

---

Aus der Medizinischen Klinik für Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät der Charite-Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

**Western Blot und realtime PCR- basierte Identifizierung  
möglicher Hypertonie assoziierter Gene an einem definiertem  
Hypotoniemodell an Wistar-Kyoto Ratten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Vesna Furundzija  
aus Berlin

---

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet  
2. Prof. Dr. med. B. Sanner  
3. Prof. Dr. med. M. Bader

Datum der Promotion: 17.09.2008

# I. INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>II</b>
<b>III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>IV. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	
<b>1.1. Hypertonie im Überblick .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Definition und Formen der Hypertonie .....	1
1.1.2. Prävalenz und Epidemiologie der Hypertonie .....	2
1.1.3. Hypertonie als Risikofaktor .....	2
1.1.4. Pathogenese der Hypertonie .....	3
<b>1.2. Pathophysiologie und Funktion des Endothels .....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Endotheliale Vasodilatoren .....	5
<b>1.3. Bedeutung des Sauerstoffs und seiner Radikale .....</b>	<b>7</b>
1.3.1. Radikale - Sauerstoffradikale .....	7
1.3.2. ROS und seine Wirkung .....	9
<b>1.4. Oxidativer Stress - Redox Status .....</b>	<b>15</b>
1.4.1. Hämoxygenase (HO) .....	15
1.4.2. Einfluss von oxidativen Stress auf die Gefäßphysiologie .....	16
1.4.3. Endotheliale Dysfunktion .....	17
<b>1.5. Resistin-Idee .....</b>	<b>19</b>
<b>1.6. Zielsetzung .....</b>	<b>20</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Material rt-PCR und Western Blot .....</b>	<b>22</b>
2.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	22
2.1.2. Materialien für die rt-PCR und Western Blot .....	22
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.2.1. Intraarterielle Blutdruckmessung .....	29
2.2.2. Materialgewinnung – Nieren- und Aortenexplantation .....	30
2.2.3. RNA-Isolierung über Trizol® .....	30
2.2.4. Reverse Transkription .....	31
2.2.5. Polymerasekettenreaktion .....	32
2.2.6. Western Blot .....	40
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Veränderungen des systolischen Blutdrucks .....</b>	<b>47</b>

---

<b>3.2. Ergebnisse der Western Blot und realtime-PCR.....</b>	<b>49</b>
3.2.1. Real- Time PCR .....	49
3.2.2. Western Blot.....	58
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>70</b>
<b>7. DANKSAGUNG.....</b>	<b>79</b>
<b>8. CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>80</b>
<b>9. ERKLÄRUNG.....</b>	<b>81</b>

---

## II. Abkürzungsverzeichnis

A.	-	Arteria
Ach	-	Acetylcholin
ADH	-	antidiuretisches Hormon
ADMA	-	asymmetrische dimethylierte Argininvarianten
ADP	-	Adenosindiphosphat
ANF	-	atrialer natriuretischer Faktor
APS	-	Ammoniumpersulfat
ATP	-	Adenosintriphosphat
BRD	-	Bundesrepublik Deutschland
CAT	-	Catalase
cDNA	-	complementary Desoxyribonukleinsäure
cGMP	-	zyklisches Guanosinmonophosphat
eNOS	-	constitutive Stickstoffmonooxidsynthase
COX	-	Cyclooxygenase
CSE-Hemmer	-	Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer
CT	-	cycle-treshold
CYP	-	Cytochrom P
DEPC	-	Diethylcyanophosphonat
DHP	-	Deutsche Herz-Kreislauf Präventionsstudie
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DPI	-	Diphenyleneiodonium
dsDNA	-	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
e <sup>-</sup>	-	Elektron
EC <sub>50</sub>	-	effective concentration 50 %
EDHF	-	endothelial derived hyperpolarization factor
EDRF	-	endothelial derived relaxing factor
eNOS	-	endotheliale Stickstoffmonooxidsynthase
EST	-	expressed sequence tag
ET-1	-	Endothelin-1
FDR	-	false discovery rate
FK-506	-	Tacrolimus
FMN	-	Flavinmononukleotid
g	-	Gramm
GAPDH	-	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GC	-	Guanylatcyclase

---

GEO	-	Gene Expression Omnibus
GTP	-	Guanosintriphosphat
Häm	-	Protoporphyrin IX
HETE	-	Hydroxyeicosatetraensäuren
HO	-	Hämoxygenase
HWZ	-	Halbwertszeit
HX	-	Hypoxanthin
ICAM	-	intercellular adhesin molecule
Ig	-	Immunglobulin
IL	-	Interleukin
iNOS	-	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IP-Rezeptor	-	Prostacyclin-Rezeptor (PGI <sub>2</sub> )
IPO	-	Indophenoloxidase
JNC	-	Joint National Comitee of Prevention
KCl	-	Kaliumchlorid
kD	-	Kilo Dalton
kg	-	Kilogramm
KHK	-	koronare Herzkrankheit
K <sub>m</sub>	-	Michaelis-Menten-Konstante
LAGETSI	-	Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin
LDL	-	low density lipoprotein
L-NAME	-	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Argininmethylester
LPS	-	Lipopolysaccharide
MCP	-	monocyte chemoattractant protein
M-MLV	-	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP	-	Matrixmetalloproteinase
mox	-	<i>mitogenic oxidase</i>
mRNA	-	messenger Ribonukleinsäure
N.	-	Nervus
NA	-	not available
NADH/ NAD <sup>+</sup>	-	Nicotinamadenindinukleotid
NADPH	-	Nicotinamadenindinucleotidphosphat
ND	-	not done
nNOS	-	neuronale Stickstoffmonooxidsynthase
NO	-	Stickstoffmonooxid
NOS	-	Stickstoffmonooxid-Synthase

---

nox	-	non-phagozyten Oxidase
OD	-	optical density
OHCL	-	hypochlorige Säure
p (dN #184) <sub>6</sub>	-	Random-Hexamere
pAVK	-	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	-	polymerase chain reaction
PDGF	-	platelet derived growth factor
PE	-	Phenylephrin
PEPCK	-	Phosphoenolpyruvatecarboxykinase
PGH <sub>2</sub>	-	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	-	Prostaglandin I <sub>2</sub>
phox	-	Phagozyten-Oxidase
PLA	-	Phospholipasen
PVDF	-	Polyvinylidenfluorid
RAAS	-	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	-	reactive oxygen species
RT	-	Reverse Transkription
RT-Buffer	-	Reverse Transkription-Puffer
rt-PCR	-	realtime-Polymerase chain reaction
SEM	-	standard error of mean
sGC	-	soluble Guanylatcyklase
SHR	-	spontaneously hypertensive rats
SNP	-	Sodiumnitroprussid
SOD	-	Superoxiddismutase
TEMED	-	Tetramethyldiamin
TGF	-	transforming growth factor
Tm	-	Schmelztemperatur (melting temperature)
TNF	-	tumor necrosis factor
Tris	-	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
USA	-	United States of America
VCAM	-	vascular cell adhesion molecule
WHO	-	World Health Organisation
WKY-Ratten	-	Wistar-Kyoto-Ratten
X	-	Xanthin
XDH	-	Xanthindehydrogenase
XO	-	Xanthinoxidase
XOR	-	Xanthinoxidoreduktase

---

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Struktur der NAD(P)H-Oxidase der neutrophilen Granulozyten und der glatten Gefäßmuskelzelle

Abbildung 2: Schmelzpunktanalyse des verwendeten  $\beta$ -Actins (actb3)

Abbildung 3 : Genexpressionskurve eines rt-PCR-Laufes als Beispiel

Abbildung 4: Vergleich des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz z den hypotensiven Tieren und normotensiven Kontrolltieren

Abbildung 5: Auswertung der Real- Time PCR von XDH in der Aorta

Abbildung 6: Auswertung der Real- Time PCR von XDH in der Niere.

Abbildung 7: Auswertung der Real- Time PCR von Por in der Aorta

Abbildung 8: Auswertung der Real- Time PCR von Por in der Niere

Abbildung 9: Auswertung der Real- Time PCR von NOX 1 in der Aorta

Abbildung 10: Auswertung der Real- Time PCR von NOX 1 in der Niere

Abbildung 11: Auswertung der Real- Time PCR von NOX 4 in der Aorta

Abbildung 12: Auswertung der Real- Time PCR von NOX 4 in der Niere

Abbildung 13: Auswertung der Real- Time PCR von iNOS in der Aorta

Abbildung 14: Auswertung der Real- Time PCR von iNOS in der Niere

Abbildung 15: Auswertung der Real- Time PCR von eNOS in der Aorta

Abbildung 16: Auswertung der Real- Time PCR von eNOS in der Niere

Abbildung 17: Auswertung der Real- Time PCR von HO-1 in der Aorta

Abbildung 18: Auswertung der Real- Time PCR von HO-1 in der Niere

Abbildung 19: Western- Blot Por Aorta

Abbildung 20: Western- Blot Por Niere

Abbildung 21: Western- Blot XDH Aorta

Abbildung 22: Western- Blot XDH Niere



**IV. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Einteilung der Hypertonie.
Tabelle 2	Sauerstoffradikale in der Übersicht.
Tabelle 3	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.
Tabelle 4	Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.
Tabelle 5	Durchschnittswerte der relativen Transkriptionshäufigkeit der einzelnen Gene der Aorta im Vergleich
Tabelle 6	Durchschnittswerte der relativen Transkriptionshäufigkeit der einzelnen Gene der Niere im Vergleich

# 1. Einleitung

## 1.1. Hypertonie im Überblick

### 1.1.1. Definition und Formen der Hypertonie

Die aktuellen Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) definieren den Bluthochdruck (arterielle Hypertonie) als Erhöhung der Blutdruckwerte auf mindestens 140/90mmHg. Der vordere, systolische Wert entspricht dem Druck, der entsteht, wenn sich das Herz kontrahiert und das Blut in die Peripherie (Arterien) pumpt. Der hintere diastolische Wert entsteht bei der Erschlaffung bzw. Relaxation des Herzens. Die Blutdruckwerte werden immer paarweise angegeben. Liegen der systolische und diastolische Wert in zwei unterschiedlichen Klassen, so wird bei der Beurteilung der Werte immer die höhere Klasse herangezogen.

*Tabelle 1: Einteilung der Hypertonie (Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure); Chobanian A.V. et al., 2003)*

<b>Klassifikation</b>	<b>systolischer Blutdruckwert in mmHg</b>	<b>diastolischer Blutdruckwert in mmHg</b>
optimaler Blutdruck	< 120	< 80
normotensiver Blutdruck	< 130	< 85
hoch normotensiver Blutdruck	130-139	85-89
leichte Hypertonie (Schweregrad I)	140 -159	90-99
mittelschwere Hypertonie (Schweregrad II)	160-179	100-109
schwere Hypertonie (Schweregrad III)	< 180	< 110
isoliert systolische Hypertonie	$\geq$ 140	< 90

Die Hypertonie kann in zwei unterschiedliche Formen unterteilt werden, die essentielle auch primäre Hypertonie genannt und die sekundäre Hypertonie. Der Unterschied besteht darin, dass bei der sekundären Hypertonie eine bekannte anatomische Anormalität oder endokrine Störung vorhanden ist, die die Hypertonie als Folge auslöst. Das bedeutet, dass bei der Beseitigung dieses primären Grundes auch die daraus resultierende Hypertonie beseitigt werden kann. Zu diesen primären Noxen gehört zum Beispiel das Konsumieren von Hormonpräparaten (Antibabypille) oder Kortikoiden, oder auch bekannte Grunderkrankungen

wie Nierenerkrankungen (z.B. chronische interstitielle, renoparenchymatöse oder renovaskuläre Erkrankungen), Stoffwechselstörungen (Cushing Syndrom, Conn Syndrom oder Hyperthyreose) oder auch kardiovaskuläre Störungen (Aorteninsuffizienz oder Aortenisthmusstenose) .

### **1.1.2. Prävalenz und Epidemiologie der Hypertonie**

Die arterielle Hypertonie hat weltweit eine Prävalenz von 26 % und gehört zu den häufigsten Ursachen der Gesamtsterblichkeit der Weltbevölkerung mit 5,8 % (Kearney PM, Whelton M, Reynolds K et al., 2005). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht nach eigenen Einschätzungen davon aus, dass ein erhöhter Blutdruck für 7,1 Millionen Tote jährlich verantwortlich ist und 13 % der Mortalität ausmacht. Die tendenziell steigende globale Prävalenz ist bei weitem nicht mehr nur in den Industrienationen zu verzeichnen (World Health Report, 2003). Hochrechnungen zu Folge, wird die Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung bis zum Jahre 2025 weltweit auf 29 % steigen (Kearney PM, Whelton M, Reynolds K et al., 2005). In der Bundesrepublik Deutschland (BRD) ist die Prävalenz für die Hypertonie nach Daten der Deutschen Herz-Kreislauf-Präventionsstudie (DHP) und des WHO-MONICA Projekts (World Health Organization-Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) zufolge, bei den 45-74 jährigen auf etwa 35 % geschätzt. Weitere Ergebnisse im Rahmen des MONICA Augsburgs Projekts ergaben, dass sogar seit Mitte der achtziger Jahre kein Rückgang bei der Prävalenz zu verzeichnen ist, sondern fast jeder zweite ab dem 50. Lebensjahr einen erhöhten Blutdruck hat. Epidemiologische, bevölkerungsbasierte Querschnittsstudien zeigen, dass es in der BRD ein Nord-Süd-Gefälle der kardiovaskulären Mortalität gibt, sowie eine signifikant höherer Prävalenz der Hypertonie in der nordöstlichen Region Deutschlands im Vergleich zur südwestlichen Region (Meisinger C, Heier M, VolzkeH et al., 2006).

### **1.1.3. Hypertonie als Risikofaktor**

Der Prävalenzanstieg der Hypertonie erhält vor allem in anbeacht der daraus resultierenden Folgeerkrankungen eine signifikante Bedeutung. Die schwersten Folgen der unbehandelten Hypertonie sind die verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen wie zum Beispiel (z.B.) die koronare Herzkrankheit, zerebrovaskuläre und periphere Gefäßkrankheiten mit zugehörigen Endorganschäden wie z.B. Herz- beziehungsweise Nierenversagen. Hierfür und

für viele verwandte Erkrankungen stellt der Hypertonus im unbehandeltem Zustand einen Risikofaktor erster Ordnung dar (Kjeldsen et al.2001, Lewington et al.2002).

Allein an diesen Folgeerkrankungen sterben pro Jahr mehr als 400.000 Menschen, so dass die Herz- Kreislaufferkrankung in der Todesursachenstatistik an erster Stelle steht und bei Frauen einen prozentualen Anteil von 49,7 % und bei Männern 39,8 % der Gesamttodesfälle ausmacht (Statistisches Bundesamt, 2004).

So ist z.B. die Hypertonie ein zentraler Progressionsfaktor für das Fortschreiten einer Niereninsuffizienz, unabhängig von der Genese der Nierenfunktionseinschränkung. Betrachtet man in der Kausalitätskette den weiteren Verlauf so weiß man, dass schon eine leichte Nierenfunktionseinschränkung einen wesentlichen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt (Mann JF, Gerstein HC,Dulau-Florea I, Lonn E 2003).

#### **1.1.4. Pathogenese der Hypertonie**

Die Pathogenese der Hypertonie ist sehr komplex, so dass bis heute keine eindeutige Erklärung gefunden werden konnte. Man geht am ehesten von einem multifaktoriellen Prozess aus, der die Interaktion von genetischen Ursachen und Umweltfaktoren, aber auch Verhaltensweisen involviert (Frohlich ED et al., 2001). Zu den genannten Umweltfaktoren, die bei der Entstehung der Hypertonie im engen Zusammenhang stehen, zählen vor allem Alkohol (Beilin L.J., Puddey I.B., 1992), Übergewicht (Landsberg L. et al., 1992) Kochsalzkonsum (Aldermann M.H., 1999), Stress (Falkner B., 1991), orale Kontrazeptiva, Arbeitsbedingungen, Bewegungsarmut und das Klima.

Die dazu korrelierenden Gene findet man im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), im Kallikrein-Kinin-System, im sympathischem Nervensystem, in bestimmten G-Proteinen und vor allem die in den Genen für Salzsensitivität (Poch E et al., 2001; Yu H. et al., 2002; Luft F.C., 2000).

Dahl führte ein eindrucksvolles Experiment durch, bei dem zwei Rattenstämme untersucht wurden, von denen der eine sensitiv gegenüber Kochsalz war und eine Hypertonie entwickelte und der andere nicht. Nachdem die Niere der salzsensitiven Tiere in die salzresistenten Tiere transplantiert wurde, übertrug sich auch die Hypertonie (Dahl L.K. et al., 1962; Curtis J.J. et al., 1983). Daran kann man über den Einfluss des Umweltfaktors hinaus auch erkennen, dass die Niere genauso wie die Umwelt eine wesentliche Rolle in der Blutdruckregulation spielt. Zu der Interaktion zwischen genetisch- und umweltbedingten Faktoren bedarf es einer genauen Untersuchung auf dem Bereich der genfokussierten Forschung. 1923 gab es eine Studie die bewies, dass Geschwister von Patienten mit

Hypertonie vermehrt an Bluthochdruck litten (Weitz W., 1923), diese Studie zeigt z.B., dass der Hypertonus einer genetischen Ursache unterliegen muss.

Einzelerefolge wie z.B. das Auffinden von hypertonieassoziierten Polymorphismen in den Genbereichen von Angiotensin, Angiotensin Converting- Enzym, Aldosteronsynthesen, adrenergen Rezeptoren und  $\alpha$ -Adducin zeigten alle nur einen geringen Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks, so dass die Suche nach weiteren bisher nicht gefundenen Kandidatengenen der primären Hypertonie fortgesetzt wird. Die Hypothese von Sir Pickering, dass jedes pathologisch veränderte, blutdruckregulierende Gen eine anteilige Auswirkung auf die primäre Hypertonie hat und erst das Zusammenspiel aller die tatsächliche genetische Grundlage der Hypertonie ausmacht (Pickering G., 1978), dient heute als Fundament aller Studien, die sich mit der genetischen Ursache für die primäre Hypertonie auseinandersetzen. Adipositas oder Diabetes mellitus spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Hypertonie (Landsberg L. et al., 1992 & 1996). Trotz zahlreicher Ergebnisse in vielen Studien konnte keines in direktem Zusammenhang mit der Entstehung der Hypertonie gebracht werden. Zu den untersuchten Mechanismen zählen z.B. das Renin –Angiotensin-System (Hollenberg N.K. et al., 1986), Adrenalin und Noradrenalin (Raymond J.R. et al., 1990), Prostaglandine, EDRF, Kallikrein-Kinin-System (Naasjeletti A. ,Malik K.U.,1979, Bonnardeaux A. et al., 1995), Vasopressin (Goldsmith S.R., 1987), Serotonin (Robertson J.I., 1990), und Endothelin-I (Yanagisawa M. et al., 1988). Immer häufiger wird auch eine mögliche Ursache für die Hypertonie im Bereich der reaktiven Sauerstoffradikale (englisch: reactive oxygen species ROS) gesucht (Cai H., Harrison D.G., 2000). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Erforschung der Hypertoniepathogenese durch die Manigfaltigkeit der möglichen und komplex zusammenwirkenden Mechanismen die Forschung erheblich erschwert. Vor allem auf dem Feld der genetischen Ursachenforschung scheint es eine Vielzahl von möglichen Kandidatengenen zu geben, die letztendlich den Phänotyp Bluthochdruck definieren könnten und möglicherweise eine der bereits genannten Blutdruckregulierenden Faktoren beeinflussen.

## **1.2. Pathophysiologie und Funktion des Endothels**

Das Gefäßendothel, ein hochspezifisches Zellsystem mit einer Vielzahl an Funktionen, die bei der Blutdruckregulation eine entscheidende Rolle spielen, zählt mit ca. 1,5 kg zu den größten Organen im menschlichen Organismus. Es besteht an seiner luminalen Seite aus einer

einzelligen Endothelschicht. Die Endothelzellen werden in vivo drei unterschiedlichen hämodynamischen Kräften ausgesetzt (Dobrin et al., 1989):

- der rhythmischen Dehnungskraft, die durch pulssynchrone Druckänderung den Querschnitt der Gefäßwand zirkulär belastet
- dem hydrostatischem Druck, basierend auf dem transmuralen Druckgefälle zwischen Blut und Gewebe
- und der Wandschubspannung, die durch die Strömung des Blutes in Richtung der Längsachse des Gefäßes auf das Endothel wirkt

Zu den wichtigsten Funktionen des Endothels zählt die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase, die Regulation der Blutgerinnung mittels einer antithrombogenen Oberfläche (Bombeli, Mueller et. al 1997), die Kontrolle des trans- und perizellulären Stofftransportes, die Antigenpräsentation, die Steuerung von Koagulation, Fibrinolyse und die Entzündungsreaktionen (Clines, Pollak et al. 1998). Die Modulation des Kontraktionszustandes der glatten Gefäßmuskulatur und die damit einhergehende Anpassung des Gefäßdurchmessers an die hämodynamische Gegebenheiten mittels des Gefäßtonus (Griendling und Alexander 1996) ist besonders für die Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutflusses unter verschiedensten körperlichen Bedingungen wichtig (Busse, 1985; Vanhoutte, 1988; Busse und Fleming, 1993). Dies geschieht nach humoraler oder physikalischer Stimulation mittels Bildung und Freisetzung von vasokonstriktorischer oder vasodilatatorischer Substanzen. Zu den vasokonstriktorischen Substanzen zählen unter anderem Endothelin I (ET-1), Angiotensin II (AT-II), Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Zu den wichtigsten relaxierenden Substanzen gehören Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), Epoxyeicosatetraensäure und der endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF).

### **1.2.1. Endotheliale Vasodilatoren**

Die bereits genannten Vasodilatoren EDRF (Stickstoffmonoxid, NO) und Prostazyklin PGI<sub>2</sub> gelten unter physiologischen Bedingungen als die wichtigsten kurzlebigen Autakoide. Sie sind daran beteiligt die lokale Kontrolle des Gefäßtonus und die Inhibition der Thrombozytenaktivierung zu steuern. Schon 1997 erkannte Vanhouette das NO sowohl der wichtigste quantitative als auch qualitative vasodilatierende Faktor ist.

NO gehört zu den lipophilen Gasen, es ist durch seine kleine Molekülgröße fähig, sehr schnell durch die Membranen der einen zur nächsten Zelle zu diffundieren ohne Gebrauch von einem

spezifischen Transportersystems zu machen, und dort ebenfalls lokal wirksam zu werden. Es ist mit einer Halbwertszeit von 2- 5 sec. ein sehr kurzlebiges Molekül.

Die NO- Bildung wird durch eine spezifische Gruppe von Isoenzymen, den NO- Synthasen (NOS) katalysiert (Moncada, 1976; Nathan, 1993). Es gibt bisher drei beschriebene Isoformen der NO-Synthase .Darunter fallen die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder auch TYP 3) (Canon 1998), die neuronale NOS (nNOS oder Typ1) (Charles, Chubb et al., 1993), und die induzierbare NOS (iNOS oder TYP 2) (MacNaul und Hutchinson 1993). Die konstitutiven NO-Synthasen binden in Abhängigkeit von der intrazellulären Kalziumkonzentration reversibel an Calmodulin und sind somit erst aktiv, d.h. dass durch einen erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel mehr cNOS (nNOS, eNOS) aktiviert wird und somit mehr NO entstehen kann. Neben diesem Aktivierungsweg gibt es auch eine kalziumunabhängige Aktivierung der eNOS mittels Phosphorylierung (Dimmler et al., 1999), shear stress und gesteigerter zellulärer Tyrosinphosphorylierung (Bauersachs et al., 1997), sowie durch isometrische Gefäßkontraktion (Fleming et al., 1999). Nicht nur das bereits erwähnte Calmodulin stellt ein wichtiges Cosubstrat für die NO Synthasen dar, ebenso benötigen sie für eine Freisetzung von NO, Eisen Protoporphyrin IX (Häm), Flavin-Mono-Nukleotid (FMN) und Nikotinamiddinukleotidphosphat (NADPH). Diese Enzyme bilden durch Abspaltung aus der Guaninogruppe der Aminosäure L-Arginin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und der protonierten Form des NADPH, NO und L-Citrullin. Arginin gehört zu den basischen Aminosäuren und ist ein Nebenprodukt des Harnstoffzyklus. Im menschlichen Körper kommt es im Blut in Konzentrationen von 100 µM vor und kann nur in geringen Mengen synthetisiert werden, so dass wir den Rest über Nahrungsmittel zu uns nehmen müssen. Der einzige einheitlich beschriebene und bisher bewiesene Rezeptor für NO im biologischen System stellt die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase, sGC) dar, ein Enzym das die chemische Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in das cyclische Guanosin-Monophosphat (cGMP) katalysiert. Diese Umwandlung geschieht erst nachdem das NO an der Häm Gruppe der GC bindet. Das entstandene cGMP fungiert in der Zielzelle als second messenger (Boger, Bode-Boger et al. 1996). Die erhöhte Konzentration an cGMP sorgt nun für eine Aktivierung der cGMP- abhängigen Proteinkinase, wodurch über Phosphorylierung eine verminderte intrazelluläre Kalziumkonzentration mit nachfolgender vermehrter Aufnahme von Kalzium in den intrazellulären Speicher und eine erhöhte Kalziumexkretion aus der Zelle folgt, dass sorgt für die Relaxation in den glatten vaskulären- und nichtvaskulären Muskelzellen und für die Dilatation des Gefäßes (Moncada S. & Higgs A et al. 1993). Neben dieser Wirkung inhibieren NO sowie PGI<sub>2</sub> die Thrombozytenaggregation

und Adhäsion von Blutplättchen am Gefäßendothel und führen demzufolge zu einer verstärkten Fibrinolyse (Gryglewski, Chlopicki et al. 1995). Beobachtet man die NO Produktion in Gefäßendothelzellschichten, so ist die eNOS die quantitativ bedeutendste Synthese die für die Bildung des NO verantwortlich ist. Auch die iNOS wird in der Endothelzellschicht exprimiert trägt jedoch unter physiologischen Bedingungen nicht signifikant zur endothelialen NO Bildung bei (Geiger M., Stone A. et al., 1997). Kommt es nun im Körper, z.B. im Rahmen eines aktivierten Immunsystems zur Freisetzung von Mediatoren wie z.B. der bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-2 und viele andere, so wird über eine Überaktivität der iNOS zu viel NO produziert, welches in diesen hohen Konzentrationen toxisch wirkt auf viele Zellen (Nathan C., 1992). Die zytotoxische Wirkung des unter pathologischen Bedingungen entstandenen NO entfaltet sich sowohl auf körpereigene Zellen (Tumorzellen) als auch auf viral, bakteriell, infizierten oder fungalen Zellen. Transkription und Translation werden in verschiedenen Zelltypen durch NO beeinflusst. Die Cytochrom-P450 haltigen Enzyme werden durch NO inaktiviert (Khatsenko, Gross et al. 1993). Unter den physiologisch vorkommenden Konzentrationen wirkt NO nicht zellschädigend auf den Körper, sondern zeigt eine besondere Bedeutung im vaskulären Strukturumbau in der physiologischen Blutdruckregulation sowie der Angiogenese und der Apoptose (Huang P.L., Huang Z. et al., 1995; Dimmeler S and Zeiher A.M. 1997; Papapetropoulos A., Garcia Cardena G. et al., 1997; Rudic R.D., Shesely E.G. et al. 1998).

