

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Akuter oxidativer Stress verstärkt die Angiotensin II-induzierte
Konstriktion mesenterialer Arterien der adulten Maus über den
p38-MAPK/MK2-Signalweg

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Steffen Schmidt

aus Brandenburg an der Havel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Patzak
2. Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski
3. Priv.-Doz. Dr. med. O. Grisk

Datum der Promotion: 19.11.2010

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	I
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERBLICK	2
2.1.1	Die Regulation des Gefäßtonus	2
2.1.2	Die Endothelfunktion	2
2.1.3	Kalzium-abhängige und Kalzium-sensitivierende Kontraktionsmechanismen der glatten Gefäßmuskulatur	4
2.2	Angiotensin II	8
2.2.1	Die Angiotensin II – Rezeptoren	8
2.2.2	Signaltransduktionswege von Angiotensin II in der glatten Muskulatur	9
2.3	Reaktive Sauerstoffspezies	10
2.3.1	Die NADPH-Oxidasen als wichtigste Quelle der vaskulären ROS-Bildung	11
2.3.2	Aufbau der vaskulären NADPH-Oxidasen	12
2.3.3	Regulation der vaskulären NADPH-Oxidasen durch Ang II	13
2.4	Endotheliale Dysfunktion und Gefäßveränderungen im Alterungsprozess	14
3	HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG	15
4	MATERIAL UND METHODEN	16
4.1	Verwendete Pharmaka und Pufferlösungen	16
4.2	Versuchstiere	17
4.3	Präparation der Mesenterialarterie	17
4.4	Myograph	18
4.4.1	Aufbau und Funktionsweise des Myographen	18
4.4.2	Normierung der Gefäßdurchmesser	19
4.5	Versuchablauf	20
4.5.1	Gewinnung von Material für die molekularbiologische Analysen	21
4.6	Messung des Kalziumtransienten	22
4.7	Messung der NADPH-Oxidase Aktivität	23
4.8	Analyse der Expression der NADPH-Oxidasen	23
4.8.1	Probenaufbereitung	24
4.8.2	Quantifizierung der RNA	24

4.8.3	Reverse Transkriptase-Reaktion (cDNA-Synthese)	25
4.8.4	Überblick zur Polymerase-Ketten-Reaktion	25
4.8.5	Real-time PCR	26
4.9	Proteinbestimmung mit SDS-PAGE und Western-Blot	28
4.10	Datenerfassung und statistische Auswertung	31
5	ERGEBNISSE	32
5.1	Funktionelle Untersuchungen an isolierten Gefäßringen	32
5.1.1	Einfluss der NADPH-Behandlung auf die Kontraktion	32
5.1.2	Die Rolle des Stickstoffmonoxidsystems	33
5.1.3	Endothel-abhängige Vasodilatation	34
5.1.4	Ang II-induzierte Kalziumtransienten	35
5.1.5	Rolle der ROS	36
5.1.6	Rolle des p38-MAPK / MAPKAPK-2 Signalweges	38
5.1.7	Einfluss der Purinrezeptoren	40
5.2	Aktivität und Expression der NADPH-Oxidasen	41
5.2.1	Simulation der ROS-Produktion mit NADPH	41
5.2.2	Expressionsanalysen	42
5.3	p38-MAPK- und MLC ₂₀ -Phosphorylierung	42
6	DISKUSSION	45
6.1	Einfluss des Alters auf die Expression und Aktivität der NADPH-Oxidasen	45
6.2	Mechanismen der Kontraktionsverstärkung durch NADPH	47
6.3	Modell des akuten oxidativen Stresses	52
7	ZUSAMMENFASSUNG	55
8	LITERATURVERZEICHNIS	57
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	71
10	LEBENS LAUF	75
11	VERÖFFENTLICHUNGSVERZEICHNIS	76
12	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	78
13	DANKSAGUNG	79

1 Einleitung

Oxidativer Stress entsteht durch eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und/oder verminderte antioxidative Kapazität und stellt eine wesentliche Komponente des Alterungsprozesses dar. Eine Reihe pathologischer Veränderungen des Gefäßsystems, insbesondere der Endothelzellen, werden durch oxidativen Stress induziert¹²⁶. Vaskuläre Alterung wird dabei überwiegend als eine endotheliale Dysfunktion infolge vermehrter ROS verstanden.

Lokale und systemische Renin-Angiotensin-Systeme mit dem Effektor Angiotensin II (Ang II) sind an der Regulation der Organdurchblutung und des systemischen Blutdruckes beteiligt. Ang II ist ein Vasokonstriktor, der seine Wirkung über kalziumabhängige und kalziumsensitivierende Signalwege vermittelt⁸⁸. Studien weisen auf eine Beteiligung der stressinduzierten p38 mitogen aktivierten Protein-Kinase (MAPK) an kalziumsensitivierenden Signalwegen in vaskulären glatten Muskelzellen hin^{89;102;111}. Ang II induziert glattmuskuläre Kontraktion auch über Aktivierung von ROS. Eine wesentliche Quelle der ROS ist die NADPH-Oxidase^{9;36;41;124}. Signalwege dieser kontraktiven Ang II-Wirkung schließen wiederum die p38-MAPK ein^{31;40;41;84;88;103}.

Diese Befunde führten zu unserer Hypothese, dass oxidativer Stress nicht nur vorrangig endotheliale Veränderungen hervorruft, sondern auch die Kontraktionsmechanismen der glatten Gefäßmuskeln auch unabhängig vom endothelialen Stickstoffmonoxid beeinflussen kann. Wir nehmen an, dass die p38-MAPK als Vermittler oxidativen Stresses in der Zelle die Einstellung des Gefäßtonus durch vasoaktive Stoffe, insbesondere durch Ang II, moduliert.

Die bisher überwiegend anekdotisch beschriebenen Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress, p38-MAPK-Signalwegen und Gefäßkontraktion sollen in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Dabei stellten wir uns die Frage, wie akuter oxidativer Stress die Ang II-vermittelte Gefäßkontraktion beeinflusst, welche Rolle die Stress-induzierte p38-MAPK dabei spielt und ob diese Wirkungen altersabhängig sind. Es wurde ein Modell akuten oxidativen Stresses durch Stimulation mit dem Substrat der NADPH-Oxidase (NADPH) entwickelt. Funktionelle Untersuchungen (Gefäßkontraktion und -dilatation), pharmakologische Manipulationen, Genexpressionsanalysen der NADPH-Oxidase-Komponenten, und der Einsatz von gendefizienten Tieren dienen der Beantwortung der Fragestellung.

2 Literaturüberblick

2.1.1 Die Regulation des Gefäßtonus

Eine wichtige Fähigkeit des Kreislaufes ist, Blutdruck und Organdurchblutung trotz sich ständig ändernder Bedingungen dem metabolischen Bedarf anzupassen. Bei der Regulation des Blutkreislaufes spielt die glatte Muskulatur der Blutgefäße eine entscheidende Rolle. Blutgefäße befinden sich unter Ruhebedingungen des Organs oder des Organismus in einem Zustand, der Ruhetonus genannt wird. Eine Zunahme dieses Tonus entspricht einer Gefäßkonstriktion, eine Abnahme einer Gefäßdilataion. Durch ein sehr fein reguliertes Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion gewährleistet die glatte Muskulatur der Gefäße einen adäquaten Perfusionsdruck für die regionale Blutverteilung in den verschiedenen Stromgebieten des Organismus. Zentrale Mechanismen die den Tonus beeinflussen werden durch das Kreislaufzentrum koordiniert und über den Sympathikus, sowie durch Hormone vermittelt. Zusätzlich wird regional, also im Gefäß selbst oder im umgebenen Gewebe, der Tonus durch lokal wirkende vasoaktive Mediatoren (Autakoide) und myogene Antworten beeinflusst bzw. eingestellt ¹²⁵.

2.1.2 Die Endothelfunktion

Das Endothel bildet als kontinuierliche, einschichtige Zellschicht eine selektiv permeable Barriere zwischen dem extra- und intravasalen Raum. Das Endothel produziert und sezerniert viele verschiedene Autakoide und reguliert damit aktiv eine Vielzahl von Funktionen ^{164;165}. Eine entscheidende Rolle spielt das Endothel bei der Kontrolle und Modulation des Gefäßmuskeltonus, somit ist es an der funktionsadäquaten Gewebedurchblutung mitbeteiligt ^{13;34;162}. Zu den kontraktil wirkenden Autakoiden, die das Endothel sezerniert, zählen unter anderem Thromboxan A₂, Endothelin-1, Prostaglandin H₂ und Angiotensin II ^{88;148;164;165}. Zu den wichtigsten sezernierten Vasodilatoren gehören der "Endothelium-Derived Relaxing Factor" (EDRF), der dem chemisch instabilen Stickstoffmonoxid (NO) entspricht ^{55;107}, das Prostaglandin I₂ (Prostazyklin) ^{164;165}, sowie der „Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor“ (EDHF) ^{97;164;165}.

Unter den Vasodilatoren nimmt das Stickstoffmonoxid eine zentrale Rolle bei der Regulierung wichtiger physiologischer Prozesse der Zelle ein. NO diffundiert frei durch

Zellmembranen und aktiviert dort intrazelluläre Rezeptoren, und reagiert mit einer Vielzahl von Molekülen und Radikalen. Neben seiner Funktionen als vasodilatierender, antiaggregatorischer, antiproliferativer und antiinflammatorischer *second messenger*^{3;90}, wirkt NO antioxidativ und verhindert eine Verschiebung des Reduktions-Oxidations-Gleichgewichtes zu Gunsten der oxidativen Seite^{3;90;123;138}.

Die endogene Biosynthese von NO erfolgt durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen (NOS). Die NO-Synthasen katalysieren in einer oxidoreduktiven Reaktion die Bildung von NO und L-Citrullin aus der Aminosäure L-Arginin unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH^{3;123} (Abb. 1). Bisher sind drei bis zu 320 kDa große Isoformen der NOS bekannt, die sich in ihrer gewebespezifischen Verteilung, der Fähigkeit zur NO-Produktion, und in ihrer Induktivität unterscheiden. Dabei handelt es sich um eine neuronale (nNOS, NOS-I), eine induzierbare (iNOS, NOS-II) und eine endotheliale (eNOS, NOS-III) Isoform^{3;123}. Die nNOS ist hauptsächlich in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems und im Skelettmuskel lokalisiert, während die eNOS überwiegend in vaskulären Endothelzellen, Kardiomyozyten und Thrombozyten exprimiert wird^{3;90}. Die nNOS und eNOS sind konstitutiv exprimiert und sind für die kontinuierliche Synthese von NO als Signalmolekül im neuronalen und kardiovaskulären System verantwortlich. Die Aktivierung der konstitutiven NOS erfolgt über einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch eine Förderung der Bindung von Calmodulin an die NO-Synthase³. Die iNOS wird Kalzium-unabhängig im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr und bei inflammatorischen Reaktionen^{3;90} exprimiert, wodurch temporär wesentlich höhere zytotoxische NO-Konzentrationen produziert werden können.

Die vasorelaxierende Wirkung des endothelialen NO wird in den VSMC durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) ausgelöst (Abb. 1). Die sGC katalysiert die Umsetzung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP)^{3;68}. Das Signalmolekül cGMP aktiviert mehrere Signalkaskaden. In glatten Gefäßmuskelzellen ist die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK)⁵³ eine der Hauptziele für cGMP. Durch die Hemmung der Inositoltriphosphat-vermittelten Kalziumfreisetzung und einer verstärkten Rückspeicherung von Ca²⁺ mittels Aktivierung einer Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SR)¹⁹, führt die cGK zu einer verminderten zytosolischen Kalziumkonzentration, deren Folge eine Vasorelaxation ist.

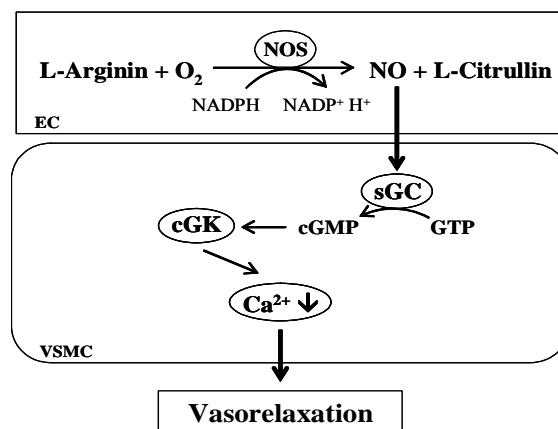


Abbildung 1: Schematische Darstellung des NO/cGMP – Signalweges.

NO (Stickstoffmonoxid), eNOS (endotheliale NO-Synthase), sGC (lösliche Guanylatzyklase), GTP (Guanosintriphosphat), cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat), cGK (cGMP-abhängige Proteinkinase), $\text{Ca}^{2+} \downarrow$ steht für das Absinken der Kalziumkonzentration, EC (Endothelzelle), VSMC (glatte Gefäßmuskelzelle).

Die Erkennung und Umsetzung von zellulären Signalen durch Expression von Rezeptoren, z.B. für Wachstumsfaktoren oder Zytokinen ist eine weitere wichtige Funktion des Endothels. Das Endothel der Gefäße hat demnach mit seinen Funktionen einen wesentlichen Anteil an der Regulation der Vasorelaxation und Vasokonstriktion, der Hämostase, dem vaskulären Wachstum und Remodelling^{164;165}.

2.1.3 Kalzium-abhängige und Kalzium-sensitivierende Kontraktionsmechanismen der glatten Gefäßmuskulatur

Die glatte Muskulatur enthält als kontraktile Elemente Aktin-, Tropomyosin- und Myosinfilamente. Bei der Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC, „vascular smooth muscle cells“) ist der Schlüsselmechanismus die Steuerung der Phosphorylierung der regulatorischen leichten Myosin Kette (MLC_{20}) des Myosin, die etwa 20 kDa groß ist^{51;121;133}. Dadurch wird eine Interaktion von Myosin und Aktin ermöglicht, die schließlich die Kontraktion der VSMC veranlasst. Im Wesentlichen kann das über zwei verschiedene Signalwege geschehen: 1. Über den Kalzium-abhängigen Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex und 2. Kalzium-unabhängig über verschiedenste Protein-Kinase-Systeme. Bei beiden Signalwegen wird das Myosin Rezeptor-vermittelt aktiviert (Abb. 2).

Eine Aktivierung von membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, „g-protein coupled receptor“) durch Liganden, wie z.B. Ang II, bewirkt das heterotrimäre $G_{\alpha_q/11}$ -Proteine die Phospholipase C_{β} (PLC_{β}) stimulieren¹⁵⁸. Die PLC_{β} hydrolysiert aus dem kleinen Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), die *second messenger* Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). Die Bindung von IP_3 an den IP_3 -Rezeptor des SR hat eine Ca^{2+} -Freisetzung in das Zytosol zur Folge. Die intrazellulären Kalziumspeicher werden durch Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran wieder aufgefüllt, dies wird als kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom bezeichnet und dient der Aufrechterhaltung einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration⁸⁷. Durch die erhöhte Kalziumkonzentration wird schließlich die Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) -abhängige leichte Myosin-Ketten-Kinase (MLCK, „myosin light chain kinase“) aktiviert und führt zur Phosphorylierung der MLC_{20} am Serin-19^{51;121;133}.

Kalzium-unabhängig wird der Phosphorylierungsgrad der MLC_{20} von der Myosin-leichten-Ketten-Phosphatase (MLCP, „myosin light chain phosphatase“) reguliert. Durch Abspaltung der Phosphatgruppe vom Serin-19 der MLC_{20} induziert die MLCP eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur⁷⁶. Die MLCP besteht aus drei Untereinheiten. Einer 38 kDa großen katalytischen Untereinheit (PP1c), einer 110 kDa großen regulatorischen Untereinheit (MYPT1, „myosin phosphatase target 1“), sowie einer 20 kDa großen Untereinheit (M20) mit noch unbekannter Funktion^{51;121;133}.

Über eine Stimulation von $G_{\alpha_{12/13}}$ gekoppelten Protein-Rezeptoren erfolgt die Aktivierung des RhoA/Rho-Kinase Signalweges³⁸. Die Rho-Kinase vermindert die Aktivität der MLCP durch Phosphorylierung der MYPT1 Untereinheit⁶³. Über diesen Weg kann der Phosphorylierungsgrad der MLC_{20} aufrechterhalten werden. Es resultiert eine verstärkte Kontraktilität der VSMC bei konstanter Kalziumkonzentration^{51;121;133}. Dieser Prozess wird als Kalziumsensibilisierung bezeichnet. Die Rho-Kinase kann aber auch direkt die MLC_{20} am Serin-19 phosphorylieren und so eine Kontraktion der VSMC auslösen. Das ist sogar in völliger Abwesenheit von Kalzium möglich⁶⁹. Neben der Rho-Kinase können noch die „integrin-linked kinase“²⁵, die „p21-activated protein kinase“¹⁴¹, und die „zip-Kinase“⁹⁹ die MLC_{20} Kalzium-unabhängig phosphorylieren, oder über eine Phosphorylierung der MYPT1-Untereinheit der MLCP den Aktivitätsgrad der MLC_{20} erhöhen^{51;121;133}.

Ein anderer Weg der Hemmung der MLCP läuft über das CPI-17 Inhibitor-Protein. CPI-17 phosphoryliert die PP1c Untereinheit der MLCP, wodurch ihre Aktivität gesenkt wird^{29;30}.

Ursprünglich wurde CPI-17 als Substrat für die Proteinkinase C (PKC) entdeckt. Jedoch ist nun bekannt, dass die Aktivität von CPI-17 durch Phosphorylierung von mehreren Kinasen reguliert wird. Dazu gehören z.B. die PKC²⁹, Rho-Kinase⁶⁷, „integrin-linked kinase“²⁴, und die „p21-activated protein kinase“¹⁴¹.

Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind ebenfalls an der Regulation der Gefäßkontraktilität beteiligt. Als Bestandteil der inter- und intrazellulären Signaltransduktion beeinflussen sie beispielsweise die Proliferation, Differenzierung, Inflammation und Apoptose. Die Aktivierung erfolgt in einer Signalkaskade durch übergeordnete Kinasen. Als wichtige Substrate für die MAPK dienen zahlreiche Transkriptionsfaktoren, Interleukine, Zytokine, sowie weitere Kinasen und Proteine, wie z.B. die MAPK aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK2, MK2) und HSP („Heat Shock“ Proteine). Es gibt mehrere Isoformen und verwandte Subgruppen innerhalb der Kinase-Kaskaden. Diese sind miteinander verknüpft und bilden so ein Signaltransduktionsnetzwerk. Die Familie der MAPK kann in drei große Gruppen eingeteilt werden. Hierzu zählen die „extrazellulär regulierte Kinase“ (ERK), die „c-jun-NH₂-terminale Kinase“ (JNK), und die p38-MAP-Kinase^{17;102;111}.

Im Folgenden wird nun die p38-MAPK im Kontext der Gefäßkontraktilität näher betrachtet. Von der 38kDa großen p38-MAPK wurden bislang vier Isoformen identifiziert - p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ . Im vaskulären System werden vor allem die p38 α - und die p38 β -MAPK Isoform exprimiert. Die p38-MAPK wird durch physikalischen Stress, wie erhöhte Wandspannung durch Scherkräfte, oder osmotische Gradienten und UV-Exposition, aber auch durch Zytokine und GPCR aktiviert¹⁰². Als weitere Aktivatoren der p38-MAPK werden in der Literatur verschiedene reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid und Superoxidanion genannt⁷. In Endothelzellen und in VSMC ist die p38-MAPK an Prozessen der Gefäßpermeabilität, Zytokinproduktion, Proliferation, Differenzierung, Zellhypertrophie und vasomotorischen Funktionen mitbeteiligt^{102;111}. Taniyama und Mitarbeiter beschrieben, dass nach erfolgter Stimulierung die p38-MAPK mit der Proteinkinase Akt und ihrem direkten Substrat MAPKAPK2 (MK2) einen Signalkomplex bildet¹⁴². In der Folge kann das kleine Hitze-Schock-Protein 27 (HSP27) phosphoryliert werden⁷³. Durch Interaktion mit Aktinfilamenten und Verstärkung der Aktinpolymerisation beeinflusst HSP27 die Kontraktilität der VSMC⁷⁵. Zugleich kann die MAPKAPK2 aber auch direkt die MLC₂₀ an der gleichen Bindungsstelle wie die MLCK phosphorylieren, und so zu einer erhöhten Gefäßkontraktilität führen⁶⁴.

Der Phosphorylierungsgrad der MLC_{20} , und damit die Fähigkeit zur Kontraktion der glatten Muskulatur, wird demnach durch ein fein abgestimmtes System von verschiedensten Ca^{2+} -abhängigen und sensitivierenden Kinase Signalwegen gesteuert.

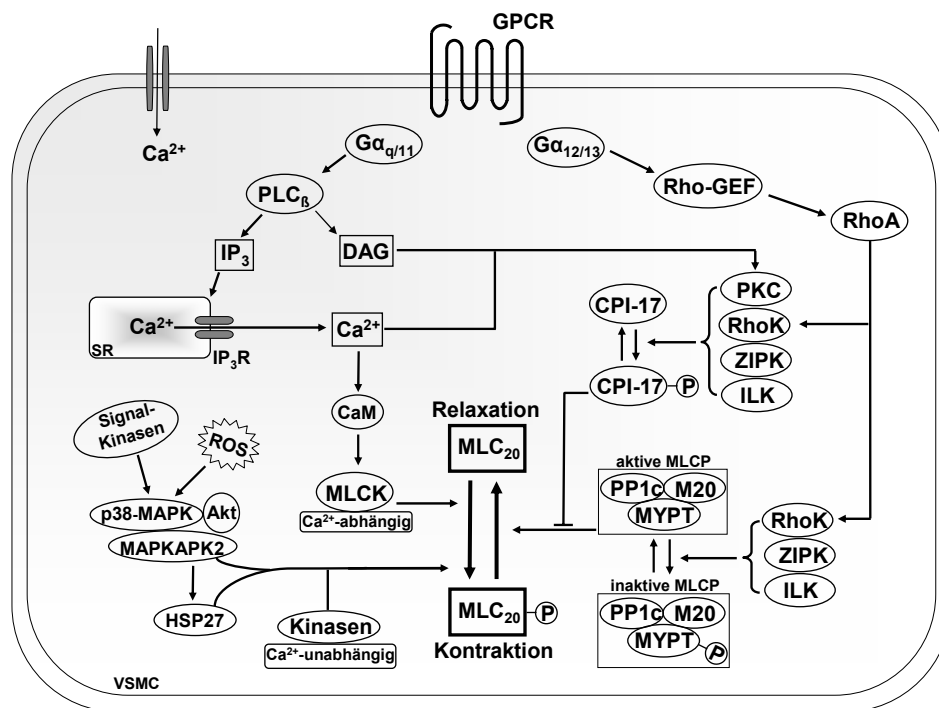


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signalwege für die Kontraktion in VSMC (Modifiziert nach Sanders, KM¹²¹). Die Aktivierung der $G\alpha_{q/11}$ -Proteine führt zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und Aktivierung der Ca^{2+} /CaM-abhängigen MLCK. $G\alpha_{12/13}$ -Proteine aktivieren den RhoA/RhoK-Signalweg. Über GPCR, ROS und Rezeptor-unabhängige Kinasen wird der p38-MAPK Komplex aktiviert. Die Signalwege erhöhen den Phosphorylierungsgrad der MLC_{20} und führen so zu einer Steigerung der Kontraktilität der VSMC.

Abkürzungen: GPCR (G-Protein gekoppelter Rezeptor), $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ (heterotrimere G-Proteine), PLC_{β} (Phospholipase C_β), IP_3 (Inositoltriphosphat), DAG (Diazylglyzerol), SR (sarkoplasmatisches Retikulum), CaM (Ca²⁺/Calmodulin-Komplex), Ca^{2+} (Kalziumion), P (Phosphatgruppe), MLCK (Myosin-leichte-Ketten-Kinase), MLC (regulatorische leichte Kette des Myosin), Rho (Ras-Homolog), GEF („guanine nucleotide exchange factor“), RhoK (Rho-Kinase), MLCP (Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase), MYPT (regulatorische Untereinheit der MLCP), PP1c (katalytische Untereinheit der MLCP), M20 (nicht katalytische Untereinheit der MLCP), CPI-17 („PKC-potentiated inhibitory protein“), PKC (Proteinkinase C), ZIPK („zipper-interacting protein kinase“), ILK („integrin-linked kinase“), ROS (reaktive Sauerstoffspezies), Akt (Proteinkinase), MAPK (mitogen aktivierte Proteinkinase), HSP („heat shock protein“).

