

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Kardiologie und Angiologie der  
Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Verbesserung einer experimentell induzierten  
endothelialen Dysfunktion durch Proteasominhibition in  
Gefäßringen der Ratte

D I S S E R T A T I O N

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

vorgelegt der  
Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Herrn Nicola Wilck  
aus Potsdam

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. V. Stangl
2. Prof. Dr. med. C. Tschöpe
3. Priv.-Doz. Dr. med. habil. M. Faßhauer

Datum der Promotion: 03.09.2010

## Abstract

Endothelial dysfunction is a hallmark of a number of cardiovascular diseases and characterized by impaired endothelium-dependent vasorelaxation. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major pathway for intracellular protein degradation and is involved in the regulation of numerous cellular processes. Recent studies showed endothelium-protective effects of low-dose proteasome inhibition in endothelial cells. Therefore it is hypothesized that low-dose proteasome inhibition prevents the development of endothelial dysfunction.

The influence of proteasome inhibition on endothelial dysfunction was investigated in rat aortic rings. Endothelial dysfunction was induced by incubation of rat aortic rings with TNF- $\alpha$  for 48 hours. Vascular reactivity was investigated in isometric tension studies. TNF- $\alpha$  dose-dependently reduced endothelium-dependent vasorelaxation. Co-incubation of aortic rings with TNF- $\alpha$  and proteasome inhibitor MG132 dose-dependently prevented endothelial dysfunction. Similar results were obtained by incubation with proteasome inhibitor MG262.

Further investigations showed a reduced expression of NAD(P)H oxidase subunits and enhanced expression of the superoxide dismutase (SOD1), leading to a significantly reduced superoxide anion production. Despite improved endothelium-dependent vasorelaxation of rat aortic rings under proteasome inhibition, expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was reduced. On the other hand, expression of the potent vasoconstrictor endothelin-1 was reduced in proteasome inhibitor treated rings.

In conclusion, proteasome inhibition prevents TNF- $\alpha$ -induced vascular dysfunction in rat aortic rings. Potential mechanisms involve antioxidative properties and suppression of endothelin-1 levels.

### Keywords:

proteasome inhibition, endothelial dysfunction, nitric oxide, reactive oxygen species

## Zusammenfassung

Die endotheliale Dysfunktion ist ein Merkmal vieler kardiovaskulärer Erkrankungen und gekennzeichnet durch die Einschränkung der endothelabhängigen Vasorelaxation. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist der wichtigste Abbauweg intrazellulärer Proteine und an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass niedrigdosierte, nicht toxische Proteasominhibition zu einem endothelprotektiven Expressionsmuster in Endothelzellen führt. Es wird daher die Hypothese aufgestellt, dass niedrigdosierte Proteasominhibition eine endotheliale Dysfunktion verhindern kann.

Der Einfluss von Proteasominhibitoren auf die endotheliale Dysfunktion wurde an isolierten aortalen Gefäßringen der Ratte untersucht. Die Induktion einer endothelialen Dysfunktion erfolgte durch Inkubation der Gefäßringe mit TNF- $\alpha$  für 48 Stunden. Die Vasorelaxation wurde im Organbad mit Acetylcholin und Papaverin nach Phenylephrin-Vorkontraktion unter isometrischen Bedingungen untersucht. Dabei führte TNF- $\alpha$  zu einer dosisabhängigen Abnahme der endothelabhängigen Vasorelaxation. Die Koinkubation der Ringe mit TNF- $\alpha$  und dem Proteasominhibitor MG132 konnte die Abnahme der endothelabhängigen Vasorelaxation dosisabhängig verhindern. Mit dem Proteasominhibitor MG262 wurden die Ergebnisse bestätigt.

Weiterführende Untersuchungen zeigten eine verminderte Expression von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten sowie verstärkte Expression der Superoxiddismutase unter Proteasominhibition, was zu einer signifikanten Abnahme der Superoxidanion-Produktion führte. Trotz verbesserter endothelabhängiger Vasorelaxation der Gefäßringe war die Expression der endothelialen NO-Synthase unter Proteasominhibition vermindert, wohingegen die Expression des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 durch Proteasominhibition reduziert wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Proteasominhibition die Entstehung einer TNF- $\alpha$ -induzierten endothelialen Dysfunktion verhindert. Antioxidative Eigenschaften und die Senkung der Endothelin-1 Expression konnten potentiell verantwortlich gemacht werden.

### Schlagwörter:

Proteasominhibition, endotheliale Dysfunktion, Stickstoffmonoxid, reaktive Sauerstoffspezies

# Widmung

Die vorliegende Arbeit ist meiner lieben Familie gewidmet.

*There is a theory which states that if ever anybody discovers exactly what the Universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable... There is another theory which states that this has already happened.*

– Douglas Adams (1952-2001) in: *The Restaurant at the End of the Universe*, 1980 –

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Funktion des vaskulären Endothels . . . . .	1
1.1.1	Bedeutung und Funktion des Endothels . . . . .	1
1.1.2	Endothelabhängige Vasorelaxation und Vasokonstriktion . . . . .	2
1.1.3	NO und eNOS – Hauptfaktoren der vaskulären Homöostase . . . . .	4
1.1.4	Endothelin-1 als potenter Vasokonstriktor . . . . .	6
1.1.5	Endotheliale Dysfunktion . . . . .	7
1.1.6	Ursachen der endothelialen Dysfunktion . . . . .	8
1.1.7	Oxidativer Stress . . . . .	9
1.1.8	Behandlung der endothelialen Dysfunktion . . . . .	11
1.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System . . . . .	13
1.2.1	Proteasom . . . . .	13
1.2.2	Ubiquitin-Markierung der Proteasom-Substrate . . . . .	14
1.2.3	Funktionen des UPS . . . . .	15
1.2.4	Proteasominhibitoren . . . . .	16
1.2.5	Niedrigdosierte Proteasominhibition . . . . .	19
1.2.6	Niedrigdosierte Proteasominhibition und Endothelfunktion . . . . .	19
1.3	Zielsetzungen . . . . .	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	Das Aortenringmodell . . . . .	22
2.1.1	Tiere . . . . .	23
2.1.2	Präparation von Aorta thoracalis und Gefäßringen . . . . .	23
2.1.3	Langzeitinkubation von Gefäßringen . . . . .	24
2.1.4	Testung der Vasoreaktivität von isolierte Gefäßringen . . . . .	25
2.2	Isolierung von Proteinen . . . . .	28
2.3	Western Blot . . . . .	29
2.3.1	Gelzusammensetzung . . . . .	30
2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	30
2.3.3	Transfer . . . . .	31
2.3.4	Umsetzung der Blots mit Antikörpern . . . . .	31
2.4	RNA . . . . .	33
2.4.1	RNA-Isolation aus Aortenringen . . . . .	33
2.4.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der extrahierten RNA . . . . .	33
2.4.3	Reverse Transkription, DNase-Verdau . . . . .	34
2.4.4	Real-Time RT-PCR . . . . .	35
2.4.5	Primermatrix . . . . .	36
2.5	Messung der Proteasomaktivität . . . . .	38

2.6	Lucigenin–Chemilumineszenz zur Messung der Superoxid-Produktion . . . . .	39
2.7	Messung des Endothelin-Gehalts in Aortenringen . . . . .	40
2.8	Citrullin-Assay zur NO-Produktionsbestimmung . . . . .	41
2.9	Messung des cGMP-Gehalts in Aortenringen . . . . .	42
2.10	Häufig verwendeten Chemikalien und Lösungen . . . . .	44
2.11	Software . . . . .	45
2.12	Statistik . . . . .	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1	Messung der Proteasomaktivität . . . . .	46
3.2	Vasorelaxationsexperimente . . . . .	47
3.2.1	Induktion einer endothelialen Dysfunktion mit TNF- $\alpha$ . . . . .	48
3.2.2	Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch Proteasominhibition . . . . .	49
3.3	Einfluss niedrigdosierter Proteasominhibition auf wichtige vasoaktive Mediatoren . . . . .	55
3.3.1	Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) . . . . .	55
3.3.2	NOS-Aktivität im Citrullin Assay . . . . .	57
3.3.3	mRNA-Expression der cGK-I . . . . .	58
3.3.4	Bestimmung der cGMP-Konzentration . . . . .	59
3.4	Expression von Endothelin-1 . . . . .	60
3.5	Bildung und Abbau reaktiver Sauerstoffradikale . . . . .	62
3.5.1	mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase . . . . .	62
3.5.2	mRNA-Expression der Lipxygenase und der Xanthinoxidase . . . . .	63
3.5.3	Expression der Superoxiddismutase (SOD1) und Katalase . . . . .	64
3.5.4	Superoxidanionproduktion . . . . .	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	TNF- $\alpha$ verursacht eine endotheliale Dysfunktion in aortalen Gefäßringen . . . . .	68
4.2	Niedrigdosierte Proteasominhibition verhindert eine endotheliale Dysfunktion . . . . .	69
4.2.1	Rolle der eNOS . . . . .	70
4.2.2	Rolle von Endothelin-1 . . . . .	71
4.2.3	Rolle oxidativen Stresses . . . . .	73
4.2.4	Proteasominhibition in Aortenringen ohne TNF- $\alpha$ -Schädigung . . . . .	76
4.3	Endothelprotektion durch niedrigdosierte Proteasominhibition . . . . .	77
4.4	Ausblick . . . . .	81
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
	<b>A Abkürzungen</b>	<b>101</b>
	<b>B Danksagung</b>	<b>103</b>
	<b>C Lebenslauf</b>	<b>104</b>
	<b>D Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>105</b>
	<b>E Publikationsverzeichnis</b>	<b>106</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktion des vaskulären Endothels

### 1.1.1 Bedeutung und Funktion des Endothels

Das Gesamtvolumen des Endothels des menschlichen Körpers ist vergleichbar mit dem der Leber [1]. Es bildet mit dem dünnen Stratum subendotheliale die Tunica interna (kurz: Intima) – die innerste Schicht der dreischichtig aufgebauten Gefäßwand. Als Monolayer zwischen Blutstrom und Gefäßwand gelegen, ist das vaskuläre Endothel jedoch weit mehr als eine passive Barriere. Es ist der zentrale Regulator der vaskulären Homöostase.

In Reaktion auf zirkulierende Hormone, Zytokine und Medikamente, als auch auf physikalische und chemische Faktoren synthetisieren Endothelzellen Substanzen, die Gefäßtonus und -permeabilität, Gerinnung, Angiogenese, Inflammation und weitere Bereiche der vaskulären Homöostase regulieren.

Durch Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Vasorelaxation und Vasokonstriktion, Inhibition und Förderung der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, Thrombogenese und Fibrinolyse, nimmt das Endothel die Schlüsselfunktion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ein. Störungen dieses Gleichgewichts können zu endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose führen. Im Rahmen der Regulation des Gefäßtonus übt das Endothel beispielsweise seine Regulatorfunktion durch Produktion von sowohl vasorelaxierenden (z.B. Stickstoffmonoxid, Prostazyklin, endothelium-derived hyperpolarizing factor) als auch vasokonstringierenden Substanzen (z.B. Endothelin-1, Prostanoiden) aus. Der Gefäßtonus ist abhängig von der Balance dieser Faktoren, sowie von der Fähigkeit der glatten Muskelzellen, auf diese zu reagieren. Dysbalance im Sinne einer Abnahme der vasorelaxierenden Funktion hat weitreichende Konsequenzen für das kardiovaskuläre System und kennzeichnet viele Erkrankungen. Die zentrale Bedeutung und die exponierte Lage machen

das Endothel zu einem attraktiven Angriffspunkt bei der Entwicklung pharmakologischer Therapien zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen.

### 1.1.2 Endothelabhängige Vasorelaxation und Vasokonstriktion

Die Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation bedarf eines intakten Endothels, der Verlust des Endothels führt dagegen zur Vasokonstriktion unter Acetylcholin-Stimulation [2]. Diese frühe Erkenntnis beschrieb eindrücklich die Bedeutung eines intakten Endothels für die vaskuläre Tonusregulation. Die Identifikation von Stickstoffmonoxid (NO) als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) etablierte NO als potenten Vasodilatator und zentralen Faktor der vaskulären Homöostase [3–5]. Neben NO synthetisiert und setzt das Endothel eine Reihe von Substanzen frei, die den Gefäßtonus regulieren. Dabei unterscheidet man vom Endothel synthetisierte Vasodilatoren und Vasokonstriktoren.

Die endothelabhängige Vasorelaxation erfolgt hauptsächlich durch Bildung und Freisetzung von NO, Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>, auch: Prostazyklin) und EDHF (engl.: *endothelium-derived hyperpolarizing factor*). Der jeweilige Anteil von NO, PGI<sub>2</sub> und EDHF an der endothelabhängigen Vasorelaxation kann variieren. So nimmt z. B. die Bedeutung von EDHF mit abnehmender Gefäßgröße zu [6]. NO gilt jedoch als der wichtigste Vasodilatator im Gefäßsystem, dessen protektive Wirkungen allerdings nicht ausschließlich auf die Regulation des Gefäßtonus beschränkt sind (siehe Abschnitt 1.1.3). Anschließend wird kurz auf PGI<sub>2</sub> und EDHF eingegangen.

Viele NO-freisetzende Signale führen auch zur Bildung von PGI<sub>2</sub>, dem Hauptprodukt der vaskulären Cyclooxygenase. Neben der potenten Hemmung der Plättchenaggregation ist PGI<sub>2</sub> auch ein endothelabhängiger Vasodilatator. Über Bindung an Prostazyklin(IP)-Rezeptoren und Aktivierung der Adenylatzyklase in vaskulären glatten Muskelzellen relaxiert PGI<sub>2</sub> cAMP-abhängig und agiert synergistisch zu NO auf glatte Muskelzellen und Blutplättchen [7]. Die relaxierende Wirkung ist jedoch auf Stromgebiete mit entsprechendem Rezeptorbesatz limitiert [8]. Der Beitrag von PGI<sub>2</sub> zur endothelabhängigen Vasorelaxation wird als eher gering eingestuft [6]. In spontan hypertensiven Ratten kann PGI<sub>2</sub> paradoxerweise auch Gefäßkontraktionen auslösen [1].

Da die Ausschaltung des NO/cGMP- und des PGI<sub>2</sub>/cAMP-Wegs die endothelabhängige Vasorelaxation nicht komplett aufhebt, wird die Existenz eines weiteren endothelabhängigen Vasodilatators angenommen, der seine Wirkung über die Aktivierung von Kalium-Kanälen und Hyperpolarisation glatter Muskelzellen entfaltet [9]. Dieser Vasodilatator wird als EDHF bezeichnet. Die biochemische Identität von EDHF ist nicht vollständig geklärt. Das Akronym EDHF steht nicht für eine einzige Substanz, sondern für eine Gruppe von Faktoren, welche zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen führen [9]. Dazu zählen aus Arachidonsäure Cytochrom P 450-abhängig synthetisierte Epoxyeicosatriensäuren (EETs) [10], Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [11] und Kaliumionen [12]. Eine EDHF-vermittelte Vasorelaxation kann – zumindest partiell – eine NO-Defizienz kompensieren [13]. Auch NO und PGI<sub>2</sub> können eine Hyperpolarisation auslösen [9].

Der endothelabhängigen Vasorelaxation entgegengesetzt ist die endothelabhängige Vasokonstriktion – entweder indirekt durch Neutralisierung vasorelaxierender Faktoren oder durch Bildung vasokonstringierender Substanzen. Ersteres trifft für Superoxidanionen zu, die NO inaktivieren und dessen vasorelaxierende Wirkung aufheben. Darüber hinaus hemmen Sauerstoffradikale die Signalwege der drei großen Vasodilatoren NO, Prostazyklin und EDHF [1] und begünstigen damit die endothelabhängige Vasokonstriktion.

Das Endothel ist jedoch auch Bildungsort direkter Vasokonstriktoren [14]. Dazu zählen die beiden Arachidonsäurederivate Prostaglandin H<sub>2</sub> und Thromboxan A<sub>2</sub>, welche durch die Cyclooxygenase (COX) bzw. Thromboxansynthase synthetisiert werden und rezeptorvermittelt über eine Senkung der cAMP-Konzentration zur Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen führen [8]. Angiotensin II wird durch Oberflächenexpression des Angiotensin Converting Enzyms (ACE) gebildet. Endothelin-1 wird von Endothelzellen synthetisiert und gilt als potentester Vasokonstriktor [15].

Das Gleichgewicht zwischen vasorelaxierenden und vasokonstringierenden Faktoren kennzeichnet die Tonusregulation unter physiologischen Bedingungen. Überproportionaler Einfluss der einen oder anderen Gruppe ist dagegen Merkmal verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen. So überwiegt im Rahmen der arteriellen Hypertension der Einfluss der Vasokonstriktoren, im Gegensatz dazu ist der septische Schock durch überschießende Vasorelaxation gekennzeichnet. In Tabelle 1.1 sind wichtige Mediatoren der endothelialen Tonusre-

gulation zusammengestellt. Die Abschnitte 1.1.3 und 1.1.4 befassen sich näher mit NO und ET-1 – zwei zentrale, im Rahmen der Arbeit wichtige, Faktoren.

Tabelle 1.1: **Auswahl endothelialer Vasodilatoren und -konstriktoren.**

<b>Vasodilatoren</b>	<b>Vasokonstriktoren</b>
Stickstoffmonoxid (NO)	Thromboxan A <sub>2</sub> (TxA <sub>2</sub> )
Prostazyklin (PGI <sub>2</sub> )	Prostaglandin H <sub>2</sub> (PGH <sub>2</sub> )
EDHF	Endothelin-1 (ET-1)
– H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Angiotensin II
– EET	Isoprostane
– Kaliumionen	Uridinadenosintetraphosphat
C-natriuretisches Peptid	

### 1.1.3 NO und eNOS – Hauptfaktoren der vaskulären Homöostase

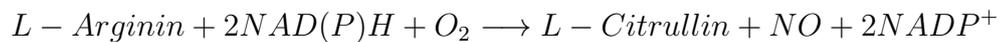
Stickstoffmonoxid (NO) ist in vielerlei Hinsicht ein zentrales Element der vaskulären Homöostase. Als Vasodilatator antagonisiert NO die Wirkung verschiedener Vasokonstriktoren. Außerdem hemmt NO die Thrombozytenaggregation, die Leukozytenadhäsion an das Endothel und die Proliferation glatter Muskelzellen. Diese Eigenschaften machen NO zu einem wichtigen Element der endogenen Abwehr gegen Inflammation, Thrombose und Gefäßschädigung – Schlüsselereignisse im Verlauf von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose [16].

Seine vasorelaxierende Wirkung erreicht NO durch Diffusion in das Zytosol der vaskulären glatten Muskelzellen und Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Dies führt zum Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP), Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGK, auch PKG), Abfall der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in glatten Muskelzellen und nachfolgender Relaxation [5, 17].

NO wird durch die NO-Synthase aus L-Arginin gebildet. Es existieren drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase: Die endotheliale (eNOS bzw. NOS III) und die neuronale NO-Synthase (nNOS bzw. NOS I) werden auch als konstitutive NO-Synthasen bezeichnet, sowie die induzierbare NO-Synthase (iNOS bzw. NOS II). Alle Isoformen sind ähnlich aufgebaut, innerhalb des Körpers haben sie jedoch unterschiedliche Bedeutung. Die gleiche Zellart kann dabei auch mehr als eine Isoform exprimieren. So ist die Expression der eNOS nicht allein auf Endothelzellen beschränkt, sondern konnte in mehreren nicht-endothelialen Zellen

nachgewiesen werden [18]. Im Gefäßsystem wird NO hauptsächlich durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet [18].

Die endotheliale NO-Synthase ist als Homodimer aktiv und erfordert die Anwesenheit mehrerer Kofaktoren. Ein eNOS-Monomer besteht aus einer C-terminalen Reduktase-Untereinheit und der N-terminalen Oxidase-Untereinheit, welche durch eine Calmodulin-bindende Brücke verbunden werden. Die C-terminale Reduktase-Untereinheit verfügt über Bindungsstellen für Flavinmononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Nicotinamidadeninukleotidphosphat (NAD(P)H) und generiert Elektronen durch Dehydrogenierung von NAD(P)H. Die Oxidase-Untereinheit enthält das katalytische Zentrum und bindet die Kofaktoren Haem, Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und das Substrat L-Arginin [19]. Die Biosynthese von NO erfolgt nach der Gleichung [5]:



Die eNOS-Aktivität wird durch eine Reihe von Faktoren reguliert. Calmodulin (CaM) ist ein allosterischer Aktivator der eNOS. Ein Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> nach Stimulation durch endogene Vasodilatoren oder laminaren Scherstress führt über eine vermehrte Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplex-Bildung zur Verdrängung des Inhibitors Caveolin-1 und somit zur Aktivierung der eNOS [20].

Die Aktivität des eNOS-Dimers ist abhängig von der Anzahl gebundener BH<sub>4</sub>-Moleküle. Ein mit BH<sub>4</sub> gesättigtes Dimer agiert als reine NO-Synthase, während bei nur geringer Bindung von BH<sub>4</sub> anstelle von NO Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) synthetisiert werden [21], was als Entkopplung („*uncoupling*“) der eNOS bezeichnet wird [22].

Bei der posttranslationalen eNOS-Regulation spielen Phosphorylierungen eine entscheidende Rolle. So führt zum Beispiel die Akt-abhängige Phosphorylierung des Serinrests 1177 zu einer Zunahme der eNOS-Aktivität [23]. Die Bindung des Substrats L-Arginin an das katalytische Zentrum kann durch asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), einen endogenen kompetitiven Inhibitor, verhindert werden [24].

Die eNOS-Expression kann beispielsweise durch Scherstress (z.B. durch Sport), Wachstumsfaktoren (TGF-β) sowie Hormone (Östrogene) verstärkt werden [18]. Im Gegensatz dazu reduziert Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) die Halbwertszeit von eNOS-mRNA [25] und führt somit zur Expressionsabnahme. Die Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit ist eine Hauptursache der endothelialen Dysfunktion und fördert die Atherogenese (siehe 1.1.6).

### 1.1.4 Endothelin-1 als potenter Vasokonstriktor

Endothelin-1 (ET-1) ist ein potenter Vasokonstriktor und wird als Gegenspieler von NO in der Regulation des Gefäßtonus bezeichnet [26]. ET-1 ist der wichtigste Vertreter der Endotheline (ET-1, ET-2, ET-3). Endotheline bestehen aus 21 Aminosäuren, werden durch ein Endothelin Converting Enzyme (ECE) aus Big-Endothelin gebildet, welches wiederum durch Endopeptidasen aus Präpro-Endothelin-Peptiden entsteht. Endotheline werden nicht nur von vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen gebildet, sondern auch von neuronalen, renalen und pulmonalen Zellen [27].

ET-1 wirkt vornehmlich para- und autokrin [28] auf  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptoren der Endothel- und glatten Muskelzellen, folglich sind die zu messenden ET-1-Plasmakonzentrationen sehr niedrig [27]. Stimulation der  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptoren auf glatten Muskelzellen führt über die Phospholipase C, Inositoltriphosphat und Diacylglycerol zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und konsekutiver Kontraktion [27].  $ET_B$ -Rezeptoren auf Endothelzellen stimulieren dagegen die Freisetzung von NO und Prostazyklin und führen zur Vasodilatation [29]. In der Lungenstrombahn agieren  $ET_B$ -Rezeptoren als Clearance-Rezeptoren [30].

Die Bedeutung von ET-1 für die vaskuläre Tonusregulation konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Infusion von ET-1 führt zu Vasokonstriktion nach einer kurzen Phase der  $ET_B$ -Rezeptor-vermittelten Vasodilatation [31]. Infusion eines  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten in die Arteria brachialis senkt den peripheren Widerstand sowie den arteriellen Blutdruck [32]. Die Rolle von ET-1 im Rahmen der Pathogenese der arteriellen Hypertension ist noch nicht vollständig geklärt. Überexpression von ET-1 in der Gefäßwand konnte in einigen Tiermodellen der arteriellen Hypertension gezeigt werden [33]. Bei Patienten mit essentieller Hypertension wurden erhöhte ET-1-Plasmakonzentrationen festgestellt [34]. Zwar ist bei gesunden Patienten ET-1 fast ausschließlich in Endothelzellen nachweisbar, bei Bluthochdruck und koronarer Herzkrankheit (KHK) lassen sich jedoch große Mengen ET-1 in der Tunica media verschiedener Arterien nachweisen [35]. Die endotheliale Dysfunktion in hypertensiven Tiermodellen konnte durch  $ET_A$ -Rezeptorantagonisierung verbessert werden [36].

Neben der Vasokonstriktion fördert ET-1 die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen sowie die vaskuläre und myokardiale Hypertrophie.  $ET_A$ -Rezeptorantagonisierung verhindert Hypertrophie von Gefäßen und vermindert linksventrikuläre Hypertrophie in hypertensiven Tiermodellen [27, 33].

### 1.1.5 Endotheliale Dysfunktion

Eine verbreitete Definition beschreibt die endotheliale Dysfunktion als ein Ungleichgewicht von auf das Endothel einwirkenden sowie vom Endothel produzierten vasorelaxierenden und vasokonstringierenden Substanzen [37]. Betrachtet man die Vielfalt an regulatorischen Funktionen des Endothels, so wird klar, dass sich eine Funktionsstörung des Endothels nicht ausschließlich auf die Tonusregulation auswirkt. Im klinischen Alltag jedoch bietet es sich an, durch Messung der vasorelaxierenden Kapazität *in vivo* auf den endothelialen Funktionszustand zu schließen. Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit Änderungen der arteriellen Vasorelaxation.

Die Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasorelaxation – ein Hauptmerkmal der endothelialen Dysfunktion – konnte früh an Tiermodellen der arteriellen Hypertension [38] und Hypercholesterinämie gezeigt werden [39]. Es folgten ähnliche Beobachtungen an arteriosklerotisch veränderten humanen Koronargefäßen, die sogar eine paradoxe Vasokonstriktion unter Acetylcholin-Infusion zeigten [40]. Heute wird die endotheliale Dysfunktion nicht nur mit Atherosklerose und Hypertension, sondern mit einer Reihe von physiologischen (z.B. Alter, postprandiale Lipidämie, Postmenopause), vor allem jedoch pathophysiologischen Prozessen (z.B. Infektion und Inflammation, Diabetes mellitus, Adipositas usw.) assoziiert [1]. Die Bedeutung der endothelialen Dysfunktion im Rahmen der Atherogenese konnte mehrfach gezeigt werden [41]. Dabei spielen Störungen der endothelialen Integrität eine wichtige Rolle in allen Phasen der Atherogenese, von der Initiierung atherosklerotischer Läsionen bis hin zur Plaqueruptur. Der Verlust protektiver Eigenschaften des dysfunktionalen Endothels lässt das ungehinderte Wirken proatherogener Faktoren zu und fördert somit die Atherogenese [16].

