose festzustellen. Bei reproduzierbarem Ausbleiben einer schmerztypischen Reaktion erfolgte die Herzpunktion zur Blutabnahme und danach die

Eröffnung des Thorax. Zu Beginn der Präparation erfolgte unter dem Mikroskop die Entnahme beider Lungenflügel und des Herzens, um die Aorta in situ darzustellen. Die Aorta wurde möglichst weit kaudal im Thorax durchtrennt, um ein ausreichendes Stück der thorakalen Aorta zu erhalten. Die Gefäßabgänge wurden von kaudal nach kranial abgetrennt und das periaortale Fettgewebe unter vorsichtigem Anheben des kaudalen Stumpfes sauber zirkulär entfernt. Nach Trennen des kranialen Endes der thorakalen Aorta vom Aortenbogen konnte das Aortenstück in toto entnommen und anschließend in eine vorbereitete Schale mit gekühlter Krebs-Henseleit Pufferlösung eingebracht werden. Die frei präparierte Aorta wurde dort von etwaig vorhandenen Gewebeanhaftungen wie Adventitiaresten befreit und verbliebene Blutreste gefäßschonend ausgespült. Im Anschluss stand das Schneiden der Aorta in mindestens drei gleich lange Gefäßsegmente von 1,5-2 mm Länge an, welche in Krebs-Henseleit Pufferlösung vorsichtig auf Gewebhacken geschoben wurden. Die Aortenringe am Gewebhacken wurden auf einen zweiten stationären Gewebhacken am Myographie-Gerät auf 10 mN (ca. 1 g) mittels eines normierten Gewichts in die auf 37°C angewärmte und begaste Krebs-Henseleit Pufferlösung im Organbad gebracht. Während der 60 Minuten Äquilibrationsphase in 2 ml Pufferlösung erfolgte alle 15 Minuten der Wechsel der Pufferlösung und gegebenenfalls das Nachstellen der Grundspannung auf 10 mN. Bei der Präparation und Separation der einzelnen Stücke der Aorta wurde ein Mikroskop und eine Mikroschere verwendet.

3.3.5 Versuchsprotokoll

Nach Ablauf der Äquilibrationszeit begann das eigentlich Versuchsprotokoll. Es wurden 80 nM KCl in die Organbäder gegeben und anschließend 20 Minuten gewartet. In dieser Zeit kontrahierten die Aorten maximal. Dieses stellt einen Test für die sorgfältige Präparation der Aorta dar, da hier die Qualität der funktionierenden und damit nicht beschädigten Zellen im Gesamten überprüft wird.

Versuchsablauf:

1. 60 Minuten Äquilibrationsphase
2. Applikation von 40 µl von 4 M KCl-Lösung (Konzentration im Organbad: 80 nM)
3. Waschphase
4. Applikation von PHE (Konzentration im Organbad von 0,4 – 0,6 µM)

5. Aufsteigende Applikation von ACh (Konzentration im Organbad: 0,1 nM – 10 μ M)
6. Waschphase, gegebenenfalls Nachjustieren auf 1 g
7. Aufsteigende Applikation von PHE (Konzentration im Organbad: 0,1 nM – 10 μ M)
8. Aufsteigende Applikation von SNP (Konzentration im Organbad: 0,01 nM – 10 μ M)
9. Einmaliges Waschen, 10 Minuten warten

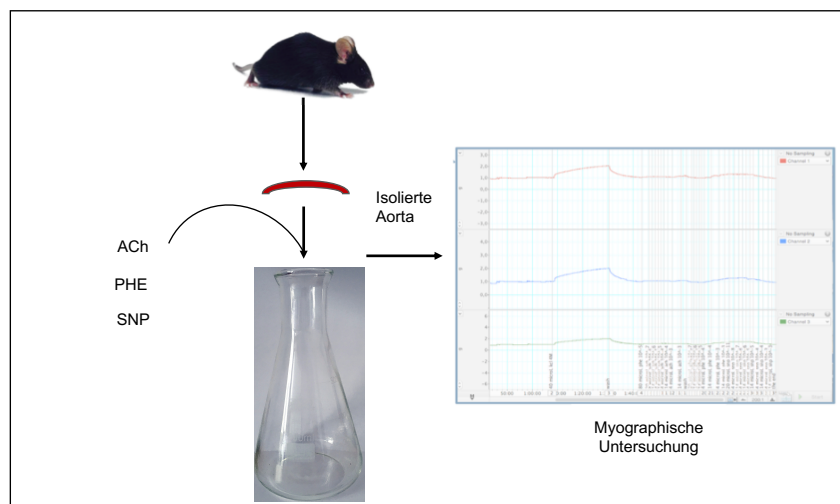


Abbildung 5: Organbadversuche mit isolierten Aorten bei myographischer Untersuchung

Schematische Darstellung der Organbadversuche mit Isolierung der Aorten aus den Versuchstieren und die Applikation vasoaktiver Substanzen (ACh, PHE, und SNP) ins Organbad unter myographischer Dokumentation. Dosis-Wirkungs-Kurven ergeben sich daraufhin nach genanntem Protokoll und wurden statistisch analysiert.

In der Waschphase wurde die Krebs-Henseleit Pufferlösung mehrfach gewechselt, um sicherzustellen, dass alle Rückstände der Wirkstoffe beseitigt sind. Die aufsteigenden Gaben erfolgten kumulativ: Hierbei erreichten alle Versuchstiergruppen bei der höchsten kumulativen Dosis die molare Masse von bis zu 10 μ M. Die Reaktion der Aortenringe auf die vasoaktiven Substanzen wurde in Milli-Newton (mN) bei isometrischer Kontraktion als auch bei Kraftabnahme bei Vasodilatation gemessen. Alle Messungen erfolgten als Mehrfachbestimmungen, sodass pro Versuch die Reaktion von mindestens zwei Aortenringen eines Tieres parallel bestimmt wurde. Zur Aufzeichnung der Messungen wurde ein Myographie-Gerät und die Software LabChart 8 verwendet.

3.3.6 Applikation des Pyk2-Inhibitors bei NZO Tieren

Zur Inhibition der Pyk2 wurde eine Injektionslösung mit der Endstoffmenge von 11 nmol des Feststoffes PF 431396 hydrate zusammen mit dem klassischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) und NaCl-Lösung angesetzt. Einem Teil der NZO Tiere wurde 15 Minuten vor der Blut- und Organentnahme nach finaler Narkose 100 µl der Pyk2-Inhibitor intraperitoneal appliziert. Die Injektionslösung wurde für jeden Versuchstag frisch vorbereitet.

3.3.7 Blutentnahme sowie Blutaufbereitung

Zur Bestimmung der Plasma-Insulin-Konzentration der NZO Tiere mit und ohne Pyk2-Inhibitor mithilfe eines Insulin ELISA wurde den Tieren terminal Blut entnommen. Dieses wurde durch Herzpunktion bei geschlossenem Thorax durchgeführt. Andere Vorgehensweisen wie die Herzpunktion bei bereits geöffnetem Thorax wiesen Einschränkungen bezüglich der Menge des gewonnenen Blutes auf. Nach Gewinnung des Vollblutes mithilfe von mit Heparin gespülten Omicans®-Spritzen wurde dieses in Eppi-Röhrchen mit 1 µl Heparin bei 3000 G für 3 Minuten bei 4 °C in eine Zentrifuge gegeben. Nach Entnahme aus der Zentrifuge wurde vorsichtig unter Abstand zum *Buffy Code* ungefähr 300 µl Plasma in ein zweites Eppi-Röhrchen gegeben, welches bis zur Messung bei -80 °C gelagert wurde.

3.4 Analyse der vaskulären Funktion und Steifigkeit *in-vivo*

Die vaskuläre Funktion *in-vivo* wurde mithilfe von hochauflösendem Ultraschall (Vevo 2100) mit einem Linearschallkopf bei 30-70 MHz untersucht. Hierbei wurden die Veränderungen des Durchmessers eines Gefäßes als Reaktion auf Scherbelastung nach einer Okklusionsphase via Blutdruckmanschette bzw. Cuff analysiert. Weiterhin wurden auch die Veränderungen des Gefäßdurchmessers in der Okklusionsphase dokumentiert. Als physiologische Antwort auf die Okklusion eines Gefäßes war ein Anstieg der Scherbelastung mit infolgedessen Vasodilatation und damit Zunahme des Gefäßdurchmessers zu beobachten. Die Analyse der Steifigkeit der arteriellen Gefäße erfolgte an der A. carotis communis der Mäuse über die indirekte Messung der Pulswellengeschwindigkeit.

3.4.1 Flussmedierte Vasodilatation

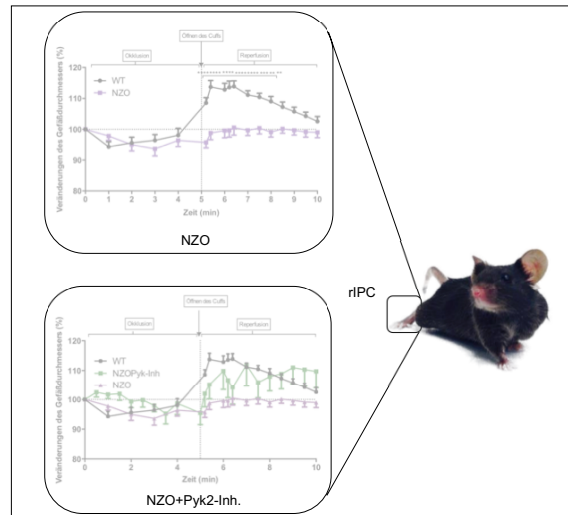


Abbildung 6: Untersuchung der vaskulären Funktion im Rahmen der FMD-Versuche

Schematisch dargestellt ist die Messung der flussmedierten Vasodilatation unter Okklusion und nach Öffnen des Cuffs als Reaktion des Gefäßes pro Zeit mithilfe von hochauflösendem Ultraschall am Hinterlauf der Versuchstiere.

Im Rahmen der FMD-Versuche wurden die Versuchstiere nach der Anästhesieeinleitung in einer Isofluran-gefluteten „Einleitungsbox“ auf einem verstellbaren Untersuchungstisch in Rückenlage fixiert. Die Schnauze der Tiere wurde in eine Vorrichtung gelegt, die eine Anästhesie für die Dauer der FMD-Versuche gewährleistete. Mithilfe von integrierten Sensoren im Untersuchungstisch wurde während der Untersuchung an der Position der Vorder- und Hinterläufe die Herz- und Atemfrequenz sowie die Körpertemperatur abgeleitet. Dieses erlaubte eine Aussage über den Wachheitszustand und das Stresslevel, um gegebenenfalls daraufhin eine Anpassung der Isofluran-Versorgung durchzuführen. Während der Versuche betrug die Isofluran Konzentration im Durchschnitt 1,5-2 %. Bei den NZO waren zur Einleitung z.T. höhere Isofluran MAC-Werte notwendig. Die Versuchstiere wurden im Bereich der Leiste mit Enthaarungscreme und anschließender Rasur für die FMD-Versuche der A. iliaca externa vorbereitet. Zur Inhibition der Pyk2 wurde einem Teil der NZO 15 Minuten vor der FMD-Messung die o.g. Injektionslösung intraperitoneal appliziert.

Versuchsablauf:

1. Anbringen der Blutdruckmanschette bzw. *Cuff* am Oberschenkel und Fixierung des Beines auf einem kleinen Kissen; ggf. Hüfte hochlagern und Bein 90 ° abwinkeln zur optimalen Einstellung des Gefäßverlaufs
2. Einstellung des Schallkopfs in der Halterung in eine waagerechte, leicht gekippte Position zur optimalen Einstellung des Gefäßverlaufs in der Leiste
3. Suche nach Doppelpulsation im Bereich der Leiste oder im *Pulse Wave* (PW) - Mode zur Einstellung des arteriellen Gefäßes
4. Stoppuhr einstellen nach unten abgebildetem Schema (Tbl.1) zur Aufnahme von Sequenzen mit dem Ziel der FMD-Bestimmung
5. Start 5 min Okklusion der A. iliaca externa mit Druckanpassung des *Cuffs* auf 250-320 mmHg
6. Nach 5 min Beginn Reperfusionphase über 5 min bei vollständig geöffnetem *Cuff*

Tabelle 1: Protokoll Messung flussmedierte Dilatation unter Okklusion und nach Öffnen des *Cuffs* in zeitlichen Abständen

Dargestellt sind die Messintervalle mithilfe von hochauflösendem Ultraschall unter Okklusion in B-Mode und nach Öffnen des *Cuffs* in B (b)-und PW (pw)-Mode. (BL=Baseline)

FMD	Dateiname	Zeit
	BL A. iliaca externa	
	BL PW A. iliaca externa	
Stoppuhr starten	Okklusion	
	0,5 b	4:30
	1 b	4:00
	1,5 b	3:30
	2 b	3:00
	2,5 b	2:30
	3 b	2:00
	3,5	1:30
	4 b	1:00
<i>Cuff</i> öffnen, Stoppuhr hochzählen lassen	0 b	20 s vor 0
	20 b	20
	30 pw	30
	40 b	40
	50 pw	50
	60 b	1:00
	70 pw	1:10
	80 b	1:20
	90 pw	1:30

	100 b	1:40
	110 pw	1:50
	120 b	2:00
	130 pw	2:10
	150 b	2:30
	160 pw	2:40
	180 b	3:00
	190 pw	3:10
	210 b	3:30
	220 pw	3:40
	240 b	4:00
	250 pw	4:10
	270 b	4:30
	280 pw	4:40
	300 b	5:00
	310 pw	5:10

3.4.2 Pulswellengeschwindigkeit

Die Messung der Pulswellengeschwindigkeit (PWV) in der A. carotis communis erfolgte nach der oben genannten Vorbereitung der Versuchstiere und der Platzierung des Schallkopfes für einen longitudinalen Anschnitt des Gefäßes. Zur Berechnung der PWV war eine Sequenz proximal und distal der Bifurkation der A. carotis communis als auch die Strecke dazwischen in M-Mode und PW-Doppler notwendig. Orientierend an dem Zeitintervall zwischen der R-Zacke und dem systolischen *Notch* des angeschlossenen EKGs bzw. der Spitze des systolischen Anteils im PW-Doppler konnte der Quotient aus $\frac{s}{t}$ berechnet werden.

3.5 Plasma-Insulin ELISA

Im Labor des Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf wurden die zuvor bei -80 °C gelagerten Plasmaproben von WT sowie NZO mit und ohne Applikation von Pyk2-Inhibitor auf ihre Insulinkonzentration untersucht. Vor dem Beginn der Messung wurde das Insulin (*Mouse*) ultrasensitive ELISA – DRG (EIA – 34440) – Kit ungefähr 1,5 Stunden vorher aus dem 4 °C Kühlraum genommen, damit die Reagenzien bei Versuchsbeginn Raumtemperatur erreichen konnten. Die Plasmaproben wurden auf Eis bereitgestellt. Zur Vorbereitung wurde erstens der Waschpuffer 1X aus dem beigefügten Waschpufferkonzentrat 21X und 1000 ml destilliertem Wasser sowie zweitens die Enzymkonjugat-Lösung 1X aus Enzymkonjugat 11X und Enzymkonjugat-Puffer im Verhältnis von 1:11 angesetzt.

Versuchsablauf:

1. Vorbereitung von *Microplate Wells* für die Calibratoren, die Proben und die Kontrolle
2. Verdünnung der Proben mit Calibrator 0 (Nullstandard)
3. Pipettieren von 25 µl der Calibratoren 0 bis 5, der zuvor verdünnten Proben und der Kontrolle in die *Microplate Wells*
4. Pipettieren von 100 µl der Enzymkonjugat-Lösung 1X in jedes der *Microplate Wells*
5. Nach Verschluss der *Microplate* mit Folie bei 700 RPM und Raumtemperatur 2 Stunden auf den Rüttler
6. Nach 2 Stunden Enzymkonjugat-Lösung 1X aus den *Microplate Wells* werfen
7. Waschen der *Microplate Wells* mit 300 µl Waschpuffer 6x
8. Pipettieren von 200 µl lichtempfindlichem TMB in jedes der *Microplate Wells*
9. Bei Raumtemperatur inkubieren nach Verschluss der *Microplate* mit Alufolie und Gabe in eine Schublade
10. Nach 15 Minuten pipettieren von 50 µl Stop solution in jedes der *Microplate Wells*
11. *Microplate* in iMark™ Microplate Absorbance Reader (BIO-RAD) geben und Messung bei 450 nm für 3 Sekunden durchführen

Die Proben wurden zur Messung probeweise im Verhältnis 1:5 mit dem Calibrator 0 verdünnt. In vielen Fällen war jedoch bei den Plasmaproben eine erneute Messung bei einer Verdünnung von 1:10 oder 1:20 wegen des sehr hohen Insulingehaltes der Proben notwendig. Bei der Kontrolle handelte es sich um im Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf aufgereinigte gesunde Inselzellen des Pankreas. Zum Pipettieren der Reagenzien in die *Microplate Wells* wurde eine geeignete Multipipette verwendet. Zur Messung der Insulinmenge in den Plasmaproben wurde die Microplate Manager® Software verwendet. Vor der Messung wurde die Software für das verwendete Schema hinsichtlich der Calibratoren, der Proben und der Kontrolle sowie des Verdünnungsverhältnisses vorprogrammiert. Abhängig von dem r^2 nach Anpassung eines *Curve Fit Plots* konnten die Daten verwertet werden.