2.2 Angiotensin II

Ang II wurde ursprünglich als ein potenter Vasokonstriktor beschrieben. Heute wird Ang II vielmehr als ein multifunktionales Hormon angesehen, das eine Fülle wichtiger zellulärer Prozesse wie Proliferation, Migration, Apoptose, Inflammation, und Fibrosierung beeinflusst und reguliert^{88;148}. Während der Entwicklung ist Ang II ein bedeutender Wachstumsmodulator für Blutgefäße und die renale Organentwicklung. Unter physiologischen Bedingungen spielt Ang II eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Vasotonus und des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes. Bei pathologisch veränderten Bedingungen ist Ang II durch seine Eigenschaften bei Störungen des Gefäßtonus, der endothelialen Dysfunktion mit erhöhtem oxidativen Stress, und Inflammationsreaktionen mitbeteiligt. Dieses sind auch charakteristische Kennzeichen die bei vaskulären Alterungsprozessen und der Arteriosklerose auftreten^{41;88;103;148;163;165}.

2.2.1 Die Angiotensin II – Rezeptoren

Ang II vermittelt seine Wirkung über spezifische Ang II-Rezeptoren (AT-R). Man unterscheidet zwei Rezeptoren, den AT₁- und den AT₂-Rezeptor. Diese werden nach ihrer Affinität für Losartan (AT₁-R) und für CPG 42112A, PD123177 und PD123319 (AT₂-R) differenziert^{11;23}. Beim AT₁-Rezeptor der Maus treten zwei Subtypen auf, der AT_{1A}-R und der AT_{1B}-R, die in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Verhältnissen exprimiert werden. So überwiegt der AT_{1A}-R im kardiovaskulären Gewebe, während der AT_{1B}-R in Drüsengewebe wie der Nebenniere überwiegt⁵⁶. Über den AT₁-Rezeptor vermittelt Ang II Wirkungen wie Vasokonstriktion, Zellproliferation und Zellhypertrophie, Inflammation, Osmoregulation, Sympathikusmodulation, und oxidativen Stress²³.

Die Bedeutung und Funktion des AT₂-R ist heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Der AT₂-Rezeptor wird überwiegend im Gehirn und den Nebennieren, geringer im Gefäßendothel und Myokard exprimiert. Im fetalen Gewebe ist der AT₂-R weiter verbreitet, was auf eine Bedeutung im Entwicklungs- und Differenzierungsprozess hindeutet. Zu den AT₂-R vermittelten Wirkungen zählen Vasodilatation, Zelldifferenzierung, Apoptose, und antiproliferative, antifibrotische und antiinflammatorische Effekte^{23;78;156;170}. Daher werden dem AT₂-R gewebeprotective Eigenschaften zugeschrieben, die den Effekten des AT₁-R entgegenwirken. Die Regulierung des

Gefäßtonus durch den AT₂-Rezeptor wird kontrovers diskutiert. Viele Studien ordnen dem AT₂-Rezeptor vasodilatatorische Eigenschaften zu, jedoch gibt es auch entgegengesetzte Befunde²³.

Insgesamt scheint auf funktioneller Ebene¹⁵⁶ und auf zellulärer Signalebene ein intensiver Austausch zwischen dem AT₁-R und dem AT₂-R zu bestehen¹⁵. Möglicherweise moduliert der AT₂-R auf diese Weise die physiologischen und pathophysiologischen Effekte des AT₁-R.

2.2.2 Signaltransduktionswege von Angiotensin II in der glatten Muskulatur

Aufgrund der Funktions- und Regulationsvielfalt von Ang II werden im Folgenden nur die Signalwege, die zu einer Gefäßkonstriktion, sowie zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies führen, genauer betrachtet.

Durch Bindung von Ang II an den AT₁-R werden verschiedene Signaltransduktionsmechanismen aktiviert (Abb. 3). Eine der Hauptfunktionen von Ang II ist die Fähigkeit zur Induktion einer akuten Gefäßkontraktion, welche innerhalb von Sekunden über den Kalzium-abhängigen und -unabhängigen G-Protein-gekoppelten Signalweg vermittelt wird (Kapitel 2.1.2). Neben den bisher schon beschriebenen Aktivierungswegen, wird G-Protein-abhängig die Phospholipase D (PLD) stimuliert^{88;148}. Sie hydrolysiert Phosphatidylcholin und es entsteht Phosphatidsäure und Cholin. Die Phosphatidsäure wird dann in DAG umgewandelt. Unter Beteiligung von Ca²⁺-Ionen aktiviert DAG die Proteinkinase C, die eine Gefäßkontraktion induzieren kann^{88;148}. Es wurde auch gezeigt, dass Ang II die Phospholipase A₂ (PLA₂) phosphoryliert und aktiviert^{88;148}. Die Stimulierung der PLA₂ führt zur Freisetzung von Arachidonsäure (AA), die wiederum Vorläufer der Prostaglandin- und Leukotrienbildung ist^{88;148}. Die durch Cyclooxygenase gebildeten Prostaglandin I₂ und Prostaglandin E₂ haben eine vasodilatatorische Wirkung. Denen gegenüber stehen das vasokonstriktorisch wirkende Prostaglandin H₂ und Tromboxan A₂. Die Lipooxygenase katalysiert die Bildung von vasokonstriktorischen Leukotrienen aus der AA. Es wurde gezeigt, dass Ang II über Arachidonsäure bzw. deren Metabolite^{83;172} und die Proteinkinase C die NADPH-Oxidasen aktivieren kann, in deren Folge vermehrt ROS gebildet werden. Ang II trägt über diese Signalwege zur Einstellung des oxidativen Status der Zelle bei^{36;83;88;148}.

AT₁-R-vermittelt kann Ang II in einer Signalkaskade über die NADPH-Oxidasen und verschiedene Tyrosinkinasen die mitogen aktivierten Proteinkinasen (siehe Kapitel 2.1.2) aktivieren^{18;36;88;102;148}. Von Sylvain Meloche und Mitarbeitern wurde beschrieben, dass der p38-

MAPK Signalweg die Ang II-induzierte Kontraktilität von Aortensegmenten beeinflusst⁸⁹. Eine Inhibition der p38-MAPK führte zu einer signifikant verminderten Ang II-Antwort. An glatten Gefäßmuskelzellen wurde gezeigt, dass Ang II die p38-MAPK durch reaktive Sauerstoffspezies, die von der NADPH-Oxidase gebildet wurden, aktiviert¹⁵³. Die funktionale Relevanz eines Ang II – NADPH-Oxidase – p38-MAPK – Signalweges für die vasomotorische Reaktivität ist damit noch nicht gezeigt.

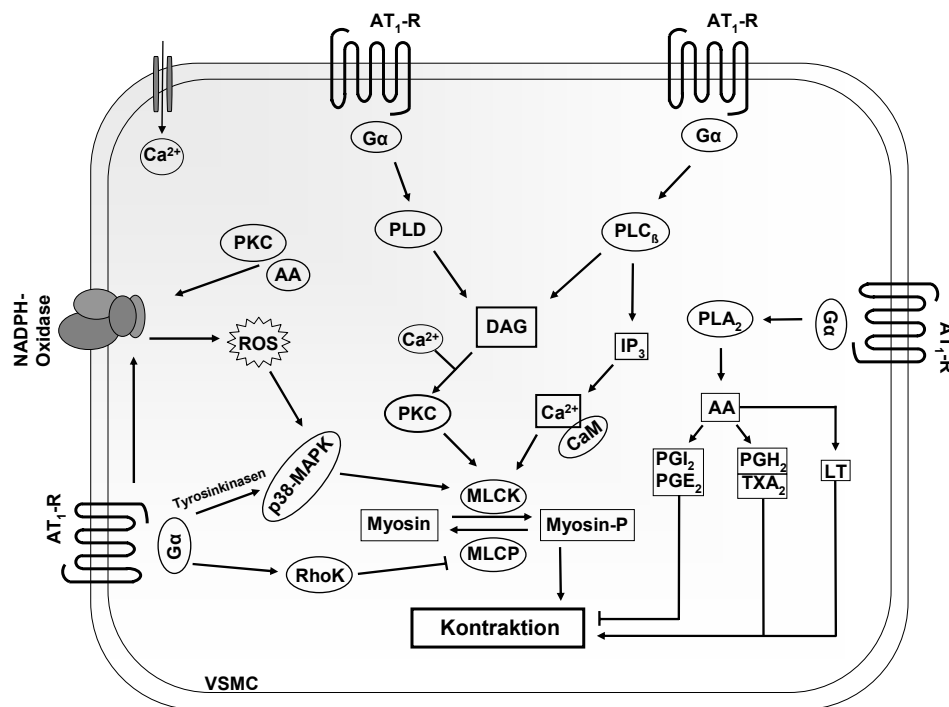


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der kontraktiven Signalwege des AT₁-R in VSMC (Modifiziert nach Mehta, PK⁸⁸). Erläuterung siehe obigen Text.

Abkürzungen: AT₁-R (Angiotensin-Rezeptor Typ 1), Gα (heterotrimere G-Proteine), PLC_β (Phospholipase C_β), IP₃ (Inositoltriphosphat), DAG (Diacylglycerol), PKC (Proteinkinase C), CaM (Ca²⁺/Calmodulin-Komplex), Ca²⁺ (Calciumion), P (Phosphatgruppe), MLCK (Myosin-leichte-Ketten-Kinase), MLCP (Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase), RhoK (Rho-Kinase), PLA₂ (Phospholipase A₂), AA (Arachidonsäure), PGI₂ (Prostaglandin I₂), PGE₂ (Prostaglandin E₂), PGH₂ (Prostaglandin H₂), TXA₂ (Tromboxan A₂), LT (Leukotriene), PLD (Phospholipase D), ROS (reaktive Sauerstoffspezies), MAPK (mitogen-aktivierte-Proteinkinasen).

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Radikale sind Atome, Moleküle oder Substanzen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in ihrer äußeren Hülle aufweisen. Dadurch erhalten sie eine hohe Potenz chemische Reaktionen mit anderen Molekülen einzugehen. Radikale die molekularen Sauerstoff enthalten werden als

reaktive Sauerstoffspezies bezeichnet. Zu den ROS gehören das Superoxidation (O_2^-), das Hydroxylradikal ($HO\bullet$), Peroxinitrit ($ONOO^-$), und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), obwohl H_2O_2 per Definition kein Radikal ist. Eine zentrale Bedeutung innerhalb der ROS nimmt das Superoxidation ein. In einer aus Superoxid-Dismutase (SOD) katalysierten Reaktion entsteht aus O_2^- das reaktionsfreudige H_2O_2 , das durch Katalase in das besonders reaktive Hydroxylradikal überführt wird. Das $HO\bullet$ reagiert mit fast allen organischen Bestandteilen von Zellen²². Superoxidation ist indessen in seinem Reaktionsverhalten selektiver als $HO\bullet$. In einer der schnellsten chemischen Reaktionen reagiert O_2^- mit NO zu Peroxinitrit und inaktiviert damit das wesentlich an der Regulation des Gefäßtonus mitbeteiligte NO^{3;45}. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen ROS produzieren und in ihrer Funktion durch ROS beeinflusst werden^{18;41}. Es gibt eine Reihe von Enzymsystemen die konstitutiv oder induzierbar ROS generieren können. Hierzu werden z.B. die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, die Cytochrom P₄₅₀-Monooxygenasen, die Xanthin-Oxidasen, die NO-Synthasen und die NADPH-Oxidasen^{42;77} gezählt.

Die ROS haben eine nicht zu unterschätzende Bedeutung im Stoffwechsel. Sie können zahlreiche oxidative Veränderungen im Organismus auslösen und dadurch physiologische Funktionen beeinflussen. So entstehen z.B. ROS bei der Signaltransduktion verschiedener Regulationsvorgänge und fungieren als „*second messenger*“. Weiterhin sind sie an der vasomotorischen Regulation beteiligt^{37;41;42;77;83}.

2.3.1 Die NADPH-Oxidasen als wichtigste Quelle der vaskulären ROS-Bildung

Die NADPH-Oxidase wurde ursprünglich in Leukozyten beschrieben¹²⁰ und ist im Rahmen der Zell-vermittelten Pathogenabwehr sehr gut charakterisiert worden. In diesen Zellen führt ein induzierbarer „oxidative burst“ zu einer antipathogenen Wirkung^{9;74;139}.

Alle vaskulären Zellen verfügen über eine funktionsfähige NADPH-Oxidase. Es wurde wiederholt gezeigt, dass unter den verschiedenen ROS produzierenden Enzymsystemen die NADPH-Oxidasen die Hauptquelle der ROS-Produktion in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen darstellen^{40;41;114}. Die vaskulären NADPH-Oxidasen sind Membran-assoziierte Enzyme, die die Reduktion eines Elektrons des Sauerstoffs mit Hilfe von NADPH als Elektronenspender katalysieren. Funktionelle Untersuchungen der vaskulären NADPH-Oxidase konnten Unterschiede zum ursprünglich entdeckten Enzymkomplex der Leukozyten aufdecken.

In vaskulären Zellen erfolgt die O_2^- -Generierung auf wesentlich geringerem Niveau ohne „oxidative burst“ und ist eher konstitutiv^{9;74;105;139}.

2.3.2 Aufbau der vaskulären NADPH-Oxidasen

Die vaskulären NADPH-Oxidasen bestehen aus mehreren Untereinheiten (Abb. 4). Grundbaustein ist das membranständige Flavocytochrom b558¹²⁷. Dieses ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten p22^{phox} (phox: „phagocyte oxidase“) und dem Glykoprotein gp91^{phox}. Zur Elektronenübertragung von NADPH auf molekularen Sauerstoff sind die prosthetischen Gruppen FAD und Häm an diese beiden Untereinheiten gebunden¹¹⁹. Um eine Aktivierung der NADPH-Oxidase abhängigen O_2^- -Produktion zu erreichen, ist die Beteiligung der zytosolischen Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} notwendig. Bei der Aktivierung wird p47^{phox} PKC-abhängig phosphoryliert⁷⁴. Nach Komplexbildung mit p67^{phox} translozieren beide Untereinheiten an das membranständige Cytochrom b558, wo die Organisation und Aktivierung mit folgender O_2^- -Bildung von p67^{phox} und dem kleinen G-Proteine Rac moduliert wird^{9;74}.

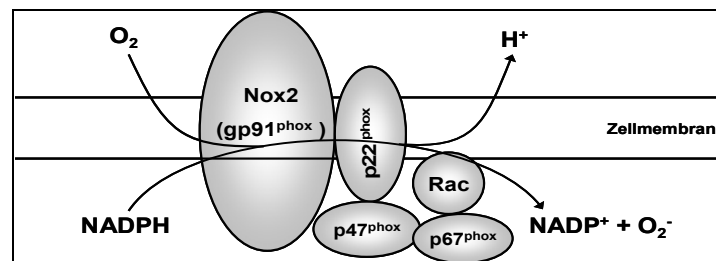


Abbildung 4: Schematische Darstellung der vaskulären Nox2. (Modifiziert nach Griendling, KK⁴¹)

Gp91^{phox} stellt die katalytische Einheit des membranständigen Flavocytochroms der NADPH-Oxidase in Phagozyten dar. In den letzten Jahren konnten gp91-Homologe in verschiedenen Zellen und Organismen nachgewiesen werden^{9;74;139}. Nach Einführung einer einheitlichen Nomenklatur wird gp91 auch als Nox2 (Nox: NADPH-Oxidase) und seine Homologe wiederum als Nox1, Nox3, Nox4 und Nox5 bezeichnet^{9;74}. So ist z.B. Nox4 in allen Zelltypen der Gefäßwand exprimiert, während Nox2 hauptsächlich in VSMC von Widerstandsgefäßen und in Endothelzellen exprimiert wird^{9;74;83}. Die Substratspezifität der vaskulären NADPH-Oxidase wurde kontrovers diskutiert. Es wurde jedoch vielfach gezeigt, dass NADPH das bevorzugte Substrat der vaskulären NADPH-Oxidase ist. Im vaskulären System führt NADPH zu einer wesentlich höheren O_2^- -Bildung als NADH¹³⁴.

2.3.3 Regulation der vaskulären NADPH-Oxidasen durch Ang II

Die komplexe Aktivierung der NADPH-Oxidase erfolgt biphasisch. Sie kann akut innerhalb von Minuten durch Ligandenbindung an den AT₁-Rezeptor, oder chronisch über Stunden bis Tage erfolgen. Für die vorliegende Arbeit ist die akute Aktivierung der NADPH-Oxidase von besonderem Interesse.

Durch Bindung an den AT₁-Rezeptor aktiviert Ang II die NADPH-Oxidase über die drei Phospholipasen PLC, PLA₂, und PLD³⁶. Diese phosphorylieren über ihre Metabolite, bzw. direkt über PKC die zytosolische p47^{phox} Untereinheit und induzieren damit die Aktivierung der NADPH-Oxidase. Die Ang II-vermittelte NADPH-Oxidase Aktivierung erfordert aber auch das kleine G-Protein Rac. Ang II aktiviert über die βγ-Untereinheit von heterotrimären Gq-Proteinen die Tyrosinkinase Src¹⁵¹. Durch Phosphorylierung aktiviert c-Src die Kinase c-Abl¹⁶¹, welche den GEF („guanine nucleotide exchange factor“) stimuliert. Die Rac-GEF Aktivierung ist wiederum abhängig von der Src-vermittelten EGFR („epidermal growth factor-receptor“) Transaktivierung. EGFR dient dann als Bindungsstelle für die PI3-Kinase, die ein unmittelbarer Rac-GEF Aktivator ist¹²⁹. Als Folge der EGFR- und PI3-K-Anregung wird die NADPH-Oxidase, durch GEF-vermittelte Rac-Stimulierung, aktiviert. Die generierten ROS aktivieren ihrerseits Src, wodurch die NADPH-Oxidase in einer Selbst-Aktivierungsschleife die eigene ROS-Produktion erhöht. Es wurde durch Touyz und Mitarbeiter gezeigt, dass Ang II auch eine Assoziation von p47^{phox} und Aktin durch Interaktion mit Cortactin induziert. Cortactin ist ein bevorzugtes Substrat von Src^{150;152}. So ist die NADPH-Oxidase über Ang II-vermittelte Src-Aktivierung an der Regulation des Zytoskeletts und des Gefäßtonus beteiligt¹⁴⁹.

Es wurde bereits gezeigt^{36;42;88;148}, dass Ang II erhöhten oxidativen Stress in der Gefäßwand induzieren kann. Ursache dafür ist eine erhöhte Aktivität der vaskulären NADPH-Oxidasen^{18;36;42;83;88;114}. Ebenso wurde in der Literatur berichtet, dass eine erhöhte Aktivität der NADPH-Oxidasen durch Ang II-Stimulation mit einer Induktion der Expression von p22^{phox} oder p67^{phox} einhergeht^{104;160}.

Unter pathologischen Bedingungen mit z.B. erhöhter Ang II Konzentration wird die Aktivität der NADPH-Oxidasen gesteigert, und verändert so das Gleichgewicht von NO und O₂⁻ zugunsten der Radikale. Es wird den vaskulären NADPH-Oxidasen aufgrund erhöhter ROS-Bildung, auch durch Ang II, eine wesentliche Rolle bei Genese der endothelialen Dysfunktion und der Arteriosklerose im Alterungsprozess zugeteilt⁴¹.

2.4 Endotheliale Dysfunktion und Gefäßveränderungen im Alterungsprozess

Die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion beruht auf einem multifaktoriellen Prozess. In der Literatur wurden mehrere pathologische Mechanismen beschrieben, die zu einem Ungleichgewicht des Reduktions-Oxidations-Status im vaskulären System führen. Oxidativer Stress infolge erhöhter vaskulärer Produktion von ROS wird als wichtigster Mechanismus in diesem Prozess angesehen. Antioxidative Systeme wie SOD, Katalase, Glutathion, und NO stehen den oxidativen ROS gegenüber. Eine Zunahme der Konzentration von freien Radikalen führt zu einer Dysbalance des Reduktions-Oxidations-Status in der Zelle zugunsten der oxidativen Seite, welches als oxidativer Stress bezeichnet wird und mit einer endothelialen Dysfunktion einhergeht. Bei der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion nehmen das O_2^- und $ONOO^-$, sowie die NADPH-Oxidase eine besondere Rolle ein. Durch pro-arteriosklerotische Reize, pro-inflammatorische Zytokine und Ang II werden die NADPH-Oxidasen stimuliert und bilden vermehrt O_2^- ⁴¹. Die Produktion von O_2^- verbraucht NO und bildet als Endprodukt Peroxynitrit, das wiederum über eine Oxidation eines eNOS-Kofaktors ³ die eNOS entkoppelt, welche statt NO nun Superoxidanionen produziert. Es resultiert ein *circulus vitiosus* mit der Folge einer deutlich verringerten NO-Bioverfügbarkeit ^{3;14;165}.

Es gibt zahlreiche Hypothesen darüber, wie der Prozess des vaskulären Alterns verläuft. Darunter ist die Annahme, dass das Altern der Gefäße durch eine Zunahme oxidativen Stresses verursacht wird, weitgehend akzeptiert. Es kommt z.B. zu einer Zunahme der ROS-Produktion und des oxidativen Schadens an Proteinen und Lipiden, sowie zu einer verstärkten apoptotischen Aktivität. Oxidativer Stress ist auch die Folge geschwächter antioxidativer Abwehrsysteme. Im Alterungsprozess kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Endothel-abhängigen Vasorelaxation was sowohl in Tiermodellen ¹⁶³ als auch beim Menschen ¹⁷⁴ gezeigt werden konnte. In venösen Endothelzellen älterer Männer fand sich eine vermehrte Expression der p47^{phox} Untereinheit der NADPH-Oxidase ²⁷. Mechanischen Faktoren, wie z. B. pulsatiler Stress und Scherkräfte, spielen mit zunehmendem Alter eine immer größere Rolle. Sie stimulieren die Produktion freier Sauerstoffradikale, insbesondere O_2^- , in den Endothelzellen ⁵². Es ist bekannt, dass VSMC in Arterien älterer Mäuse höhere Niveaus von ROS erzeugen und eine erhöhte MAP-Kinasen-Aktivität aufweisen ⁹¹.

Zu den relevanten strukturellen Gefäßveränderungen im Alterungsprozess gehört die zunehmende Wandverdickung in nahezu allen arteriellen Gefäßen. In der Tunica intima trägt hier die Anhäufung von extrazellulärer Matrix aus kleinen elastischen Fasern und Mikrofibrillen bei, welches auf einer verstärkte Aktivität der SMC zurückzuführen ist. In der Tunica media wurde eine Zunahme von Kollagenen und eine Abnahme von elastischen Fasern beschrieben. Diese Veränderungen laufen ebenfalls auf eine Anhäufung des oxidativen Schadens in der Gefäßwand hinaus, die den Fortschritt von Arteriosklerose im Alter erleichtert ¹⁰³.

3 Herleitung der Aufgabenstellung

Oxidativer Stress in Gefäßen und Gefäßalterung wird bisher fast ausschließlich mit einer endothelialen Dysfunktion in Verbindung gebracht. Neuere Erkenntnisse über die Rolle stressinduzierter Kinasen bei der Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur weisen jedoch auf die Möglichkeit einer NO-unabhängigen Beeinflussung kontraktiler Gefäßfunktion der glatten Muskulatur durch oxidativen Stress hin.

In der vorliegenden Arbeit wird Hypothese geprüft, dass oxidativer Stress über Signalwege, welche die p38-MAPK einschließen, die kontraktile Funktion glatter Muskelzellen beeinflusst und dass dieser Effekt altersabhängig ist.