### **1.3.Bedeutung des Sauerstoffs und seiner Radikale**

#### **1.3.1. Radikale – Sauerstoffradikale**

Atome oder auch Moleküle, die ein oder mehrere freie Elektronen auf der äußeren Hülle besitzen werden als freie Radikale bezeichnet. Diese freien Elektronen streben danach ein Elektronenpaar zu binden und sind somit sehr reaktionsfreudig. Wie reaktionsfreudig ein Radikal ist, kann anhand seiner Halbwertszeit (HWZ) ermittelt werden. Je kürzer die HWZ, desto reaktionsfreudiger das Radikal. Betrachtet man nun die verschiedenen Gruppen der Radikale so ist besonders den Radikalen des Sauerstoffs eine Bedeutung beizumessen. Das Sauerstoffradikal entsteht im menschlichen Körper ganz natürlich während der Energieerzeugung, aber auch durch äußere Einflüsse. Eines der stärksten und bekanntesten Oxidationsmittel ist das Sauerstoffatom. Sein bestreben andere Moleküle zu oxidieren und dabei Elektronen an sich zu binden ist sehr hoch. Das bei dieser Reaktion entstehende



Produkt sind Radikale, die als ROS bezeichnet werden. Der Begriff Sauerstoffradikal wird meistens nicht nur für die radikalische sondern auch nicht radikalene Moleküle verwendet, die bei univalenter Reduktion von Sauerstoff oder Reaktionen der primär gebildeten Spezies miteinander oder aber auch mit anderen Molekülen entstehen. Die nichtradikalischen Sauerstoffderivate besitzen wie der Name schon sagt kein ungepaartes Elektron in ihrer Hülle, trotzdem haben sie die starke Neigung mit anderen Molekülen chemische Reaktionen einzugehen und sind deshalb den radikalischen Sauerstoffderivaten gleichgestellt. Zu den radikalischen Molekülen zählen in diesem Zusammenhang das Superoxidanion ( $O_2^-$ ), das Hydroxylradikal ( $OH\cdot$ ) und das Stickstoffmonoxid (NO). Zu den nichtradikalischen Sauerstoffderivaten zählen unter anderem Wasserstoffperoxid und Peroxynitrat. Singlet-Sauerstoff ( $O^1$ ), hypochlorige Säure (HOCl), Nitrogenoxide (z.B. NO), Lipidperoxide und Lipidradikale gehören desweiteren zu den reaktiven Sauerstoffradikalen. Diese Radikale lösen zahlreiche oxidative Veränderungen an organischen Molekülen aus und können damit deren physiologische Funktionen verändern.

*Tabelle 2 : Sauerstoffradikale in der Übersicht*

Spezies	Name
$O_2^-$	Superoxid-Radikal
$HO_2\cdot$	Perhydroxylradikal
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
$HO\cdot$	Hydroxyl-Radikal
$RO\cdot$	R-Oxyl-Radikal
$ROO\cdot$	R-Dioxyl-Radikal
$ROOH$	R-Hydroperoxid
$OONO\cdot$	Peroxynitrit
$*O_2$	Singulett-Sauerstoff

### 1.3.1.1. Entstehung der Sauerstoffradikale

Durch die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser während der Atmungskette in den Mitochondrien wird die aerobe Energiegewinnung und somit das Überleben aerober Zellsysteme gesichert. Molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) kann jedoch die Bildung von Sauerstoffradikalen mit einem hohen toxischen Potential verursachen. Die dabei entstehenden Sauerstoffradikale mit ihrer hohen Reaktionsfähigkeit lösen nicht nur physiologische Reaktionen wie Fremdstoffmetabolisierung, Eikosanoidmetabolismus, Phagozytose, Synthese biogener Amine aus, sondern auch unspezifische Reaktionen, die letztendlich zur

Zellschädigung führen. Zu den verschiedenen Entstehungsmechanismen von Sauerstoffradikalen gehört unter anderem die Ein-Elektronen-Reduktion, die nach dem Ein-Elektronen-Transport auf das Sauerstoffatom das Superoxidradikal ( $O_2^-$ ) als Produkt zur Folge hat. Ein weiterer Entstehungsmechanismus ist der Zwei-Elektronen-Transportprozesse, wodurch z.B. das Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) entsteht. Der Drei-Elektronen-Transportprozeß generiert die Entstehung des hochreaktiven Hydroxylradikals ( $OH\cdot$ ), meistens durch metallkatalysierte enzymatische Prozesse. Durch eine ebenfalls metallkatalysierte Reaktion, vornehmlich Eisen, entsteht das am stärksten oxidativ wirkende Sauerstoffradikal, das Perhydroxyradikal, die protonierte Form des Superoxidanions. Eine Reihe von Enzymsystemen, die in den Säugetierzellen zur Bildung von Sauerstoffradikalen beitragen, sind bekannt. Zu diesen Enzymsystemen zählen NAD(P)H-Oxidase, Cyclooxygenase, mitochondriale Elektronen-Transport-Ketten, NO-Synthasen, Lipooxygenasen, Xanthinoxidasen, Peroxidasen und Hämproteine (Häm, Hämatin). Die membrangebundene NAD(P)H-Oxidase löst innerhalb des Gefäßsystems primär die Entstehung der ROS aus (Wolin M.S. et al., 1998), wobei mehrere Isoformen der NAD(P)H-Oxidase identifiziert werden konnten (Warnholtz A. et al., 1999).

### 1.3.2. ROS und seine Wirkung

ROS können im Körper sowohl intra- als auch extrazellulär entstehen. Es gibt eine Reihe von Enzymsystemen in der Zelle, die konstitutiv oder induzierbar ROS produzieren können. Dies sind u.a. Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, Lipooxygenase, Xanthinoxidase, NO-Synthase, Zyklooxygenase, Cytochrom P450-Monooxygenase und die NADPH-Oxidase (Fukai et al., 2002). Im Organismus entstehen reaktive Sauerstoffspezies vor allem in den Mitochondrien als Nebenprodukt der intrazellulären Atmungskette, vor allem entsteht dabei Superoxid als Zwischenprodukt. Während 96-99 % des Sauerstoffs in der Atmungskette durch Cytochromoxidasen in den Mitochondrien vollständig zu Wasser reduziert werden, entstehen aus den restlichen 1-4 % Superoxid (Siems et al. 1998). Als sekundäre Produkte des Superoxids entstehen  $H_2O_2$ - und  $^{\circ}OH$ -. Aber auch durch Entzündungszellen entstehen reaktive Sauerstoffspezies, um so Viren und Bakterien zu schädigen. Alle biologischen Makromoleküle können dem Oxidations- und Destruktionsprozess durch ROS unterliegen, wie z.B. Lipide (insbesondere in den Zellmembranen), Proteine und die DNA und dabei zu letalen Zellschädigungen führen. Einen besonderen zytotoxischen Effekt kann den Hydroxyl-Radikalen ( $HO\cdot$ ) beigemessen werden, da sie als einzige ROS direkt mit biologischen Makromolekülen reagieren können (Imlay J.A. et al. 2002). Wie bereits erwähnt, werden unter

physiologischen Bedingungen ROS im Rahmen des oxidativen Metabolismus intra- und extrazellulär im menschlichen Körper freigesetzt (Orie et al., 1999). Erst bei einem Ungleichgewicht zwischen Radikalbildung und –abbau und folglich vermehrter Freisetzung von ROS, treten durch die Radikale Schädigungen auf, was als Ursache zahlreicher chronischer Krankheiten wie Diabetes mellitus, Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Ischämie postuliert wird (Lockette et al., 1986, Belch et al., 1995, Heinecke, 1998, Da Ros et al., 2005). Entsteht solch ein Ungleichgewicht zugunsten einer Überproduktion von ROS, so bezeichnet man dies als oxidativen Stress (Fattman et al., 2001). Zahlreiche Literaturrecherchen zeigten, dass besonders Superoxidanionen maßgeblich an der Induktion der endothelialen Dysfunktion beteiligt sind. Freie Sauerstoffradikale vermitteln in ihrer Funktion als second messenger die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Proteine und Enzyme (Griendling et al., 2000), was zur Induktion von Genen führt, die wiederum essentiell für die Funktionalität vaskulärer Zellen sind, da sie endothelabhängige Gefäßrelaxation, Zellwachstum und –migration, und vieles mehr regeln.

### **1.3.2.1. Enzymsysteme der ROS Produktion**

In der Zelle befinden sich mehrere Substanzen, die sauerstoffabhängig zur ROS-Bildung führen. Es gibt spezielle Enzymsysteme und auch niedermolekulare Substanzen, die vor allem durch ihre autooxidativen und katalysatorischen Eigenschaften zur ROS-Entstehung beitragen. Drei Enzymsysteme wurden in der Vergangenheit näher untersucht, die den Hauptanteil der ROS-Produktion ausmachen und im Folgendem näher betrachtet werden. Zu ihnen zählen die NADH/NADPH-Oxidasen, NO-Synthasen und die Xanthinoxidoreduktase. In der folgenden Aufzählung findet man einige der quantitativ wichtigsten Quellen der ROS Bildung (Siems et. al., 1998): Purinabbau (Xanthinoxidase), Xenobiotika-Entgiftung (Reaktionen des Cytochrom-P450-Systems), Neutrophile Granulozyten und Makrophagen (NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase), mitochondriale Atmungskette und viele mehr.

### **1.3.2.2. Aufbau der NAD(P)H Oxidasen**

Die NADPH-Oxidasen sind eine Gruppe von Enzymen, die in vielen Zellen vorkommen. In den neutrophilen, eosinophilen und mononukleären Leukozyten ist die NADPH-Oxidase am besten untersucht, wo sie die Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  aus molekularem Sauerstoff und NADPH katalysiert (Babior, 1999). Die NAD(P)H-Oxidase der neutrophilen Granulozyten setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, zum einen aus dem Flavocytochrom b558, das die

Zellplasmamembran durchspannt und selbst aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt ist, der größeren gp91phox und der kleinen p22phox, zum anderem aus dem im Zytoplasma vorkommenden Komponenten p47phox, p67phox und den GTPasen Rac1 oder Rac2 (Babior et al., 2002).

In der nachfolgenden Abbildung kann man die neutrophile, granulozytäre NADPH-Oxidase sehen in einer stark vereinfachten Darstellung und die NADPH Oxidase einer glatten Muskelzelle zum Vergleich. Das in den Phagosomen vorkommende Enzym besteht aus dem membranären Cytochrom b558 Komplex, bestehend aus den Untereinheiten gp91phox, p22phox und einem Häm. Nach der Stimulation durch eine Rezeptorbindung kommt es über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und einer Rac / PAK-abhängigen Phosphorylierung der zytoplasmatischen Komponenten p67phox und p47phox, zu deren Translokation an die membranären Untereinheiten. Dadurch wird der Transfer von Elektronen von NADPH über FAD und FMN zu gp91phox ermöglicht und die Reduktion von Sauerstoff ausgelöst. In den nicht phagozytierenden Zellen, wie z.B. in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, konnte man keine gp91phox finden (Patterson C. et al., 1999), was vermuten lässt, dass es in diesen Zellen Isoformen der gp91phox-Untereinheit geben muss, die die gleichen Funktionen ausüben wie die Untereinheit gp91 der Neutrophilen. Untersuchungen konnten bisher zeigen, dass Endothelzellen und Fibroblasten eine analoge NADPH-Oxidase Untereinheit zur gp 91 phox der neutrophilen Granulozyten besitzen nämlich das Protein Nox 2, während in glatten Muskelzellen Nox 1 und Nox 4 anzufinden war

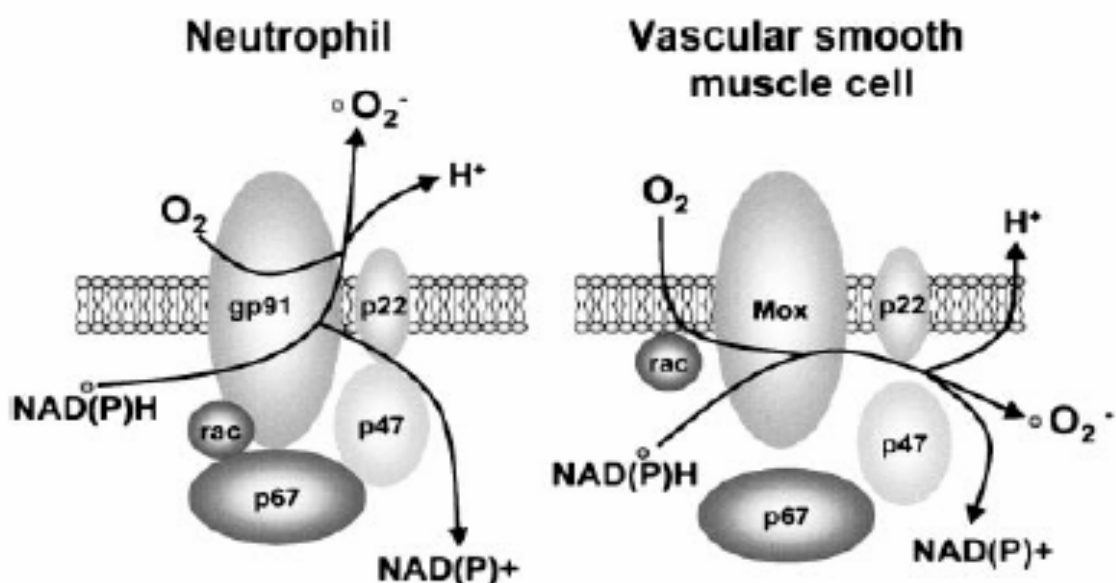
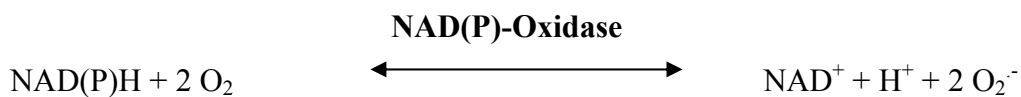


Abbildung 1: Molekulare Struktur der NAD(P)H-Oxidase der neutrophilen Granulozyten und der glatten Gefäßmuskelzelle (Griendling K.K. et al., 2000).

### 1.3.2.3. NAD(P)H Oxidasen im Überblick

Seit langem ist bekannt, dass Gefäße und kardiales Gewebe eine große Kapazität in der Bildung von ROS besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass jede Zelle innerhalb des Gefäßes wie z.B. glatte Muskelzellen, Fibroblasten (Suh Y.A. et al., 1999), Endothelzellen (Bayraktutan U. et al., 1998) und Makrophagen (Radeke H.H. et al., 1991) in der Lage sind Sauerstoffradikale zu bilden. Den NADH/NAD(P)H-Oxidasen, die das führende Enzymsystem für die ROS-Bildung in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und kardialen Gewebe sind, wird dabei besonders Interesse zuteil. Die membranassoziierten Enzymsysteme katalysieren die Reduktion eines Sauerstoffmoleküls, wodurch es zu einer Übertragung eines Elektrons kommt. NADH oder NADPH fungieren dabei als Elektronendonator



Als Vergleichsmaßstab hat man die enzymatischen Aktivitäten der Arachidonsäure-metabolisierenden Enzyme Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen, Xanthinoxidase und der mitochondrialen Oxidasen herangezogen. Es wurde versucht zu differenzieren, ob nun NADH oder NADPH für die NAD(P)H-Oxidase das bevorzugte sei. In der Literatur findet man dabei unterschiedliche Aussagen. Einigen Studien kamen zum Ergebnis, dass das NADPH das bevorzugte Substrat sei (Pagano P.J. et al., 1995), andere Studien hingegen sahen eher das NADH als Hauptdonator für die Elektronenübertragung (Rajagopalan et al., 1996). Wieder andere zeigten, dass NADH und NADPH gleiche Bedeutung in Bezug auf glatte Gefäßmuskelzellen zukommt, aber dass bei der Superoxidanionen-Produktion in Endothelzellen die Bedeutung von NADH dominiert (Griendling K.K. et al., 2000). In der letzten Zeit wurde die Struktur der NAD(P)H-Oxidase weitreichend erforscht, wobei verstärkt die Aufmerksamkeit auf die vaskulären NAD(P)H-Oxidasen gelegt wurde. Diese Art von Enzymen scheint transmembranös zu liegen. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die NADH/NADPH-abhängige Superoxidanionen-Produktion in der 100.000g-Membran-Fraktion liegt, was die Vermutung zulässt, dass sich die NAD(P)H-Oxidase entweder in Mikrosomen oder in der Zellmembran befindet (Griendling K.K. et al., 2000). Bei der Bildung von ROS durch die NADPH Oxidase sind verschiedene bekannte Wirkungsmechanismen bekannt. Die NAD(P)H-Oxidase aus neutrophilen Granulozyten ist ein transmembranöses Protein, das den Elektronentransport über die Zellmembran auf extrazellulären molekularen Sauerstoff katalysiert mithilfe des intrazellulär gelegenen

NADHs beziehungsweise NADPHs. Auch die NADH/NAD(P)H-Oxidasen aus Endothelzellen und Fibroblasten (Meier B. et al., 1991; Zulueta J.J. et al., 1995) zeigen den gleichen Wirkungsmechanismus; hierbei entstehen extrazelluläre ROS-Spezies. In glatten Gefäßmuskelzellen kommt es anders wie zuvor beschrieben zu einer überwiegend intrazellulären Produktion von Sauerstoffderivaten (Zafari A.M. et al., 1998), bei Fibroblasten wurde ein NADH-abhängiges Ektoenzym gefunden (O'Donnell V.B., Azzi A., 1996). An den unterschiedlichsten Wirkungsweisen der NAD(P)H Oxidase der einzelnen Zellen kann man erkennen, dass sie kein einheitliches Enzym darstellt, sondern eher eine Enzymfamilie bildet mit unterschiedlichem Wirkmechanismus aber einer einheitlichen Funktion.

#### **1.3.2.4. Xanthinoxidase**

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR), ein Molybdoenzym, kommt im Zytosol vor und ist ein im Purin- und Pyrimidinstoffwechsel involviertes Enzym. Die XOR kommt in zwei möglichen Formen vor, wie z.B. als Dehydrogenase (XDH ,80%) und der Oxidaseform (XO, 20%), die den Abbau von Hypoxanthin (HX) über Xanthin (X) zu Harnsäure katalysieren. Beide Formen der XOR können ineinander übergehen. Die XDH verwendet bei der o.g. Reaktion oxidiertes Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) als Elektronenakzeptor. Im Rahmen der Ischämiephase kann durch Thiol-Oxidation oder proteolytische Abspaltung eine Umwandlung der XDH-Form in die XO-Form erfolgen. XO hingegen verwendet anstelle von NAD<sup>+</sup> molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor, wodurch es zur Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>•-</sup> kommt (Laakso et al., 2004) (Harrison, 1997). Das dabei entstandene Produkt ROS trägt anschließend zur auftretenden endothelialen Dysfunktion bei. (Ullrich und Bachschmid, 2000).An einer Studie mit spontan hypertensive Ratten (spontaneously hypertensive rats, SHR) konnte man erste Hinweise finden, dass die Xanthinoxidoreduktase an der Superoxidanionenproduktion beteiligt ist. Bei diesen Tieren führt die Applikation einer rekombinanten Form der Superoxid-Dismutasen (SOD) zu einer deutlichen Verminderung des Blutdrucks. Diesen Effekt kann man bei normotensiven Kontrollratten nicht beobachten. Die Superoxid Dismutase kommt in drei Isoenzymformen vor: SOD1, 2 und 3. Sie zählt zu den enzymatischen Antioxidantien, genauso wie Glutathionperoxidase (GPX), Catalase(CAT) und auch Indophenoloxidase (IPO). Zu den nicht enzymatischen Antioxidantien zählt unter anderem das Glutathion. SOD kommt eine wichtige Rolle beim Abbau der Superoxidanionen zu, welches dann von der Glutathionperoxidase weiter zu H<sub>2</sub>O abgebaut wird (Kinnula 2003). Superoxiddismutase (SOD) katalysiert als einziges Enzym die Dismutation von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kann O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nicht durch SOD abgefangen werden, reagiert es sehr schnell mit NO,

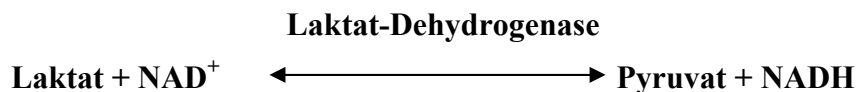
wodurch die NO Bioverfügbarkeit deutlich determiniert wird (Fukai et. al., 2002). SOD ist demzufolge, durch die Kontrolle von NO, ein zentrales Element in der Aufrechterhaltung des vaskulären Redoxgleichgewichtes (Mugge et al., 1991) (Muzykantov, 2001). Als Antagonist der Xanthinoxidoreduktase führt Oxypurionl bei diesen Tieren ebenfalls zu einer deutlichen Minderung des Blutdrucks, so dass man einen bedeutenden Einfluss dieses Enzyms in der Ätiologie dieser Bluthochdruckform annehmen kann (Nakazono K. et al., 1991) und diese Tatsache einen weiteren Hinweis über die Beteiligung der Xanthinoxidoreduktase bei der ROS Entstehung darstellt.

### 1.3.2.5. Cytochrom P450 (CYP)

Die Cytochrom P450 (CYP) sind membrangebundene Enzyme und gehören zu der Gruppe der Monooxygenasen. Sie enthalten eine Häm-Gruppe und sind Teil eines Multienzymkomplexes, der zusätzlich aus einer FAD/FMN enthaltenden NADPH, CYP-Reduktase und einem Cytochrom b5 besteht. Die CYP-Reduktase mit einer molekularen Masse von 78 kD katalysiert den separaten Transfer von zwei Elektronen im Verlauf des unten beschriebenen Reaktionszyklus. Betrachtet man den Reaktionszyklus genauer so erkennt man, dass mit Hilfe verschiedener Kofaktoren, CYP-Enzyme ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) auf das entsprechende Substrat übertragen können, wodurch dieses oxidiert oder peroxydiert wird (Davydov, 2001). Einige CYP-Enzyme katalysieren auch Peroxidasereaktionen ihres Substrates und brauchen dann keinen molekularen Sauerstoff (Puntarulo und Cederbaum, 1998). Bindet ein Substrat an das aktive Zentrum der zentralen Häm-Gruppe von der Cytochrom P450 NADPH-Reduktase so wird anschließend ein Elektron ( $e^-$ ) übertragen, das dann zur Reduktion des Eisen $^{3+}$  zu Eisen $^{2+}$  dient. Molekularer Sauerstoff wird an dieses Eisen $^{2+}$  angelagert, dadurch wird das Eisen wieder oxidiert zu seiner ursprünglichen Fe $^{3+}$  Form. Bei diesem Reaktionsschritt kann sich der Sauerstoff als Superoxidanion ( $O\bullet^-$ ) lösen wobei ein  $e^-$  am Eisen $^{3+}$  verbleibt und der Zyklus wieder mit der Reduktion des zentralen Eisen $^{3+}$  der Häm-Gruppe zu Eisen $^{2+}$  beginnen kann. Wird das Substrat oxygeniert, so wird die Dioxygenbindung durch die Aufnahme eines zweiten  $e^-$  von der Reduktase instabil und ein Sauerstoffatom wird in Form von  $H_2O$  abgespalten. Des Weiteren ist es möglich, dass sich auch aus diesem Zwischenprodukt reaktive Sauerstoffradikale (ROS) als  $H_2O_2$  abspalten, wodurch dann die Häm-Gruppe erneut zum Ausgangszustand vor der ersten Reduktion des Eisen $^{3+}$  zurückkehrt.

## 1.4. Oxidativer Stress - Redox Status

Verschiebt sich im Körper das Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von ROS zugunsten der Bildung, so erfährt der Körper oxidativen Stress. Ebenso sind die Zellen dem oxidativen Stress ausgesetzt, wenn die antioxidative Wirkung des Körpers unzureichend ist. Die hohe Konzentration an reaktiven Sauerstoffderivaten hat verschiedene Angriffsmöglichkeiten auf den Körper. Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen, wie z.B. Bluthochdruck (Kiowski 1999), Atherosklerose (Cai und Harrison 2000), Alzheimer (Pratico et al. 2001) Diabetes mellitus (Cai und Harrison 2000) und Lebererkrankungen (Meagher et al. 1999). Der Redox-Status hingegen ist abhängig von der chemischen Zusammensetzung in der Zelle, die in Relation zu den vorhandenen Reduktionsäquivalenten steht. Das Redox-Potential kann mit Hilfe von so genannten Redox-Reaktionspaaren wie Laktat/Pyruvat, NADH/NAD<sup>+</sup> und reduziertes Glutathion/oxidiertes Glutathion abgeschätzt werden. Das Redox-Potential steht im unmittelbaren Zusammenhang mit dem oxidativen Stress, dem die Zellen ausgesetzt sind. Bei oxidierenden Reaktionen werden Reduktionsäquivalente verbraucht, das in einer Änderung des Redox-Potentials widerspiegelt wird. Das Redox-Potential kann sich aber auch durch eine Zunahme des Laktates zum Beispiel verändern. Die Konzentration von NADH steigt dann nach folgender Reaktion:



Eine hohe Konzentration von Pyruvat führt in der direkten Umkehrung der Reaktion zu einer hohen Konzentration an NAD<sup>+</sup>. Man kann die Begriffe „oxidativer Stress“ und „Redox-Status“ nicht synonym gebrauchen. Durch eine veränderte oxidative Umgebung kann eine Veränderung des Redox-Status ausgelöst werden, jedoch muss ein veränderter Redox-Status nicht zwangsläufig zu einer Änderung der oxidativen Umgebung führen.

### 1.4.1. Hämoxygenase (HO)

Bisher sind drei Isoformen der HO bekannt, die den oxidativen Abbau von toxischem Häm zu Biliverdin katalysieren. HO-1 spaltet ein Molekül Häm, dabei entsteht zu gleichen Teilen Biliverdin, Kohlenmonoxid und freies Eisen (Tenhunen R, Marver HS, Schmid R: The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 61:748-755). Zu den drei Formen der HO zählen zum einen die Hämoxygenase-1, ein Hitzeschockprotein welches ubiquitär in allen Geweben vorkommt und induzierbar ist



zum anderem Hämoxxygenase-2, welche verstärkt im Gehirn und Hoden exprimiert wird und von dem angenommen wird, dass es nicht induzierbar ist (Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK, 1986). Die HO-3 ist die dritte Form der HO, die bisher nicht näher charakterisiert ist (McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD *Eur J Biochem* 247:725-732). In in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit Häm, Metallen, inflammatorischen Zytokinen, NO, Wachstumsfaktoren, sowie unter hypoxischen und oxidativen Stress die HO-1 Aktivität erhöht war (Rizzardini M, Carelli M. et al 1994., Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM 1991; Choi AM, Alam J, 1996). Die Induktion von HO-1 vermittelt einen vom Körper eingerichteten zellulären Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress, wie er nach verschiedenen Arten von akuten Zellschäden auftreten kann (Vogt BA, Shanley TP et al., 1996).