3.6 Western Blot Analyse zur Identifikation von totaler eNOS

Beim Western Blot handelt es sich um eine weit verbreitete analytische Technik zur Identifikation eines Zielproteins aus einer komplexen Mischung von Proteinen eines Gewebes mittels spezifischer Antigen-Antikörper-Interaktion.

3.6.1 Zellyse

Vor der Proteinbestimmung der Aortenproben erfolgte die Lyse des Organs. Dafür wurden die Proben mithilfe eines in flüssigem Stickstoff gekühlten Mörsers vorbereitet. Bei den zerkleinerten Aorten wurde einmalig 200 µl RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor zur Homogenisierung hinzugegeben. Im letzten Schritt wurden die gekühlten Proben für 10 Minuten bei 4 °C ins Ultraschallbad und danach in die Zentrifuge bei 1000 G gegeben.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach einer der kolometrischen Lowry Assay ähnlichen Methode mit dem BCTM Protein Assay der Firma BIO-RAD durchgeführt. Unter der Methode versteht man die Konzentrationsbestimmung einer Substanz durch eine Vergleichsmessung mit einer Farbskala, die wiederum einer bestimmten Konzentration der Substanz entspricht. Bei der Lowry Assay Methode kommt es zur Komplexbildung zwischen Kupfer-(II)-Ionen und Peptidbindungen der Proteine. Die Kupfer-(II)-Ionen werden zu Kupfer-(I)-Ionen reduziert, die wiederum das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau reduzieren. Die Absorption der resultierenden Blaufärbung stellt sich bei einer Wellenlänge von 740 nm photometrisch dar. Über die lineare Regression lässt sich so die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmen. Mithilfe von aufsteigenden Proteinkonzentrationen von 0 mg/ml bis 2 mg/ml aus Bovine Serum Albumin wurde eine Standardreihe angelegt und mit den verdünnten Proben verglichen. Die zuvor gewonnenen Herzlysate wurden mit Millipore H₂O im Verhältnis 1:75, die Aortenlysate im Verhältnis 1:5 verdünnt. Von der Lösung A' wurden 25 µl und von der Lösung B 200 µl auf den Standard sowie auf jede Probe gegeben. Anschließend wurde der Ansatz unter Lichtausschluss 15 Minuten inkubiert und die Absorption bei 740 nm ausgemessen. Sowohl für die Standardreihe als auch für die Proben wurde in der 96- Wells-Platte eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.6.3 Versuchsprotokoll

Nach der Proteinbestimmung erfolgte die Festlegung der Menge an Protein pro Probe, die in die Kammern des Gels eingetragen werden sollte. Um zur Detektion des Zielproteins eine ausreichende Proteinkonzentration zu erhalten, wurden 40 µg Protein pro Probe bestimmt. Von jeder Probe wurde eine ihrer Proteinkonzentration entsprechenden Menge entnommen und nach Vorbereitung mit Millipore H₂O , NuPAGE Sample Buffer 4x und Bolt Sample Reduction Agent zentrifugiert und danach 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Zur späteren Orientierung der aufgetrennten Proteine erfolgte die Applikation von 5 µl MagicMarker XP und 10 µl Novex Sharp Prestained Marker in eine Geltasche eines 7 % Tris-Acetat-Gels. Von den zu bestimmenden Proben wurden 25 µl pro Probe in eine Geltasche eingeführt. Die Laufzeit des Gels im XCell II™ Blot Modul betrug ungefähr 1,5 Stunden bei einer Spannung von 110 Volt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde der Runningpuffer verworfen und das Gel vorsichtig aus dem Plastikrahmen genommen, um es für den *Semi-Wet-Transfer* auf eine vorbereitete 0,2 µm Nitrocellulose Membran abzulegen. Dazu wurde das Gel auf die Membran zwischen Whatman-Paper und Schwämmen mit Transferpuffer für 1 Stunde bei einer Spannung von 30 Volt erneut in das XCell II™ Blot Modul gegeben. Für den Fixierungsprozess wurde die Membran zunächst getrocknet und gemäß der aufgetrennten Proteinabschnitte, die mit dem Novex Sharp Prestained Marker sichtbar gemacht wurden, zurechtgeschnitten. Nach Aktivierung der Membranstücke mit Millipore H₂O konnten sie in *Blocking solution* auf der Basis von Bovine Serum Albumin und *Tris buffered saline* bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Rüttler fixiert werden. Für die Proteinbestimmung der totalen endothelialen NO-Synthase (teNOS) wurden die Membranen vor Fixierung passend zurechtgeschnitten, um eine Detektion der Zielproteine um das molekulare Gewicht von 133 kDa zu gewährleisten. Im Anschluss an den Fixierungsprozess kam es zur Inkubation der Membranen mit dem Primär-Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Rüttler. Der Primär-Antikörper Anti-teNOS (*Mouse*) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 mit *Blocking solution* auf die Membran appliziert. Das *loading control*-Protein Anti-β-Aktin für Aorten wurde in der Verdünnung von 1:5000 mit *Blocking solution* auf die Membran gegeben. Die Banden von anti-Aktin stellten eine Kontrolle dafür dar, dass gleiche Mengen an Aortensubstanz für die einzelnen Versuchstiere verwendet wurden, und gewährleisteten die Vergleichbarkeit der anti-teNOS Banden.

Am nächsten Tag wurden die Membranen unter kontinuierlichem Rütteln auf Raumtemperatur gebracht, die Primär-Antikörper verworfen und die Membranen mit TBS gewaschen, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Der Sekundär-Antikörper *Mouse Anti-goat* (HRP) musste Spezies-abhängig von dem Primär-Antikörper im üblichen Verdünnungsverhältnis von 1:5000 mit *Blocking solution* für eine Stunde auf die Membranen bei Raumtemperatur gegeben werden. Anschließend kam erneut TBS auf die Membranen, bevor sie mithilfe von SuperSignal Chemolumineszenz-Lösung im ImageQuant LAS4000 (GE) Gerät mit der Software ImageQuant untersucht wurden.

3.7 Datenauswertung

Im Rahmen der Aortenringversuche wurden die Dosis-abhängigen Reaktionen auf die vasoaktiven Substanzen mithilfe der Software LabChart 8 aufgezeichnet. Die Rohdaten wurden in Microsoft Excel folgendermaßen verarbeitet: Bei ACh-Applikation wurde die einzelne Dosis-spezifische Reaktion zur Kraft am Zeitpunkt 0 (10 mN) und zur allerersten bzw. am niedrigsten dosierten Dosis-spezifischen Reaktion auf ACh ins Verhältnis gesetzt $(F_{AChx} - F_{t0}) / (F_{ACh\ min} - F_{t0})$. Bei PHE-Applikation wurde die einzelne Dosis-spezifische Reaktion zur Kraft nach der Waschphase auf ACh, zur KCl-Gabe und zur Kraft am Zeitpunkt 0 (10 mN) in Bezug gesetzt $(F_{PHEx} - F_{tW}) / (F_{KCl} - F_{t0})$. Bei SNP-Applikation wurde die einzelne Dosis-spezifische Reaktion zum Mittelwert der Kraft vor der PHE- und nach SNP-Applikation, zur aller letzten bzw. am höchsten dosierten Dosis-spezifischen Reaktion von PHE und zur Kraft am Zeitpunkt 0 (10 mN) in Bezug gesetzt $(F_{SNPx} - F_{meanW}) / (F_{PHE\ max} - F_{t0})$. Im Idealfall ergibt sich für jedes Versuchstier für jede Dosis-spezifische Reaktion ein technisches Replikat als Mittelwert aus den Messungen von 3 Aortenringen.

Als Gründe gegen eine Verwertung der Daten wurden Unregelmäßigkeiten im Versuchsablauf z.B. Ausfall der Begasung der Aorten oder eine unabsichtliche Schädigung der Aortenstücke bei der Präparation, sowie eine große Differenz der Rohdaten bei einem der 3 thorakalen Aortenstücke einer Maus zu den zwei anderen mit Standardabweichungen (SD) >15 definiert.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die verarbeiteten Daten aus den Organbadversuchen mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 6 analysiert. Der Versuchsaufbau der Aortenringversuche enthält wiederholte Messungen der abhängigen Variablen im Bezug auf das Versuchstier, wobei Prism eine Datenanalyse nach *grouped*

table, repeated measurement two-way ANOVA – matched values stacked empfiehlt. Bei z.T. fehlenden Messwerten z.B. bei Unregelmäßigkeiten im Versuchsablauf sowie hier dem Vorliegen von technischen Replikaten anstelle von Rohdaten war die genannte Analyse bei Graphpad Prism nicht möglich. Da es sich ebenso um pharmakologische Daten im Sinne von Dosis bzw. Konzentrations-Wirkungs-Kurven handelt, erfolgte eine Analyse als *nonlinear regression, dose-response – stimulation, equation: log(agonist) vs. response*. Bei den Aortenringversuchen von Nrf2 KO/ WT und NZO/ WT wurde eine statistische Bewertung mit einer *Ordinary two-way ANOVA*, einer Form der zweifaktoriellen Varianzanalyse, durchgeführt. Hierbei stellen die 2 Versuchstiergruppen einen Faktor und die Gabe von vasoaktiven Substanzen den anderen Faktor, der Einfluss auf die Dosis-Wirkungs-Kurven hat, dar. Bei >2 Versuchstiergruppen wie bei NZO/NZO+Pyk2-Inhibitor/WT muss formal eine dreifaktorielle Varianzanalyse verwendet werden, über die jedoch das verwendete Statistikprogramm Graphpad Prism 6 nicht verfügt.

Im Rahmen der zweifaktoriellen ANOVA werden drei p-Werte berechnet, die drei Nullhypothesen überprüfen; es wird unterschieden zwischen einem *Interaction, Column* und *Row* p-Wert. Der *Column* p-Wert vergleicht die Mäusespezies (WT, NZO, Nrf2 KO) oder die Behandlung (NZO, NZO+Pyk2-Inhibitor). Der *Row* p-Wert steht für die Konzentrationen der Pharmaka. Der bedeutendste p-Wert ist jedoch der *Interaction* p-Wert, der die Frage beantwortet, ob die Änderungen der Konzentrationen (*Rows*) für alle Mäusespezies (*Column*) gleich sind. Als statistischer Test hinterfragt der Sidak Post-hoc-Test, ob die Unterschiede zwischen den Mauspezies aus der zweifaktoriellen Varianzanalyse/ *two-way ANOVA* tatsächlich signifikant ausfallen. Ein Niveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

Die FMD- und die PWV-Messungen wurden mithilfe des Ultraschall-Geräts Vevo 2100 aufgezeichnet und die Sequenzen bzw. Einzelbilder mit dem Programm VevoLab ausgewertet. Die ausgemessenen Gefäßdurchmesser der einzelnen Sequenzen beim FMD wurden mithilfe von Excel mit dem Gefäßdurchmesser bei $t = 0$ ins Verhältnis gesetzt. Bei Graphpad Prism 6 wurde zur Auswertung der FMD-Daten eine ein- oder zweifaktorielle ANOVA mit Sidak oder Tukey Post-hoc-Test durchgeführt. Die indirekte Pulswellengeschwindigkeitsmessung wurde als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) mithilfe eines ungepaarten t-Test analysiert. Ein Niveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

Zur Messung der Insulinmenge in den Plasmaproben wurde die Microplate Manager® Software verwendet. Statistische Analysen wurden mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und eines Tukey Post-hoc-Tests bei der Annahme von $\alpha = 0,05$ ausgeführt.

Die Western Blot Analyse zur Anpassung von Helligkeit und Kontrast sowie zur quantitativen Auswertung der Banden wurde mithilfe der Software Image Studio™ Lite durchgeführt. Zur quantitativen Untersuchung des Signals der teNOS Bande erfolgte mithilfe von Graphpad Prism 6 eine statistische Analyse mithilfe eines ungepaarten t-Tests. Ein Niveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche: Organbad

Zur Untersuchung der endothelialen Funktion *ex-vivo* diente ein angepasstes Laborinternes Protokoll zur kumulativen Applikation Endothel-abhängiger und -unabhängiger vasoaktiver Substanzen in das Organbad. Die Dosis-abhängige Reaktion der isolierten Aortenringe auf den Endothel-abhängigen Vasodilatator Acetylcholin (ACh), den Endothel-unabhängigen Vasokonstriktor Phenylephrin (PHE) und den Endothel-unabhängigen Vasodilatator sowie NO-Donor Nitroprussid-Natrium (SNP) wurde mithilfe eines Myographen dokumentiert. Insgesamt wurden vier Versuchstiergruppen untersucht: Nrf2 KO, unbehandelte NZO, mit Pyk2-Inhibitor behandelte NZO sowie WT.

Als Vorversuch erfolgte eine EC_{50} -Bestimmung der WT und Nrf2 KO bei PHE-Applikation, um eine Spezies-spezifische Vasokonstriktion zu ermitteln. Zur Überprüfung der Vitalität der Aortenringe wurde vor jedem Organbadversuch eine KCl-Applikation durchgeführt und bei Ausbleiben einer adäquaten Reaktion der Aortenring für den weiteren Versuch ausgeschlossen.

4.1.1 Nrf2 KO ohne spezifische EC_{50} bei Phenylephrin-Applikation

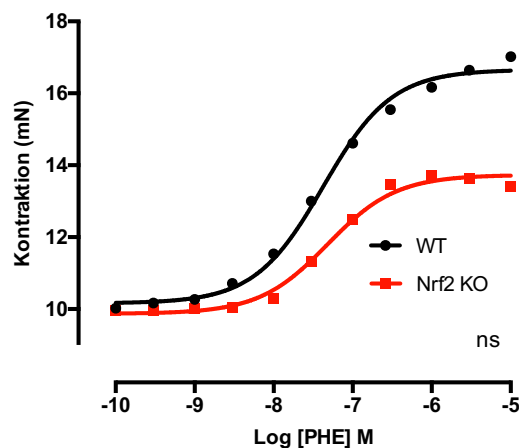


Abbildung 7: Mausstamm-spezifische EC_{50} bei PHE-Applikation

PHE induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven der Aortenringe von WT und Nrf2 KO auf Verdünnungsstufen von 0,1 nM bis 10 μ M, 10 mN als Ausgangsniveau. Werte dargestellt als Mittelwerte. (WT: n=3; Nrf2 KO: n=4; ungepaarter t-Test $p > 0,05$, ns)

Bei der EC_{50} handelt es sich um die mittlere effektive Konzentration einer Substanz, die eine halbmaximale Reaktion zwischen der Messbasis und der maximalen Reaktion ergibt. Die EC_{50} von PHE gilt als Spezies-abhängig und wurde als Orientierung für die PHE-Bolus-Gabe in den Organbadversuchen verwendet.

Zweck des PHE-Bolus ist die Gewährleistung einer suffizienten Präkonstriktion der Aortenringe bei den verschiedenen Mäusestämmen, um auf die anschließende kumulative ACh-Applikation eine möglichst vollständige Relaxation zu erreichen. Es wurden dafür Verdünnungsstufen von 0,1 nM bis 10 μ M PHE hergestellt. Hinsichtlich der EC_{50} konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT und den Nrf2 KO (Abb. 7) beschrieben werden: Bei gleicher Messbasis lag die maximale Reaktion bei den Mäusestämmen zwar um 3 nM auseinander, jedoch ergaben sich keine Signifikanzen im ungepaarten t-Test ($p = 0,1264$). Mit zunehmenden kumulativen PHE-Konzentrationen ab $\log(\text{PHE}) -8$ zeigte sich eine geringer ausgeprägte Kontraktionsreaktion bei den Nrf2 KO im Vergleich zu den WT. Die EC_{50} lag rechnerisch mithilfe des Statistikprogramms Graphpad Prism für die WT bei $4,239 \cdot 10^{-8}$ und für die Nrf2 KO bei $4,806 \cdot 10^{-8}$.

Aus diesen Ergebnissen ergab sich für die Versuchstiergruppen ein PHE-Bolus von 80 - 100 μ l einer 10^{-6} verdünnten Lösung, die einer Konzentration im Organbad von 0,4 – 0,6 μ M entspricht. Versuche unserer Kooperationspartner konnten zeigen, dass die EC_{50} bei NZO derjenigen der WT entspricht.