Folgende Aufgaben wurden abgeleitet:

1. Etablierung eines Modells akuten oxidativen Stresses in Mesenterialarterien der Maus
2. Untersuchung der Expression der beteiligten ROS-produzierenden Systeme
3. Untersuchung der kontraktilen/dilatativen Gefäßfunktion bei oxidativem Stress mittels Myographie und Evaluation einer Interaktion von Ang II mit oxidativem Stress
4. Untersuchung der Rolle von p38-MAPK und des Signalweges durch pharmakologische und biochemische Methoden

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Pharmaka und Pufferlösungen

In den Experimenten wurden folgende Chemikalien und Substanzen verwendet:

Von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D:

Ang II ($C_{50}H_{71}N_{13}O_{12}$), Apocynin ($HOC_6H_3(OCH_3)COCH_3$), APS ($H_8N_2O_8S_2$), BSA (Rinderserumalbumin), Chloroform ($CHCl_3$), Isopropanol ($(CH_3)_2CHOH$), Kalziumchlorid ($CaCl_2$), Lucigenin ($C_{28}H_{22}N_4O_6$), NADPH ($C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 \cdot 4C_6H_{13}N$), PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung), Phenylephrin ($C_9H_{13}NO_2$), SB220025 ($C_{18}H_{19}FN_6 \cdot 3HCl$), SDS ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$), Suramin ($C_{51}H_{34}N_6Na_6O_{23}S_6$), TEMED ($(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$), Tempol ($C_9H_{18}NO_2$), Tiron ($C_6H_4Na_2O_8S_2$).

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D:

Aceton (CH_3COCH_3), Coomassie Blau R-250 ($C_{45}H_{45}N_3NaO_7S_2$), Diethylether ($(CH_3CH_2)_2O$), DMSO ($(CH_3)_2SO$), Essigsäure ($C_2H_4O_2$), Ethanol (CH_3CH_2OH), Glycin (NH_2CH_2COOH), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Methanol (CH_3OH), Milchpulver, Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$), TBS-T (Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20), TCA (Cl_3CCOOH), Tris ($NH_2C(CH_2OH)_3$), Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$).

Weitere Substanzen:

Fura-2 AM ($C_{44}H_{47}N_3O_{24}$, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D), D(+)-Glucose ($C_6H_{12}O_6$, Merck KGaA, Darmstadt, D), EDTA ($((HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D), steriles Reinstwasser (Biochrom AG, Berlin, D), RNase-freies Wasser (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D).

Für die funktionellen Experimente im Organbad wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (K-H-L) bestehend aus 112 mmol/l NaCl, 4,9 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l $CaCl_2$, 1,19 mmol/l KH_2PO_4 , 1,2 mmol/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 24,67 mmol/l $NaHCO_3$, 5,55 mmol/l D(+)-Glucose, und 0,027 mmol/l EDTA hergestellt. Zur Gefäßpräparation wurde eine K-H-L mit verringerter $CaCl_2$ -Konzentration (0,629 mmol/l) benutzt. Für die Herstellung der Pufferlösung wurde bidestilliertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage verwendet. Die Pufferlösung wurde mit medizinischem Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2 , Linde Gas, Berlin, D) begast und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

4.2 Versuchstiere

Es wurden männliche Mäuse des Stammes C57/Bl6 und männliche MAPKAPK-2 defiziente Mäuse (MK2-/-)⁶⁶ verwendet. Die MK2-/- Mäuse wurden mit C57/Bl6 Mäusen rückgekreuzt, so dass C57/Bl6 als Wildtypen (Kontrolltiere) geeignet waren (Überlassung von Prof. Dr. rer. nat. M. Gaestel, Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover). Es wurden zwei Altersgruppen untersucht. Die Gruppe juveniler Tiere hatte im Mittel ein Alter von $65 \pm 6,1$ Tagen und ein Gewicht von $23 \pm 2,5$ Gramm. Die Gruppe adulter Tiere war durchschnittlich $160 \pm 20,6$ Tage alt und wog $31 \pm 2,9$ Gramm. Die Versuchstiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité am Campus Mitte von erfahrenen Tierpflegern gezüchtet, unter Standardbedingungen in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, sowie mit Pressfutter und Wasser ernährt. Sämtliche Tierexperimente fanden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006, herausgegeben vom Bundesministerium der Justiz, statt. Eine Genehmigung zur Tötung der Versuchstiere lag vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit des Bundeslandes Berlin vor (T0089/06).

4.3 Präparation der Mesenterialarterie

In den Versuchen wurden Mesenterialarterien der ersten Ordnung, d.h. die ersten abzweigenden Äste der Arteria mesenteria superior, auf ihre Eigenschaften untersucht. Die Versuchstiere wurden narkotisiert und durch zervikale Translokation getötet. Die Bauchdecke wurde eröffnet und das Darmpaket mit Mesenterium dargestellt. Der Darm wurde proximal am Duodenum und distal am Colon sigmoideum mit einem Faden abgebunden, an diesen Punkten erfolgte die Durchtrennung des Darmes. Anschließend wurde die A. mesenterica superior an ihrem Abgang aus der Aorta mit dem nun freien Darm abgesetzt, und in einem eisgekühlten (4°C) mit K-H-L gefülltem Becherglas aufbewahrt. Zur weiteren Präparation wurde dieses Präparat in eine mit schwarzem Silikon beschichtete und mit kalter K-H-L befüllten Petrischale überführt. Unter einem Stereomikroskop (Typ MZ6 Leica, Wetzlar, D) wurde der Darm mit dünnen Nadeln aufgespannt. Ein geeigneter Abgang der A. mesenterica superior wurde aufgesucht und ohne direkte Berührung mit Hilfe einer Präzisionspinzette (Dumont Nr. 5, Schweiz) und Mikroschere (Aesculap OC498R, Aesculap AG & CO, Tuttlingen, D) von umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit. Aus der frei präparierten Arterie wurde mit Hilfe einer Messeinheit im Objektiv des Mikroskops ein zwei Millimeter langer Ring

herausgeschnitten. Durch den Gefäßring wurde nun unter größter Vorsicht ein Edelstahldraht (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dänemark) mit 40 µm Durchmesser geschoben, ohne dabei die Gefäßwand zu berühren. Nun wurde ein zweiter Gefäßring aus einem Abgang der A. mesenterica superior frei präpariert. Bis die Gefäßringe in den Myographen eingesetzt werden konnten wurden sie mit dem Edelstahldraht in einer zweiten Petrischale, die ebenfalls gekühlt und mit K-H-L gefüllt war, aufbewahrt. Die hier verwendete Krebs-Henseleit-Lösung enthielt zur Gefäßschonung weniger Kalziumchlorid (0,629 mmol/l). Dadurch waren die Gefäßringe stärker relaxiert, welches ein leichteres Einführen des Edelstahldrahtes ermöglicht.

4.4 Myograph

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der Gefäßsegmente ein Myograph System eingesetzt, wie es im Jahre 1976 von Mulvany und Halpern erstmals vorgestellt wurde⁹⁵. Seit der Einführung hat sich diese Untersuchungstechnik von Gefäßsegmenten nach Mulvany und Halpern zu einer Standardmethode von *in vitro* Untersuchungen an Blutgefäßen entwickelt. Mit Hilfe des Myographen können isolierte Gefäße systematisch auf ihre funktionellen Eigenschaften analysiert werden. Der luminäre Durchmesser der Gefäße kann dabei bis zu 60 µm klein sein. Durch definierte isometrische Bedingungen können verschiedene Experimente an den gleichen Gefäßabschnitten miteinander verglichen werden. So ist es möglich, eine gründliche Beschreibung eines bestimmten Gefäßabschnittes vorzunehmen.

4.4.1 Aufbau und Funktionsweise des Myographen

Mit den verwendeten Myographen (Modell 410A und 500A, DMT, Aarhus, Dänemark) können zwei Gefäßringe gleichzeitig in getrennten Messkammern voneinander unabhängig untersucht werden. Zur Aufzeichnung der Versuchsdaten war der Myograph über eine Schnittstelle (Myo-Interface) mit einem Computersystem verbunden. Der Myograph besaß eine Heizung zur Erwärmung der enthaltenen Lösungen. Die Temperatur in der Kammer wurde durch ein Regulationsystem des Myographen konstant bei 37°C gehalten. Neu eingebrachte Lösungen wurden zuvor in einem Wasserbad ebenfalls auf diese Temperatur erwärmt und damit störende Temperaturschwankungen beim Wechsel des Organbades vermieden. Die Messkammern waren mit einer Abdeckung verschlossen, die eine konstante Gaszufuhr, den Austausch des Organbades, und das Einbringen von den verwendeten Wirkstoffen ermöglichte. Zur

Aufrechterhaltung des pH-Wertes von 7,4 wurde das Organbad über die gesamte Versuchszeit mit Carbogen begast. Der Wechsel des Organbades erfolgte durch ein schnelles Absaugen mit Hilfe einer externen Saugpumpe und durch rasches Auffüllen neuer K-H-L mittels einer 5 ml Pipette. Die Messkammern hatten jeweils ein Volumen von 8 ml. Der zu untersuchende Gefäßring wurde mit zwei Edelstahldrähten an den beiden Trägerbacken befestigt. Ein Träger war mit einem Signalwandler und Kraftmesser verbunden, der Zweite mit einer Mikrometerstellschraube. Mit der Mikrometerstellschraube konnte der Abstand der beiden Träger zueinander in μm Schritten verändert werden. Der Kraftmesser hatte eine Empfindlichkeit 0,01 mN.

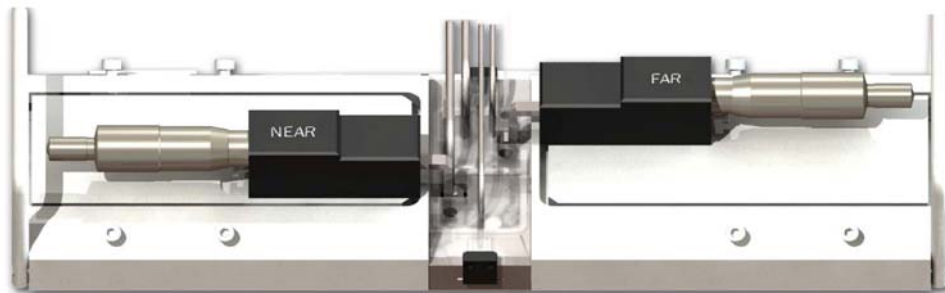


Abbildung 5: Beispiel eines verwendeten Myographen - DMT-Modell 410A.

(Quelle: Benutzerhandbuch DMT - Dual Wire Myograph System, Model 410A, Version 3.2)

4.4.2 Normierung der Gefäßdurchmesser

Mit der Myographietechnik werden *in vitro* Bedingungen geschaffen, die die Gegebenheiten einer *in vivo* Situation simulieren. Damit verschiedene Gefäße miteinander vergleichbar sind, wurde für jedes Gefäß ein optimaler Lumendurchmesser mit der entsprechenden Vorspannung eingestellt. Hier erreichen die kontraktile Elemente der glatten Gefäßmuskulatur die größte Kraftentfaltung. Wenn ein Gefäßsegment so gespannt wird, dass die Dehnung der eines transmuralen Druckes von 100 mmHg entspricht, ist ein Zustand erreicht, der als IC_{100} bezeichnet wird. Untersuchungen von Mulvany und Halpern haben gezeigt, dass die aktive Kraftentwicklung eines Gefäßes am größten ist, wenn der innere Gefäßdurchmesser 90% des IC_{100} beträgt⁹⁵. Dieser Durchmesser wird als IC_1 -Wert definiert. Mittels eines speziellen Normalisierungsprotokolls wird der IC_1 -Wert für jeden untersuchten Gefäßring ermittelt. Bei der Normalisierung werden die Trägerbacken schrittweise um 50 μm voneinander entfernt. Die einzelnen Abstandsveränderungen der Träger und die dabei verursachten Kräfte werden vom

Myographen über die Zeit von einer Minute erfasst. Mit Hilfe der bekannten Daten aus Gefäßlänge, Kraftentwicklung, Abstand und Stärke der Edelstahl-drähte berechnet ein Normalisierungsmodul (ADInstruments GmbH, Spechbach, D) den inneren Gefäßdurchmesser und die erzeugte tangentielle Wandspannung. Am Ende der Normalisierung wird das Gefäßsegment auf den IC_1 -Wert eingestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden ein automatisierter Myograph (DMT-Modell 500A) und ein manueller Myograph (DMT-Modell 410A) verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Normalisierungsprozedur beim Modell 500A auch manuell durchgeführt.

4.5 Versuchablauf

Die Versuchstiere wurden getötet und die Mesenterialarterien zum Einsetzen in den Myographen, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, vorbereitet. Zum Einspannen der Gefäßringe wurden die Untersuchungskammern des Myographen mit 5 ml der 4°C kalten und begasten K-H-L befüllt, die weniger Kalzium enthält. Das Gefäßsegment wurde zunächst mit dem Draht an dem Trägerbacken befestigt, der mit dem Signalwandler verbunden war. Nun wurde äußerst vorsichtig ein zweiter, ebenfalls 40 µm dicker Draht, durch das Gefäß geführt. Dabei musste insbesondere darauf geachtet werden, dass die Drahtspitze nicht die Gefäßwand berührt. Als nächstes wurden die Träger mit der Mikrometerstellschraube so dicht wie möglich zusammen gefahren, ohne dabei den Gefäßring einzuklemmen. Erst dann konnte der zweite Draht an dem Träger, der mit der Mikrometerstellschraube verbunden war, befestigt werden. Der Gefäßring war so frei beweglich und wurde durch die Drähte nicht gedehnt (Abbildung 6). Danach wurde die K-H-L durch 5 ml gekühlte und begaste normale K-H-L ersetzt. Die Thermostatierung des Myographen wurde auf 37°C eingestellt und die Gaszufuhr geöffnet. Nach dem Erreichen der gewünschten Temperatur wurde das in Kapitel 4.4.2 beschriebene Normalisierungsprotokoll durchgeführt. Anschließend wurde die K-H-L erneuert. Nach einer Stabilisierungsphase von 20 Minuten wurden die K-H-L durch eine stark kaliumhaltige (100 mmol/l KCl) K-H-L ausgetauscht. Diese erhöhte Kaliumkonzentration führt zu einer Membrandepolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Es kommt es zu einem spannungsabhängigen Kalziumeinstrom in die VSMC. In der Folge reagierte das Gefäß mit einer maximalen Vasokonstriktion. Nach dem Erreichen der maximalen Konstriktion wurde die kaliumhaltige K-H-L wieder durch normale K-H-L ausgewaschen.

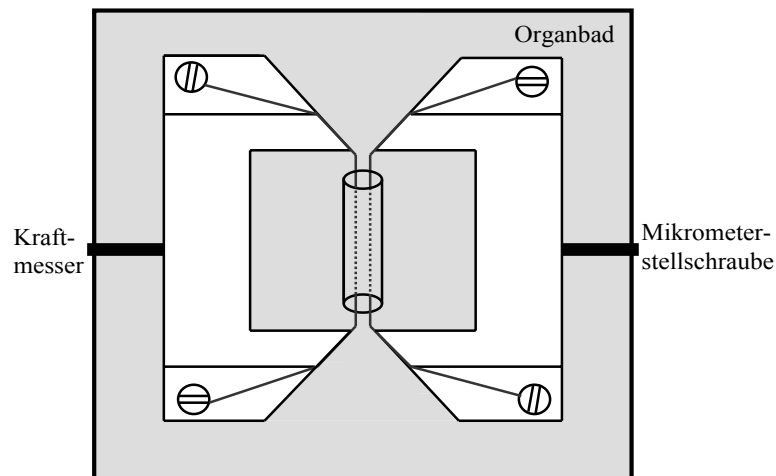


Abbildung 6: Schemaskizze der Messkammer eines Myographen mit eingespanntem Gefäßring.

Nun wurden die Gefäßringe für die Dauer einer Stunde mit den jeweiligen Wirkstoffen in der K-H-L inkubiert. Folgende Substanzen und Konzentrationen wurden verwendet: NADPH ($3 \cdot 10^{-5}$ mol/l), L-NAME (10^{-4} mol/l), SB220025 ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/l), Apocynin (10^{-4} mol/l), Tempol (10^{-4} mol/l) und Suramin (10^{-4} mol/l). Die K-H-L und Wirkstoffe wurden alle 20 Minuten erneuert. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte die Messung einer kumulativen Konzentrations-Antwort-Kurve für Ang II von 10^{-10} bis $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l, bzw. für Acetylcholin von 10^{-9} bis 10^{-6} mol/l.

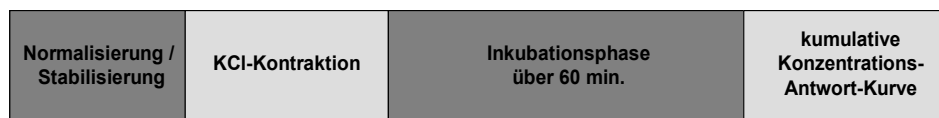


Abbildung 7: Protokoll der funktionellen Untersuchungen

4.5.1 Gewinnung von Material für die molekularbiologische Analysen

Die gesamte Arteria mesenterica superior mit ihren Ästen wurde präpariert und mit dem gleichen Versuchsprotokoll der einzelnen Gefäßringe behandelt. Für die weiteren Analysen wurden das Gewebe nach dem Versuch in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in 10%-iger TCA in Acetonlösung fixiert und anschließend bei -80°C gelagert.

4.6 Messung des Kalziumtransienten

Für die Messung des Kalziumtransienten wurden die spektralen Fluoreszenzeigenschaften des Kalzium-sensitiven Farbstoffes Fura-2 verwendet, weil das Exzitationsspektrum dieses Kalziumchelators von der Bindung freier Kalziumionen abhängig ist⁴⁶. Fura-2 bindet Ca^{2+} in einem Verhältnis von 1:1. Wird ein Ca^{2+} -Ion gebunden kommt es zu einer Veränderung in der Struktur des elektronischen Energieniveaus mit einem veränderten Absorptionsverhalten von Fura-2. Das Maximum der Fluoreszenzintensität wird zu einer anderen Anregungswellenlänge verschoben. Das Maximum des Exzitationsspektrums ist für die kalziumgebundene Form von Fura-2 bei $\lambda_1 = 340$ nm, für die kalziumfreie Form bei $\lambda_2 = 380$ nm. In beiden Bereichen erfolgt die maximale Emission bei $\lambda = 510$ nm. Als Messgröße dient das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten F_{340} und F_{380} , welche durch Anregung mit den Wellenlängen λ_{340} und λ_{380} bei 510 nm emittiert werden. Der Quotient F_{340}/F_{380} wird als „Ratio“ bezeichnet und verhält sich proportional zur Konzentration freier Kalziumionen⁴⁶.

Zur Messung des Kalziumtransienten muss Fura-2 in das Zytosol der VSMC der Gefäßringe gebracht werden. Fura-2 AM als ein nicht fluoreszierender, membranpermeabler, lipophiler Acetoxymethylester kann direkt in das Organbad des Myographen inkubiert werden. In veresterter Form diffundiert Fura-2 AM in das Zytosol, wo die Esterbindungen hydrolytisch aufgespalten werden. Der nun polarisierte Farbstoff ist eine Ca^{2+} -sensitive, freie Säure, die in dieser Form membranimpermeabel und fluoreszent ist⁹².

Die Gefäßringe wurden im Myographen über 90 Minuten unter Lichtschutz mit $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l FURA-2 AM inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Auswaschen über fünf Minuten, um Fura-2 AM vollständig aus dem Organbad zu entfernen. Nach einer Stabilisierungsphase von 10 Minuten wurde die Konzentration-Antwort-Kurve für Ang II gemessen. Der Einfluss von NADPH wurde durch gleichzeitige Inkubation mit FURA-2 AM ermittelt. Durch das Austauschen des Organbades mit K-H-L, die 100 mM KCl enthielt, wurden die Gefäßringe anschließend zur maximalen Kalziumausschüttung und Vasokonstriktion angeregt. Die Fluoreszenz-Messung erfolgte mit einem Fluoreszenz System Interface FSI 700 (IonOptix Corp., Milton, USA) mit dem die Gefäßringe abwechselnd alle zwei Sekunden bei 340 und 380 Nanometer angeregt wurden. Die Emissionsintensität wurde bei 510 nm gemessen. Aus den erhaltenen Ratio-Werten konnte dann der Verlauf des Kalziumtransienten, bezogen zur maximalen Kalium-induzierten Kontraktion, dargestellt werden.

4.7 Messung der NADPH-Oxidase Aktivität

Die NADPH-Oxidase Aktivität der untersuchten Gefäßringe wurde mit Hilfe der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz-Methode erfasst. Die Chemilumineszenz-Methode ist eine der Standard Untersuchungen zur Detektion von intrazellulären Superoxidanionen. Bei Kontakt mit O_2^- setzt Lucigenin Photonen frei, die im Luminometer gemessen werden können. Es wird postuliert, dass das Lucigenin-Kation (Luc^{2+}) durch Aufnahme von einem Elektron zum Radikal (Luc^+) reduziert wird. Dieses reagiert mit dem Superoxidradikal zu einem instabilen Intermediat, welches zerfällt und dabei ein angeregtes Acridon bildet. Das Acridon emittiert dann beim Rückfall in den Ruhezustand Licht^{143;166}.

Für die Messung der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz wurde die gesamte mesenteriale Gefäßarkade der *A. mesenterica superior* der adulten und juvenilen Versuchstiere frei präpariert. Die Gefäßsegmente wurden anschließend für zehn Minuten bei 37° C in einem K-H-L-HEPES Puffer mit folgenden zusätzlichen Substanzen inkubiert: L-NAME (10^{-4} M) als NO-Synthase-Inhibitor, Allopurinol (10^{-4} M) als Xanthinoxidase-Inhibitor und Rotenon ($5 \cdot 10^{-5}$ M) zur Blockierung der mitochondrialen Elektronentransportkette. Zur Kontrolle der Spezifität erfolgte jeweils eine simultane Messung mit zusätzlicher Applikation von Tiron ($2 \cdot 10^{-2}$ M). Nach der Inkubationsphase erfolgte die Applikation von Lucigenin ($5 \cdot 10^{-6}$ M). Die Chemilumineszenz wurde bei 37 °C alle 30 s für eine Sekunde über eine halbe Stunde mit einem Luminometer (Microlumat Plus Berthold, Bad Wildbad, D) gemessen. Danach wurde NADPH ($3 \cdot 10^{-5}$ M) in das Reaktionsgemisch appliziert und die Chemilumineszenz für weitere 30 min aufgezeichnet. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Ang II (10^{-8} M) zum Reaktionsansatz und die Chemilumineszenz wurde für weitere 20 Minuten aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte in relativen Lichteinheiten (RLU = relative light units) pro Minute und Milligramm Trockengewicht.

4.8 Analyse der Expression der NADPH-Oxidasen

Die Expression der verschiedenen NOX Isoformen und Untereinheiten wurde mit Hilfe der Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) analysiert.

4.8.1 Probenaufbereitung

Für die Untersuchung der NOX-Expression wurde die mesenteriale Gefäßarkade der Arteria mesenterica superior verwendet, und mit den gleichen Protokollen, wie in Kapitel 4.5 beschrieben behandelt. Für die Gewinnung der RNA aus der mesenterialen Gefäßarkade wurden die Gewebeproben mit 1000 µl RNA-Bee (#CS-501B, Tel-Test, Inc., Friendswood, USA) versetzt und mit verschiedenen großen Pipettenspitzen homogenisiert und anschließend gevortext. Um die Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu vervollständigen, wurden die Proben für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden nun mit 200 µl Chloroform versetzt, für 20 Sekunden kräftig geschüttelt, und für fünf Minuten bei 4°C inkubiert. Nun wurde die Probe bei 12000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Laborzentrifuge 3K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, D), um eine Phasenauftrennung zu bekommen. Die obere, wässrige Phase, die RNA enthält, wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ausfällung der RNA erfolgte bei -20°C über Nacht. Danach wurden die Proben 30 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml 75%-igem Ethanol in RNase-freiem Wasser gewaschen und fünf Minuten bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend in 6 µl sterilem Wasser gelöst.

4.8.2 Quantifizierung der RNA

Die gewonnene RNA wurde anschließend mit dem Spectrophotometer (Beckman DU 640, Beckman GmbH, Krefeld, D) zur Überprüfung der Reinheit und der Konzentration untersucht. Nach Verdünnung (1:100) der RNA-Lösung wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Extinktionswert (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt die Konzentration, der in der Probe vorhandenen Ribonukleinsäuren. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und des RNA-Faktors ($40 \mu\text{g/ml} : \text{OD}_{260} = 1$) kann die Konzentration in µg/µl berechnet werden. Die Reinheit der in den Proben vorhandenen RNA wurde durch Quotientenbildung zwischen den Extinktionswerten bei 260 und 280 nm ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) überprüft. Dieser Quotient sollte zwischen 1,8-2,0 liegen.