Der Nachweis einer endothelialer Dysfunktion in Gefäßen ohne erkennbare atherosklerotische Läsionen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren [42] betont die Rolle der endothelialen Dysfunktion in der frühen Phase der Atherosklerose. Die Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren (z.B. Hypercholesterinämie, Hypertension, Diabetes, Rauchen usw.) ist ein unabhängiger Prediktor für das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion [43]. Mehrere Studien zeigten erhöhte kardiovaskuläre Ereignisraten bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion [44–46]. Wiederherstellung der Endothelfunktion ist mit kardiovaskulärer Ereignisfreiheit assoziiert [47]. Demnach lassen sich durch Testung der endothelabhängigen

Vasorelaxation prognostische Aussagen über den Krankheitsverlauf von Risikopatienten machen [48].

Invasiv kann die Endothelfunktion z.B. angiographisch durch Acetylcholin-Infusion in Koronararterien untersucht werden. Entsprechend dem Ausmaß der endothelialen Schädigung kommt es zur unterschiedlich starken Vasorelaxation oder gar – im Falle einer vollständigen Endotheldenudation – paradoxen Vasokonstriktion. Die nichtinvasive sonographische Untersuchung der NO-vermittelten, flussabhängigen Dilatation (FMD, „*flow-mediated dilation*“) nach kurzer Ischämie der Arteria brachialis ist eine akzeptierte Methode zur Beurteilung der Endothelfunktion [49]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Endothelfunktion ex vivo evaluiert – an isolierten Gefäßringen der Ratte durch endothelabhängige Vasorelaxation mit Acetylcholin.

### 1.1.6 Ursachen der endothelialen Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion bzw. die verminderte endothelabhängige Vasorelaxation ist multifaktoriell bedingt. Im Vordergrund steht dabei die Abnahme der Bioverfügbarkeit von NO durch eingeschränkte Produktion und/oder durch verstärkte Degradation. Die Mechanismen, die zur Reduktion der Bioverfügbarkeit führen, können in Abhängigkeit von der jeweiligen Pathologie sehr unterschiedlich sein.

Ein Großteil der Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit bei kardiovaskulären Erkrankungen erfolgt durch die im Rahmen dieser Erkrankungen vermehrt anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Verstärkte Produktion von Superoxidanionen bei geschwächter zellulärer antioxidativer Abwehr führt zur schnellen NO-Degradation und Reduktion der Menge an bioaktivem NO [50]. Abschnitt 1.1.7 geht näher auf den oxidativen Stress im Rahmen der endothelialen Dysfunktion ein.

Die verminderte Produktion von NO kann sowohl durch reduzierte eNOS-Expression als auch durch eine reduzierte eNOS-Aktivität bedingt sein. So kann die eNOS-Expression durch proatherogene Stimuli wie Zytokine und LDL reduziert werden [18]. Posttranslational kann die Aktivität der eNOS z.B. durch Dephosphorylierung und endogene eNOS-Inhibitoren (asymmetrisches Dimethylarginin, ADMA) gesenkt werden [24]. Trotz erhöhter eNOS-Expression kann die endothelabhängige Vasorelaxation vermindert sein. Diese kompensatorische Expressionsverstärkung, wie in hypercholesterinämischen Tiermodellen [18] und bei Diabetes

mellitus [51] zu beobachten, ist jedoch ineffektiv, da hier eine vermehrt dysfunktionale eNOS in entkoppeltem Zustand nicht NO generiert, sondern selbst Superoxid produziert.

Die verminderte Vasorelaxation im Rahmen der endothelialen Dysfunktion kann jedoch auch durch Störungen in der nachgeschalteten Singalkaskade bedingt sein, z. B. durch verminderte Expression und Aktivität der löslichen Guanylatcyclase (sGC), der cGMP-abhängigen Proteinkinase (cGKI) sowie durch erhöhte Expression und Aktivität von Phosphodiesterasen (PDEs) [17].

Die vermehrte Produktion von vasokonstriktorisches Mediatoren wie Endothelin-1 kann zusätzlich zu seiner direkten vasokonstriktorisches Wirkung die NO-Bioverfügbarkeit durch Stimulation der Superoxid-Produktion [52] und Hemmung der eNOS-Expression [53] reduzieren.

### 1.1.7 Oxidativer Stress

Unter physiologischen Bedingungen sind reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. das Superoxid-anion ( $O_2^-$ ), wichtige Signalmoleküle und Regulatoren von Zellzyklus, Genexpression und Proteinkinase-Aktivität. Im gesunden Endothel wird die Radikalproduktion durch enzymatische (z.B. Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase) und nicht-enzymatische (z.B.  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin, Ascorbinsäure) Anti-Oxidantien reguliert. So reduzieren Superoxiddismutasen Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches z.B. durch Katalase und Glutathionperoxidase zu Wasser metabolisiert wird.

Erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies, hervorgerufen durch ein Ungleichgewicht von Radikalproduktion und -elimination, bezeichnet man als oxidativen Stress. Eine Folge davon ist die Oxidation von Makromolekülen wie DNA, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden. Dem oxidativen Stress wird eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression vieler kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben [54]. In vaskulären Zellen können Superoxidanionen durch Enzyme der Atmungskette, die Xanthinoxidase, die Cyclooxygenase, die Lipoxygenase, Cytochrom P450 Monooxygenasen, die entkoppelte eNOS (siehe Abschnitt 1.1.3) und NAD(P)H Oxidasen produziert werden [55].

Obwohl die pathologischen Zustände, in denen die endotheliale Dysfunktion eine Rolle spielt, sehr unterschiedlich sind, ist oxidativer Stress ein gemeinsames, wichtiges Merkmal. Reaktive Sauerstoffspezies hemmen die Vasorelaxation durch Prostacyclin, EDHF und NO [1]. Die

NO-Bioverfügbarkeit wird durch beschleunigte NO-Degradation durch Superoxidanionen reduziert. NO wird durch die Reaktion mit  $O_2^-$  zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) inaktiviert. Diese Reaktion ist dreimal schneller als die Reaktionsgeschwindigkeit von  $O_2^-$  mit der SOD. Das Reaktionsprodukt, Peroxynitrit, kann durch seine oxidativen Effekte selbst zum oxidativen Stress beitragen [50]. Zudem können Superoxidanionen die lösliche Guanylatcyclase inhibieren [56].

Hauptquelle der Superoxidanionen in Gefäßen sind NAD(P)H-Oxidasen [57] – ähnlich der für den *respiratory burst* verantwortlichen NAD(P)H-Oxidase in Granulozyten. Sie katalysieren die Einelektronenreduktion von Sauerstoff mit den Elektronendonoren NAD(P)H bzw. NADH. Eine erhöhte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität ist mit der endothelialen Dysfunktion und mit atherosklerotischen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie und Diabetes assoziiert [58]. Da die NAD(P)H-Oxidase von Bedeutung in der vorliegenden Arbeit ist, geht der nachfolgende Abschnitt näher auf die NAD(P)H-Oxidase ein.

Die granulozytäre NAD(P)H-Oxidase besteht aus den zwei membranständigen Untereinheiten gp91phox (auch: Nox2, 91 kDa) und gp22phox (22 kDa), mehreren zytoplasmatischen Untereinheiten (p47phox, p67phox, p40phox) und einem regulatorischen G-Protein (Rac). Das Glykoprotein gp91phox hat Bindungsstellen für NAD(P)H und Sauerstoff wie auch Flavin- und Hämgruppen, um den Elektronentransfer zwischen den beiden Substraten zu gewährleisten. Der Komplex aus gp91phox und p22phox bildet den Cytochrom b558 Komplex und ist notwendig für die Oxidase-Aktivität. Neben der Membrantranslokation der zytoplasmatischen Untereinheiten p40phox, p47phox und p67phox ist auch die GTPase Rac wichtig im Rahmen der Oxidase-Aktivierung [59, 60].

gp91phox-enthaltende NAD(P)H-Oxidasen werden auch in vaskulären Zellen exprimiert. Zusätzlich konnten eine Gruppe gp91phox-homologer Untereinheiten in vaskulären Zellen identifiziert werden, die mit Nox1–7 bezeichnet werden (Nox2 wird synonym für gp91phox verwendet). Die Expression der Isoformen in den vaskulären Zelltypen ist komplex: Jede Gefäßschicht für sich scheint dabei eine bestimmte Zusammensetzung von NAD(P)H-Oxidasen zu haben, die zudem speziesvariabel zu sein scheint [60]. Nox4, p22phox, p47phox und Rac1 scheinen von allen vaskulären Zellen exprimiert zu werden. Dagegen wird Nox2 besonders in adventitiellen Fibroblasten und Endothelzellen, Nox1 in glatten Muskelzellen

exprimiert [60]. Die Hauptquelle von  $O_2^-$  in Endothelzellen sind Nox4-enthaltende NAD(P)H-Oxidasen [61].

Die Aktivität und Expression der vaskulären NAD(P)H-Oxidasen wird durch Faktoren reguliert, die auch im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen (zur Übersicht siehe [60]). So aktiviert Angiotensin II über seinen  $AT_1$ -Rezeptor die NAD(P)H-Oxidase, steigert die Superoxidproduktion und induziert die Expression von gp91phox [62]. Auch ET-1 induziert die Expression von gp91phox [52], ebenso kann TNF- $\alpha$  die NAD(P)H-Oxidase p47phox-abhängig aktivieren [63].

### 1.1.8 Behandlung der endothelialen Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion ist Merkmal einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen. Die Behandlung der Grunderkrankung kann zur Wiederherstellung der endothelialen Funktion beitragen. Dabei ist auch die Beseitigung kardiovaskulärer Risikofaktoren von Bedeutung. Eine endotheliale Dysfunktion erscheint dabei zumindest teilweise reversibel, wenn der schädigende Einfluss beseitigt wird. So verbessert sich die Endothelfunktion bei Rauchern bei entsprechender Rauchabstinenz, mit einem Maximum der Funktionsverbesserung nach ca. zwei Jahren [64, 65]. Im Rahmen der arteriellen Hypertonie verbessert Sport die endothelabhängige Vasorelaxation [66].

Lipidsenkende Therapien, wie Diät [67], LDL-Apharese [68] oder die medikamentöse Therapie mit Cholestyramin [69], können zur Endothelfunktionsverbesserung führen. Einige Wirkstoffe, welche breite Anwendung bei der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen finden, können eine endotheliale Dysfunktion positiv beeinflussen. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-(HMG-CoA-Reduktase-) Inhibitoren (Statine) verbessern die endothelabhängige Vasorelaxation in Koronararterien und peripheren Arterien hypercholesterinämischer und gesunder normocholesterinämischer Patienten (zur Übersicht [41]). Dabei lässt sich die Verbesserung der endothelabhängigen Vasorelaxation sehr früh nach Therapiebeginn, noch vor einer erkennbaren Senkung des Plasma-LDL, nachweisen [70, 71]. Verantwortlich dafür werden pleiotrope, Cholesterin-unabhängige Effekte der Statine gemacht. Dazu werden die antioxidativen, antiinflammatorischen und immunomodulatorischen Effekte der Statine gezählt [72]. Darüber hinaus verbessern Statine die

NO-Bioverfügbarkeit durch Steigerung der eNOS-Expression und -Aktivität, Reduktion der Caveolin-1-Expression, Verstärkung der Hsp90-Expression sowie durch Stabilisierung der eNOS mRNA [16, 65, 72]. Vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit sei erwähnt, dass die pleiotropen Effekte von Statinen nicht auf eine Modulation der proteasomalen Aktivität zurückzuführen sind [73].

Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (ACE-Inhibitoren) können ebenfalls eine endotheliale Dysfunktion verbessern [27, 65]. So verbessert Quinapril die endotheliale Dysfunktion in Koronararterien bei KHK-Patienten [74]. ACE-Inhibitoren hemmen die Freisetzung der vasoaktiven Mediatoren Angiotensin II und Endothelin-1, welche potente Stimulatoren der Superoxidproduktion sind. Erhöhte Konzentrationen von Bradykinin unter ACE-Inhibition stimulieren zusätzlich die NO-Freisetzung [75].

Auch Substitution von Kofaktoren der NO-Synthese oder Antioxidantien bei Risikopatienten kann zur Verbesserung einer endothelialen Dysfunktion führen. So verbessert eine orale Langzeitbehandlung von hypercholesterinämischen Patienten mit Tetrahydrobiopterin die Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation der Arteria brachialis [76]. Die orale Gabe von L-Arginin verbessert die flussvermittelte endothelabhängige Vasodilatation (FMD) bei Patienten mit essentieller arterieller Hypertension [77]. Ascorbinsäure verbessert die Endothelfunktion bei Patienten mit arterieller Hypertension durch verminderte Degradation von NO durch Superoxidanionen [78].

Die vorliegende Arbeit soll Abschluss darüber bringen, ob die Modifikation des UPS durch Proteasominhibitoren eine experimentell induzierte endotheliale Dysfunktion verbessern kann.

## 1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist der wichtigste Abbauweg intrazellulärer Proteine und befindet sich im Cytosol und im Kern aller eukaryotischen Zellen. 80-90% des intrazellulären Proteinabbaus erfolgt über das Proteasom und ist hemmbar durch Proteasominhibitoren oder ATP-Depletion [79–81]. Demnach ist das UPS an der Regulation vieler zellulärer Prozesse beteiligt und notwendig für die Lebensfähigkeit der Zelle [82].

Für die Beschreibung des Ubiquitin-vermittelten Abbaus von Proteinen wurden die Forscher Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose im Jahr 2004 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

### 1.2.1 Proteasom

Das 26S Proteasom ist ein multifunktionaler proteolytischer Komplex, bestehend aus dem katalytischen Kern, dem 20S Proteasom, und zwei regulatorischen 19S Untereinheiten (zur Übersicht [83]).

Das zylinderförmige 20S Proteasom ist ein 700–750 kDa schweres Molekül aus vier übereinanderliegenden Ringen, welche einen zentralen Hohlraum umschließen [84], in dem die Proteolyse erfolgt. Die zwei identischen inneren  $\beta$ -Ringe und die zwei ebenfalls identischen äußeren  $\alpha$ -Ringe bestehen aus sieben verschiedenen  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ - Untereinheiten [85]. Somit besteht ein eukaryotisches 20S-Proteasom aus 28 Untereinheiten und zwei identischen Hälften [86] (Abbildung 1.1).

Die inneren  $\beta$ -Ringe tragen die proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms: In Eukaryoten verfügt jeder der zwei  $\beta$ -Ringe über eine *chymotrypsin-like* Aktivität (schneidet nach hydrophoben Resten), eine *trypsin-like* Aktivität (schneidet nach basischen Resten) und eine *caspase-like* Aktivität (schneidet nach sauren Resten) [87]. Weitere proteolytische Aktivitäten werden diskutiert.

Anders als sonstige Peptidasen benutzen alle proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms Hydroxylreste von terminalen Threoninresten der  $\beta$ -Untereinheiten als Nukleophile [88], welche die Peptidbindungen angreifen. Außerdem werden Proteine schrittweise, ohne Freigabe von Zwischenprodukten, in kleine Peptide von 3-20 Aminosäuren Länge gespalten [89]. Die entstehenden Oligopeptide werden durch zytosolische Exopeptidasen weiter zu Aminosäuren abgebaut oder über den MHC I Komplex auf der Zelloberfläche als Antigen präsentiert.

Alle Aktivitäten sind dem Inneren des zylinderförmigen 20S Proteasoms zugewandt. Der Eintritt der Substrate in diesen Hohlraum erfolgt über die  $\alpha$ -Ringe. Sie haben eine strukturgebende Funktion [90], verschließen den proteolytischen Kern und verhindern somit den unkontrollierten Abbau zytosolischer Proteine [84, 91].

Das isolierte 20S Proteasom degradiert Proteine sehr langsam [83]. Es kann zwar entfaltete und kurze Peptide hydrolysieren – jedoch keine polyubiquitinierten Proteine [92]. Die proteolytische Aktivität kann durch Bindung der endogenen, regulatorischen Komplexe 19S (auch: PA700) und 11S (auch: PA28) an die  $\alpha$ -Untereinheiten stimuliert werden [83].

Das hantelförmige, 2,4 MDa schwere 26S Proteasom entsteht durch Bindung von zwei 19S Komplexen an die äußeren  $\alpha$ -Ringe. Der 19S Komplex besteht aus zwei Teilen – *base* und *lid*. Die Funktion des *lid* ist noch unklar, möglich ist die Erkennung und Abspaltung der Ubiquitinketten von Substraten. Die *base* bindet an den 20S Kern und trägt sechs ATPase-Aktivitäten. Diese ermöglichen die Entfaltung der abzubauenen Proteine (*chaperone-like activity* [93]) sowie die ATP-abhängige Öffnung der  $\alpha$ -Ringe des 20S-Komplexes, wodurch entfaltete Proteine in den katalytischen Kern gelangen [92, 94]. Die Bindung des 11S Komplexes (auch: PA28) ist von Bedeutung im Rahmen der Antigenpräsentation über MHC I [95, 96]. Durch Bindung dieser beiden regulatorischen Proteine entstehen verschiedene Unterformen, die sich in Aufbau und Funktion unterscheiden [97].

### 1.2.2 Ubiquitin-Markierung der Proteasom-Substrate

Der Abbau von Proteinen über das UPS erfordert zwei aufeinanderfolgende Prozesse: 1. Markierung der Proteine mit Ubiquitin-Molekülen 2. Abbau der markierten Proteine durch das Proteasom und der konsekutiven Freisetzung von freien und wiederverwendbaren Ubiquitin-Molekülen [82].

Die Ubiquitinierung erfolgt in drei Schritten [92] (Abbildung 1.1). Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 erzeugt mit Hilfe von ATP ein E1-Thiolester-Ubiquitin-Zwischenprodukt, welches mit Bildung eines weiteren Zwischenprodukts auf ein Ubiquitin-Carrier-Protein E2 übertragen wird. Eine der zahlreichen bereits heute identifizierten Ubiquitin-Protein-E3-Ligasen bindet spezifisch ein zum Abbau vorgesehenes Protein und überträgt das aktivierte Ubiquitin-Molekül auf einen Lysinrest des Substrats oder auf einen internen  $\text{NH}_2$ -Rest schon gebundener Ubiquitin-Moleküle. Die dabei entstehenden Ubiquitin-Ketten werden vom Proteasom erkannt – Ketten aus mindestens vier Ubiquitin-Molekülen sind dabei notwendig für

eine effiziente Bindung an das Proteasom [98]. Eukaryotische Zellen enthalten möglicherweise mehrere hundert E3-Ligasen, welche verschiedene Degradationssignale von Proteinen erkennen und somit einen spezifischen Markierungsweg ermöglichen [99].

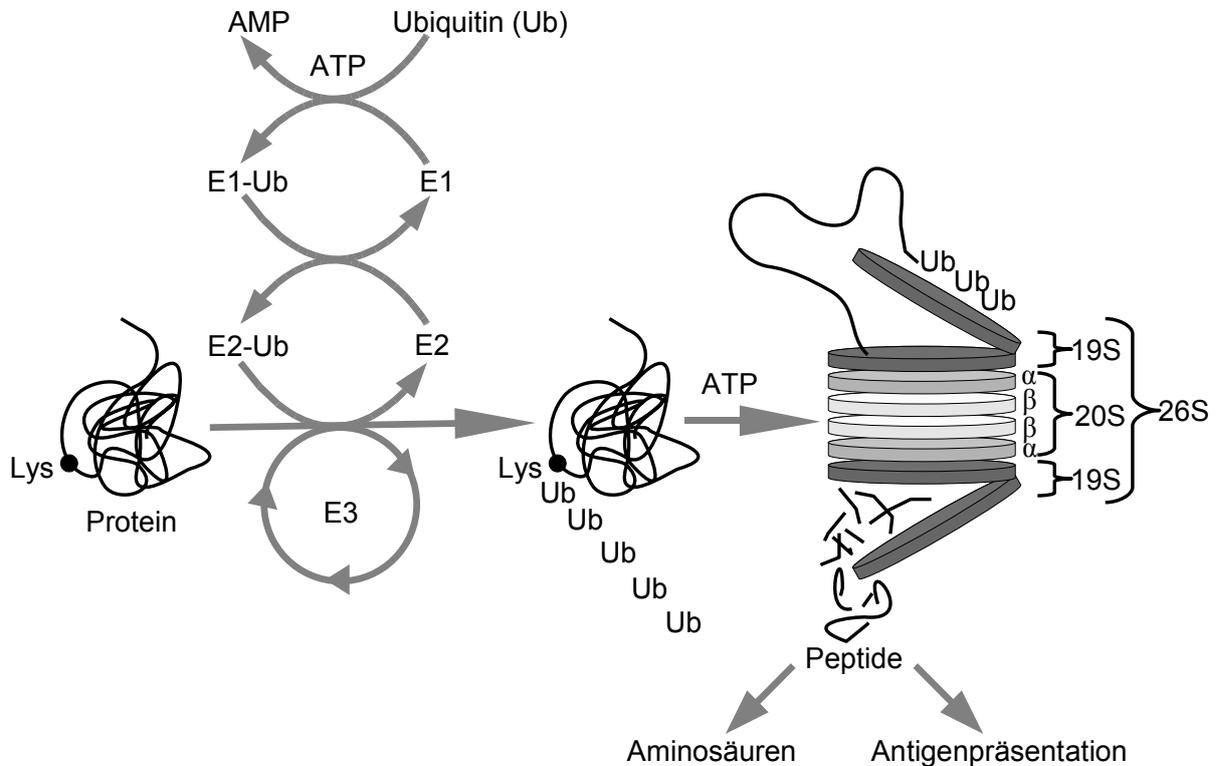


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS).

### 1.2.3 Funktionen des UPS

Eine Hauptaufgabe ist die Degradation von gealterten, geschädigten Proteinen sowie der Abbau von durch Mutation und Synthesefehlern entstandenen Proteinen. Über 30% aller synthetisierten Proteine sind defekt und werden über das Proteasom abgebaut [100]. Die Funktion des UPS ist jedoch nicht allein auf die Degradation von abnormen Proteinen beschränkt. So spielt das UPS durch Degradation von Transkriptionsfaktoren, Enzymen und regulatorischen Proteinen eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse. Tabelle 1.2 zeigt eine Auswahl von Substraten des UPS.

So kommt dem UPS eine wichtige Rolle zum einen bei der Synthese als auch bei der Aktivitätsregulation des Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  zu. Die Synthese der p50-Untereinheit von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  erfolgt durch limitierte Proteolyse des p105-Vorläuferproteins im Proteasom [101].

Tabelle 1.2: **Funktionsbereiche ausgewählter Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems.** Modifiziert nach [99].

Funktionsbereich	Substrat
Zellzyklus	Zykline, p27 <sup>Kip1</sup> , p21
anti-apoptotische Faktoren	Bcl-2, cIAP, XIAP,
pro-apoptotische Faktoren	p53, Bax, Bid, Caspase 3, Caspase 7
Regulation der Genexpression	c-jun, E2F1, I $\kappa$ B, $\beta$ Catenin, Nrf2
Inflammation	I $\kappa$ B, p105-Vorläuferprotein von NF $\kappa$ B,
Antigenpräsentation über MHC I	eine Vielzahl intrazellulärer Proteine

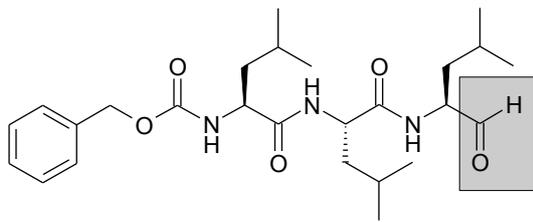
Die Aktivierung von NF $\kappa$ B erfolgt durch Ubiquitinierung und anschließende Degradation seines Inhibitors, I $\kappa$ B [102]. Erst nach proteasomalem Abbau von I $\kappa$ B wird NF $\kappa$ B in den Zellkern transloziert, um die Expression verschiedener proinflammatorischer Mediatoren zu verstärken [103].

Durch Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau von Regulatoren der Apoptose ist das UPS ein Hauptfaktor in der Regulation des programmierten Zelltods [104], durch Abbau von Zyklinen und Inhibitoren der cyclin dependent kinases (CDK) wird der Zellzyklus beeinflusst. Besondere Bedeutung hat das UPS bei der Antigenpräsentation über MHC I [105].

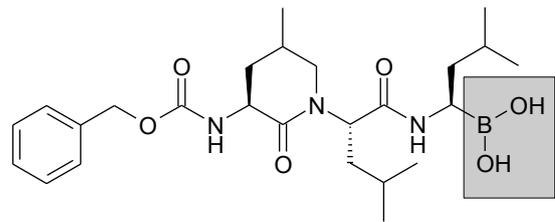
### 1.2.4 Proteasominhibitoren

Proteasominhibitoren haben große Bedeutung bei der Aufklärung der Funktion des Proteasoms erlangt. Obwohl das Proteasom mehrere proteolytische Aktivitäten besitzt, reicht die Inhibition der chymotrypsin-like Aktivität aus, um den Großteil des Proteinabbaus zu hemmen [81]. Die Inhibition der caspase-like und der trypsin-like Aktivitäten haben wenig Einfluss auf die Gesamtproteolyse. Fast alle bekannten Proteasominhibitoren hemmen vorrangig die chymotrypsin-like Aktivität, mit wesentlich geringer ausgeprägten Effekten auf die restlichen proteolytischen Aktivitäten [99].

Proteasominhibitoren lassen sich in folgende Gruppen unterteilen: Peptidaldehyde, Peptidboronate, Peptidvinylsulfone, Epoxyketone und Nicht-Peptide. Peptidaldehyde sind die ältesten und verbreitetsten Proteasominhibitoren. Sie sind reversible Inhibitoren und zeichnen sich durch eine hohe Zellpermeabilität und schnellen zellulären Abbau aus [106]. Wirkprinzip ist die Ausbildung einer Hemiacetalbindung mit der Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins der die Aktivität tragenden  $\beta$ -Untereinheit. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete



MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO)



MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)<sub>2</sub>)

Abbildung 1.2: **Strukturformeln der verwendeten Proteasominhibitoren.** Pharmakophor jeweils grau unterlegt.