#### **1.4.2. Einfluss von oxidativen Stress auf die Gefäßphysiologie**

Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid werden in fast allen Zellen innerhalb des Gefäßsystems produziert (Griendling K.K., Sorescu D. et al., 2000). In einigen Studien hat sich herausgestellt, dass einzelne Sauerstoffradikalspezies in physiologischen Prozessen als second Messengers fungieren, was sich an den folgenden Eigenschaften erkennen lässt:

die Konzentration an ROS innerhalb des Gefäßsystems kann zum Beispiel durch eine Reihe von vasoaktiven Hormonen z.B. Angiotensin II (Rajagopalan S. et al., 1996), IL-1 $\beta$ , Tumor necrosis factor  $\alpha$  und  $\beta$  (DeKeulenaer G.W. et al., 1998; Ushio-Fukai M. et al., 1996), PDGF, Thrombin, Lactosylceramide sowie durch das G-Protein rac 1 oder rac 2 innerhalb von Milisekunden gesteigert werden (De Keulenaer G.W., 1998), womit eine Regulation der ROS-Produktion möglich ist. Zum anderen gibt es eine Reihe an Schutzmechanismen, die zum Beispiel den Metabolismus der ROS regulieren, wie im Falle der SOD, die die Überführung des Sauerstoffanions in die stabilere Form des Wasserstoffperoxids katalysiert, welches im weiteren Verlauf durch die Enzyme Katalase und Gluthationperoxidase zu Wasser abgebaut wird.

Durch die Möglichkeit der Regulation der ROS-Bildung und ROS-Metabolisierung kann es zu raschen Konzentrationsänderungen kommen, einer weiteren bedeutenden Eigenschaft von second messengern.

### 1.4.3. Endotheliale Dysfunktion

Das Gefäßendothel als größtes Organ im menschlichen Körper mit parakrinen und endokrinen Eigenschaften verhindert im gesunden Zustand die Leukozyten- und Thrombozytenaggregation, wirkt vasodilatatorisch und antiinflammatorisch und vermindert den oxidativen Stress an den Wänden des Gefäßes. Wie bereits erwähnt kann das Endothel durch Freisetzung verschiedener Stoffe wie z.B. PGI<sub>2</sub>, NO (über cGMP Erhöhung), Acetylcholin, Bradykinin und auch Serotonin vasodilatierend wirken. Im Zustand einer endothelialen Dysfunktion ist das Gefäßendothel unfähig, die physiologischen Mechanismen zur Regulation des Gefäßradius, der Blutgerinnung oder der Produktion antiinflammatorischer Zytokine in einer angemessenen Weise zu leisten (Gimbrone 1995). Heute bezeichnet man damit eine verminderte Fähigkeit des Endothels, auf einen adäquaten Reiz hin mit einer NO-Freisetzung zu reagieren. Unter der Endothelschädigung und endothelialen Dysfunktion werden signifikant häufiger kardiovaskuläre Ereignisse beobachtet. Wichtige pathogenetische Faktoren sind das oxidierte LDL und das Homocystein. Reagiert ein Gefäßes mit funktionseingeschränktem Endothel auf Acetylcholin (Jayakody, Senaratne et al. 1985), welches über vaskuläre, muskarinerge Rezeptoren zum einen vasokonstriktorisch und zum anderen wie bereits erwähnt unter physiologischen Bedingungen durch das Endothel vermittelt vasodilatatorisch wirkt, so kann man folgendes beobachten:

Das Acetylcholin wirkt unter physiologischen Bedingungen über eine sekundäre NO-Freisetzung vasodilatatorisch. Ist das Endothel nun in seiner Funktion eingeschränkt, so kann es als Folge inadäquat NO freisetzen und die Acetylcholinwirkung kehrt von seiner physiologischen vasodilatatorischen Wirkung in eine über den muskarinergen Mechanismus vasokonstringierende um (Jayakody, Senaratne et al. 1985; Freiman, Mitchell et al. 1986; Ludmer, Selwyn et al. 1986). An einem Experiment mit hypercholesterinämischen Hasen und Affen mit endothelialer Dysfunktion konnte dieser Sachverhalt bestätigt werden. Ähnlichkeiten sind bei Menschen mit koronarer Herzkrankheit (Ludmer, Selwyn et al. 1986; Golino, Piscione et al. 1991), Atherosklerose (Zeiger, Drexler et al. 1993), Diabetes mellitus (Stehouwer, Lambert et al. 1997), Herzinsuffizienz (Fish, Nabel et al. 1988), Hypercholesterinämie oder Hypertonie (Moncada, Palmer et al. 1991; Cai and Harrison 2000) zu beobachten, bei deren Ätiologie pathogenetisch auch eine endotheliale Dysfunktion zugrunde liegt. Der hier beschriebene eingeschränkte vasodilatierende Effekt des Endothels zeigt in den verschiedenen Krankheitsentitäten eine multifaktorielle Ätiologie und die Veränderungen sind abhängig von spezifischen, pathologischen Manifestationen wie z.B.

unter anderem Dauer der Schädigung und der geschädigten Gefäßregion. Die inadäquate NO Produktion kann auf verschiedenen Ebenen ihre Ursache finden:

#### **1.4.3.1. Veränderungen der NO Konzentration auf Substratebene**

In mehreren Studien konnte sowohl am Tiermodell als auch am Menschen unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B., Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und arterieller Hypertonie gezeigt werden, dass L-Arginin einen positiven Einfluss auf die endotheliale Funktion hat (Cooke, Andon et al. 1991; Drexler, Zeiher et al. 1991; Creager, Gallagher et al. 1992). Bei der oralen Verabreichung von L-Arginin konnte gezeigt werden, dass durch eine maximale Verdoppelung des Serumspiegels bereits eine signifikante Verbesserung der endothelialen Kapazität und eine signifikant verminderte Atheroskleroseentstehung verzeichnet werden konnten (Chen and Sanders 1993).

#### **1.4.3.2. Veränderungen auf Expressionsebene und der Enzymstruktur**

Obwohl die eNOS konstitutiv exprimiert wird, konnte in den letzten Jahren bei in vivo und in vitro Versuchen gezeigt werden, dass sie nicht nur auf Proteinebene, sondern auch transkriptionell reguliert wird. Erhöhte Scherkräfte („shear stress“) des Blutes induzieren die eNOS-Expression (Nishida, Harrison et al. 1992). Ebenso wird eine signifikante kompensatorische Steigerung der eNOS-Expression ausgelöst unter Exposition von Lysophosphatidylcholin (Awolesi, Sessa et al. 1995) und geringen Konzentrationen an oxidiertem LDL (Hirata, Miki et al. 1995). Eine Vielzahl von pathologischen Faktoren, wie z.B. Hypoxie, TNF- $\alpha$ , und hohe Konzentrationen an oxidiertem LDL können die eNOS-Expression vermindern.

#### **1.4.3.3. Veränderungen auf Ebene der Bioverfügbarkeit von NO**

Neben den bereits beschriebenen reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS) spielen auch reaktive Stickstoffmetabolite in der Entstehung von oxidativem Stress eine bedeutende Rolle (Droege, 2002). NO und auch Superoxidanion zählen zu den freien Radikalen. Durch Oxidation eines der terminalen Guanido-Nitrogen-Atome von der Aminosäure L-Arginin entsteht das Stickoxid-Radikal (NO $\bullet$ ). Katalysiert wird diese Reaktion durch die NO-Synthetase (NOS) (Droege 2002).

Diese beiden Radikale gehen eine schnelle Radikal-Radikal-Bindung miteinander ein (Thomson, Trujillo et al. 1995). Die Bindung zwischen NO und ROS führt einerseits zur Bildung eines Oxidationsmittels wie z.B. Peroxynitrit (ONOO-) und andererseits zur

Inaktivierung des NO-Moleküls, wobei vasoinactive Nitrogenoxide (Nitrate oder Nitrite) entstehen. Durch die Inaktivierung des NO-Moleküls und der damit einhergehenden Abnahme der NO Bioverfügbarkeit kommt es zu einer reduzierten dilatativen Gefäßfunktion, die bei einer Reihe von Krankheitsbildern, wie beispielsweise der Hypertonie (Touyz R.M., 2004) oder des Diabetes mellitus (Zou M.H. et al., 2004) eine entscheidende Rolle spielt. Die vasodilatatorisch wirkende NO Konzentration war nachweislich bei Rauchern vermindert. (Heitzer, Just et al. 1996; Heitzer, Yla-Herttuala et al. 1996; Solzbach, Hornig et al. 1997; Ting, Timimi et al. 1997). Die verminderte endotheliale Kapazität ist unter diesen Konditionen nicht nur auf den Mangel an NO allein zurückzuführen, denn im Gegensatz dazu ist die NO-Produktion im Sinne eines Kompensationsmechanismus sogar bis auf das dreifache gesteigert (Minor, Myers et al. 1990).

### **1.5. Resistin-Idee**

Die Arbeitsgruppe um Kim konnte vor einigen Jahren eine eindrucksvolle Entdeckung in der Diabetesforschung machen. Die Gruppe stellte die Hypothese auf, dass eine Überexpression von blutzuckersteigernden Genen als Ursache des Diabetes mellitus in Fragen kommen würde. Um die Hypothese zu bestätigen suchte die Gruppe nun nach experimentellen Möglichkeiten, diese differentiell exprimierten Gene identifizieren zu können. Dabei kam Kim auf die Idee, dass bei Änderungen einer physiologischen Stellgröße im Organismus, wie z.B. Blutdruck oder Blutzucker, der Körper eigene Kompensationsmechanismen nutzt um diese Stellgröße wieder in ihren Soll Bereich zu verschieben. Er induzierte bei den Versuchstieren eine künstliche Hypoglykämie, um eine gesteigerte Expression gegenregulierender, blutzuckersteigernder Gene zu erzielen. Die Microarray-Technologie bot ihm dabei die Möglichkeit, genomweit alle gesteigert exprimierten Gene darstellen zu können. Unter den gefundenen aufregulierten Genen fand sich ein bisher unbekanntes, blutzuckersteigerndes Gen, das mittlerweile als resistin-Gen bekannt geworden ist (Kim K.H. et al., 2001). Auch bei der Erforschung der Pathogenese der essentiellen Hypertonie könnte man sich den Möglichkeiten aus der Diabetesforschung bedienen und neben den bekannten blutdruckregulierenden Systemen wie vegetatives Nervensystem, Katecholamine, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, oder ADH die Technologie der Microarrays nutzen, um eine genomweite Identifizierung blutdruckrelevanter Gene und der zugehörigen physiologischen Systeme zu ermöglichen.

## 1.6. Zielsetzung

Bisher konnten nur wenige solcher mit lediglich geringem Einfluss auf den Blutdruck behafteten Kandidatengene identifiziert werden. Dieses komplexe Expressionsprofil an Genen ist mit den herkömmlichen molekularbiologischen Verfahren bisher nicht fassbar gewesen. Durch die Microarrays ist man jedoch in der Lage, in einem einzigen Versuchsansatz eine Expressionsänderung mehrerer tausend Gene zu erfassen.

In der vorangegangenen Publikation von T. Westhoff, „A physiogenomic approach to study the regulation of blood pressure“, konnte die Identifizierung neuer differentiell exprimierter blutdruckregulierender Gene (Kandidatengene der essentiellen Hypertonie) unter Zuhilfenahme der neu entwickelten Microarray-Technologie erzielt werden. Dabei sollten über eine Analyse der zugehörigen Genprodukte neue blutdruckregulierende Systeme identifiziert werden. Als Hypothese wurde das Gedankenmodell von Kim auf den hier vorherrschenden Sachverhalt projiziert: als Antwort auf eine künstlich induzierte Hypotension im Rattenmodell sollten vermehrt Gene exprimiert werden, die dem Blutdruckabfall entgegenwirken. Dabei wurde eine signifikante Hypotonie induziert bzw. eine Abregulation der Kandidatengene erreicht, indem der systolische Blutdruck durch eine Blutentnahme um circa 30% gesenkt wurde. Die dabei nach null, eine, drei und sechs Stunden entnommene Niere wurde mittels Transkriptionsanalysen, den so genannten Microarrays, untersucht. Die Microarrays offenbarte adäquate Signale in zwölf cDNA-Proben. Zur Bestätigung der differentiellen Regulation der detektierten Gene und zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde im Anschluss an die Microarray-Analyse eine realtime-PCR (SYBR Green<sup>®</sup>) für die gefundenen Gene durchgeführt, in der wiederum die in cDNA umgeschriebene mRNA hypo- und normotensiver Ratten miteinander verglichen wurde. Neben einer Verifikation der Microarray-Ergebnisse lässt sich mit dieser Methode das Ausmaß der Expressionsänderung quantitativ erfassen. Acht von den 12 in der Microarray Analyse gefundenen Genen konnten in der realtime-PCR verifiziert werden. Von diesen acht Genen besaßen vier Gene eine Funktion im Herz Kreislaufsystem. In der vorliegenden Arbeit sind besonders zwei (XDH und Cytochrom P450 Oxidoreduktase) dieser letztgenannten vier Gene von besonderem Interesse, da sie in den Metabolismus reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) involviert sind. Diese beiden Gene und fünf weitere Gene (NOX1, NOX4, iNOS, eNOS, HO-1) die ebenfalls im ROS- Metabolismus eine entscheidende Rolle spielen wurden aus Gewebeproben der thorakalen Aorta und Niere in einem definierten Hypotoniemodell zu einer bestimmten Messpunktreihe auf Nukleinsäureebene mittels realtime PCR untersucht.

---

Des Weiteren wurden die zwei Gene (Xdh und Cytochrom P450 Oxidoreduktase (Por)), die in den Microarrays adäquate Signale gaben und in der rt-PCR Analysen signifikant aufreguliert waren auf Proteinebene untersucht mittels Western Blot, um so die Aufregulation der Gene qualitativ und semiquantitativ zu bestätigen. Die Kenntnis genetischer Marker der essentiellen Hypertonie ließe die Erstellung individueller Risikoprofile für Patienten zu, die für Diagnostik, Prävention sowie eine frühzeitige und effektive Therapie von Bedeutung sein könnte. Wie bereits dargestellt, lässt sich die essentielle Hypertonie bisher nicht auf eine Veränderung in einem der bekannten blutdruckregulierenden Systemen zurückführen, so dass das Vorhandensein noch unbekannter Regulationssysteme postuliert wird.

## 2. Material und Methoden

Das Tierversuchsvorhaben ist beim LAGETSI (*Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin*) von der Ethikkommission bewilligt worden.

### 2.1.Material rt-PCR und Western Blot

#### 2.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Bei den eingesetzten männlichen Versuchstieren handelt es sich um Wistar-Kyoto-Ratten, (*WKY*), die durchschnittlich 114 Tagen (*105-134 Tagen*) alt sind und ein durchschnittliches Körpergewicht von 257 g (*247 – 284 g*) haben. Die Ratten stammen von der Firma Charles River Laboratories (*Sulzfeld, Deutschland*).

Die Tiere werden in Kolonie in einem Tierstall ohne Fenster gehalten bei einer Raumtemperatur zwischen  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchte von 40 bis 70 %. Der Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden wird mittels eines Zeitschaltprogramms vorgegeben, wobei zwischen 6 Uhr und 18 Uhr eine Dauerbeleuchtung eingesetzt wurde. Entstaubte und entkeimte Weichholzfasern von der Firma Altromin (*Soest, Deutschland*) werden als Einstreu verwendet, das zweimal in der Woche gewechselt wird. Neben Trinkwasser und Trockenfutter (*Firma Altromin, Soest, Deutschland*), das ad libitum angeboten wird, steht zusätzlich dreimal pro Woche Obst und Körner zur Verfügung. Zwischen dem Tag der Anlieferung und dem ersten Tierversuch vergehen mindestens 5 Tage Akklimatisierungszeit. Die in vivo Versuche an WKY-Ratten wurde zwischen 6 Uhr und 18 Uhr durchgeführt. Die Nieren- und Aortenexplantation für die in vitro Versuche wurde zwischen 6 Uhr und 12 Uhr durchgeführt.

#### 2.1.2. Materialien für die rt-PCR und Western Blot

##### 2.1.2.1. Reaktionssets

PCR Master Mix

Promega/Madison/USA

- H<sub>2</sub>O
- RT Buffer
- RNAsin
- dNTP's, 10mM
- M-MLV-Reverse Transkriptase

BCA Protein Assay Kit

Pierce, Rockford/USA

- BCA Reagenz A

(Na-Carbonat, Na-Bicarbonat,BCA Reagenz,  
Na-Tartrat in 0,1 M Na OH)

- BCA Reagenz B (4% CuSO<sub>4</sub>)
- Albumin Standard Lösung 2mg/ml

KPL LumiGLO<sup>®</sup> Western Blot Kit

KPL Maryland/USA

- Detector Block Solution 5x
- Detector Block Powder
- Peroxidase-labeled Sekundäre Antikörper
- Waschlösung (20x)
- LumiGlo<sup>®</sup> Peroxidase Chemilumineszenz Lösung A
- LumiGlo<sup>®</sup> Peroxidase Chemilumineszenz Lösung A

### 2.1.2.2. Chemikalien und Biochemikalien

Trizol

Eppendorf

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Merck,Darmstadt/D

DEPC-H<sub>2</sub>O

Ethanol 75% und 100 %

Merck,Darmstadt/D

Chloroform (CHCl<sub>3</sub>)

Merck,Darmstadt/D

Isopropanol

Merck,Darmstadt/D

bidestiliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O)

Fluka,Buchs/CH

Random Hexamer *p(dN)<sub>6</sub>*

Promega/Madison/USA

Biotenylierte Proteinleiter (10-200 kD)

Cellsignal, Danvers/USA

Natriumchlorid (NaCl)

Merck, Darmstadt/D

Kaliumchlorid (KCl)

Merck, Darmstadt/D

Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Sigma, St.Louis/USA

Natriumhydrogenphosphat (Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Merck, Darmstadt/D

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Merck, Darmstadt/D

Tris HCl (Tris-hydroxymethyl-aminomethan-HCl)

Merck, Darmstadt/D

Tris Base (Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Base)

Merck, Darmstadt/D

Glycerol

Merck, Darmstadt/D

Bromphenolblau

Serva, Heidelberg

β-Mercaptoethanol

Invitrogen, Carlsbad/USA

Serva, Heidelberg

Glycin

Merck, Darmstadt/D



Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt/D
Triton X-100	Merck, Darmstadt/D
Methanol	Merck, Darmstadt/D
Complete Mini Proteaseinhibitor	Roche, Indianapolis/USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt/D
Tween 20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn/D
Stickstoff	Linde, Wiesbaden/D
Sodiumorthovanadat	Sigma, St.Louis/USA
Roti <sup>®</sup> -Blue	Roth-Karlsruhe/D
Ammoniumpersulfat (APS)	Life Technologies, Paisley/USA
Ponceau S Certistain <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt/D
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, St.Louis/USA
n-Butanol	Merck, Darmstadt/D

### 2.1.2.3. Farbstoff

SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City/USA
---------------------------	--

### 2.1.2.4. Antikörper

#### Polyklonale primäre Antikörper

Kaninchen anti Cytochrom P450 (EC 1.6.2.4, Por)	abcam Hiddenhausen/D
Monoklonaler Antikörper	
Maus anti Xanthin Oxidase	LAB Vision Warm Spring/USA

#### Monoklonaler primärer Antikörper

Maus anti β-actin	SantaCruz Biotechnology Heidelberg/D
-------------------	---

#### Sekundärer Antikörper (Peroxidase –labeled)

Anti-Kaninchen IgG (H+L)	KPL Maryland/USA
Anti-Maus IgG (H+L)	KPL Maryland/USA
Goat anti-Maus IgG HRP	SantaCruz Biotechnology Heidelberg/D

### 2.1.2.5. Primer

XDH	forward	5'-TCAAGAAATGGAAGGAGCCCT-3'	TibMolibol
	reverse	5'-TCTCCTGCTTTCTGTTGAGCG-3'	
POR	forward	5'-TCAGCAAGATCCAAACAACGG-3'	TibMolibol

	reverse	5'-CCACGAAGCTGCTCTCTTTGA-3'	
<i>NOX 1</i>	forward	5'-ATAGCTACTGCCACCCCAAGT-3'	Oligoservice
	reverse	5'-TTGAGTACCGCCGACAGCA-3'	
<i>NOX 4</i>	forward	5'-CACCAGATGTTGGGCCTAGG-3'	Oligoservice
	reverse	5'-GGATCAGGCTGCAGTTGAGG-3'	
<i>p22<sub>phox</sub></i>	forward	5'-CGCCATTGCCAGTGTGTGATCTA-3'	Oligoservice
	reverse	5'-CGCTCCTTGGGTTTAGGCTC-3'	
<i>inos</i>	forward	5'-TCACTGGGACTGCACAGAATG-3'	Oligoservice
	reverse	5'-TTGATCCTCACGTGCTGTGG-3'	
<i>enos</i>	forward	5'-TGCAGGTATTTGATGCTCGG-3'	Oligoservice
	reverse	5'-AGATTGCCTCGGTTTGTTC-3'	
<i>gp91<sub>phox</sub></i>	forward	5'-TAGCACTTCACACGGCCATTC-3'	Oligoservice
	reverse	5'-GTCCCGACTCTGGCATTCA-3'	
<i>Actb</i>	forward	5'-TAGCACTTCACACGGCCATTC-3'	Oligoservice
	reverse	5'-GTCCCGACTCTGGCATTCA-3'	

#### 2.1.2.6. Filterpapier, Membranen und Säulen

Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Einbeck/D
Filterpapier	Whatman International Maidstone/UK

#### 2.1.2.7. Puffer und Lösungen

##### Proteinaufreinigung:

Triton- Lysepuffer	50mM Tris HCl pH 7,5 50mM NaCl 5mM MgCl 0,1 % Triton X-100 1 Complete Mini (Proteaseinhibitor) 200 µl Sodiumorthovanadat
--------------------	--

##### SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese:

Ammoniumpersulfatlösung	10 % (w/v) APS in ddH <sub>2</sub> O
Comassie-Blau Lösung	20 ml Methanol p.A. 60 ml ddH <sub>2</sub> O

---

	20 ml Roti <sup>®</sup> -Blue (5x)
Comassie-Blau Entfärbelösung	100 ml Methanol p.A. 20 ml Essigsäure 280 ml ddH <sub>2</sub> O
Elektrophoreselaufpuffer	50mM Tris 380 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,625 M Tris HCl pH6,8
SDS-Lösung	10% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O
SDS Probenpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6, 8 4 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol 0,006 % (v/v) Bromphenolblau 1 % (v/v) β-Mercaptophenol
Trenngelpuffer	1, 5 M Tris HCl in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,8
<u>Western- Blot</u>	
Blockpuffer	0, 5 g Detector Block Puder 40 ml ddH <sub>2</sub> O 10 ml Detector Block Solution (5x)
Detektions Puffer	10 ml Detector Block Solution 50 ml ddH <sub>2</sub> O
Transferpuffer	10 ml Methanol p.A. 30 ml Elektrophoresepuffer 50 ml ddH <sub>2</sub> O
Waschpuffer	5 ml Wasch Lösung (20x) 95 ml ddH <sub>2</sub> O
LumiGlo <sup>®</sup> Chemiluminescent Substrate A	2 ml
LumiGlo <sup>®</sup> Chemiluminescent Substrate B	2 ml
<u>sonstige Puffer:</u>	

AP- Puffer (10x)	1M Tris-HCl 1M NaCl 25mM MgCl <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O pH 9,9
AP Puffer (5x)	1M Tris-HCl 1M NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O pH 9,5
PBS	140 mM NaCl 2 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4

**2.1.2.8. Verbrauchsmaterial**

Einwegsskalpelle	Rüttgers, Solingen/D
Fadenmaterial	Firma Johnson & Johnson,Noderstedt/D
Pipettenspitzen	Süd Laborbedarf, Gauting/D
Präparationsbesteck	FST, Foster City/USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg/D
0,5 ml	Eppendorf, Hamburg/D
1,5 ml, 2,0 ml	Falcon, Oxnard/USA
15 ml, 20 ml	VWR, Darmstadt/D
Schläuche	Braun Melsungen, Melsungen/D
Spritzen und Kanülen	AppliedBiosystems, Foster City/USA
96 Well PCR-Platte	BD Bioscience, Bedford/USA
Cover Slides BD Falcon CultureSlides	Roth, Karlsruhe/D
Deckgläser	

**2.1.2.9. Geräte und Laborhilfsmittel**

ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City/USA
Computer	Fujitsu Siemens,Compaq/HP
Homogenisator (Schradder)	Hugo Sachs, March-Hugstetten/D
OP-Tisch Größe 5 mit Heizung	LG, Seoul/Ko
Monitor	Bosch Stuttgart/D
Külschränke	

---

Gefrierschrank -80°C	Heraeus/Osterode/D
	Forma Scientific, Marietta/USA
-20° C	Liebherr, Biebach an der Riß/D
Nano Drop (ND-1000 Spectrophotometer)	NanoDrop Technologies, Wilmington/USA
Mastercycler	Eppendorf
Heating controller Typ 861	Hugo Sachs, March-Hugstetten/D
Analysewaage	Sartorius, Göttingen/D
Glaswaren (Kolben, pipetten etc.)	Brand, Wertheim/D
pH Messgeräte	Beckmann, Palo Alto/USA
pH-Messelektrode MI-410	Microelectrodes, Bedford/USA
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Homogenisator (Dispergiergerät)	Roth/Karlsruhe/D
Pipetten	Eppendorf
Rektalthermistor probe 2	Hugo Sachs, March-Hugstetten/D
Vortex	Roth/Karlsruhe/D
Zentrifugen	Heraeus/Osterode/D Sorvall, Newton/USA
Magnetrührer	IKA-Werk, Staufen in Breisgau/D
Gelgießapparatur (casting stand & frame)	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Glasplatten	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Elektrophoresekamm	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Röntgenfilmkassette mit Hyperfilm ECL	Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg/D
Curix 160 Apparatur	AGFA, Köln/D
Schüttler	New Brunswick Scientific, New Jersey/USA
Rotator	Rettenberg, Göttingen/D

Spektrophotometer

Thermo Scientific

**2.1.2.10. Software**

Adobe Acrobat 6.0 Professional

Adobe System Inc., San Jose/USA

MS Office 2003 Profession

Microsoft Corp., Redmond/USA

MS Explorer 6.0

Microsoft Corp., Redmond/USA

ABI Prism 7000 SDS Software

Applied, Biosystems,  
Foster City/USA

BCA Proteinbestimmungssoftware

Pierce, Rockford/USA

Adobe Photoshop 7.0

Adobe System Inc., San Jose/USA

Endnote 6.0

ISI ResearchSoft, Berkeley/USA

**2.2. Methoden****2.2.1. Intraarterielle Blutdruckmessung**

An den WKY-Ratten wurde zwischen 6.00 Uhr und 18.00 Uhr eine intraarterielle Blutdruckmessung durchgeführt. Durch eine intramuskuläre Injektion von Ketamin/Xylazin (80 bzw. 10 mg/kg) werden die Ratten anästhesiert und die Betäubung bedarfsgerecht durch wiederholte Injektion aufrechterhalten. Während des operativen Eingriffes wurde die Körpertemperatur der anästhesierten Ratten von 37 °C mittels eines beheizten Operationstisches aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wird durch einen Rektalthermistor kontinuierlich gemessen, der mit dem Beheizungssystem des Operationstisches rückgekoppelt und verbunden ist. Die Heiztemperatur des Tisches wird dementsprechend automatisch an die aktuelle rektal ermittelte Körpertemperatur angepasst.