4.8.3 Reverse Transkriptase-Reaktion (cDNA-Synthese)

Vor der PCR muss aus der gewonnen RNA, durch das Enzym Reverse-Transkriptase, zuerst eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden ⁶². Hierfür wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4368814) und der RNase Inhibitor (#N8080119, Applied Biosystems, Darmstadt, D) entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Die einzelnen Komponenten waren auf 4°C gekühlt. Von der isolierten RNA wurden 650 ng mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 10 µl in PCR Tubes aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 10 µl des RT-Mixes. Die PCR Tubes wurden im Thermocycler T3 (Biometra GmbH, Göttingen, D) inkubiert und die cDNA transkribiert. Hierbei wurde folgendes Programm angewandt. Annealing-Reaktion für zehn Minuten bei 25°C, Elongationsreaktion für 120 Minuten bei 37°C, Inaktivierung des Enzyms durch Erwärmung auf 85°C für fünf Sekunden, Abkühlung auf 4°C. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung für die PCR-Reaktion wurde die cDNA auf 10 ng/µl verdünnt.

Zusammensetzung des RT-Mixes:

2 µl	10 x RT Buffer
0,8 µl	25 x dNTPs (100 mM)
2 µl	10 x RT Random Primer
1 µl	MultiScribe Reverse Transcriptase (50 u/µl)
1 µl	RNase Inhibitor (20 u/µl)
3,2 µl	steriles Wasser

4.8.4 Überblick zur Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur selektiven Vervielfältigung von definierten Nukleinsäuresequenzen wurde 1987 von Mullis und Faloona ⁹⁴ die Polymerase-Kettenreaktion entwickelt. Für die Amplifikation werden eine DNA-abhängige Polymerase, Desoxyribonukleotide und zwei Oligonukleotide (Primer) benötigt, welche gegenläufig den Zielbereich der DNA einschließen. Zuerst wird die DNA bei über 90°C denaturiert. Beim Annealing lagern sich bei niedriger Temperatur die Primer an spezifischen, durch die Basensequenz festgelegten Stellen, auf dem DNA-Template an. Darauf folgend synthetisiert das thermostabile Enzym DNA-Polymerase, in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden, neue komplementäre DNA-Stränge (Elongation). Dieser Zyklus aus

Denaturierung, Annealing und Elongation wird 20 bis 50 Mal wiederholt. Nach jedem Reaktionszyklus kommt es zu einer Verdopplung der DNA Moleküle. So können in kurzer Zeit große Mengen an DNA gewonnen werden.

4.8.5 Real-time PCR

Die Real-time PCR beruht auf der Polymerase-Kettenreaktion. Bei dieser Variante der PCR kann während der Amplifizierung die Menge an gebildeten PCR-Produkten überprüft bzw. dargestellt werden. Die hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren in die neu entstandenen DNA-Stränge und erzeugen Licht, dessen Intensität bis zum Erreichen eines Maximums ansteigt. Dafür wird einmal pro Zyklus die Zunahme der Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR[®]-Green bei einer Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Amplifikate gemessen. Aus den gemessenen Emissionen werden Amplifikationskurven erstellt und der Ct-Wert (Cycle-Threshold) für ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau ermittelt. Der Ct-Wert gibt die Anzahl an Zyklen an, bei der das Fluoreszenzsignal der neu gebildeten DNA-Stränge die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Der Ct-Wert ist direkt von der in der PCR-Reaktion eingesetzten cDNA-Menge abhängig und befindet sich in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Am Ende der PCR werden die Proben langsam von 50°C auf 95°C erhitzt. Dabei wird kontinuierlich die Fluoreszenzintensität gemessen und mit Hilfe der ersten Ableitung die Schmelzkurve ermittelt. Dadurch ist eine Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktion, durch Differenzierung zwischen den gewünschten spezifischen PCR-Produkten und unspezifischen Produkten, wie z.B. Bildung von Primerdimeren, möglich. Es erfolgt jeweils eine simultane Messung eines Referenzgens zur Berechnung der relativen Genexpression.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Real-time PCR mit einem StepOnePlus[™] Real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, D) und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]-Green (Bioline, Luckenwalde, D) durchgeführt. In die Vertiefungen einer 96-well PCR-Platte wurden 25 µl des Real-time-PCR-Reaktionsansatzes pipetiert. Die Platte wurde anschließend mit einer Abdeckfolie verschlossen und die Proben kurz abzentrifugiert. Folgendes PCR-Programm wurde durchgeführt: Nach einem 10-minütigem Denaturierungsschritt bei 95°C folgten 40 Zyklen mit jeweiliger Denaturierung bei 95°C über 15 Sekunden, Annealing bei 65°C über 1 Minute, Elongation bei 77°C über 30 Sekunden. Die abschließende Schmelzkurvenanalyse erfolgte von 50°C – 95°C. Es wurden jeweils drei Ansätze mit der gleichen cDNA-Matrize pipettiert. Zur

Kontrolle diente β -Aktin als Referenzgen, da es unter den gegebenen Bedingungen in konstanter Menge vorhanden ist. Als Negativkontrolle wurden Proben ohne cDNA verwendet. Die Auswertung und Berechnung der relativen Genexpression erfolgt mit Hilfe der Δ Ct-Methode mit der zugehörigen Software zum StepOnePlus™ Real-time PCR System. Die Differenz der Ct-Werte der einzelnen gemessenen Gene und des Ct-Wertes von β -Aktin liefert die Δ Ct-Werte. Diese sind ein Maß für die relative mRNA-Menge der untersuchten Gene in Bezug zu β -Aktin als Referenzgen.

Zusammensetzung des Real-time-PCR-Reaktionsansatzes:

1 μ l = 10 ng	cDNA-Template
12,5 μ l	2 x ImmoMix™
0,5 μ l	50 x SYBR®-Green
0,5 μ l	Vorwärts-Primer (10pmol/ μ l)
0,5 μ l	Rückwärts-Primer (10pmol/ μ l)
10 μ l	steriles Wasser

Für die Real-time PCR wurden folgende Primer verwendet:

Primer:	Genbank Acc.-Nr	Sequenz 5' - 3'	Produktgröße in Basenpaaren
Nox1 vorwärts:	NM_172203	GGTTGGGGCTGAACATTTTTC	167
Nox1 rückwärts:		TCGACACACAGGAATCAGGAT	
Nox2 vorwärts:	NM_007807	GCACCTGCAGCCTGCCTGAATT	187
Nox2 rückwärts:		TTGTGTGGATGGCGGTGTGCA	
Nox4 vorwärts	NM_015760	GGCTGGCCAACGAAGGGGTAA	188
Nox4 rückwärts:		GAGGCTGCAGTTGAGGTTTCAGGACA	
p22 ^{phox} vorwärts	NM_007806	CTGGCGTCTGGCCTGATTCTCATC	200
p22 ^{phox} rückwärts:		CCGAAAAGCTTCACCACAGAGGTCA	
p47 ^{phox} vorwärts	NM_010876	CAGCCATGGGGGACACCTTCATT	190
p47 ^{phox} rückwärts:		GCCTCAATGGGGAACATCTCCTTCA	
β -Aktin vorwärts	NM_007393.2	CACCCGCGAGCACAGCTTCTTT	156
β -Aktin rückwärts:		AATACAGCCCGGGGAGCATC	

4.9 Proteinbestimmung mit SDS-PAGE und Western-Blot

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe in einem Gleichstromfeld Richtung Plus-Pol mittels einer Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt. Anschließend transferiert man die Proteine in einem als Western-Blotting bezeichneten Verfahren auf eine Membran. Der Nachweis der Zielproteine erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Die Proben der mesenterialen Gefäßarkaden aus den funktionellen Untersuchungen wurden aufgetaut und dreimal mit Aceton bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Danach wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und 30 Minuten lang bei 95°C im Schüttelinkubator (1200 rpm) behandelt. Dadurch lösen sich Gewebe und Membranstrukturen der Gefäße auf und die Proteine werden freigesetzt. Nach dem Abzentrifugieren (10000 x g / 3 min) der unlöslichen Bestandteile wurde der wässrige Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch photometrische Messung (NanoDrop 8000; PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$.

Die Elektrophorese der Proteinextrakte (20-30 μg /Probe) erfolgte in einem 10%-igen Polyacrylamid-Gel nach Laemmli⁷⁰. Dazu wurden die Gelplatten in die Gießvorrichtung der Gelapparatur (Bio-Rad Laboratories, München, D) eingesetzt, und das 10%-ige Trenngel gegossen. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um Unebenheiten zu vermeiden. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt. Anschließend wurde das Trenngel mit dem 6%-igem Sammelgel überschichtet und die Kämme eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde Laufpuffer in den Gelapparaturbehälter gegeben, die Gele eingesetzt und die Kämme gezogen. Vor dem Start der SDS-PAGE wurden die Proteinproben mit RotiLoad1 (#K929.1, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, D) versetzt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Pipettieren der Proteinproben in die Geltaschen erfolgte nach kurzem Ausspülen der Taschen. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Gemisch aus Standardproteinen mit definierter

Molmasse aufgetragen (*für Coomassie-Färbung: Prestained Protein Marker, Broad Range, #P7708S, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D; *für Western Blotting Nachweis: Cruz Marker, #2035, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D). Die Elektrophorese erfolgte bei 80V für 15 Minuten und anschließend bei 100 V für 100 Minuten.

Danach wurden die aufgetrennten Proteine mittels Tank-Blot Verfahren in einer Bio-Rad Mini Transfer Kammer (Bio-Rad Laboratories, München, D) auf HybondTM-P Membranen (Amersham-Pharmacia, Freiburg, D) transferiert. Der Proteintransfer erfolgte mittels Blottingpuffer für eine Stunde bei 100 V. Zur Kontrolle der Proteinübertragung auf die Membran wurde das Gel anschließend mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt (0,25% Coomassie Blau R-250, 50% Methanol, 10% Essigsäure). Die nachfolgende Entfärbung erfolgte mittels Entfärberlösung bei Raumtemperatur (40% Methanol, 10% Essigsäure). Potentiell unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden durch einstündige Inkubation mit 5%-iger Blockierungslösung abgesättigt. Zur Inkubation mit den Primärantikörpern wurde die Membran mit TBS-T für fünf Minuten gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern bei 4°C über Nacht in 1%-iger Blockierungslösung unter leichtem Schwenken. Die eingesetzten Primärantikörper waren ein spezifischer pSer20 anti-MLC Kaninchen IgG Antikörper (#R1535P, Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, D, Verdünnung: 1:1000) und ein anti-p38-MAPK Kaninchen IgG Antikörper (#506119, Calbiochem, Bad Soden, Verdünnung: 1:5000, D). Beide Antikörper sind gegen spezifische Phosphorylierungsstellen der Proteine gerichtet und dienen damit dem Nachweis des phosphorylierten Anteils des Proteins. Nach dem dreimaligen Waschen der Membranen mit TBS-T für jeweils fünf Minuten, erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Donkey-anti-Rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D, #sc2317, Verdünnung: 1:100000) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift mit TBS-T über dreimal fünf Minuten, erfolgte die Detektion der Proteinbanden. Dies wurde mit Hilfe des ChemiGlowTM-West Detection Kit (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) und Exposition eines Hyperfilms ECL (Amersham-Pharmacia, Freiburg, D) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei kommt es durch eine Peroxidase-vermittelte Lichtreaktion zu einer Röntgenfilmschwärzung im Bereich der Antikörper-markierten Banden. Die Schwärzung ist dabei dem Enzym-vermittelten Substratumsatz proportional, welche von der Menge des gebundenen Antikörpers und somit der in der Probe enthaltenen Proteinmenge abhängt. Die entwickelten Röntgenfilme wurden

eingescannt und densitometrisch mit Hilfe des Programms Scion Image (Scion Corporation, Maryland, USA) ausgewertet.

Das Abwaschen der Antikörper erfolgte für fünf Minuten in bi-distilliertem Wasser, 5 bis 15 Minuten mit 0,2 M Natriumhydroxid, und wieder 5 Minuten mit bi-distilliertem Wasser. Anschließend wurde eine erneute Beprobung mit einem polyklonalen Antikörper gegen α -Aktin durchgeführt (#AB5694, Acris Antibodies GmbH, D, Verdünnung: 1:1000) und entsprechend dem soeben beschriebenen Protokoll behandelt. α -Aktin wird konstitutiv exprimiert und ist spezifisch für glattmuskuläre Zellen. Der Nachweis von α -Aktin diente als Lade- und Transferkontrolle und wurde zur Normierung herangezogen.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Gele:

Probenpuffer:	Puffer 1:	Puffer 2:
25 mM Tris	0,75 M Tris-Base	0,25M Tris-Base,
200 mM Glycin	10% SDS	10% SDS
0.5 % SDS	pH 8,8	pH 6,8
Trenngel:	Sammelgel:	Laufpuffer:
1,5 ml H ₂ O	1,3 ml H ₂ O	25 mM Tris-Base
3 ml 30%-iges Polyacrylamid	0,5 ml 30%-iges Polyacrylamid	250 mM Glycin
4,5 ml Puffer 1	1,9 ml Puffer 2	3,5 mM SDS
75 μ l APS	37,5 μ l APS	
7,5 μ l TEMED	6,8 μ l TEMED	
Blottingpuffer:	TBS-T:	Blockierungslösung:
25 mM Tris	10 mM Tris pH 8.0	5% Milchpulver bzw.
200 mM Glycin	150 mM NaCl	1% Milchpulver
2 mM SDS	0,05% Tween 20	in TBS-T
20% Methanol		

4.10 Datenerfassung und statistische Auswertung

Zur Datenaufzeichnung und Analyse der funktionellen Experimente stand ein PowerLab[®] System mit dem Programm Chart[™] Version 5.5 (ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland) zur Verfügung. Die graphische Aufbereitung und statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA). Die Analyse der Experimente wurde mit Hilfe der Zwei-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) bei Graphen mit zwei Konzentrations-Antwort-Kurven vorgenommen. Die Ein-Weg-Varianzanalyse für wiederholte Messungen wurde bei Graphen mit mehr als zwei Konzentrations-Antwort-Kurven eingesetzt. An die ANOVA schloss sich bei Erreichen des Signifikanzniveaus ($p < 0,05$) der Bonferroni-Post-Test an. Wenn möglich, wurden die Konzentrations-Antwort-Kurven zur Ermittlung der Maximalwerte und der Konzentration, die 50% der Maximalreaktion hervorrief (EC_{50}), an eine vier-parametrische logistische Funktion angepasst. Die EC_{50} wird in logarithmierter Form als pEC_{50} angegeben. Der Maximalwert der Gefäßverengung wird folgend als TOP bezeichnet. Alle Konzentrations-Antwort-Kurven wurden auf die maximale KCl-induzierte Kontraktion in Prozent normiert.

Bei der Analyse der NADPH-Oxidase Aktivität wurde aus den gemessenen relativen Lichteinheiten ein Mittelwert \pm SEM gebildet. Bei der PCR wurden für jedes Gen, inklusive des Referenzgens β -Aktin, und jedes Tier jeweils drei Ansätze für die real-time PCR pipettiert und gemessen. Aus den Analyse-Ergebnissen der ΔCt -Methode wurden für jedes Tier Mittelwerte berechnet und die für die statistische Auswertung benutzt. Beim Western-Blot ist pro Tier ein Ansatz pipettiert worden. Aus den densitometrischen Werten (im Vergleich zu α -Aktin) wurde ein Mittelwert \pm SEM gebildet. Die Analyse der NADPH-Oxidase Aktivität, der PCR- und Western-Blot Ergebnisse, erfolgte mit der Ein-Weg-Varianzanalyse und mit einem nichtparametrischen Prüfverfahren.

Alle angegebenen Daten werden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, wobei n die Anzahl der verwendeten Versuchstiere der Ergebnisse repräsentiert.

5 Ergebnisse

5.1 Funktionelle Untersuchungen an isolierten Gefäßringen

5.1.1 Einfluss der NADPH-Behandlung auf die Kontraktion

Um den Einfluss von NADPH auf die Ang II-induzierte Kontraktion zu verifizieren, wurden die Gefäßringe beider Gruppen von Versuchstieren jeweils mit und ohne NADPH für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Konzentrations-Antwort-Kurve für Ang II gemessen. Die Gefäße der juvenilen und adulten Tiere zeigten eine ähnliche Antwort auf Ang II ohne Vorbehandlung (Abb. 8). NADPH hatte keinen Einfluss auf die Kontraktilität bei juvenilen Mäusen. (Abb. 8a). Nach Applikation von NADPH war in der Gruppe der adulten Mäuse eine Linksverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve zu verzeichnen (Abb. 8b pEC₅₀: NADPH 8,56 ± 0,01, Kontrolle 8,29 ± 0,06, p<0,01). Die maximale Kontraktion als Antwort auf Applikation von Ang II war in der NADPH-behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die maximale Gefäßkontraktion lag in der Kontrollgruppe bei 36 ± 5%, in der NADPH behandelten Gruppe bei 65 ± 5%. Das entspricht einer Kontraktilitätszunahme von 29% (Abb. 8b).

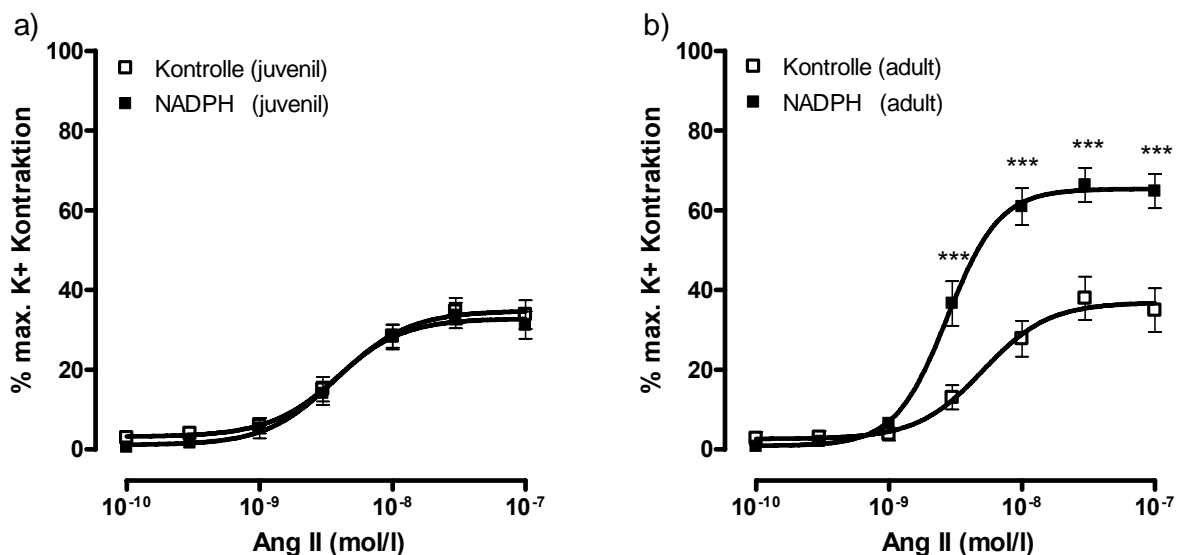


Abbildung 8: Einfluss von NADPH auf die Konzentrations-Antwort-Kurve von Ang II in Gefäßen juveniler (a) und adulter (b) Mäuse. NADPH-Inkubation verursacht nur in Gefäßen der adulten Versuchstiere einer Zunahme der Gefäßkontraktion. NADPH versus Kontrolle, *** p<0,001, n=10.

5.1.2 Die Rolle des Stickstoffmonoxidsystems

Die Beeinflussung der Ang II-induzierten Kontraktion durch NO wurde mit Hilfe des nichtselektiven NOS-Antagonisten L-NAME untersucht. Durch Ausschaltung des NO-Systems wurde die Gefäßkontraktilität in beiden Gruppen stark erhöht. Bei vergleichbarem Ausgangsniveau erhöhte sich die maximale Kontraktion der Gefäße in Bezug zur KCl-Kontraktion jeweils um etwa 50%. Es kam zu einer Linksverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurven (Abb. 9a pEC₅₀: L-NAME 8,61 ± 0,02, Kontrolle 8,38 ± 0,03, p<0,05; Abb. 9b pEC₅₀: L-NAME 8,62 ± 0,02, Kontrolle 8,29 ± 0,06, p<0,01). Die L-NAME-Effekte unterscheiden sich nicht im Vergleich beider Gruppen (Abb. 9).

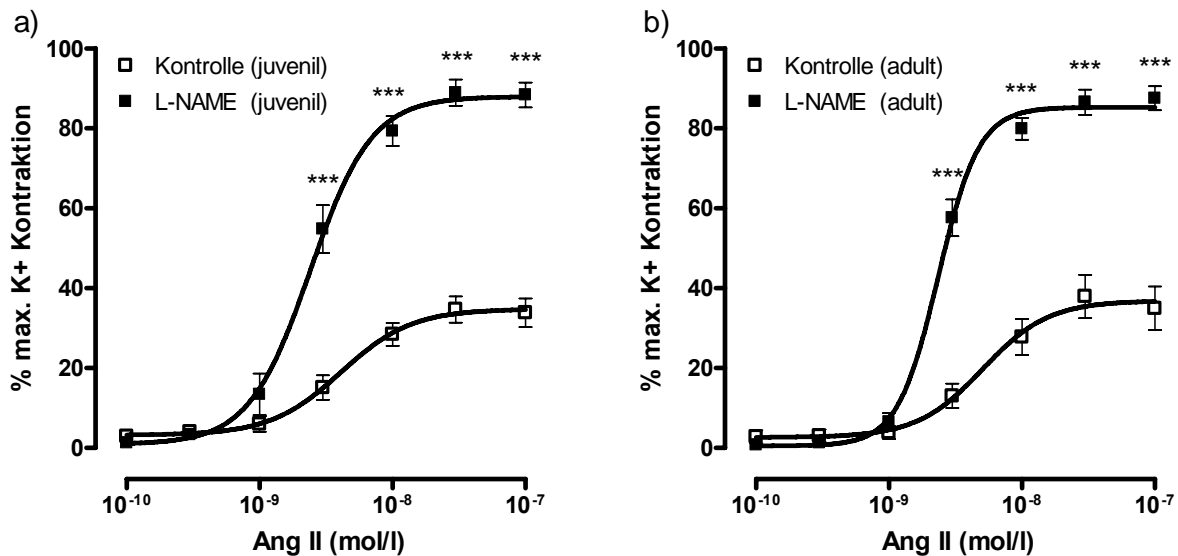


Abbildung 9: Einfluss von L-NAME auf die Konzentrations-Antwort-Kurve von Ang II in Gefäßen juveniler (a) und adulter (b) Versuchstiere. Die Inhibition der eNOS führt in beiden Gruppen zu einer verstärkten Gefäßkontraktilität. TOP (a): L-NAME 88 ± 3%, Kontrolle 35 ± 3%, p<0,01. TOP (b): L-NAME 85 ± 3%, Kontrolle 36 ± 5%, p<0,01. L-NAME versus Kontrolle, *** p<0,001. Kontrolle n=10, L-NAME n=9.

Durch gleichzeitige Inkubation mit NADPH und L-NAME wurde geprüft, ob das NO-System für die NADPH-Effekte mitverantwortlich ist. Bei den Gefäßen der juvenilen Versuchstiere gab es keinen Unterschied zur alleinigen L-NAME-Behandlung (Abb. 10a). In der Gruppe der adulten Tiere führte die Applikation von NADPH zu einer Sensitivierung der Ang II-Antwort bei gleichbleibender maximaler Kontraktionskraft (Abb. 10b). Die Linksverschiebung war signifikant (Abb. 10b pEC₅₀: L-NAME+NADPH 8,93 ± 0,03, L-NAME 8,62 ± 0,02, p<0,001) und spricht für einen vom NO-System unabhängigen Effekt von NADPH.