MG132 (siehe Abb. 1.2) gehört zur Gruppe der Peptidaldehyde. Im Rahmen von experimentellen Studien erwies sich MG132 durch seine hohe Selektivität für das Proteasom – Calpaine und Cathepsin werden erst in mindestens zehnfach höherer Konzentration inhibiert – als ein Inhibitor der ersten Wahl [99]. Der zweite im Rahmen dieser Arbeit verwendete Proteasominhibitor ist MG262 (siehe Abb. 1.2), ein Vertreter der Peptidboronate. Im Gegensatz zu den Aldehyden zeichnen sich diese durch eine noch höhere Spezifität für das Proteasom und eine wesentlich höhere inhibitorische Potenz aus.

### Zelluläre Effekte der Proteasominhibition

Die Konsequenzen von Proteasominhibition sind komplex und abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z. B. vom Typ des verwendeten Proteasominhibitors, von der eingesetzten Konzentration, von der Inkubationsdauer und von der Art des behandelten Gewebes (zur Übersicht [99, 107]).

Proteasominhibitoren können zu einer Abnahme des proteasomalen Proteinabbaus und zur Akkumulation kurzlebiger, polyubiquitinylierter Proteine sowie zur Anhäufung abnormer (d.h. fehlgefalteter, beschädigter) Proteine führen. Dies löst die verstärkte Expression von Hitzeschockproteinen und Stressproteinen aus und führt dadurch z. B. zu Thermotoleranz [108]. Langzeitbehandlung mit Proteasominhibitoren kann über mehrere Wege zur Apoptose führen, dabei reagieren proliferierende Zellen empfindlicher als postmitotische Zellen [99]. Die Stabilisierung wichtiger Proteine, z. B. des Tumorsuppressorproteins p53 oder des cyclin dependent kinase (cdk) Inhibitors p27, könnte dabei für die Induktion der Apoptose verantwortlich sein [109, 110]. Zusätzlich könnte die Akkumulation fehlgefalteter Proteine über den JNK-Weg zur Apoptose führen [111]. Die Verhinderung der Aktivierung des Apoptoseinhibitors NFκB (s.u.) ist in diesem Zusammenhang ebenfalls zu diskutieren [112]. Im Gegensatz

dazu sind auch antiapoptotische Eigenschaften von Proteasominhibitoren beschrieben: Eine Inkubationsdauer von weniger als 16 Stunden schützt nicht proliferierende Thymozyten und neuronale Zelllinien vor Apoptose. Verantwortlich dafür könnte die Stabilisierung der Apoptoseinhibitoren bcl-2 und IAPs sein, welche über das Proteasom abgebaut werden [99].

Grundlage der wichtigen antiinflammatorischen Eigenschaften von Proteasominhibitoren ist die Hemmung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$ .  $\text{I}\kappa\text{B}$  – Substrat des Proteasoms und endogener Inhibitor von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  – wird unter Proteasominhibition stabilisiert. Folglich kann  $\text{NF}\kappa\text{B}$  die Expression inflammatorischer Mediatoren (z.B. Zytokine, Adhäsionsmoleküle) nicht aktivieren [102].

### **Neue Therapieansätze durch Proteasominhibitoren**

Trotz der überaus wichtigen Funktionen des UPS in der Zelle wird die partielle oder zeitweise Inhibition dieses Systems erstaunlich gut toleriert [113]. Dies eröffnet Möglichkeiten zur therapeutischen Anwendung von Proteasominhibitoren.

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Proteasominhibitoren durch ihre antiproliferativen, proapoptotischen Eigenschaften einen vielversprechenden Therapieansatz in der Behandlung von hämatologischen und soliden Tumoren darstellen. Die Anwendung des Proteasominhibitors Bortezomib wurde in mehreren klinischen Studien überprüft und ist mittlerweile eine anerkannte und sichere Therapie bei Patienten mit bereits vorbehandeltem, rezidierten und therapierefraktären multiplem Myelom [114–116]. Die Wirksamkeit bei weiteren Tumorerkrankungen wird aktuell im Rahmen verschiedener Studien überprüft [117, 118].

Durch Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  bieten Proteasominhibitoren einen vielversprechenden Therapieansatz bei inflammatorischen Erkrankungen, so z. B. bei rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Asthma [119].

Inflammation kennzeichnet Ischämie-Reperfusionsschäden im Rahmen von myokardialen und cerebralen Infarkten. Auch hier könnte Proteasominhibition zukünftig einen interessanten Therapieansatz darstellen [119, 120]. So konnte der Proteasominhibitor PS-519 in Tiermodellen cerebrale und myokardiale Gewebeschäden limitieren und die Funktion verbessern [121, 122]. Es sind weitere Studien nötig, um diese Therapieoption zu evaluieren.

### 1.2.5 Niedrigdosierte Proteasominhibition

Abseits der Therapie proliferativer Erkrankungen sind die proapoptotischen Eigenschaften von Proteasominhibitoren nicht erwünscht. Durch partielle Inhibition mit niedrigen Konzentrationen eröffnet sich jedoch die Möglichkeit, positive Eigenschaften zu nutzen, ohne proapoptotische Signalwege zu aktivieren. So induzieren niedrige und nicht toxische Konzentrationen von Proteasominhibitoren die Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* und fördern Knochenbildung *in vivo* [123]. Die partielle Proteasominhibition mit Epoxomicin und Lactazystin ermöglicht die Modulation der Präsentation viraler Antigene über MHC I, ohne die zelluläre Vitalität zu beeinflussen [124].

Auch in kardiovaskulären Zellen konnten positive Eigenschaften niedrigdosierter Proteasominhibition gezeigt werden. So konnten Meiners et al. in primären Endothelzellen (HUVEC) zeigen, dass 70 nM MG132 und 4 nM MG262, im Gegensatz zu 200 nM MG132 und 10 nM MG262, die Zellvitalität nicht einschränken und keine Apoptose induzieren [125]. Die Expressionsanalyse mittels Microarray Chip zeigte dabei differentielle Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Grad der Proteasominhibition: Hohe Konzentrationen regulierten mehr Gene in größerem Ausmaß als niedrige Konzentrationen. Ohne zur Apoptose zu führen, induzierten dabei niedrige Inhibitorkonzentrationen die Expression endothelprotektiver Gene (siehe Abschnitt 1.2.6). In einem Tiermodell reduzierte die Behandlung mit MG132 kardiale Fibrose und die Expression von Kollagenen und Matrixmetalloproteinasen in SHR-Ratten [126].

### 1.2.6 Niedrigdosierte Proteasominhibition und Endothelfunktion

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in unserem Labor der Einfluss von Proteasominhibition auf die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) untersucht [127]. Die Inkubation von Endothelzellen (CPAE, HUVEC) mit niedrigen Dosen MG132 (50–250 nM) erhöhte die eNOS mRNA- und Proteinexpression konzentrations- und zeitabhängig. Der Anstieg der eNOS-Expression begann nach 16 Stunden, mit einem Maximum nach 48 Stunden. Nach der Einmalgabe des Proteasominhibitors war die eNOS mRNA-Expression mindestens 7 Tage erhöht, obwohl die Akkumulation polyubiquitinerter Proteine nur drei Tage nachweisbar blieb. Die Erhöhung der eNOS mRNA zeigt eine transkriptionelle Antwort an. Die Not-

wendigkeit einer de novo Proteinsynthese konnte durch Proteinsynthesehemmung mit Cycloheximid gezeigt werden. Nur Konzentrationen unter 250 nM zeigten diese Effekte, schon 500 nM senkten die eNOS-Expression und verringerten die Zellvitälität. Die mit MG132 gezeigten Effekte waren mit äquipotenten Dosen der anderen Proteasominhibitoren MG262, Epoxomicin und Lactazystin in ähnlichem Umfang reproduzierbar. Funktionelle Daten unterstützten die in der Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse. Parallel mit dem Anstieg der eNOS-Proteinexpression stieg die eNOS-Aktivität, mit einem Maximum nach 48 Stunden. Zusätzlich verbesserte die 48-stündige Inkubation mit MG132 die endothelabhängige Vasodilatation von isolierten Gefäßringen der Ratte konzentrationsabhängig.

Die bereits zuvor erwähnte Microarray-Analyse von Endothelzellen unter niedrigdosierter Proteasominhibition konnte die eNOS-Expressionsverstärkung bestätigen [125]. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit die vorteilhafte Regulation weiterer für die Endothelfunktion relevanter Gene gezeigt werden. Die Expression unterschiedlicher antioxidativer Enzyme wurde unter niedrigdosierter Proteasominhibition verstärkt. Sowohl die Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase-3, die Glutathion-S-Transferase als auch die Hämoxigenase wurden hochreguliert. Interessanterweise nahm die Expression von Nox4, einer Untereinheit des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes, ab. Die Expression von Thrombomodulin und tissue plasminogen activator (tPA), beides antikoagulatorische Schlüsselfaktoren, nahm zu. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der HMG-CoA-Reduktase und monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) verringert. Die Expression des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 wurde ebenfalls reduziert. Als funktionelle Konsequenz der beschriebenen Effekte konnte in derselben Arbeit dargelegt werden, dass partielle Proteasominhibition mit MG132 oder MG262 in Endothelzellen einen  $H_2O_2$ -induzierten Anstieg intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies signifikant reduziert. Anknüpfend an diese Vorarbeiten konnte kürzlich gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivierung antioxidativer Enzyme durch partielle Proteasominhibition abhängig vom Transkriptionsfaktor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) ist [128]. Das Spektrum der endothelprotektiven Eigenschaften niedrigdosierter Proteasominhibition erweiternd, führt diese zu einer reduzierten Expression von Adhäsionsmolekülen im Sinne einer verminderten endothelialen Aktivierung. Dabei reduzierten MG132 sowie MG262 die TNF- $\alpha$ -induzierte Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin in Endothelzellen signifikant. In mit Bortezomib behandelten Dahl-Salz-sensitiven Ratten (DSSR) konnten diese Ergebnisse bestätigt werden [129].

Zusammenfassend betrachtet zeigen die erwähnten Studien eine Endothelprotektion durch zeitlich begrenzte, niedrigdosierte Proteasominhibition, welche maßgeblich auf deren antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften zurückzuführen ist.

### 1.3 Zielsetzungen

In der vorliegenden Arbeit sollen die überwiegend in Zellkulturexperimenten gewonnenen Daten zur Rolle des UPS und von Proteasominhibitoren im Rahmen der Endothelfunktion im Aortenringmodell überprüft werden. Dabei wird ein Ringmodell als Bindeglied zwischen der Zellkultur und der *in vivo* Situation gewählt. Die Arbeit stellt sich folgende Ziele und Fragestellungen:

- Etablierung eines Aortenringmodells der Ratte zur Induktion einer endothelialen Dysfunktion.
- Untersuchung des Einflusses niedrigdosierter Proteasominhibition auf die induzierte endotheliale Dysfunktion. Lässt sich die endotheliale Dysfunktion durch niedrigdosierte Proteasominhibition verbessern?
- Ist eine eventuelle Verbesserung der Endothelfunktion mit einer Verbesserung der eNOS-Expression und NO-Bioverfügbarkeit verbunden?
- Welche zusätzlichen Faktoren oder Mechanismen spielen in diesem Modell eine Rolle?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Das Aortenringmodell

Material	Hersteller
Trapanal (Wirkstoff Thiopental-Natrium)	Altana Pharma
Aqua ad iniectabilia	Braun
Injektionskanülen und Spritzen	Braun
Ethanol Vol.-70% zur Desinfektion	Herbeta-Arzneimittel
Präparationsbesteck	Aesculap
Mikrofederschere OC498R	Aesculap
Hitzsterilisationsofen	Memmert
sterile Kulturschalen	Falcon
Präparationsmikroskop (Vergrößerungen 40/63/100×)	Fa. Carl Zeiss Jena
Carbogen	Linde
Sicherheitswerkbank HS9	Heraeus Instruments
Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies
Fetal Bovine Serum (FCS)	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin 10000 U/10000 µg/ml	Biochrom
Polymyxin B	Sigma Aldrich
24-well-Zellkulturplatte	Falcon
Kulturschrank Biosafe eco	Integra Biosciences
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH Darmstadt
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO)	Biomol
MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-B(OH) <sub>2</sub> )	Calbiochem
Recombinantes humanes TNF-α	BD Biosciences Pharmingen
Acetylcholin	Sigma Aldrich
Papaverinhydrochlorid	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Phenylephrin	Sigma Aldrich

### 2.1.1 Tiere

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden ausschließlich gesunde, männliche Wistar-Ratten (Charles River, Deutschland) mit einem Gewicht von 300–350 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité CCM, Tucholskystrasse 2, 10117 Berlin, nach Richtlinien des Gesetzgebers. Die Fütterung erfolgte mit Standardpellets und Wasser ad libitum. Tötung und Organentnahme wurden im Kardiologischen Forschungslabor durchgeführt.

### 2.1.2 Präparation von Aorta thoracalis und Gefäßringen

Die Euthanasie der Ratte erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 0,3 g/kg Körpergewicht Trapanal. Anschließend wurde die Ratte auf dem Präparationstisch befestigt und mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Während der gesamten Tier- und Organpräparation wurde steril präpariert, verwendetes Präparationsbesteck wurde hitzesterilisiert. Thorax und oberes Abdomen wurden mit Schere und Pinzette eröffnet und die Oberbauchorgane vorsichtig beiseite gelagert. Danach wurden die Aorta ascendens durchtrennt und Herz und Lungen entnommen. Die nun prävertebral sichtbare Aorta wurde mit 4°C kalter, steriler Krebs-Henseleit-Lösung gespült. Dadurch wurde in den Thorax ausgetretenes Blut ausgespült und die Aorta abgekühlt. Die Exzision der Aorta thoracalis erfolgte durch vorsichtiges Schneiden entlang der Wirbelkörper mit einer feinen Präparationsschere von cranial nach caudal. Dabei wurde die gesamte Aorta thoracalis vom Arcus aortae bis zum Zwerchfell exzidiert und unnötige Quetschungen und Dehnungen des Organs vermieden, um das Endothel nicht zu verletzen. Abschließend wurde die Aorta in eine sterile Kulturschale mit 4°C kalter Krebs-Henseleit-Lösung überführt und sofort mit der weiteren Organpräparation fortgefahren.

Die Präparation von Aorta und Gefäßringen erfolgte steril unter dem binokularen Präparationsmikroskop. Es wurde das distale Ende der Aorta aufgesucht, mit einer Injektionskanüle (1,20×40 mm) kanüliert und vorsichtig mit eiskalter Krebs-Henseleit-Lösung gespült, um Blutreste und Thromben schonend zu entfernen. Nach einem weiteren Spülvorgang erfolgte die Präparation der Aorta in eiskalter, Carbogen-begaster Krebs-Henseleit-Lösung in einer Silikon-beschichteten Petrischale. Auf dieser wurde die Aorta mit feinen Einmal-Insulin-Kanülen (0,45×12 mm) befestigt. Die Aorta wurde mittels Mikrofederschere und Pinzette von adhärentem Fett-, Muskel- und Fettgewebe befreit. Nach einer erneuten Spülung erfolg-

te das Schneiden der Aorta in 1,5-2 mm breite Ringe. Arcus aortae und rund 5 mm des distalen Endes der Aorta wurden verworfen, da das Endothel hier durch die Arbeitsschritte potentiell beschädigt wurde. Aus einer Aorta thoracalis konnten somit durchschnittlich 14 bis 16 Gefäßringe gewonnen werden. Direkt im Anschluss erfolgte die Langzeitinkubation der Gefäßringe im Kulturmedium.

### 2.1.3 Langzeitinkubation von Gefäßringen

Ziel der durchgeführten Inkubation ist es, Gefäßringe ex vivo in einem geeigneten Kulturmedium für 48 Stunden aufzubewahren. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Gefäßringe innerhalb dieses Zeitraumes mit TNF- $\alpha$  und Proteasominhibitoren zu behandeln. Im Gegensatz zu kultivierten Zellen handelt es sich bei isolierten Gefäßringen um intakte Gewebeverbände mit erhaltener Gewebearchitektur, erhaltenen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen.

Alle Arbeitsschritte wurden steril unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Als Kulturmedium diente Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 1% FCS, 50 U/ml Penicillin, 50  $\mu$ g/ml Streptomycin und 1  $\mu$ g/ml Polymyxin B. Zunächst wurden die Ringe in Kulturschalen zweimalig im Medium gespült, um Reste der Krebs-Henseleit-Lösung zu entfernen. Danach wurden die Ringe vorsichtig in die mit Kulturmedium gefüllten Vertiefungen (wells) einer 24-well-Zellkulturplatte überführt. Grundsätzlich wurde ein Gefäßring in einer Vertiefung in 2 ml Kulturmedium inkubiert. Alle Arbeitsschritte wurden mit äußerster Vorsicht ausgeführt, um das Endothel nicht zu beschädigen. Nach 20-minütiger Äquilibration im Kulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Ringe mit TNF- $\alpha$  und/oder Proteasominhibitoren behandelt.

**TNF- $\alpha$ .** Die endotheliale Dysfunktion wurde durch 48-stündige Inkubation mit TNF- $\alpha$  induziert. TNF- $\alpha$  (gelöst in PBS + 0,1% BSA) wurde direkt in das Kulturmedium gegeben, in einer Endkonzentration von 250 bzw. 500 pg/ml. Die Inkubation erfolgte im Kulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

**Proteasominhibitoren.** Die verwendeten Proteasominhibitoren wurden in DMSO gelöst und direkt in das Kulturmedium gegeben. MG132 wurde in 50 und 100 nM Konzentration verwendet, MG262 wurde in 500 pM Konzentration eingesetzt. DMSO wurde parallel als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Gefäßringe wurden 48 Stunden im Kulturschrank

bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die verwendeten Inkubationszeiten und Konzentrationen orientierten sich an Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe [125,127].

#### 2.1.4 Testung der Vasoreaktivität von isolierte Gefäßringen

**Der Messplatz für isolierte Gefäßringe.** Alle Messungen erfolgten unter isometrischen Bedingungen, d. h. es wurde Kraftänderungen bei konstantem Gefäßdurchmesser registriert. Die Messungen an Aortenringen wurden an zwei Messplätzen für je 6 Gefäßringe durchgeführt (siehe Abbildung 2.1). Mit den zwei vorhandenen Messplätzen können 12 isolierte Aortenringe zeitgleich untersucht werden. Konzeption und Bau der Messplätze wurden von Dipl. Ing. (FH) Thomas Düsterhöft und Johannes Hundertmark ausgeführt (beide Mitarbeiter des Kardiologischen Forschungslabors). Die einzelnen Aortenringe werden an jeweils zwei

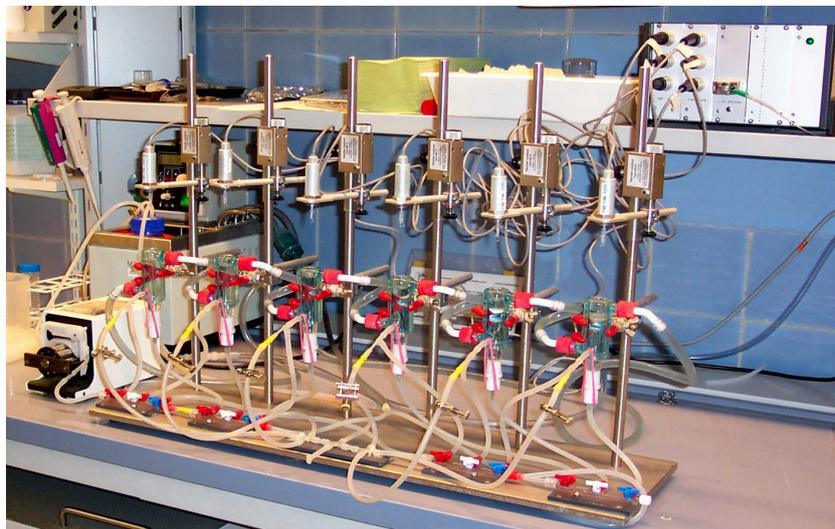


Abbildung 2.1: **Der Messplatz für isolierte Gefäßringe**

Platinhaken in einem Organbad, gefüllt mit 10 ml modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung, aufgehängt (siehe Abbildung 2.2). Durch kontinuierliche Begasung dieser Lösung mit Carbogen (Gasgemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) wird ein physiologischer pH-Wert von 7,4 gewährleistet. Das Organbad ist Teil eines doppelwandigen Glasgefäßes (Fa. Medizinisch-Glastechnische Werkstätte P. Heinrich), welches mit einer Dreifingerklemme stabil im Messplatzgerüst (Spezialanfertigung Fa. Gemmel Metalle) aufgehängt ist. Während der untere Platinhaken unbeweglich am Boden des Organbades aufgehängt wird, ist der obere Platinhaken mit einem senkrecht montierten Kontraktionskraftaufnehmer (FMI TIM-1020 isometrischer Transducer, Meßbereich +/- 30 g, Föhr Medical Instruments GmbH) verbunden. Dieser Transducer

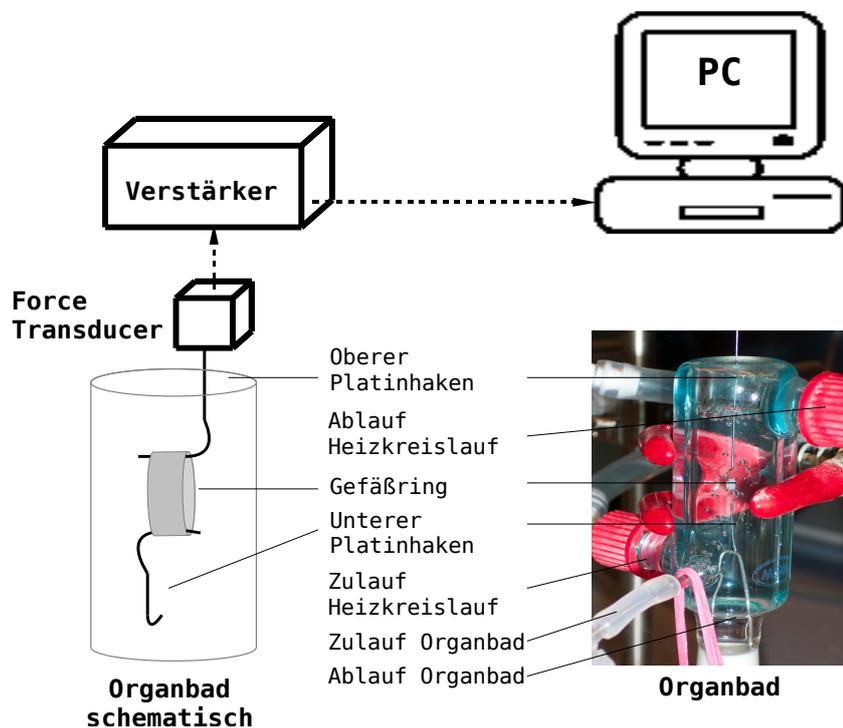


Abbildung 2.2: **Messanordnung für isolierte Aortenringe.** Links schematisch, rechts Originalabbildung eines Organbads.

ist in einem Feinpositionierelement (Vernier Control Type 850 N, Hugo Sachs Elektronik) aufgehängt, über welches die Vorspannung des Rings exakt eingestellt werden kann. Über einen Messverstärker werden die Werte auf den Computer übertragen und mit Hilfe der Software LabView (National Instruments) dargestellt und aufgezeichnet. Die Messapparatur wurde mit genormten Gewichten regelmäßig geeicht.

Um in den Organbädern eine gleichbleibende Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  zu gewährleisten, werden die äußeren Hohlräume der Glasgefäße mit zirkulierendem,  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasser aus dem Heizkreislauf durchströmt, Heizwasser und die Krebs-Henseleit-Lösung sind durch das Glasgefäß voneinander getrennt. Kunststoffschläuche verbinden die in Reihe geschalteten äußeren Hohlräume der Glasgefäße, so dass sich ein Heizkreislauf bildet, der durch einen Umwälzthermostat mit Warmwasserbad (C 10, Fa. Haake) geschlossen wird. Die Organbäder werden aus einem erwärmten und mit Carbogen begasten Vorratsbehälter gespeist. Über einen Ablauf am Boden der Organbäder können diese separat voneinander abgesaugt werden.

**Durchführung der Messungen.** Im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der Gefäßringe erfolgte die Testung der Vasoreaktivität. Diese wurde an vorkontrahierten Ringen durchgeführt. Ausgehend von einer Vorspannung (Preload) von 2000 mg wurden die Gefäßringe mit dem  $\alpha_1$ -Agonisten Phenylephrin vorkontrahiert. Anschließend wurde die endothelabhängige Vasodilatation mit Acetylcholin durchgeführt, nach einer Auswaschphase und der erneuten Kontraktion folgte die endothelunabhängige Vasodilatation mit Papaverin. Tabelle 2.1 zeigt den einheitlichen Versuchsablauf.

**Tabelle 2.1: Einheitlicher Versuchsablauf für die Testung der endothelabhängigen und -unabhängigen Vasorelaxation von Phenylephrin-vorkontrahierten, aortalen Gefäßringen der Ratte.**

<b>Versuchsablauf</b>		
<b>Phase</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Zeit</b>
Vorspannung und Äquilibration	Vorsichtiges Einhängen der Ringe und schrittweises Vorspannen über 5 Minuten bis auf 2000 mg; wiederholtes Nachspannen bis stabile Spannungswerte von 2000 mg erreicht sind	15 min
Kontraktionstest mit Kaliumchlorid (KCl)	Kontraktionstest mit 50 mM KCl (167 $\mu$ l einer 3 M KCl-Lösung) zur Überprüfung der Funktionalität der Gefäßringe; ggf. Austausch funktionsuntüchtiger Ringe	10 min
Auswaschen	Vollständige Relaxation durch dreimaliges Auswaschen, Wiedereinstellung der Vorkontraktion von 2000 mg	15 min
Äquilibration	ggf. Korrektur der Vorspannung von 2000 mg, stabiles Vorspannungsniveau aller Gefäßringe	45 min
Phenylephrin-Vorkontraktion	submaximale Vorkontraktion mit $\alpha_1$ -Agonisten Phenylephrin (50 nM), Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus (steady state)	30 min
Endothelabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin	kumulative Gaben von Acetylcholin (10 nM–10 $\mu$ M) in 5-minütigen Abständen	35 min
Auswaschen und erneute Äquilibration	Nach 4-maligem Auswaschen Wiedereinstellung der Vorspannung von 2000 mg	60 min
Phenylephrin-Vorkontraktion	submaximale Vorkontraktion mit $\alpha_1$ -Agonisten Phenylephrin (50 nM), Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus (steady state)	30 min
Endothelunabhängige Vasodilatation mit Papaverin	Kumulative Gaben von Papaverin (100 nM–100 $\mu$ M) im Abstand von 10 Minuten	70 min
Versuchsende	Auswaschen	

## 2.2 Isolierung von Proteinen

Material	Hersteller
Kugelmühle MM301	Retsch
Lysepuffer pH 7,4	siehe Anhang
Centrifuge 5415R	Eppendorf Germany

Jeweils 4 Aortenringe wurden in einem gekühlten 2 ml Eppendorfgefäß mit 80  $\mu$ l Lysepuffer und zwei 4 mm Edelstahlkugeln in der Kugelmühle für 1 Minute bei 30 Hz homogenisiert und lysiert. Überprüfung der Vollständigkeit der Homogenisierung durch Augenkontrolle und ggf. Wiederholung des Mahlvorgangs. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße bei 10000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues, vorgekühltes Eppendorfgefäß transferiert, das Pellet verworfen. Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Material	Hersteller
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
BSA-Standardlösung	Pierce
Wärmeschrank	Heraeus Instruments
96-well-Platte	Greiner
ELISA Reader	Anthos Labtec Instr.