Durch eine mediane Halsfasziotomie und anschließender Tracheotomie wird die Trachea freigelegt und ein 20 Gauge Polyethylenschlauch in die Trachea eingeführt. Der Tubus wird mit einem Faden fixiert. Danach wird die A. carotis communis sinistra unter Schonung des N. vagus und des Carotissinus frei präpariert. Die A. carotis wird im distalen Anteil abgesetzt und durch eine Ligatur verschlossen. Der proximale Anteil wird durch eine Mini-Gefäßklemme kurzzeitig abgedrückt. Eine kleine Inzision in der A. carotis ermöglicht das Einbringen eines Polyethylenschlauchs bis zum Übergang zur Aorta, der durch eine Ligatur fixiert wird. Dieser Polyethylenschlauch ist über einen Luer-Lok an einen mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllten Verbindungsschlauch angeschlossen, der über einen Drei-Wege-Hahn an den Druckaufnehmer angeschlossen wird. Der Druckaufnehmer wird auf exakter Herzhöhe

des Tieres genullt. Die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck werden digital über das Aufzeichnungs- und Auswerteprogramm HSE-Bdas kontinuierlich aufgezeichnet. Nach der operativen Positionierung des arteriellen Katheters wird eine Aufzeichnung des Blutdrucks über eine Äquilibrationszeit von 45 Minuten angefertigt. Anschließend konnten die Experimente zur Materialgewinnung stattfinden.

### **2.2.2. Materialgewinnung – Nieren- und Aortenexplantation**

Um eine akute Hypotension zu verursachen, wurden fünf Tieren zwischen 3 bis 5 ml Blut über einen zweiten arteriellen Zugang über die A. iliaca entnommen. Die normotensiven Kontrollratten wurden lediglich ventrikulär punktiert ohne dabei Blut zu entnehmen. Alle Arbeiten wurden in Ethernarkose durchgeführt. Der systolische Blutdruck wurde intraarteriell eine halbe Stunde vor Blutentnahme, unmittelbar nach der Blutentnahme sowie weitere drei, sechs und zwölf Stunden später gemessen und aufgezeichnet. Nach null, drei, sechs und zwölf Stunden nach der ventrikulären Punktion wurden die Nieren sowie die thorakalen Aorten präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung konserviert.

### **2.2.3. RNA-Isolierung über Trizol<sup>®</sup>**

#### **2.2.3.1. Grundlagen**

Die gebrauchsfertige patentierte Lösung Trizol<sup>®</sup> besteht aus Phenol und Guanidin-isothiocyanat, mit der Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben isoliert werden kann. Mit Trizol<sup>®</sup> konnte eine Vereinfachung und damit Verbesserung der von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski P., Sacchi N., 1987) entwickelten Methode zur RNA-Isolierung erzielt werden. Das Reagenz reißt Zellwände und -membranen auf und löst Zellkomponenten auf, wobei die RNA intakt bleibt.

#### **2.2.3.2. Durchführung**

Die entnommenen Organe (Niere und Aorta) wurden bei -80°C tiefgefroren. Durch die Trizol<sup>®</sup>-Methode konnte Gesamt-RNA isoliert werden. In ein mit 1 ml eisgekühltes Trizol gefülltes 2ml Tube wurden 75-80 mg Gewebe hinzugetan, um es dann zweimal 60 Sekunden mit dem Homogenisator auf Eis zu homogenisieren. Danach wurde die homogenisierte Probe

bei 12.000 Upm für 10 min bei 4°C zentrifugiert um die groben Partikelreste zu entfernen. Der zurückgebliebene abpipettierte Überstand wurde zur Separation der Phasen mit 200 µl Chloroform/1 ml Trizol<sup>®</sup> vermischt, für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 12.000 Upm erneut für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten zwei Phasen sichtbar gemacht werden, wobei sich in der oberen durchsichtigen Phase die RNA befand. Nachdem die obere Phase in ein neues Tube abpipettiert wurde, konnte die Probe nach Zugabe von 500 µl Isopropanol/1 ml Trizol<sup>®</sup> für 10 min bei Raumtemperatur gelagert werden. Danach wurde die RNA bei 12.000 Upm für 10 min bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückgebliebene Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (-20°C kaltem Ethanol/1 ml Trizol<sup>®</sup> 75%ig) gewaschen und bei 7.500 Upm für 5 min erneut bei 4°C zentrifugiert. Der hier beschriebene Vorgang der Waschung wurde nochmals wiederholt. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei 55° C in 3 min gelöst. Die gewonnene RNA wurde anschließend mit dem <sup>®</sup>ND-1000 Spectrophotometers zur Überprüfung der Reinheit und der Konzentration untersucht. Die RNA-Extinktionen wird bei 260 und 280 nm photometrisch vermessen. Der Extinktionswert bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt die Konzentration, der in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren unter der Vorgabe, dass ein OD-Wert von eins annähernd einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht. Der OD-Wert sollte zwischen 0,05 und 1,0 liegen, denn nur dann ist eine Linearität der Messung gegeben. Die Reinheit der in den Proben vorhandenen RNA wird mit der Quotientenbildung zwischen den Extinktionswerten bei 260 und 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) abgeschätzt. Werte zwischen 1,8 und 2,0 stehen für eine saubere RNA-Präparation. Wird DEPC-H<sub>2</sub>O als Lösemittel verwendet, ist die RNA auch bei einem Wert von 1,6 noch als rein anzusehen. Bei Werten, die unterhalb des genannten Reinheitswertes liegen, kann man von Protein- und/oder Trizol<sup>®</sup>-Kontaminationen ausgehen, die eine genaue Bestimmung der RNA-Konzentration sehr erschweren. Berechnung der RNA-Konzentration:

$$OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} : 1\ 000 = \text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

## 2.2.4. Reverse Transkription

### 2.2.4.1. Übersicht

Retroviren, eukaryontischen RNA-Viren, enthalten eine RNA- abhängige DNA- Polymerase, die sog. Reverse Transkriptase. Retroviren (z. B. HIV) nutzen dieses Enzym, um in der Wirtszelle bei Infektionen die Virus- RNA zu transkribieren, so dass ein RNA-DNA-Hybrid entsteht. Dieser Schritt ist essenziell, um das Virus zu vermehren. Durch die RNase-H-



Aktivität des natürlichen Enzyms kann dann der RNA-Strang aus dem Hybrid entfernt und der verbliebene DNA-Einzelstrang repliziert werden. Auf diese Weise wird ein doppelsträngiges DNA-Molekül synthetisiert. Die reverse Transkriptase wird vor allem in der Gentechnologie eingesetzt, um aus RNA-Strängen DNA herzustellen. Diese Technik wird als reverse Transkription bezeichnet. In den hier durchgeführten Versuchen wurde die M-MLV-Reverse Transkriptase von Promega verwendet. Bei dem Enzym handelt es sich um eine Mutante der Reversen Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia Virus*, bei der durch eine Aminosäuresubstitution die RNase-H-Aktivität eliminiert wurde. Das führt dazu, dass im Vergleich zur reversen Transkriptase mit RNase-Aktivität, eine höhere Prozentzahl an cDNA mit voller Länge synthetisiert wird. Die hier verwendeten eukaryontischen mRNAs besitzen Poly(A)-Schwänze, so dass man Oligo(dT) der Reversen Transkriptase als Primer nutzen kann. Von diesem Primer wird ein zur mRNA komplementärer DNA-Strang, sog. cDNA, in 5' → 3'-Richtung synthetisiert.

#### **2.2.4.2. Reverse Transkription (RT) Durchführung**

Eine etablierte Arbeitsvorschrift diente als Basis für die hier durchgeführte Reaktion. Das Pipetieren erfolgte in RNase-freier Umgebung. Die einzelnen Komponenten waren 4 °C kalt. Pro Ansatz wurden 30 µl RT-MasterMix (7,5µl H<sub>2</sub>O + 15 µl 5 x RT-Buffer + 0,75 µl RNAsin+ 3,75 µl dNTP's, 10 mM+ 3 ,0 µl M-MLV-RT) zusammengestellt. 6 µg Gesamt-RNA werden mit 6 µl sequenzunspezifischen Random Hexameren ( $(p(dN))_6$ ,  $c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) nach Herstellerangaben versetzt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 45 µl aufgefüllt. Nach 5 minütiger Denaturierung der Probe bei 70°C werden jeweils 30 µl des RT-MasterMixes hinzugefügt und alles für die Dauer von einer Stunde bei 37°C im Eppendorf Mastercycler inkubiert. Anschließend läuft ein zehnminütiger Heizschritt von 95°C ab, der die Reverse Transkriptase inaktiviert und somit die Reaktion beendet. Die dabei entstandene cDNA wurde im Anschluss im Verhältnis 1:4 mit Wasser verdünnt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.2.5. Polymerasekettenreaktion**

##### **2.2.5.1. Grundlagen**

###### **2.2.5.1.1. Überblick**

1985 wurde die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) von Kary B. Mullis entdeckt. Acht Jahre später erhielt er für seine Erfindung sogar den Nobelpreis für

Chemie (Mullis K.B., Faloona F.A., 1987). Immer häufiger wird die rt-PCR auch für Routineuntersuchungen verwendet, da die Reagenzien immer günstiger werden und eine stetige Vereinfachung und Automatisierung einzelner Teilschritte ermöglicht wurde. Die PCR Methode ist ein *in vitro* Verfahren zur gezielten Vermehrung eines bestimmten DNA-Genomfragmentes, das zwischen zwei Loci mit bekannter Nukleotidsequenz liegt. Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung (*Amplifikation*) sehr geringer Nukleinsäuremengen aus den unterschiedlichsten Materialien. Im folgendem werden die einzelnen Schritte der PCR beschrieben: *Denaturierung*-> Die doppelsträngige DNA (*dsDNA*) wird bei 93°C- 95°C denaturiert. *Annealing*-> Am 5`- und 3`-Ende des zu amplifizierenden Bereichs lagern sich spezifische Oligonukleotide, die Primer, an. *Elongation* -> Die Oligonukleotide werden durch die DNA-abhängigen DNAPolymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate (*dNTPs*) verlängert. Der entstandene DNA-Doppelstrang wird durch die DNA-Polymerase so lange verlängert bis die Reaktion unterbrochen wird oder die Bindung zwischen DNA und DNA-Polymerase gelöst wird. Diese Lösung kann z.B. durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95°C verbunden mit einer wiederholten Denaturierung der dsDNA erfolgen. Kühlt man den Reaktionsansatz auf 40 bis 60°C herunter, so binden die freien Oligonukleotide, in Abhängigkeit ihres mittleren Schmelzwertes (*Tm-Wertes*), an die komplementäre Sequenz der DNA-Matrize. Der Vorgang kann nun wiederholt werden und es kann eine erneute Synthese eines weiteren Doppelstranges durchgeführt werden. Die Abfolge der einzelnen PCR- Schritte wird als Zyklus bezeichnet. Bis zu 25- 40 Mal werden die Zyklen wiederholt. RNA kann erst dann in der PCR amplifiziert werden, wenn sie vorher mit dem Enzym Reverse Transkriptase (*RNA-abhängige-DNA-Polymerase*) in eine komplementäre DNA umgeschrieben worden ist, da RNA nicht als Matrize für die Polymerase geeignet ist. Die entstehenden RNA-DNA-Heteroduplexe dienen als Ausgangsmatrize für eine Amplifikation mittels PCR. In der Reversen Transkription kann man Oligo-dT-Primer, Hexamere oder spezifische Primer verwenden („*spezifisches Priming*“). Die Oligo-dT-Primer sind kurze Nukleotide, die ausschließlich aus der Base Thymin bestehen. Sie binden an den Poly-A-Schwanz von zellulären mRNAs und ermöglichen so eine gezielte Amplifikation der mRNAs.

#### **2.2.5.1.2. Primer**

Primer sind synthetisch hergestellte, kleine, einzelsträngige Oligonukleotide. Der Primer ist eine Spiegelbildkopie eines spezifischen Abschnitts aus der nachzuweisenden DNA-Sequenz. Meistens besteht er aus 18- 24 Basenpaaren. Für die PCR Methode ist er obligat notwendig,

da er Startpunkt der Synthese der Polymerase ist. Primer sollten komplementär zum 5'- bzw. zum 3'-Ende der Zielstränge sein, wobei sie den zu vermehrenden Bereich nicht nur am Beginn der Replikation markieren sondern auch das Ende der Replikationsregion begrenzen. Die Primer lagern sich bei einem PCR-Nachweis während der Annealingphase über Wasserstoff-rückenbindungen an den nachzuweisenden DNA-Einzelstrang an, was als Hybridisierung bezeichnet wird. Die zu suchende DNA-Sequenz wird anschließend so oft vervielfältigt, bis eine analytisch messbare Menge vorhanden ist. Nicht nur die Struktur und Sequenz eines Primers sind von größter Wichtigkeit, sondern auch die Primerkonzentration kann erheblichen Einfluss auf die Ausbeute der PCR-Reaktion haben. Primer werden relativ zur Menge der Ziel-DNA im Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben, daraus folgt nämlich, dass sich die beiden Zielstränge präferiert mit den Primern hybridisieren, als dass es zu einem *Reannealing* der beiden Stränge kommt.

#### **2.2.5.1.3. Thermocycler**

Unter dem Thermocycler versteht man ein Gerät, das die Temperatuzyklen der einzelnen PCR Schritte selbständig durchführt. Die Thermocycler werden im Gegensatz zu früher, wo viele PCR Schritte noch nicht automatisiert waren, immer moderner und fortschrittlicher. Es gibt Geräte, in denen die Gefäße in einem Metallblock stehen, der zyklisch aufgeheizt und abgekühlt wird und die einzelnen Schritte vollständig automatisch ablaufen. Wieder andere Geräte arbeiten mit drei separaten Metallblocks und erfordern ein automatisches Umsetzen der Gefäße. Der moderne Cyler benutzt als Wärmeübertragungsmittel Luft, außerdem werden Glaskapillaren verwendet, so dass man während der Reaktion die Produktbildung spektroskopisch verfolgen kann und die Analysezeiten stark verkürzt ist. Ein Cyler sollte akkurate und reproduzierbare Inkubationstemperaturen des PCR-Zyklus nicht nur ansteuern sondern auch halten und so wenig wie möglich Variationen der Temperatur zeigen. Außerdem sollte die Zeit zwischen den drei Inkubationszeiten des PCR-Zyklus (*ramping-time*) möglichst kurz sein.

#### **2.2.5.1.4. Thermoprofil**

Eine optimale Zykluszahl beläuft sich auf 25-40 Mal. Bei hohen Zykluszahlen und vordringen in den Plateaubereich der PCR-Reaktion kommt es in diesem Bereich nicht nur zur starken Abnahme der Neusynthese, sondern auch zu verstärkten Fehlhybridisierungen.

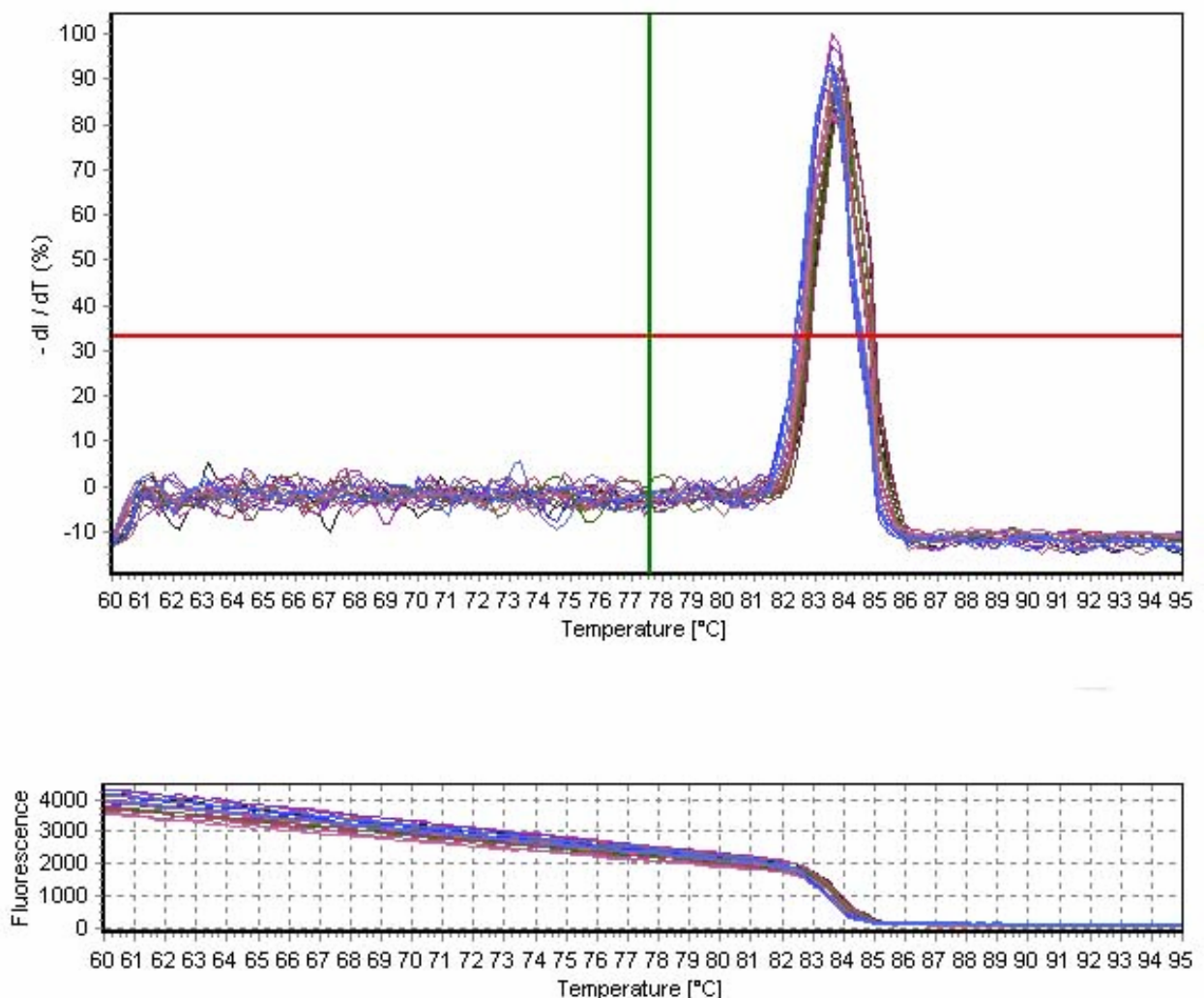
Bei 95°C wird die dsDNA durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt, auch Denaturierung genannt (Trennung des DNA-Doppelstranges). Vor dem ersten Zyklus der PCR liegt die DNA in einer noch recht komplexen hochmolekularen Struktur vor, so dass eine Initiale einmalige Denaturierungstemperatur von 95°C für ein bis fünf Minuten gewählt wird. Je weniger DNA denaturiert wird, desto geringer fällt die Annealing-Effizienz der Primer aus. Da bei der Denaturierung, die schon ab 70°C beginnt, auch viele andere Komponenten der Reaktion zerstört werden, muss die Denaturierungszeit so kurz wie möglich gehalten werden. Bei modernen Thermocyclern reichen daher Zeiten von 10 bis 30 Sekunden. Das Anlagern der Primer Annealing (Anlagerung), über Wasserstoffbrückenbindungen, an den jeweiligen komplementären Strang erfolgt bei primerspezifischen Schmelztemperaturen ( $T_m$ ), in der Regel aber zwischen 40°C und 65°C. Unter Schmelztemperatur versteht man diejenige Temperatur, bei der die Helixstruktur (zwischen Primer und Zielstrang) zur Hälfte verloren gegangen ist. Die Annealingtemperatur sollte in der Regel 5 bis 10°C niedriger gewählt werden. Für fast alle PCR-Reaktionen muss die Annealingtemperatur empirisch optimiert werden. Bei der Elongation (Verlängerung des Stranges) dienen Primer als Startpunkte für die DNA-Polymerase, die ihr bestimmtes Temperaturoptimum für die Elongation benötigen. Die Elongationszeit sollte der Größe des erwarteten Amplifikats angepasst werden. Nach dem letzten Zyklus wird oft ein zusätzlicher 5 bis 15 minütiger Elongationsschritt bei 72°C angehängt, um nur partiell verlängerte Produkte zu vervollständigen.

#### **2.2.5.1.5. SYBR Green®**

Die realtime-PCR Systeme basieren auf der Detektion und Quantifizierung eines fluoreszierenden Reporters. Das Reportersignal ist direkt proportional mit der Menge an gebildetem PCR Produkt. SYBR® Green ist ein DNA spezifischer, interkalierender Farbstoff, der bei Anregung durch energiereiches UV-Licht, Licht im sichtbaren energieärmeren Wellenlängenbereich (Fluoreszenz) emittiert. Mit zunehmender Menge an PCR Produkt nimmt die beobachtete Fluoreszenz zu. Die Interkalierung des Farbstoffs in die dsDNA macht eine extrem verstärkte Lichtemission möglich. Die Vorteile des Farbstoffes sind, dass es preisgünstig und sensitiv ist, eine universelle Verwendbarkeit hat und einfach zu verwenden ist, da mit ihm prinzipiell jede PCR verfolgt werden kann (Bustin S.A., 2000). Die Nachteile sind z.B. das der Farbstoff nicht nur an dem korrektem Produkt bindet, sondern auch an Artefakt wie z.B. Primerdimer, die somit auch zu einem unspezifischen Anstieg der Fluoreszenz auch in negativen Proben führen (Vandesompele J. et al., 2002). Eine klare

Differenzierung zwischen Primerdimer bzw. Artefakt und Zielfragment ist daher zwingend notwendig (Vandesompele J. et al., 2002). Um dem entgegen zu wirken wurde bei den interkalierenden Farbstoffen die Schmelzpunktanalyse eingeführt. Am Ende der eigentlichen PCR wird eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wird dabei in 1°C-Schritten von 50°C auf 95°C erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Der Punkt, an dem dsDNA schmilzt, ist durch einen Abfall (Peak) der Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes gekennzeichnet, da der interkalierende Farbstoff von der einzelsträngigen DNA dissoziiert. Wenn die PCR optimal eingestellt ist, sollte ein Schmelzpunktpeak zu erwarten sein, der spitz zuläuft. Dieser Schmelzpunkt stellt das spezifische, zu erwartende Produkt dar. Unterschiedlich große Produkte und Produkte anderer Sequenz haben unterschiedliche Schmelzpunkte.

Abbildung 2: Schmelzpunktanalyse des verwendeten  $\beta$ -Actins (*actb3*)



### 2.2.5.1.6. Auswertung

Die realtime-PCR (rt-PCR) lässt eine zeitgleiche Auswertung der Reaktion während des eigentlichen Amplifikationsprozesses zu. Die in der rt-PCR gemessenen, emittierten Fluoreszenzen eines Farbstoffs dienen als Basis für die Auswertung. Emittierte Fluoreszenz und entstehendes Amplifikat sind linear proportional, so dass die Verhältnismäßigkeit über die Messung der Fluoreszenz auf die entstehende Menge an Produkt geschlossen werden kann. Zwei Auswertungsmöglichkeiten kann man bei den rt-PCR-Systemen unterscheiden: Die Endpunktmessung und die Echtzeitmessung. Bei allen zurzeit erhältlichen Geräten wird eine Endpunktmessung durchgeführt, die die Fluoreszenzwerte der Probe zu Beginn und am Ende misst (bei einigen Geräte auch einmal in der Mitte der Zyklenanzahl). Somit kann nur eine qualitative Aussage (Ja/Nein-Aussage) gemacht werden, da nur ein Anstieg der Fluoreszenz während der PCR-Reaktion ermittelt wird. Ergebnisse während des Amplifikationsprozesses und eine Quantifizierung kann man hier nicht erzielen. Die Echtzeitmessung misst dagegen die Fluoreszenz während jedes einzelnen Zyklus. Welcher Zyklusschritt (Annealing- oder Elongationsschritt) als Zeitpunkt der Messung definiert werden, ist von der Sondenart abhängig. Betrachtet man nun eine PCR Expressionskurve so kann man feststellen, dass beim Start der Reaktion die Fluoreszenzwerte nicht gleich Null sind. Auslöser sind zum einen die eingesetzten Farbstoffe, die auch ohne Reaktion eine gewisse Grundfluoreszenz aufweisen, zum anderen sind auch verwendete Materialien daran beteiligt, wie z.B. Plastikreaktionsgefäße, die bei Anregung eine gewisse Hintergrundfluoreszenz haben. Bei einer negativen quantitativen rt-PCR verbleibt die gemessene Fluoreszenz unter dem Schwellenwert und verläuft in einer geraden Linie bis zum Ende. Bei einer positiven Reaktion kommt es zur Amplifikation des Produkts und damit zum Anstieg der Fluoreszenz im Laufe der Reaktion. Vor dem Fluoreszenzanstieg verbleibt die gemessene Fluoreszenz für eine gewisse Anzahl an Zyklen unverändert und verläuft als gerade parallel zur Abszisse. Dieser Bereich wird Basislinie genannt. In diesem Bereich der PCR sind die entstehenden Produktmengen so gering, dass es noch nicht zum Anstieg der Fluoreszenz kommt. Im Bereich der Basislinie kommt es immer zu vereinzelt Schwankungen in der gemessenen Fluoreszenz. Diese beruht auf Schwankungen der Fluoreszenz in der Probe. Der Punkt ab dem eine gemessene Fluoreszenz einer Probe klar von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden ist und als positiv zu werten ist, wird als Schwellenwert bezeichnet (Threshold). An diesem Punkt findet die Unterscheidung zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz statt. Er wird definiert als die Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz gemessen zwischen Zyklus

3 und 15 multipliziert mit dem Faktor 10. Der Schnittpunkt zwischen der Fluoreszenz und dem Schwellenwert projiziert auf die Abszisse wird als Cycle-threshold (CT) bezeichnet und stellt den niedrigsten messbaren positiven Wert einer quantitativen rt-PCR dar und gibt also eine Zyklenanzahl an. Er steht in direkter Beziehung zur Ausgangsmenge der eingesetzten DNA. Je höher der CT-Wert ist, desto kleiner ist die Ausgangsmenge an DNA und umgekehrt. Der CT-Wert ermöglicht somit die Quantifizierung einer Reaktion.