4.1.2 Einschluss der Aortenringe nach Vitalitätsprüfung

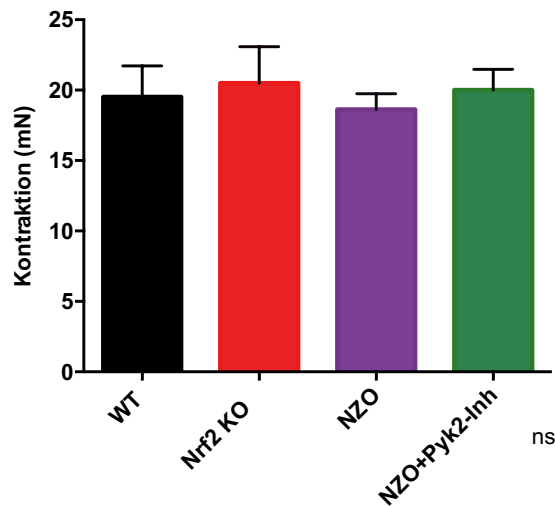


Abbildung 8: Vitalitätsprüfung bei KCl-Applikation

Kontraktion der Aorten der Versuchstiergruppen auf KCl-Gabe in mN. (WT: n=13; Nrf2 KO: n=10; NZO: n=11; NZO+Pyk2-Inhibitor: n=11; Mittelwerte \pm SEM; einfaktorielles ANOVA, Sidak Post-hoc-Test $p > 0,05$, ns)

Zu Anfang eines jeden Aortenringversuches fand die Überprüfung der Aorten aller Versuchstiergruppen hinsichtlich ihrer Vitalität statt, um bereits initial grobe Verletzungen der Gefäße beim Präparieren oder Transferieren von der Petrischale an die Drähte des Myographie-Geräts zu erkennen. Dafür wurde nach der Äquilibrationsphase 80 mM KCl ins Organbad appliziert und die Kontraktionsfähigkeit der Aorten überprüft. Da sich keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf KCl zwischen den Versuchstiergruppen ($p = 0,0510$) ergaben, konnten alle Aorten, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wurden, in die weitere Auswertung der endothelialen Funktion eingeschlossen werden (Abb. 8). Aorten von bereits initial auffälligen Versuchsdurchläufen u.a. bei Ausfall der Begasung der Aorten oder bei deutlicher makroskopischer Schädigung der Aortenstücke bei der Präparation fanden keinen Zugang zur Vitalitätsprüfung und wurden daher hier nicht genannt.

4.2 Erhaltene endotheliale Funktion *ex-vivo* bei Nrf2 KO

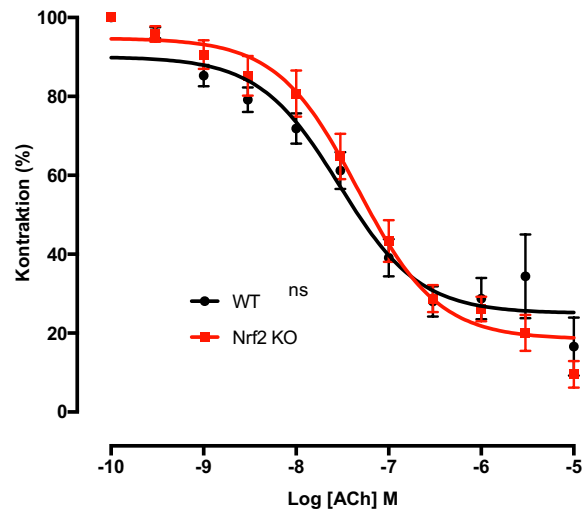


Abbildung 9: Erhaltene ACh-abhängige Vasodilatation bei Nrf2 KO

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT und Nrf2 KO Aorten auf 0,1 nM bis 10 μ M kumulative ACh-Applikation. (WT: n=10; Nrf2 KO: n=13; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA, Sidak Post-hoc-Test $p > 0,05$, ns)

Zur Untersuchung der Endothel-abhängigen Vasodilatation wurde ACh kumulativ 0,1 nM bis zu 10 μ M, nach Vorkontraktion durch einen PHE-Bolus, siehe EC₅₀, appliziert. Es lag zu keinem Zeitpunkt in der Dosis-Wirkungs-Kurve von ACh ein signifikanter Unterschied zwischen den WT und den Nrf2 KO vor. Im Durchschnitt dilatierten die Aorten der WT auf 26,7 % und die der Nrf2 KO auf 19,2 % im Bezug auf die Vorkontraktion durch PHE.

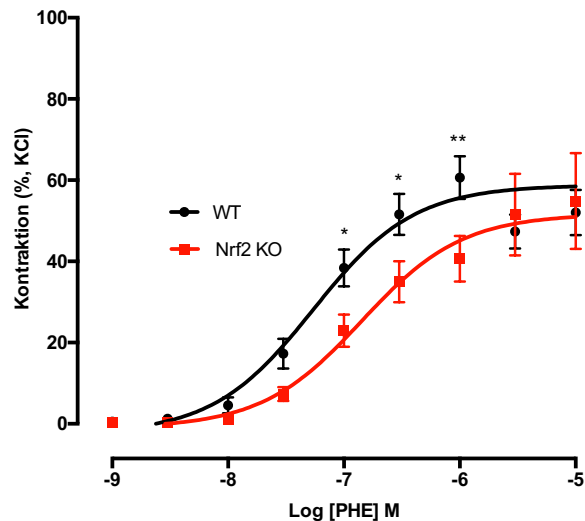


Abbildung 10: Eingeschränkte PHE-abhängige Vasokonstriktion bei Nrf2 KO

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT und Nrf2 KO Aorten auf 0,1 nM bis 10 μ M kumulative PHE-Applikation. (WT: n=13; Nrf2 KO: n=10; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA * $p \leq 0,05$, Sidak Post-hoc-Test * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$)

Die Reaktion der Nrf2 KO Mäusaorten auf PHE ergab im Vergleich zu den WT Aorten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Kontraktion (*Interaction* $p = 0,0284$). Im Post-hoc-Test konnte bezogen auf den Bereich der logarithmierten Dosierung log (PHE)-7 bis -6 Differenzen ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,001$) dargestellt werden. Hinsichtlich der α -adrenergen Stimulation durch PHE zeigte sich bei den Nrf2 KO eine eingeschränkte Kontraktionsreaktion. Bei einer maximalen Applikation von PHE 10 μ M wiederum waren die Aorten der WT im Durchschnitt auf 52,1 % und die der Nrf2 KO auf 54,9 % kontrahiert.

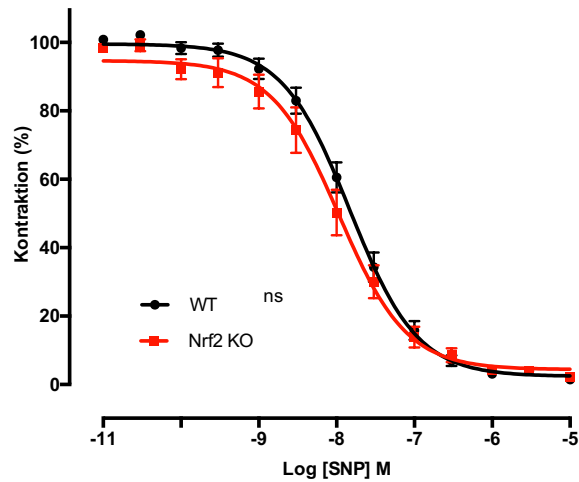


Abbildung 11: Erhaltene SNP-abhängige Vasodilatation bei Nrf2 KO

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT und Nrf2 KO Aorten auf 0,01 nM bis 10 μ M kumulative SNP-Applikation. (WT: n=13; Nrf2 KO: n=10-13; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA, Sidak Post-hoc-Test $p > 0,05$, ns)

Die Endothel-unabhängige Vasodilatation der Aorten wurde mithilfe des NO-Donors Nitroprussid-Natrium in einer Konzentration von 0,01 nM bis 10 μ M im vorkontrahierten Zustand überprüft. Es ergaben sich zwischen WT und Nrf2 KO keine signifikanten Unterschiede.

4.3 Signifikante endotheliale Dysfunktion in NZO *ex-vivo* und *in-vivo*

4.3.1 Verminderte Endothel-abhängige Vasodilatation der NZO Aorten

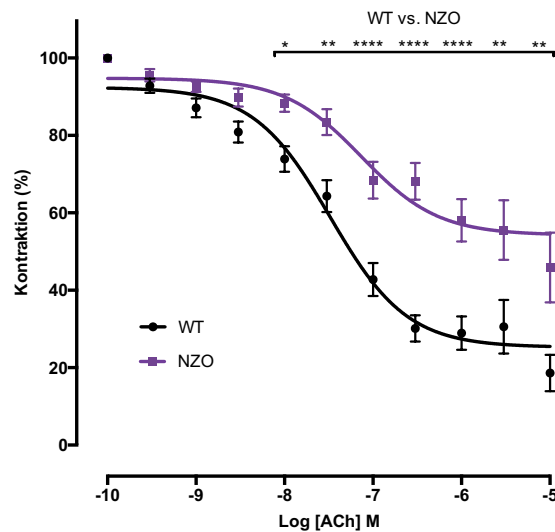


Abbildung 12: Signifikant verminderte ACh-abhängige Vasodilatation bei NZO

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT und NZO Aorten auf 0,1 nM bis 10 μ M kumulative ACh-Applikation. (WT: n=16; NZO: n=11; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA **** $p \leq 0,0001$, Sidak Post-hoc-Test * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$)

Zur Untersuchung der Endothel-abhängigen Vasodilatation der NZO *ex-vivo* wurde ACh kumulativ von 0,1 nM bis 10 μ M ins Organbad auf die bereits mit PHE präkonstringierten Aortenringe appliziert. Die Endothel-abhängige Vasodilatation präsentierte sich bei den NZO im Vergleich zum WT signifikant vermindert (zweifaktorielle ANOVA $p \leq 0,0001$, siehe Abbildung 12). Bei geringen kumulativen ACh-Konzentrationen ergaben sich beim Post-hoc-Test keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf ACh zwischen den Versuchstiergruppen. Ab einer logarithmierten Konzentration von log (ACh) -8 bis -5, die einer Dosis von 10 nM bis 10 μ M entspricht, zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede (Sidak Post-hoc-Test $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,0001$) in der Vasodilatation zwischen den Versuchstiergruppen.

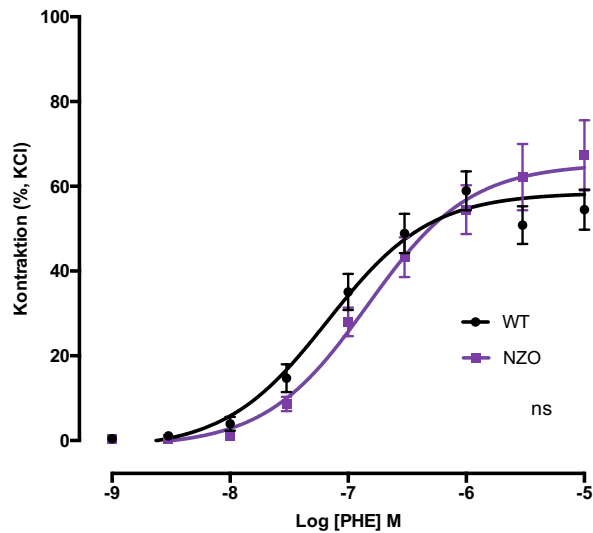


Abbildung 13: Erhaltene PHE-abhängige Vasokonstriktion bei NZO

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT und NZO Aorten auf 0,1 nM bis 10 μ M kumulative PHE-Applikation. (WT: n=16; NZO: n=11; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA, Sidak Post-hoc-Test $p > 0,05$, ns)

Nach einer Waschphase wurde zur Überprüfung der Endothel-unabhängigen Vasokonstriktion PHE kumulativ 0,1 nM bis 10 μ M in die Organbäder appliziert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Dosis-Wirkungs-Kurven auf PHE-Gabe zwischen den WT und den NZO (Abb. 13).

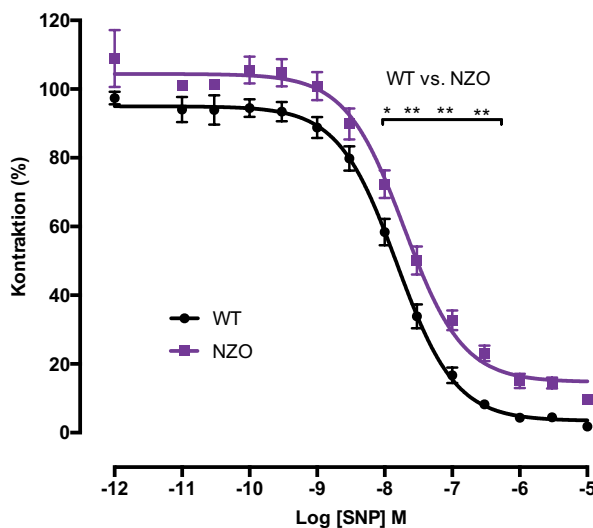


Abbildung 14: Erhaltene SNP-abhängige Vasodilatation bei NZO

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT und NZO Aorten auf 0,01 nM bis 10 μ M kumulative SNP-Applikation. (WT: n=16; NZO: n=11; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA $p > 0,05$, Sidak Post-hoc-Test * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

Die SNP-bedingte Reaktion der mit PHE präkonstringierten Aorten diente zur Überprüfung der maximalen Endothel-unabhängigen Vasodilatation. Der exogene NO-Donor wurde kumulativ in einer Konzentration von 0,01 nM bis 10 µM in die Organbäder appliziert. Es zeigten sich einige geringfügige Unterschiede im Post-hoc-Test bei log (PHE) -8 bis -6,5 (Sidak Post-hoc-Test $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$) zu den WT. Der *Interaction* p-Wert ($p = 0,9779$), als entscheidender p-Wert im Rahmen der zweifaktoriellen ANOVA, sprach jedoch gegen signifikante Differenzen zwischen den Versuchstiergruppen hinsichtlich der Endothel-unabhängigen Vasodilatation (Abb.14).

4.3.2 Verminderte vaskuläre Funktion *in-vivo* bei NZO

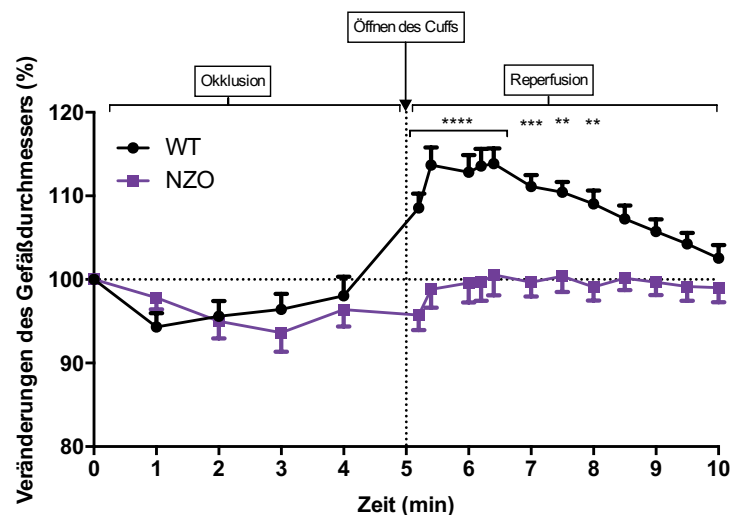


Abbildung 15: Eingeschränkte flussmedierte Vasodilatation nach Okklusion bei NZO

Diameter-Veränderung in Okklusion und Reperfusion der A. iliaca externa von WT und NZO. (WT: n=19; NZO: n=21; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA **** $p \leq 0,0001$, Sidak Post-hoc-Test * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

Conclusiv zu den Organbadversuchen wurden zur Überprüfung der Endothel-abhängigen Funktion *in-vivo* vor und nach der Okklusion der A. iliaca externa Veränderungen des Gefäßdurchmessers dokumentiert. Die statistische Auswertung ergab signifikante Differenzen zwischen den Gefäßdurchmessern der WT und NZO nach Öffnen des *Cuffs* im Rahmen der Reperfusion (zweifaktorielle ANOVA $p \leq 0,0001$). Es wurde eine signifikant verminderte Vasodilatation von Minute 1 bis 3 im Rahmen der Reperfusion bei den NZO im Vergleich zur Kontrollgruppe dokumentiert (Sidak Post-hoc-Test $p \leq$

0,05, $p \leq 0.01$); die physiologische Vasodilatation als Reaktion auf Scherbelastung, hier durch Anlage eines *Cuffs*, zeigte sich eingeschränkt (Abb.15).