Der Proteinextrakt wurde 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt, davon wurden je 10  $\mu$ l in zwei Vertiefungen einer 96-well-Platte (Doppelwertbestimmung) gegeben und mit 200  $\mu$ l Reaktionsreagenz, bestehend aus Reagenz A (*bicinchoninic acid*, Abk. BCA) und Reagenz B (Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  erfolgte die Extinktionsmessung (Messfilter 570 nm). Als Standard diente BSA in einer Konzentration von 0,125 -1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , als Leerwert wurde Lysepuffer (1:10 in Aqua bidest. verdünnt) verwendet. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Standardkurve.

## 2.3 Western Blot

Material	Hersteller
Elektrophoresekammer TV100	Carl Roth GmbH
Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech
Blotkammer	peqlab Biotechnologie GmbH
Wippe WT 12	Biometra
Thermoblock	Liebisch Bielefeld
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH
Tween 20	Serva
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Bromphenolblau	Biomol
Methanol	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Prestained Protein Marker	New England BioLabs
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Enhanced Chemiluminescence Kit	Amersham, UK
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Glycin	Roth

Zum spezifischen, quantitativen Nachweis von Proteinen wurden diese mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe im Polyacrylamid-Gel getrennt, auf eine Membran transferriert (geblottet) und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die im Zellysate enthaltenen Proteine werden durch kurzes Aufkochen im Ladepuffer mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. SDS verleiht den Proteinen eine negative Außenladung entsprechend ihrer Größe und ermöglicht so die Auftrennung im elektrischen Feld.

## Lösungen

TBS	SDS-Laufpuffer	5× SDS-Probenpuffer
50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	2,5 mM Tris	655 $\mu$ l 1 M Tris pH 6,8
150 mM NaCl	19,2 mM Glycin	2,0 ml 99% Glycerol
pH 7,4	0,01% SDS	500 $\mu$ l $\beta$ -Mercaptoethanol
	pH 8,8	2,3 ml 10% SDS
		10 mg Bromphenolblau
		ad 10 ml mit Aqua dest.

Blotpuffer	Blocklösung	Waschpuffer TBS-T
48 mM (5,82 g/l) Tris	10× Roti-Block	TBS
39 mM (2,93 g/l) Glycin	1:10 in PBS	+ 0,1% Tween 20
20% (200 ml/l) Methanol		

### 2.3.1 Gelzusammensetzung

Die eindimensionale Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt und wird als SDS-PAGE bezeichnet (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Durch Polymerisation der Bestandteile Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid, durch Ammoniumpersulfat und TEMED initiiert, entstehen Poren, deren Größe die Separation der Proteine beeinflusst. Mit steigendem Acrylamidgehalt sinkt die Porengröße. Für eNOS (140 kDa) wurden 8%-Gele verwendet, für SOD1 (17 kDa) Gradientengele (kommerziell erworben: 4-20% Tris-Glycin-Gel, Cat.No. EC60252BOX, Invitrogen). Die Gelzusammensetzung ist nachfolgend aufgeführt.

Bestandteil	Sammelgel	8%-Gel
Aqua dest.	3,65 ml	3,28 ml
1,5 M Tris pH 8,8	–	1,56 ml
1 M Tris pH 6,8	625 $\mu$ l	–
SDS 10%	50 $\mu$ l	62,5 $\mu$ l
Acrylamid 40%	625 $\mu$ l	1,28 ml
APS 10%	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

### 2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Nach erfolgter Lyse und Proteinmessung wurden 20  $\mu$ g Protein mit 5× SDS-Probenpuffer gemischt, 5 Minuten bei 95 °C im Thermoblock erhitzt, kurz anzentrifugiert und in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wurde die Gelelektrophorese mit 10 mA pro Gel für 15 Minuten gestartet, danach auf 15 mA pro Gel erhöht und nach ca. 1-1,5 Stunden beendet. Dann wurden die Gelplatten aus der Kammer entnommen, separiert, das Sammelgel entfernt, das Gel für 15 Minuten im Blotpuffer inkubiert, um mit dem Blotten weiterzufahren.

### 2.3.3 Transfer

Die im Gel aufgetrennten Proteine werden hierbei im elektrischen Feld einer Blotkammer auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde zunächst für 1 Minute mit Methanol aktiviert, dann 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen und anschließend 5-10 Minuten in Blotpuffer gespült. Auf drei kathodenseitige, in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere wurde die Membran gelegt, darauf das Gel und dann nochmals drei getränkte Whatman-Papiere anodenseitig. Die Stapel wurden, um Luftblasen zu vermeiden, vorsichtig abgerollt. Die Blotkammer wurde verschlossen, dann 1-1,5 Stunden bei 400 mA geblottet. Danach wurden die Stapel separiert, die Membran für 5 Minuten in Ponceau S-Lösung angefärbt, um den Transfer zu überprüfen. Anschließend wurden die Membranen in Roti-Block inkubiert.

### 2.3.4 Umsetzung der Blots mit Antikörpern

Primär-/Sekundäran- tikörper	Poteinmenge	Verdünnung	Hersteller
Mouse anti-eNOS monoclonal ab, reactivity hu, m, r; isotype mouse IgG1	20 $\mu$ g	1:2500	BD Transduction Laboratories (610296)
SOD1 rabbit polyclonal antibody IgG, reactivity hu, m, r	20 $\mu$ g	1:2000	Abcam (ab16831)
$\beta$ -Actin, rabbit polyclonal antibody	20 $\mu$ g	1:2000	Cell Signalling (#4967)
Goat anti-mouse HRP	–	1:2500	Santa Cruz
Goat anti-rabbit HRP	–	1:10000	Santa Cruz

Zunächst wurden die Membranen für 2 Stunden in Roti-Block geschwenkt, um eine spezifische Antikörperbindung zu gewährleisten und freie Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen (Blocken). Der jeweilige primäre Antikörper wurde wie o. g. in der Blocklösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C damit inkubiert. Anschließend wurden die Membranen viermalig 10 Minuten in TBS-T gewaschen und danach für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach nochmaligem Waschen in TBS-T wurden die Membranen eine Minute in ECL-Reagenz inkubiert. Die durch die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) und das Luminol des ECL-Reagenz generierte Lichtemission wurde durch Auflegen eines Films in einer

Kassette registriert. Nach der Entwicklung wurden die Filme gescannt.

Zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung der Gele wurden die Membranen mit einem  $\beta$ -Aktin-Antikörper inkubiert. Dazu mussten die schon bestehenden Antikörperbindungen gelöst werden, indem die Membranen für 30 Minuten bei 50°C in Striplösung (100 mM Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,7) inkubiert wurden. Anschließend wurde 4-malig in TBS-T gewaschen und entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll ab Roti-Block weiterverfahren.

## 2.4 RNA

### 2.4.1 RNA–Isolation aus Aortenringen

Material	Hersteller
TRIzol Reagent	Invitrogen
Chloroform	J.T.Baker
Isopropanol	J.T.Baker
Ethanol	J.T.Baker
Kugelmühle MM301	Fa. Retsch
Edelstahlkugeln	Quiagen
Centrifuge 5415R	Eppendorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf
DEPC(Diethylpyrocarbonat)-Wasser	Sigma

Ein Teil der inkubierten Gefäßringe wurde neben den Vasoreaktivitätsexperimenten für Expressionsanalysen in 2 ml Eppendorfgläsern in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die RNA-Isolation wurden jeweils 2 Aortenringe verwendet.

Die Isolation der RNA erfolgte mit TRIzol Reagent – einer Verbesserung der single step Methode nach Chomczynski und Sacchi [130]. Gewebeaufschluss und Homogenisierung der Ringe erfolgten einheitlich mit Hilfe einer Kugelmühle in 2 ml Eppendorfgläsern. Dazu wurden pro Eppendorfglas zwei 4 mm Edelstahlkugeln verwendet und  $800\ \mu\text{l}$  TRIzol Reagent zugefügt. Die Homogenisierung der Ringe erfolgte in der vorgekühlten Halterung für 90 Sekunden bei 30 Hz. Überprüfung der Vollständigkeit des Gewebeaufschlusses erfolgte durch Augenkontrolle und ggf. Wiederholung des Mahlvorgangs. Anschließend erfolgten die Extraktionsschritte nach Angaben des Herstellers. Zur Resuspension der isolierten RNA wurden  $30\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest. verwendet, die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der extrahierten RNA

Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt, indem  $1\ \mu\text{l}$  der RNA 1:50 in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. verdünnt und die Extinktion im Photometer (Spectrophotometer DU 640, Beckmann) bei 260 nm und 280 nm bestimmt wurde. Nach der Formel

$$c(\mu\text{g}/\text{ml}) = \text{Absorption}_{260\text{nm}} \cdot \text{Verdünnung} \cdot K$$

wurde die Konzentration der RNA berechnet. Dabei ist K die Konstante für die optische Dichte (für RNA 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Der Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

### 2.4.3 Reverse Transkription, DNase–Verdau

Material	Hersteller
Personal Cycler	Biometra
Aqua ad iniectabilia	Braun
DNase I (2 U/ $\mu\text{l}$ )	Ambion
Hexamer-Primer DN6 Hexamer	TIB Molbiol
RT-Mastermix	
4,0 $\mu\text{l}$ 5 $\times$ Reverse Transkriptase Puffer	Invitrogen
2,0 $\mu\text{l}$ DTT (100mM)	Invitrogen
1,0 $\mu\text{l}$ dNTPs (10mM)	Biozym
0,5 $\mu\text{l}$ RNase Inhibitor 40	Protector
1,0 $\mu\text{l}$ M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )	Invitrogen

Durch die Reverse-Transkriptions-Reaktion (RT) wird die isolierte RNA in eine komplementäre cDNA (*copy*-DNA) umgeschrieben, um letztere dann in der PCR zu verwenden. Es wurde hierbei eine M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase verwendet. Als Primer wurden Random-Hexamere eingesetzt, welche unspezifisch an mRNA-Sequenzen binden.

Es wurden 50 ng Gesamt-RNA eingesetzt und mit Aqua ad iniectabilia auf 9  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zunächst erfolgte der DNase-Verdau, um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden. Die Proben wurden nach Zugabe von 0,5  $\mu\text{l}$  DNase I 15 min bei 37°C im Cycler inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch 5-minütige Inkubation bei 75°C hitzeinaktiviert. 2  $\mu\text{l}$  Hexamer-Primer wurden zupipettiert und die Proben dann 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um eine vollständige Anlagerung zu erreichen. Nach 5 Minuten bei 4°C wurden pro Ansatz 8,5  $\mu\text{l}$  des RT-Mastermixes hinzupipettiert. Nach 5 Minuten Annealing bei 25°C erfolgte die Elongation für 60 Minuten bei 37°C. Anschließend Lagerung der Proben auf Eis, Aufbewahrung bei -80°C.

## 2.4.4 Real-Time RT-PCR

Material	Hersteller
SYBR GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems
Realttime GeneAmp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
96-well-Platte	Applied Biosystems

Zur Quantifizierung der mRNA-Sequenzen wurde die Real-Time RT-PCR eingesetzt. Als Ausgangsprodukt diente die generierte cDNA. Das Prinzip ist neben der Verwendung spezifischer Primer (siehe Tabelle 2.4) die Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR GREEN 1 [131, 132]. SYBR GREEN 1 bindet sequenzunabhängig an doppelsträngige DNA und fluoresziert im gebundenen Zustand. Dieses Fluoreszenzsignal ist proportional zum Amplifikationsprozess und wurde mit Hilfe des ABI PRISM 5700 Detection Systems während der Reaktion aufgezeichnet. Ein passiver Referenzfarbstoff (ROX) wird mitgeführt, der nicht an der PCR-Amplifikation teilnimmt und einen internen Standard liefert, auf den das SYBR GREEN-dsDNA-Komplex-Signal normalisiert wird. Gemessen wird die Anzahl an PCR-Zyklen, welche nötig ist, um die normalisierte Fluoreszenzintensität ( $\Delta R_n$ -Wert) über das Hintergrundsignal ansteigen zu lassen: Diese Zyklus-Zahl heisst  $C_t$ -Wert (*threshold cycle*).

Die Real-Time RT-PCR erfolgte in einer 96-well Mikrotiterplatte in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  pro Reaktionsansatz, für alle Proben wurden Dreifachwerte bestimmt und gemittelt. Um so genau wie möglich zu arbeiten, wurden für alle Proben Ansätze nach dem anschließend dargestellten Pipettierschema erstellt. Tabelle 2.2 zeigt die verwendeten Cycling Parameter.

Ansatz 1	F-Primer und R-Primer in optimierter Konzentration + Aqua	11,5 $\mu\text{l}$
Ansatz 2	SYBR GREEN PCR Master Mix cDNA	12,5 $\mu\text{l}$ 1,0 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen		25,0 $\mu\text{l}$

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des ABI Prism 7000 SDS Software von Applied Biosystems ausgewertet. Die Berechnung der Expression der verschiedenen Zielsequenzen erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode relativ auf die Expression des Housekeeping-Gens RPS-11. SYBR Green bindet unspezifisch jegliche doppelsträngige DNA. Unerwünschte Produkte

Tabelle 2.2: **Cycling-Parameter für quantitative Real-Time RT-PCR, modifiziert nach [133].**

Zeiten und Temperaturen			
<i>AmpErase UNG</i> <sup>1</sup>	<i>AmpliTag Gold</i> DNA	40 Zyklen	
Aktivierung/Inkubation	Polymerase Aktivierung	Denaturierung	Anneal/Extend
HOLD	HOLD	CYCLE	
2 Minuten 50°C	10 Minuten 95°C	15 Sekunden 95°C	1 Minute 60°C

(Verunreinigungen, Primer-Dimere) führen zu falsch positiven Signalen. Für optimale Reaktionsbedingungen wurden die Primer nach Herstellerangaben [131] mit Hilfe der Primer Express Software (PE Applied Biosystems) ausgewählt und die Primerkonzentrationen entsprechend Abschnitt 2.4.5 optimiert. Die Abwesenheit unspezifischer Amplifikation wurde in der Schmelzkurvenanalyse (Fehlen zusätzlicher Peaks in der Schmelzkurve) überprüft.

### 2.4.5 Primermatrix

Durch unabhängige Variation der Forward- und Reverse-Primer-Konzentrationen wurden die Reaktionsbedingungen optimiert. Es wurde die Konzentrationskombination ermittelt, bei der mit konstanter cDNA-Menge der niedrigste  $C_t$ -Wert und der höchste  $\Delta R_n$ -Wert auftreten. Tabelle 2.3 zeigt die Konzentrationskombinationen. Die letztendlich verwendeten Primerkonzentrationen sind in Tabelle 2.4 angegeben. Mitgeführt wurden ebenfalls NTCs (NTC: *no template controls*) ohne cDNA, um zu überprüfen, ob unerwünschte unspezifische Amplifikation, zum Beispiel durch Entstehung von Primer-Dimeren, auftritt.

	Forward Primer (nM)		
Reverse Primer (nM)	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	300/50	300/300	900/300
900	900/50	300/900	900/900

Tabelle 2.3: **Primer-Optimierungsmatrix.**

Dazu wurden 15  $\mu$ l der Probe im Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter der UV-Lampe wurde die Spezifität der Reaktionsprodukte überprüft.

Das Fehlen von Peaks in der Schmelzkurvenanalyse der NTCs zeigt die fehlende Primerdimer-Bildung. Die Abwesenheit unspezifischer Amplifikation wurde zusätzlich durch Auftragen der Amplifikationsprodukte im Polyacrylamid-Gel überprüft.

Tabelle 2.4: Für Real-Time RT-PCR verwendete Forward- und Reverse-Primer (Abk. F und R) der Ratte und deren eingesetzte Konzentrationen. Alphabetisch geordnet. # kennzeichnet das Housekeeping-Gen.

Gen	Sequenz	Konz. in nM
Catalase-F	5'-TGCGGACATTCTATACGAAGGTG-3'	300
Catalase-R	5'-AGGTGGTTGGCAATGTTCTCA-3'	300
Endothelin-1-F	5'-AGAAGTGTATCTATCAGCAGCTGGTG-3'	300
Endothelin-1-R	5'-GTCTTGATGCTGTTGCTGATAG-3'	900
eNOS-F	5'-GGATCCTGGCAGCCCTAAGA-3'	900
eNOS-R	5'-CACAAACACGCGGTGAACCT-3'	900
gp91phox-F	5'-AGCTATGAGGTGGTGTAGTGG-3'	300
gp91phox-R	5'-ACCAGACAGACTTGAGAATGGAGG-3'	900
iNOS-F	5'-TGAGGATATCTTCGGTGCGG-3'	300
iNOS-R	5'-TCTTGTGCCTTTGGGCTCC-3'	900
12/15 Lipoxygenase-F	5'-TGGGAATGTTCAATCTCCACTACAA-3'	300
12/15 Lipoxygenase-R	5'-TCTCGACACCAGCTCTGCAGT-3'	300
NOX-1-F	5'-CAGTGAGGATGTCTTCCAGTACGA-3'	300
NOX-1-R	5'-TTCAAGAAGGAAGCAAAGGGAGT-3'	900
NOX-4-F	5'-ACTACTACATCCACCAGATGTTGGG-3'	300
NOX-4-R	5'-TGAGGTTTCAGGACAGATGCAGAA-3'	900
p22phox-F	5'-AAGAAGCCAAGTGAGGCCG-3'	300
p22phox-R	5'-TCTGTCACTGGATTGGGTTAACC-3'	300
p40phox-F	5'-GAACAGCCCTTTCACCTGCA-3'	300
p40phox-R	5'-GATCCGAGTCTCAGCGATCTCTT-3'	900
p47phox-F	5'-ACGCAGGTGAACCGTATGTAACC-3'	300
p47phox-R	5'-CTCAGACAGGGACACCTCATCC-3'	300
p67phox-F	5'-TGATGCCGATAACCGGACAA-3'	300
p67phox-R	5'-GGCTGGGTAGCATCATAACTGAAG-3'	300
PKGI-F	5'-TGCATTCCAAAGGAATCATTTACA-3'	300
PKGI-R	5'-GGCATAACCTCGGTGATCTAGGAT-3'	300
#RPS11-F	5'-TGTTGGAGAGTGCAGGCCTC-3'	300
#RPS11-R	5'-TGCCAGCAGCCTTGGTG-3'	300
SOD1-F	5'-CTCTAAGAAACATGGCAGGTCCA-3'	900
SOD1-R	5'-GTCCTTTCCAGCAGCCACA-3'	300
Xanthinoxidase-F	5'-TTGCAAGACTAATCTGCCCTCC-3'	300
Xanthinoxidase-R	5'-TCCAGTATTCTGCGATTAGCATCC-3'	300

## 2.5 Messung der Proteasomaktivität

Material	Hersteller
SpectraMax GeminiEM Microplate Reader 96 well Platte schwarz	Mol. Devices Greiner
Fluorogenes Substrat Suc-LLVY-MCA (Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-4-Methyl-7-Coumarylamid) Methylcoumarylamid-Standard (MCA)	Bachem Bachem
<b>2x 26S-Puffer:</b> 450 mM Tris-HCl pH 7,8 (37°C) 8,2 (RT) 90 mM KCl 15 mM MgAc x 4 H <sub>2</sub> O 15 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck Merck Merck Merck
<b>Reaktionsansatz</b> pro well: 60,0 µl 2x 26S-Puffer 23,3 µl H <sub>2</sub> O 0,22 µl 0,5 M Dithiothreitol (DTT) 6,0 µl 100 mM ATP 10,0 µl 2 mM SLLVY 0,2 µl Phosphokreatin-Kinase 0,5 µl Phosphokreatin	Sigma Roche Bachem Sigma Calbiochem

Die Messung der Proteasomaktivität erfolgte mit Hilfe fluorogener Substrate. Diese werden im Überschuss zum Ringlysat gegeben und fluoreszieren nach dem Abbau durch das Proteasom. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Proteasomaktivität.

Dazu wurden pro Behandlung drei Aortenringe nach erfolgter Inkubation zweimalig in PBS gespült, mit einer feinen Schere zerkleinert, in 80 µl Aqua im 1,5 ml Eppendorfgefäß zermörsert und durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen lysiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 2.2) wurden pro Probe 10 µg Protein ad 20 µl Aqua bidest. verdünnt und in die 96 well Platte pipettiert, es wurden Dreifachwerte bestimmt. 100 µl Reaktionsansatzlösung wurden hinzupipettiert, die Platte in Aluminiumfolie eingewickelt und 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde im Reader die Fluoreszenz bestimmt (Exzitation 370 nm, Emission 445 nm). MCA diente als Standard (0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM und 3 µM); für die Leerwerte wurde Aqua bidest. verwendet. Die Aktivität wird als prozentuale Aktivität im Vergleich

zur Kontrolle berechnet.

## 2.6 Lucigenin–Chemilumineszenz zur Messung der Superoxid-Produktion

Material	Hersteller
N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridiniumdinitrat (Lucigenin)	Sigma
$\beta$ -Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NAD(P)H)	Sigma
Tris	Sigma
Tiron ( $C_6H_4Na_2O_8S_2$ )	Riedel-de Haen
Superoxiddismutase (SOD)	Sigma
96-well-Mikrotiterplatte (black & white)	Wallac
VICTOR3 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer
Feinwaage BA 160P	Sartorius

Die Lucigenin-Chemilumineszenz lässt einen Vergleich der relativen Superoxidanion-Produktion zwischen unterschiedlichen Gefäßen zu. Lucigenin wird durch Superoxid ( $O_2^-$ ) zum Kation-Radikal reduziert, um mit einem weiteren  $O_2^-$  das lumineszierende N-Methylakridon zu bilden [134].

Es wird diskutiert, dass die Lucigenin-Methode im Vergleich zu anderen Messmethoden die Menge der Superoxid-Produktion überschätzt [135, 136]. Verantwortlich dafür wird das *redox cycling* gemacht. Dieses Phänomen soll bei hohen Lucigenin-Konzentrationen (bis zu  $250 \mu M$ ) auftreten. Wie verschiedene Untersucher feststellten, tritt dieses Phänomen nicht auf, wenn deutlich geringere Konzentrationen (unter  $20 \mu M$ ) eingesetzt werden [134]. Deshalb wurden die nachfolgend beschriebenen Messungen an intakten Aortenringen mit einer Lucigenin-Konzentration von  $10 \mu M$  durchgeführt.

Nach der 48-stündigen Inkubation wurden die Aortenringe mit einer Pinzette vorsichtig in Kulturschalen in  $37^\circ C$  Hepes-Puffer pH 7,4 gespült und für 60 Minuten äquilibriert. Für den Messpuffer wurde ein Mastermix angesetzt (Hepes-Puffer pH 7,4, Lucigenin  $10 \mu M$ , NAD(P)H  $100 \mu M$ ). Für eine Messung wurden pro Behandlung zwei Aortenringe verwendet, die in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße in  $500 \mu l$  Messpuffer aufgenommen und für 15 Minuten bei  $37^\circ C$  inkubiert wurden. Die Messung erfolgte in einer 96-well-Platte in  $200 \mu l$  Messpuffer im Counter. Gemessen wurde über eine Minute, die Werte gemittelt, als Leerwert wurde der Messpuffer verwendet. Die Spezifität der Messung für Superoxid wurde in parallelen Ex-

perimenten durch Zugabe von Superoxiddismutase (SOD, 400 U/ml in Hepes-Puffer) oder Tiron (10 mM in PBS), einem nicht-enzymatischen Superoxid-Fänger, in den Messpuffer untersucht. Ein fehlender Anstieg der Messwerte im Vergleich zum Leerwert bestätigte die Spezifität der Messung. Nach der Messung wurden die Ringe getrocknet und gewogen. Darstellung der Messwerte als Counts/Sekunde/mg Trockengewicht.

## 2.7 Messung des Endothelin-Gehalts in Aortenringen

Material	Hersteller
MixerMill	Retsch
Edelstahlkugeln	Quiagen
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Centrifuge 5415R	Eppendorf
Amprep 500 mg C2 Minicolumns RPN1913	Amersham Biosciences, UK
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma
Wasserbad	Haake
Lyophylle	Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Endothelin EIA Kit Cat. No. 583151	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)
Anthos HT-III ELISA-Reader	Anthos Mikrosysteme GmbH

Nach Präparation und Inkubation der Aortenringe erfolgte die Lagerung bei -80°C in 2 ml Eppendorfgefäßen. Für die Messungen wurden 8 Aortenringe pro Behandlung verwendet. Zunächst wurden die Ringe bei 4°C in 600 µl eines 1 M CH<sub>3</sub>COOH/20 mM HCl-Gemischs mit zwei 4 mm Edelstahlkugeln bei 30 Hz für 1 Minute im MixerMill homogenisiert. Nach Entfernung der Kugeln wurden die Proben für weitere 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 10 Minuten erfolgte die Abnahme des Überstands, das Pellet wurde verworfen. Proteinmessung entsprechend Abschnitt 2.2.