#### **2.2.5.1.7. Relative Quantifizierung**

Bei der relativen Quantifizierung handelt es sich um eine häufig genutzte Methode, die die Veränderungen in einem im Gleichgewicht befindlichen System erfasst und für die Genexpressionsstudien eine adäquate Quantifizierungsmethode darstellt. Diese Art von Quantifizierung beruht auf dem Vergleich des Verhältnisses der DNA/RNA Menge einer zu untersuchenden Probe mit einer Probe mit bekanntem DANN/RNA Gehalt. Da in diesem Fall nur ein Verhältnis beider Proben zueinander berechnet wird (Bustin S.A., 2000) braucht man weder die Konzentration der Zielsequenz, noch muss eine Standardkurve mit bekannter Konzentration erstellt werden. Die Bestimmung der unbekanntem Menge bezeichnet man als semiquantitativ, da die Menge nur bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz, abgeschätzt wird. Es gibt zwei Arten der Berechnung der relativen Menge:

Die Standardkurven- Methode und die  $\Delta\Delta CT$ -Methode (Livak K.J., Schmittgen T.D, 2001). Bei beiden Methoden wird neben der eigentlichen Zielsequenz auch eine „endogene Kontrolle“ (Referenzgen) benötigt, die mit amplifiziert wird. Diese endogene Kontrolle wird Housekeeping Gene genannt. Es ist eine aktive Referenz – eine Normalisierung womit die Menge an Ziel-RNA im Verhältnis zu der insgesamt in der Probe vorhandenen RNA gesetzt wird. Als endogene Kontrolle sollten Gene verwendet werden, die ubiquitär und in einer konstanten Menge in den verwendeten Zellen vorkommen wie z.B.  $\beta$ -Actin, 18s rRNA oder GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase).

Vergleicht man die unterschiedlichen Housekeeping Gene, so konnte man zeigen, dass es zu einer unterschiedlichen Expression von Housekeeping Genen in Zellen kommen kann (Bustin S.A., 2000). Die Verwendung z.B. von GAPDH ist kritisch zu betrachten.  $\beta$ -Actin stellt womöglich die beste Option dar. 1. Berechnung mittels Standardkurven -Methode:

In der rt-PCR werden neben den zu untersuchenden Proben auch serielle Verdünnungen eines Housekeeping Gens und eines der Zielsequenz ähnlichen Standards zur Bestimmung der PCR-Effizienz mit analysiert. Genaue Konzentrationen müssen nicht bekannt sein. Ist die Effizienz der PCR-Reaktion von Standard und Housekeeping Gen gleich, so ist es

ausreichend, für die weiteren Berechnungen nur die Standardkurve des Housekeeping Gens heranzuziehen. Danach werden die CT-Werte für die zu untersuchenden Proben 1 und 2 gegen die ermittelten Housekeeping Gen-CT-Werte „normalisiert“. Im dritten und letzten Schritt wird der resultierende niedrigere Wert als Kalibrator festgesetzt und gleich 1 gesetzt. So ergibt sich eine Relation beider Proben zu einander.

2. Bei der zweiten Methode können die CT-Werte direkt miteinander verglichen werden; dazu benötigt man keine Standardkurve. Diese Berechnungsform wird als  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode bezeichnet (Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001). Grundlage hierfür ist eine gleiche Effizienz der Housekeeping Gen-PCR und der Zielsequenz-PCR.

### 2.2.5.2. Arbeitsschritte

Die nach der Reversen Transkription erhaltene und danach verdünnte cDNA wird in die Vertiefung einer 96-well PCR-Platte pipetiert, dabei werden in jedes Well 4  $\mu\text{l}$  reinpipetiert. Danach werden noch 21  $\mu\text{l}$ /Well des Master-Mixes hinzupipetiert, so dass 25  $\mu\text{l}$  pro Well Gesamtvolumen enthalten sind. In dem Master Mix sind enthalten 12,5  $\mu\text{l}$  SYBR®-Green, ein Vorwärts-Primer (1,5  $\mu\text{l}$ ), ein Rückwärts-Primer (1,5  $\mu\text{l}$ ) sowie 5,5  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O. Die Platte wurde anschließend abzentrifugiert und zur Messung im ABI Prism® 7000 Sequence Detection System gelegt. Nach dem 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C folgten 40 Zyklen von jeweils einminütiger Denaturierung bei 95°C und Extension bei 60°C. Jede Probe wurde aus technischen Gründen als Triplikat aufgetragen und analysiert.  $\beta$ -Actin (actb3) diente als Housekeeping Gen. Mit Hilfe des Programms ABI Prism® 7000 SDS Software wurden die so erhaltenen Daten ausgewertet. Hierbei wurden alle Parameter gemäß der Voreinstellung übernommen und der CT-Wert wurde über die Funktion auto-CT ermittelt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.

#### 1. Schritt: für jede Probe wurde der $\Delta\text{CT}$ -Wert berechnet:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Kandidatengen}} - \text{CT}_{\beta\text{-Actin}}$$

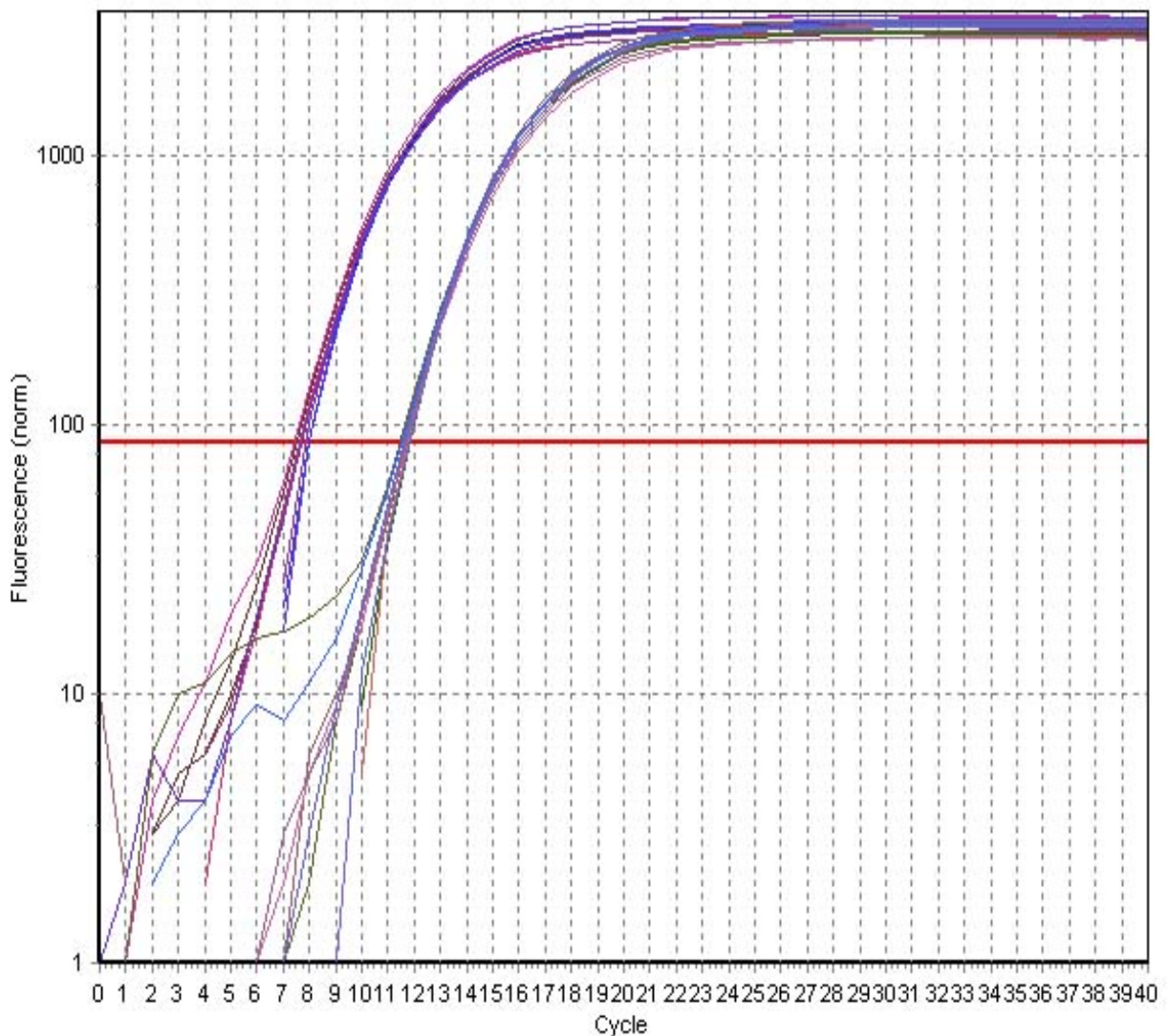
#### 2. Schritt: basierend auf Schritt 1 wurde der $\Delta\Delta\text{CT}$ bestimmt:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Behandlung}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrolle}}$$

#### 3. Schritt: die relative Transkriptionshäufigkeit wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Relative Transkriptionshäufigkeit} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$



*Abbildung 3: Genexpressionskurve eines rt-PCR-Laufes als Beispiel*

## 2.2.6. Western Blot

### 2.2.6.1. Grundlagen

#### 2.2.6.1.1. Proteinisolation

Die entnommenen Organe (thorakale Aorta und Niere) werden aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$  KÜhlschrank auf flüssigen Stickstoff gelegt und während der ganzen Proteinisolation auf Eis gehalten bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Danach wird die aortale Gewebeprobe gänzlich mit 0,5 ml Lysepuffer versetzt. Von der

Nierenprobe wurden 70-75 mg entnommen und ebenfalls mit 0,5 ml Triton Lysepuffer versetzt. Jede Probe wird mit dem Homogenisator zerkleinert und danach zurück erneut in den Stickstoff gelegt. Die nun wieder gefrorenen Proben werden aus dem Stickstoff auf das Eis gelegt und aufgetaut. Nach erfolgter Auftauung der Proben auf Eis werden die Proben 3x für 2 min ins Ultraschallbad gelegt. Zwischen den Schritten werden die Proben jeweils 2 min auf Eis abgekühlt. Durch die Ultraschallwellen möchte man einen Aufschluss der Zellen bewirken. Anschließend werden die Proben bei 4°C und 2800 Upm für 15-20 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sind zwei Phasen sichtbar geworden. Die obere helle Phase wird in ein neues 2 ml Tube umpipetiert. Das übrig gebliebene trübe Sediment wird verworfen. Die Zentrifugation wird bei gleichen Bedingungen wiederholt und die helle obere Phase wird anschließend wieder umpipetiert und bis zur anschließenden BCA Proteinbestimmung auf Eis (4°C) gelegt.

#### **2.2.6.1.2. BCA-Proteinbestimmung**

BCA-Methode (Smith et al., 1985)

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA-Protein Assay-Kit durchgeführt. Das Kit enthält neben den Lösungen A (BCA) und B (4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) das Rinder-Serum-Albumin (BSA). Durch die Proteine wird im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, woraufhin die Bichinolin-4-carbonsäure mit  $\text{Cu}^+$  reagiert und zwei Bichinolinsäure-Moleküle einen Chelatkomplex mit dem  $\text{Cu}^+$ -Ion eingehen, der dadurch intensiv purpurgefärbt wird. Die zu untersuchenden Proben wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 200  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wurde, versetzt. Dabei wurden pro Probe drei Verdünnungsreihen hergestellt (1:5, 1:10 und 1:20) um so eine höhere Wahrscheinlichkeit zu erreichen, dass die Werte im Absorbionsmessbereich der Eichreihe liegen. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 562 nm im Spectrophotometer gemessen. Anhand einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) bekannter Konzentrationen konnte die unbekannte Proteinkonzentration der zu testenden Probe bestimmt werden.

#### **2.2.6.1.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

In 10 %igen diskontinuierlichen SDS Polyacrylamidgelen können Proteine nach der Methode von Laemmli durch vertikale Plattenelektrophorese analysiert werden. Dabei wird ein kleinporiges Trenngel von einem großporigen Sammelgel überschichtet. Als

Elektrophoresepuffer dient ein Tris-Glycin Puffer. Neben den Proteinen wandern auch Chloridionen des Sammelgels, jedoch mit einer höheren Geschwindigkeit, desweiteren wandern auch Glycin- Ionen des Elektrophoresepuffers durch das Sammelgel, die sind jedoch langsamer in ihrer Wanderung als die Proteine. Durch die unterschiedlich schnelle Wanderung im Sammelgel werden die Proteine in enge Banden fokussiert. Erreichen die Proteine nun das Trenngel, das nicht nur kleinporiger ist sondern auch eine höhere Salzkonzentration aufweist sowie einen höheren pH-Wert als das Sammelgel, so befinden sich nun die Glycin- Ionen an vorderster Wanderungsfront und die Proteine werden nun nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Mittels einer mitlaufenden, biotyniliert Proteinleiter, werden 10 Banden bzw. Markerproteine in einem definiertem Größenbereich zwischen 10 – 200 kD angezeigt, so dass das Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine an den einzelnen Banden ermittelt werden konnte. Nach abgeschlossener Proteinauftrennung wurde das Gel ggf. mit Coomassie –blau gefärbt oder direkt durch den Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran übertragen.

#### **2.2.6.1.4. Probenvorbereitung**

Um die bestmöglichen Ergebnisse im Western Blot zu erzielen wurden die einzelnen Schritte mehrmals optimiert und etabliert in der Arbeitsgruppe. Bei einem zehn-well Gel war eine Proteinkonzentration der Probe (Niere und thorakale Aorta) von 30µg/µl pro Well nötig, so dass die Proben so verdünnt worden, dass die Gesamtfüllmenge eines Wells von 10 µl nicht überschritten wurde. Die Proteine wurden bevor sie in das Gel aufgetragen wurden mit 2x SDS-Probenpuffer 1:1 verdünnt und für 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert und dadurch hitzedenaturiert. Zusätzlich wurde die biotyniliert Proteinleiter in einem Verhältnis von 1:19 mit 2x SDS Probenpuffer verdünnt und in den weiteren Schritten wie die Proben behandelt. Nach Erhitzung erfolgte noch eine 5 minütige Zentrifugation der Proben und der Proteinleiter bei 13000 rpm und 4°C. Da der SDS Probenpuffer eine anionische Eigenschaft besitzt, wurde die Eigenladung der Proteine so effektiv bedeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstanden sind (ca.1,4 g SDS pro g Protein), wodurch die Proteine in Richtung Anode wandern. Das auch im Puffer enthaltene β-Mercaptophenol, ein niedermolekulares Thiol, verursacht eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Proteinen.

### 2.2.6.1.5. Herstellung von Polyacrylamidgele

Zwischen zwei Glasplatten, die vorher mit Alkohol gesäubert wurden und dann in die Gelgießapparatur eingespannt wurden, wird zunächst das Trenngel, eingegossen, welches zur luftangrenzenden Seite mit H<sub>2</sub>O gesättigtem n- Butanol überschichtet wurde um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erhalten. Das n-Butanol wurde dann, nach vollständiger Polymerisation des Trenngels mit ddH<sub>2</sub>O entfernt und mit der Sammelgellösung ersetzt. Um nun die Geltasche in das Sammelgel zu kriegen, verwendet man einen mehrzinkigen, 0,75 mm dicken Elektrophoresekamm, den man in das noch flüssige Sammelgel eintaucht und dort bis zur vollständigen Polymerisation des Sammelgels belässt und erst danach entfernt und die Taschen mit ddH<sub>2</sub>O ausspült. Anschließend wird das fertige Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die danach mit Elektrophoreselaufpuffer bis zur Markierung befüllt wird. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in den ersten zehn Minuten bei 150 V und dann bei weiteren 90-100 min. bei 100 V. Die genauen Zeiten des zweiten Zyklus richten sich aber auch nach der Durchwanderung des SDS Puffer und des Bromphenolblaus, die durch ihre farbliche Eigenschaft die Durchwanderungsstrecke im Gel optisch sichtbar machen können. Nach der Elektrophorese wird das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und zwischen den Platten entfernt und wird entweder mit Coomassie Blau angefärbt, in Transferpuffer äquilibriert oder gleich im Anschluss geblottet. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

*Tabelle 3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele*

<b><i>Substanzen</i></b>	<b><i>Trenngel 10%ig</i></b>	<b><i>Sammelgel 5%ig</i></b>
Acrylamid/Bis (37,5% w/v)	10 ml	3,3 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 ml
dH <sub>2</sub> O	11,9 ml	13,7 ml
SDS (10%w/v)	0,3 ml	0,2 ml
Ammoniumpersulfat (10%w/v)	0,12 ml	0,12 ml
TEMED	0,04 ml	0,04 ml

### 2.2.6.1.6. Coomassie Blau Färbung

Die in dem Gel enthaltenen aufgetrennten Proteine können mit dem Farbstoff Roti®-Blue, eine 5 fach konzentrierte kolloidale Coomassie Brilliant Blau G- 250 Lösung, irreversibel

fixiert und gefärbt werden. Die 1x Lösung wird durch 60 ml H<sub>2</sub>O, 20 ml Methanol und 20 ml 5-fach Färbelösung gebrauchsfertig angerührt. Die Gele werden für 8-12 Stunden in der Färbung belassen und anschließend für einige Stunden in der Coomassie Blau Entfärbelösung inkubiert. Ein Nachweis mit Coomassie Blau Färbung wird erst ab einer Proteinkonzentration von 0,1 -2 µg pro Bande möglich.

#### **2.2.6.1.7. Western Blot**

Beim Western-Blotting werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm; Schleicher& Schuell, Einbeck/D) per Elektrotransfer überführt und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert. Eine Halbtrockenzelle von Bio Rad mit Platinedelstahl- Elektrode (Trans- Blot SD Semi Dry Transfer cell) wird als Blotkammer verwendet. Vor Beginn des Transfers wird das Gel, die Filterpapiere 4 x 3MM Whatman- Papier (Whatman International Ltd., Maidstone, England) und die PVDF Membran für 15 min in den Transferpuffer gelegt. Zuvor werden Filterpapier und Nitrozellulosemembran auf die Gelgröße zugeschnitten. Die Membran wird außerdem vorher noch mit Methanol p.A. befeuchtet und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Der Transfer findet bei 4°C statt, je ccm Gelfläche wurden 3 mA Strom angelegt und es wurde für 50 min geblotet. Das Blot-Sandwich ist von oben nach unten in folgender Reihenfolge aufgebaut:

Anodengitter –Gitterschwamm-Whatman Filterpapier- Nitrozellulosemembran-SDS-Gel-Whatman-Filterpapier-Gitterschwamm-Kathodengitter

#### **2.2.6.1.8. Ponceaurot Färbung**

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF Membran kann zur Kontrolle eines erfolgreichen Proteintransfers die Membran mittels reversibler Färbung mit Ponceaurot angefärbt werden. War das Blotten erfolgreich, so sind die Proteinbanden sichtbar. Detektiert werden Proteine ab einer Größe von 50 ng. Der überflüssige Farbstoff wird mit Wasser entfernt.

#### **2.2.6.1.9. Immundetektion membrangebundener Proteine**

Nach Immobilisierung der Proteine an der Membran können sie durch eine antikörpervermittelte Enzymreaktion nachgewiesen werden. Zuerst erfolgt die Bindung eines spezifischen Antikörpers an das immobilisierte Zielprotein (Antigen). Durch ein Enzymgekoppelten anti- Spezies- IgG Antikörper und Zugabe eines Substrat-Chromogen

Gemisches kann der Antigen- Antikörper Komplex optisch sichtbar gemacht werden. Nach Bedarf kann die Membran in unterschiedlich breite Streifen geschnitten werden um so unterschiedliche Proteine per Immundetektion parallel untersuchen zu können. Bevor die Membran mit den primären Antikörpern benetzt werden kann muss sie für eine Stunde bei RT oder über Nacht, unter schwenkenden Bewegungen in der 1x Detector Block Lösung aus dem KPL LumiGLO® Western Blot Kit (KPL Maryland/USA ) inkubiert werden, dadurch wird ein absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen erreicht. Danach werden die Membran, bzw. die einzelnen Membranschnitte bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern benetzt. Zuvor wurden die Antikörper für monoklonal Maus anti XO im Verhältnis 1:500 und der polyklonale Kaninchen anti Cytochrom P450 im Verhältnis 1:1000 mit der 1x Detector Block Lösung vermischt. Auch der Maus anti  $\beta$ -Actin wurde vorher im Verhältnis 1:1000 mit der 1x Detector Block Lösung vermischt. Im Anschluss an die erste Antikörperbenetzung wird die Membran 3 x 5 min. und 1 x 10 min. mit der 1x Waschlösung aus dem KPL LumiGLO® Western Blot Kit (KPL Maryland/USA) gewaschen. Der zweite Antikörper, der zuvor in einem Verhältnis für anti- Mause- IgG 1:1000 und anti-Kaninchen- IgG 1:5000 mit der 1x Conjugate Lösung aus dem KPL LumiGLO® Western Blot Kit vermischt wurde, wird bei RT für 1 Stunde inkubiert. Neben der Zugabe der Zweitantikörper wird hier auch der Anti biotin Ziegen IgG hinzugegeben, der mit den Proteinen der Proteinleiter binden soll und diese damit später sichtbar erscheinen lässt. Der bereits beschriebene Waschvorgang wird wiederholt. Die Membran wurde nun 1 min an der Luft getrocknet. In der nachstehenden Tabelle sind die primären und sekundären Antikörper mit ihrer spezifischen Verdünnung genauer beschrieben.

*Tabelle 4: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper*

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>
anti Cytochrom P450 ((EC 1.6.2.4, Por))	Kaninchen	1:1000
anti Xanthin Oxidase	Maus	1:500
Anti $\beta$ -ctin	Maus	1:1000
<b>Sekundäre Antikörper</b>	Meerrettichperoxidase-konjugiert	
anti-Rabbit IgG (H+L)	Kaninchen	1:5000
anti-Mouse IgG (H+L)	Maus	1:1000
anti-biotin IgG	Ziege	1:1000

**2.2.6.1.10. Chemilumineszenz- Reaktion mit dem KPL LumiGLO® Western Blot Kit**

Die hier verwendeten sekundären Antikörper sind Meerrettichperoxidase markiert, das hat zur Folge, dass nach Zugabe der LumiGlo® Lösung aus dem LumiGlo® Western Blot Kit (KPL Maryland/USA), die vorher durch Mischung der LumiGlo® -Substanz A und B im Verhältnis 1:1 entstanden ist, diese durch die Peroxidase oxidiert wird und damit chemiluminimetrisch gemessen werden kann. Die Membran wird zwei Minuten mit der LumiGlo® Lösung benetzt (2ml/pro Proteingel) und anschließend in eine Frischhaltefolie verpackt. Die Membran wurde dann in die Röntgen Film Kassette mit einem Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg/D) gelegt. Der Film wurde zwischen 5 min und 16 Stunden belichtet und danach in einer Curix 160- Apparatur (AGFA, Köln/D) entwickelt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Veränderungen des systolischen Blutdrucks

Der systolische Blutdruck wurde durch die Blutentnahme um circa 30% gesenkt. Das erforderliche Blutvolumen lag bei 3 ml und wurde in vorangegangenen Experimenten für die vorliegenden 240 bis 250 g schweren Versuchstieren ermittelt. Die Senkung des systolischen Blutdrucks, ausgelöst durch die Blutentnahme, war signifikant ( $p < 0,05$ ) und betrug  $31 \pm 5\%$  des maximalen systolischen Blutdrucks ( $n = 5$ ).

Bei den nach sechs Stunden entnommenen Organen (Niere, thorakale Aorta), hatte sich der systolische Blutdruck bei den Tieren mit Blutentnahme zwar wieder auf  $87 \pm 2\%$  des Ausgangswertes stabilisiert, lag jedoch immer noch signifikant ( $p < 0,05$ ) unter dem der normovolämischen Kontrollgruppe. Bei den nach zwölf Stunden entnommenen Organen lag der Blutdruck im Verhältnis zu der normovolämischen Kontrollgruppe zwar noch darunter aber zeigte keine Signifikanz mehr. Die Herzfrequenz verhielt sich äquivalent dazu, d.h. dass die Frequenz durch nach induzierter Hypotonie nach drei und sechs Stunden signifikant erhöht war im Vergleich zum Ausgangswert. Die Frequenz war nach zwölf Stunden annähernd wieder bei dem Ausgangswert und nicht mehr signifikant erhöht.



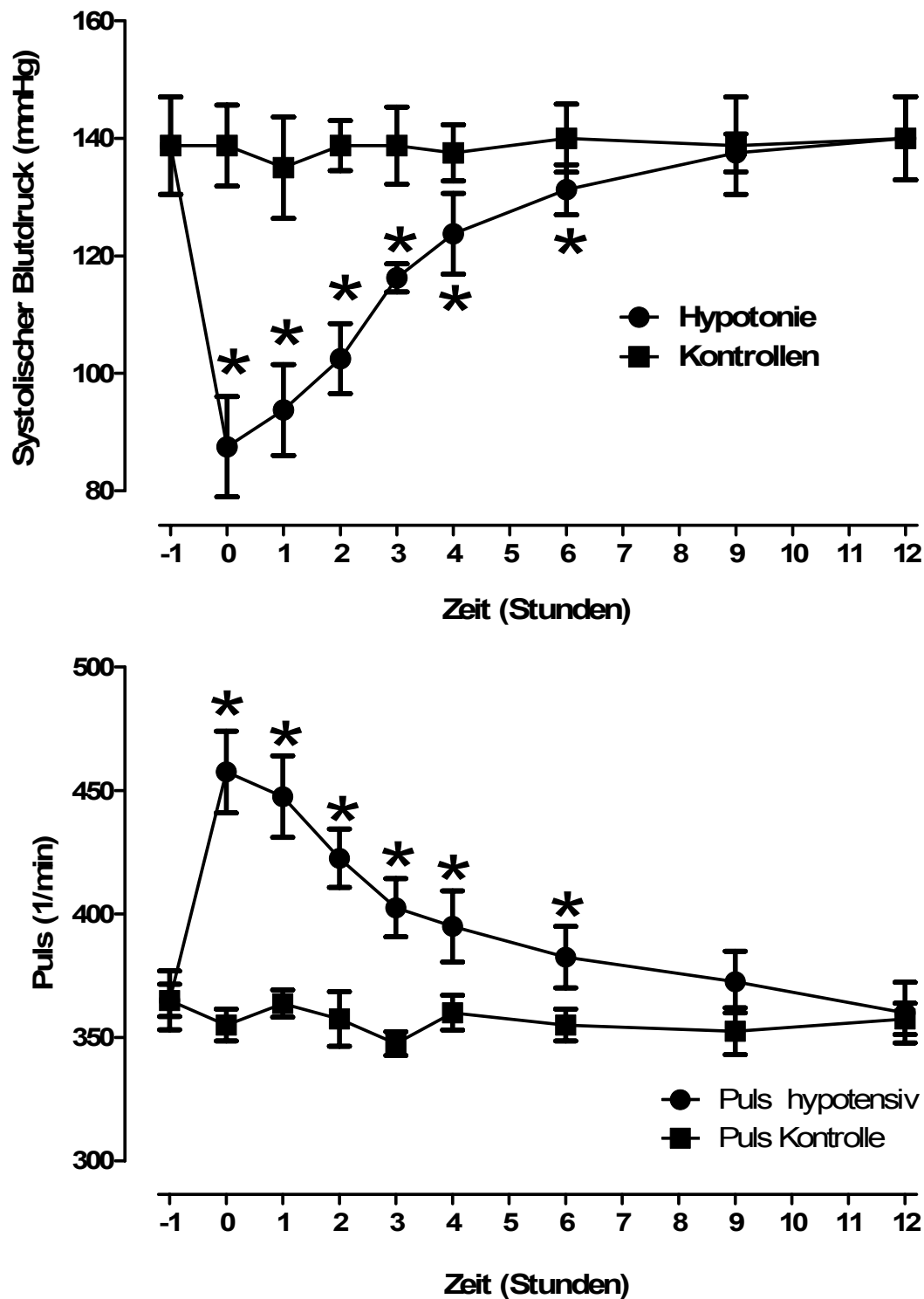


Abbildung 4: Hypotensive Tiere und normotensive Kontrolltiere werden anhand ihres systolischen Blutdruckes und ihrer Herzfrequenz verglichen. Die Blutdruckmessungen wurde 1 Stunde vor sowie zum Zeitpunkt der Blutentnahme 0 h und nochmals nach weiteren 3h, 6 h. und 12 h durchgeführt.