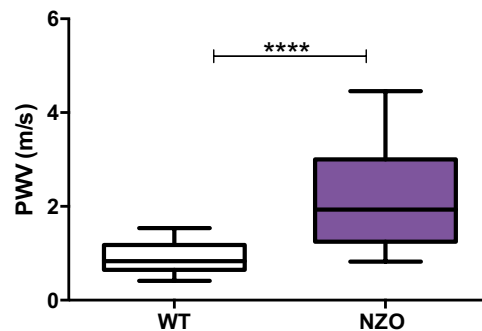


Abbildung 16: Signifikant erhöhte Pulswellengeschwindigkeit bei NZO

Indirekte PWV-Berechnung in der A. carotis communis von WT und NZO. (WT: n=20; NZO: n=19; Mittelwerte \pm SEM; ungepaarter t-Test **** $p \leq 0,0001$).

Es zeigte sich eine ausgeprägte vaskuläre Steifigkeit bei den NZO im Vergleich zu den WT, die sich durch signifikante Differenzen der Pulswellengeschwindigkeit in der A. carotis communis ergab (Mittelwerte: WT: 0,91 m/s, NZO: 2,13 m/s; ungepaarter t-Test $p \leq 0,0001$).

4.3.3 Verminderte teNOS in den NZO-Aorten

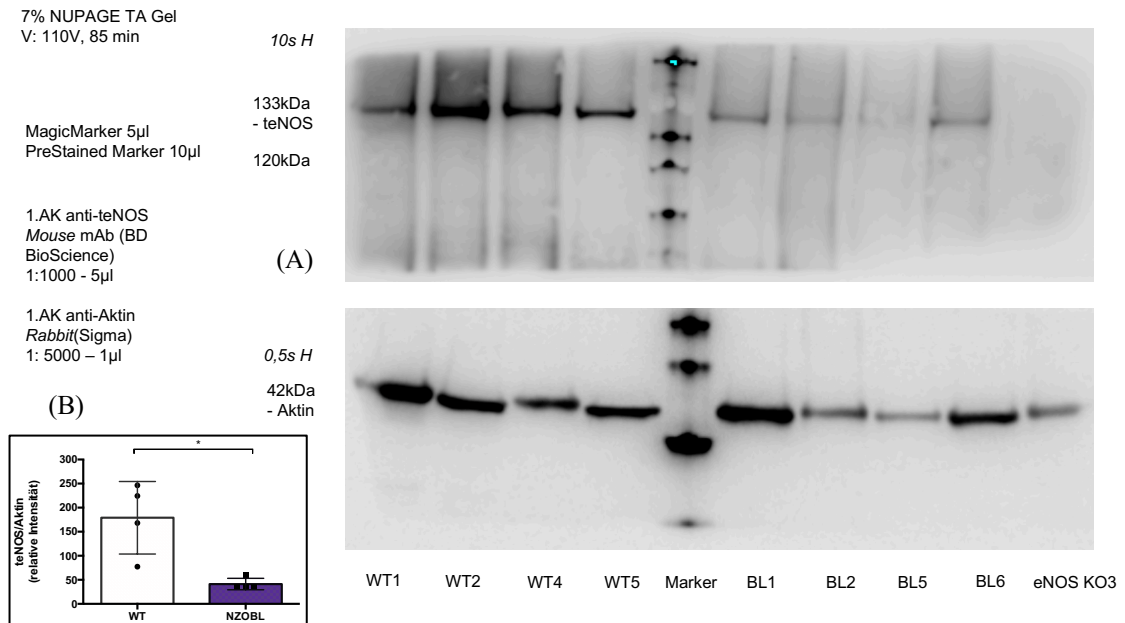


Abbildung 17: Signifikant verminderte teNOS bei NZO

(A) Repräsentativer Western Blot von teNOS (oberes Feld) genormt an Aktin (unteres Feld) und (B) Densitometrische Analyse der eNOS-Expression in der Aorta von WT und NZO. (WT und NZO=BL: jeweils n=4; eNOS KO: n=1; Mittelwerte \pm SEM; ungepaarter t-Test * $p \leq 0,05$). AK=Antikörper

Die Western Blot Analyse ergab eine signifikant verminderte Expression der totalen eNOS in den Aorten der NZO im Vergleich zu den WT. Quantitativ wurde dieses in der Analyse der Banden mithilfe von Image Studio Lite 5.0 und nach einem ungepaarten t-Test deutlich ($p \leq 0,05$). Es wurden 4 WT (WT1, 2, 4, 5), 4 NZO (BL1, 2, 5, 6) und eine eNOS KO (eNOS KO3) Mauseorta verwendet, die einzelnen Mausindividuen zuzuordnen sind (Abb.17 A, B).

4.4 Partielle Wiederherstellung der endothelialen Funktion bei NZO+Pyk2-Inhibitor

4.4.1 Verbesserte ACh-abhängige Vasodilatation bei NZO+Pyk2-Inhibitor

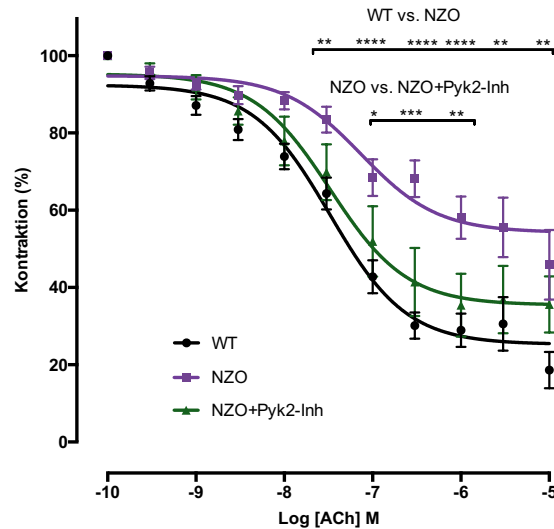


Abbildung 18: Partielle Wiederherstellung der Vasodilatation bei NZO+Pyk2-Inhibitor

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT, NZO und NZO+Pyk2-Inhibitor Aorten auf 0,1 nM bis 10 μ M kumulative ACh-Applikation. (WT: n=16; NZO: n=11; NZO+Pyk2-Inhibitor: n=11; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA ** $p \leq 0,01$, Sidak Post-hoc-Test * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$)

Nach pharmakologischer Pyk2-Inhibition durch intraperitoneale Injektion von PF 431396 hydrate erfolgte die Untersuchung der Endothel-abhängigen Vasodilatation, damit der eNOS-abhängigen Vasodilatation, durch die kumulative Gabe von ACh. Bei geringen ACh-Konzentrationen waren im Post-hoc-Test keine Unterschiede in der Reaktion auf ACh zwischen den Versuchstiergruppen festzustellen. Ab einer logarithmierten Konzentration von log (ACh) -7,5 kam es jedoch zu signifikanten Unterschieden in der Vasodilatation zwischen den Versuchstiergruppen: Erstens die Endothel-abhängige Vasodilatation war bei den NZO im Vergleich zu den WT signifikant vermindert (s. Abb. 12). Zweitens die Dosis-Wirkungs-Kurve der NZO mit Pyk2-Inhibitor zeigte bei höheren ACh-Konzentrationen ab log (ACh) -7 im Vergleich zu den unbehandelten NZO signifikante Veränderungen (Sidak Post-hoc-Test $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$). In conclusio ergab sich eine partielle Wiederherstellung der Endothel-abhängigen Vasodilatation unter Pyk2-Inhibition mit Annäherung der Dosis-Wirkungs-Kurve an die der WT. Im Durchschnitt dilatierten die Aorten der unbehandelten NZO bis auf 45,9 % und die der NZO mit Pyk2-Inhibitor bis auf 35,6 %.

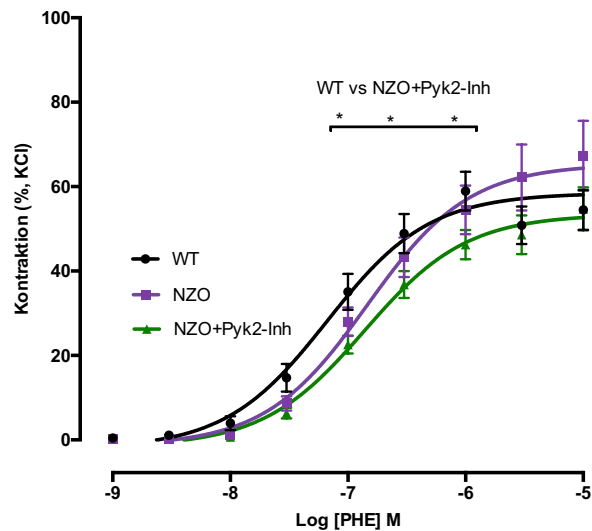


Abbildung 19: Erhaltene PHE-abhängige Vasokonstriktion bei NZO+Pyk2-Inhibitor

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT, NZO und NZO+Pyk2-Inhibitor Aorten auf 0,1 nM bis 10 μ M kumulative PHE-Applikation. (WT: n=16; NZO: n=11; NZO+Pyk2-Inhibitor: n=11; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA $p > 0,05$, Sidak Post-hoc-Test * $p \leq 0,05$)

Die Endothel-unabhängige Vasokonstriktion auf PHE zeigte zwar im Post-hoc-Test einige Unterschiede (log (PHE) -7 bis -6, $p \leq 0,05$) zwischen den Versuchstiergruppen, der *Interaction* p-Wert sprach jedoch gegen signifikante Differenzen ($p = 0,1747$). Im Durchschnitt kontrahierten die Aorten der unbehandelten NZO bis auf 67,3 %, die der NZO mit Pyk2-Inhibitor bis auf 54,7 % der Grundkraft zum Zeitpunkt 0 (10 mN).

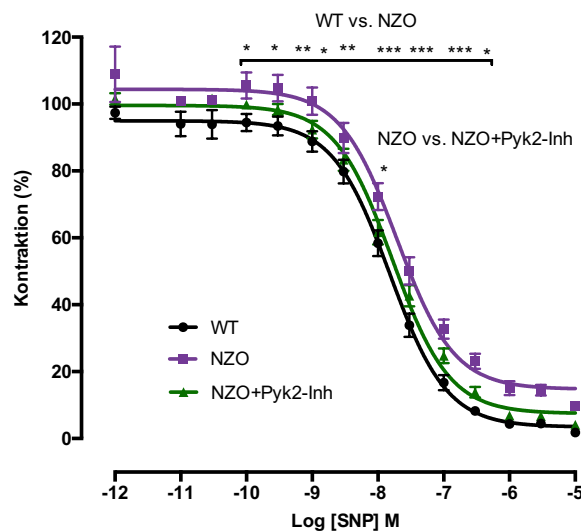


Abbildung 20: Erhaltene SNP-abhängige Vasodilatation bei NZO+Pyk2-Inhibitor

Dosis-Wirkungs-Kurven von WT, NZO und NZO+Pyk2-Inhibitor Aorten auf 0,01 nM bis 10 μ M kumulative SNP-Applikation. (WT: n=16; NZO: n=11; NZO+Pyk2-Inhibitor: n=11; Mittelwerte \pm SD; zweifaktorielle ANOVA $p > 0,05$, Sidak Post-hoc-Test * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Die Endothel-unabhängige Vasodilatation auf SNP ergab im Post-hoc-Test nach Sidak signifikante Unterschiede zwischen WT und unbehandelten NZO (log (SNP) -10 bis -6, $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$). Weiterhin fiel ein einzelner geringfügiger Unterschied (log (SNP) -8, $p \leq 0,05$) von NZO+Pyk2-Inhibitor zu unbehandelten NZO auf. In der statistischen Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA (*Interaction* $p = 0,9988$) konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen dokumentiert werden. Während die WT bei der höchsten Konzentration von SNP komplett dilatierten, fehlten bei den Aorten der NZO 9,6 % und bei den der NZO+Pyk2-Inhibitor 4,1 % bis zur kompletten Relaxation.

4.4.2 Verbesserte vaskuläre Funktion bei NZO+Pyk2-Inhibitor

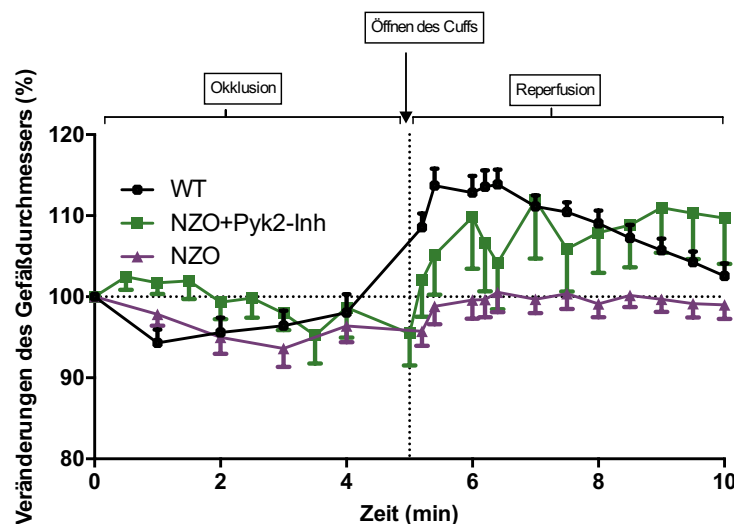


Abbildung 21: Partielle Wiederherstellung der Vasodilatation nach Okklusion bei Pyk2-Inhibition

Diameter-Veränderung in Okklusion und Reperfusion der A. iliaca externa von WT und NZO mit und ohne Pyk2-Inhibitor. (WT: n=19; NZO: n=21; NZO+Pyk2-Inhibitor: n=10; Mittelwerte \pm SD; einfaktorielle ANOVA *** $p \leq 0,001$, Tukey Post-hoc-Test: WT vs. NZO *** $p \leq 0,001$, WT vs. NZO+Pyk2-Inhibitor ns, NZO vs. NZO+Pyk2-Inhibitor ** $p \leq 0,01$)

Die Untersuchung der flussmedierten Dilatation und Pulswellengeschwindigkeit mithilfe von hochauflösendem Ultraschall an der A. iliaca externa sowie A. carotis communis wurde nach Pyk2-Inhibitor Applikation zur Korrelation der Ergebnisse aus den Aortenringversuchen verwendet. Es zeigte sich eine partielle Wiederherstellung der Vasodilatation nach Okklusion bei den NZO+Pyk2-Inhibitor im Vergleich zu den unbehandelten NZO (einfaktorielle ANOVA $p = 0,0003$, Tukey Post-hoc-Test: NZO vs.

NZO+Pyk2-Inhibitor $p \leq 0.01$). Zwischen den WT und NZO+Pyk2-Inhibitor ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

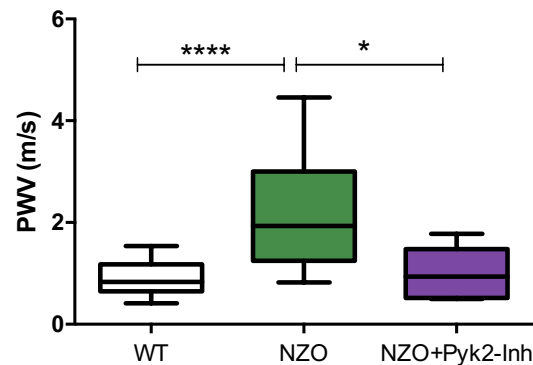


Abbildung 22: Signifikant verminderte Gefäßsteifigkeit bei NZO+Pyk2-Inhibitor

Indirekte PWV-Berechnung in der A. carotis communis von WT, NZO mit und ohne Pyk2-Inhibitor. (WT: n=20; NZO: n=19; NZO+Pyk2-Inhibitor: n=7; Mittelwerte \pm SEM; ungepaarter t-Test: WT vs. NZO **** $p \leq 0,0001$, NZO vs. NZO+Pyk2-Inhibitor * $p \leq 0,05$)

Bei der indirekten Berechnung der Pulswellengeschwindigkeit in der A. carotis communis präsentierte sich eine partielle Wiederherstellung der Gefäßfunktion und damit eine verminderte Gefäßsteifigkeit bei den NZO+Pyk2-Inhibitor. Es konnte im ungepaarten t-Test ein signifikanter Unterschied zwischen der PWV der WT und der NZO ($p \leq 0,0001$) sowie zwischen den behandelten und unbehandelten NZO ($p \leq 0,05$) dokumentiert werden. Bei den NZO+Pyk2-Inhibitor lag im Durchschnitt eine PWV von 1,001 m/s vor.