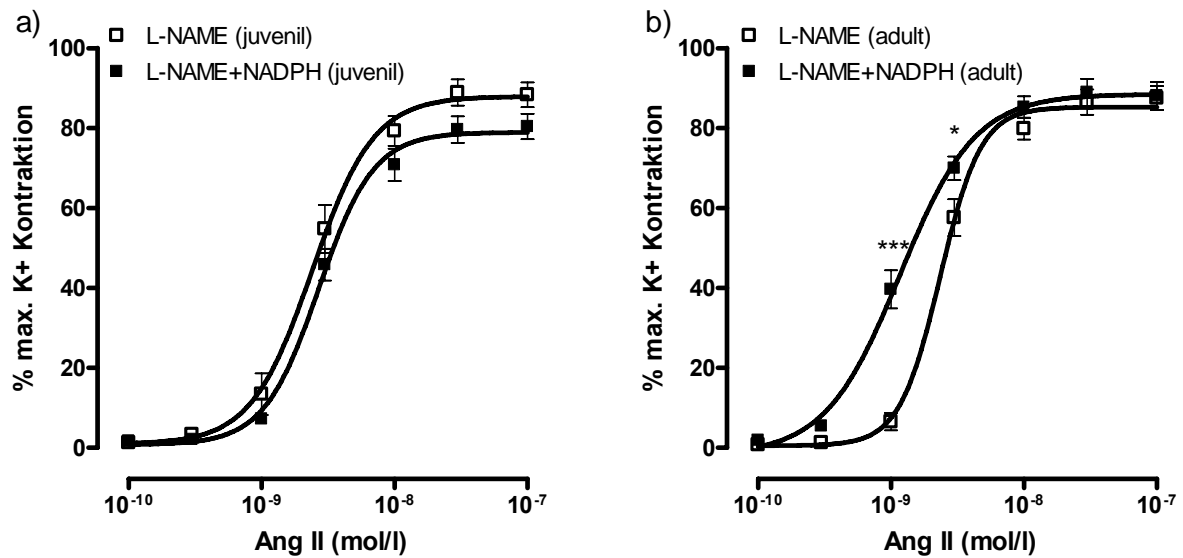


Abbildung 10: Einfluss von L-NAME und NADPH auf die Konzentrations-Antwort-Kurve von Ang II in Gefäßen juveniler (a) und adulter (b) Versuchstiere. NADPH-Inkubation bewirkt nur in den Gefäßen der adulten Mäuse eine Zunahme der Sensitivität. L-NAME+NADPH versus L-NAME, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$; $n = 9$.

5.1.3 Endothel-abhängige Vasodilatation

Da der NADPH-Effekt auf die Ang II-vermittelte Kontraktion nur in Gefäßen der adulten Versuchstiere feststellbar war, wurden die folgenden Experimente ausschließlich mit Gefäßsegmenten adulter Mäuse durchgeführt.

Der Einfluss von NADPH auf die Dilatationsfähigkeit der Gefäße wurde mit Hilfe von Acetylcholin untersucht. Acetylcholin dilatiert Gefäße über eine Endothel-abhängige NO-Freisetzung. Die Mesenterialarterien wurden nach der Inkubationsphase mit Phenylephrin auf etwa 50% der Maximalkraft kontrahiert und dann die Acetylcholin-Konzentrations-Antwort-Kurve gemessen.

Die Inkubation der adulten Gefäße mit NADPH hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Dilatation der Gefäße (Abb. 11 pEC_{50} : NADPH $7,38 \pm 0,05$, Kontrolle $7,18 \pm 0,08$, $p > 0,05$).

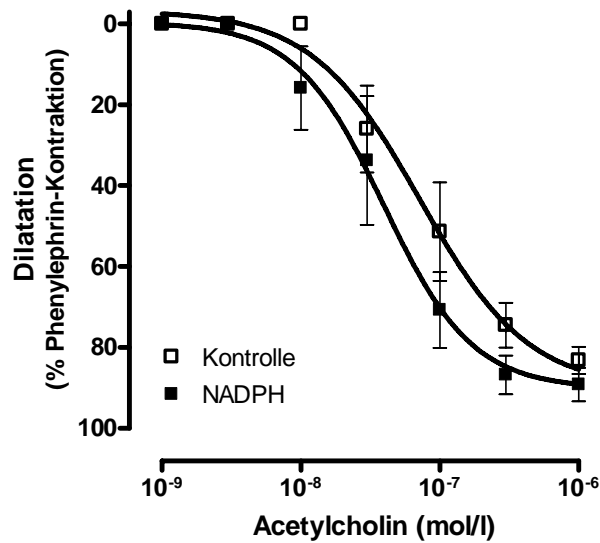


Abbildung 11: NADPH-Behandlung und Endothel-abhängige Vasodilatation. Die Behandlung der adulten Gefäße führt zu keiner signifikanten Änderung der Dilatation. Kontrolle vs. NADPH, $p > 0,05$, $n = 8$.

5.1.4 Ang II-induzierte Kalziumtransienten

Die Rolle von Kalzium bei der Vermittlung Ang II-induzierter Kontraktion wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 AM untersucht. Aus Abbildung 12a wird ersichtlich, dass es keinen wesentlichen Unterschied im Verlauf der Kalziumtransienten zwischen den NADPH-behandelten und nicht behandelten Gefäßringen gibt. Abbildung 12b zeigt die Konzentrations-Antwort-Kurve dieser Gefäße. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde, die in Abb. 8b dargestellt sind. Es zeigte sich ebenfalls eine Linksverschiebung der Ang II-Konzentrations-Antwort-Kurve nach Inkubation mit NADPH (Abb. 12b pEC_{50} : NADPH $8,57 \pm 0,01$, Kontrolle $8,39 \pm 0,01$, $p < 0,01$). Die maximale Kontraktion als Antwort auf Applikation von Ang II war in der NADPH-behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($61 \pm 10\%$ vs. $32 \pm 5\%$, Kontraktilitätszunahme: 29%).

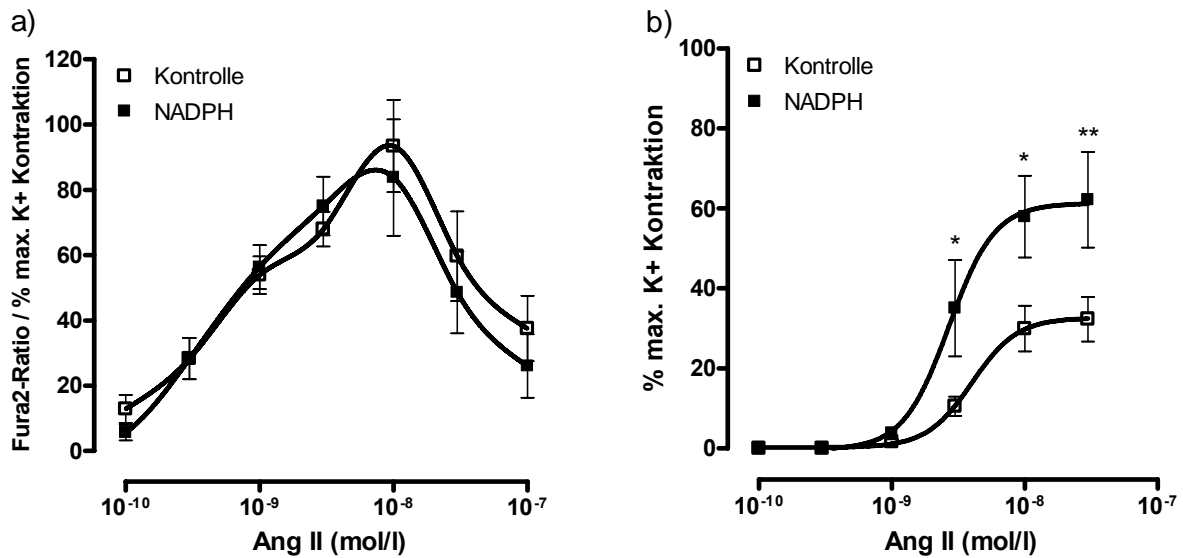


Abbildung 12: Rolle der Kalziumtransienten bei der Ang II-induzierten Kontraktion.

Bei der Messung der Kalziumtransienten ergab sich keine Differenz zwischen den NADPH-behandelten Gefäßen und der Kontrollgruppe (a). Die simultan aufgezeichnete Konzentrations-Antwort-Kurve für Ang II (b) zeigt ähnliche Ergebnisse wie Abbildung 8b. NADPH vs. Kontrolle, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $n = 8$.

5.1.5 Rolle der ROS

Um den Einfluss der ROS auf die Ang II-Antwort nach der Stimulation mit NADPH zu evaluieren, wurde Apocynin (Antioxidanz) appliziert. Der NADPH-Effekt wurde unterdrückt (Abb. 13a). Die maximale Gefäßkontraktion verringerte sich von $65 \pm 5\%$ auf $31 \pm 3\%$ in Bezug zur KCl-induzierten Kontraktion und lag somit im Bereich der Kontrollgruppe. Ebenso wurde eine signifikante Abnahme der Sensitivität beobachtet (Abb. 13a pEC_{50} : NADPH $8,56 \pm 0,01$, Apocynin+NADPH $8,29 \pm 0,03$, $p < 0,001$). Die maximale Gefäßkraft war bei gleichzeitiger Inkubation von Apocynin und NADPH gegenüber der Apocynin-Kontrolle verringert (Abb. 13a TOP: Apocynin $45 \pm 5\%$, Apocynin+NADPH $31 \pm 3\%$, # $p < 0,05$).

Apocynin selbst hatte einen geringen verstärkenden Einfluss auf die Ang II-induzierte Kontraktion (Abb. 13b). Die maximale Kontraktion war in der Apocynin behandelten Gruppe gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 13b TOP: Apocynin $45 \pm 5\%$, Kontrolle $36 \pm 5\%$, + $p < 0,05$). Die Sensitivität (pEC_{50}) war unverändert.

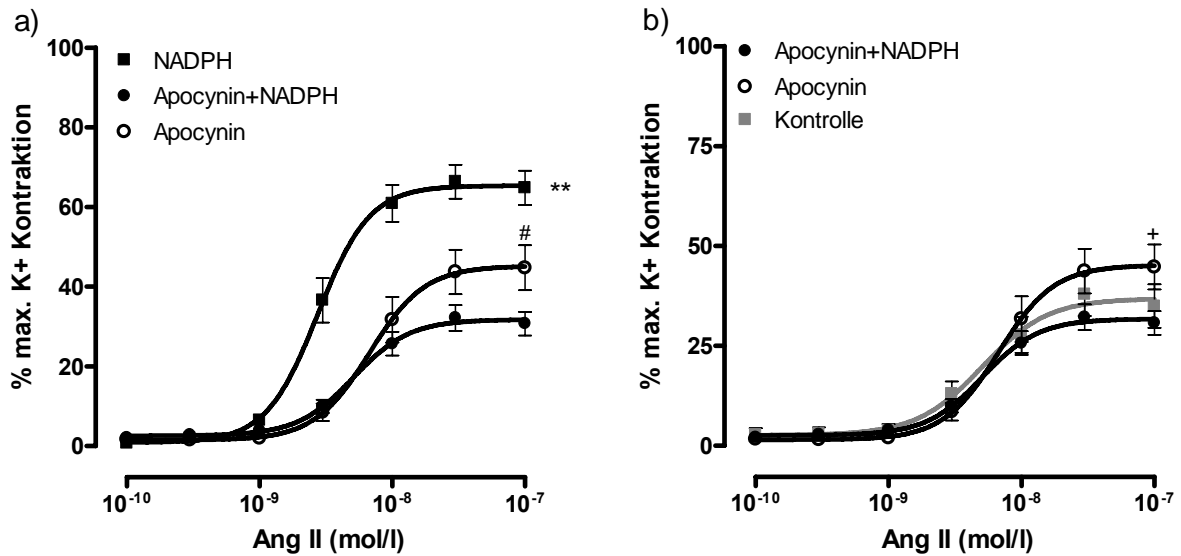


Abbildung 13: Rolle der NADPH-Oxidase für die Konzentrations-Antwort-Kurven von Ang II in Gefäßen adulter Versuchstiere. Apocynin verhindert die NADPH Wirkung. NADPH versus Apocynin+NADPH, ** $p < 0,01$. Apocynin vs. Kontrolle, + $p < 0,05$, Apocynin vs. Apocynin + NADPH, # $p < 0,05$. NADPH $n=10$, Kontrolle $n=10$, Apocynin $n=9$, Apocynin+NADPH $n=9$.

In einer weiteren Untersuchungsserie wurden die Gefäßringe mit dem freien Radikalfänger Tempol inkubiert. Tempol verhinderte den NADPH-Effekt (Abb. 14a TOP: NADPH $65 \pm 5\%$, Tempol+NADPH $27 \pm 3\%$, $p < 0,001$). Tempol allein und in Verbindung mit NADPH verschoob die Konzentrations-Antwort-Kurve für Ang II nach rechts (Abb. 14a,b pEC_{50} : Kontrolle $8,29 \pm 0,06$ vs. Tempol+NADPH $8,06 \pm 0,01$, vs. Tempol $8,11 \pm 0,01$, $p < 0,01$ und NADPH $8,56 \pm 0,01$ vs. Tempol+NADPH $8,06 \pm 0,01$, $p < 0,001$), wobei es keinen Unterschied in der Ang II-Antwort bei Tempol-Behandlung mit und ohne NADPH gab.

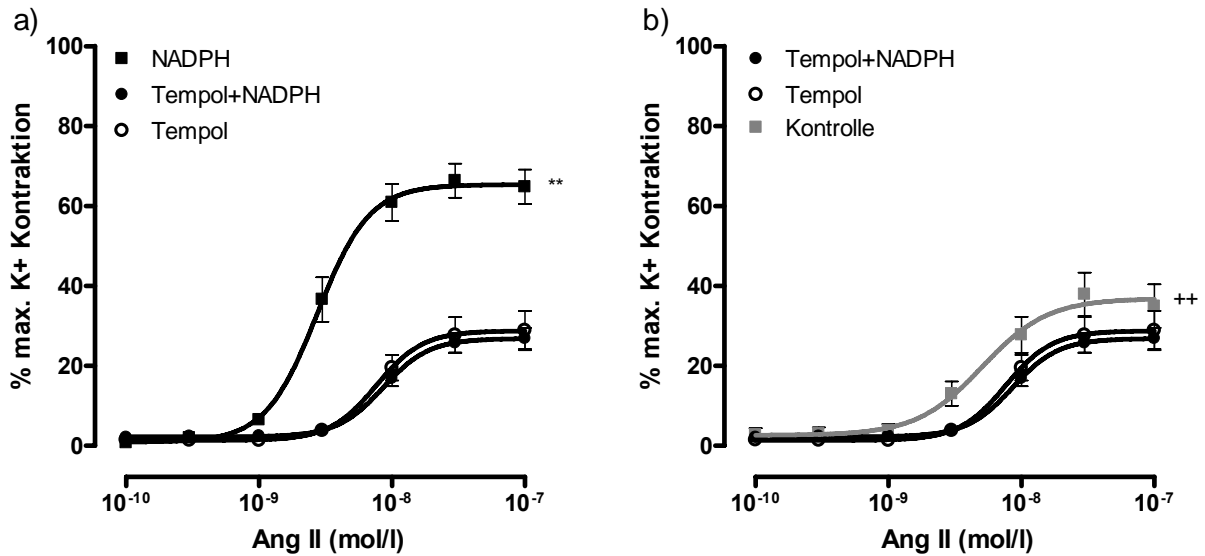


Abbildung 14: Rolle der ROS auf die Konzentrations-Antwort-Kurven von Ang II in Gefäßen adulter Versuchstiere. Tempol verhindert die NADPH-Wirkung. NADPH versus Tempol+NADPH, ** $p < 0,01$; Kontrolle vs. Tempol+NADPH bzw. vs. Tempol, ** $p < 0,01$. NADPH $n=10$, Kontrolle $n=10$, Tempol $n=9$, Tempol+NADPH $n=9$.

5.1.6 Rolle des p38-MAPK / MAPKAPK-2 Signalweges

Die Beteiligung des p38-MAPK-MK2-Signalweges am NADPH-Effekt wurde mittels SB220025, einem spezifischen Inhibitor der p38-MAP-Kinase, sowie unter Verwendung von MK2-defizienten Mäusen untersucht (Abb. 15).

SB220025 unterdrückte den NADPH-Effekt. Die maximale Gefäßkontraktion betrug $32 \pm 6\%$ im Vergleich zu $65 \pm 5\%$ bei den nur mit NADPH-behandelten Tieren. Die Konzentrations-Antwort-Kurve verschob sich durch SB220025 wieder nach rechts (Abb. 15a pEC_{50} : NADPH $8,56 \pm 0,01$, SB220025+NADPH $8,26 \pm 0,01$, $p < 0,001$). SB220025 allein hatte keinen Einfluss auf die Ang II-Antwort (Abb 15b), jedoch waren die Ang II-Antworten bei gleichzeitiger Behandlung mit SB220025 und NADPH im Vergleich zur adulten Kontrollgruppe schwächer (Abb. 15b).

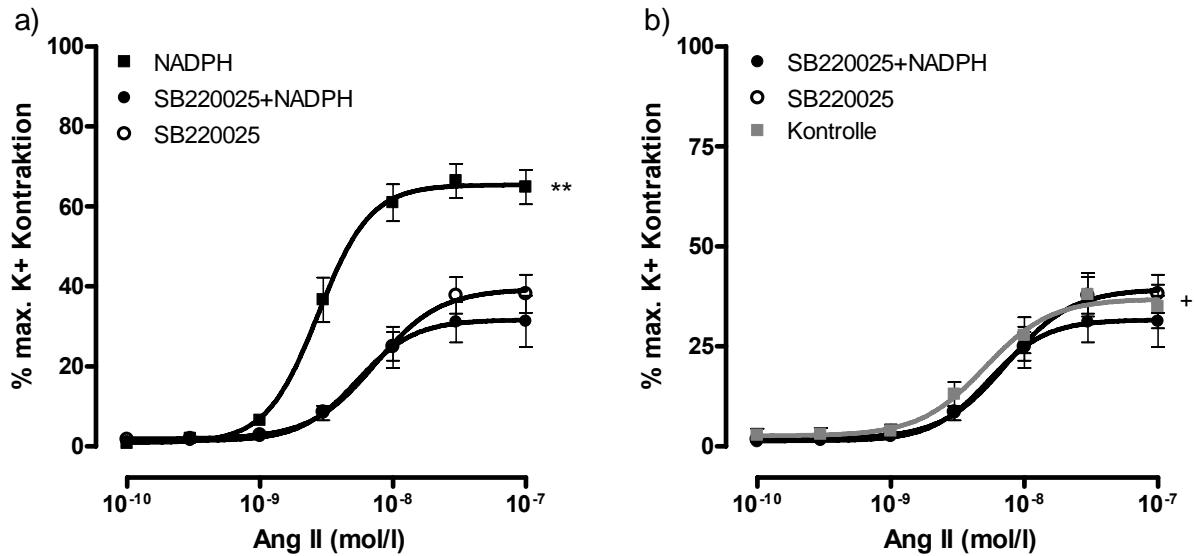


Abbildung 15: Rolle des p38-MAPK Signalweges für die Konzentrations-Antwort-Kurven von Ang II in Gefäßen adulter Versuchstiere. Die Behandlung der Gefäße mit SB220025 verhindert den NADPH-Effekt. NADPH vs. SB220025+NADPH, ** $p < 0,01$, Kontrolle vs. SB220025+NADPH, + $p < 0,05$. NADPH n=10, Kontrolle n=10, SB220025 n=9, SB220025+NADPH n=9.

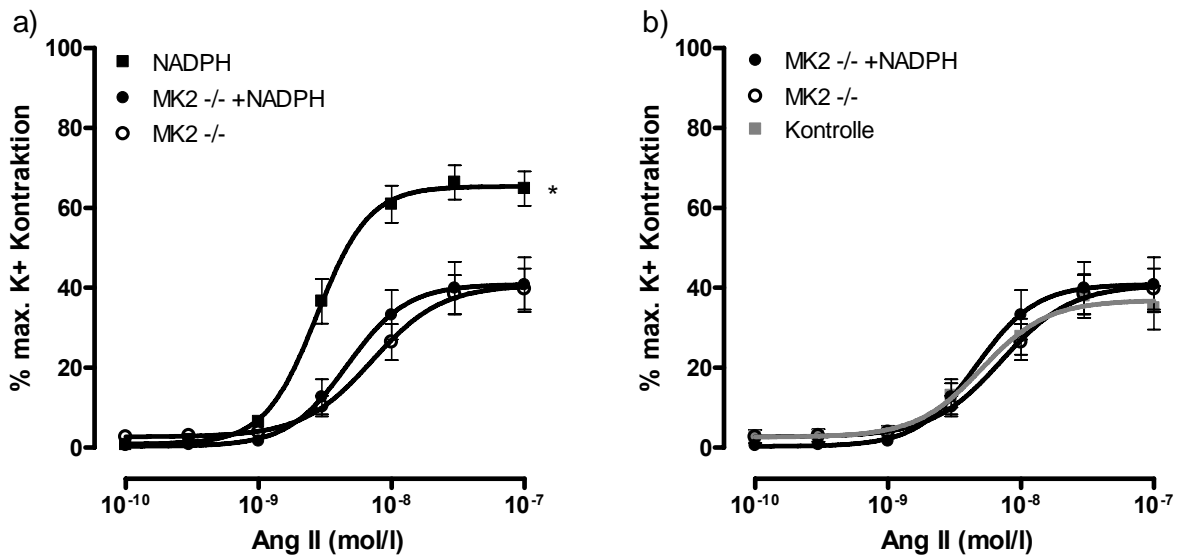


Abbildung 16: Rolle des MAPKAPK-2 Signalweges auf die Konzentrations-Antwort-Kurven von Ang II in Gefäßen adulter Versuchstiere. MK2-Defizienz verhindert den NADPH-Effekt. NADPH vs. MK2-/- +NADPH, * $p < 0,05$. NADPH n=10, Kontrolle n=10, MK2-/- n=10, MK2-/- +NADPH n=10.

In Gefäßen von adulten MK2-/- Mäusen fand durch Inkubation mit NADPH keine Verstärkung der Kontraktilität statt (Abb. 16a). Die Ergebnisse der MK2-/- Mäuse zeigten eine

Sensitivitätsverminderung, d.h. Rechtsverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve, im Vergleich zu NADPH-behandelten Wildtypen (Abb. 16a pEC₅₀: NADPH 8,56 ± 0,01, MK2^{-/-}+NADPH 8,33 ± 0,01, p<0,001). Die Ang II-Konzentrations-Antwort-Kurve unterschied sich nicht zwischen den Gefäßen der MK2^{-/-} Mäuse und der Kontrollgruppe (Wildtypen, Abb. 16b).

5.1.7 Einfluss der Purinrezeptoren

Aus NADPH können purinerge Substanzen (ATP, Adenosin) entstehen, die eine vasoaktive Wirkung via P1- und P2-Rezeptoren erzeugen. P2-Wirkungen bei NADPH-Gabe sind in der Literatur beschrieben⁵⁹. Durch Inkubation mit dem nichtselektiven P2-Rezeptorantagonisten Suramin wurde eine potentielle Rolle der purinergen Rezeptoren bei der Vermittlung des hier beobachteten NADPH-Effektes untersucht. Abbildung 17a zeigt, dass Inhibition der purinergen Rezeptoren während NADPH-Behandlung die maximale Gefäßkontraktilität im Vergleich zu alleiniger NADPH-Inkubation verringert (Abb. 16a TOP: NADPH 65 ± 5%, Suramin+NADPH 48 ± 5%, p<0,001). Suramin vermindert in gleichem Maße auch die Ang II-Antwort von Gefäßen un behandelter Tiere (Abb. 17b TOP: Kontrolle 36 ± 5%, Suramin 20 ± 2%, p=0,0175). Es wurde eine Linksverschiebung der Konzentrations-Antwort-Kurve beobachtet (Abb. 17b pEC₅₀: Suramin+NADPH 8,54 ± 0,04, Suramin 8,21 ± 0,04, p=0,01).