\* $p < 0,05$ , signifikante Blutdruckdifferenz von den hypotensiven Tieren gegenüber den Kontrolltieren ( $n = 5$ ).

## 3.2. Ergebnisse der Western Blot und realtime-PCR

### 3.2.1. Real- Time PCR

Für die PCR wurde die bei der Reversen Transkription erzeugte cDNA verwendet. Es wurde die Menge an cDNA der Gene für XDH, Cytochrom P450 (EC 1.6.2.4, Por) , NOX 1, NOX 4, iNOS, eNOS und HO- 1 in dem entnommenen Gewebe Niere und thorakale Aorta bestimmt, die eine Aussage darüber erlauben, wie viel mRNA für das jeweilige Gen in der Probe enthalten war. Das Gen, welches für  $\beta$ -Actin kodiert, dient in diesem Zusammenhang als so genanntes „housekeeping Enzym“ und wird definitionsgemäß in der immer gleichen Menge exprimiert. Als endogene Kontrolle liefert es eine Aussage darüber, wie erfolgreich die RT verlaufen ist und wie viel cDNA in den einzelnen Proben jeweils vorhanden war, bzw. wie das Verhältnis von Ziel RNA zu der insgesamt in der Probe vorhandenen RNA Menge war.

Zur Berechnung der relativen Transkriptionshäufigkeit wurde die  $\Delta\Delta CT$  -Methode angewandt (Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001). Als Grundlage dient die gleiche Effizienz der Real- Time PCR von housekeeping Gen und von der Zielsequenz.

angewandte Formel: **Relative Transkriptionshäufigkeit =  $2^{-\Delta\Delta CT}$**

### 3.2.1.1. Real- Time PCR Ergebnisse XDH Niere und Aorta

Nachfolgend sind die Real- Time PCR Ergebnisse der Xanthindehydrogenase dargestellt für die Gewebeproben Aorta und Niere. Auch hier kann eine immer größer werdende Menge an Xdh in beiden Gewebeproben verzeichnet werden.

Bei dem Vergleich der beiden Gewebeproben untereinander wird eine stärkere Aufregulation der Xdh in der Niere im Verhältnis zur Aorta verzeichnet.

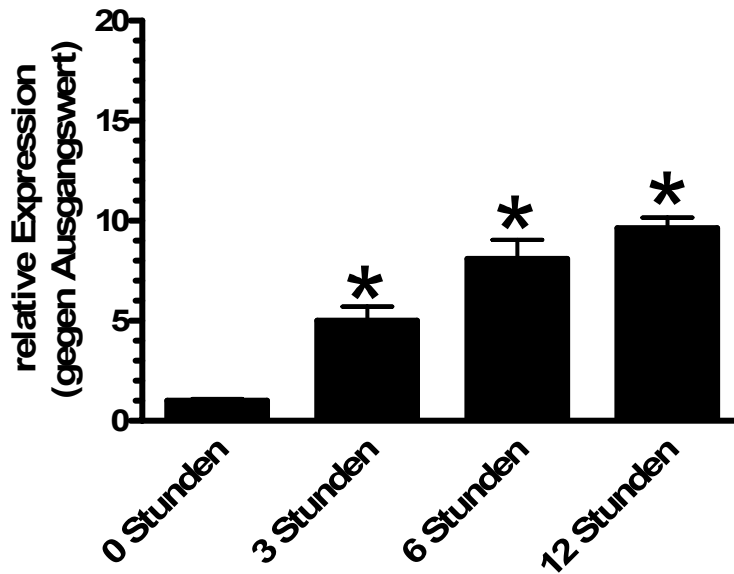


Abbildung 5: Auswertung der Real- Time PCR von XDH in der Aorta.

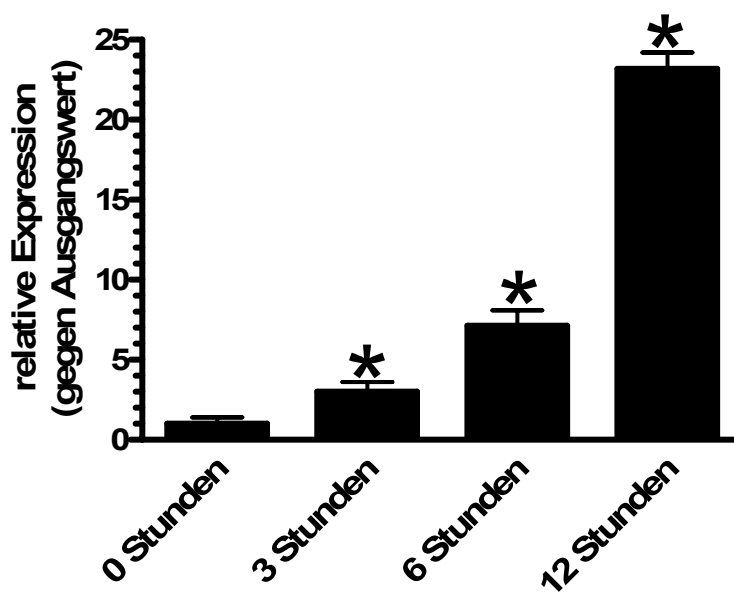


Abbildung 6: Auswertung der Real- Time PCR von XDH in der Niere.

### 3.2.1.2. Real- Time PCR Ergebnisse Cytochrom P450 (EC1.6.2.4, Por) Niere und Aorta

Nachfolgend sind die Real- Time PCR Ergebnisse des Cytochrom P 450 (EC 1.6.2.4, Por) dargestellt für die Gewebeprobe Aorta und Niere. Auch hier kann eine immer größer werdende Menge an Por in der Nierengewebeprobe verzeichnet werden.

Bei dem Vergleich der beiden Gewebeprobe untereinander wird eine stärkere Aufregulation des Por in der Niere im Verhältnis zur Aorta detektiert.

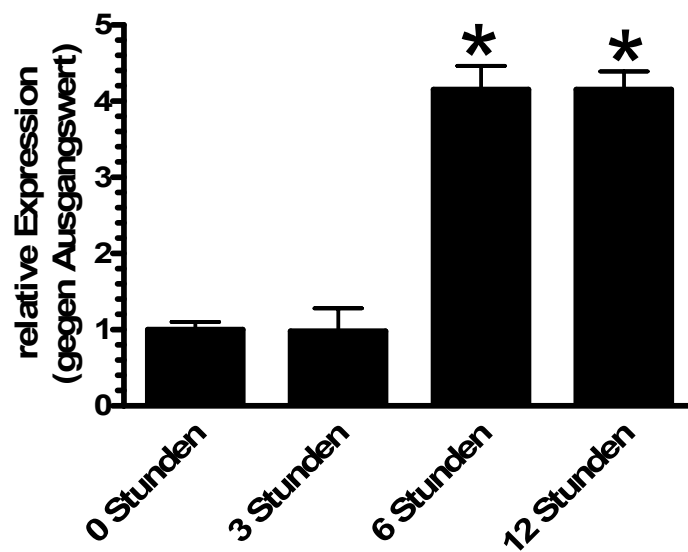


Abbildung 7: Auswertung der Real- Time PCR von Por in der Aorta

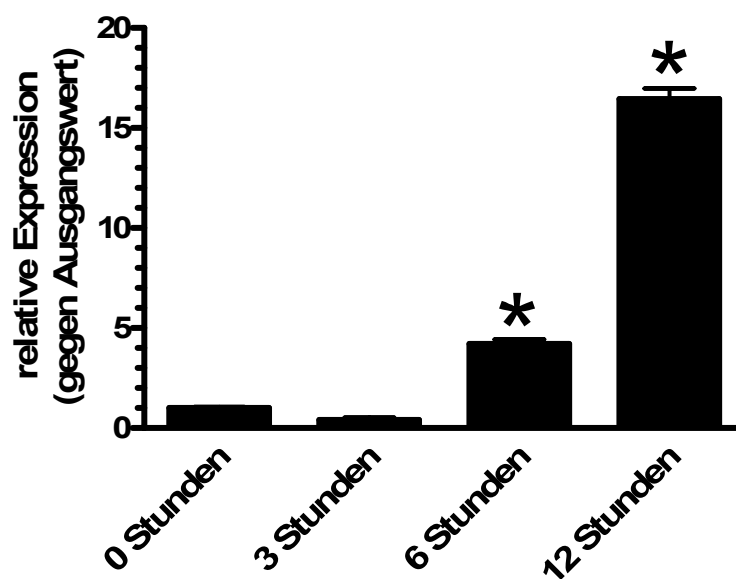


Abbildung 8: Auswertung der Real- Time PCR von Por in der Niere

### 3.2.1.3. Real- Time PCR Ergebnisse NOX 1 Niere und Aorta

Die realtime- PCR Ergebnisse der Aorta und Niere für NOX1 sind nachfolgend dargestellt. Auch hier kann eine immer größer werdende Menge an NOX 1 in der Nierengewebeprobe verzeichnet werden. Bei dem Vergleich der beiden Gewebeprobe untereinander ist eine Abregulation der NOX 1 im Aortengewebe zu erkennen. Anders verhält es sich in der Niere, wo insgesamt eine Aufregulation der NOX 1 zu erkennen ist, die allerdings im Vergleich zur XDH und Cytochrom P450 schwächer ausgebildet ist.

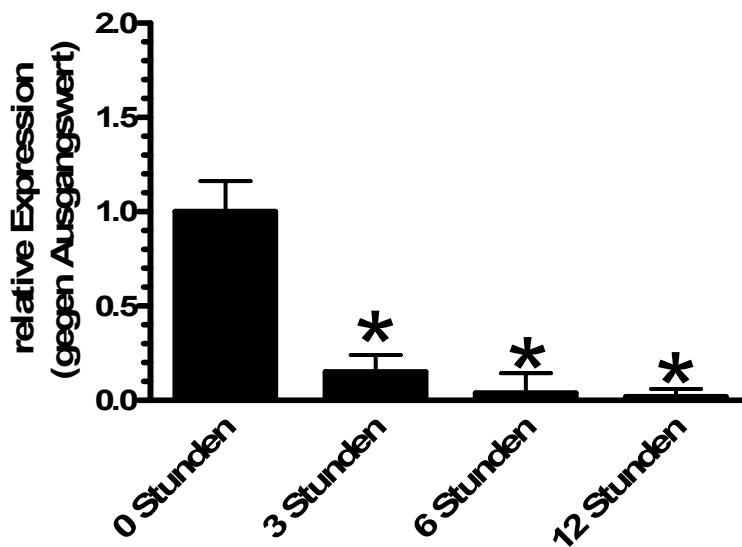


Abbildung 9: Auswertung der Real- Time PCR NOX 1 in der Aorta

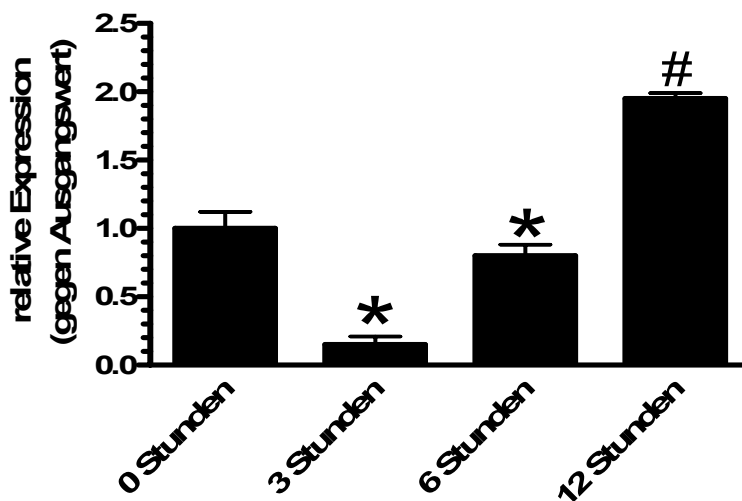


Abbildung 10: Auswertung der Real- Time PCR NOX 1 in der Niere

### 3.2.1.4. Real- Time PCR Ergebnisse NOX 4 Niere und Aorta

Die realtime- PCR Ergebnisse der Aorta und Niere für NOX4 sind nachfolgend dargestellt. Im aortalen Gewebe wird die NOX 4 insgesamt betrachtet abreguliert, scheint aber 12 Stunden nach der Hypotonieinduktion wieder eine Aufregulation in Richtung Ausgangswert (0h) zu erfahren. Im renalen Gewebe nimmt die Konzentration der NOX 4, gemessen zum Zeitpunkt 3h und 6 h, im Verhältnis zum Ausgangswert Wert leicht ab. Die Messung nach zwölf Stunden zeigt eine Aufregulation.

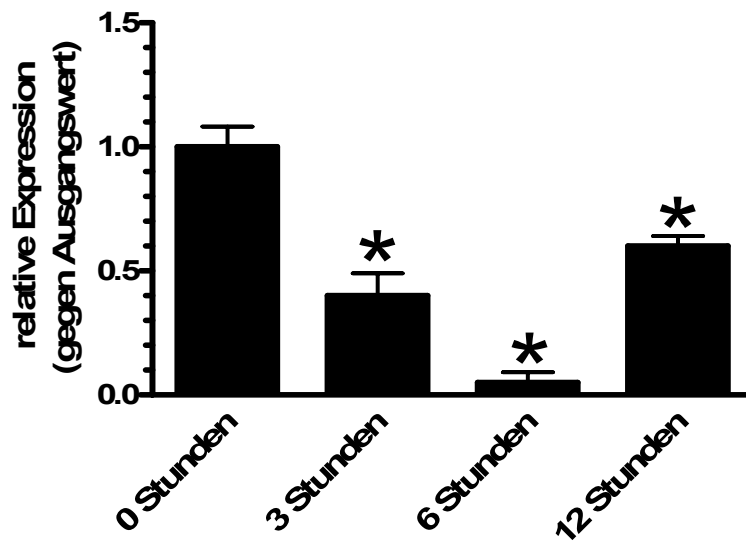


Abbildung 11: Auswertung der Real- Time PCR NOX 4 in der Aorta

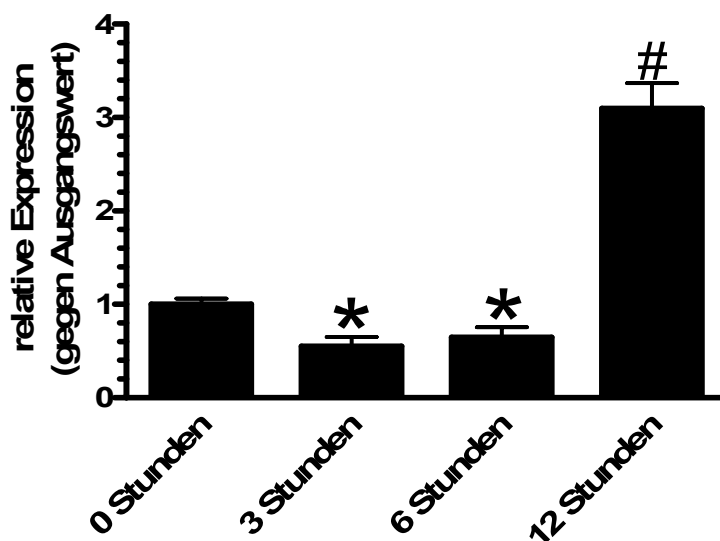


Abbildung 12: Auswertung der Real- Time PCR NOX 4 in der Niere

### 3.2.1.5. Real- Time PCR Ergebnisse iNOS Niere und Aorta

Die realtime- PCR Ergebnisse der Aorta und Niere für iNOS sind nachfolgend dargestellt. Im aortalen Gewebe wird die iNOS insgesamt betrachtet abreguliert, scheint aber in der 12 Stunden Messung wieder eine Aufregulation in Richtung Ausgangswert zu erfahren. Im renalen Gewebe nimmt die Konzentration der iNOS zu allen Messzeiten zu.

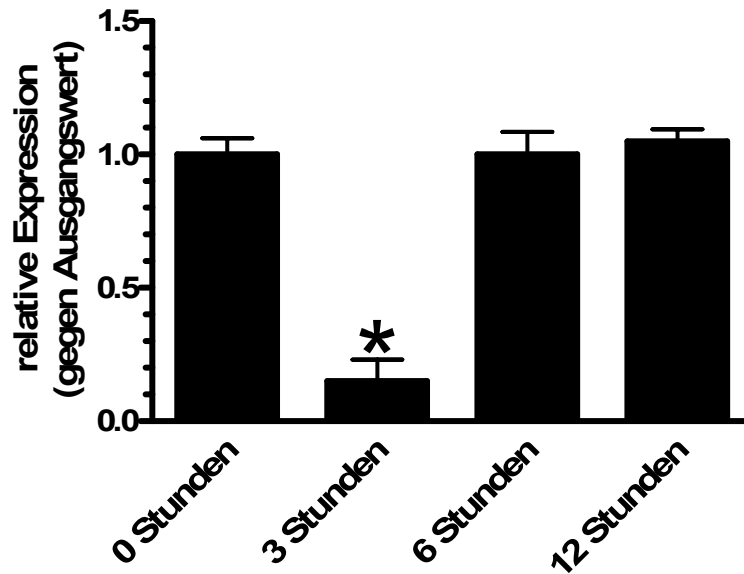


Abbildung 13: Auswertung der Real- Time PCR iNOS in der Aorta

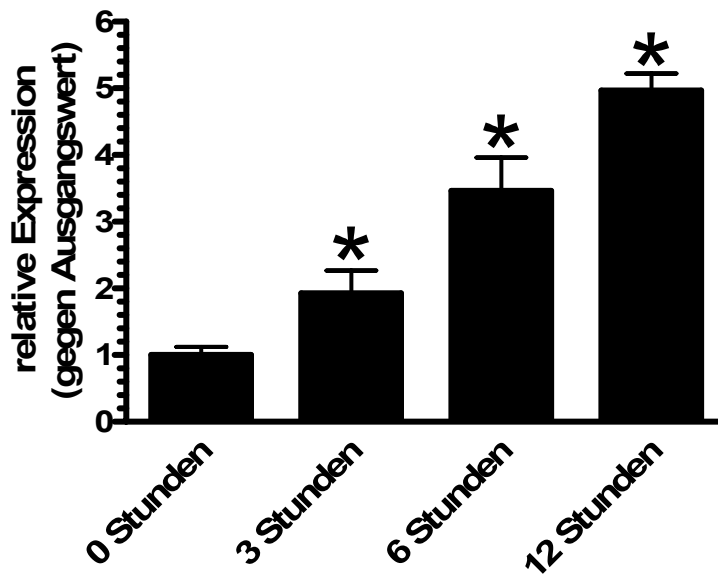


Abbildung 14: Auswertung der Real- Time PCR iNOS in der Niere

### 3.2.1.6. Real- Time PCR Ergebnisse eNOS Niere und Aorta

Die Real- Time PCR Ergebnisse der Aorta und Niere für eNOS sind nachfolgend dargestellt. In beiden Gewebeprobe n wird die eNOS abreguliert. Im renalen Gewebe nimmt die Konzentration der eNOS vor allem nach drei Stunden stark ab und steigt bis zur zwölften Stunde fast wieder zu ihrer Ausgangskonzentration 0h an.

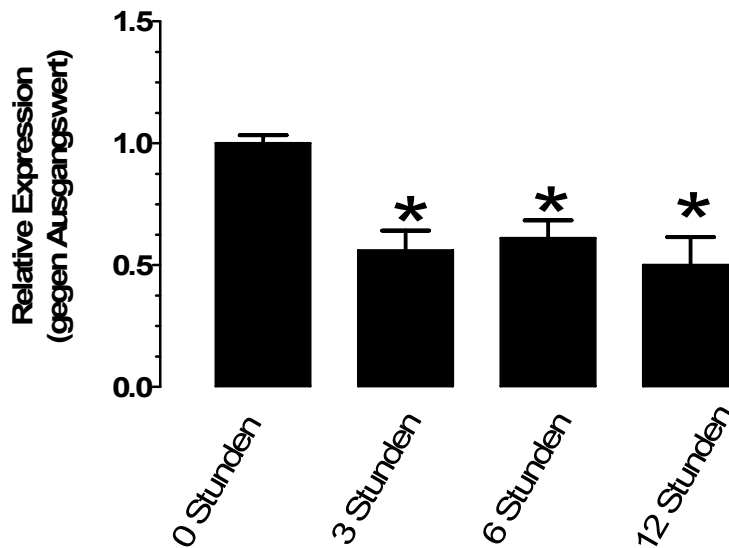


Abbildung 15: Auswertung der Real- Time PCR eNOS in der Aorta

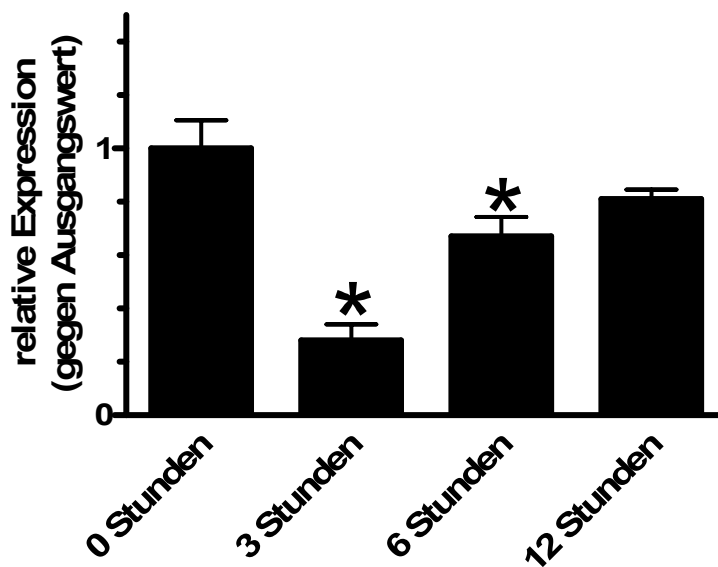


Abbildung 16: Auswertung der Real- Time PCR eNOS in der Niere



### 3.2.1.7. Real- Time PCR Ergebnisse HO- 1 Niere und Aorta

Die Real- Time PCR Ergebnisse für Aorta und Niere der HO- 1 sind nachfolgend dargestellt. In beiden Gewebeproben ist ein Anstieg der relativen Transkriptionshäufigkeit zu erkennen. Im renalen Gewebe nimmt die Konzentration des HO-1 Transkriptionsproduktes stärker zu als im Verhältnis zu den aortalen Gewebeproben.

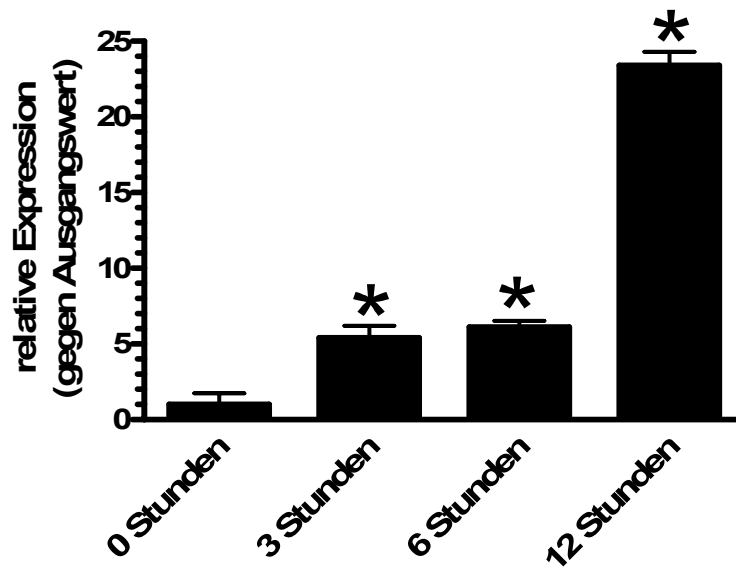


Abbildung 17: Auswertung der Real- Time PCR HO-1 in der Aorta

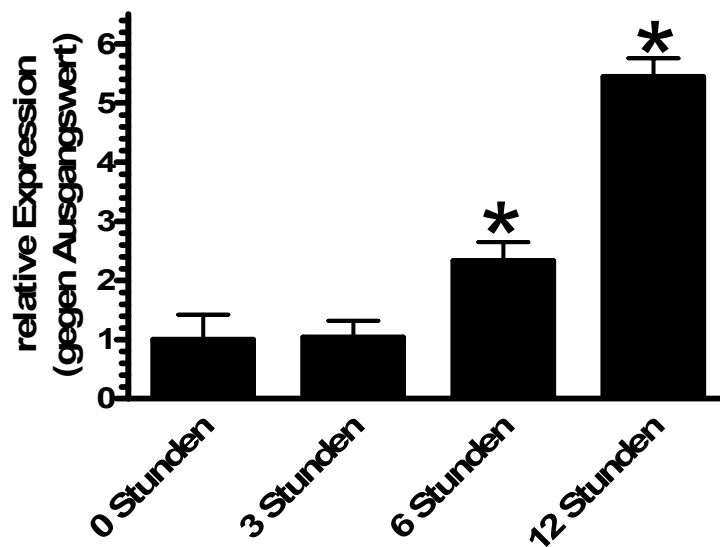


Abbildung 18: Auswertung der Real- Time PCR HO-1 in der Niere

### 3.2.1.8. Real- Time PCR Ergebnisse im Vergleich

Um eine Vergleichbarkeit der relativen Transkriptionshäufigkeit der einzelnen Gene, bezogen auf die unterschiedlichen Messzeitpunkte, zu erzielen, wurden aus den jeweiligen Tiergruppen, ein Durchschnittswert der relativen Transkriptionshäufigkeit berechnet, der in der nachfolgenden Tabelle für jedes einzelne Gen dargestellt ist.