4.4.3 Erhöhte Plasma-Insulinspiegel bei NZO

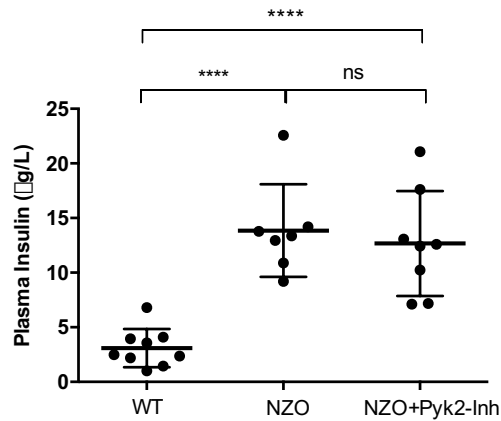


Abbildung 23: Signifikant erhöhte Plasma-Insulinspiegel bei NZO

Plasma-Insulinspiegel in WT und NZO mit und ohne Pyk2-Inhibitor. (WT: n=9; NZO: n=7; NZO+Pyk2-Inhibitor: n=8; Mittelwerte \pm SD; ungepaarter t-Test **** $p \leq 0,0001$, einfaktorische ANOVA; Tukey Post-hoc-Test: WT vs. NZO **** $p \leq 0,0001$, WT vs. NZO+Pyk2-Inhibitor **** $p \leq 0,0001$, NZO vs. NZO+Pyk2-Inhibitor $p > 0,05$, ns)

Der ultrasensitive Insulin ELISA diente primär als diagnostischer Beweis für das Vorliegen einer kompensatorischen Hyperinsulinämie bei peripherer Insulinresistenz der NZO. Für die drei Versuchstiergruppen ergaben sich im Durchschnitt folgende Plasma-Insulinwerte: WT (n = 9) 3,12 ng/ml, NZO (n = 7) 13,87 ng/ml und NZO+Pyk2-Inhibitor (n = 8) 12,66 ng/ml. Es lagen damit signifikant erhöhte Plasma-Insulinspiegel bei den NZO unabhängig von PF 431396 hydrate im Vergleich zu den WT vor (ungepaarter t-Test $p \leq 0,0001$). Es konnte gezeigt werden, dass die einmalige Pyk2-Inhibitor Applikation keinen Einfluss auf die quantitative Menge an Plasma-Insulin der Versuchstiere hatte.

4.4.4 Expression der teNOS unabhängig von Pyk2-Inhibition

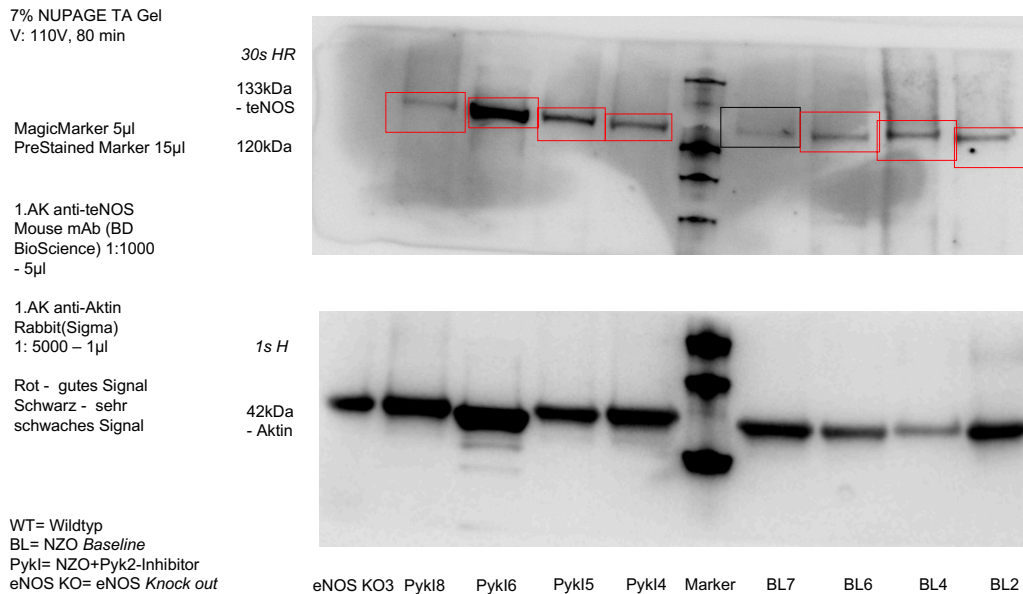


Abbildung 24: teNOS Proteinanteil bei NZO unabhängig von Pyk2-Inhibition

Western Blot Analyse von NZO mit (n=4) und ohne Pyk2-Inhibitor Gabe s. BL (n=4) sowie von eNOS KO Mausarten (n=1). Darstellung der Banden von Aktin und teNOS. Markierungen: schwarz=nicht auswertbar, rot=deutlich eingeschränkte Qualität

Bei der Western Blot Analyse der Aorten ergab sich orientierend der Anhalt für eine einheitliche Expression der teNOS zwischen den NZO mit oder ohne Pyk2-Inhibitor Applikation. Der Antikörper anti-teNOS *Mouse* ergab hinsichtlich der Bande bei 133 kDa zwischen den behandelten wie unbehandelten NZO keine Unterschiede. Die Gabe des Pyk2-Inhibitors schien keinen Effekt auf die teNOS zu haben. Bei der Kontrollbande der eNOS KO zeigte sich kein Signal nach anti-teNOS-Gabe. Es wurden eine eNOS KO (eNOS KO3), 4 NZO mit Pyk2-Inhibitor (Pykl4 ,5 ,6 ,8) und 4 NZO ohne Pyk2-Inhibitor (BL2 ,4 ,6 ,7) Mausarten verwendet, die einzelnen Mausindividuen zuzuordnen sind. Eine quantitative Analyse der Banden mithilfe von Image Studio Lite 5.0 wurde bei der eingeschränkten Qualität der Banden (s. Abb. 24, Markierungen) nicht durchgeführt.

5 Diskussion

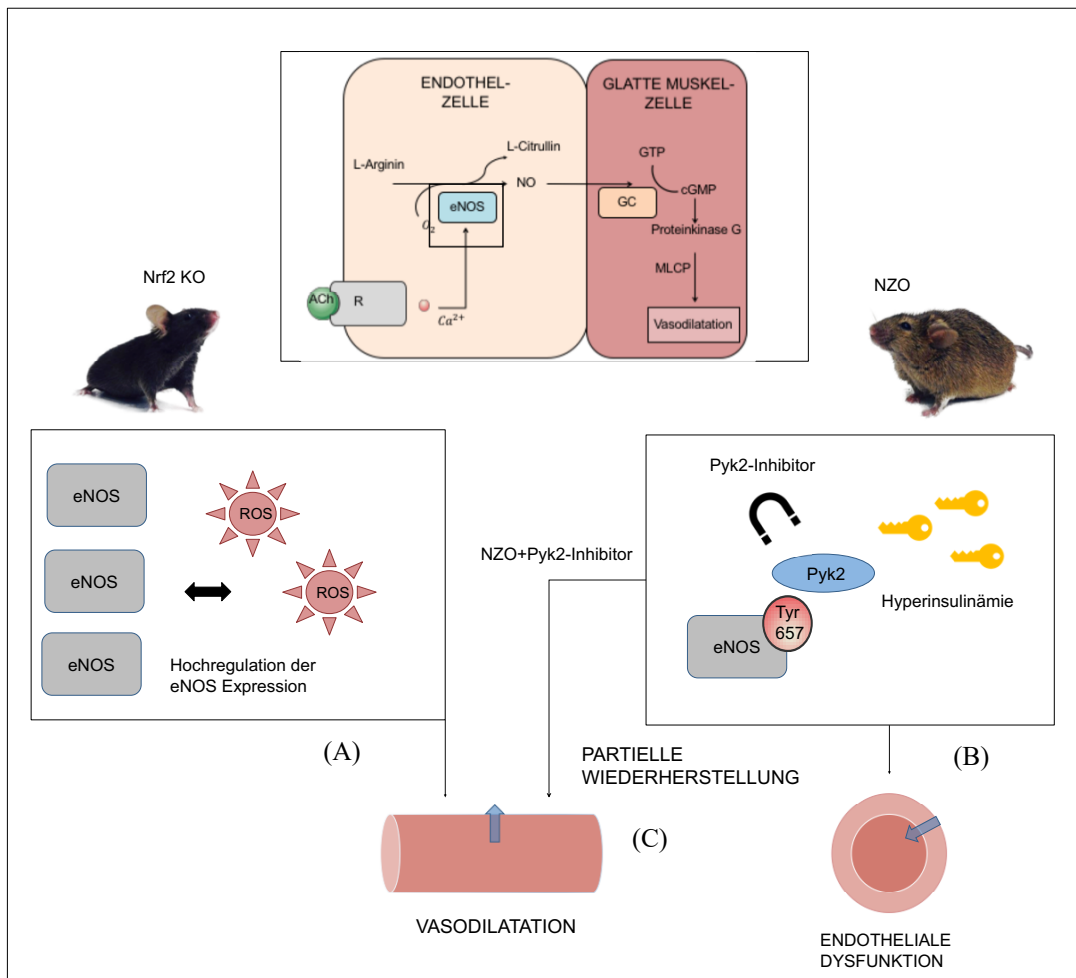


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Ergebnisse

Ex-vivo und *in-vivo* Versuche konnten initiale Hypothesen bezüglich der endothelialen Funktion unterstützen bzw. widerlegen. (A) Erhaltene endotheliale Funktion bei Nrf2 KO trotz ROS durch Hochregulation der eNOS-Expression. (B) Endotheliale Dysfunktion bei NZO durch die vorliegende Hyperinsulinämie. (C) Partielle Wiederherstellung der endothelialen Funktion bei NZO nach Pyk2-Inhibitor Applikation.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung der endothelialen Funktion in Abhängigkeit von oxidativem Stress und dem Vorliegen eines Typ-II-Diabetes mellitus mit Hyperinsulinämie untersucht. Es zeigte sich, dass die Redox-Dysregulation nicht per se eine endotheliale Dysfunktion im Mausmodell *ex-vivo* bzw. *in-vivo* bedingt. Die Hauptaussagen der vorliegenden Arbeit stellen sich folgendermaßen dar:

Bei den Nrf2 KO ergaben sich erstens trotz Dysbalance des zellulären Redox-Status keine signifikanten Unterschiede in der Endothel-abhängigen Vasodilatation, d.h. es lag eine

vollständig erhaltene endotheliale Funktion vor. In diesem Zusammenhang ist ebenso die in der Arbeitsgruppe dokumentierte Hochregulation der totalen eNOS in den Aorten der Tiere zu sehen.

Die NZO zeichneten sich zweitens durch eine reduzierte Endothel-abhängige Vasodilatation und damit eNOS-abhängige Vasodilatation im Vergleich zu den WT aus, d.h. es lag eine endotheliale Dysfunktion vor.

Drittens zeigten die NZO+Pyk2-Inhibitor eine partielle signifikante Wiederherstellung der Endothel-abhängigen Vasodilatation im Vergleich zu den unbehandelten NZO.

Die Ergebnisse machen die Rolle der endothelialen NO-Synthase bei Hochregulation bzw. Inaktivierung für die endotheliale Funktion im Rahmen von Redox-Dysregulation deutlich.

5.1 Erhaltene endotheliale Funktion bei eNOS-Hochregulation in Nrf2 KO

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 spielt eine zentrale Rolle in der Protektion des Organismus, somit auch des Gefäßsystems, gegenüber oxidativen Schäden durch Initiierung antioxidativer Zielgene mit Bereitstellung von antioxidativen Abwehrsystemen. *In-vivo* und *ex-vivo* Versuche haben ergeben, dass eine pharmakologische Aktivierung von Nrf2 gegenüber oxidativem und hämodynamischem Stress schützt, während bei Fehlen des Transkriptionsfaktors diese positiv-regulatorischen Effekte ausbleiben [108]. Es ist bekannt, dass es ohne den Transkriptionsfaktor Nrf2 zu einer erhöhten Bildung von ROS im Rahmen von oxidativem Stress mit oxidativer Modifikation von Zielproteinen, sowie Apoptose, DNA-Schäden und Lipidproduktion kommt [72, 82, 109]. Bezogen auf die vaskuläre Funktion wäre anzunehmen, dass es bei Fehlen des protektiven Transkriptionsfaktors Nrf2 initial zu endothelialer Dysfunktion mit dysfunktionaler und destabilisierter eNOS, verminderter NO-Verfügbarkeit, erhöhter vaskulärer Steifigkeit und Hypertension kommt.

Interessanterweise zeigten sich bei den Nrf2 KO trotz Dysbalance des zellulären Redox-Status keine signifikanten Unterschiede in der Endothel-abhängigen Vasodilatation nach ACh-Applikation, somit ergab sich eine vollständig erhaltene endotheliale Funktion.

Conclusiv mit den *ex-vivo* Untersuchungen konnte in der Arbeitsgruppe eine maximale Vasodilatation der Arteria iliaca externa der Nrf2 KO *in-vivo* nach Okklusion des Gefäßes mit hochauflösendem Ultraschall im Rahmen von Scherbelastung und flussmediierter Dilatation dokumentiert werden [110]. Während der Okklusion kam es jedoch zu einer paradoxen Reaktion des Iliakalgefäßes mit Vasodilatation im Gegensatz zu den WT. Gori et al. konnten die beschriebene, paradoxe Reaktion bei Okklusion als eNOS-unabhängigen Prozess identifizieren, der ROS- und ET-I-abhängig zu sein scheint [111]. Weiterhin wurde das Ausbleiben vaskulärer Steifigkeit durch eine unveränderte PWV im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Arteria carotis communis festgestellt. Die Blutdruckmessung mittels Millar-Katheter bei den Nrf2 KO ergab einen signifikant erniedrigten systolischen und diastolischen Blutdruck im Vergleich zu den WT. Die Applikation des spezifischen NOS-Inhibitor ETU *in-vivo* resultierte im Bezug auf die Scherbelastung in einer blockierten Vasodilatation nach Okklusion und in einer deutlichen Zunahme des Blutdrucks [110]. Die Ergebnisse der *ex-vivo* Untersuchungen sprechen in ihrer Zusammenschau mit denen in der Arbeitsgruppe gewonnenen *in-vivo* Daten für eine vollständig erhaltene endotheliale Funktion bei den Nrf2 KO.

Bei Überprüfung der Mediatoren Endothel-abhängiger Vasodilatation ergaben sich weiterhin NO_2^- - und NO_3^- -Spiegel ähnlich wie bei WT sowie eine erhaltene NO-Verfügbarkeit. Die cGMP-stimulierende Carbachol Applikation ergab eine verstärkte cGMP-Synthese im Vergleich zum WT, was im Rahmen des NO-Signalweges ein weiteres Indiz für einen durch Kompensation angepasster Organismus ist. Das Vorliegen von oxidativem Stress wurde in den Aorten der Nrf2 KO durch erniedrigte GSH, reduzierte Glutathion-Level, auch Glutathion-Disulfid genannt (GSSG), bei erniedrigtem GSH/GSSG-Quotient, als Prädiktor für zellulären Stress, festgestellt. Die zuletzt genannten Ergebnisse zu den Nrf2 KO finden sich in der Literatur bestätigt, ebenso hinsichtlich der reduzierten antioxidativen Enzyme im Rahmen der Glutathion-de-novo-Synthese [112, 113]. Mögliche zu Grunde liegende Mechanismen stellen bei vollständig erhaltener endothelialer Funktion vor dem Hintergrund von genuinem Fehlen des Transkriptionsfaktors Nrf2 eine Adaptation an eine Redox-Dysregulation bzw. eine Kompensationsreaktion des Organismus dar.

Eine Western Blot Analyse der Arbeitsgruppe konnte in der Tat das Vorliegen einer eNOS-Hochregulation in den Aorten und Herzen der Nrf2 KO dokumentieren. Eine posttranslationale Regulation der eNOS durch veränderte Phosphorylierung an der Ser 1177 konnte bei den Nrf2 KO wiederum nicht festgestellt werden.

Paradoxerweise könnte sich die vollständig erhaltene endotheliale Funktion bei den Nrf2 KO zum Teil durch ein akutes Einsetzen von oxidativem Stress selbst erklären: Die Akkumulation von großen Mengen an ROS ist per se mit vasodilatatorischer Wirkung assoziiert [114, 115] und könnte so zu einer kompensierten Vasodilatation beitragen. Dieser Zusammenhang könnte ebenso die paradoxe Reaktion bei Nrf2 KO auf Okklusion der Arteria iliaca interna mit Vasodilatation im Gegensatz zu WT erklären [111]. Weiterhin ist bekannt, dass durch oxidativen Stress, insbesondere durch Wasserstoffperoxid, eine eNOS-Überexpression [76] und ein positiver Effekt auf die Bioaktivität beobachtet werden kann [116]. Nicht verwunderlich ist daher, vornehmlich in frühen Arteriosklerose-Stadien, dass in betroffenen Gefäßen ebenso eine eNOS-Überexpression festgestellt wird [117, 118]. Bei fortgeschrittener Arteriosklerose wird jedoch bereits eine reduzierte Transkription und/oder erhöhte eNOS RNA-Instabilität dokumentiert [119]. Erwähnenswert ist neben der eNOS-Hochregulation durch oxidativen Stress der Entkopplungsmechanismus der eNOS mit Bereitstellung von ROS anstelle von NO. Beweise für das Vorliegen einer funktionalen eNOS bei eNOS-Überexpression haben wir jedoch bei den Nrf2 KO in Form einer erhaltenen NO-Verfügbarkeit sowie NO_2^- - und NO_3^- -Spiegeln wie bei WT festgestellt. Weiterhin konnte das Vorliegen einer funktionalen eNOS mittels Gabe des selektiven eNOS-Inhibitors ETU mit darauffolgender Verschlechterung bis zum kompletten Verlust der vaskulären Funktion in der Arbeitsgruppe bestätigt werden. Ebenso liegen Beweise für eine erhaltene NO-Signalkaskade durch eine Erhöhung der NO-sensitiven GC-1-Expression und verstärkten Carbachol-induzierten cGMP Produktion mit eNOS-Hochregulation vor.