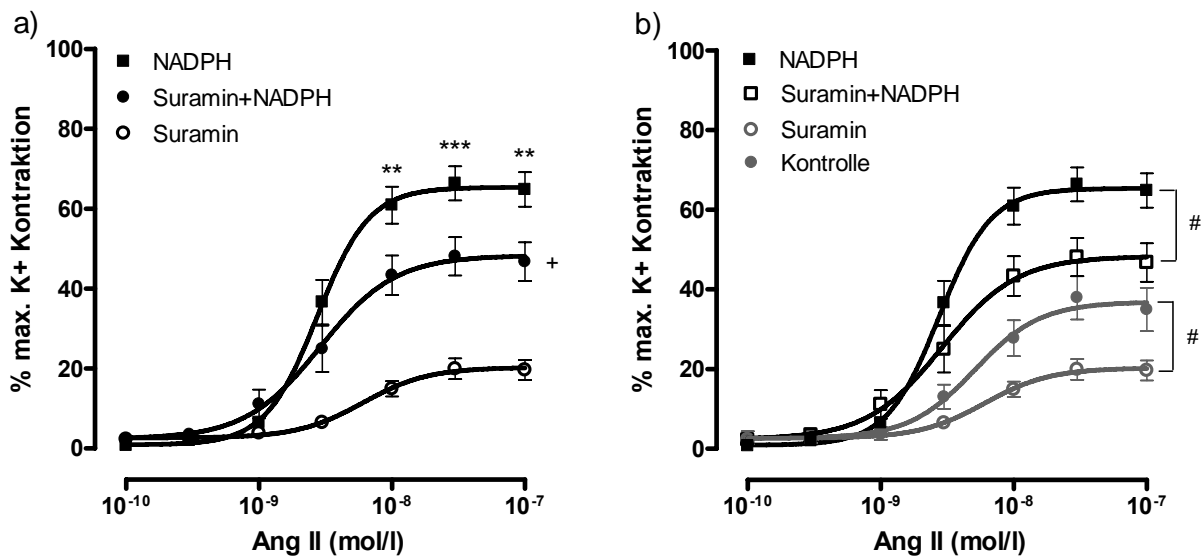


Abbildung 17: Einfluss von Purinrezeptoren auf die Konzentrations-Antwort-Kurven von Ang II in Gefäßen adulter Versuchstiere. Die Inhibition der purinergen Rezeptoren mit Suramin verhindert den NADPH-Effekt nicht. NADPH vs. Suramin+NADPH, *** p<0,01, ** p<0,01. Suramin+NADPH vs. Suramin, + p<0,05. NADPH vs.

Suramin+NADPH, Kontrolle vs. Suramin, # $p < 0,05$ ($10^{-8} - 10^{-7}$). Kontrolle $n=10$, NADPH $n=10$, Suramin $n=9$, Suramin+NADPH $n=9$.

5.2 Aktivität und Expression der NADPH-Oxidasen

5.2.1 Simulation der ROS-Produktion mit NADPH

Um den Erfolg der NADPH-Applikation auf die NADPH-Oxidase-Aktivität respektive Superoxidfreisetzung zu verifizieren, wurde die O_2^- -Freisetzung mittels der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz ermittelt. Die Messung erfolgte in relativen Lichteinheiten (RLU) pro Minute und Milligramm Trockengewicht. Der Superoxidanionradikalfänger Tiron diente der Kontrolle einer spezifischen Lumineszenz durch Superoxidanionradikale.

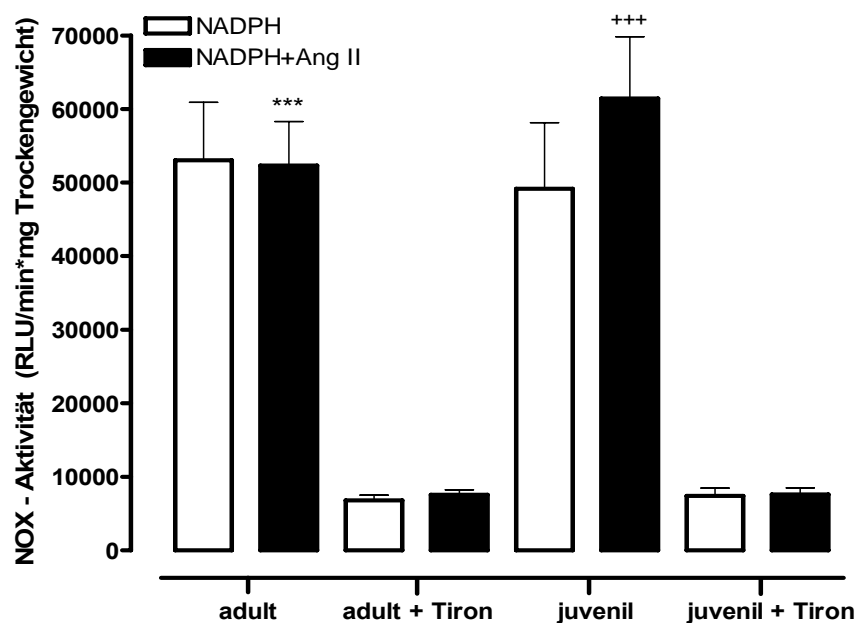


Abbildung 18: Aktivierung der NADPH-Oxidase mit NADPH und Lumineszenzverstärkung. Das Antioxidanz Tiron hemmt diesen Effekt. Adult versus adult + Tiron *** $p < 0,0001$, juvenil vs. juvenil+Tiron *** $p < 0,0001$, $n=10$.

Applikation von NADPH führte zu Radikalbildung, die durch Tirongabe gehemmt wurde. Es gab keinen Unterschied in der O_2^- -Konzentration (Lumineszenz) zwischen den juvenilen und adulten Tieren. Applikation von Ang II steigerte die Lumineszenz nicht weiter in beiden Testgruppen. Tiron verringerte die Radikalbildung stark in beiden Gruppen auf 14% (adult) bzw. 12% (juvenil) des Stimulationsniveaus (Abb. 18).

5.2.2 Expressionsanalysen

Die Untersuchung der Expression der NOX-Isoformen und Untereinheiten auf mRNA-Ebene wurde mittels real-time PCR durchgeführt. Die Expression der Isoformen Nox1, Nox2, und Nox4, als auch von p22^{phox} und p47^{phox} wiesen keinen Unterschied zwischen den juvenilen und adulten Versuchstieren auf (Abb. 19).

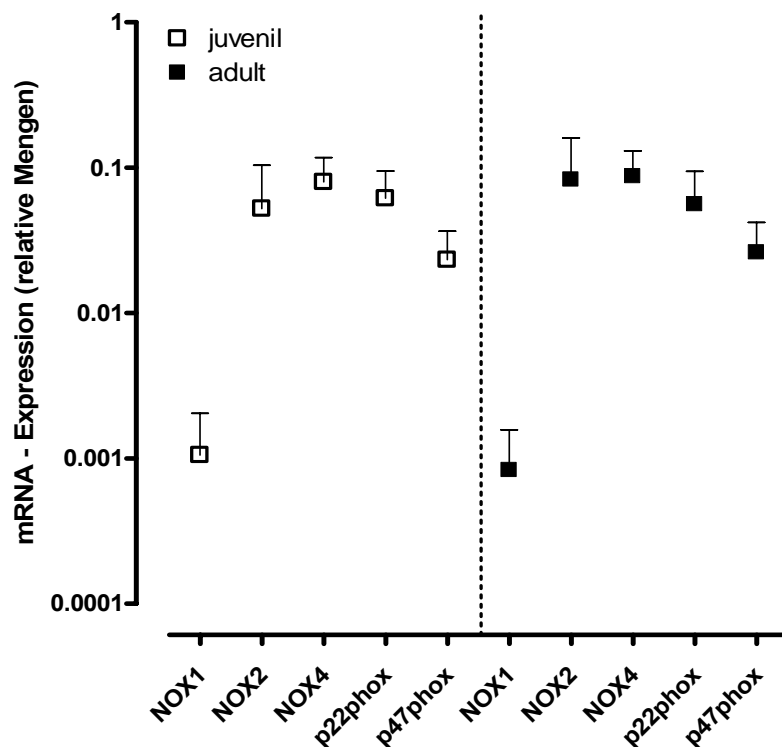


Abbildung 12: Expression der NOX-Isoformen und Untereinheiten in juvenilen und adulten Mäusen.

Auf der Ebene der mRNA Expression konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. n=10.

5.3 p38-MAPK- und MLC₂₀-Phosphorylierung

Abbildung 20 zeigt, dass Ang II, NADPH und die Kombination von beiden Substanzen die Phosphorylierung der p38-MAPK im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen verstärkte. In der Gruppe der adulten Mäuse ist die p38-MAPK Phosphorylierung nach Ang II-Applikation und NADPH-Behandlung jedoch deutlich größer als bei Einzelbehandlung mit Ang II oder NADPH.

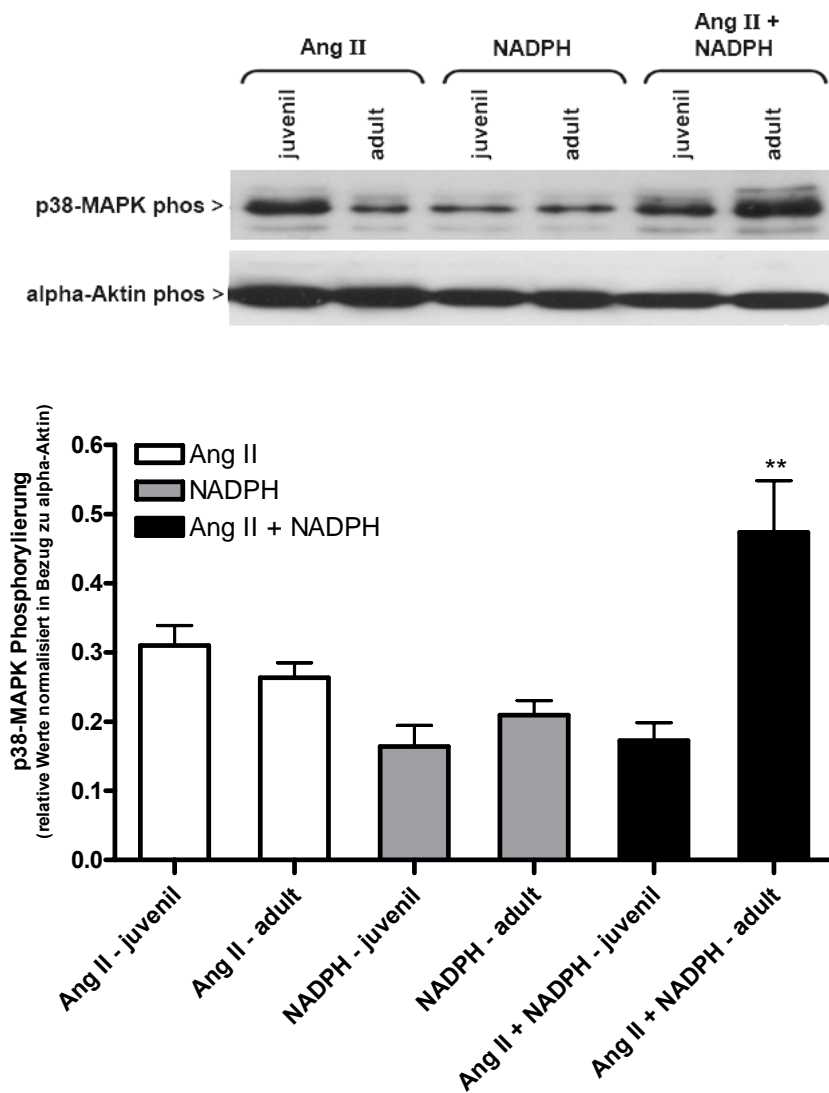


Abbildung 20: Analyse der p38-MAPK Phosphorylierung.

Inkubation mit NADPH bewirkt nur bei den adulten Mäusen eine erhöhte p38-MAPK Phosphorylierung nach Ang II Applikation (unterer Teil der Abb.). Darüber ist ein originaler Blot dargestellt. Adult Ang II+NADPH versus juvenil Ang II+NADPH ** $p < 0,01$, $n=6$.

NADPH-Behandlung erhöhte die Phosphorylierung der MLC_{20} (Ser19) nach Applikation von Ang II in den adulten Tieren signifikant (Abb. 21). Der Phosphorylierungsgrad ist gegenüber den juvenilen Mäusen etwa 2,5fach stärker. Einzelbehandlung mit NADPH und Ang II verstärkte ebenfalls die Phosphorylierung. Es zeigten sich hier jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Testgruppen.

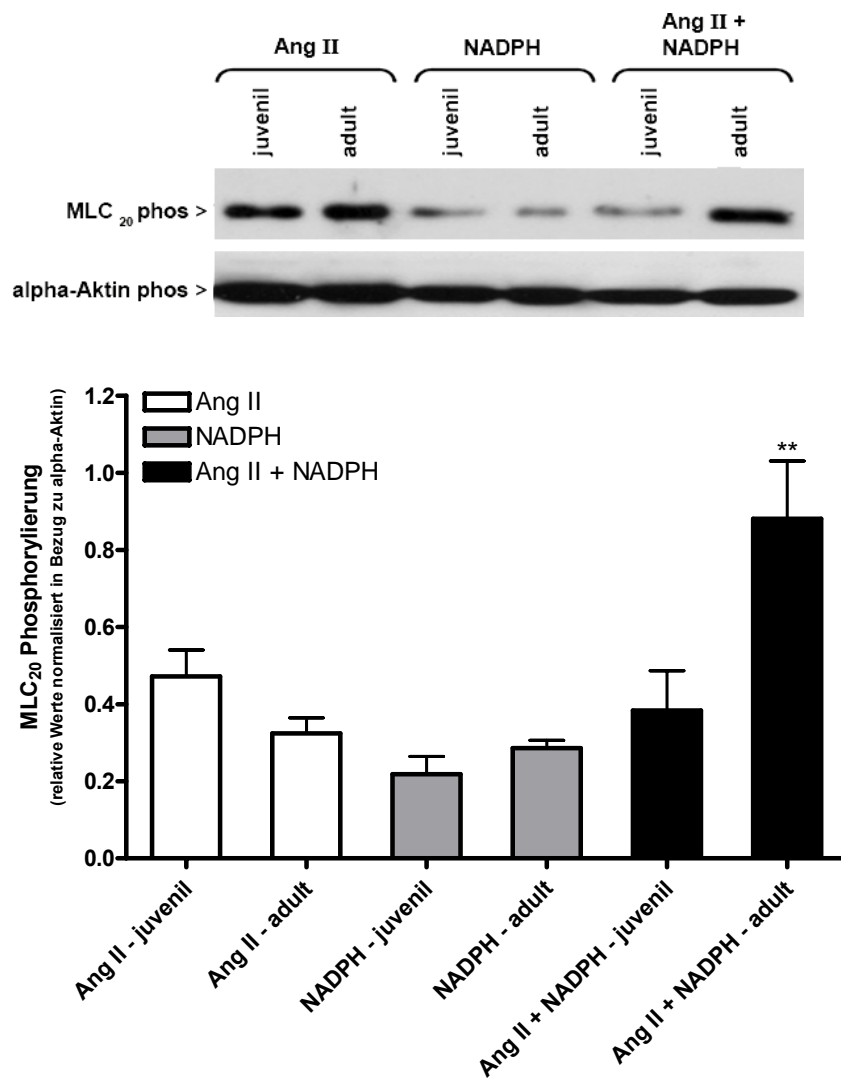


Abbildung 21: Analyse der MLC₂₀ Phosphorylierung. NADPH bewirkt nach Ang II-Applikation nur bei den adulten Mäusen eine erhöhte MLC₂₀ Phosphorylierung (unterer Teil der Abb.). Darüber ist ein originaler Blot dargestellt. Adult Ang II+NADPH versus juvenil Ang II+NADPH ** p<0,01, n=6.

6 Diskussion

NADPH-Behandlung induziert akuten oxidativen Stress und verstärkt die Ang II-induzierte Vasokonstriktion in mesenterialen Gefäßringen der adulten Maus. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass dieser akute Effekt wesentlich mit dem p38-MAPK/MK2-Signalweg verbunden ist. Dabei ist die dilatative Funktion der Gefäße nicht eingeschränkt. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Wirkung von oxidativem Stress in Verbindung mit Alter über eine Beeinflussung der dilatativen endothelialen Funktion hinausgeht und andere Mechanismen zur Gefäßdysfunktion beitragen. Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung von Radikalen und oxidativem Stress bei der Einstellung des Gefäßtonus.

Stimulation der NADPH-Oxidase führt in erster Linie zur Bildung von Superoxidanion. Es können jedoch auch andere ROS wie zum Beispiel H_2O_2 entstehen. In dieser Arbeit wird deshalb der Begriff „ROS“ für die gebildeten Radikale verwendet.

6.1 Einfluss des Alters auf die Expression und Aktivität der NADPH-Oxidasen

Die gesteigerte NADPH-Oxidase Aktivität stellt die wichtigste Quelle von oxidativem Stress im Prozess des vaskulären Alterns dar ^{21;48;108}. Einer der Hauptbefunde der vorliegenden Arbeit ist, dass akuter oxidativer Stress durch eine gesteigerte NADPH-Oxidase-Aktivität nur in Gefäßen von adulten Tieren, nicht jedoch in juvenilen Tieren, zu einer verstärkten Ang II-induzierten Vasokonstriktion führt. Die Expression der NOX-Isoformen Nox1, Nox2, Nox4 und Untereinheiten (22^{phox} , $p47^{phox}$) war in beiden Altersgruppen der C57/Bl6 Mäuse gleich. NADPH-Behandlung führte zu einem gleich großen Anstieg der Superoxidradikalkonzentration in beiden Gruppen. Das lässt den Schluss zu, dass der beobachtete Effekt von NADPH in adulten Mäusen wahrscheinlich nicht mit einer veränderten Expression und/oder Aktivität der NADPH-Oxidase einhergeht. Die Belastung mit Superoxidradikalen nach NADPH-Behandlung ist in beiden Gruppen sehr ähnlich. Der Effekt von NADPH beruht möglicherweise auf einer unterschiedlichen Verarbeitung der Radikalbelastung in den beiden Altersgruppen.

Der Einfluss des vaskulären Alterns auf die Aktivität und Expression der NADPH-Oxidasen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Adler und Mitarbeiter zeigten eine erhöhte Nox2-Expression im kardiovaskulären System alter Ratten ¹. In VSMC von Aorten wurden erhöhte Nox4-Level im Alterungsprozess beobachtet ⁸⁶. An cerebralen Arteriolen wurde gleichfalls über eine erhöhte Nox2-Expression berichtet ⁸⁵. In pulmonalen Arterien von gealterten Ratten wurden

stärkere Konzentrationen von Nox1, Nox2 und Nox4 gesehen¹¹². In mesenterialen Gefäßen älterer Menschen wurde eine erhöhte mRNA-Expression von Nox4 gefunden¹¹⁷.

Erhöhte ROS-Induktion wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben. Hamilton und Mitarbeiter berichteten, dass in Aorten und der A. carotis von gealterten Ratten eine erhöhte Produktion von Superoxidanionen im Vergleich zur jüngeren Kontrollgruppe induzierbar ist. In einem hypertensiven Tiermodell ließ sich die Bildung von ROS noch weiter steigern. Die p22^{phox} Expression war in alten Tieren größer als in der jüngeren Kontrollgruppe⁴⁸. In Gehirnarteriolen der alten Ratte wurde im Vergleich zu jüngeren Tieren eine erhöhte ROS Produktion unter basalen und stimulierten Bedingungen gezeigt. Das p67^{phox} Protein war erhöht. Die eNOS-abhängige Dilatation war verringert und konnte durch Inkubation der Gefäße mit Apocynin und DPI verbessert werden. Dies weist darauf hin, dass die erhöhte ROS Produktion möglicherweise auf eine verstärkte Aktivität der NADPH-Oxidase zurückzuführen ist⁸⁵. In Mesenterialarterien der Ratte fand sich eine erhöhte p22^{phox} Expression im Alter, während p47^{phox} unverändert war¹⁰. Diese Altersveränderungen der Enzymexpression werden möglicherweise durch Ang II bewirkt. Stimulierung von VSMC mit Ang II erhöhte die NADPH-Oxidase Aktivität, die Expression von Untereinheiten wie p22^{phox} und p47^{phox}, und förderte die ROS Bildung^{33;40;41;71;114}. Diese Befunde werden durch Arbeiten unterstützt, die zeigen, dass ACE-Inhibitoren die NO-abhängige Dilatation in gealterten Arterien verbessern^{39;93}. Im vaskulären Alterungsprozess spielt auch eine Reduktion von antioxidativen Mechanismen eine Rolle. Mehrere Studien zeigten eine Verminderung der antioxidativen Enzyme wie SOD, Katalase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase in gealterten Tieren^{128;131}.

In der vorliegenden Arbeit gab es keine Unterschiede in der Expression von NADPH-Oxidase Komponenten auf mRNA-Ebene im Vergleich juveniler und adulter Mäuse. Ein Grund dafür könnte der geringere Altersunterschied im Vergleich zu den zitierten Studien sein. Die erhöhte Expression von NADPH-Oxidase Untereinheiten wurde jeweils in sehr alten Tieren mit einer Altersdifferenz von bis zu 20 Monaten zur Vergleichsgruppe gezeigt. Das Alter der Tiere dieser Arbeit unterschied sich nur um 3¹/₂ Monate, und es wurden juvenile mit adulten Tieren verglichen.

Jacobson und Mitarbeiter fanden eine erhöhte O₂⁻-Bildung in Mesenterialarterien von gealterten Ratten, die mit einer gesteigerten Sensitivität für erhöhten Blutdruck einherging. Es wurde jedoch kein Unterschied in der Expression von Nox1, gp91^{phox} (Nox2) und Nox4 in den beiden Gruppen gesehen. Dagegen war die Expression der Xanthinoxidase in der Gruppe der

älteren Tiere erhöht⁵⁷. Eine andere Studie weist auch auf eine Rolle dieses Enzyms bei den altersbedingten Änderungen der Gefäßfunktion hin⁹⁸. Csiszar und Mitarbeiter demonstrierten in Koronargefäßen alter Ratten eine stärkere Bildung von Superoxid jedoch keine Änderung der Expression von Nox1, p22^{phox}, p47^{phox}, und p67^{phox} im Vergleich zu jungen Tieren²¹. Auch in alten und sehr alten Ratten einer anderen Studie war die Expression der p47^{phox} und p67^{phox} nicht erhöht. Nur in den Aortenringen der sehr alten Tiere wurde auch eine erhöhte O₂⁻-Bildung beobachtet⁸.

Obwohl die zitierten Arbeiten die Annahme eine Beteiligung oxidativen Stresses im Alterungsprozess von Gefäßen mehrheitlich unterstützen, bleibt unklar, wie es unter physiologischen Bedingungen im Alterungsprozess zu oxidativem Stress kommt und welche Enzyme beteiligt sind.

6.2 Mechanismen der Kontraktionsverstärkung durch NADPH

Stickstoffmonoxid-System

Oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion gehen mit einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit einher. Das von der NADPH-Oxidase gebildete Superoxidanion reagiert mit Stickstoffmonoxid zu Peroxinitrit^{3;45} und fängt somit NO weg^{14;165}. Die NO-Bioverfügbarkeit kann auch über eine Entkopplung der eNOS reduziert werden. Der eNOS-Kofaktor Tetrahydrobiopterin wird durch Peroxinitrit oxidiert und steht dann der eNOS nicht mehr zur Verfügung. In der Folge wird nun von der eNOS selbst O₂⁻ produziert^{3;123}.

Unter den meisten Bedingungen führt eine Blockade der eNOS mit L-NAME in Gefäßen auf Grund des verminderten NO Angebotes zu einer gesteigerten Vasokonstriktion^{16;48}. In der vorliegenden Arbeit erhöhte die Inhibition der eNOS ebenfalls die maximale Ang II-vermittelte Kontraktion unbehandelter juveniler und adulter Tiere auf ein gleiches Kontraktionsniveau. Auch nach NADPH- + L-NAME-Behandlung erreichten die Gefäße gleiche Kontraktionsmaxima, wobei der Hub bei den adulten Tieren, aufgrund der primär stärkeren Antwort, geringer war (Vergl. Abb. 8b mit Abb. 10b). Nur in den Gefäßen der adulten Tiere nahm außerdem die Sensitivität der Ang II-induzierten Gefäßkontraktilität zu. Dieser Befund kann auf einer veränderten Bioverfügbarkeit von NO nach NADPH-Behandlung und/oder auf anderen unbekanntem Mechanismen beruhen, die eine Sensitivitätserhöhung für Ang II bewirken. Gegen den ersten Punkt spricht jedoch der hier erhobene Befund einer sehr ähnlichen Endothel-abhängigen Dilatation der NADPH-behandelten und unbehandelten Gruppe adulter Mäuse. Der

beobachtete NADPH-Effekt beruht also eher nicht auf einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit, sondern auf anderen kontraktionsfördernden Mechanismen. Diese werden weiter unten diskutiert.