Aus dem Überstand erfolgte die Extraktion von Endothelin mittels Amprep C2 Minicolumns. Dazu wurden zunächst die Säulen mit 2 ml Methanol und 2 ml H<sub>2</sub>O äquilibriert, hierbei und bei allen nachfolgenden Waschvorgängen wurde eine Flussrate von ≤ 5 ml/min eingehalten. Pro Behandlung wurden 900 µg Protein auf die Säulen geladen und mit 5 ml 0,1-%iger Trifluoressigsäure (TFA, *engl. Trifluoroacetic Acid*) gewaschen. Dann wurde mit 2 ml eines 80% HPLC-sauberen Methanol/ 0.1% TFA-Gemischs gewaschen und das Eluat in Eppendorfgefäßen aufgefangen.

Anschließend erfolgte eine Gefriertrocknung in einer Lyophylle über Nacht, nach Resuspen-

sion in 100  $\mu\text{l}$  Assay Puffer wurden die Proben anschließend im Enzymimmunoassay (EIA) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen EIA in *Sandwich*-Technik, die Messung erfolgt in einer 96-well Mikrotiterplatte. Durch enzymatische Aktivität der an den zweiten Antikörper gekoppelten Acetylcholinesterase in Gegenwart von Acetylthiocholin/2-Nitrobenzoesäure (Ellmans-Reagenz) entsteht eine gelbliche Färbung, deren Intensität proportional zur Endothelinkonzentration ist. Nach Inkubation der Mikrotiterplatte bei 4°C wurde die Extinktion bei 412 nm im ELISA-Reader gemessen, die Endothelin-Konzentration anhand der Standardkurve mit Hilfe der Software WinRead (Version 2.3, Anthos) bestimmt und in pg/ml dargestellt.

## 2.8 Citrullin-Assay zur NO-Produktionsbestimmung

Material	Hersteller
L-[2, 3, 4, 5- $^3\text{H}$ ] Argininmonohydrochlorid	Amersham GE Healthcare, UK
DOWEX 50WX8-200	Sigma-Aldrich
Rotiszint eco plus	Carl Roth GmbH
1409 Liquid Scintillation Counter	Wallac
Thermomixer 5436	Eppendorf
Micro Bio-Spin Chromatography Columns	Bio-Rad
Vortexer	Heidolph
Centrifuge 5415C	Eppendorf
pH-Meter pH 320	WTW

Der Citrullin-Assay beruht auf der Umwandlung von L- $^3\text{H}$ -Arginin zu L- $^3\text{H}$ -Citrullin unter Abspaltung von NO und ist ein Maß für die Aktivität der NO-Synthasen unter standardisierter Zugabe aller Kofaktoren. Die Bildung von L- $^3\text{H}$ -Citrullin kann mit dieser Methode nach Trennung der beiden Aminosäuren durch einen Kationenaustauscher gemessen werden. Nach Präparation und Inkubation der Aortenringe wurden diese in 37°C PBS gespült, in Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Homogenisierung der Ringe erfolgte in Lysepuffer mit einer Kugelmühle entsprechend Abschnitt 2.2, die Proteinmessung erfolgte wie in Abschnitt 2.2 beschrieben. Es wurden ausschließlich Proteinextrakte eingesetzt.

30  $\mu\text{g}$  Protein wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert, dazu jeweils 40  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch gegeben (20  $\mu\text{l}$  2 $\times$ Assay-Puffer, 15  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, 4  $\mu\text{l}$  10 mM NAD(P)H, 1  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Arginin (1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )) und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe des Kationenaustauschers

DOWEX + EGTA pH 5,5 (500  $\mu$ l) wurde die Reaktion gestoppt, die Gefäße wurden gevortext und die Lösung auf die Säule geladen. Nach 10 Sekunden Zentrifugation bei 1000 rpm wurde das Eluat mit 1,4 ml Szinti-Cocktail gemischt, in Messgefäße gefüllt und für jeweils 1 Minute im Counter mit dem Programm Easycount gemessen.

<b>2× Assay-Puffer</b>	
Aqua dest.	Millipore
0,2% Triton X100	Sigma-Aldrich
100 mM Hepes (Natriumsalz) pH 7,4	Sigma-Aldrich
2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
2,5 mM CaCl <sub>2</sub>	Merck
2 $\mu$ M FAD	Sigma-Aldrich
2 $\mu$ M FMN	Sigma-Aldrich
30 $\mu$ M Tetrahydrobiopterin (BH <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
2 mM Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich

Vor der Verwendung wird DOWEX (Stammkonzentration 0,5 g/ml) wie folgt behandelt: 100 g DOWEX werden dreimalig mit 1 Liter 1 M NaOH gewaschen, dann zweimaliges Waschen mit 1 Liter Aqua dest, dann zweimaliges Waschen in Hepes/EGTA-Lösung pH 5,5 (100 mM Hepes-Natrium, 10 mM Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)) und zuletzt erneutes Auffüllen auf 200 ml und Einstellung des pH-Werts auf 5,5.

## 2.9 Messung des cGMP-Gehalts in Aortenringen

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma
Acetylcholin	Sigma
Kugelmühle	Retsch
Feinwaage	Sartorius
Salzsäure (HCl) 32%	Merck
Centrifuge 5415R	Eppendorf
Direct cGMP Enzyme Immunoassay Kit 96 Well CG-200	Sigma
Shaker MTS 2/4 digital	IKA
Anthos HT-III Reader	Anthos Mikrosysteme GmbH

Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Ringe in die unter 2.1.4 beschriebene Meßanordnung eingehängt. Nach 60 Minuten Äquilibration in der mit Carbogen begasten KHS wurde diese gegen 100  $\mu$ M IBMX (gelöst in DMSO) enthaltende KHS ausgetauscht und die

Ringe darin für 30 Minuten inkubiert. IBMX ist ein Phosphodiesteraseinhibitor, der den Abbau von cGMP durch die Phosphodiesterase hemmt, wodurch das entstehende cGMP akkumuliert. Danach wurden die Ringe im Organbad mit 1  $\mu$ M Acetylcholin für exakt 2 Minuten stimuliert, anschließend sofort in 2 ml Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Pro Behandlung wurden drei Aortenringe verarbeitet.

Nach kurzem Abtropfen auf Filterpapier und Wiegen der Ringe auf der Feinwaage erfolgte die Homogenisierung der Aortenringe bei  $4^{\circ}\text{C}$  in der Kugelmühle. Dazu wurden die Ringe in 50  $\mu$ l 0,1 M HCl pro mg Gewicht aufgenommen, die Eppendorfgefäße mit jeweils zwei Edelstahlkugeln bestückt und dann für 1 Minute bei 30 Hz in der Kugelmühle homogenisiert. Nach Zentrifugation (10 Minuten,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10000 rpm) wurden die Überstände abgenommen und für die Messung verwendet.

Die Messung des cGMP-Gehalts der Aortenringe erfolgte mit Hilfe des Direct cGMP Enzyme Immunoassay Kit, einem kompetitiven Immunoassay für die quantitative Bestimmung von cGMP in mit 0,1 M HCl behandelten Proben. Alle Messungen wurden entsprechend der mitgelieferten Anleitung durchgeführt. Das Meßprinzip basiert auf einem polyklonalen Antikörper (cGMP Rabbit Direct Antibody), der kompetitiv cGMP aus den Proben oder cGMP mit kovalent gebundener alkalischer Phosphatase (cGMP-Konjugat) bindet. In einer mit einem sekundären Antikörper (Goat anti-Rabbit IgG) beschichteten 96well Platte wurden Proben und cGMP-Standards mit dem cGMP-Konjugat und dem cGMP-Antikörper gemischt und auf einem Platten-Shaker (500 rpm) 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechende Kontrollen wurden mitgeführt. Nach mehrmaligem Waschen, Hinzufügen des Substrats (p-Nitrophenylphosphat in Puffer) und 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Enzymreaktion mit der gelieferten Lösung (Trinatriumphosphat in Wasser) gestoppt und anschließend durch einen Mikrotiterplatten-Reader bei 405 nm ausgelesen. Für alle eingesetzten Proben wurden Doppelwerte bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der erstellten Standardkurve, die Darstellung der Werte in nmol/g Ringgewicht.

## 2.10 Häufig verwendeten Chemikalien und Lösungen

### Chemikalien

Material	Hersteller
Ethanol absolut	J.T. Baker
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
D(+)-Glucose	Merck
N-2-Hydroxyethylpiperazinyl-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes) Natriumsalz	Sigma
Tris-HCl	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	J.T. Baker
Diclofenac	Sigma
Riboflavin 5'-Monophosphat (FMN)	Sigma
Pefablock	Boehringer
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Flavinadenindinukleotid (FAD)	Sigma

### Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (KHS)	NaCl 144 mM, KCl 5,9 mM, CaCl <sub>2</sub> 1,6 mM, MgSO <sub>4</sub> 1,2 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO <sub>3</sub> 25 mM, d-Glucose 11,1 mM, Diclofenac 1 μM
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	KCl 2,67 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,47 mM, NaCl 137,93 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 8,06 mM, fertig bezogen von Invitrogen
Hepes-Puffer pH 7,4	NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgSO <sub>4</sub> 1 mM, Hepes-Na 10 mM, Glukose 10 mM, CaCl <sub>2</sub> 1,5 mM
Lysepuffer pH 7,4	Tris-HCl 50 mM, KCl 1,15%, Glukose 5 mM, Triton X 1000 1%, EDTA 5 mM, Pefablock 1 mM, DTT 2 mM

## 2.11 Software

- MiKTeX2.7 unter Microsoft Windows XP und TeXnicCenter 1.0 RC1 zum Erstellen des Layouts dieser Arbeit
- JabRef Version 2.5 zur Literaturverwaltung
- SigmaPlot 8.0 zur Erstellung von Diagrammen
- Adobe Photoshop 7.0 und OpenOffice 2.1 zur Erstellung von Abbildungen
- SigmaStat 3.0 für die statistische Auswertung

## 2.12 Statistik

Die Darstellung der Messwerte erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Bei n-Zahlen über n=5 erfolgte die statistische Auswertung durch Anwendung des t-Tests bzw. Mann-Whitney-Tests. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert  $< 0,05$  angenommen.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Messung der Proteasomaktivität

Der Einsatz niedriger Inhibitorkonzentrationen bietet die Möglichkeit einer partiellen Inhibition des UPS. Im Gegensatz zu hohen, toxischen Inhibitorkonzentrationen führen niedrige Konzentrationen vornehmlich zur Reduktion der chymotrypsin-like Aktivität, ohne größere Reduktion der zwei weiteren Aktivitäten und Beeinflussung der Zellvitalität [107]. Hier wurde die chymotrypsin-like Aktivität in aortalen Gefäßringen der Ratte durch Abbau fluorogener Substrate (SLLVY-AMC) bestimmt.

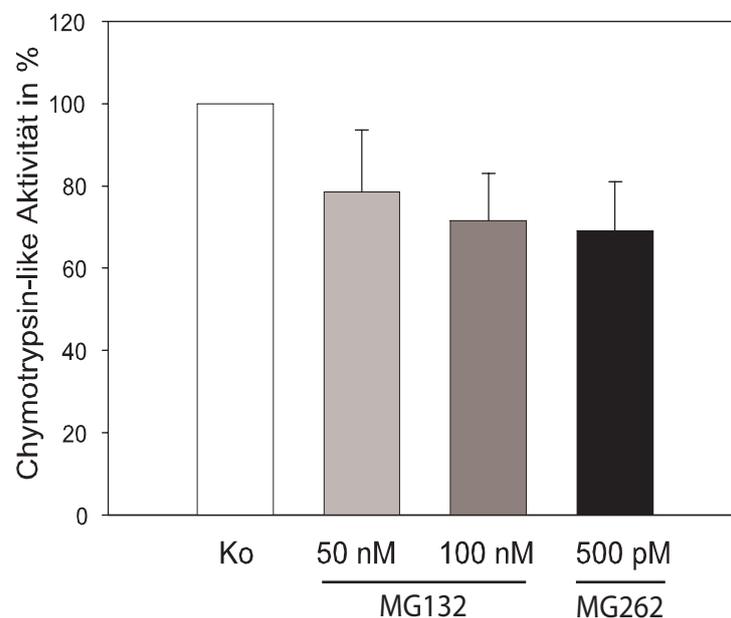


Abbildung 3.1: **Proteasomaktivität nach 12-stündiger Inkubation der aortalen Gefäßringe mit 50 bzw. 100 nM MG132 und 500 pM MG262.** Bestimmung durch Abbau fluorogener Substrate (SLLVY-AMC). Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  SEM in % der Lösungsmittelkontrolle (n=4).

Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen führten zu einer Abnahme auf 69-78 % Restaktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (MG132 50 nM:  $78,5 \pm 15$  %, MG132 100 nM:  $71,5 \pm 11,5$  %, MG262 500 pM:  $69,1 \pm 12$  %, Mittelwerte  $\pm$  SEM, siehe Abb. 3.1). Damit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Inhibitorkonzentrationen in Gefäßringen nur zu einer geringen Proteasomaktivitätsabnahme führen. Schon im Vorfeld konnte für diese Konzentrationen eine fehlende Toxizität gezeigt werden [125]. In den folgenden Vasorelaxationsexperimenten wurde die funktionelle Vitalität der Gefäßringe untersucht.

## 3.2 Vasorelaxationsexperimente

Die mit den angegebenen Substanzen inkubierten Aortenringe wurden durch Testung der endothelabhängigen Vasorelaxation mit Acetylcholin nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin evaluiert. Dazu wurden kumulative Acetylcholin Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen. Zur Prüfung der endothelunabhängigen Vasoreaktivität wurde die Vasorelaxation mit Papaverin untersucht.

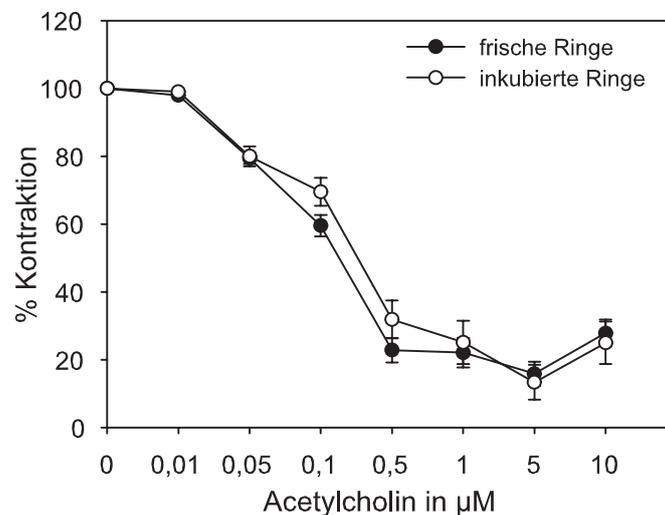


Abbildung 3.2: **Endothelabhängige Vasorelaxation von frisch präparierten Aortenringen im Vergleich zu inkubierten Aortenringen.** Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation unmittelbar nach Organentnahme bzw. nach Langzeitinkubation für 24 Stunden in DMEM mit 1 % FCS.  $n=15$  für beide Gruppen. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In Vorexperimenten wurde die Langzeitinkubation der Gefäßringe mit unterschiedlichen Kulturmedien getestet. Das letztendlich verwendete Protokoll ermöglichte eine Inkubati-

on der Gefäßringe ohne Einschränkungen von Phenylephrin-induzierter Kontraktion und Acetylcholin-induzierter Relaxation. Abbildung 3.2 zeigt die uneingeschränkte Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation von für 24 Stunden inkubierten Gefäßringen im Vergleich zu frisch präparierten Gefäßringen. Nachfolgend konnte die Inkubation auf 48 Stunden ausgeweitet werden.

### 3.2.1 Induktion einer endothelialen Dysfunktion mit TNF- $\alpha$

Ziel der Inkubation von Gefäßringen mit TNF- $\alpha$  war die Induktion einer endothelialen Dysfunktion, dessen Hauptmerkmal die verminderte endothelabhängige Vasorelaxation ist. Es wurde untersucht, ob die Inkubation von Aortenringen mit TNF- $\alpha$  zu einer verminderten endothelabhängigen Vasorelaxation im Vergleich zu Kontrollringen nach Vorkontraktion mit Phenylephrin führt.

Die 48-stündige Inkubation der Aortenringe mit 250 pg/ml bzw. 500 pg/ml TNF- $\alpha$  führte zu einer signifikanten, dosisabhängigen Reduktion der Acetylcholin-induzierten, endothelabhängigen Vasorelaxation. Während die Kontrollringe bis unter das Vorkontraktionsniveau relaxierten, erreichten die mit TNF- $\alpha$  inkubierten Ringe Werte von  $11 \pm 8\%$  (für 250 pg/ml TNF- $\alpha$ ) bzw.  $33 \pm 7\%$  (für 500 pg/ml TNF- $\alpha$ ) der Vorkontraktion (Angaben beziehen sich auf die vorletzte Acetylcholin-Gabe ( $5 \mu\text{M}$ ), Mittelwerte  $\pm$  SEM). Die endothelunabhängige Vasorelaxation mit Papaverin zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und TNF- $\alpha$ -Aortenringen (siehe Abb. 3.3). Diese Ergebnisse zeigen die Abnahme der endothelabhängigen Vasorelaxation im Sinne einer endothelialen Dysfunktion durch TNF- $\alpha$  bei uneingeschränkter endothelunabhängiger Vasorelaxation. Damit wurde dieses Schädigungsmodell für alle weiteren Untersuchungen zur Wirkung von Proteasominhibitoren verwendet.

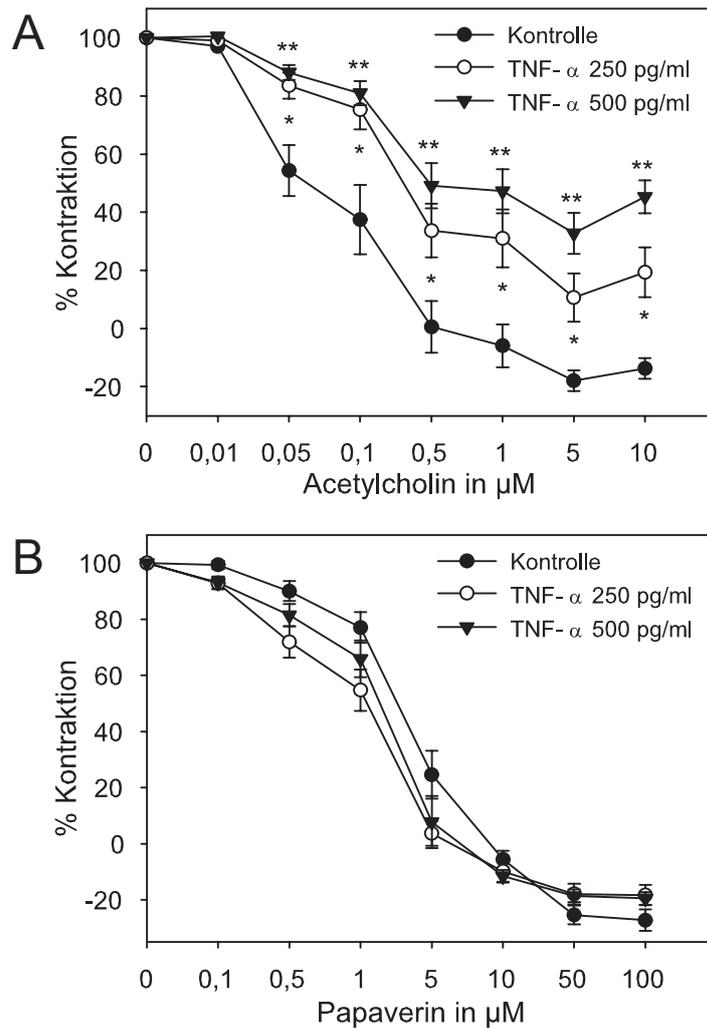


Abbildung 3.3: **Vasorelaxation TNF- $\alpha$ -inkubierter Aortenringe.** 48-stündige Inkubation mit 250 bzw. 500 pg/ml TNF- $\alpha$ . **A** Signifikante, dosisabhängige Abnahme der Acetylcholin-vermittelten Vasorelaxation im Vergleich zur Kontrolle (n=8). **B** Papaverin-vermittelte Vasorelaxation (n=8). Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion, Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*p<0,05 im Vgl. zur Kontrolle; \*\*p<0,01 im Vgl. zur Kontrolle.

### 3.2.2 Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch Proteasominhibition

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss niedriger Konzentrationen von Inhibitoren des UPS auf die endotheliale Dysfunktion untersucht. Dazu wurden die Aortenringe über 48 Stunden mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  allein oder mit dem Proteasominhibitor MG132 inkubiert.



koinkubierten Ringe das Niveau der Kontrollringe. Trotz signifikanter Unterschiede in der Vasorelaxation auf Acetylcholin, zeigten sich bei der anschließenden Papaverin-induzierten endothelunabhängigen Vasorelaxation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, was für eine unbeeinträchtigte Funktion der glatten Muskelzellen in allen Behandlungsgruppen spricht (siehe Abb. 3.5, Abb. 3.4 zeigt eine repräsentative Originalregistrierung der Vasorelaxation).

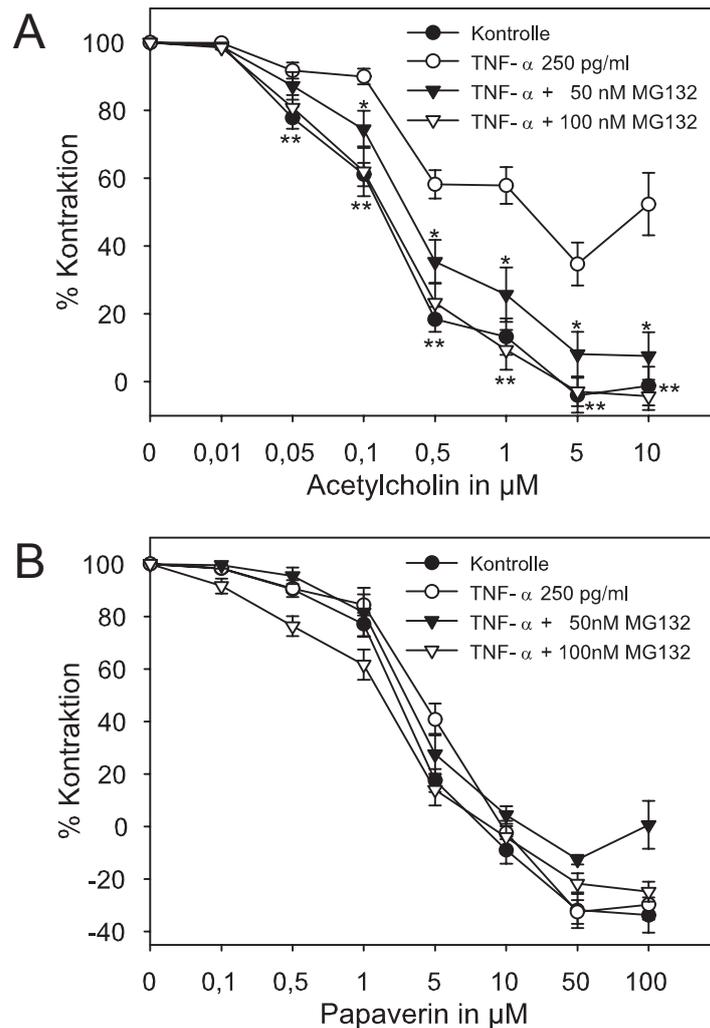


Abbildung 3.5: **Verhinderung der TNF- $\alpha$ -induzierten endothelialen Dysfunktion durch MG132.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und zusätzliche Inkubation mit 50 oder 100 nM MG132. **A** Dosisabhängige Verbesserung der Acetylcholin-Vasorelaxation MG132-behandelter Ringe im Vergleich zur TNF- $\alpha$ -Schädigung (n=8-12). **B** Unveränderte Vasorelaxation mit Papaverin (n=9-13). Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion, Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*p<0,05; \*\*p<0,01 im Vgl. zu TNF- $\alpha$ -Ringen.

Um MG132-spezifische Effekte auszuschließen, wurde der Einfluss eines weiteren Proteasominhibitors auf die TNF- $\alpha$ -induzierte endotheliale Dysfunktion untersucht. MG262 ist ein Vertreter der Peptidboronate und wurde ebenfalls in niedriger Konzentration und in äquipotenter Dosis zu MG132 eingesetzt. Diese richtete sich nach einer Vorarbeit aus unserem Labor [125] und konnte in Vorexperimenten weiter auf 500 pM MG262 reduziert werden.

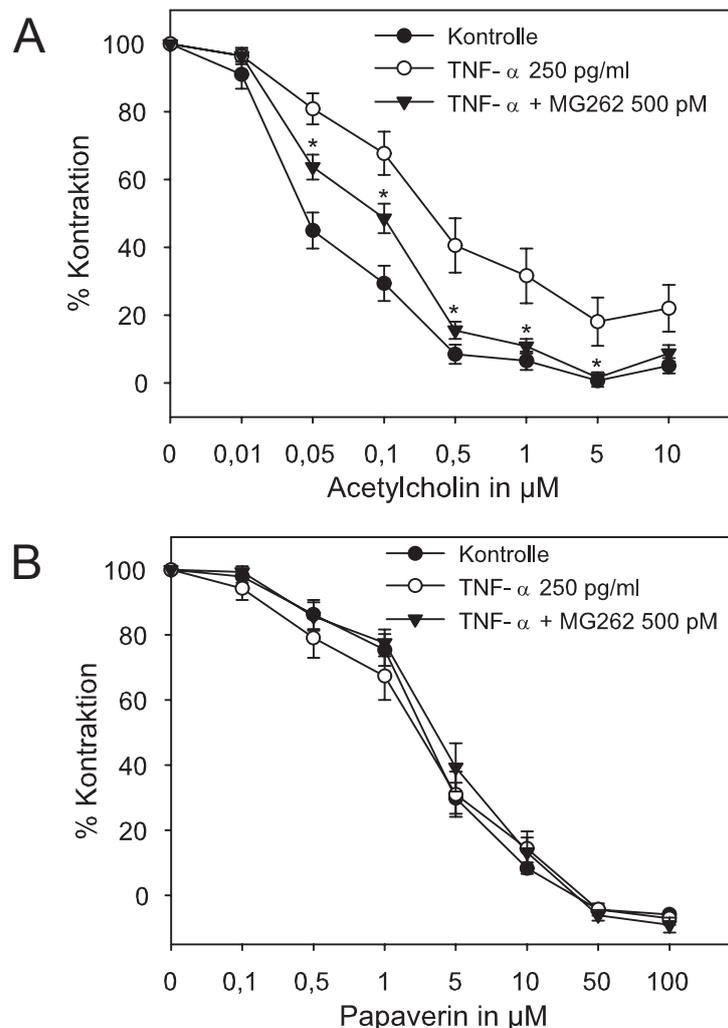


Abbildung 3.6: **Verhinderung der TNF- $\alpha$ -induzierten endothelialen Dysfunktion durch MG262.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und zusätzliche Inkubation mit 500 pM MG262. **A** Verbesserung der Acetylcholin-Vasorelaxation MG262-behandelter Ringe im Vergleich zur TNF- $\alpha$ -Schädigung (n=12). **B** Unveränderte Vasorelaxation mit Papaverin (n=11-12). Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion, Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*p<0,05 im Vgl. zu TNF- $\alpha$ -Ringen.