Darüber hinaus spricht die Endothel-unabhängige Vasodilatation auf SNP im Organbad ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe für eine erhaltene Signalkaskade bei Nrf2 KO in der glatten Muskelzelle. Eine Kompensation der endothelialen Funktion kann jedoch ebenso ursächlich oder additiv in einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase, die bereits in Nrf2 KO bei diastolischer Dysfunktion festgestellt wurde, gesehen werden. In den Herzen der Nrf2 KO wurde eine verminderte SERCA2a-Expression dokumentiert, die als intrazelluläre Calcium-ATPase an der Regulation von Kontraktion/Relaxation beteiligt ist. Eine verminderte Kontraktilität wurde auch bei Rechtsverschiebung der Dosis-Reaktions-Kurve auf PHE in isolierten Aortenringen deutlich; dieses könnte ein Hinweis für eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase im Endothel der Aorten sein. Das Fehlen des Transkriptionsfaktors Nrf2 kann gewissermaßen ebenso

direkt eine verstärkte eNOS-Expression bewirken, da die Reduktion von Häm, essentiell für die eNOS-Signalkaskade, entfällt [74]. Zusätzlich könnte auch ein bisher unbekannter Mechanismus, der zu einer verminderten Antwort auf vasokonstriktorische Stimuli in den Gefäßen bei Nrf2 KO führt, an der erhaltenen endothelialen Funktion beteiligt sein.

Die eNOS-Hochregulation in den Aorten und Herzen bei funktioneller eNOS im Modell des Organismus für die Adaptation an chronisch oxidativen Stress ist jedoch als führender Kompensationsmechanismus beim Vorliegen von Redox-Dysregulation zu sehen.

5.2 Signifikante endotheliale Dysfunktion bei metabolischem Syndrom

Es ist bekannt, dass das humane metabolische Syndrom mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität assoziiert ist. In diesen Kontext ist die endotheliale Dysfunktion der NZO, die als polygenetisches Mausmodell für das metabolische Syndrom und für Typ-II-Diabetes mellitus gelten, in unseren *in-vivo* und *ex-vivo* Versuchen einzuordnen. Konkret zeigte sich eine reduzierte Endothel-abhängige Vasodilatation auf ACh, verminderte Scherbelastungs-bedingte Vasodilatation sowie eine erhöhte Gefäßsteifigkeit im Vergleich zu den WT.

Das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion in den isolierten Aortenringen männlicher *New Zealand Obese* Inzucht Mäuse konnte erstmals im Rahmen dieser Arbeit durch Organbadversuche dokumentiert werden. Marchesi et al. konnten für mesenteriale Arterien zeigen, dass NZO mit signifikant eingeschränkter Vasodilatation auf ACh im Vergleich zu den verwandten NZB reagieren [120].

Die Endothel-unabhängige Reaktion auf kumulative SNP-Dosen im Organbad ergab im Post-hoc-Test einzelne signifikante Differenzen zur Kontrollgruppe bei $p > 0,05$ in der zweifaktoriellen ANOVA. Man könnte annehmen, dass sich die heterogene Ausprägung des voll ausgebildeten Typ-II-Diabetes mellitus bei männlichen NZO limitierend für unsere Versuche darstellt, was sich potenziell in den einzelnen Signifikanzen im Post-hoc-Test als Ausreißer abzeichnet. Jedoch macht gerade diese Heterogenität die Ähnlichkeit zum humanen Krankheitsbild aus und tritt in den Hintergrund, da die NZO ein gut dokumentiertes Mausmodell ist. Darüber hinaus wäre zu diskutieren, ob die einzelnen Signifikanzen im Post-hoc-Test durch den Verlust von antikontraktilen Potential bei den NZO bedingt sein könnten. In weiteren Studien konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine gestörte Calcium-Homöostase und verminderte NO-Produktion in koronaren Endothelzellen und der dazugehörigen kontraktilen Einheit im

Rahmen von Typ-II-Diabetes mellitus mit Einfluss auf das antikontraktile Potential vorliegt [121, 122].

Im Widerspruch dazu könnte das Ausbleiben von signifikanten Unterschieden zwischen den NZO und den WT auf die Endothel-unabhängige Vasokonstriktion auf PHE gesehen werden. Andererseits zeigten die Aorten der NZO eine normale vasokonstriktorische Antwort auf α 1-adrenerge Stimuli.

Daten des vergleichbaren polygenetischen Diabetesmodell der Tallyho Maus können die Dokumentation einer endothelialen Dysfunktion im Rahmen der Diabetes-Erkrankung unterstützen [123]. In der zitierten Arbeit zeigt sich in den Mausexemplaren eine eingeschränkte Endothel-abhängige Vasodilatation auf ACh, bei unauffälliger Endothel-unabhängiger Vasodilatation auf SNP und signifikant verstärkter Kontraktion auf PHE.

Conclusiv mit den Ergebnissen der *ex-vivo* Versuche konnte mittels *in-vivo* Ultraschallmessung der FMD und der indirekten PWV die endotheliale Dysfunktion in NZO validiert werden. Eine auffällige FMD, wie sie in der Arteria iliaca externa der NZO dokumentiert wurde, spricht gegen eine physiologische Scherbelastungs-bedingte Vasodilatation, damit gegen eine normale eNOS-abhängige Vasodilatation, [14, 124] und kann beispielsweise bei Hypertonie vorliegen [125]. Mahmoud et al. konnten ebenso zeigen, dass eine Hyperinsulinämie eine reduzierte FMD in isolierten humanen Skelettmuskelarteriolen bedingt [126]. Bei der PWV-Messung, als diagnostisches Mittel zur Feststellung von Gefäßsteifigkeit, war eine deutlich beschleunigte PWV in der A. carotis communis der NZO im Vergleich zu den WT zu messen. Eine pathologisch erhöhte PWV bei Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom und Typ-II-Diabetes mellitus durch Glykierung von Matrixproteinen [88, 127] und Gefäßremodeling bei arteriosklerotischen Veränderungen lässt Rückschlüsse auf das kardiovaskuläre Risiko ziehen [128, 129].

Übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen zur vaskulären Funktion zeigte sich in einer vorausgehenden Arbeit eine kardiale Dysfunktion in den NZO mit signifikant reduzierter Ejektionsfraktion und linksventrikulärer Hypertrophie als Zeichen für ein *Remodeling* im Rahmen eines Typ-II-Diabetes mellitus [130].

Weiterhin konnte die verminderte teNOS-Expression der NZO in der quantitativen Analyse eines repräsentativen Western Blots die Aussage der endothelialen Dysfunktion als definitionsgemäßer Rückgang der NO-Bioverfügbarkeit u.a. bedingt durch eine veränderte eNOS-Expression bzw. -Präsenz unterstützen. In Zusammenhang mit einer

fettreichen Diät konnten Balwierz et al. ebenso eine Verminderung der eNOS-Expression in NZO zeigen [131].

Andererseits kann eine endotheliale Dysfunktion ebenso mit einer vermehrten Expression bei einer jedoch non-funktionalen eNOS assoziiert sein [132], wengleich sich diese Veränderung infolge von oxidativem Stress mit ROS [76] darstellt. In den Mesenterialgefäßen der NZO wurde bereits eine endotheliale Dysfunktion durch einen verminderten $\frac{\text{eNOS-Dimer}}{\text{eNOS-Monomer}}$ -Quotient gezeigt [120]. Der verminderte eNOS-Quotient, damit verminderte Dimerisation, spricht in den peripheren Mesenterialgefäßen für eine reell non-funktionale, entkoppelte eNOS.

Im Rahmen des ultrasensitiven Insulin ELISA bestätigte sich für die NZO eine Hyperinsulinämie als transientes Charakteristikum des Typ-II Diabetes bei Insulinresistenz. Es wurden signifikant erhöhte Plasma-Insulinspiegel von 9,2 – 22,6 ng/ml bei 20 Wochen alten NZO im Vergleich zur Kontrollgruppe (1 - 6,8 ng/ml) verzeichnet. Bereits wenige Wochen nach Geburt ist das Auftreten von erhöhten Insulin-Spiegeln z.T. von 4 - 16 ng/ml, im Vergleich zu 1-3 ng/ml bei der Kontrollgruppe, gesichert [133, 134]. Mit der Dokumentation einer relevanten Hyperinsulinämie in den NZO ergab sich darüber hinaus das relevante Kriterium zur Untersuchung der Annahme eines eNOS-modulierenden Effektes.

Zusammenfassend korreliert die Datenlage hinsichtlich der (kardio-)vaskulären Funktion von NZO mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Hinsichtlich der dokumentierten endothelialen Dysfunktion unserer NZO stellt sich die Frage, ob bei der multifaktoriellen Genese des Typ-II-Diabetes mellitus die Hyperinsulinämie eine maßgebliche Rolle für die endotheliale Funktion spielt. Nicht auszuschließen ist, dass im Rahmen der multifaktoriellen Grunderkrankung Hyperglykämie und Dyslipidämie über zahlreiche biochemische Mechanismen der Redox-Dysregulation an der endothelialen Dysfunktion beteiligt sind. Redox Dysregulation, im Organismus oft als oxidativer Stress bezeichnet, äußert sich als ROS-Formation [85, 86], Induktion von proinflammatorischen Signalwegen via Proteinkinase C [135-137] und NFκB [87]; oxidativer Stress hat unter anderem eine reduzierte eNOS-Aktivität [75] sowie reduzierte NO-Freisetzung [138] zur Folge.

Abschließend erwies sich die NZO Maus als geeignetes Modell zur Beantwortung unserer Fragestellung bezüglich des Einflusses von Typ-II-Diabetes mellitus mit Hyperinsulinämie auf die vaskuläre Funktion.

5.3 Positive Wirkung des Pyk2-Inhibitors auf die eNOS-Aktivität

Fisslthaler et al. konnten eine inhibitorische Wirkung der Hyperinsulinämie auf die Aktivität der eNOS via Pyk2, und damit indirekt auf die endotheliale Funktion, dokumentieren [64].

Nach Applikation des Pyk2-Inhibitors PF 431396 hydrate konnte in dieser Arbeit bei den behandelten NZO eine partielle, jedoch signifikante Wiederherstellung der Endothel-abhängigen Vasodilatation im Vergleich zu den WT festgestellt werden. Indessen hatte die Pyk2-Inhibition weder direkten Einfluss auf die Hyperinsulinämie noch auf die teNOS in den Aorten der NZO, wie im ultrasensitiven Insulin ELISA und bei der Western Blot Analyse dargelegt wurde.

In den *in-vivo* und *ex-vivo* Versuchen zeigte sich eine verbesserte vaskuläre Funktion und eine verminderte Gefäßsteifigkeit nach Applikation des Pyk2-Inhibitors. Die Erholung der endothelialen Dysfunktion bei behandelten NZO ergab sich bei den Aortenringversuchen erst bei höheren kumulativen ACh-Konzentrationen im Vergleich zu den WT. Signifikante Unterschiede waren bei hohen ACh-Konzentrationen ebenso vereinzelt von den NZO+Pyk2-Inhibitor zu den unbehandelten NZO festzustellen. Auf kumulative SNP- und PHE-Dosen ergaben sich nur einzelne geringfügige Unterschiede zu den Vergleichstiergruppen im Organbad, was bei Interaction $p > 0,05$ potenziell als Ausreißer bei heterogenem Phänotyp zu sehen ist.

Conclusiv zu den *ex-vivo* Ergebnissen zeigte sich ebenso eine partielle Wiederherstellung der Endothel-abhängigen Funktion nach Pyk2-Inhibitor Gabe im Vergleich zu den unbehandelten NZO mittels FMD und PWV. Bei der Bestimmung der PWV ergab sich für die behandelten NZO eine verringerte PWV, die einer Normalisierung des Blutdruckes unter Pyk2-Inhibition entspricht.

Die Ergebnisse nach Gabe des Pyk2-Inhibitors stützen die Aussage der Arbeit von Fisslthaler et al., die von einem negativ-regulatorischen Effekt der Hyperinsulinämie auf die eNOS ausgeht. Hierbei soll es über Aktivierung der Pyk2 zur posttranslatorischen Phosphorylierung der Tyr 657 mit Inhibition der eNOS kommen.

In der Tat ergab eine verminderte Pyk2-Expression via siRNA eine Erholung der eNOS-Aktivität konkordant zu den *ex-vivo/ in-vivo* Versuchen nach Applikation des Pyk2-Inhibitors [64]. Viswambharan et al. kommen in einem transgen Mausmodell mit Endothelium-spezifischen Überexpression des Insulinrezeptors (hIRECO), und damit

einer selektiven Verstärkung des Insulinsignalwegs PI 3-K /Akt, äquivalent zur Hyperinsulinämie in der Arbeit von Fisslthaler et al. zu der Aussage einer reduzierten eNOS-Aktivität bei erhöhter Pyk2-Aktivität bzw. Expression. Akt-1-, NADPH-Oxidase 2- und Superoxid-bedingt, also bedingt durch v.a. oxidativen Stress, konnte in der zitierten Arbeit eine Pyk2-Hochregulation mit Phosphorylierung von Tyr 657 an der eNOS dokumentiert werden [139].

Im murinen Modell mit fettreicher Diät wurde eine deutlich erhöhte Expression und Phosphorylierung von Pyk2 festgestellt [140], was ebenso für das NZO Mausmodell zu erwarten ist, und was den positiven Effekt des Pyk2-Inhibitors auf die eNOS-Aktivität darüber hinaus erklären könnte.

Wang et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass eine Hyperinsulinämie zu einer gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors *Krüppel-like factor 5* (KLF5) mit negativer Regulation der eNOS-Transkription und folglich niedrigen eNOS-Leveln führt [141]. Mit KLF5 als aktivierenden Transkriptionsfaktor der Angiogenese und des *Remodeling* gäbe es neben der Pyk2 eine weitere Signalkaskade, die bedingt durch Hyperinsulinämie Einfluss auf die eNOS, hier im Sinne transkriptionaler Veränderungen, nimmt.

Dass Insulin darüber hinaus einen positiv-regulatorischen Effekt auf die eNOS über eine Stimulation der Akt-1 ausübt und diese Ser 1177 an der eNOS aktiviert [64, 142], kommt bedingt durch einen verminderten Elektronenfluss über die eNOS nicht zum Tragen; insgesamt steht damit die Inhibition bzw. verminderte Aktivität der eNOS durch Pyk2 im Vordergrund [64]. Die Verbesserung der Endothel-abhängigen Relaxation nach pharmakologischer Pyk2-Inhibition in dieser Arbeit, könnte man mit einer überwiegend positiv-regulatorischen Insulin-Signalkaskade über Ser 1177 bei partieller Erholung der endothelialen Funktion erklären. Hyperinsulinämie als Kennzeichen von Insulinresistenz bei den NZO scheint demnach die dokumentierte endotheliale Dysfunktion jedenfalls (mit) zu bedingen.

Im Hinblick auf den verwendeten Pyk2-Inhibitor PF 431396 ist bekannt, dass, bezogen auf die jeweilige IC₅₀, FAK mehr als Pyk2 inhibiert wird und FAK einen protektiven Einfluss auf kardiale Myozyten aufweist [143]. Pyk2 und FAK, zugehörig zu derselben Familie von cytosolischen Tyrosin-Kinasen, sollen weiterhin über bis zu 45% übereinstimmende Aminosäure-Sequenzen und ähnliche Domäne-Strukturen, wie die Tyrosin Kinase Domäne, verfügen [144]. Andererseits konnten Bibli et al. mithilfe von

siRNA bei Pyk2-*Knockout* ähnliche Ergebnisse wie bei pharmakologischer Pyk2-Inhibition erzielen [65]. Eine parallele Inhibition von FAK neben Pyk2 mit Einfluss auf die endotheliale Funktion, die über die Wirkung von Pyk2 hinaus relevant ist, ist somit ausgeschlossen.

Nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Manipulation der Pyk2 auch auf andere Weise als über die Tyr 657 die endotheliale Funktion positiv-regulatorisch beeinflusst, da Pyk2 an zahlreichen intrazellulären Signalwegen beteiligt ist. Die Kinase Pyk2 wird neben Insulin obgleich ebenso durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen [145], inflammatorische Signale wie Interleukine, B-Zellen [146] und Agonisten von G-Proteingekoppelten Rezeptoren, z.B. Angiotensin II [147] aktiviert.

Es wurde festgestellt, dass bei Pyk2 (-/-) Tieren verminderte B- und T-Zell Antworten vorlagen, welches bei Autoimmunität der NZO Mäuse mit Autoantikörper gegen den Insulin-Rezeptor relevant ist [148]. Angenommen die Autoantikörper sind an der Insulinresistenz und der gestörten Insulin-medierten Vasodilatation der NZO beteiligt, so würde der Pyk2-Inhibitor diese Wirkung aufheben und ebenso die gestörte Insulin-medierte Vasodilatation mit beeinflussen. Die Monozyten- und Makrophagen-Migration ist bei Pyk2 (-/-) Mäusen ebenso gestört, welches einen positiven Effekt auf die endotheliale Funktion bei oxidativem Stress und Gefäßremodeling mit Arteriosklerose im diabetischen Modell hätte [148]. Andererseits muss man annehmen, dass die Mechanismen bei Pyk2 (-/-) Tieren und der pharmakologischen Pyk2-Inhibition sich unterscheiden, da es sich um eine chronisch im Vergleich zu einer einmaligen Manipulation handelt. Bezüglich der Pyk2-Wirkung auf den Glucosestoffwechsel im Zusammenhang mit dem Endothelin-I(ET-I)-Signalweg soll es einen biphasischen Verlauf geben: Bei akuter ET-I-Exposition, *in-vitro* in Insulin-sensitiven Geweben sowie weiterhin dokumentiert *in-vivo* in Ratten und Menschen [149], soll es zu Pyk2-Phosphorylierung [150] mit einem verbesserten Glucosetransport und GLUT4 Translokation kommen [150, 151], während die verlängerte Exposition zum gegenteiligen Effekt mit Insulinresistenz führt [152, 153]. Für Typ-II-Diabetes mellitus und das humane metabolische Syndrom sind allgemein erhöhte ET-I-Spiegel bekannt [154, 155], und die Wirkung der langfristigen Exposition mit ET-I als möglicher Auslöser von Insulinresistenz zu erwarten. Demnach könnte über die Pyk2-Inhibition die negativ-regulatorische Wirkung von ET-I auf die Glucose-Homöostase und damit der Einfluss der Insulinresistenz verringert und die physiologische vasodilatatorische Wirkung von Insulin überwiegen.

Über die festgestellte partielle Erholung der Endothel-abhängigen Vasodilatation hinaus könnte man annehmen, dass es nach Pyk2-Inhibition zu einem verbesserten Glucosetransport und GLUT4 Translokation und damit zur Erholung der gestörten Glucose-Homöostase bzw. Hyperinsulinämie, kommt. Weiterhin kann man sich vorstellen, dass die Pyk2-Inhibition auch einen Effekt auf die bei oxidativem Stress hochregulierte TNF α und AT-II hat, die über Pyk2-Induktion zu einer Inhibition der eNOS-Aktivität führen [140]. Andererseits wurden in den NZO in unserer Arbeitsgruppe keine Unterschiede im Vergleich zu den WT bezüglich der TNF α Level festgestellt.

Als alternativen Weg der Wiederherstellung der endothelialen Funktion ist die PKC-Inhibition zu sehen, da PKC bei diabetischen Zuständen erhöht ist. Es konnte bereits bei PKC-Inhibition eine verstärkte eNOS-Genexpression in murinen Versuchen und am Patienten erfolgreich dokumentiert werden [93, 135]. Sulforaphan bzw. sein synthetisiertes Analogon Triterpenoid wiederum soll die Redox-Dysregulation im Rahmen von Typ-II-Diabetes mellitus durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 und der damit verbundenen ARE-Genexpression [156, 157] herbeiführen und damit die endotheliale Dysfunktion beseitigen. Der eingesetzte Pyk2-Inhibitor kann im Rahmen dieser Modulatoren der endothelialen Funktion gesehen werden, auch wenn er, wie anzunehmen ist, neben der positiv-regulatorischen Wirkung auf die eNOS auch an weiteren Signalkaskaden mit Verbesserung der vaskulären Funktion beteiligt ist.

Insgesamt kann man nach Pyk2-Inhibition im NZO Mausmodell von einem positiven Einfluss auf die vaskuläre Funktion und auf die eNOS-Aktivität sprechen. Wenngleich der Beweis einer veränderten eNOS-Phosphorylierung hinsichtlich Tyr 657 oder Ser 1177 im Rahmen einer Western Blot Analyse nicht ausreichend nachgewiesen werden konnte. Mit Blick auf die Ergebnisse scheint es sich bei der Inhibition der Kinase Pyk2 um eine spezifische Möglichkeit zu handeln, um die Aktivität der eNOS und damit auch die endotheliale Funktion im Rahmen einer Hyperinsulinämie positiv zu beeinflussen.

Abschließend kann man sagen, dass eine vollständige Wiederherstellung der endothelialen Funktion nach Pyk2-Inhibitor Applikation in NZO nicht gelingen kann, da bei der multifaktoriellen Erkrankung neben dem negativ-regulatorischen Effekt der Insulin-vermittelten Signalkaskade weitere Faktoren von Bedeutung sind.

5.4 Konzeptionelle Erwägungen

Als Kontrollgruppe für die NZO kamen die WT, die sogenannten C57BL/6J Mäuse, und *New Zealand Black* Mäuse (NZB) grundsätzlich in Frage. Die *New Zealand Black* Maus (NZB) ist eine von Bielschowsky 1948 durch Inzucht erzeugte Maus aus demselben Auszuchtstamm wie die NZO [158] und ihr nächstverwandter Stamm. Bei NZB liegen eine Normoglykämie und Normoinsulinämie, jedoch ebenso eine Hypercholesterinämie, eine geringer ausgeprägte Obesität als bei NZO, Hypertension sowie spontane Autoantikörper vor. Da jedoch zwingend gesunde Tiere ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren als Kontrollgruppe für die NZO benötigt wurden, entschieden wir uns für die C57BL/6J Black 6 Maus als normometabolische Vergleichsgruppe.

Die NZO mit der C57BL/6J Black 6 Maus als Kontrollgruppe erwies sich als geeignetes Modell zur Beantwortung unserer Fragestellung bezüglich des Einflusses von Typ-II-Diabetes mellitus auf die vaskuläre Funktion.

Bei FMD und PWV handelt es sich um potente nicht-invasive Methoden zur Darstellung der vaskulären Funktion. Die Ergebnisse können jedoch bei den anästhesierten Mäusen u.a. durch die Erfahrung des Sonographen, die Auswertung der Rohdaten, die Umgebungstemperatur bei großer Körperoberfläche der Tiere und die Anästhesie beeinflusst werden. Schlussendlich gewährleisten standardisierte Versuchsabläufe und ein geübter sowie differenzierter Umgang mit den sonographischen Methoden die Qualität der Ergebnisse.

6 Schlussfolgerungen

Lange Zeit war die biochemische Rolle der Endothelzellen bei der Vasodilatation und damit auch die Rolle der eNOS nicht bekannt. Erst durch Arbeiten von Furchgott und Zawadzki 1980 wandelte sich das Verständnis für das Endothel, das ACh-induziert eine Endothel-abhängige Vasodilatation ermöglicht. Die in diesem Zusammenhang relevante NO-Synthase wurde schließlich 1989 von Moncada et al. erkannt [32]. Die vorliegende Arbeit trägt zum Verständnis bei, welchen Einfluss die Redox-Dysregulation in Form von Hyperinsulinämie und chronisch oxidativem Stress auf die endotheliale Funktion und damit auf die Rolle der eNOS ausübt.

Im Rahmen von Typ-II-Diabetes mellitus begünstigen Hyperglykämie und kompensatorisch Hyperinsulinämie die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion als ersten Schritt der Gefäßschädigung. Es ist bekannt, dass Typ-II-Diabetes mellitus mit einer fünf bis zehn Jahre reduzierten Lebenserwartung, insbesondere aufgrund der kardiovaskulären mikro- und makrovaskulären Folgekomplikationen, einhergeht. Die frühzeitige Diagnose eines Typ-II-Diabetes mellitus sowie strukturierte jährliche Screenings sind daher als Prävention vor Endstadien wie Erblindung, Nierenversagen als auch koronarer Herzerkrankung zu sehen. Initial kann eine Umstellung des Lebensstils mit u.a. körperlicher Aktivität und Diäten eingeleitet werden, wobei ein Ausbleiben von Therapieerfolgen jedoch zumeist die medikamentöse Einstellung von Blutdruck, Blutzucker, Lipiden notwendig macht. Im Rahmen der Sekundärprävention bei Typ-II-Diabetes mellitus Patienten werden Statine, ACE- oder Angiotensinrezeptor-Inhibitoren sowie zusätzliche Antihypertensiva erfolgreich eingesetzt, um das Risiko für die Entstehung bzw. einen Progress vaskulärer Komplikationen zu senken.

Vor diesem Hintergrund ist die partielle Wiederherstellung der Endothel-abhängigen Funktion auf Pyk2-Inhibition im Diabetes-Mausmodell als potenzieller Therapieansatz zu werten. Auswertungen von 11 prospektiven Studien ergaben eine Assoziation einer Hyperinsulinämie mit hoher kardiovaskulärer Mortalität in Männern und Frauen unabhängig von anderen Risikofaktoren [92]. Basierend auf den Erkenntnissen von Fisslthaler B. et al., die einen inhibitorischen Einfluss der Hyperinsulinämie auf die Aktivität der eNOS via Pyk2 dokumentierten, scheint die Gabe des Pyk2-Inhibitors einer endothelialen Dysfunktion jedenfalls bei unseren ca. 20 Wochen alten NZO entgegenzuwirken. Auch wenn sich die vaskulären Komplikationen bei dieser multifaktoriellen Erkrankung selbstverständlich nicht nur auf den untersuchten Effekt der Hyperinsulinämie via Pyk2 begrenzen lassen, ist bei Pyk2-Inhibition eine vaskuläre Verbesserung im NZO Mausmodell sichtbar. Die partielle Wiederherstellung der endothelialen Funktion nach Pyk2-Inhibition stellt einen Mechanismus zur selektiven Modulation der eNOS und damit auch einen vielversprechenden Therapieansatz bei endothelialer Dysfunktion im Rahmen der Sekundärprävention bei Typ-II-Diabetes mellitus zur Minimierung kardiovaskulärer Ereignisse dar. Eine pauschale Übertragung muriner auf humane Prozesse u.a. bei Unterschieden im Bereich des Immunsystems [159, 160] sollte jedoch kritisch betrachtet werden.

Bei steigender Inzidenz von Typ-II-Diabetes mellitus Neuerkrankungen stehen in den kommenden Jahrzehnten in der diabetologischen Versorgung große

gesundheitspolitische und gesellschaftliche Herausforderungen, bei im Gegenzug zunehmendem Verständnis der biochemischen Zusammenhänge, an.

Neben Typ-II-Diabetes mellitus als kardiovaskulären Risikofaktor sind auch Hypertension, Hypercholesterinämie und Nikotinabusus mit oxidativem Stress assoziiert. Bei einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Abwehrsystemen, definiert als oxidativer Stress, kommt es zur Initiierung bzw. dem Progress kardiovaskulärer Erkrankungen. In diesem Zusammenhang nimmt der Transkriptionsfaktor Nrf2 eine Schlüsselrolle bei der Regulation von pro- und antioxidativen Abwehrsystemen ein.

In der vorliegenden Arbeit konnte für das Nrf2 KO Mausmodell für chronisch oxidativen Stress bei Nrf2-Gendeaktivierung zwar eine Redox-Dysregulation bestätigt, gleichwohl eine erhaltene endotheliale Funktion paradoxerweise dokumentiert werden. Anhand der parallel vorliegenden eNOS-Hochregulation in Herzen und Aorten von Nrf2 KO wird die Rolle der eNOS bei der Erhaltung der endothelialen Funktion deutlich. Diese eNOS-Hochregulation lässt eine Vielzahl bisher unbekannter Mechanismen hinter der Erhaltung der endothelialen Funktion im Rahmen von Redox-Dysregulation vermuten. Durch die Ergebnisse im Nrf2 KO Mausmodell wird deutlich, dass Nrf2-abhängige Signalwege nicht nur relevant für Redox-Dysregulation sind, sondern ebenso direkt auf die (kardio-) vaskuläre Funktion Einfluss nehmen. Bei kardiovaskulären Erkrankungen als führende europaweite Todesursache trotz therapeutischer Meilensteine ist die Grundlagenforschung, insbesondere hinsichtlich des Einflusses von chronisch oxidativem Stress auf die vaskuläre Funktion, von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit konnte die Relevanz der eNOS als wichtiger Aspekt in der Genese vaskulärer Erkrankungen aufgezeigt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update*. Eur Heart J, 2014. **35**(42): p. 2929.
2. Roth, G.A., et al., *Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality*. N Engl J Med, 2015. **372**(14): p. 1333-41.
3. Reynolds, L.R., et al., *Differential effects of rosiglitazone and insulin glargine on inflammatory markers, glycemic control, and lipids in type 2 diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77**(2): p. 180-7.
4. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol, 1977. **86**(3): p. 675-84.
5. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
6. Balletshofer, B.M., et al., *Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance*. Circulation, 2000. **101**(15): p. 1780-4.
7. Schulz, E., et al., *Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(6): p. 1115-26.
8. Heiss, C., et al., *In vivo measurement of flow-mediated vasodilation in living rats using high-resolution ultrasound*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(2): p. H1086-93.
9. Jerie, P., *[Milestones of cardiovascular therapy. III. Nitroglycerin]*. Cas Lek Cesk, 2007. **146**(6): p. 533-7.
10. Marsh, N. and A. Marsh, *A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. **27**(4): p. 313-9.
11. Ignarro, L.J., *Physiological significance of endogenous nitric oxide*. Semin Perinatol, 1991. **15**(1): p. 20-6.
12. Star, R.A., *Nitric oxide*. Am J Med Sci, 1993. **306**(5): p. 348-58.
13. Lancaster, J.R., Jr., *A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide*. Nitric Oxide, 1997. **1**(1): p. 18-30.
14. Rubanyi, G.M., J.C. Romero, and P.M. Vanhoutte, *Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor*. Am J Physiol, 1986. **250**(6 Pt 2): p. H1145-9.
15. Busse, R., et al., *Endothelial cells are involved in the vasodilatory response to hypoxia*. Pflugers Arch, 1983. **397**(1): p. 78-80.
16. Rubanyi, G.M. and P.M. Vanhoutte, *Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor*. Am J Physiol, 1986. **250**(5 Pt 2): p. H822-7.

17. Fleming, I., et al., *Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 18): p. 4103-11.
18. Azuma, H., M. Ishikawa, and S. Sekizaki, *Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation*. Br J Pharmacol, 1986. **88**(2): p. 411-5.
19. Kroncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**(6): p. 327-43.
20. Kroncke, K.D., et al., *Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(8): p. 1407-20.
21. Arnold, W.P., et al., *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(8): p. 3203-7.
22. Green, L.C., S.R. Tannenbaum, and P. Goldman, *Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat*. Science, 1981. **212**(4490): p. 56-8.
23. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1498-505.
24. Nagababu, E., et al., *Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46349-56.
25. Hendgen-Cotta, U.B., et al., *Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10256-61.
26. Rassaf, T., et al., *Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function*. Circ Res, 2007. **100**(12): p. 1749-54.
27. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
28. Forstermann, U., et al., *Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries*. Circ Res, 1986. **58**(4): p. 531-8.
29. Ignarro, L.J., et al., *Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid*. J Pharmacol Exp Ther, 1986. **237**(3): p. 893-900.
30. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical*. Circ Res, 1987. **61**(6): p. 866-79.
31. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
32. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(11): p. 1709-15.