*Tabelle 5: Durchschnittswerte der relativen Transkriptionshäufigkeit einzelner Gene*

#### *Aorta*

<b>relative Transkriptionshäufigkeiten</b>	XDH	Por	NOX 1	NOX4	iNOS	eNOS	HO1
<b>Tiere</b>							
0h	1	1	1	1	1	1	1
3h	5,01	0,91	0,15	0,4	0,15	0,56	5,4
6h	8,09	4,15	0,04	0,05	1	0,61	6,11
12h	9,63	4,15	0,02	0,6	1,05	0,5	23,4

*Tabelle 6: Durchschnittswerte der relativen Transkriptionshäufigkeit einzelner Gene*

#### *Niere*

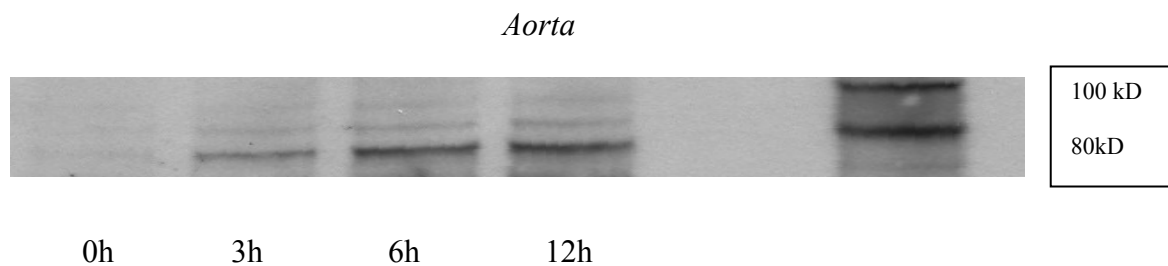
<b>relative Transkriptionshäufigkeiten</b>	XDH	Por	NOX 1	NOX4	iNOS	eNOS	HO1
<b>Tiere</b>							
0h	1	1	1	1	1	1	1
3h	3,02	0,4	0,15	0,55	1,93	0,28	1,04
6h	7,14	4,21	0,8	0,65	3,46	0,67	2,33
12h	23,17	16,44	1,95	3,1	4,97	0,81	5,44

### 3.2.2. Western Blot

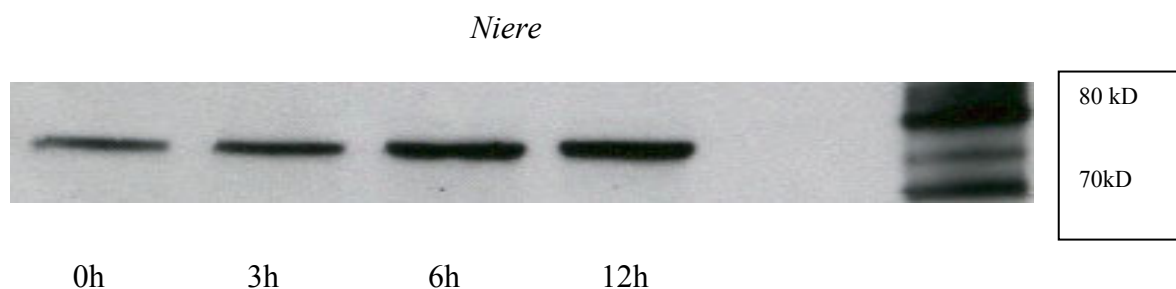
Zur Bestätigung der Ergebnisse aus der Real Time PCR wurde als semiquantitatives Nachweisverfahren der Western Blot eingesetzt für die XDH und Cytochrom P450. Mit dieser Methode kann die Aktivität der XDH und des Cytochroms P450 (EC 1.6.2.4, Por) auf Proteinebene in den Proben (Aorta und Niere) nachgewiesen werden, indem die nachzuweisenden Proteine nach der Sandwichmethode mit spezifischen Antikörpern markiert und letztlich mittels einer Chemilumineszenzreaktion auf einem Film abgebildet werden können. Als Positivkontrolle diente das jeweilige  $\beta$ -Actin Protein. Die Intensität der einzelnen Banden lässt im Vergleich Rückschlüsse auf die Konzentration der dargestellten Proteine zu. Die Banden für XDH befinden sich bei 142 kD, für Por bei 72 kD.

#### 3.2.2.1. Western Blot Cytochrom P450 (EC 1.6.2.4, Por ) der Aorta und Niere

Für beide Gewebeprobe sind die Banden für Por in den aufsteigenden Zeitreihen (0h, 3h, 6h und 12 h) in ihrer Intensität immer stärker ausgeprägt. Die Ergebnisse aus der realtime- PCR können hier auch bestätigt werden.



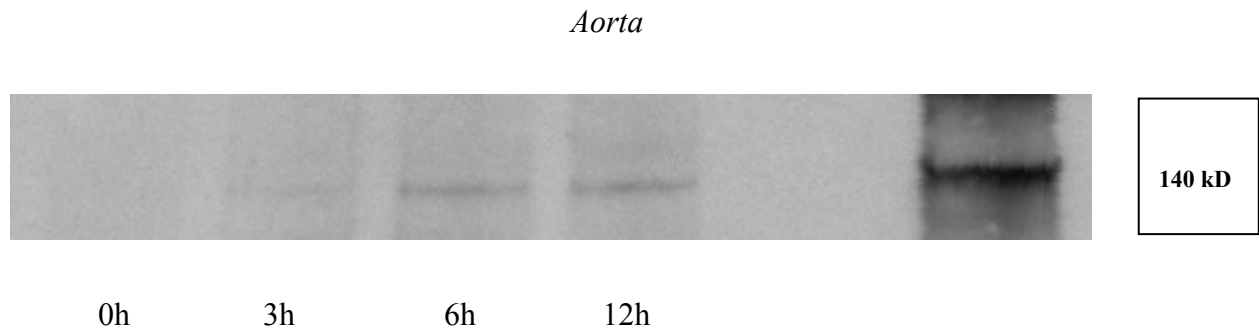
*Abbildung 19: Western- Blot Por Aorta; die Banden, die sich bei 72 kD befinden nehmen mit immer länger werdendem Abstand zur induzierten Hypotonie an Intensität zu. Damit kann die in der realtime-PCR gefundene Aufregulation bestätigt wird.*



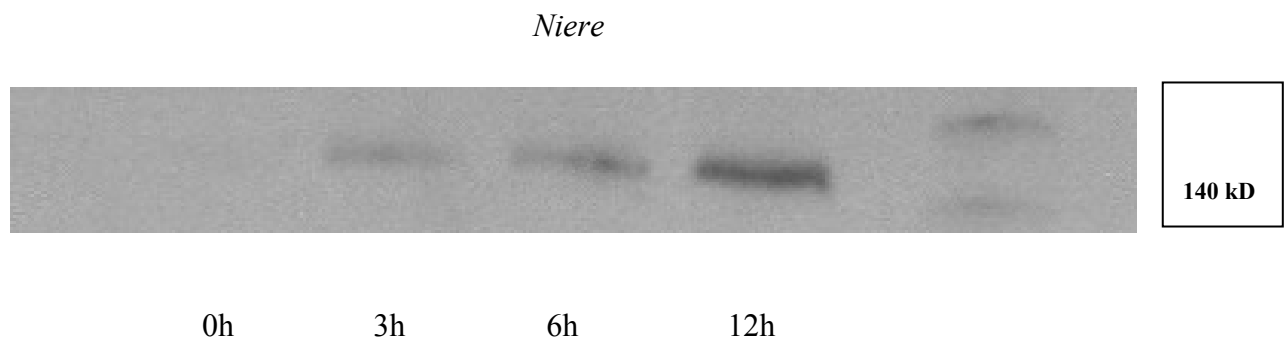
*Abbildung 20: Western- Blot Por Niere; die Banden, die sich bei 72 kD befinden nehmen mit immer länger werdendem Abstand zur induzierten Hypotonie an Intensität zu. Damit kann die in der realtime-PCR gefundene Aufregulation bestätigt werden.*

### 3.2.2.2. Western Blot XDH der Aorta und Niere

Für beide Gewebeproben sind die Banden für XDH in den aufsteigenden Zeitreihen (0h, 3h, 6h und 12 h) in ihrer Intensität immer stärker ausgeprägt. Die Ergebnisse der realtime- PCR können also auch hier bestätigt werden.



*Abbildung 21: Western- Blot XDH Aorta, die Banden, die sich bei 142 kD befinden nehmen mit immer länger werdendem Abstand zur induzierten Hypotonie an Intensität zu. Damit kann die bereits in der realtime-PCR gefundene Aufregulation bestätigt werden*



*Abbildung 22: Western- Blot XDH Niere; die Banden, die sich bei 142 kD befinden nehmen mit immer länger werdendem Abstand zur Hypotonieinduktion an Intensität zu. Damit kann die bereits in der realtime-PCR bestätigte Aufregulation im Nierengewebe bestätigt werden.*

## 4. Diskussion

### Tierversuche

Wie in allen Modellen stellt sich immer die Frage auf die Reprojizierbarkeit des erstellten Modells auf andere Modelle, vor allem die Alternative der Versuchsmöglichkeiten am lebenden Organismus. Die Blutdruckregulation muss immer als systemisches Geschehen im Kreislauf betrachtet werden, so dass die hier vorgenommene fokussierte Organuntersuchung die Beurteilung der Gesamtregulation des Blutdruckes einschränkt.

Des Weiteren sollte die für dieses Modell gewählte Methode der Hypotonieinduktion mittels Blutentnahme diskutiert werden, da sie nicht das einzige Stellglied der Blutdruckregulation darstellt. Würde man ein Modell konstruieren, indem das Stellglied der Hypotonieinduktion nicht die Blutentnahme ist, sondern z.B. bereits genetisch vorgezüchtete, hypotone Tiere, so stellt sich die Frage, ob die hier herausgefundenen Ergebnisse eine Äquivalenz aufweisen würden.

Vergleichende Expressionsstudien, die von vornherein die Untersuchung an einem hypertenem Tiermodell, den WKY mit SHR durchführten, zeigten in der Microarrayanalyse keine Identifizierung von Kandidatengenen für die Blutdruckkontrolle (Okuda T., Sumiya T. et al., 2002). Die SHRs stammen zwar von hypertensiven WKY-Ratten ab, trotzdem sind beide Stämme genetisch heterogen. Sicherlich könnte man spekulieren, dass die genetische Identität von hypotensiven Versuchstieren und Kontrolltieren einen entscheidenden Vorteil bringt für das hier gewählte Tiermodell.

### Ergebnisse

Als einer der kritischen Faktoren für die chronische Schädigung am Endothel und der Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen an der Gefäßwand wird heutzutage vor allem der durch reaktive Sauerstoffatome (ROS) entstehende oxidative Stress genannt (Cai und Harrison 2000; Zalba et al. 2000). Zu den ROS zählen unter anderem das Superoxidradikalanion, das Hydroxylradikal, Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff.

Risikofaktoren wie z.B. Hypertonie oder auch Diabetes sind mit einer vermehrten Bildung von ROS assoziiert (Vogel 1997). Diese Moleküle greifen unter anderem zelleigene Moleküle an und können zu schädlichen Zellveränderungen führen. Der Körper hat deswegen

Mechanismen zur Eliminierung dieser ROS Metabolite eingerichtet wie z.B. die Superoxiddismutase oder Radikalfänger wie Vitamin C.

Da kardiovaskuläre Erkrankungen an erster Stelle der Todesursachenstatistik stehen, wird klar, weshalb die Forschung auf dem Gebiet der möglichen Auslöser für oxidativen Stress oder endothelialer Dysfunktion so intensiv betrieben wird.

In dieser Arbeit wurde ein Modell an Ratten etabliert, dass die Betrachtung der Blutdruckregulation auf physiogenomischer Ebene zugänglich macht, um daraus neue vasoregulatorische Mechanismen aufzudecken. Bei den normotensiven Ratten wurde durch Punktion und Entnahme von 3 ml Blut eine akute Hypotension ausgelöst, und erwartet, dass das vasoregulatorische System dieser Hypotension entgegenwirkt. Diese entgegenwirkenden Mechanismen, gemessenen an verschiedenen aufregulierten bzw. abregulierten Genprodukten, werden an der entnommenen Rattenniere und an der thorakalen Aorta nach 3h, 6h und zwölf Stunden untersucht.

### **Xdh**

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR), ein Molybdoenzym, kommt im Zytosol vor und ist ein im Purin- und Pyrimidinstoffwechsel involviertes Enzym. Die XOR kommt in zwei möglichen Formen vor, wie z.B. als Dehydrogenase (XDH, 80%) und der Oxidaseform (XO, 20%), die den Abbau von Hypoxanthin (HX) über Xanthin (X) zu Harnsäure katalysieren. Beide Formen der XOR können ineinander übergehen. Die XDH verwendet bei der o.g. Reaktion oxidiertes Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) als Elektronenakzeptor. Im Rahmen der Ischämiephase kann durch Thiol-Oxidation oder proteolytische Abspaltung eine Umwandlung der XDH-Form in die XO-Form erfolgen. XO hingegen verwendet anstelle von NAD<sup>+</sup> molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor, wodurch es zur Bildung von Sauerstoffradikalen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>•-</sup> kommt (Laakso et al., 2004) (Harrison, 1997).

XDH und XO werden stark exprimiert auf der Lumenseite des Endothels (Cai H., Harrison D.G., 2000).

Mit dem Western Blot Verfahren und der realtime-PCR konnten die Ergebnisse der Microarrayanalyse aus der vorangegangenen Arbeit für beide Gewebeproben (Niere und Aorta) verifiziert werden. XDH wird nicht nur sechs Stunden nach induzierter Hypotonie aufreguliert, sondern wird auch noch zwölf Stunden später stark aufreguliert. Das konnte man anhand der Bandenintensität und der Aufregulation des relativen Transkriptionsfaktors bestätigen. Das im ROS- Metabolismus mitwirkende Gen XDH (bzw. XO und das von ihm abstammende O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) wirkt störend auf die endothelabhängige Vasodilatation und führt

vielleicht durch eine unregelmäßige Überfunktion sogar zur Hypertonie. (Suzuki H., DeLano F.A. et al., 1998). So wurde das von XO abstammende  $O_2^-$  schon mehrfach mit kardiovaskulären Erkrankungen inklusive der endothelialen Dysfunktion, starken Rauchern (Guthikonda S. et al., 2003) sowie Hypercholesterinämie (Cai H., Harrison D.G., 2000) in Zusammenhang gebracht.

#### **Cytochrom P450 Oxidoreduktase (EC 1.6.2.4, Por)**

Cytochrom P450 verschlüsselt für die NADPH-Cytochrom-P-450-Oxidoreduktase (Por, Accession number NM\_031576), einem Teil des membranständigen Cytochrom-P-450-Multienzymkomplexes. Zurzeit wird immer mehr ersichtlich, dass die Cytochrom-P-450-Metabolite der Arachidonsäure eine wichtige Rolle sowohl in der Vasoregulation (Depolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen) als auch in der Nierenfunktion (Modulation der renalen Natriumreabsorption) (Roman R.J., 2002) spielen. Sobald im Cytochrom-P-450-Reaktionszyklus die Elektronen für die Reduktion des zentralen Hämeisens benötigt werden und auf das aktivierte gebundene Sauerstoffmolekül übertragen worden sind entstehen ROS Metabolite wie  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  und Hydroxylradikale (Fleming I., 2001).

Die realtimer-PCR Ergebnisse zeigen auch hier eine Aufregulation für Niere und Aorta bis einschließlich der in der 12. h gemessenen Werte. Mit der Aufregulation des Gens kann die Vorstellung, dass über eine erhöht einhergehende  $O_2^-$ -Produktion auch eine arterielle Hypertonie ausgelöst werden kann durch z.B. endothelialer Dysfunktion bestärkt werden. (Sarkis A. et al., 2004). Die ermittelten Daten suggerieren, dass die NADPH-Cytochrom-P-450-Oxidoreduktase (Por) bei der Regulation des vaskulären Cytochrom-P-450 eine kritische Rolle spielen könnte.

#### **NOX 1 und NOX 4**

Die NADPH-Oxidasen sind eine Gruppe von Enzymen, die in vielen Zellen vorkommen. In den neutrophilen, eosinophilen und mononukleären Leukozyten ist die die NADPH-Oxidase am besten untersucht, wo sie die Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  aus molekularem Sauerstoff und NADPH katalysiert (Babior, 1999). Die NAD(P)H-Oxidasen der neutrophilen Granulozyten setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, zum einen aus dem Flavocytochrom b558, das die Zellplasmamembran durchspannt und selbst aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt ist, der größeren gp91phox und der kleinen p22phox, zum anderem aus dem im Zytoplasma vorkommenden Komponenten p47phox, p67phox und den GTPasen Rac1 oder Rac2 (Babior et al., 2002). Für die gp91 phox wurde in menschlichen Körperzellen Homologa gefunden,

die bezeichnet werden als NOX 1 (Suh et al., 1999), NOX 3 (Kikuchi et al., 2000), NOX 4 (Geiszt et al., 2000) und NOX 5 (Banfi et al., 2001).

Vor allem in vaskulären Zellen und in glatten Gefäßmuskelzellen konnte neben gp91 phox, Nox1 und Nox4 nachgewiesen werden. NADH/NAD(P)H-Oxidasen gehören zu den führende Enzymsystem für die ROS-Bildung in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und kardialem Gewebe , wobei die membranassoziierten Enzymsysteme die Reduktion eines Sauerstoffmoleküls katalysieren, wodurch es zu einer Übertragung eines Elektrons kommt. NADH oder NADPH fungieren dabei als Elektronendonator.

Bei den Ergebnissen in der realtime- PCR der Aorta wird eine Abregulation beider Gene beobachtet, wohingegen im Nierengewebe beide Genprodukte bis zur Messung in der sechsten Stunde nach induzierter Hypotonie auch abreguliert werden , jedoch in der Messung nach 12 h aufreguliert sind. Basierend auf der Funktion der NAD(P)H-Oxidasen im ROS Metabolismus, wäre eine Aufregulation beider Gene in den Proben zu erwarten. In der Niere kann man erst in der Messung nach 12 h eine Aufregulation sehen, so dass das die Vermutung offen lässt, dass in der Aorta möglicherweise bei einer weitem Messung nach 12 h oder ggf. einer definierten Langzeitmessung eine Aufregulation detektiert werden könnte. Möglicherweise ist auch der Expressionsort von entscheidender Bedeutung oder aber auch die unterschiedliche Reaktionsfähigkeit einzelner Organstrukturen auf Situationen wie z.B. induzierter Hypotonie mit daraus folgender Gegenregulation.

Durch die Beteiligung an der ROS Entstehung, ist auch hier ähnlich wie bei XDH und Cytochrom P450, die Beteiligung an hypertoniauslösenden Faktoren anzunehmen und zu diskutieren welche der beiden Formen einen signifikanteren Einfluss auf den ROS Metabolismus hat oder sie vielleicht bei dieser Betrachtung beide als gleichwertig anzusehen sind.

### **eNOS und iNOS**

NO wird von drei verschiedenen NO-Synthasen produziert eNOS, iNOS und nNOS (Moncada, 1976; Nathan, 1993), die sich sowohl in der Regulation als auch Lokalisation in den Zellen und damit in der Funktion unterscheiden. Die eNOS ist dafür zuständig in Endothelzellen aus L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO) zu bilden (Bredt und Snyder, 1994), welches als Vasodilatator fungiert und somit großen Einfluss auf den Blutdruck hat. Außerdem ist es verantwortlich für die Inhibierung der Plättchenaggregation, die verminderte Leukozytenanhaftung und das Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur.



Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass unter pathophysiologischen Bedingungen, wenn nicht genügend Substrat für die enzymale Reaktion vorliegt, eNOS selbst schädliche Radikale produzieren kann (Cosentino, F., et al., 1998; Vergnani, L., et al., 2000).

Die iNOS wird in der Endothelzellschicht exprimiert trägt jedoch unter physiologischen Bedingungen nicht signifikant zur endothelialen NO Bildung bei (Geiger M., Stone A. et al., 1997). Kommt es nun im Körper, z.B. im Rahmen eines aktivierten Immunsystems zur Freisetzung von Mediatoren wie z.B. der bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-2 und vielen anderen, so wird über eine Überaktivität der iNOS zu viel NO produziert, welches in diesen hohen Konzentrationen toxisch wirkt. Durch z.B. Über- oder Unteraktivität der eNOS oder iNOS, wie es bei der Endotheldysfunktion der Fall ist, entsteht nicht nur eine geminderte NO-Verfügbarkeit und damit eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation, sondern auch eine Dominanz von oxidativem Stress (Nathan C., 1992).

Bei den realtime-PCR Ergebnissen konnte eine Aufregulation der iNOS in Niere und Aorta und eine Abregulation der eNOS in beiden Geweben gesehen werden.

Die Abregulation der eNOS wurde bereits vor Versuchsbeginn hypothetisch postuliert, da bei eintretender Hypotension die vasodilatierende Wirkung zu einer weiteren Verschlechterung und nicht zur gewünschten Gegenregulation führen würde.

Nach momentanem Stand der Wissenschaft stellt die endotheliale NO-Produktion die Basis für ein intaktes kardiovaskuläres System dar (Katusic, 2001). Diese These wird durch die Erkenntnis gestützt, dass kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und Bluthochdruck oftmals eine endotheliale Dysfunktion in Form einer gestörten endothelialen NO-Produktion oder reduzierten NO-Bioverfügbarkeit vorangeht (Li und Förstermann, 2000). Die verminderte NO-Verfügbarkeit trägt zu systemischen Bluthochdruck, Atherosklerose und Dysfunktion in den Atemwegen bei (Shaul, 2002). Projiziert man die Annahme auf die Situation der Hypertonie so könnte eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO entweder Ausdruck einer verminderten Expression der endothelialen NO-Synthasen eNOS sein, oder vielleicht ein Mangel an Substrat oder Kofaktoren der eNOS sein, oder vielleicht eine Veränderungen auf zellulärer Signalebene – zum Beispiel eine nicht ausreichende Aktivierung der eNOS oder sogar ein beschleunigter NO-Abbau durch ROS der Grund sein.

Die iNOS wurde in beiden Gewebeproben vermehrt exprimiert, was unter oxidativem Stress sowie durch Endotoxine, Exotoxine und Entzündungsmediatoren induziert werden kann (Charles I.G., Moncada, S. et al., 1993).

Die vermehrte relative Transkriptionshäufigkeit der iNOS in beiden Geweben verursacht ein Anstieg der NO- Konzentrationen, die sich in dieser Höhe im toxischen Bereich befinden, das fördert unter anderem die Arteriosklerosebildung und stört die endothelabhängige Gefäßfunktion (Verbeuren et al., 1993; Kessler et al., 1997; Behr-Roussel et al., 2000; Detmers et al., 2000) und könnte somit ebenfalls ein Faktor in der genetischen Ursachenforschung der Bluthochdrucks sein. Insgesamt ist die Rolle der induzierten NO-Synthase in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert.

### **Hämoxygenase**

Bisher sind drei Isoformen der HO bekannt, die den oxidativen Abbau von toxischem Häm zu Biliverdin katalysieren. Zu den drei Formen der HO zählen zum einen die Hämoxygenase-1, ein Hitzeschockprotein welches ubiquitär in allen Geweben vorkommt und induzierbar ist zum anderem Hämoxygenase-2, welche verstärkt im Gehirn und Hoden exprimiert wird und von dem angenommen wird, dass es nicht induzierbar ist. Die HO- 3 ist bisher nicht näher charakterisiert. Die Induktion von HO-1 vermittelt einen vom Körper eingerichteten zellulären Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress, wie er nach verschiedenen Arten von akuten Zellschäden auftreten kann (Vogt BA, Shanley TP et al., 1996). HO-1 spaltet ein Molekül Häm, dabei entsteht zu gleichen Teilen Biliverdin, Kohlenmonoxid und freies Eisen (Tenhunen R, Marver HS, Schmid R).

Die HO- 1 war in beiden Gewebeproben aufreguliert. Wie in mehreren Versuchen gezeigt werden konnte, wird HO-1 vor allem dann induziert, wenn die Körperzellen oxidativem Stress ausgesetzt sind (Vogt BA, Shanley TP et al., 1996). Andere Studien konnten zeigen, dass allein schon chronische Stresssituationen bei Ratten eine Induktion der HO-1 auslösen. (Olivenza,R., M.A.Moro et al., 2000)

In dem hier vorliegendem Modell sind bereits durch die Aufregulation der verschiedenen Gene wie XDH, Cytochrom P450, NOX 1 und 4 genügend ROS produzierende Metabolite vorhanden, die die Aufregulation der HO-1 als denkbare Konsequenz zuließen.

Auch die Blutentnahme könnte für die Ratte über einen länger dauernden Kompensationsmechanismus eine Art von Stress auslösen, woraus eine Induktion der HO- 1 erklärbar wäre.

Zusammenfassend sind vier von den hier sieben untersuchten Genen sowohl in der Niere als auch in der Aorta aufreguliert (XDH, Cytochrom P450 Oxidoreduktase, iNOS und HO-1). NOX 1 und NOX 4 waren beide im aortalen Gewebe abreguliert und in der Niere aufreguliert. Die eNOS war in beiden Proben abreguliert

All diese untersuchten Gene spielen eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System, und ihre korrespondierenden Proteine beeinflussen den Metabolismus von ROS.

Gehäuft ergeben sich Hinweise darauf, dass oxidativer Stress viele Endothelfunktionen beeinflusst, inklusive der Modulation des Gefäßtonus. Die Inaktivierung von NO durch Superoxid und andere reaktive Sauerstoffverbindungen führen zu einer verminderten Vasodilatatorpotenz, welche im Allgemeinen auf eine endotheliale Dysfunktion hinweist (Matsuda S., Katsumata R. et al., 2000).

Unterschiedliche Ergebnisse, bzgl. der Auf- oder Abregulation, in den beiden Gewebeproben könnten über die Annahme erklärt werden, dass die Nierenproben im Gegensatz zur Aorta aus einer Vielzahl verschiedener parenchymaler Strukturen, wie zum Beispiel interstitiellem Gewebe, Glomeruli und Gefäßen und tubulären Strukturen, zusammengesetzt sind.

In der Diabetesforschung entwickelten Kim und seine Mitarbeiter (Kim K.H. et al., 2001) einen experimentellen Ansatz, der dem in dieser Arbeit ähnelt. Sie induzierten bei Mäusen eine akute Hypoglykämie, um die Expressionsrate gegenregulatorischer Gene, die den Anstieg des Blutzuckers verursachen, zu erhöhen (Kim K.H. et al., 2001). Die anschließend durchgeführten Microarrayanalysen deckte ein Gen auf, welches heute unter dem Namen Resistin geläufig ist (Steppan C.M. et al., 2001).

Die vorliegende Arbeit verweist auf noch weitere Gruppen von Genen, die einen Teil der genetischen Basis der Blutdruckregulation bilden könnten. Andere Untereinheiten der NADPH-Oxidasen oder aber auch Metabolite wie die Antioxidantien Superoxiddismutase (SOD) könnten zum Beispiel Thema weiterer Forschungsansätze werden.

Insgesamt betrachtet ist das hier verwendete Genomscreeningmodell nur eine von vielen in der Forschung möglichen Instrumenten vasoregulatorische Mechanismen aufzudecken.

Einschränkungen dieser Studie liegen vor allem auch in der Analyse der Messzeitpunkte vor, die nur eine Betrachtung bis zur zwölften Stunde nach Hypotonieinduktion zulässt. Weitere

Transkriptomanalysen von verschiedenen Zeitpunkten werden folgen müssen, um einen charakteristischen Unterschied zwischen akutem und Langzeitphänomen sowie zwischen regulatorischem und kompensatorischem Gegenmechanismus erkennen lassen zu können. Des Weiteren sollte darauf verwiesen werden, dass es noch weitere Gengruppen gibt, die im Rahmen der Hypertonieforschung eine entscheidende Stellung einnehmen könnten, Als Beispiel könnten hier weitere Untereinheiten der NADPH-Oxidasen ( z.B. p22 phox) oder aber auch Metabolite wie das Antioxidanz Superoxiddismutase (SOD) genannt werden.