Die Koinkubation der Ringe mit TNF- $\alpha$  (250 pg/ml) und MG262 (500 pM) verbesserte die Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation signifikant im Vergleich zu den TNF- $\alpha$ -geschädigten Ringen. Mit  $2 \pm 2$  % der Vorkontraktion erreichten die koinkubierten Ringe wiederum

das Niveau der unbehandelten Kontrollen. Die Vasorelaxation mit Papaverin ergab keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Mit diesen Ergebnissen konnten die mit MG132 erzielten Daten bestätigt werden (siehe Abb. 3.6).

Mit den Vasorelaxationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass niedrigdosierte Proteasominhibition die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion verhindern kann. Potentiell verantwortliche Mechanismen wurden im zweiten Teil der Arbeit untersucht.

### Einfluss der Proteasominhibition auf ungeschädigte Gefäßringe

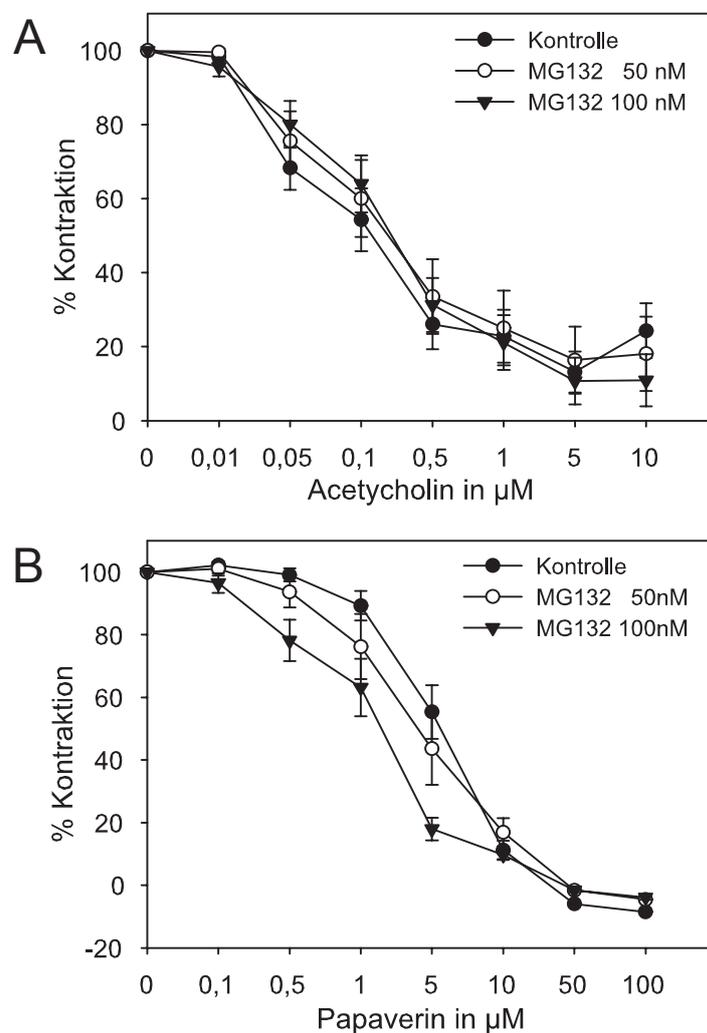


Abbildung 3.7: Vasorelaxation MG132-behandelter Gefäßringe im Vergleich zu unbehandelten Kontrollringen. 48-stündige Inkubation mit 50 und 100 nM MG132. **A** Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation, (n=11–12) **B** Endothelunabhängige Vasorelaxation mit Papaverin, (n=8). Relaxation in % der Vorkontraktion, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In parallelen Experimenten wurde der Effekt der alleinigen Inkubation der Aortenringe mit dem Proteasominhibitor MG132 auf ungeschädigte, nicht mit TNF- $\alpha$  behandelte, Gefäßringe geprüft.

Die 48-stündige Inkubation der Ringe mit MG132 zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Acetylcholin-induzierten Vasorelaxation im Vergleich zu den Kontrollen. Die endothelabhängige Vasorelaxation der unbehandelten Kontrollringe konnte durch MG132-Behandlung nicht weiter gesteigert werden. Die endothelunabhängige Vasorelaxation mit Papaverin ergab keine Unterschiede zwischen MG132-behandelten Ringen und Kontrollen (siehe Abb. 3.7).

### **3.3 Einfluss niedrigdosierter Proteasominhibition auf wichtige vasoaktive Mediatoren**

Neben der Testung der Vasoreaktivität der Aortenringe sollten weiterführende Analysen am Modell der TNF- $\alpha$ -induzierten endothelialen Dysfunktion klären, welche Mechanismen an der Verhinderung der endothelialen Dysfunktion durch Proteasominhibition beteiligt sind. Dabei sollte geklärt werden, ob eine bessere Bioverfügbarkeit von NO von Bedeutung ist. Desweiteren sollte die Rolle oxidativen Stresses und des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 in diesem Modell evaluiert werden. Dazu wurden die Aortenringe wie beschrieben mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132 für 48 Stunden inkubiert und für die jeweiligen Analysen aufgearbeitet.

#### **3.3.1 Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS)**

Die Inkubation der Aortenringe mit TNF- $\alpha$  (250 pg/ml) führte trotz verminderter Acetylcholin-induzierter Vasorelaxation (siehe 3.2.1) zu einem Anstieg der eNOS mRNA-Expression ( $1,32 \pm 0,12$ ) im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 3.8 A). Die Inkubation der Ringe mit MG132 (100 nM) reduzierte die eNOS mRNA ( $0,58 \pm 0,10$ ). Auch die Koinkubation der Ringe mit TNF- $\alpha$  und MG132 reduzierte die eNOS mRNA Expression um mehr als die Hälfte ( $0,40 \pm 0,04$ ), obwohl die Acetylcholin-vermittelte Vasorelaxation gegenüber TNF- $\alpha$ -Ringen signifikant verbessert war (siehe 3.2.2). Im Western Blot wurden diese zunächst überraschenden Ergebnisse bestätigt: TNF- $\alpha$  verstärkte die eNOS-Expression, die Koinkubation sowie die alleinige Inkubation mit MG132 reduzierten die eNOS-Expression (siehe Abb. 3.8 B).

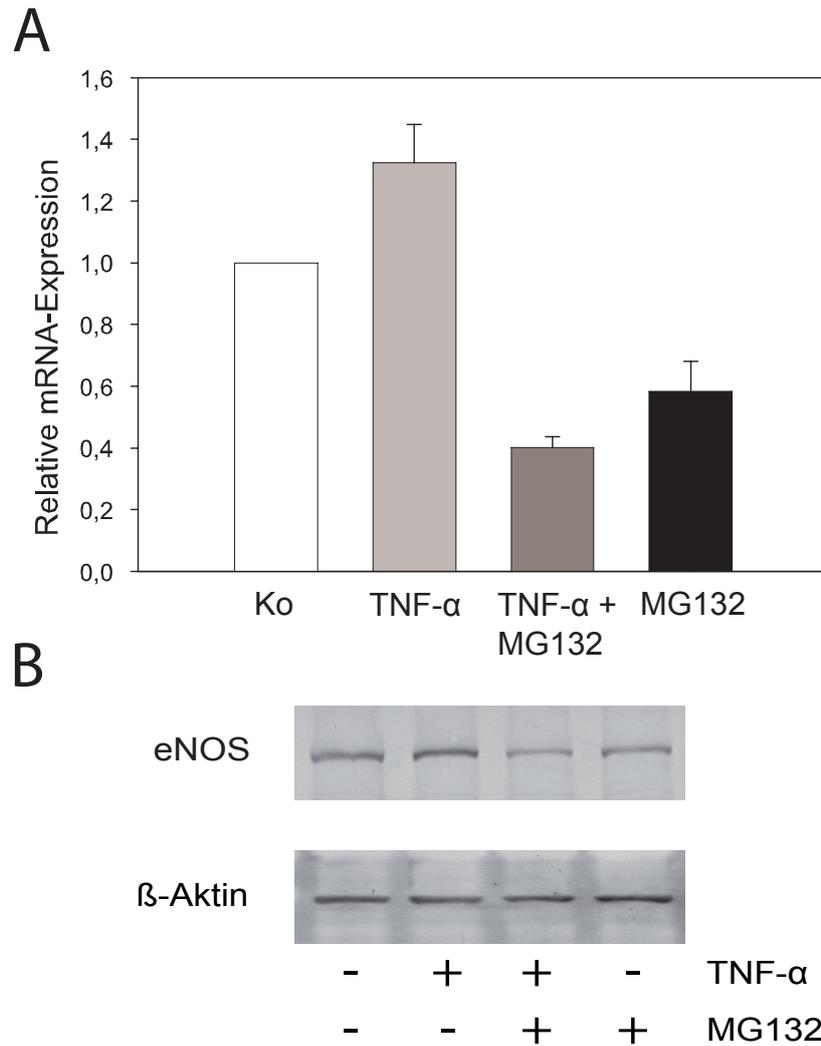


Abbildung 3.8: **Expression der eNOS in Aortenringen.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. **A** Relative eNOS mRNA-Expression. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier unabhängigen Real-Time RT-PCR Experimenten. **B** eNOS-Proteinexpression und Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin. Repräsentativer Blot aus vier unabhängigen Experimenten.

Demnach ist überraschenderweise trotz verbesserter Vasorelaxation die eNOS-Expression im Vergleich zur Kontrolle und TNF- $\alpha$ -Stimulation unter Proteasominhibition vermindert. Damit wurde auf mRNA- sowie auf Protein-Ebene gezeigt, dass Änderungen der eNOS-Expression keine Erklärung für die geschädigte bzw. verbesserte Endothelfunktion im gewählten Aortenringmodell darstellen.

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) ist eine weitere potentielle Quelle von vaskulärem NO und kann durch Zytokine (z.B. Interleukin-1, TNF- $\alpha$ ) in glatten Muskelzellen induziert werden [137]. Die relative mRNA Expression der iNOS war unter TNF- $\alpha$ -Behandlung als auch unter Koinkubation mit TNF- $\alpha$  und MG132 leicht erhöht ( $1,24 \pm 0,13$  bzw.  $1,42 \pm 0,20$ ), die mRNA Expression unter MG132-Behandlung zeigte sich ähnlich der Kontrolle ( $0,84 \pm 0,06$ ). Demnach ist die iNOS mRNA Expression in Gegenwart von TNF- $\alpha$  leicht erhöht – für TNF- $\alpha$ -Behandlung und Koinkubation in ähnlichem Maße – und bietet deswegen wenig Erklärungsansatz für die verbesserte Endothelfunktion koinkubierter Ringe im Vergleich zu mit TNF- $\alpha$ -behandelten Ringen.

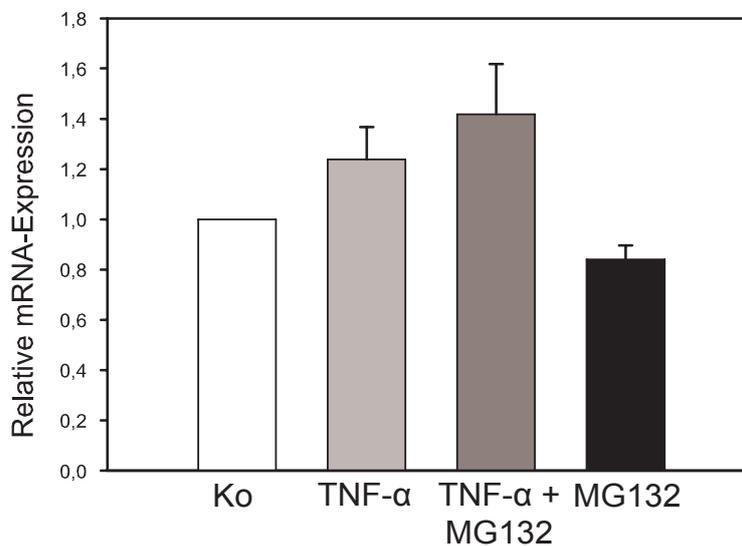


Abbildung 3.9: **Relative Expression der iNOS mRNA in Aortenringen.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. Darstellung als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier unabhängigen Real-Time RT-PCR Experimenten.

### 3.3.2 NOS-Aktivität im Citrullin Assay

Im Citrullin-Assay wurde die Enzymaktivität der NO-Synthasen in Gefäßringhomogenaten bestimmt (siehe Abbildung 3.10). TNF- $\alpha$  steigerte die Aktivität um 17,2% im Vergleich zu den Kontrollen, während die Koinkubation mit TNF- $\alpha$  und MG132 die Aktivität um 22,5% senkte. Die alleinige Behandlung mit MG132 reduzierte die Aktivität um 33,2% im Vergleich zu den Kontrollringen. Diese Messwerte für die Enzymaktivität zeigen ein ähnliches Muster wie die Werte für die eNOS-Expression und schließen Steigerungen der Enzymaktivität als Ursache für die verbesserte Vasorelaxation unter Proteasominhibition aus.

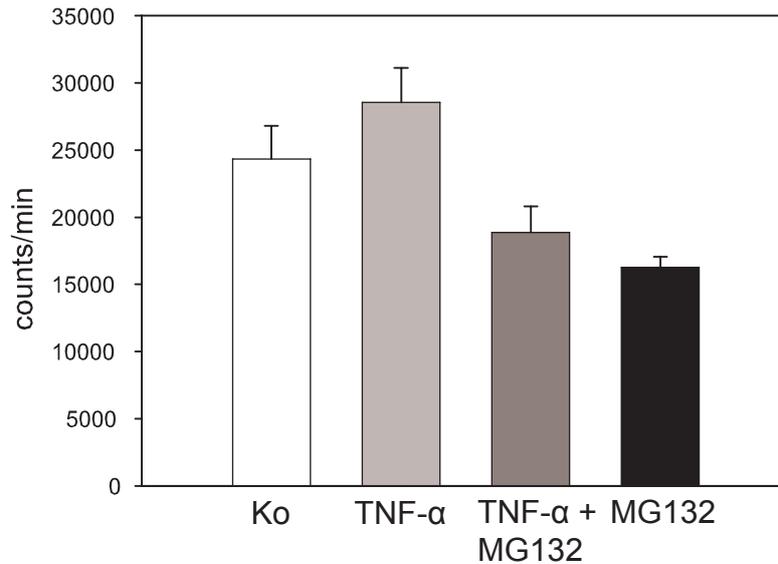


Abbildung 3.10: **NOS-Aktivität in Lysaten von Aortenringen.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. Gemessen im Citrullin-Assay, Mittelwerte in counts/min  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Experimenten.

### 3.3.3 mRNA-Expression der cGK-I

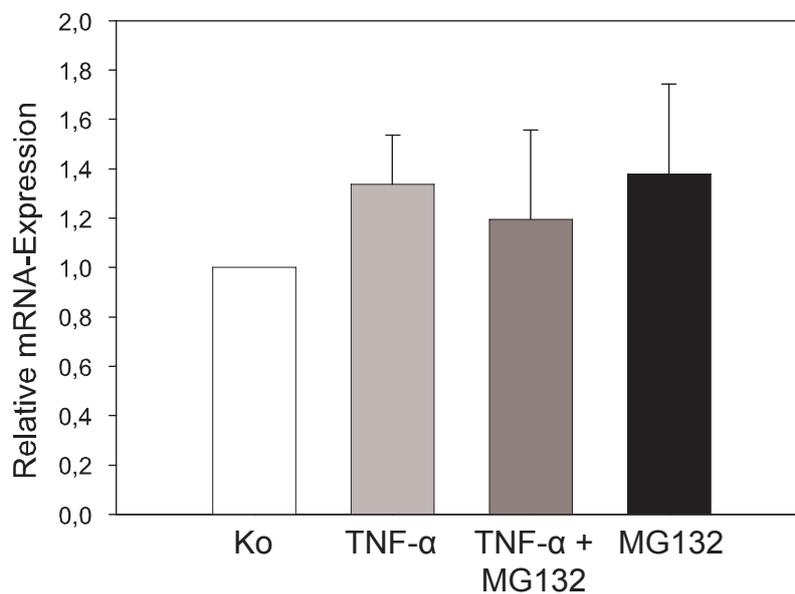


Abbildung 3.11: **Relative cGK-I mRNA-Expression in Aortenringen.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier unabhängigen Real-Time RT-PCR Experimenten.

Um zu überprüfen, ob die Expression der cGK-I durch TNF- $\alpha$  oder Proteasominhibition beeinflusst wird, wurde die cGK-I-mRNA in Aortenringen bestimmt. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 3.11).

Eine verbesserte Vasorelaxation aufgrund einer verstärkten Expression der cGK-I mRNA konnte somit ausgeschlossen werden.

### 3.3.4 Bestimmung der cGMP-Konzentration

Die vaskuläre NO-Bioverfügbarkeit ergibt sich aus der Menge an gebildetem NO auf der einen und der Degradation des gebildeten NO auf der anderen Seite. Zwar ist cGMP auch an weiteren wichtigen zellulären Reaktionen beteiligt, jedoch lässt die Bestimmung der cGMP-Konzentration in Gefäßringen Rückschlüsse auf die NO-Bioverfügbarkeit zu. Um die Bioverfügbarkeit zwischen den Behandlungsgruppen zu vergleichen, wurde die cGMP-Gewebekonzentration in den Gefäßringen nach Acetylcholinstimulation in Anwesenheit des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX bestimmt (siehe Abb. 3.12). Dabei reduzierte die Inkubation mit TNF- $\alpha$  die cGMP-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um knapp die Hälfte ( $2,80 \pm 0,16$  vs.  $1,58 \pm 0,26$  nmol/g). Die Koinkubation mit TNF- $\alpha$  und MG132 sowie die alleinige Inkubation mit MG132 reduzierte die cGMP-Konzentrationen weiter auf  $1,01 \pm 0,15$  bzw.  $0,91 \pm 0,18$  nmol/g.

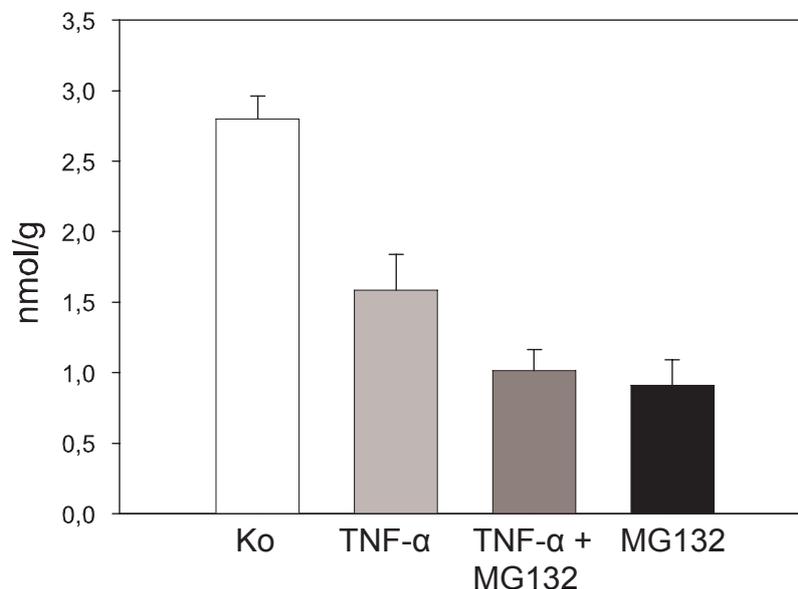


Abbildung 3.12: **cGMP-Gehalt in Aortenringen nach Stimulation mit Acetylcholin.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. Angaben in nmol/g. Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Experimenten.

Trotz verbesserter endothelabhängiger Vasorelaxation zeigten koinkubierte Aortenringe somit niedrigere cGMP-Konzentrationen als nur mit TNF- $\alpha$  inkubierte Aortenringe. Im

Zusammenhang mit den für die eNOS-Expression und NOS-Aktivität gewonnenen Daten lässt sich damit eine Verbesserung der NO-Bioverfügbarkeit als Ursache für die verbesserte Vasorelaxation weitestgehend ausschließen. Im Gegenteil: Die gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass die Behandlung von Aortenringen mit niedrigdosierter Proteasominhibition die NO-Bioverfügbarkeit reduziert. Demnach müssen andere Mechanismen ursächlich für die verbesserte endothelabhängige Vasorelaxation verantwortlich sein.

### **3.4 Expression von Endothelin-1**

Um zu überprüfen, ob die Behandlung mit niedrigen Konzentrationen MG132 im Aortenringmodell die Expression von ET-1 vermindert, wurden die Präpro-ET-1 mRNA und der Endothelin-Gehalt in Aortenringen bestimmt.

#### **mRNA-Expression von Präpro-Endothelin-1**

Mit der Real-Time RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Aortenringe über 48 Stunden mit TNF- $\alpha$  (250 pg/ml) die relative Präpro-ET-1 mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle  $1,7 \pm 0,35$ -fach steigert. Im Gegensatz dazu reduzierte die Koinkubation mit TNF- $\alpha$  und MG132 sowie die Inkubation mit MG132 (100 nM) allein die relative mRNA-Expression drastisch auf  $0,06 \pm 0,01$  bzw.  $0,07 \pm 0,01$  (siehe Abb. 3.13 A). Demzufolge führt die Inkubation der Aortenringe mit dem Proteasominhibitor MG132 in der niedrigen Konzentration von 100 nM zu einer deutlichen Verminderung der Präpro-ET-1-mRNA. TNF- $\alpha$  erhöht die mRNA-Expression dieses potenten Vasokonstriktors im verwendeten Modell.

#### **Endothelin-Gewebekonzentration**

Aufgrund der geringen Größe dieses Peptids wurde die Expression nicht im Western Blot, sondern im Enzymimmunoassay (EIA) bestimmt. Die durchschnittliche Endothelinkonzentration im Kontrollringhomogenat betrug  $38,5 \pm 5,53$  pg/ml. TNF- $\alpha$  steigerte den Endothelingehalt leicht auf  $47,5 \pm 7,24$  pg/ml, während die Koinkubation mit TNF- $\alpha$  und MG132 sowie MG132 allein die Endothelinkonzentration auf  $31,4 \pm 7,63$  pg/ml bzw.  $29,8 \pm 8,64$  pg/ml reduzierten (siehe Abb. 3.13 B). Dabei war die Reduktion der Endothelinkonzentration durch MG132, mit und ohne TNF- $\alpha$ , weniger ausgeprägt als für die Präpro-ET-1-mRNA gezeigt, bestätigte aber im Trend die mRNA-Daten.

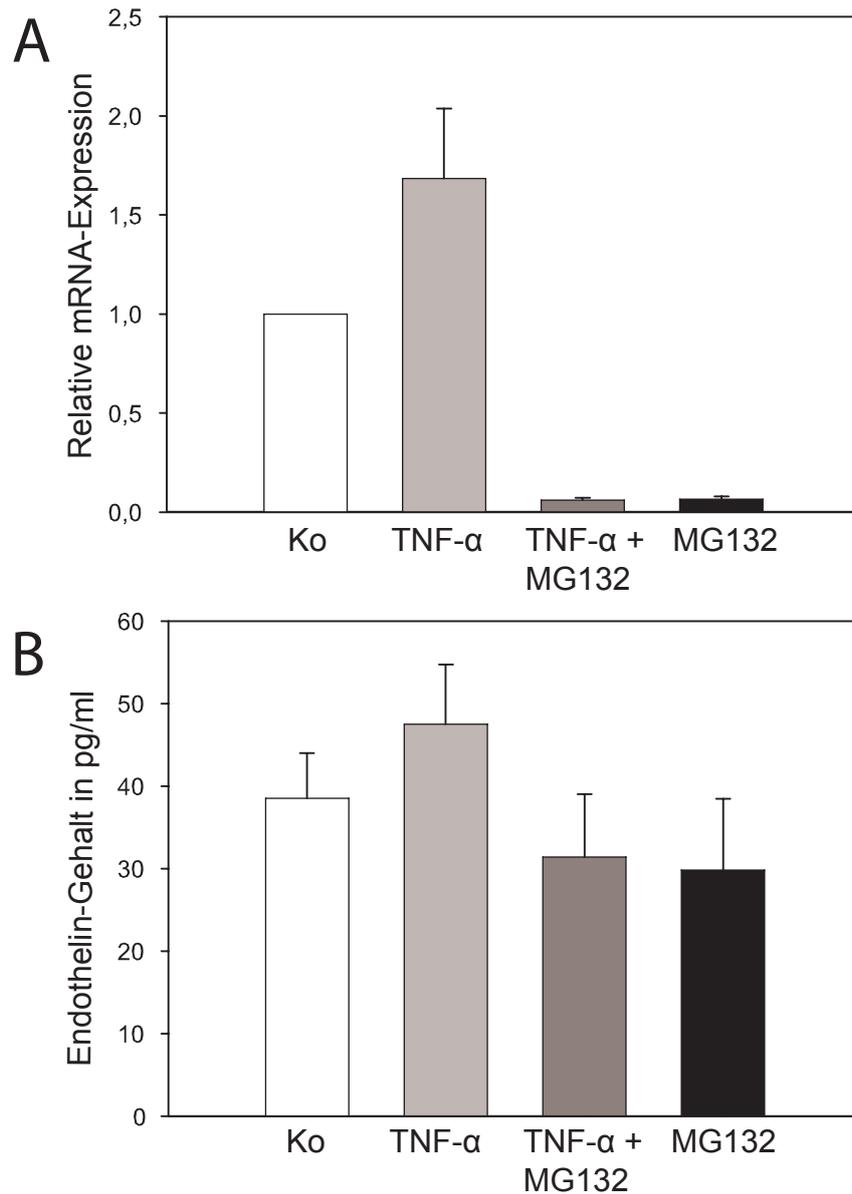


Abbildung 3.13: **Endothelinexpression in Aortenringen.** 48-stündige Inkubation mit TNF- $\alpha$  (250 pg/ml) und/oder MG132 (100 nM). **A** Relative mRNA-Expression von Präpro-Endothelin-1. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4. **B** Endothelin-Gehalt nach Messung im EIA. Angaben in pg/ml, Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=5.