NADPH – ROS & Antioxidantien

Wie die von den NADPH-Oxidasen gebildeten ROS den Gefäßtonus beeinflussen, wird kontrovers diskutiert und ist noch nicht endgültig geklärt. Superoxidanion und Wasserstoffperoxid scheinen die Induzierung einer Vasokonstriktion zu ermöglichen^{6;20;61}. Es gibt aber auch entgegengesetzte Annahmen. In der *A. mesenterica*^{32;35;82}, den Koronararterien^{122;144}, und Pulmonararterien¹² von verschiedenen Spezies, induziert H₂O₂ eine Gefäßdilataion. Je nach experimentellen Bedingungen ist auch eine Induzierung von Gefäßkonstriktion möglich⁸². Souza und Mitarbeiter konnten jedoch klar darstellen, dass die vaskuläre NADPH-Oxidase eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Gefäßtonus spielt¹³⁵. Die exogene Zugabe von NADH und NADPH führte zu einer gesteigerten ROS-Bildung. An der halbmaximal vorkontrahierten thorakalen Aorta von Mäusen induzierte die Applikation von NADPH eine Vasokonstriktion. Beim Menschen spielt NADPH-Oxidase-Aktivierung eine Rolle bei der Ang II-induzierten Kontraktion in Gefäßen von Patienten mit Hypertonie¹¹³. Bei verschiedenen Tiermodellen konnte das ebenfalls beobachtet werden^{37;81}.

Die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch NADPH führte in den Lumineszenz-Experimenten zu einer erhöhten Superoxidkonzentration in den Gefäßen. Zur weiteren Klärung der Rolle von Radikalen bei der Vermittlung der NADPH-Effekte auf die Kontraktion wurde der Redoxstatus der isometrisch untersuchten Gefäße pharmakologisch beeinflusst. Tempol ist ein Superoxiddismutase-Mimetikum und fördert den Abbau der von der NADPH-Oxidase gebildeten ROS. Die Behandlung der Gefäßringe mit Tempol verringerte den kontraktionsverstärkenden Effekt von NADPH deutlich. Tempol allein schwächte die kontraktile Gefäßantwort auf Ang II geringfügig, aber signifikant, ab. Dies wurde auch schon in der Literatur beschrieben^{113;130}. Des Weiteren wurde der Einfluss von Apocynin, einem Antioxidanz, auf den NADPH-Effekt untersucht. Apocynin wird in der Zelle durch Peroxidase-Oxidation aktiviert⁵⁸. Es gibt eine Fülle an Veröffentlichungen die zeigen konnten, dass Apocynin die NADPH-Oxidase Aktivität und Superoxideradikal Produktion verringert^{4;37;48;57;81;113}. Der genaue Mechanismus einer Inhibition der NADPH-Oxidase ist bislang unbekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass Apocynin die Bindung der p47^{phox} Untereinheit an Nox2 durch Anlagerung an die Bindungsstelle

verhindert¹⁶⁹. Andere Berichte zeigen, dass Apocynin die NADPH-Oxidasen nicht spezifisch inhibiert^{28;72}. Apocynin ist offensichtlich unter bestimmten Bedingungen sogar in der Lage, oxidativen Stress zu erzeugen. Myeloperoxidase-vermittelte Apocynin-Aktivierung führt zur Bildung eines freien Radikals, das Glutathion oxidieren kann. Studien in Gliazellen zeigen, dass Apocynin oxidativen Stress konzentrationsabhängig erhöht¹¹⁶. Auch in Fibroblasten wurde eine erhöhte ROS-Produktion durch Apocynin festgestellt¹⁶⁷. Eine weitere Studie kam zu dem Schluss, dass Apocynin kein Inhibitor der NADPH-Oxidase ist. Apocynin wirkt möglicherweise vielmehr als ein Antioxidanz⁴⁹. Diese Literaturlaufstellung zeigt, dass die exakte Wirkung und Funktionsweise von Apocynin noch nicht bekannt ist. In der vorliegenden Arbeit verminderte Apocynin die Wirkung der NADPH-Behandlung auf die Ang II-vermittelte Kontraktion in adulten mesenterialen Gefäßringen deutlich. Das steht im Einklang mit Ergebnissen von Tempol. Diese Daten deuten darauf hin, dass die hier beobachteten NADPH-Effekte eine aktivierte NADPH-Oxidase mit erhöhter ROS-Produktion einschließen. Interessanterweise führt der oxidative Stress aber nur in adulten Mäusen auch zu einer stärkeren Ang II-Antwort.

P2-Rezeptoren

Aus NADPH können purinerge Substanzen (z.B. ATP, Adenosin) entstehen, die eine vasoaktive Wirkung via P1- und P2-Rezeptoren erzeugen. Judkins und Mitarbeiter schlussfolgerten zum Beispiel aus ihren Experimenten in abdominalen Aortensegmenten, dass exogenes NADPH eine Vasokonstriktion nicht über den Anstieg von ROS, sondern über P2X-Rezeptoren auslöst⁵⁹.

Ein Einfluss von purinergen Substanzen auf den durch NADPH-erzeugten kontraktile Effekt, wurde durch Hemmung der P2-Rezeptoren mit Suramin in der vorliegenden Arbeit geprüft. Es zeigte sich eine Verminderung der Kontraktion, die in der unbehandelten und behandelten Gruppe jedoch gleich groß war. Die Blockierung von P2Y- und P2X-Rezeptoren in der A. mesenterica der adulten Maus konnte also den Einfluss von NADPH auf die Ang II-induzierte Gefäßkontraktilität nicht verhindern. Das spricht gegen eine wesentliche Rolle von P2-Rezeptoren bei der Vermittlung der NADPH-Wirkung.

Kalzium-abhängige Signalwege

Die Untersuchung der intrazellulären Kalziumtransienten mittels Fura-2-Imaging ergab keine Unterschiede im Vergleich von NADPH-behandelten und unbehandelten Gefäßen. Die

Kontraktionsstärke war jedoch in der behandelten Gruppe deutlich stärker. Dies weist auf die Aktivierung kalziunsensitivierender Signalwege durch NADPH-Behandlung hin.

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration kann jedoch auch durch oxidativen Stress beeinflusst werden. Beispielsweise erhöhte die H_2O_2 -Bildung infolge von Ang II-Applikation die intrazelluläre Kalziumkonzentration in einer Studie von Redondo und Mitarbeiter¹¹⁵. Blockierung des IP_3 -Rezeptors verhinderte den Effekt. H_2O_2 ist an der Vermittlung Ang II-induzierter Kontraktion in VSMC beteiligt^{118;145}. Tyrosinkinasen wie Src¹⁴⁹ und ERK¹⁴⁷ liegen im Signalweg der Ang II-induzierten Kontraktion vor der IP_3 -Bildung und Kalziumkonzentrationserhöhung. H_2O_2 aktiviert möglicherweise diese Tyrosinkinasen für die eine Redox-Sensitivität auch schon gezeigt wurde^{146;151;159}. ROS-Bildung ist wahrscheinlich ein wichtiger Schritt der Ang II-induzierten Kalziumfreisetzung. In Gefäßen von spontan hypertensiven Ratten, welche eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration aufweisen, war die Kalziuserhöhung von Ang II- und ROS-abhängig¹⁴⁰. Ein anderer Mechanismus, der für die ROS-Sensitivität der Ang II-induzierten Kalziumkonzentrationserhöhung verantwortlich ist, könnte die Aktivierung von Kalziumkanälen sein. Eine erhöhte Expression der $\alpha_1\text{C}$ -Untereinheit des L-Typ-Kalziumkanals durch Ang II ist von ROS-abhängig¹⁵⁴. Ein andere Studie zeigt, dass der Kanal durch NADPH-Oxidasen reguliert wird¹⁶⁸. ROS können die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA)^{44;60} und die Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran (PMCA)^{43;173} inhibieren. Folglich wird die Wiederaufnahme von Kalzium in das SR gehemmt und die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht. Aus den zitierten Arbeiten wird deutlich, dass ROS die Kalziumkonzentration der VSMC über verschiedenste Signalwege akut und chronisch beeinflussen können. Die fehlende Kalziuserhöhung bei gleichzeitiger Kontraktionskraftverstärkung in der NADPH-behandelten Gruppe adulter Mäuse in der vorliegenden Arbeit spricht eher nicht für eine direkte ROS-Wirkung auf die Kalziumvermittelten Signalwege der Kontraktion. Im folgenden Abschnitt wird die Beteiligung Kalzium-unabhängiger Wege diskutiert.

Kalzium-sensitivierende Signalwege (p38-MAPK, MK2, Rhok)

Die p38-MAPK ist in zentrale zelluläre Signalwege involviert, wird durch zahlreiche Stressoren aktiviert, und führt zu vielfältigen Zellreaktionen^{102;157}. Die MAPK-Signalwege sind dabei eher mit den späteren Phasen einer Ang II-vermittelten Reaktion assoziiert. Eine Stimulierung dieser Signalwege führt u.a. zu vaskulärer Proliferation, Differenzierung und

Hypertrophie, wobei aber auch eine Gefäßkontraktion akut moduliert werden kann^{84;89;102;110;111}. Die p38-MAPK spielt auch bei der Ang II-induzierten Vasokonstriktion sowohl in mesenterialen Arterien als auch an afferenten Arteriolen der Maus eine Rolle^{84;110}. Meloche und Mitarbeiter⁸⁹ berichteten als erste, dass eine Blockierung der p38-MAPK in intakten Aortenringen von normotensiven Ratten die Ang II-induzierte Kontraktion vermindert. Gleichfalls wurde verdeutlicht, dass Ang II in kultivierten VSMC die p38-MAPK aktiviert. Eine Inkubation des Gewebes mit H₂O₂ führte zu einer Aktivierung der p38-MAPK. Dieses Ergebnis steht mit den Beobachtungen von Ushio-Fukai¹⁵⁷ im Einklang, und deutet auf eine Wirkung von ROS bei der p38-MAPK-Aktivierung hin.

In der vorliegenden Arbeit erhöhte Ang II die Phosphorylierung der p38-MAPK, die sich durch Behandlung mit NADPH noch weiter erhöhte. Die p38-MAPK wird hier offensichtlich durch ROS aktiviert. Pharmakologische Hemmung der p38-MAPK in den Mesenterialarterien der adulten Maus hatte keinen Einfluss auf die Ang II-induzierte Kontraktion. Jedoch verhinderte eine p38-MAPK-Hemmung den NADPH-Effekt. In MK2-defizienten Versuchstieren führte NADPH-Behandlung zu keiner gesteigerten Kontraktilität. Die Befunde weisen darauf hin, dass der p38-MAPK/MK2-Signalweg die verstärkte Vasokonstriktion auf Ang II in adulten Mäusen vermittelt. Für die Redox-Sensitivität und funktionale Beeinflussung der Ang II-vermittelten vasomotorischen Funktion ist demzufolge ein vollständiger p38-MAPK/MK2-Signalkomplex nötig. Arbeiten von Taniyama und Kollegen lassen vermuten, dass eine konstitutive Verbindung von Akt und p38-MAPK Ursache der ROS-Sensitivität und Rekrutierung der MK2 ist¹⁴². Die p38-MAPK-Aktivierung durch Ang II wurde in anderen Modellen schon gezeigt^{110;153}. Untersuchungen an renalen Arterien von diabetischen und nicht diabetischen Ratten zeigten eine Beteiligung der p38-MAPK an der Regulation des Blutdruckes und der renalen Hämodynamik⁶⁵.

In dieser Arbeit ging die Aktivierung der p38-MAPK mit einer erhöhten Phosphorylierung der MLC₂₀, sowohl nach Applikation von Ang II, als auch im stärkeren Maße nach NADPH-Behandlung einher. Möglicherweise führt eine Konvergenz der Ang II- und NADPH-initiierten Signalwege zur Verstärkung der p38-MAPK-Phosphorylierung und MLC₂₀-Aktivierung. Der Signalweg vom p38-MAPK/MK2-Signalkomplex zur MLC₂₀ schließt unter anderem HSP-27 ein, welches ein wichtiger Regulator der Gefäßmuskelkontraktion ist. HSP-27 inhibiert die MLCP^{47;54;89;132;171}. MLCK-Aktivierung und MLCP-Inaktivierung durch p38-MAPK kann auch

über andere Wege als HSP-27 erfolgen. In diesem Zusammenhang sind „integrin-linked kinase“ und „zip-kinase“ zu nennen⁵.

Die p38-MAPK ist wahrscheinlich nicht nur an der Ang II-vermittelten Gefäßkontraktilität involviert. Es wurde vielmehr auch über eine Beteiligung dieses Enzyms an der Noradrenalin- und Endothelin-induzierten Kontraktion mesenterialer Arterien von Ratten berichtet¹⁰¹. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eine mögliche Spezifität der Interaktion von NADPH-Behandlung und Ang II-Gabe in mesenterialen Gefäßen auszuschließen, wie sie in renalen Gefäßen vermutet wird¹¹⁰.

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Kontraktion durch ROS stellt der Rho/RhoK-Signalweg dar. RhoK spielt bei der Ang II-induzierten Hypertonie eine Rolle¹⁵⁵. Die Ang II-stimulierte und RhoK-vermittelte MLC₂₀-Phosphorylierung ist NADPH-Oxidasen abhängig⁵⁰. Der genaue Mechanismus der Rho/RhoK-Aktivierung durch ROS ist nicht bekannt. Die von der NADPH-Oxidase gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies und deren Derivate wie H₂O₂ aktivieren die Tyrosinkinase c-Src mit nachfolgender PI3-K-Aktivierung^{129;149}. PI3-K spielt in Zusammenhang mit erhöhter MLCK-Aktivität, Kalziumsensitivität und Kontraktilität eine Rolle. PI3-K vermittelt Signale von ROS auch in Zusammenhang mit der vasomotorischen Funktion¹⁰⁰. ROS bzw. O₂⁻ modulieren auch die Aktion vasoaktiver Stoffe wie 5-HT¹³⁷ und beeinflussen die Wirkung einer Adrenorezeptor-Stimulation¹³⁶.

6.3 Modell des akuten oxidativen Stresses

Eine Aufgabe dieser Arbeit war, ein Modell zur Erzeugung von akutem oxidativen Stress zu etablieren. Aufgrund der raschen Desensibilisierung der AT₁-Rezeptoren unter den gegebenen *in vitro* Bedingungen konnte die NADPH-Oxidase nicht mit Ang II akut stimuliert werden. Die NADPH-Oxidase wurde mit ihrem Substrat NADPH stimuliert. Die Substratspezifität wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Eine Reihe von Arbeiten hat den exogenen Einfluss von NADPH und/oder NADH auf die ROS-Bildung und den Vasotonus, *in vitro* und *in vivo*, untersucht^{26;106;109;135}. Die zitierten Arbeiten konnten an verschiedenen Gefäßabschnitten und Spezies, eine Beeinflussung des Vasotonus mit erhöhter ROS-Bildung durch NADPH zeigen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass exogen appliziertes NADPH den Vasotonus und die Aktivität der NADPH-Oxidasen modulieren kann. Andere Arbeiten berichten

hingegen, dass NADH die Aktivität der NADPH-Oxidasen wesentlich stärker erhöht als NADPH^{40;114}. Durch Elektronen-Spin-Resonanz-Charakterisierung der vaskulären NADPH-Oxidase konnte jedoch verdeutlicht werden, dass das bevorzugte Substrat der NADPH-Oxidasen für die Beeinflussung des Vasotonus NADPH ist¹³⁴. An Gefäßringen der Aorta von Mäusen führte NADPH und NADH Applikation zur erhöhten Radikalproduktion, welche nach 60 Minuten eine maximale Plateauphase erreicht. In dieser Studie hatte nur NADPH, nicht aber NADH, einen Einfluss auf den Vasotonus¹³⁵.

Aufgrund dieser Befunde wurde in der vorliegenden Arbeit mit NADPH stimuliert. Übereinstimmend zu den vorgenannten Befunden wurde eine erhöhte Aktivität der NADPH-Oxidasen nach Stimulation mit NADPH durch Chemilumineszenz ermittelt. Durch Hemmung anderer ROS-generierender Enzyme kann diese Chemilumineszenz vorwiegend dem NADPH-Oxidase-Produkt Superoxidanion zugeordnet werden. Der ROS-scavenger Tiron hemmte die ROS-Bildung nach Stimulation der NADPH-Oxidasen weitestgehend und bekräftigt, dass die Lumineszenz durch ROS verursacht wurde. Eine weitere Steigerung der NADPH-Oxidase-Aktivität durch Ang II nach Stimulation mit NADPH wurde nicht festgestellt. Ang II erhöhte ROS in verschiedenen anderen Studien^{40;104;114;160}. Der fehlende Effekt in der vorliegenden Studie könnte vor allem auf die experimentellen Bedingungen zurückgeführt werden. Die Inkubation mit NADPH führte möglicherweise schon zu einer maximalen akuten Aktivierung der NADPH-Oxidasen¹³⁵.

In der dieser Arbeit wurde die NADPH-Oxidase-Aktivität mit Hilfe der Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz nachgewiesen. Das reduzierte Lucigenin reagiert mit O_2^- und führt zur Chemilumineszenz. In hohen Konzentrationen kann Lucigenin jedoch am Redox-Kreislauf teilnehmen und durch Autoxidation selbst Superoxidanion bilden^{79;80;143;166}. Daher ist es möglich, dass ein Teil der Lucigenin-Chemilumineszenz auf einer direkten Autoxidation von Lucigenin mit Bildung von O_2^- beruht und so die Ergebnisse der Aktivitätsmessung beeinflusst. Allerdings wäre der Effekt unter den gegebenen Bedingungen in beiden Gruppen gleich, und würde die Ergebnisse nicht wesentlich beeinflussen. Um das Redoxpotential zu verringern, wurde eine niedrige Konzentration von Lucigenin in der vorliegenden Studie verwandt. Zudem konnten Li und Mitarbeiter zeigen, dass eine Autoxidation von Lucigenin unter O_2^- -bildenden Bedingungen eher nicht relevant ist⁷⁹. Auf Grund von Redoxpotentialmessungen wird eine

Autoxidation von Lucigenin zudem für wenig wahrscheinlich gehalten^{2,96}. Genauere Methoden zur Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität, wie das Elektronen-Spin-Resonanz-Verfahren¹³⁴, standen mir nicht zur Verfügung.

Die vorliegende Studie zeigt mittels verschiedener Methoden, dass NADPH-Behandlung akuten oxidativen Stress erzeugt. Dieser führt altersabhängig in Mesenterialarterien von C57/B16 Mäusen zu einer verstärkten Ang II-Antwort. Dieser Effekt beruht vermutlich nicht auf einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit. Die p38-MAPK mit dem Zielenzym MK2 sind dagegen wesentlich in den Signalweg eingebunden.

7 Zusammenfassung

1. Oxidativer Stress spielt bei der Alterung und zahlreichen pathologischen Veränderungen von Gefäßen eine Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell akuten oxidativen Stresses durch Applikation von NADPH verwendet, um dessen Auswirkungen auf die Gefäßreaktivität zu untersuchen.
2. Es wurde die Hypothese geprüft, dass oxidativer Stress über Signalwege, welche die p38-MAPK einschließen, die Kontraktilität glatter Gefäßmuskelzellen erhöht und dass der Effekt altersabhängig ist.
3. Mesenteriale Arterien von C57/Bl6 und MK2-defizienten Mäusen wurden unter isometrischen Bedingungen in einem Gefäßmyographen nach Mulvany und Halpern hinsichtlich ihrer kontraktilen und dilatativen Eigenschaften untersucht. Gefäßsegmente juveniler (65 Tage alt) und adulter (160 Tage alt) Versuchstiere wurden verwendet.
4. Die NADPH-Oxidase wurde durch NADPH-Inkubation über 60 Minuten stimuliert. Durch pharmakologische Eingriffe wurden Signalwege beeinflusst und mittels Konzentrations-Antwort-Kurven für Ang II der Einfluss auf die Gefäßkontraktilität ermittelt.
5. Die real-time PCR diente der Expressionsbestimmung von NADPH-Oxidase-Isoformen und Untereinheiten auf mRNA-Ebene. Die Phosphorylierung von Proteinen wurde mit Western-Blots analysiert. Die Superoxidkonzentration wurde mittels Lucigenin-Chemilumineszenz gemessen.
6. Die Konzentrations-Antwort-Kurve für Ang II war bei den unbehandelten juvenilen und adulten Tieren gleich. Akuter oxidativer Stress durch NADPH-Behandlung führte jedoch in den Gefäßen adulter Tiere zu einer signifikant höheren Kontraktion und Ang II-Sensitivität.
7. Die Expression der Nox1, Nox2, Nox4, p47^{phox} und p67^{phox} war in Mesenterialgefäßen juveniler und adulter Tiere gleich. NADPH-Behandlung erhöhte die Superoxidkonzentration *ohne* Unterschied im Vergleich beider Gruppen.
8. Die Behandlung mit dem nichtselektiven NOS Inhibitor L-NAME verstärkte die Ang II-Antwort in den juvenilen und adulten Gefäßen auf ein gleiches Maximum. NADPH-Behandlung + L-NAME hatten keinen weiteren Einfluss auf die Maximalkontraktion, erhöhte aber die Sensitivität für Ang II in adulten Tieren. Da die Endothel-abhängige Vasodilatation in NADPH-behandelten und unbehandelten adulten Tieren gleich war, beruht die Sensitivitätssteigerung vermutlich nicht auf einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit, sondern auf anderen NO-unabhängigen Mechanismen.

9. Die verstärkte Antwort auf Ang II infolge NADPH-Behandlung in adulten Mäusen ging *nicht* mit einer gesteigerten Kalziumfreisetzung einher. Die Phosphorylierung der MLC₂₀ war jedoch in Gefäßen adulter Tiere größer. Dies weist auf die Aktivierung kalziumsensitivierender Signalwege hin.
10. Die Phosphorylierung sowohl der p38-MAPK als auch der MLC₂₀ war in adulten Gefäßen nach NADPH-Behandlung und Ang II-Applikation stärker als in den juvenilen Gefäßen. Hemmung der p38-MAPK verhinderte den NADPH-Effekt auf die Kontraktilität adulter Gefäße ebenso wie MK2-Defizienz (MK2-defiziente Mäuse).
11. Die Arbeit zeigt, dass NADPH-Behandlung zu stärkerer Ang II-Antwort in adulten Gefäßen bei gleicher Superoxidbelastung führt. Dies deutet auf eine unterschiedliche Verarbeitung akuten oxidativen Stresses in juvenilen und adulten Gefäßen hin.
12. Gleiche dilatative, endothelabhängige Kapazität in behandelten und unbehandelten Gefäßen adulter Tiere spricht gegen eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit nach NADPH-Behandlung.
13. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsmessungen weisen auf eine Schlüsselrolle des p38-MAPK/MK2-Signalweges bei Vermittlung der gesteigerten Ang II-Antwort nach NADPH-Behandlung hin. Möglicherweise beruht das auf einer erhöhten Redox-Sensitivität des p38-MAPK/MK2-Komplexes.
14. Der altersabhängige Effekt von ROS auf die Ang II-vermittelte Gefäßkontraktilität suggeriert, dass erhöhter oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen schon in adulten Gefäßen eine wichtige Rolle für die Gefäßintegrität spielen, obwohl eine endotheliale Dysfunktion mit verminderter NO-Bioverfügbarkeit (noch) nicht besteht.
15. Weitere Untersuchungen müssen klären, wie es zu einer Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges kommt und ob das Endothel dabei eine Rolle spielt. Weiterhin ist von Interesse, welche anderen gefäßaktiven Substanzen in ihrer Wirkung auf die Mesenterialgefäße durch akuten oxidativen Stress beeinflusst werden. Eine weitere wichtige Frage, die sich aus der vorliegenden Arbeit ergibt, ist die nach der Beteiligung anderer sekundär entstehender ROS an der NADPH-induzierten Erhöhung der Gefäßreaktivität in adulten Tieren.
16. Die vorliegende Arbeit berichtet über einen neuen Aspekt der kontraktionsfördernden Wirkung oxidativen Stresses in der Altersentwicklung von Gefäßen, bei dem ein NO-unabhängiger, p38-MAPK-vermittelter Mechanismus von Bedeutung ist.