Außerdem sollte gezeigt werden, ob die hier untersuchten Gene auch an anderen, vergleichbaren Modellen zu äquivalenten Ergebnissen führen würden und Schlussfolgerungen für das Krankheitsbild der Hypertonie möglich sind.

Insgesamt dürfte dieser physiogenomische Ansatz einen tieferen Einblick in die Genetik und die Physiologie der Blutdruckregulation erlauben.

## 5. Zusammenfassung

Der essentielle Hypertonus ist eine multifaktoriell bedingte Störung der Blutdruckregulation. Zurückzuführen ist das auf verschiedene Umweltfaktoren und eine Vielzahl von blutdruckrelevanten Genen. Bisher konnten einige Kandidatengene identifiziert werden, wobei weitere wahrscheinlich sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist einerseits die Verifizierung aber auch die Entdeckung neuer differentiell exprimierter blutdruckregulierender Gene. Über die Analyse der zugehörigen Genprodukte sollen neue blutdruckregulierende Systeme identifiziert werden können.

Durch das Herbeiführen einer akuten Hypotension (*Blutdruckreduktion um  $31 \pm 5\%$* ) bei normotensiven Ratten, wurde erwartet, dass das vasoregulatorische System der Hypotension entgegenwirken wird. Die durch diese Hypotension induzierte Aufregulation blutdrucksteigernder Gene in der Niere und thorakalen Aorta sollen anschließend in einer definierten Zeitreihe (Messpunkte nach induzierter Hypotonie) detektiert und mittels realtime-PCR und Western Blot verifiziert, quantifiziert und qualitativ erfasst werden.

Die Hypothese, dass genau diese aufregulierten Gene einen Faktor in der Entstehung der Hypertonie darstellen könnten, durch z.B. unregulierte oder auch entkoppelte inadäquate Aufregulation der dazugehörigen Proteine, stellt die hier untersuchten Gene als eine der vielen möglichen genetischen Basismodelle der Blutdruckregulation dar.

Zwei funktionell bekannte Gene (*XDH und Cytochrom P450 (EC 1.6.2.4, Por)*) waren bereits bei Voruntersuchungen mittels realtime-PCR und Microarray Analyse als signifikant aufreguliert ( $p < 0,1$ ) gefunden worden, so dass in dieser Arbeit eine weitere Methode, der Western Blot, genutzt wurde, um dieses Ergebnis zu verifizieren. Des Weiteren wurden diese beiden Gene zu einem weiteren Messpunkt (12h) nach induzierter Hypotonie, im Gegensatz zur vorangegangenen Arbeit (letzter Messpunkt 6h), mittels realtime-PCR untersucht.

Neben XDH und Por wurden noch weitere Gene iNOS, eNOS, NOX1, NOX4 und HO-1 untersucht, die in ihrer Funktion ebenfalls einen hinreichenden Einfluss auf die Blutdruckregulation haben.

Nach induzierter Hypotonie und anschließender Gewebeuntersuchung (Niere und Aorta) bei 0h, 3h, 6h und 12 h wurde die relative Transkriptionshäufigkeit dieser Gene mit der realtime-PCR detektiert.

Zusammenfassend sind vier von den hier sieben untersuchten Genen sowohl in der Niere als auch in der Aorta aufreguliert (XDH, Por, iNOS und HO-1). NOX 1 und NOX 4 waren beide im aortalen Gewebe abreguliert und in der Niere aufreguliert. Die eNOS war in beiden Proben abreguliert

Die untersuchten Gene besitzen einige charakteristische Funktionen in unserem Herz-Kreislauf-System. Außer der HO-1, die in ihrer Funktion schützend auf oxidativen Stress wirkt, kommen den restlichen Genen und ihren dazugehörenden Proteinen eine entscheidende Rolle im Metabolismus reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) zu.

XDH und Por sind über komplexe Reaktionen und ihren Zwischenprodukten in der Entstehung von Sauerstoffradikalen involviert.

iNOS und eNOS sorgen über die Freisetzung von physiologischem aber auch toxischem NO zu vaskulären Tonusänderungen aber auch zu vielerlei Schäden auf Zellstrukturebene. Die erhöhte Expression von iNOS ist von einer deutlich höheren Bildung von Sauerstoffradikalen und Peroxynitrit vergesellschaftet und mündet somit wieder im Metabolismus reaktiver Sauerstoffradikale (ROS).

Auch NOX 1 und NOX 4, eine analoge Untereinheiten zur gp 91 phox, sind Bestandteile der NADPH- Oxidase glatter Muskelzellen, die ein führendes Enzymsystem darstellen in der ROS- Bildung.

Durch die Bildung von Sauerstoffradikalen und der damit einhergehenden Beteiligung am Metabolismus der ROS entsteht oxidativer Stress und somit eine Änderung des Gefäßtonus, was letztlich in eine endotheliale Dysfunktion mündet.

Die Detektion neuer Kandidatengene des essentiellen Hypertonus ließe zum einen die Erstellung individueller Risikoprofile zu, die für die Diagnostik, Prävention und einen frühzeitigen Therapiebeginn, sowie eine individualspezifische antihypertensive Therapie von großer Bedeutung wären.

## 6. Literaturverzeichnis

**Adeyemo, A. A., O. O. Omotade, et al. (2002).**

"Heritability of blood pressure in Nigerian families." *J Hypertens* **20**(5): 859-63.

**Alderman, M. H. (1999).**

"Salt reduction and cardiovascular risk." *J Hum Hypertens* **13**(9): 645.

**Applegate, L. A., P. Luscher, et al. (1991).**

"Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells." *Cancer Res* **51**(3): 974-8.

**Awolesi, M. A., W. C. Sessa, et al. (1995).**

"Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells." *J Clin Invest* **96**(3): 1449-54.

**Babior, B. M. (1999).**

"NADPH oxidase: an update." *Blood* **93**(5): 1464-76.

**Babior, B. M. (2002).**

"The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues." *Antioxid Redox Signal* **4**(1): 35-8.

**Bauersachs, J., R. Popp, et al. (1997).**

"Nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor: formation and interactions." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **57**(4-5): 439-46.

**Bayraktutan, U., N. Draper, et al. (1998).**

"Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells." *Cardiovasc Res* **38**(1): 256-62.

**Beilin, L. J. and I. B. Puddey (1992).**

"Alcohol and hypertension." *Clin Exp Hypertens A* **14**(1-2): 119-38.

**Belch, J. J., I. R. Mackay, et al. (1995).**

"Oxidative stress is present in atherosclerotic peripheral arterial disease and further increased by diabetes mellitus." *Int Angiol* **14**(4): 385-8.

**Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, et al. (1996).**

"The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications." *Atherosclerosis* **127**(1): 1-11.

**Bombeli, T., M. Mueller, et al. (1997).**

"Anticoagulant properties of the vascular endothelium." *Thromb Haemost* **77**(3): 408-23.

**Bonnardeaux, A., S. Nadaud, et al. (1995).**

"Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension." *Circulation* **91**(1): 96-102.

**Brown, W. M., S. R. Beck, et al. (2003).**

"Age-stratified heritability estimation in the Framingham Heart Study families." *BMC Genet* **4 Suppl 1**: S32.

**Busse, R., G. Trogisch, et al. (1985).**

"The role of endothelium in the control of vascular tone." *Basic Res Cardiol* **80**(5): 475-90.

**Bustin, S. A. (2000).**

"Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* **25**(2): 169-93.

**Cai, H. and D. G. Harrison (2000).**

"Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." *Circ Res* **87**(10): 840-4.

**Calvisi, D. F., S. Ladu, et al. (2004).**

"Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF-alpha transgenic mouse model of liver cancer." *J Hepatol* **41**(5): 815-22.

**Cannon, R. O., 3rd (1998).**

"Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium." *Clin Chem* **44**(8 Pt 2): 1809-19.

**Charles, I. G., A. Chubb, et al. (1993).**

"Cloning and expression of a rat neuronal nitric oxide synthase coding sequence in a baculovirus/insect cell system." *Biochem Biophys Res Commun* **196**(3): 1481-9.

**Chen, P. Y. and P. W. Sanders (1993).**

"Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats." *Hypertension* **22**(6): 812-8.

**Choi, A. M. and J. Alam (1996).**

"Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury." *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**(1): 9-19.

**Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987).**

"Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.

**Cines, D. B., E. S. Pollak, et al. (1998).**

"Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." *Blood* **91**(10): 3527-61.

**Cooke, J. P., N. A. Andon, et al. (1991).**

"Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta." *Circulation* **83**(3): 1057-62.

**Creager, M. A., S. J. Gallagher, et al. (1992).**

"L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans." *J Clin Invest* **90**(4): 1248-53.

**Curtis, J. J., R. G. Luke, et al. (1983).**

"Remission of essential hypertension after renal transplantation." *N Engl J Med* **309**(17): 1009-15.

**Dahl, L. K., M. Heine, et al. (1962).**

"Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion." *Nature* **194**: 480-2

**Davydov, D. R., N. A. Petushkova, et al. (2001).**

"Association of cytochromes P450 1A2 and 2B4: are the interactions between different P450 species involved in the control of the monooxygenase activity and coupling?" *Adv Exp Med Biol* **500**: 335-8.

**De Keulenaer, G. W., D. C. Chappell, et al. (1998).**

"Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase." *Circ Res* **82**(10): 1094-101.

**Dimmeler, S., J. Haendeler, et al. (1997).**

"Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis." *Circulation* **95**(7): 1760-3.

**Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (1997).**

"Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide." *Nitric Oxide* **1**(4): 275-81.

**Dobrin, P. B., F. N. Littooy, et al. (1989).**

"Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts." *Surgery* **105**(3): 393-400.

**Drexler, H. and A. M. Zeiher (1991).**

"Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia." *Hypertension* **18**(4 Suppl): II90-9.



**Droge, W. (2002).**

"Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* **82**(1): 47-95.

**Elgrably-Weiss, M., S. Park, et al. (2002).**

"A Salmonella enterica serovar typhimurium hemA mutant is highly susceptible to oxidative DNA damage." *J Bacteriol* **184**(14): 3774-84.

**Everson, S. A., R. E. Roberts, et al. (1998).**

"Depressive symptoms and increased risk of stroke mortality over a 29-year period." *Arch Intern Med* **158**(10): 1133-8.

**Falkner, B. (1991).**

"Blood pressure response to mental stress." *Am J Hypertens* **4**(11): 621S-623S.

**Fattman, C. L., C. T. Chu, et al. (2001).**

"Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment." *Free Radic Biol Med* **31**(10): 1198-207.

**Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (1996).**

"Endothelium-derived hyperpolarizing factor." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**(12): 1082-90.

**Fish, R. D., E. G. Nabel, et al. (1988).**

"Responses of coronary arteries of cardiac transplant patients to acetylcholine." *J Clin Invest* **81**(1): 21-31.

**Fleming, I. (2001).**

"Cytochrome p450 and vascular homeostasis." *Circ Res* **89**(9): 753-62.

**Freiman, P. C., G. G. Mitchell, et al. (1986).**

"Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates." *Circ Res* **58**(6): 783-9.

**Frohlich, E. D. (2001).**

"Preventive cardiology: more than just lipid lowering." *Prev Cardiol* **4**(3): 101-102.

**Geiger, M., A. Stone, et al. (1997).**

"Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 1): L275-81.

**Geiszt, M., J. B. Kopp, et al. (2000).**

"Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8010-4.

**Goldsmith, S. R. (1987).**

"Vasopressin as vasopressor." *Am J Med* **82**(6): 1213-9.

**Golino, P., F. Piscione, et al. (1991).**

"Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients." *N Engl J Med* **324**(10): 641-8.

**Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000).**

"Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(10): 2175-83.

**Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000).**

"NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." *Circ Res* **86**(5): 494-501.

**Grunewald, M., M. Griesshammer, et al. (2000).**

"Loco-regional thrombolysis for deep vein thrombosis: fact or fiction? A study of hemostatic parameters." *Blood Coagul Fibrinolysis* **11**(6): 529-36.

**Gryglewski, R. J., S. Chlopicki, et al. (1995).**

"Prostacyclin, nitric oxide, and atherosclerosis." *Ann N Y Acad Sci* **748**: 194-206; discussion 206-7.

**Guidelines Committee European Society of Hypertension (2003).**

"2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension." *J Hypertens* **21**(6): 1011-53.

**Guthikonda, S., C. Sinkey, et al. (2003).**

"Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers." *Circulation* **107**(3): 416-21.

**Heinecke, J. W. (1998).**

"Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis." *Atherosclerosis* **141**(1): 1-15.

**Heitzer, T., H. Just, et al. (1996).**

"Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers." *Circulation* **94**(1): 6-9.

**Heitzer, T., S. Yla-Herttuala, et al. (1996).**

"Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL." *Circulation* **93**(7): 1346-53.

**Hirata, K., N. Miki, et al. (1995).**

"Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells." *Circ Res* **76**(6): 958-62.

**Hoher, M., J. Wöhrle, et al. (2000).**

"Intracoronary beta-irradiation with a liquid (188)re-filled balloon: six-month results from a clinical safety and feasibility study." *Circulation* **101**(20): 2355-60.

**Hollenberg, N. K. (1986).**

"Strategies in antihypertensive therapy: implications of the kidney." *Am J Med* **81**(6A): 15-9.

**Hombach, V., H. H. Osterhues, et al. (2000).**

"[Risk stratification after myocardial infarct]." *Z Kardiol* **89 Suppl 3**: 75-86.

**Huang, P. L., Z. Huang, et al. (1995).**

"Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase." *Nature* **377**(6546): 239-42.

**Imlay, J. A. (2002).**

"How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis." *Adv Microb Physiol* **46**: 111-53.

**Jayakody, R. L., M. P. Senaratne, et al. (1985).**

"Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta." *Can J Physiol Pharmacol* **63**(9): 1206-9.

**Kearney, P. M., M. Whelton, et al. (2005).**

"Global burden of hypertension: analysis of worldwide data." *Lancet* **365**(9455): 217-23.

**Khatsenko, O. G., S. S. Gross, et al. (1993).**

"Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 11147-51.

**Kim, K. H., K. Lee, et al. (2001).**

"A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation." *J Biol Chem* **276**(14): 11252-6.

**Kiowski, W. (1999).**

"Endothelial dysfunction in hypertension." *Clin Exp Hypertens* **21**(5-6): 635-46.

**Kjeldsen, S. E., S. Julius, et al. (2001).**

"Characteristics of 15,314 hypertensive patients at high coronary risk. The VALUE trial. The Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation." *Blood Press* **10**(2): 83-91.

**Laakso, J. T., T. L. Teravainen, et al. (2004).**

"Renal xanthine oxidoreductase activity during development of hypertension in spontaneously hypertensive rats." *J Hypertens* **22**(7): 1333-40.

**Landsberg, L. (1992).**

"Hyperinsulinemia: possible role in obesity-induced hypertension." *Hypertension* **19**(1 Suppl): I61-6.

**Landsberg, L. (1992).**

"Obesity and hypertension: experimental data." *J Hypertens Suppl* **10**(7): S195-201.

**Lee, P. D., L. C. Giudice, et al. (1997).**

"Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions." *Proc Soc Exp Biol Med* **216**(3): 319-57.

**Lewington, S., R. Clarke, et al. (2002).**

"Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies." *Lancet* **360**(9349): 1903-13.

**Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001).**

"Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.

**Ludmer, P. L., A. P. Selwyn, et al. (1986).**

"Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries." *N Engl J Med* **315**(17): 1046-51.

**Luft, F. C., E. Mervaala, et al. (1999).**

"Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem." *Hypertension* **33**(1 Pt 2): 212-8.

**Maarse, A. C., M. De Haan, et al. (1988).**

"Inactivation of the gene encoding the 11-kDa subunit VIII of the ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur J Biochem* **172**(1): 179-84.

**MacNaul, K. L. and N. I. Hutchinson (1993).**

"Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions." *Biochem Biophys Res Commun* **196**(3): 1330-4.

**Maines, M. D., G. M. Trakshel, et al. (1986).**

"Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible." *J Biol Chem* **261**(1): 411-9.

**Mann, J. F., H. C. Gerstein, et al. (2003).**

"Cardiovascular risk in patients with mild renal insufficiency." *Kidney Int Suppl*(84): S192-6.

**McCoubrey, W. K., Jr., T. J. Huang, et al. (1997).**

"Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3." *Eur J Biochem* **247**(2): 725-32.

**Meagher, E. A., O. P. Barry, et al. (1999).**

"Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans." *J Clin Invest* **104**(6): 805-13.

**Meier, B., A. R. Cross, et al. (1991).**

"Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts." *Biochem J* **275** ( Pt 1): 241-5.

**Meisinger, C., M. Heier, et al. (2006).**

"Regional disparities of hypertension prevalence and management within Germany." *J Hypertens* **24**(2): 293-9.

**Meneshian, A. and G. B. Bulkley (2002).**

"The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction." *Microcirculation* **9**(3): 161-75.

**Messner, K. R. and J. A. Imlay (2002).**

"Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase." *J Biol Chem* **277**(45): 42563-71.

**Minor, R. L., Jr., P. R. Myers, et al. (1990).**

"Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta." *J Clin Invest* **86**(6): 2109-16.

**Moncada, S., R. Gryglewski, et al. (1976).**

"An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." *Nature* **263**(5579): 663-5.

**Moncada, S. and A. Higgs (1993).**

"The L-arginine-nitric oxide pathway." *N Engl J Med* **329**(27): 2002-12.

**Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987).**

"Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-50.

**Nakazono, K., N. Watanabe, et al. (1991).**

"Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10045-8.

**Nasjletti, A. and K. U. Malik (1979).**

"Relationships between the kallikrein-kinin and prostaglandin systems." *Life Sci* **25**(2): 99-109.

**Nathan, C. (1992).**

"Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells." *Faseb J* **6**(12): 3051-64.

**Nishida, K., D. G. Harrison, et al. (1992).**

"Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase." *J Clin Invest* **90**(5): 2092-6.

**Okuda, T., T. Sumiya, et al. (2002).**

"Analyses of differential gene expression in genetic hypertensive rats by microarray." *Hypertens Res* **25**(2): 249-55.

**Orie, N. N., W. Zidek, et al. (1999).**

"Reactive oxygen species in essential hypertension and non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Am J Hypertens* **12**(12 Pt 1-2): 1169-74.

**Pagano, P. J., Y. Ito, et al. (1995).**

"An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta." *Am J Physiol* **268**(6 Pt 2): H2274-80.

**Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, et al. (1997).**

"Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells." *J Clin Invest* **100**(12): 3131-9.

**Patschan, O., B. Kuttler, et al. (1997).**

"Kidneys from normotensive donors lower blood pressure in young transplanted spontaneously hypertensive rats." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 2): R175-80.

**Patterson, C., J. Ruef, et al. (1999).**

"Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **274**(28): 19814-22.

**Petersson, J., P. M. Zygmunt, et al. (1997).**

"Characterization of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries." *Br J Pharmacol* **120**(7): 1344-50.

**Pickering, G. (1972).**

"Hypertension. Definitions, natural histories and consequences." *Am J Med* **52**(5): 570-83.

**Pickering, G. (1978).**

"Normotension and hypertension: the mysterious viability of the false." *Am J Med* **65**(4): 561-3.

**Poch, E., D. Gonzalez, et al. (2001).**

"Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms." *Hypertension* **38**(5): 1204-9

**Pratico, D. (2001).**

"In vivo measurement of the redox state." *Lipids* **36 Suppl**: S45-7.

**Pratico, D. (2001).**

"Lipid peroxidation in mouse models of atherosclerosis." *Trends Cardiovasc Med* **11**(3-4): 112-6.

**Pratico, D. (2001).**

"Vitamin E: murine studies versus clinical trials." *Ital Heart J* **2**(12): 878-81.

**Pratico, D., K. Uryu, et al. (2001).**

"Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis." *J Neurosci* **21**(12): 4183-7.

**Puntarulo, S. and A. I. Cederbaum (1998).**

"Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes." *Free Radic Biol Med* **24**(7-8): 1324-30.

**Radeke, H. H., A. R. Cross, et al. (1991).**

"Functional expression of NADPH oxidase components (alpha- and beta-subunits of cytochrome b558 and 45-kDa flavoprotein) by intrinsic human glomerular mesangial cells." *J Biol Chem* **266**(31): 21025-9.

**Rajagopalan, S., S. Kurz, et al. (1996).**

"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* **97**(8): 1916-23.

**Raymond, J. R., M. Hnatowich, et al. (1990).**

"Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes." *Hypertension* **15**(2): 119-31.

**Rizzardini, M., M. Carelli, et al. (1994).**

"Mechanisms of endotoxin-induced haem oxygenase mRNA accumulation in mouse liver: synergism by glutathione depletion and protection by N-acetylcysteine." *Biochem J* **304** ( Pt 2): 477-83.

**Robertson, J. I. (1990).**

"Serotonin and vascular disease: a survey." *Cardiovasc Drugs Ther* **4 Suppl 1**: 137-40.

**Rudic, R. D., E. G. Shesely, et al. (1998).**

"Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling." *J Clin Invest* **101**(4): 731-6.

**Rudnick, K. V., D. L. Sackett, et al. (1977).**

"Hypertension in a family practice." *Can Med Assoc J* **117**(5): 492-7.

**Ruetten, H. and C. Thiemermann (1997).**

"Interleukin-13 is a more potent inhibitor of the expression of inducible nitric oxide synthase in smooth muscle cells than in macrophages: a comparison with interleukin-4 and interleukin-10." *Shock* **8**(6): 409-14.

**Schuster, H., T. E. Wienker, et al. (1996).**

"Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12." *Nat Genet* **13**(1): 98-100.

**Shimkets, R. A., D. G. Warnock, et al. (1994).**

"Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel." *Cell* **79**(3): 407-14.

**Siems, W. G., A. M. Pimenov, et al. (1998).**

"Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in thymocytes as an effective secondary antioxidative defense mechanism." *J Biochem* **123**(3): 534-9.

**Slattery, M. L., D. T. Bishop, et al. (1988).**

"Lifestyle and blood pressure levels in male twins in Utah." *Genet Epidemiol* **5**(4): 277-87.

**Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985).**

"Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.

**Statistisches Bundesamt (2004)**

Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2004. Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht; Gestorbene in Deu

**Stehouwer, C. D., J. Lambert, et al. (1997).**

"Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy." *Cardiovasc Res* **34**(1): 55-68.

**Susswein, A. J., I. Hurwitz, et al. (2002).**

"Mechanisms underlying fictive feeding in aplysia: coupling between a large neuron with plateau potentials activity and a spiking neuron." *J Neurophysiol* **87**(5): 2307-23.

**Tenhunen, R., H. S. Marver, et al. (1968).**

"The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**(2): 748-55.

**Thomson, L., M. Trujillo, et al. (1995).**

"Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems." *Arch Biochem Biophys* **319**(2): 491-7.

**Ting, H. H., F. K. Timimi, et al. (1997).**

"Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia." *Circulation* **95**(12): 2617-22.

**Touyz, R. M. (2004).**

"Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?" *Hypertension* **44**(3): 248-52.

**Trakshel, G. M., R. K. Kutty, et al. (1986).**

"Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform." *J Biol Chem* **261**(24): 11131-7.

**Trojanovich, S. J., R. Cailliet, et al. (1997).**

"Radiographic mensuration characteristics of the sagittal lumbar spine from a normal population with a method to synthesize prior studies of lordosis." *J Spinal Disord* **10**(5): 380-6.

**Ullrich, V. and M. Bachschmid (2000).**

"Superoxide as a messenger of endothelial function." *Biochem Biophys Res Commun* **278**(1): 1-8.

**Ushio-Fukai, M., Y. Tang, et al. (2002).**

"Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis." *Circ Res* **91**(12): 1160-7.

**Ushio-Fukai, M., A. M. Zafari, et al. (1996).**

"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* **271**(38): 23317-21.

**Vallance, P., A. Leone, et al. (1992).**

"Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure." *Lancet* **339**(8793): 572-5.

**Vandesompele, J., A. De Paepe, et al. (2002).**

"Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR." *Anal Biochem* **303**(1): 95-8.

**Vanhoutte, P. M. (1988).**

"The endothelium--modulator of vascular smooth-muscle tone." *N Engl J Med* **319**(8): 512-3.

**Vogt, B. A., T. P. Shanley, et al. (1996).**

"Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury." *J Clin Invest* **98**(9): 2139-45

**Warnholtz, A., G. Nickenig, et al. (1999).**

"Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system." *Circulation* **99**(15): 2027-33.

**Weitz W. (1923).**

Zur Ätiologie der genuinen oder vaskulären Hypertension. *Z Klin Med* **96**: 151-183, 1923

**Whitacre, C. M. and M. K. Cathcart (1992).**

"Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens." *Cell Immunol* **144**(2): 287-95.

**Wilcox, J. N., R. R. Subramanian, et al. (1997).**

"Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(11): 2479-88.

**Wolin, M. S., C. A. Davidson, et al. (1998).**

"Oxidant--nitric oxide signalling mechanisms in vascular tissue." *Biochemistry (Mosc)* **63**(7): 810-6.

**Woodmansee, A. N. and J. A. Imlay (2002).**

"Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron." *J Biol Chem* **277**(37): 34055-66.

**World Health Report (2003).**

The World Health Report 2003- Shaping the Future, *WHO*, 2003

**Yanagisawa, M., A. Inoue, et al. (1988).**

"Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(18): 6964-7.

**Zafari, A. M., M. Ushio-Fukai, et al. (1998).**

"Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy." *Hypertension* **32**(3): 488-95.

**Zeiher, A. M., H. Drexler, et al. (1993).**

"Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension." *J Clin Invest* **92**(2): 652-62.

**Zou, M. H., R. Cohen, et al. (2004).**

"Peroxyntirite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus." *Endothelium* **11**(2): 89-97.

**Zulueta, J. J., F. S. Yu, et al. (1995).**

"Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane." *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**(1): 41-9.

## 7. Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinen Eltern, meinem Bruder, meinem Freund, Freunden und Bekannten, die mich bei der Erstellung der Dissertation unterstützten und somit zum Gelingen beigetragen haben.

Vielen Dank an Herrn Dr. med. Markus Tölle, der mich während der gesamten Zeit der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Markus van der Giet möchte ich mich bedanken, für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung der Laborräume und Arbeitsmittel sowie die wertvolle Unterstützung in allen Situationen und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

E.-M. Baumann und M. Schuchardt danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung und für die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen, die während der Anfertigung dieser Arbeit aufkamen.

Z. Furundzija, meinem Cousin, danke ich für die Unterstützung bei allen Fragen rund um EDV.

Vielen Dank auch an alle, die ich hier nicht namentlich erwähnen konnte und mich trotzdem in der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.



## **8. Curriculum vitae**

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

## 9. Erklärung

Ich, Vesna Furundzija, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Western Blot und realtime PCR- basierte Identifizierung möglicher Hypertonie assoziierter Gene an einem definiertem Hypotoniemodell an Wistar-Kyoto Ratten selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Vesna Furundzija

Berlin, den 10.04.2008