Ausgehend von diesen Ergebnissen kann eine wichtige Rolle des Vasokonstriktors ET-1 im verwendeten Modell angenommen werden. Die TNF- $\alpha$ -Schädigung verstärkt die ET-1-Expression, MG132 senkt diese. Die verstärkte Wirkung von ET-1 unter TNF- $\alpha$ -Schädigung könnte somit die endothelabhängige Vasorelaxation vermindern, während der unter Proteasominhibition mit MG132 verminderte Einfluss von ET-1 die vasodilatatorische Komponente verstärkt und eine mögliche Erklärung für die verbesserte endothelabhängige Vasodilatation

unter niedrigdosierter Proteasominhibition darstellt.

## 3.5 Bildung und Abbau reaktiver Sauerstoffradikale

### 3.5.1 mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase

Die NAD(P)H-Oxidase ist die Hauptquelle der vaskulären Superoxidanionen im Rahmen der endothelialen Dysfunktion. Um zu untersuchen, ob TNF- $\alpha$  und MG132 die Expression der NAD(P)H-Oxidase im verwendeten Modell beeinflussen, wurde nach 48-stündiger Inkubation die mRNA-Expression für folgende Untereinheiten dieses Enzymkomplexes bestimmt: p22phox, p40phox, gp91phox, p47phox, Nox1, Nox4.

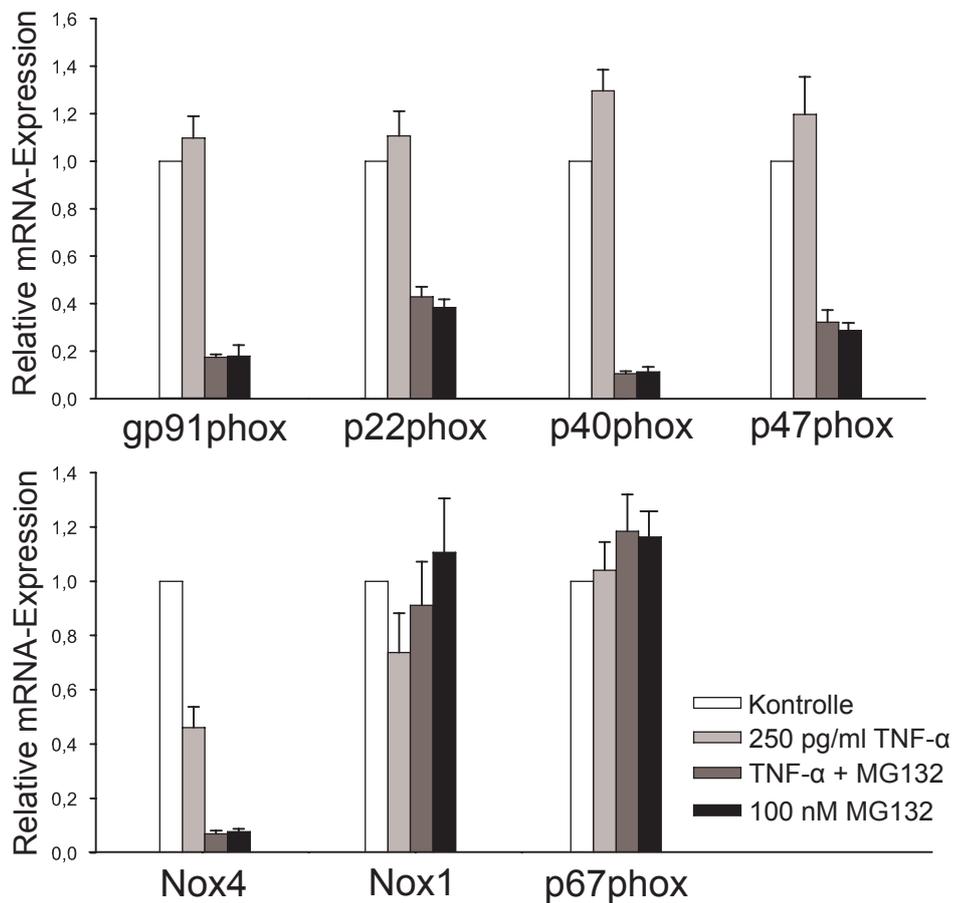


Abbildung 3.14: **Relative mRNA-Expression von NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten in Aortenringen.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4.

Tabelle 3.1: **Tabellarische Darstellung der relativen mRNA-Expression von NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten in Aortenringen.** mRNA-Expression relativ zur Expression des Housekeeping-Gens RPS11, Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4.

Untereinheit	Kontrolle	250 pg/ml TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ + MG132	100 nM MG132
p22phox	1,00	1,11 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,03
p40phox	1,00	1,30 $\pm$ 0,09	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02
p47phox	1,00	1,20 $\pm$ 0,16	0,32 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,03
p67phox	1,00	1,04 $\pm$ 0,10	1,18 $\pm$ 0,14	1,16 $\pm$ 0,09
gp91phox	1,00	1,10 $\pm$ 0,09	0,17 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,05
Nox1	1,00	0,74 $\pm$ 0,14	0,91 $\pm$ 0,16	1,11 $\pm$ 0,20
Nox4	1,00	0,46 $\pm$ 0,08	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01

Zur besseren Übersicht zeigt Tabelle 3.1 die Werte für die relative Expression der einzelnen Untereinheiten. In der zugehörigen Abbildung 3.14 läßt sich erkennen, dass TNF- $\alpha$  (250 pg/ml) die mRNA-Expression der Mehrzahl der untersuchten Untereinheiten (gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox) leicht verstärkt. Für Nox1 und Nox4 wurde jedoch eine Reduktion der mRNA-Expression durch TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Kontrolle registriert. Für die weiteren Behandlungen zeigte sich folgendes Expressionsmuster: MG132 reduzierte, mit und ohne TNF- $\alpha$ , die mRNA-Expression der Untereinheiten p22phox, p40phox, p47phox, gp91phox und Nox4 deutlich im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Reduktion konnte für Nox1 und p67phox nicht gefunden werden, hier blieben die Werte etwa auf dem Niveau der Kontrollen.

Insgesamt betrachtet steigert TNF- $\alpha$  die mRNA-Expression der meisten Untereinheiten im Trend, die Kombinationsbehandlung und MG132 allein senken im Wesentlichen die mRNA-Expression der Untereinheiten. Damit verhindert MG132 den durch TNF- $\alpha$  verursachten Expressionsanstieg und könnte somit zur Abnahme der Superoxidanion-Produktion beitragen.

### 3.5.2 mRNA-Expression der Lipoxygenase und der Xanthinoxidase

Eine bedeutende Rolle der Xanthinoxidase ist nicht zu vermuten, da die mRNA-Expression unter allen Behandlungen relativ konstant blieb (Kontrolle 1,00; 250 pg/ml TNF- $\alpha$  0,95  $\pm$  0,13; TNF- $\alpha$  + MG132 1,01  $\pm$  0,06; 100 nM MG132 1,20  $\pm$  0,16; Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Grafische Darstellung in Abb. 3.15).

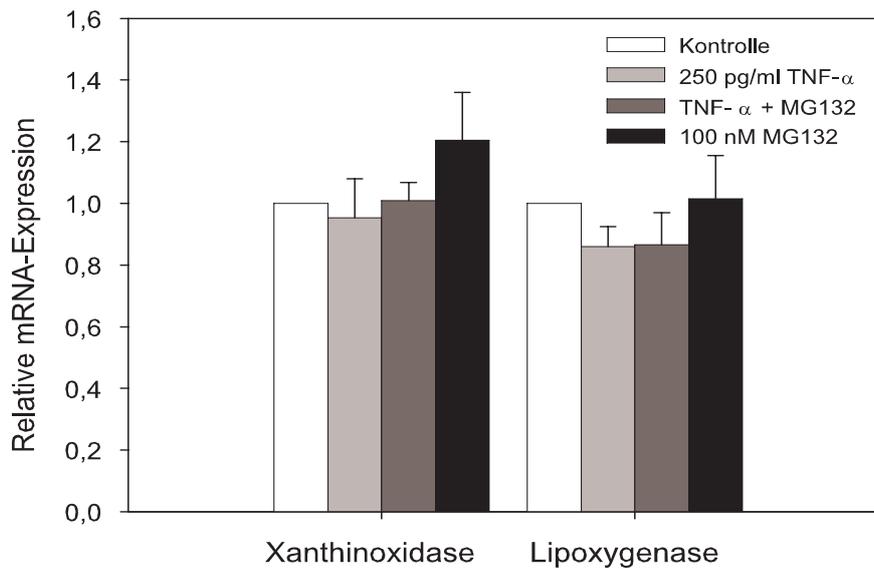


Abbildung 3.15: **Relative mRNA-Expression von Lipoxygenase und Xanthinoxidase in Aortenringen.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4.

Auch die relative mRNA-Expression der Lipoxygenase blieb unter den Behandlungen weitestgehend konstant (Kontrolle 1,00; 250 pg/ml TNF- $\alpha$   $0,86 \pm 0,07$ ; TNF- $\alpha$  + MG132  $0,87 \pm 0,10$ ; 100 nM MG132  $1,01 \pm 0,14$ ; Mittelwerte  $\pm$  SEM. Grafische Darstellung in Abb. 3.15). Demnach erscheint eine größere Bedeutung der beiden Enzyme im verwendeten Modell sehr unwahrscheinlich.

### 3.5.3 Expression der Superoxiddismutase (SOD1) und Katalase

Ebenso wie für die Superoxid-produzierenden Enzyme wurde die mRNA-Expression zweier antioxidativer Enzyme untersucht: Die Superoxiddismutase Typ 1 (SOD1, auch: CuZn-SOD) und die Katalase sind entscheidend am zellulären Detoxifikationsprozess beteiligt.

Die relative SOD1 mRNA-Expression (siehe Abb. 3.16) nach 48 Stunden in den Aortenringen wurde durch TNF- $\alpha$ -Behandlung (250 pg/ml) im Vergleich zur Kontrolle nur leicht vermindert ( $0,89 \pm 0,07$ ). Dagegen erhöhte MG132 (100 nM) die Expression der SOD1 deutlich: Die Inkubation mit TNF- $\alpha$  und MG132 erhöhte die Expression auf  $1,94 \pm 0,12$  und MG132 allein auf  $2,07 \pm 0,20$  (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

Im Western Blot konnten die Ergebnisse bestätigt werden: Der repräsentative Western Blot

in Abb. 3.16 zeigt ein stärkeres Signal für MG132-behandelte Aortenringe im Vergleich zu Kontroll- und TNF- $\alpha$ -Aortenringen. Demnach konnte auf mRNA- und Proteinebene die Zunahme der SOD1-Expression unter niedrigdosierter MG132-Behandlung, mit und ohne TNF- $\alpha$ , gezeigt werden.

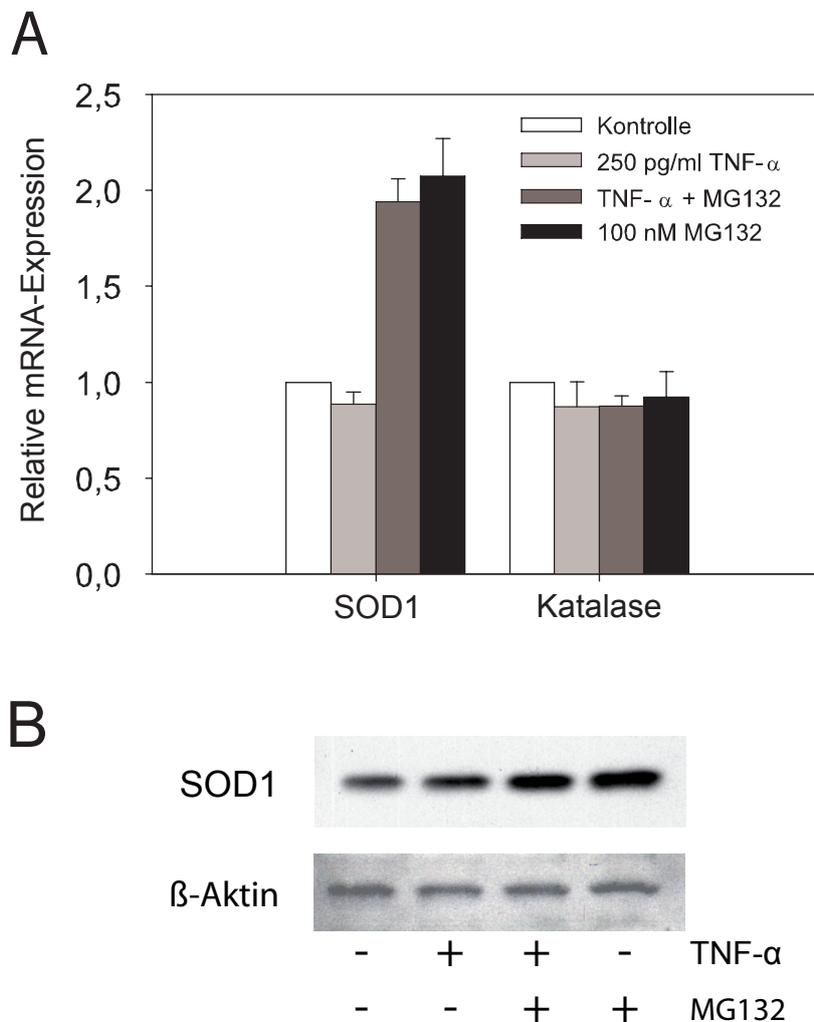


Abbildung 3.16: **Die Expression von Superoxiddismutase (SOD1) und Katalase.** 48-stündige Inkubation der Aortenringe mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. **A** Relative mRNA-Expression von SOD1 und Katalase. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4. **B** Proteinexpression der SOD1 und Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin. Repräsentativer Western Blot aus vier unabhängigen Experimenten.

Dagegen zeigte die Quantifizierung der mRNA-Expression der Katalase (siehe Abb. 3.16 A), welche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O umsetzt, keine wesentlichen Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Kontrolle 1,00; TNF- $\alpha$  0,87  $\pm$  0,13; TNF- $\alpha$  + MG132 0,87  $\pm$  0,05; 100 nM MG132 0,92  $\pm$  0,13).

### 3.5.4 Superoxidanionproduktion

Um zu untersuchen, ob die nach MG132-Behandlung verstärkte SOD1-Expression bei verminderter mRNA-Expression von NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten auch zu einer Verringerung der Superoxidanion-Produktion führt, wurde die Lucigenin-Chemilumineszenz in intakten Aortenringen bestimmt. Diese Methode lässt einen Vergleich der relativen Superoxidanion-Produktion zu [134].

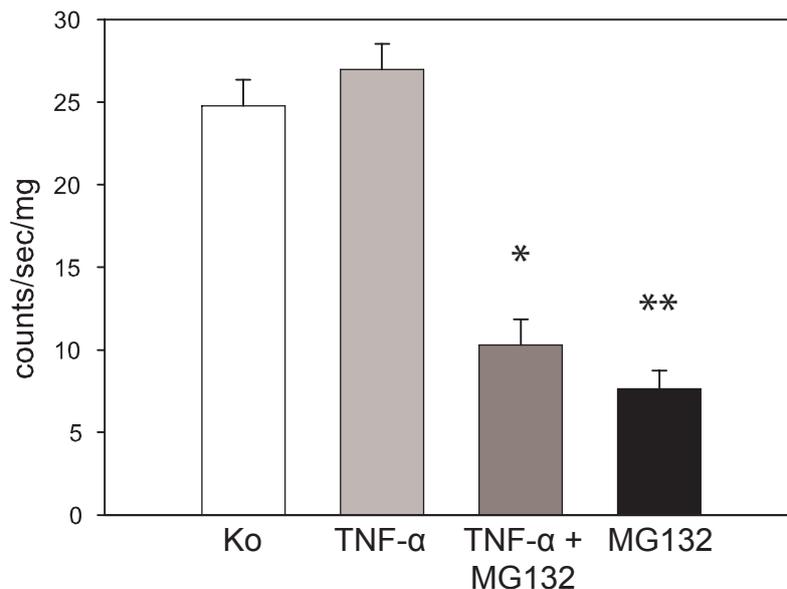


Abbildung 3.17: **Lucigenin-Chemilumineszenz von intakten Aortenringen.** 48-stündige Inkubation mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132. Mittelwerte in counts/sek/mg Trockengewicht  $\pm$  SEM aus 24 separaten Experimenten von 12 Tieren. \* $p < 0,001$  im Vgl. zu TNF- $\alpha$ -Ringern; \*\* $p < 0,001$  im Vgl. zur Kontrolle.

Die Ringe wurden mit 250 pg/ml TNF- $\alpha$  und/oder 100 nM MG132 für 48 Stunden inkubiert und anschließend für die Messung verwendet. TNF- $\alpha$  steigerte die Superoxidanionproduktion nur schwach im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle:  $24,79 \pm 1,58$ ; TNF- $\alpha$ :  $26,99 \pm 1,54$ ). Die Proteasominhibition mit MG132 verminderte die Werte jedoch signifikant – für TNF- $\alpha$  mit MG132 auf  $10,28 \pm 1,55$ , für MG132 allein weiter auf  $7,65 \pm 1,08$  (siehe Abb. 3.17). Das entspricht einer Reduktion der Superoxidproduktion auf  $45,45 \pm 8,66\%$  bzw.  $32,22 \pm 4,87\%$  der Kontrolle.

Im Einklang mit den gezeigten Expressionsdaten für SOD1 und NADP(H)-Oxidase lässt die verminderte Chemilumineszenz MG132-behandelter Aortenringe auf eine verminderte Produktion von Superoxidanionen schließen. Demnach konnten die antioxidativen Eigenschaften niedrigdosierter Proteasominhibition mit MG132 im Ringmodell bestätigt werden.

## 4 Diskussion

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass niedrigdosierte Proteasominhibition die eNOS-Expression in vaskulären Endothelzellen verstärkt und darüber hinaus ein antioxidatives Expressionsmuster in vaskulären Endothelzellen induziert. Anknüpfend an die in Endothelzellen gewonnenen Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss niedrigdosierter Proteasominhibition auf isolierte aortale Gefäßringe der Ratte untersucht. Nach der Etablierung eines ex vivo Schädigungsmodells mit TNF- $\alpha$  wurde überprüft, ob niedrigdosierte, nicht toxische Proteasominhibition diese experimentell induzierte endotheliale Dysfunktion verhindern kann. Darüber hinaus wurde untersucht, welche Mechanismen beteiligt sind.

Die Inkubation aortaler Gefäßringe der Ratte mit TNF- $\alpha$  über 48 Stunden reduzierte die endothelabhängige Vasorelaxation dosisabhängig im Sinne einer endothelialen Dysfunktion. Die gleichzeitige Inkubation mit den Proteasominhibitoren MG132 und MG262 konnte die Abnahme der endothelabhängigen Vasorelaxation durch TNF- $\alpha$  verhindern.

Die Untersuchung der beteiligten Mechanismen zeigte, dass die eNOS-Expression und die NOS-Aktivität trotz verbesserter Vasorelaxation koinkubierter Gefäßringe im Vergleich zu nur mit TNF- $\alpha$  behandelten Gefäßringen reduziert war. Geringere cGMP-Konzentrationen in MG132-behandelten Ringen konnten eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit als Ursache für die verbesserte Endothelfunktion ausschließen. In weiterführenden Untersuchungen wurde die Rolle des Sauerstoffradikalstoffwechsels näher charakterisiert und gezeigt, dass MG132 die Expression mehrerer NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten reduziert und die Expression der SOD1 verstärkt. Dies führte zu einer Reduktion der Superoxid-Produktion. Als weiteren potentiellen Mechanismus für die Endothelfunktionsverbesserung konnte gezeigt werden, dass MG132 die Expression des potenten Vasokonstriktors ET-1 supprimiert.

Nachfolgend werden diese Ergebnisse näher erörtert und in den Kontext der bisher publizierten Daten gesetzt.

## 4.1 TNF- $\alpha$ verursacht eine endotheliale Dysfunktion in aortalen Gefäßringen

Erhöhte Plasmakonzentrationen proinflammatorischer Zytokine werden bei der endothelialen Dysfunktion im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen beobachtet [138, 139]. Neben IL-1 und IL-6 kommt TNF- $\alpha$  in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu [140]. Mehrere Studien belegen die Beeinträchtigung der Endothelfunktion durch TNF- $\alpha$ . Die Infusion von TNF- $\alpha$  in Ratten sowie die Inkubation von isolierten aortalen, mesenterialen Gefäßringen oder boviner Intralobulararterien mit TNF- $\alpha$  vermindern die endothelabhängige Vasorelaxation [141–143]. Nakamura et al. konnten durch arterielle Infusion von TNF- $\alpha$  in menschliche Unterarmarterien ein Zunahme des plethysmographisch gemessenen Gefäßwiderstands feststellen [144].

Die rheumatoide Arthritis als chronisch inflammatorische Erkrankung ist ebenfalls durch eine endotheliale Dysfunktion mit erhöhten Serumkonzentrationen für TNF- $\alpha$  gekennzeichnet [145, 146]. Eine Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie verbessert wiederum die endotheliale Dysfunktion bei inflammatorischen Krankheiten [147, 148]. Desweiteren verbessert die intravenöse Gabe von Anti-TNF den Unterarmblutfluss bei Patienten mit Herzinsuffizienz [149].

Vor dem Hintergrund dieser Studien wurde in der vorliegenden Arbeit TNF- $\alpha$  für die Induktion einer endothelialen Dysfunktion verwendet. Dabei erfolgte eine Langzeitinkubation aortaler Gefäßringe der Ratte mit TNF- $\alpha$ . Die Abnahme der Acetylcholin-induzierten Vasorelaxation in der vorliegenden Arbeit war signifikant und dosisabhängig im Vergleich zu unbehandelten Kontrollringen. Das Ausmaß der Reduktion der Acetylcholin-induzierten Vasorelaxation stellte sich vergleichbar mit den in [141] für aortale Gefäßringe beschriebenen Daten nach TNF- $\alpha$ -Infusion in Ratten dar.

Ein weiteres Argument für die Verwendung von TNF- $\alpha$  als Modell einer endothelialen Dysfunktion in der vorliegenden Arbeit ist die Abnahme der eNOS-Expression nach TNF- $\alpha$ -Behandlung, wie sie in Zellkulturexperimenten beschrieben wird: Verantwortliche Mechanismen umfassen die Verringerung der eNOS mRNA-Halbwertszeit von 48 auf 3 Stunden und die Reduktion der eNOS-Promoteraktivität [25, 150, 151].

Im hier verwendeten Modell reduzierte TNF- $\alpha$  die endothelabhängige Vasorelaxation der

Aortenringe. Überraschenderweise zeigten Expressionsanalysen jedoch eine leicht erhöhte eNOS-Expression sowie leicht erhöhte NOS-Aktivität im Citrullin-Assay. Folglich konnte die naheliegendste Hypothese für die Abnahme der Vasorelaxation in Aortenringen nach TNF- $\alpha$ -Behandlung – die Abnahme der eNOS-Expression – nicht bestätigt werden. Jedoch war der cGMP-Gehalt in mit TNF- $\alpha$  inkubierten Aortenringen im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Ursächlich könnte hier eine TNF- $\alpha$ -induzierte Zunahme von oxidativem Stress, möglicherweise verstärkt durch eine Entkopplung der eNOS, zugrunde liegen (siehe Abschnitt 4.2.3). Eine erhöhte eNOS-Expression durch TNF- $\alpha$ -Behandlung wird jedoch auch in anderen Studien beschrieben: Die endotheliale Dysfunktion kann mit einer erhöhten anstatt verminderter eNOS-Expression einhergehen. Dies konnte für Diabetes mellitus [51] und die arterielle Hypertension in Ratten gezeigt werden [152]. Beide Zustände sind auch durch erhöhten oxidativen Stress gekennzeichnet. Auch die Induktion einer rheumatoiden Arthritis im Rattenmodell führte zur endothelialen Dysfunktion mit verminderter Acetylcholin-induzierter Vasorelaxation und erhöhter eNOS mRNA- und Proteinexpression im Vergleich zu gesunden Kontrollen [153]. Muzaffar et al. zeigten in Übereinstimmung mit den vorliegenden Experimenten die Hochregulation der eNOS Expression in Pulmonalarterien von Schweinen nach 16-stündiger Inkubation mit TNF- $\alpha$  [154].

## 4.2 Niedrigdosierte Proteasominhibition verhindert eine endotheliale Dysfunktion

Mit der vorliegenden Arbeit konnten die Erkenntnisse zu den endothelprotektiven Effekten niedrigdosierter Proteasominhibition [125, 127] auf ein Aortenringmodell der endothelialen Dysfunktion ausgeweitet werden. Die Proteasominhibition mit MG132 verhinderte die Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation durch TNF- $\alpha$  dosisabhängig, die höchste verwendete MG132-Konzentration (100 nM) verbesserte die Vasodilatation bis auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen. Der zweite in dieser Arbeit verwendete Proteasominhibitor MG262 konnte diese Ergebnisse bestätigen. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass niedrigdosierte Proteasominhibition die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion verhindern kann. Die Untersuchung der Ursachen für die verbesserte Vasodilatation zeigte interessante Unterschiede zu den bisher an Endothelzellen gewonnenen Erkenntnissen.

### 4.2.1 Rolle der eNOS

Die Erkenntnisse aus Zellkulturstudien, die eine Steigerung der eNOS-Expression und -Aktivität durch niedrigdosierte Proteasominhibition zeigten [125, 127], legten die Vermutung nahe, dass niedrigdosierte Proteasominhibition auch im aortalen Ringmodell über eine eNOS-Expressionszunahme sowie verbesserte NO-Bioverfügbarkeit zur Verbesserung der endothelialen Dysfunktion führt. Die verbesserte Reaktion auf Acetylcholin proteasominhibierter Ringe im Vergleich zu TNF- $\alpha$ -Ringen schien diese Annahme zu bestätigen. Jedoch zeigten weiterführende Analysen, dass die eNOS-Expression von mit TNF- $\alpha$  und MG132 koinkubierten Aortenringen, trotz verbesserter Endothelfunktion, im Vergleich zu nur mit TNF- $\alpha$  inkubierten Aortenringen reduziert war. Auch die NOS-Aktivität im Citrullin-Assay wurde durch die Koinkubation reduziert. Weiterhin ließ sich zeigen, dass der durch TNF- $\alpha$  reduzierte cGMP-Gehalt durch die Koinkubation weiter reduziert wurde.