33. Moncada, S. and R.M. Palmer, *Biosynthesis and actions of nitric oxide*. Semin Perinatol, 1991. **15**(1): p. 16-9.
34. Chapman, A.L., et al., *Ceruloplasmin is an endogenous inhibitor of myeloperoxidase*. J Biol Chem, 2013. **288**(9): p. 6465-77.
35. Furchgott, R.F., et al., *Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 1984. **6 Suppl 2**: p. S336-43.
36. Forstermann, U., et al., *Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation*. Methods Enzymol, 1994. **233**: p. 258-64.
37. Busse, R. and A. Mulsch, *Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin*. FEBS Lett, 1990. **265**(1-2): p. 133-6.
38. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 682-5.
39. Bredt, D.S., et al., *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. Nature, 1991. **351**(6329): p. 714-8.
40. Xu, K.Y., et al., *Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 657-62.
41. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
42. Izumi, Y., D.B. Clifford, and C.F. Zorumski, *Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release*. Science, 1992. **257**(5074): p. 1273-6.
43. Togashi, H., et al., *A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **262**(1): p. 343-7.
44. Lipton, S.A., et al., *A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds*. Nature, 1993. **364**(6438): p. 626-32.
45. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, Jr., *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(1): p. 65-70.
46. Ischiropoulos, H., L. Zhu, and J.S. Beckman, *Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 446-51.
47. Langrehr, J.M., et al., *Nitric oxide synthesis in the in vivo allograft response: a possible regulatory mechanism*. Surgery, 1991. **110**(2): p. 335-42.
48. MacMicking, J.D., et al., *Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Cell, 1995. **81**(4): p. 641-50.
49. Forstermann, U., J.P. Boissel, and H. Kleinert, *Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)*. FASEB J, 1998. **12**(10): p. 773-90.
50. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Nitric oxide-an endothelial cell survival factor*. Cell Death Differ, 1999. **6**(10): p. 964-8.

51. Wood, K.C., et al., *Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(8): p. 1861-71.
52. Simon, A., et al., *Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells*. *Circ Res*, 2003. **93**(9): p. 813-20.
53. Sessa, W.C., et al., *The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(21): p. 8607-11.
54. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
55. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
56. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
57. Chalimoniuk, M., et al., *Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A2 level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells*. *Acta Biochim Pol*, 2007. **54**(3): p. 611-23.
58. Schneider, J.C., et al., *Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **284**(6): p. H2311-9.
59. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. *Circ Res*, 2001. **88**(11): p. E68-75.
60. Michell, B.J., et al., *Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 17625-8.
61. Davda, R.K., L.J. Chandler, and N.J. Guzman, *Protein kinase C modulates receptor-independent activation of endothelial nitric oxide synthase*. *Eur J Pharmacol*, 1994. **266**(3): p. 237-44.
62. Fleming, I., *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS*. *Pflugers Arch*, 2010. **459**(6): p. 793-806.
63. Loot, A.E., et al., *Angiotensin II impairs endothelial function via tyrosine phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase*. *J Exp Med*, 2009. **206**(13): p. 2889-96.
64. Fisslthaler, B., et al., *Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by proline-rich tyrosine kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin*. *Circ Res*, 2008. **102**(12): p. 1520-8.
65. Bibli, S.I., et al., *Tyrosine phosphorylation of eNOS regulates myocardial survival after an ischaemic insult: role of PYK2*. *Cardiovasc Res*, 2017.
66. Yin, G., C. Yan, and B.C. Berk, *Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(6): p. 780-3.

67. Tai, L.K., et al., *Fluid shear stress activates proline-rich tyrosine kinase via reactive oxygen species-dependent pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(11): p. 1790-6.
68. Siragusa, M. and B. Fisslthaler, *Insulin Keeps PYK-ing on eNOS: Enhanced Insulin Receptor Signaling Induces Endothelial Dysfunction*. *Circ Res*, 2017. **120**(5): p. 748-750.
69. Seddon, M., Y.H. Looi, and A.M. Shah, *Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure*. *Heart*, 2007. **93**(8): p. 903-7.
70. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 245-313.
71. Forman, H.J. and M. Torres, *Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **166**(12 Pt 2): p. S4-8.
72. Li, H., S. Horke, and U. Forstermann, *Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2014. **237**(1): p. 208-19.
73. McNally, J.S., et al., *Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(6): p. H2290-7.
74. Heiss, E.H., et al., *Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(46): p. 31579-86.
75. Li, H. and U. Forstermann, *Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease*. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. **13**(2): p. 161-7.
76. Drummond, G.R., et al., *Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide*. *Circ Res*, 2000. **86**(3): p. 347-54.
77. Lubos, E., et al., *Glutathione peroxidase-1 deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(41): p. 35407-17.
78. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(2): p. 313-22.
79. Suzuki, T. and M. Yamamoto, *Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **88**(Pt B): p. 93-100.
80. Kang, K.W., S.J. Lee, and S.G. Kim, *Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress*. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**(11-12): p. 1664-73.
81. Enomoto, A., et al., *High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes*. *Toxicol Sci*, 2001. **59**(1): p. 169-77.
82. Chen, X.L., et al., *Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(5): p. H1862-70.

83. Jiang, Z.Y., et al., *Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats*. Journal of Clinical Investigation, 1999. **104**(4): p. 447-457.
84. Stehouwer, C.D., et al., *Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 55-68.
85. Cosentino, F., et al., *High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells*. Circulation, 1997. **96**(1): p. 25-8.
86. Cosentino, F., et al., *High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 1017-23.
87. Tanaka, N., et al., *The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25781-90.
88. Bierhaus, A., et al., *AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(3): p. 586-600.
89. Bucala, R., K.J. Tracey, and A. Cerami, *Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 432-8.
90. Du, X.L., et al., *Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1341-8.
91. Laakso, M., *Insulin resistance and coronary heart disease*. Curr Opin Lipidol, 1996. **7**(4): p. 217-26.
92. Group, D.I.S., *Plasma insulin and cardiovascular mortality in non-diabetic European men and women: a meta-analysis of data from eleven prospective studies*. Diabetologia, 2004. **47**(7): p. 1245-1256.
93. Kuboki, K., et al., *Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 676-81.
94. Tsukahara, H., et al., *Experimentally induced acute hyperinsulinemia stimulates endogenous nitric oxide production in humans: detection using urinary NO₂/NO₃-excretion*. Metabolism, 1997. **46**(4): p. 406-9.
95. Zeng, G.Y. and M.J. Quon, *Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin - Direct measurement in vascular endothelial cells*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(4): p. 894-898.
96. Kashiwagi, S., et al., *eNOS phosphorylation on serine 1176 affects insulin sensitivity and adiposity*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **431**(2): p. 284-90.
97. Steinberg, H.O., et al., *Insulin mediated nitric oxide production is impaired in insulin resistance*. Diabetes, 1997. **46**: p. 92-92.

98. Mather, K., et al., *Evidence for physiological coupling of insulin-mediated glucose metabolism and limb blood flow*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(6): p. E1264-70.
99. Steinberg, H.O., et al., *Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production*. Diabetes, 2000. **49**(7): p. 1231-8.
100. Dresner, A., et al., *Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 253-9.
101. Ferreras, L., et al., *Early decrease in GLUT4 protein levels in brown adipose tissue of New Zealand obese mice*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1994. **18**(11): p. 760-5.
102. Harrison, L.C. and A. Itin, *A possible mechanism for insulin resistance and hyperglycaemia in NZO mice*. Nature, 1979. **279**(5711): p. 334-6.
103. Clarke, K.W. and L.W. Hall, *"Xylazine"--a new sedative for horses and cattle*. Vet Rec, 1969. **85**(19): p. 512-7.
104. Pypendop, B.H. and J.P. Verstegen, *Hemodynamic effects of medetomidine in the dog: a dose titration study*. Vet Surg, 1998. **27**(6): p. 612-22.
105. Buckbinder, L., et al., *Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates osteoprogenitor cells and bone formation, and offers an anabolic treatment approach for osteoporosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(25): p. 10619-24.
106. Schwinn, D.A., R.W. McIntyre, and J.G. Reves, *Isoflurane-induced vasodilation: role of the alpha-adrenergic nervous system*. Anesth Analg, 1990. **71**(5): p. 451-9.
107. De Mey, J.G. and P.M. Vanhoutte, *Anoxia and endothelium-dependent reactivity of the canine femoral artery*. J Physiol, 1983. **335**: p. 65-74.
108. Li, J., et al., *Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1843-50.
109. Tanaka, Y., et al., *NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **325**(2): p. 655-64.
110. Erkens, R., et al., *Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function*. Free Radic Biol Med, 2015. **89**: p. 906-17.
111. Gori, T., et al., *Conduit artery constriction mediated by low flow a novel noninvasive method for the assessment of vascular function*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(20): p. 1953-8.
112. Jyrkkanen, H.K., et al., *Nrf2 regulates antioxidant gene expression evoked by oxidized phospholipids in endothelial cells and murine arteries in vivo*. Circ Res, 2008. **103**(1): p. e1-9.
113. Calvert, J.W., et al., *Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling*. Circ Res, 2009. **105**(4): p. 365-74.
114. Suvorava, T., et al., *Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo*. Circulation, 2005. **112**(16): p. 2487-95.
115. Suvorava, T. and G. Kojda, *Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(7): p. 802-10.

116. Balligand, J.L., O. Feron, and C. Dessy, *eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(2): p. 481-534.
117. d'Uscio, L.V., L.A. Smith, and Z.S. Katusic, *Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice*. *Stroke*, 2001. **32**(11): p. 2658-64.
118. Kanazawa, K., et al., *Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation*. *Am J Pathol*, 1996. **148**(6): p. 1949-56.
119. Oemar, B.S., et al., *Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis*. *Circulation*, 1998. **97**(25): p. 2494-8.
120. Marchesi, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome*. *Hypertension*, 2009. **54**(6): p. 1384-92.
121. Malhotra, A., M.C. Lopez, and A. Nakouzi, *Troponin subunits contribute to altered myosin ATPase activity in diabetic cardiomyopathy*. *Mol Cell Biochem*, 1995. **151**(2): p. 165-72.
122. Meininger, C.J., et al., *Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency*. *Biochem J*, 2000. **349**(Pt 1): p. 353-6.
123. Cheng, Z.J., et al., *Vascular dysfunction in type 2 diabetic TallyHo mice: role for an increase in the contribution of PGH2/TxA2 receptor activation and cytochrome p450 products*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007. **85**(3-4): p. 404-12.
124. Pohl, U., et al., *Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo*. *Hypertension*, 1986. **8**(1): p. 37-44.
125. Paniagua, O.A., M.B. Bryant, and J.A. Panza, *Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients*. *Circulation*, 2001. **103**(13): p. 1752-8.
126. Mahmoud, A.M., et al., *Nox2 contributes to hyperinsulinemia-induced redox imbalance and impaired vascular function*. *Redox Biol*, 2017. **13**: p. 288-300.
127. Lee, A.T. and A. Cerami, *Role of glycation in aging*. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. **663**: p. 63-70.
128. Cruickshank, K., et al., *Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function?* *Circulation*, 2002. **106**(16): p. 2085-90.
129. Schram, M.T., et al., *Increased central artery stiffness in impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the Hoorn Study*. *Hypertension*, 2004. **43**(2): p. 176-81.
130. John, C., et al., *Sex Differences in Cardiac Mitochondria in the New Zealand Obese Mouse*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 732.
131. Balwierz, A., et al., *Angiogenesis in the New Zealand obese mouse model fed with high fat diet*. *Lipids Health Dis*, 2009. **8**: p. 13.

132. Li, H., et al., *Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs*. Nitric Oxide, 2002. **7**(3): p. 149-64.
133. Leiter, E.H. and P.C. Reifsnnyder, *Differential levels of diabetogenic stress in two new mouse models of obesity and type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S4-11.
134. Joost, H.G. and A. Schurmann, *The genetic basis of obesity-associated type 2 diabetes (diabesity) in polygenic mouse models*. Mamm Genome, 2014. **25**(9-10): p. 401-12.
135. Hink, U., et al., *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: therapeutic implications*. Treat Endocrinol, 2003. **2**(5): p. 293-304.
136. Wakasaki, H., et al., *Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9320-5.
137. Ishii, H., D. Koya, and G.L. King, *Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(1): p. 21-31.
138. Hink, U., et al., *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Circ Res, 2001. **88**(2): p. E14-22.
139. Viswambharan, H., et al., *Selective Enhancement of Insulin Sensitivity in the Endothelium In Vivo Reveals a Novel Proatherosclerotic Signaling Loop*. Circ Res, 2017. **120**(5): p. 784-798.
140. Yu, Y., et al., *Role of PYK2 in the development of obesity and insulin resistance*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1085-91.
141. Wang, X.H., C.Y. Yan, and J.R. Liu, *Hyperinsulinemia-induced KLF5 mediates endothelial angiogenic dysfunction in diabetic endothelial cells*. J Mol Histol, 2019. **50**(3): p. 239-251.
142. Matsui, A., et al., *Central role of calcium-dependent tyrosine kinase PYK2 in endothelial nitric oxide synthase-mediated angiogenic response and vascular function*. Circulation, 2007. **116**(9): p. 1041-51.
143. Wei, H. and R.S. Vander Heide, *Heat stress activates AKT via focal adhesion kinase-mediated pathway in neonatal rat ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(2): p. H561-8.
144. Han, S., et al., *Structural characterization of proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) reveals a unique (DFG-out) conformation and enables inhibitor design*. J Biol Chem, 2009. **284**(19): p. 13193-201.
145. Lev, S., et al., *Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions*. Nature, 1995. **376**(6543): p. 737-45.
146. Astier, A., et al., *The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosine-phosphorylated after beta1-integrin stimulation in B cells and binds to p130cas*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 228-32.
147. Dikic, I., et al., *A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation*. Nature, 1996. **383**(6600): p. 547-50.

148. Okigaki, M., et al., *Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10740-5.
149. Ottosson-Seeberger, A., et al., *Exogenous endothelin-1 causes peripheral insulin resistance in healthy humans*. Acta Physiol Scand, 1997. **161**(2): p. 211-20.
150. Park, J.G., et al., *PYK2 as a mediator of endothelin-1/G alpha 11 signaling to GLUT4 glucose transporters*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47751-4.
151. Sajjan, M.P., et al., *Sorbitol activates atypical protein kinase C and GLUT4 glucose transporter translocation/glucose transport through proline-rich tyrosine kinase-2, the extracellular signal-regulated kinase pathway and phospholipase D*. Biochem J, 2002. **362**(Pt 3): p. 665-74.
152. Ishibashi, K.I., et al., *Chronic endothelin-1 treatment leads to heterologous desensitization of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes*. J Clin Invest, 2001. **107**(9): p. 1193-202.
153. Wilkes, J.J., A. Hevener, and J. Olefsky, *Chronic endothelin-1 treatment leads to insulin resistance in vivo*. Diabetes, 2003. **52**(8): p. 1904-9.
154. Schneider, J.G., et al., *Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus*. Am J Hypertens, 2002. **15**(11): p. 967-72.
155. Rocha, N.G., et al., *Metabolic syndrome and endothelin-1 mediated vasoconstrictor tone in overweight/obese adults*. Metabolism, 2014. **63**(7): p. 951-6.
156. Xue, M., et al., *Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease*. Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2809-17.
157. Pereira, A., et al., *The Sulforaphane and pyridoxamine supplementation normalize endothelial dysfunction associated with type 2 diabetes*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14357.
158. Bielschowsky, M. and C.M. Goodall, *Origin of inbred NZ mouse strains*. Cancer Res, 1970. **30**(3): p. 834-6.
159. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
160. Seok, J., et al., *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(9): p. 3507-12.

8 Danksagung

Eine Doktorarbeit ist das Ergebnis von geduldiger wissenschaftlicher Arbeit eines Einzelnen, jedoch letztlich nur realisierbar dank der Unterstützung einer Arbeitsgruppe.

Insbesondere meine Doktormutter Frau Univ.-Prof. Dr. Dr. rer. nat. Miriam M. Cortese-Krott, die mir die Möglichkeit gab meine Doktorarbeit abzulegen und mich für meinen zukünftigen Umgang mit Forschung geprägt hat, möchte ich hier nennen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm für die Möglichkeit an den experimentellen Forschungsprojekten in den Räumlichkeiten des kardiologischen Labors mitzuwirken.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an meinen Betreuer, Herrn Dr. med. Ralf Erkens, der mich in vielerlei Hinsicht über die Arbeit mit Gefäßultraschall im Mausmodell hinaus gefördert, als auch mein Interesse am Bereich der Kardiologie und Angiologie geweckt hat. Die Rohdaten der *in-vivo* Versuche (FMD/PWV s. Abb. 21 u. 22) wurden von Herrn Dr. med. Ralf Erkens als Datensatz zur Verfügung gestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte eigenständig nach Auswahl geeigneter statistischer Tests.

Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. rer. nat. Tatsiana Suvorava für ihre geteilten Kenntnisse bezüglich der Aortenanlage sowie ihre Geduld und Unterstützung bei der Datenanalyse danken.

Ansonsten spreche ich dem Deutschen Diabetes Zentrum in Düsseldorf und insbesondere Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani meinen Dank aus, für die Kooperationsbereitschaft Labore für die Insulin ELISA Versuche zur Verfügung zu stellen.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern des kardiologischen Labors der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Universitätsklinik Düsseldorf für ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Doktorarbeit bedanken.

Schlussendlich wende ich mich dankend an meine Eltern, die mich hinsichtlich dieser Doktorarbeit bestärkt und mit Rat zur Seite gestanden haben.

Abschließen möchte ich mit einem Spruch, der mich im Rahmen meiner Doktorarbeit begleitet hat: „Alle sagten das geht nicht, dann kam einer, der das nicht wusste und hat es einfach gemacht.“