8 Literaturverzeichnis

1. Adler A, Messina E, Sherman B, Wang Z, Huang H, Linke A, Hintze TH. NAD(P)H oxidase-generated superoxide anion accounts for reduced control of myocardial O₂ consumption by NO in old Fischer 344 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1015-H1022.
2. Afanas'ev IB, Ostrakhovitch EA, Mikhal'chik EV, Korkina LG. Direct enzymatic reduction of lucigenin decreases lucigenin-amplified chemiluminescence produced by superoxide ion. *Luminescence*. 2001;16:305-307.
3. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593-615.
4. Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Perez-Giron JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol*. 2008;153:926-935.
5. Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231:237-251.
6. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1989;13:859-864.
7. Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1995;77:29-36.
8. Bachschmid M, van der LB, Schuler K, Labugger R, Thureau S, Eto M, Kilo J, Holz R, Luscher TF, Ullrich V. Oxidative stress-associated vascular aging is independent of the protein kinase C/NAD(P)H oxidase pathway. *Arch Gerontol Geriatr*. 2004;38:181-190.
9. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87:245-313.
10. Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2005;25:155-162.
11. Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG, Jr., Timmermans PB. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 1991;17:720-721.
12. Burke TM, Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol*. 1987;252:H721-H732.
13. Busse R, Trogisch G, Bassenge E. The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res Cardiol*. 1985;80:475-490.

14. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840-844.
15. Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*. 2000;35:155-163.
16. Carlstrom M, Lai EY, Ma Z, Patzak A, Brown RD, Persson AE. Role of NOX2 in the regulation of afferent arteriole responsiveness. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:R72-R79.
17. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410:37-40.
18. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2006;71:216-225.
19. Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res*. 1999;84:210-219.
20. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 1994;23:229-235.
21. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res*. 2002;90:1159-1166.
22. Czapski G. Reaction of .OH. *Methods Enzymol*. 1984;105:209-215.
23. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52:415-472.
24. Deng JT, Sutherland C, Brautigan DL, Eto M, Walsh MP. Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J*. 2002;367:517-524.
25. Deng JT, Van Lierop JE, Sutherland C, Walsh MP. Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem*. 2001;276:16365-16373.
26. Didion SP, Faraci FM. Effects of NADH and NADPH on superoxide levels and cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H688-H695.
27. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, Seals DR. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. 2007;100:1659-1666.

28. Engels F, Renirie BF, Hart BA, Labadie RP, Nijkamp FP. Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrorhiza kurroa*, on arachidonic acid metabolism. *FEBS Lett.* 1992;305:254-256.
29. Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem.* 1995;118:1104-1107.
30. Eto M, Senba S, Morita F, Yazawa M. Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett.* 1997;410:356-360.
31. Fellner SK, Arendshorst WJ. Angiotensin II, reactive oxygen species, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:F1012-F1019.
32. Fujimoto S, Asano T, Sakai M, Sakurai K, Takagi D, Yoshimoto N, Itoh T. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced relaxation in rabbit mesenteric small artery. *Eur J Pharmacol.* 2001;412:291-300.
33. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.* 1997;80:45-51.
34. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
35. Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RM. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 2003;138:1085-1092.
36. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302:148-158.
37. Ghosh M, Wang HD, McNeill JR. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2004;141:562-573.
38. Gohla A, Schultz G, Offermanns S. Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res.* 2000;87:221-227.
39. Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I, Fujishima M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2000;36:581-587.
40. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74:1141-1148.
41. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86:494-501.

42. Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept.* 2000;91:21-27.
43. Grover AK, Samson SE, Fomin VP. Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. *Am J Physiol.* 1992;263:H537-H543.
44. Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:C294-C301.
45. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986;320:454-456.
46. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260:3440-3450.
47. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 3):357-368.
48. Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2001;37:529-534.
49. Heumuller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schroder K, Brandes RP. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension.* 2008;51:211-217.
50. Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S, Takeshita A. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res.* 2003;93:767-775.
51. Hirano K, Hirano M, Kanaide H. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle. *J Smooth Muscle Res.* 2004;40:219-236.
52. Hishikawa K, Luscher TF. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 1997;96:3610-3616.
53. Hofmann F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 2005;280:1-4.
54. Ibitayo AI, Sladick J, Tuteja S, Louis-Jacques O, Yamada H, Groblewski G, Welsh M, Bitar KN. HSP27 in signal transduction and association with contractile proteins in smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1999;277:G445-G454.
55. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:9265-9269.

56. Inagami T. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10 Suppl 11:S2-S7.
57. Jacobson A, Yan C, Gao Q, Rincon-Skinner T, Rivera A, Edwards J, Huang A, Kaley G, Sun D. Aging enhances pressure-induced arterial superoxide formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1344-H1350.
58. Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, Hughes CV, McNamara EJ, Ishmael F, O'Donnell RW, Chang MM, Hogg MG, Dordick JS, Santhanam L, Ziegler LM, Holland JA. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium*. 2002;9:191-203.
59. Judkins CP, Sobey CG, Dang TT, Miller AA, Dusting GJ, Drummond GR. NADPH-induced contractions of mouse aorta do not involve NADPH oxidase: a role for P2X receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317:644-650.
60. Kaplan P, Babusikova E, Lehotsky J, Dobrota D. Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem*. 2003;248:41-47.
61. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol*. 1989;257:H33-H37.
62. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:5698-5702.
63. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273:245-248.
64. Komatsu S, Hosoya H. Phosphorylation by MAPKAP kinase 2 activates Mg(2+)-ATPase activity of myosin II. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;223:741-745.
65. Komers R, Schutzer W, Xue H, Oyama TT, Lindsley JN, Anderson S. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on blood pressure, renal hemodynamics, and renal vascular reactivity in normal and diabetic rats. *Transl Res*. 2007;150:343-349.
66. Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol*. 1999;1:94-97.
67. Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, Takase K, Hartshorne DJ, Nakano T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett*. 2000;475:197-200.
68. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull*. 2004;62:505-515.

69. Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997;272:12257-12260.
70. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
71. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension.* 2002;40:511-515.
72. Lapperre TS, Jimenez LA, Antonicelli F, Drost EM, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, Rahman I. Apocynin increases glutathione synthesis and activates AP-1 in alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.* 1999;443:235-239.
73. Larsen JK, Yamboliev IA, Weber LA, Gerthoffer WT. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *Am J Physiol.* 1997;273:L930-L940.
74. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:R277-R297.
75. Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem.* 1993;268:24210-24214.
76. Lee MR, Li L, Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem.* 1997;272:5063-5068.
77. Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1045-1059.
78. Levy BI. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 2004;109:8-13.
79. Li Y, Zhu H, Kuppasamy P, Roubaud V, Zweier JL, Trush MA. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J Biol Chem.* 1998;273:2015-2023.
80. Liochev SI, Fridovich I. Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys.* 1997;337:115-120.
81. Lodi F, Cogolludo A, Duarte J, Moreno L, Coviello A, Peral DB, Vera R, Galisteo M, Jimenez R, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;544:97-103.

82. Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens*. 2005;23:571-579.
83. Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:269-280.
84. Martinka P, Lai EY, Fahling M, Jankowski V, Jankowski J, Schubert R, Gaestel M, Persson AE, Persson PB, Patzak A. Adenosine increases calcium sensitivity via receptor-independent activation of the p38/MK2 pathway in mesenteric arteries. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008;193:37-46.
85. Mayhan WG, Arrick DM, Sharpe GM, Sun H. Age-related alterations in reactivity of cerebral arterioles: role of oxidative stress. *Microcirculation*. 2008;15:225-236.
86. McCrann DJ, Yang D, Chen H, Carroll S, Ravid K. Upregulation of Nox4 in the aging vasculature and its association with smooth muscle cell polyploidy. *Cell Cycle*. 2009;8:902-908.
87. McDaniel SS, Platoshyn O, Wang J, Yu Y, Sweeney M, Krick S, Rubin LJ, Yuan JX. Capacitative Ca(2+) entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L870-L880.
88. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C82-C97.
89. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Gasson E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H741-H751.
90. Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;811:60-67.
91. Moon SK, Thompson LJ, Madamanchi N, Ballinger S, Papaconstantinou J, Horaist C, Runge MS, Patterson C. Aging, oxidative responses, and proliferative capacity in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2779-H2788.
92. Moore ED, Becker PL, Fogarty KE, Williams DA, Fay FS. Ca²⁺ imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium*. 1990;11:157-179.
93. Mukai Y, Shimokawa H, Higashi M, Morikawa K, Matoba T, Hiroki J, Kunihiro I, Talukder HM, Takeshita A. Inhibition of renin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction associated with aging in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1445-1450.
94. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-350.

95. Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature*. 1976;260:617-619.
96. Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1761-1768.
97. Nagao T, Fujishima M, Vanhoutte PM. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *Jpn J Pharmacol*. 1992;58 Suppl 2:342P.
98. Newaz MA, Yousefipour Z, Oyekan A. Oxidative stress-associated vascular aging is xanthine oxidase-dependent but not NAD(P)H oxidase-dependent. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;48:88-94.
99. Niiro N, Ikebe M. Zipper-interacting protein kinase induces Ca(2+)-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001;276:29567-29574.
100. Northcott CA, Poy MN, Najjar SM, Watts SW. Phosphoinositide 3-kinase mediates enhanced spontaneous and agonist-induced contraction in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Circ Res*. 2002;91:360-369.
101. Ohanian J, Cunliffe P, Ceppi E, Alder A, Heerkens E, Ohanian V. Activation of p38 mitogen-activated protein kinases by endothelin and noradrenaline in small arteries, regulation by calcium influx and tyrosine kinases, and their role in contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1921-1927.
102. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000;12:1-13.
103. Orlandi A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Spagnoli LG. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006;188:221-230.
104. Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*. 1998;32:331-337.
105. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:14483-14488.
106. Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol*. 1995;268:H2274-H2280.
107. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526.

108. Park L, Anrather J, Girouard H, Zhou P, Iadecola C. Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:1908-1918.
109. Park L, Anrather J, Zhou P, Frys K, Wang G, Iadecola C. Exogenous NADPH increases cerebral blood flow through NADPH oxidase-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1860-1865.
110. Patzak A, Lai EY, Fahling M, Sendeski M, Martinka P, Persson PB, Persson AE. Adenosine enhances long term the contractile response to angiotensin II in afferent arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R2232-R2242.
111. Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22:153-183.
112. Podlutzky A, Ballabh P, Csiszar A. Oxidative stress and endothelial dysfunction in pulmonary arteries of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H346-H351.
113. Puntmann VO, Hussain MB, Mayr M, Xu Q, Singer DR. Role of oxidative stress in angiotensin-II mediated contraction of human conduit arteries in patients with cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol.* 2005;43:277-282.
114. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97:1916-1923.
115. Redondo PC, Salido GM, Rosado JA, Pariente JA. Effect of hydrogen peroxide on Ca²⁺ mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:491-502.
116. Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212:179-187.
117. Rodriguez-Manas L, El Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, Solis J, Petidier R, Montes M, Nevado J, Castro M, Gomez-Guerrero C, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell.* 2009;8:226-238.
118. Rodriguez-Puyol M, Griera-Merino M, Perez-Rivero G, Diez-Marques ML, Ruiz-Torres MP, Rodriguez-Puyol D. Angiotensin II induces a rapid and transient increase of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4:869-875.
119. Rotrosen D, Yeung CL, Leto TL, Malech HL, Kwong CH. Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* 1992;256:1459-1462.
120. Sabarra AJ, KARNOVSKY ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* 1959;234:1355-1362.

121. Sanders KM. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20 Suppl 1:39-53.
122. Sato A, Sakuma I, Gutterman DD. Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2345-H2354.
123. Schini-Kerth VB, Vanhoutte PM. Nitric oxide synthases in vascular cells. *Exp Physiol.* 1995;80:885-905.
124. Schluter T, Zimmermann U, Protzel C, Mieke B, Klebingat KJ, Rettig R, Grisk O. Intrarenal artery superoxide is mainly NADPH oxidase-derived and modulates endothelium-dependent dilation in elderly patients. *Cardiovasc Res.* 2009.
125. Schubert R, Mulvany MJ. The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin Sci (Lond).* 1999;96:313-326.
126. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1115-1126.
127. Segal AW, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature.* 1978;276:515-517.
128. Semsei I, Rao G, Richardson A. Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 1991;58:13-19.
129. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* 2002;91:406-413.
130. Shastri S, Gopalakrishnan V, Poduri R, Di Wang H. Tempol selectively attenuates angiotensin II evoked vasoconstrictor responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2002;20:1381-1391.
131. Siqueira IR, Fochesatto C, de Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-Klein A, Netto CA. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 2005;23:663-671.
132. Somara S, Bitar KN. Tropomyosin interacts with phosphorylated HSP27 in agonist-induced contraction of smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C1290-C1301.
133. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83:1325-1358.
134. Sorescu D, Somers MJ, Lassegue B, Grant S, Harrison DG, Griendling KK. Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:603-612.

135. Souza HP, Laurindo FR, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H658-H667.
136. Srivastava P, Hegde LG, Patnaik GK, Dikshit M. Role of endothelial-derived reactive oxygen species and nitric oxide in norepinephrine-induced rat aortic ring contractions. *Pharmacol Res*. 1998;38:265-274.
137. Srivastava P, Rajanikanth M, Raghavan SA, Dikshit M. Role of endogenous reactive oxygen derived species and cyclooxygenase mediators in 5-hydroxytryptamine-induced contractions in rat aorta: relationship to nitric oxide. *Pharmacol Res*. 2002;45:375-382.
138. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 1994;78:931-936.
139. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J*. 2008;275:3249-3277.
140. Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:200-208.
141. Takizawa N, Koga Y, Ikebe M. Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297:773-778.
142. Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, Weber DS, Alexander RW, Griendling KK. Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C494-C499.
143. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res*. 1999;84:1203-1211.
144. Thengchaisri N, Kuo L. Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H2255-H2263.
145. Torrecillas G, Boyano-Adanez MC, Medina J, Parra T, Griera M, Lopez-Ongil S, Arilla E, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol*. 2001;59:104-112.
146. Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81:159-167.
147. Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*. 1999;99:392-399.

148. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000;52:639-672.
149. Touyz RM, Wu XH, He G, Park JB, Chen X, Vacher J, Rajapurohitam V, Schiffrin EL. Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca²⁺ signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 2001;19:441-449.
150. Touyz RM, Yao G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:512-518.
151. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:981-987.
152. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. Role of the actin cytoskeleton in angiotensin II signaling in human vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;83:91-97.
153. Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 2004;22:1141-1149.
154. Tsai CT, Wang DL, Chen WP, Hwang JJ, Hsieh CS, Hsu KL, Tseng CD, Lai LP, Tseng YZ, Chiang FT, Lin JL. Angiotensin II increases expression of alpha1C subunit of L-type calcium channel through a reactive oxygen species and cAMP response element-binding protein-dependent pathway in HL-1 myocytes. *Circ Res.* 2007;100:1476-1485.
155. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997;389:990-994.
156. Unger T. The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens.* 1999;17:1775-1786.
157. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 1998;273:15022-15029.
158. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW. Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem.* 1998;273:19772-19777.
159. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW. Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:489-495.

160. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996;271:23317-23321.
161. Ushio-Fukai M, Zuo L, Ikeda S, Tojo T, Patrushev NA, Alexander RW. cAbl tyrosine kinase mediates reactive oxygen species- and caveolin-dependent AT1 receptor signaling in vascular smooth muscle: role in vascular hypertrophy. *Circ Res.* 2005;97:829-836.
162. Vanhoutte PM. The endothelium--modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med.* 1988;319:512-513.
163. Vanhoutte PM. Ageing and endothelial dysfunction. *Eur Heart J Supplements.* 2002;4:A8-A17.
164. Vanhoutte PM, Mombouli JV. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis.* 1996;39:229-238.
165. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;196:193-222.
166. Vasquez-Vivar J, Hogg N, Pritchard KA, Jr., Martasek P, Kalyanaraman B. Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett.* 1997;403:127-130.
167. Vejrazka M, Micek R, Stipek S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1722:143-147.
168. Wang G, Anrather J, Glass MJ, Tarsitano MJ, Zhou P, Frys KA, Pickel VM, Iadecola C. Nox2, Ca²⁺, and protein kinase C play a role in angiotensin II-induced free radical production in nucleus tractus solitarius. *Hypertension.* 2006;48:482-489.
169. Williams HC, Griendling KK. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50:9-16.
170. Wu L, Iwai M, Nakagami H, Li Z, Chen R, Suzuki J, Akishita M, de Gasparo M, Horiuchi M. Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation.* 2001;104:2716-2721.
171. Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT. Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1899-H1907.
172. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Minieri CA, Akers M, Lassegue B, Griendling KK. Arachidonic acid metabolites mediate angiotensin II-induced NADH/NADPH oxidase activity and hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal.* 1999;1:167-179.

-
173. Zaidi A, Michaelis ML. Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:810-821.
 174. Zeiher AM, Drexler H, Saubier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest.* 1993;92:652-662.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
A.	Arteria (lat.)
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym, engl.: angiotensin-converting-enzyme
Akt	Proteinkinase
Ang II	Angiotensin 2
ANOVA	Varianzanalyse, engl.: analysis of variance
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT-R	Angiotensin II-Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin, engl.: Bovine Serum Albumin
bzw	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalziumion
CaM	Kalzium/Calmodulin Komplex
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
COX	Cyclooxygenase
D	Deutschland
d.h.	das heißt
DAG	Diazylglyzerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyliodonium
EC	Endothelzelle
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDHF	Endothel-abhängiger hyperpolarisierender Faktor, engl.: endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothel-abhängiger relaxierender Faktor, engl.: endothelium-derived relaxing factor

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, engl.: epidermal growth factor receptor
engl.	englisch
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase, engl.: extracellular regulated kinase
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor, engl.: guanine nucleotide exchange factor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor, engl.: G-protein coupled receptor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO•	Hydroxylradikal
HSP27	Hitze-Schock-Protein 27, engl.: heat shock protein 27
IC	innerer Gefäßdurchmesser
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	c-jun NH ₂ -terminale Kinase
kDa	Kilodalton
K-H-L	Krebs-Henseleit-Lösung
lat.	lateinisch
M	Mol
MAPK	mitogen-aktivierte-Proteinkinase, engl.: mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK2; MK2	MAP-Kinase-aktivierte-Proteinkinase 2
min	Minuten
ml	Milliliter
MLC ₂₀	regulatorische leichte Myosin Kette
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase, engl.: myosin-light-chain-kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase, engl.: myosin-light-chain-phosphatase
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mN	Millinewton

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
Nox	NADPH-Oxidase
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ONOO ⁻	Peroxinitrit
p38-MAPK	p38-mitogen-aktivierte-Proteinkinase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC _β	Phospholipase C _β
PLD	Phospholipase D
Rac	kleines G-Protein
RhoK	Rho-Kinase
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl.: sodium dodecyl sulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
second messenger	Botenstoff
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOD	Superoxid-Dismutase

SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Src	Tyrosinkinase
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOP	maximale Gefäßkontraktion
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
TXA ₂	Tromboxan A ₂
u.a.	unter anderem
V	Volt
vs.	gegen, lat.: versus
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle, glattmuskuläre Gefäßzelle
z.B.	zum Beispiel

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Veröffentlichungsverzeichnis

1. **„Oxidative stress increases angiotensin II responses in mesenteric arteries of adult mice”**
Andreas Patzak, Sebastian Schmidt, Olga Zavaritskaya, Andreas Steege, Michael Fähling, Olaf Grisk, Torsten Schlüter, Peter Martinka
2nd Cardiovascular Control Conference, Mahabalipuram, Tamil Nadu, Indien, Dezember 2008

2. **„NADPH oxidase-derived reactive oxygen species regulate Ang II-induced contractions via p38/MK2 pathway in the mouse mesenteric artery”**
Peter Martinka, Sebastian Schmidt, Michael Fähling, Andreas Steege, Matthias Gaestel, Pontus B. Persson and Andreas Patzak
Experimental Biology 2008, San Diego, California, USA, April 2008
The FASEB Journal. 2008;22:969.27-969.

3. **„Effect of iron oxide perfusion on renal micro vessel morphology, and dilatory function and endothelial mRNA expression of mouse aorta“**
Juliane Rettig, Sebastian Schmidt, Janice Schildroth, Alexander Paliege, Peter Martinka, Mauricio Sendeski, Sebastian Bachmann, Pontus B. Persson and Andreas Patzak
Experimental Biology 2008, San Diego, California, USA, April 2008
The FASEB Journal. 2008;22:761.26.

4. **„Einfluss von oxidativem Stress auf die Gefäßfunktion im Alter “**
Sebastian Schmidt
Klausurtagung des Institutes für Vegetative Physiologie, Egsdorf, Oktober 2007

5. **„Adenosine enhances calcium sensitivity by intracellular mechanisms involving p38-MAPK/MK2 pathway in the mouse mesenteric artery”**
Peter Martinka, Michael Fähling, Sebastian Schmidt, Vera Jankowski, Rudolf Schubert, Matthias Gaestel, Pontus B. Persson and Andreas Patzak
Experimental Biology 2007, Washington, DC, USA, April / Mai 2007
The FASEB Journal. 2007;21:939.4

6. **„Adenosine increases angiotensin II contractility via activation of p38 MAPK/MK2 pathway in the mesenteric arteries”**

Martinka P, Fahling M, Schmidt S, Sendeski M, Persson PB, Patzak A

The 86th Annual Meeting of the German Physiological Society, Hannover, März 2007

Acta Physiologica 2007; Volume 189, Supplement 653:002-3

7. **„Long term exposure to adenosine re-sensitises angiotensin II-induced contractions in the mesenteric artery”**

P. Martinka, M. Föhling, S. Schmidt, PB. Persson, A. Patzak

24th Conference of the European Society for Microcirculation, Amsterdam, Niederlande,

August / September 2006

J Vasc Res 2006;43(suppl 1):29–72

12 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Sebastian Steffen Schmidt erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Akuter oxidativer Stress verstärkt die Angiotensin II-induzierte Konstriktion mesenterialer Arterien der adulten Maus über den p38-MAPK/MK2-Signalweg“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum: 28.04.2010

Unterschrift: Sebastian Schmidt

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit wesentlich mit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. P. Martinka und Prof. Dr. A. Patzak. Herrn Dr. P. Martinka möchte ich für die ausgezeichnete tägliche Betreuung und Einarbeitung in die wissenschaftliche Methodik und Thematik danken. Mit seinen praktischen Fertigkeiten, wertvollen Hinweisen und Anregungen verhalf er mir zur Lösung vieler Problemstellungen. Herrn Prof. Dr. A. Patzak danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung und Begleitung dieser Promotionsarbeit. Seine vielseitigen Ideen und konstruktiven Anregungen, sowie seine fortwährende Ansprechbarkeit bei auftretenden Fragen und Problemen trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. A. Steege, Dr. M. Fähling, Frau Dr. O. Zavaritskaya und Frau U. Neumann für die außerordentliche Unterstützung bei den molekularbiologischen Aufgabenstellungen. Außerdem möchte ich mich bei Ihnen für die geschätzten Hinweise und Korrekturen während der Manuskriptarbeit bedanken.

Teile dieser Arbeit wären ohne eine Kooperation mit Wissenschaftlern anderer Einrichtungen nicht möglich gewesen. Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei PD Dr. O. Grisk und Dr. T. Schlüter vom Institut für Physiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, sowie bei Prof. Dr. M. Gaestel vom Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover bedanken.

Bei Frau Y. Amoneit und Frau A. Gerhardt möchte ich mich für die ständige Unterstützung im Labor bei Fragen und Problemen medizintechnischer Natur bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, der diese Dissertation gewidmet ist, ganz herzlich bedanken. Sie hat mich in jeder Hinsicht stets unterstützt und gefördert. Ohne ihre Hilfe wäre die Durchführung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.