Somit kann die für Endothelzellen gezeigte Steigerung der eNOS-Expression durch niedrigdosierte Proteasominhibition [127] im isolierten Aortenringmodell nicht bestätigt werden. Eine verbesserte NO-Bioverfügbarkeit als Ursache für die verbesserte Vasorelaxation der Aortenringe ist nach derzeitigem Kenntnisstand unwahrscheinlich. Eine umfassende Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse bezüglich eNOS von Zellkultur und Aortenringmodell fällt anhand der vorliegenden Daten schwer. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Tatsache, dass die Untersuchungen an verschiedenen Modellen vorgenommen wurden. Isolierte Aortenringe repräsentieren im Vergleich zu Endothelzellen in Kultur ein intaktes Gewebe mit unterschiedlichen Zelltypen und erhaltener Interaktion der Zellen untereinander. Dieser grundlegende Unterschied zwischen beiden Modellen könnte auch zu abweichenden Reaktionen auf identische externe Stimuli führen.

Eine verbesserte Acetylcholin-vermittelte Vasorelaxation trotz verminderter NO-Bioverfügbarkeit erscheint schwer vorstellbar. Ursächlich kommt die vorteilhafte Regulation alternativer vasoaktiver Mechanismen in Frage. Folglich wurden weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Gefäßfunktion besitzen, untersucht. Dazu gehören Endothelin-1 und der Sauerstoffradikalstoffwechsel. Die vorhandenen Untersuchungen lassen für beide Elemente eine vorteilhafte Regulation durch niedrigdosierte Proteasominhibition vermuten [125]. Daher wurden sowohl Endothelin-1 als auch Schlüsselenzyme des oxidativen Stoffwechsels im ver-

wendeten Ringmodell näher untersucht.

### 4.2.2 Rolle von Endothelin-1

Die Regulation des Gefäßtonus ist das Ergebnis des Zusammenspiels verschiedener vasoaktiver Mediatoren. Dabei kommt dem Antagonismus von konstringierenden und relaxierenden Mediatoren eine große Bedeutung bei der Tonusregulation zu.

Endothelin-1 (ET-1) ist ein potenter Vasokonstriktor und als Gegenspieler von NO entscheidend an der Tonusregulation beteiligt [31, 32]. Die mRNA-Expression von Präpro-ET-1 in den Aortenringen wurde durch TNF- $\alpha$  leicht erhöht, durch Koinkubation der Aortenringe mit TNF- $\alpha$  und MG132 sowie durch MG132 allein nahezu vollständig unterdrückt. Die Bestimmung des Endothelingehalts der aortalen Gefäßringe konnte diese Ergebnisse im Trend bestätigen.

Die Daten belegen die Relevanz des UPS im Rahmen der Regulation der vaskulären ET-1-Expression. Zudem stellen diese Expressionsdaten einen Erklärungsansatz für die beobachtete endotheliale Dysfunktion der Aortenringe nach TNF- $\alpha$ -Behandlung einerseits, sowie für die verbesserte endotheliale Funktion unter Proteasominhibition andererseits, dar. Die verminderte Vasodilatation von TNF- $\alpha$ -Ringern im Vergleich zu unbehandelten Ringern könnte somit teilweise durch die verstärkte Expression und vasokonstringierende Wirkung von Endothelin-1 bedingt sein. Im Umkehrschluss würde die Abnahme der ET-1 Expression durch Proteasominhibition den Einfluss dieses potenten Vasokonstriktors auf den Gefäßtonus reduzieren und mitverantwortlich für die verbesserte endothelabhängige Vasodilatation der koinkubierten Ringe im Vergleich zu TNF- $\alpha$ -Ringern sein.

Die Literatur unterstützt die hier für das Aortenringmodell gezeigten Daten. TNF- $\alpha$  führt sowohl kurzfristig zur ET-1-Freisetzung [155, 156], als auch zur Erhöhung der ET-1 Expression [157]. Proteasominhibition reduziert in Tiermodellen die Produktion von ET-1 und die Expression von Präpro-ET-1 mRNA [158–160]. Niedrigdosierte, nicht toxische Proteasominhibition mit MG132 und MG262 in HUVEC reduzierte die Expression von ET-1 und dessen ET<sub>A</sub>-Rezeptor [125]. Ohkita et al. konnten in Endothelzellen eine verstärkte ET-1 Produk-

tion und Präpro-ET-1 mRNA Expression nach TNF- $\alpha$ -Inkubation zeigen. Koinkubation der Zellen mit TNF- $\alpha$  und dem Proteasominhibitor PSI reduzierte die ET-1 Produktion und Präpro-ET-1 mRNA [161].

Entsprechend dem Konzept einer Balance zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren wäre bei einer verminderten ET-1 Expression und damit verminderter konstriktorischer Wirkung eine geringere Menge an bioverfügbarem NO nötig, um die vasokonstriktorische Wirkung von ET-1 zu antagonisieren. Die verminderte Expression von eNOS in dieser Arbeit könnte zum Teil als Anpassung an die durch Proteasominhibition stark reduzierte ET-1 Expression verstanden werden. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine parallele Veränderung der Expression von ET-1 und eNOS.

Transgene Mäuse, die ET-1 überexprimieren, weisen dennoch normale Blutdruckwerte auf. In Experimenten mit Aortenringen dieser Tiere wurde vermutet, dass eine erhöhte NO Bioverfügbarkeit den Gefäßtonus kompensatorisch normalisiert und die Entstehung eines arteriellen Hypertonus verhindert [162]. In Unterstützung dieser These wurde gezeigt, dass in ET-1 überexprimierenden Mäusen der zusätzliche knockout von eNOS zu höheren Blutdruckwerten als in eNOS knockout-Mäusen führt [163]. Die Behandlung von gesunden Sprague-Dawley Ratten mit Lipopolysaccharid (LPS) führte sowohl zur Erhöhung der eNOS als auch der Präpro-ET-1 mRNA-Expression im Lungengewebe [164]. Aortic banding im Rattenmodell führte zur Hochregulation der eNOS- und ET-1-Expression in Lungengewebe [165].

Diese Studien beschreiben die Erhöhung der eNOS-Expression bei gleichzeitig erhöhter ET-1-Expression. Der umgekehrte Fall, also die gleichzeitige Abnahme von eNOS- und ET-1-Expression mit der Herstellung einer Balance beider Mediatoren, wurde in der Literatur bis jetzt nicht beschrieben. Er bietet jedoch vor dem Hintergrund dieser Arbeit eine mögliche Erklärung für die verbesserte Vasorelaxation in Proteasominhibitor-behandelten Ringen. Zukünftig könnte beispielsweise die Inkubation von Aortenringen mit Inhibitoren des Endothelin-Systems klären, ob ein derartiger Mechanismus im Gefäßsystem existiert.

### 4.2.3 Rolle oxidativen Stresses

Oxidativer Stress ist ein Merkmal vieler kardiovaskulärer Erkrankungen und eine wichtige Ursache der endothelialen Dysfunktion. Dabei sind die Mechanismen für die Abnahme der Endothelfunktion durch oxidativen Stress in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Pathologie sehr unterschiedlich. Sie reichen unter anderem von der Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit über die Inhibition der löslichen Guanylatzyklase und weiteren Vasodilatoren wie Prostazyklin und EDHF, bis hin zur Förderung von Vasokonstriktion durch Erleichterung der Calciummobilisierung und Sensibilisierung kontraktiler Proteine in VSMC [1].

Das Ausmaß oxidativen Stresses wird einerseits durch die Radikalproduktion, als auch durch den Grad der Schwächung der antioxidativen Abwehr bestimmt. Zur vaskulären Superoxidproduktion tragen unter anderem die Xanthinoxidase, die Lipoxigenase, die entkoppelte eNOS und die NAD(P)H-Oxidase bei [50]. Der NAD(P)H-Oxidase kommt hierbei in Endothelzellen eine entscheidende Rolle zu, sie ist in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen hochreguliert. Zu den antioxidativen Schutzenzymen zählen die Superoxiddismutase und die Katalase.

#### Oxidativer Stress durch TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  induziert oxidativen Stress durch Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase [166, 167]. In der vorliegenden Arbeit erhöhte TNF- $\alpha$  die mRNA-Expression der Mehrheit der untersuchten NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten moderat, weshalb die Expressionszunahmen in der Summe relevant erscheinen. Zusätzlich reduzierte die Schädigung der Aortenringe mit TNF- $\alpha$  die Expression des antioxidativen Enzyms SOD1 leicht. Die Zunahme der Lucigenin-Chemilumineszenz als Zeichen der erhöhten Superoxid-Produktion TNF- $\alpha$ -behandelter Ringe bestätigt die Expressionsdaten. Diese Zunahme erreichte zwar kein Signifikanzniveau, spiegelt aber die moderaten Expressionsveränderungen von NAD(P)H-Oxidase und SOD1 wider. Diese moderaten Expressionsveränderungen unter TNF- $\alpha$ -Behandlung scheinen für die signifikante Einschränkung der endothelabhängigen Vasorelaxation TNF- $\alpha$ -behandelter Aortenringe nicht ausschließlich verantwortlich zu sein, sondern wirken zusätzlich zur erhöhten ET-1-Expression (siehe Abschnitt 4.2.2).

Der Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die SOD1-Expression wird in der Literatur nicht einheitlich beschrieben und ist abhängig vom untersuchten Zelltyp. So senkt TNF- $\alpha$  in U937 Zellen die

SOD1 mRNA-, Proteinexpression und Promoteraktivität [168]. Dagegen veränderte TNF- $\alpha$  die mRNA- und Protein-Expression der SOD1 in murinen und bovinen Endothelzellen bzw. in der MCF-7 Zelllinie nicht, während die Expression der MnSOD unter TNF- $\alpha$ -Behandlung anstieg [169, 170].

Die Datenlage zur Regulation der NAD(P)H-Oxidase durch TNF- $\alpha$  ist eindeutiger. Mehrere Arbeiten beschreiben die Steigerung der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und Expression der Untereinheiten durch TNF- $\alpha$ . Zum Beispiel erhöht TNF- $\alpha$  in VSMC der Ratte die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und die Expression von p22phox mRNA [171], die Proteinexpression von gp91phox in Endothelzellen und VSMC aus Pulmonalarterien des Schweines [172] sowie die mRNA-Expression von p40phox und p22phox in Koronararterien der Ratte [173]. Ebenfalls stimuliert TNF- $\alpha$  die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und die Expression von p47phox, p67phox und gp91phox in humanen Monozyten [174].

### **Schutz vor oxidativem Stress durch niedrigdosierte Proteasominhibition**

Die Auswirkungen mehrerer Proteasominhibitoren auf oxidativen Stress wurden in unterschiedlichen Modellen untersucht und in der Literatur zum Teil gegensätzlich beschrieben. Zeitlich begrenzte, nicht toxische Proteasominhibition schützt vor oxidativem Stress [125, 175], chronische Proteasominhibition und hohe, Apoptose-induzierende Inhibitorkonzentrationen können dagegen oxidativen Stress erhöhen [176, 177].

Niedrigdosierte, nicht toxische Proteasominhibition scheint in Endothelzellen eine Stressantwort hervorzurufen, die zur Induktion von Enzymen des zellulären antioxidativen Schutzsystems führt. Dies konnte von Meiners et al. für die SOD1, die Glutathionperoxidase-3, die Glutathion-S-Transferasen und die Hämoxxygenase-1 in HUVEC gezeigt werden. Mit Reporter-gen-Assays wurde z. B. für die SOD1 eine Proteasominhibitor-vermittelte, transkriptionelle Aktivierung nachgewiesen [125].

In Übereinstimmung mit dieser in HUVEC gezeigten transkriptionellen Aktivierung der SOD1-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit die SOD1 mRNA- und Proteinexpression in den Aortenringen durch MG132 gesteigert. Zwar blieb die Expression der Katalase,

verantwortlich für die Konversion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$ , in der vorliegenden Arbeit bei allen Behandlungen unverändert, jedoch fügen sich insgesamt die an Aorteringen gewonnenen Ergebnisse in das für Endothelzellen gezeigte antioxidative Expressionsmuster ein.

Zusätzlich senkte MG132 die mRNA Expression der Mehrzahl der untersuchten NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten im Vergleich zur Kontrolle und TNF- $\alpha$ -Schädigung. Damit konnte die von Meiners et al. gezeigte Expressionssenkung von Nox4 durch niedrigdosierte Proteasominhibition in HUVEC bestätigt und die Gültigkeit erstmals auch für die weiteren Untereinheiten im Aortenringmodell gezeigt werden [125]. Für die Lipoxygenase und Xanthinoxidase – weitere Quellen der vaskulären Superoxidproduktion – kann aufgrund der unveränderten mRNA-Expressionsdaten im verwendeten Modell keine bedeutende Rolle angenommen werden.

Die funktionelle Relevanz der Expressionsabnahme der NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten sowie -zunahme der SOD1 nach MG132-Inkubation konnte mit der signifikanten Abnahme der Superoxid-Produktion gezeigt werden. Eine verminderte Superoxid-Produktion würde die NO-Bioverfügbarkeit steigern und somit die endothelabhängige Vasorelaxation fördern. Tatsächlich war die endothelabhängige Vasorelaxation MG132-behandelter Ringe zwar verbessert, die cGMP-Konzentration als Maß für die NO-Bioverfügbarkeit aber reduziert.

Im Zusammenhang mit der verminderten ET-1-Expression bieten die antioxidativen Effekte niedrigdosierter Proteasominhibition einen interessanten Erklärungsansatz für die verbesserte endothelabhängige Vasorelaxation der Aortenringe bei scheinbar widersprüchlich verringerter NO-Bioverfügbarkeit. Durch die verringerte Expression der NAD(P)H-Oxidase sowie die Induktion antioxidativer Schutzenzyme ist der oxidative Status verbessert, es wird demzufolge weniger NO inaktiviert. Um einen dadurch entstehenden NO-Überschuss zu verhindern, könnte die eNOS-Expression sinken. Wie schon in 4.2.2 dargestellt, könnte die eNOS-Expression zusätzlich in Anpassung an die verminderte ET-1-Expression sinken. In dieser Situation ist eine verbesserte Vasorelaxation trotz verminderter NO-Bioverfügbarkeit denkbar.

Die Arbeit von Polytarchou und Papadimitriou, in der Antioxidantien und NAD(P)H-Oxidase

Inhibitoren die eNOS-Aktivität und den cGMP-Gehalt in HUVEC reduzierten [178], unterstützt diese Hypothese. Es sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um diese Hypothesen im Aortenringmodell zu überprüfen.

Kürzlich wurde die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Nrf2 für die Induktion antioxidativer Enzyme durch Proteasominhibition in Endothelzellen nachgewiesen. In Endothelzellen stabilisiert Proteasominhibition die Bindung von Nrf2 an antioxidative response elements (ARE) und induziert damit die Expression antioxidativer Schutzenzyme wie SOD1 und HO-1. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Proteasominhibitor-vermittelte Induktion antioxidativer Enzyme sowie die Protektion der Endothelzellen vor oxidativem Stress in Nrf2 Knockout-Mäusen ausbleibt [128]. Die Bedeutung von Nrf2 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es kann jedoch vermutet werden, dass ein derartiger Mechanismus auch im hier beschriebenen Aortenringmodell existiert.

#### **4.2.4 Proteasominhibition in Aortenringen ohne TNF- $\alpha$ -Schädigung**

Mit TNF- $\alpha$  und MG132 sowie nur mit MG132 behandelte Aortenringe zeigten ähnliche Expressionraten für die untersuchten Gene und Proteine. So konnten die Abnahme der ET-1- und NAD(P)H-Expression und Steigerung der SOD1-Expression sowohl für koinkubierte Ringe, als auch für allein mit MG132 behandelte Aortenringe festgestellt werden. Die Endothelfunktion koinkubierter Ringe im Vergleich zu TNF- $\alpha$ -Ringern war dementsprechend verbessert, die alleinige MG132-Inkubation jedoch verbesserte die endothelabhängige Vasorelaxation nicht über das Niveau der Kontrollen hinaus – trotz reduzierter ET-1- und NAD(P)H-Oxidase-Expression und reduziertem oxidativem Stress, sowie verstärkter SOD1-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dagegen konnte in den von Stangl et al. publizierten Vasorelaxationsexperimenten eine Verbesserung der Acetylcholin-induzierten Vasorelaxation für MG132-inkubierte Ringe im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gezeigt werden [127]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Inkubationsbedingungen für die Aortenringe durch Verwendung eines anderen Inkubationsmediums verbessert, um den durch die Langzeitinkubation bedingten Stress zu reduzieren. Dies resultierte in einer verbesserten Langzeitinkubation der Aortenringe, was sich anhand der vollständigen Vasorelaxation der

Kontrollringe unter maximaler Acetylcholin-Stimulation bis auf das Vorspannungsniveau vor der Phenylephrin-Kontraktion zeigen lässt. In der vorangegangenen Arbeit [127] wurde das Ausmaß dieser Vasorelaxation nicht erreicht, möglicherweise infolge eines im Vergleich zur jetzigen Inkubationsmethode erhöhten Stresses. Dadurch ist vorstellbar, dass die endothelprotektiven Eigenschaften in der vorangegangenen Studie [127] durch alleinige Proteasominhibition mit MG132 zum Tragen kamen.

Die optimale Vasorelaxation der Kontrollringe in der vorliegenden Arbeit konnte durch MG132-Inkubation jedoch nicht weiter gesteigert werden. Eine zusätzliche Vasorelaxation über das Niveau der Kontrollringe hinaus entspräche möglicherweise einer unphysiologischen, überschießenden Vasorelaxation und erscheint im Rahmen der vaskulären Tonusregulation nicht sinnvoll. Es ist somit wahrscheinlich, dass die ausbleibende Verbesserung der Vasorelaxation MG132-behandelter Ringe im Vergleich zu Kontrollen zum großen Teil durch die optimierten Inkubationsbedingungen bedingt sind.

### **4.3 Endothelprotektion durch niedrigdosierte Proteasominhibition**

Die Wiederherstellung der endothelialen Funktion im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen ist von großer Bedeutung. Beispielsweise ist für HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) die Verbesserung der NO-Bioverfügbarkeit sowie die Reduktion der ET-1-Expression beschrieben [179, 180]. Auch das UPS könnte zukünftig ein interessantes Angriffsziel für die Therapie der endothelialen Dysfunktion darstellen.

Die beschriebene Verbesserung einer experimentell induzierten endothelialen Dysfunktion im Aortenringmodell belegt die endothelprotektiven Eigenschaften von Proteasominhibitoren. Bereits in vorangegangenen Studien wurde in Zellkulturexperimenten eine vorteilhafte transkriptionelle Modulation der endothelialen Zellfunktion beschrieben [107].

Von ausschlaggebender Bedeutung ist dabei der Einsatz niedriger Inhibitorkonzentrationen, um zytotoxische Effekte zu vermeiden. So können in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Proteasominhibitors sowie Art und Funktionszustand der be-

treffenden Zelle zum Teil gegensätzliche Effekte beobachtet werden – Induktion von Apoptose durch hohe, jedoch Schutz vor Apoptose durch niedrige Inhibitorkonzentrationen [111]. Eine eNOS-Induktion durch niedrige und Senkung der eNOS-Expression durch hohe Inhibitorkonzentrationen wurde in Endothelzellen beschrieben [127]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proteasominhibitoren MG132 und MG262 wurden in niedrigen, keine Apoptose induzierenden Konzentrationen verwendet. Diese erwiesen sich als nicht toxisch, da die Zellviabilität nicht beeinträchtigt wurde und keine Aktivierung von Caspasen erfolgte [125]. In den verwendeten niedrigen Dosierungen induzierten die Proteasominhibitoren in HUVEC ein vaskuloprotektives Expressionsmuster, welches die Zellen vor oxidativem Stress schützte [125].

Die vorliegende Arbeit kann dieses Expressionsmuster durch Reduktion der ET-1-Expression sowie der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten bei verstärkter Expression der SOD1 im Aortenringmodell bestätigen. Die in Vorarbeiten [125, 127] beschriebene Steigerung der eNOS-Expression in vaskulären Endothelzellen konnte in der vorliegenden Arbeit an Aortenringen überraschenderweise nicht gefunden werden. Die möglichen Ursachen wurden in den Abschnitten 4.2.3 und 4.2.2 diskutiert und bedürfen einer weiteren Untersuchung. Sie stellen jedoch grundsätzlich keinen Widerspruch zum Konzept der endothelprotektiven Expressionsmodulation durch niedrigdosierte Proteasominhibition dar, da die funktionellen Daten zur Vasorelaxation der Aortenringe eindeutig eine verbesserte Endothelfunktion von Proteasominhibitor-behandelten Ringen gegenüber TNF- $\alpha$ -Ringern zeigen.

Warum die partielle Inhibition des UPS – als zentrales zelluläres Degradationssystem – mit niedrigen Konzentrationen nichtselektiver Inhibitoren zur differentiellen Regulation von Proteinen und Transkriptionsfaktoren im Sinne einer Endothelprotektion führt, ist nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass der Einsatz definierter Inhibitorkonzentrationen zu einer Art Substratspezifität führen könnte [107]. So reduzieren niedrige Inhibitorkonzentrationen die Chymotrypsin-like Aktivität um nur 80%, ohne wesentliche Beeinflussung der zwei anderen Aktivitäten. Im Gegensatz dazu inhibieren apoptotische Konzentrationen die Chymotrypsin-like Aktivität um über 90% und die Caspase-like Aktivität um über 50% [125]. Kisselev et al. stellten fest, dass nur die anhaltende und simultane Inhibition der Chymotrypsin-like Aktivität und einer weiteren Aktivität den Proteinabbau effizient hemmen [181]. Da der Beitrag der einzelnen Proteasomaktivitäten zum Proteinabbau zwi-

schen verschiedenen Proteinen variiert und abhängig von der Aminosäurezusammensetzung ist [181], könnte die differentielle Beeinflussung der proteasomalen Aktivitäten mit unterschiedlichen Konzentrationen nichtselektiver Inhibitoren die Stabilisierung ganz bestimmter Mediatoren zulassen [107]. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass selektivere Inhibitoren der einzelnen Proteasomaktivitäten perspektivisch ebenfalls die Beeinflussung einzelner Proteingruppen möglich machen könnten.

Vermehrt wurden kürzlich die Erkenntnisse aus Zellkulturexperimenten in Tiermodellen überprüft. So verringerte niedrigdosierte Proteasominhibition mit MG132 und MG262 die TNF- $\alpha$ -induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin), die Monozytenadhäsion sowie die Superoxidproduktion in HUVEC [129]. Erweiternd zu diesen Zellkulturexperimenten konnte im hypertensiven Rattenmodell (Dahl-Salz-sensitive Ratten) durch niedrigdosierte Behandlung mit Bortezomib eine verringerte Superoxidproduktion und Lipidperoxidation, sowie eine reduzierte Expression von VCAM-1 gezeigt werden [129]. In einer weiteren Studie konnten ebenfalls endothelprotektive Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden. So wurde gezeigt, dass die verstärkte proteasomabhängige Degradation der Guanosin-5'-triphosphat Cyclohydrolase I (GTPCH) bei Diabetes zur Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>)-Defizienz führt. BH<sub>4</sub>-Defizienz führt zur Entkopplung der eNOS und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, zum Beispiel im Rahmen des Diabetes mellitus. Durch Proteasominhibition mit MG132 konnte die Glucose-getriggerte Abnahme von GTPCH und BH<sub>4</sub> in HUVEC verhindert werden. In Übereinstimmung dazu wurde im diabetischen Mausmodell gezeigt, dass die Behandlung mit MG132 die Diabetes-induzierte Abnahme von GTPCH und BH<sub>4</sub> sowie die endotheliale Dysfunktion von Aortenringen revertiert [182].

Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt jedoch im Koronargefäßsystem von hypercholesterinämischen Schweinen eine Verschlechterung der Bradykinin-induzierten Koronargefäßrelaxation, eine Intimaverdickung und Zunahme der Atherosklerose, sowie verstärkten oxidativen Stress durch 12-wöchige Proteasominhibition mit MLN-273. Vermutete Mechanismen für den erhöhten oxidativen Stress beinhalten die Expressionsserhöhung von p47phox und eNOS, die möglicherweise in entkoppeltem Zustand zum oxidativen Stress beitragen könnte [176]. Eine 2005 publizierte Studie derselben Arbeitsgruppe zeigte im gleichen Tier-

modell mit den gleichen Behandlungszeiten eine Verbesserung der Endothelfunktion im renalen Stromgebiet, einhergehend mit einer erhöhten eNOS-Expression sowie verringerten ET-1-Expression bei erhöhtem oxidativen Stress [160]. Bei einer Inhibition der Chymotrypsin-like Aktivität in Koronararterien um 68–72% 24–72 Stunden nach der letzten Injektion des Inhibitors [176], handelt es sich jedoch um eine deutlich stärkere Proteasominhibition als z.B. in der vorliegenden Arbeit. Hier kam es zu einer Reduktion auf 69–78 % Restaktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nach Inkubation der Aortenringe mit MG132 und MG262. Somit ist davon auszugehen, dass mit der deutlichen Reduktion der proteasomalen Aktivität durch MLN-273 keine zytoprotektiven Effekte erzielt werden konnten. Zudem zeigen die unterschiedlichen Ergebnisse in der koronararteriellen bzw. renalen Strombahn bei gleichem Versuchsaufbau und Tiermodell, dass der verwendete Proteasominhibitor offenbar unterschiedliche Organsysteme differentiell beeinflusst.

Auch das Stadium der Atherosklerose ist möglicherweise von Bedeutung. Es gibt Hinweise für eine duale Rolle des UPS in der Atherosklerose [183]. In frühen Stadien könnte die proteasomale Aktivität durch oxidativen Stress erhöht sein, was die Inflammation durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor kappa B zusätzlich fördern könnte. Es kann vermutet werden, dass eine Proteasominhibition besonders in dieser Phase vorteilhaft sein könnte. Für fortgeschrittenere Stadien der Atherosklerose gibt es Hinweise auf eine reduzierte Proteasomaktivität [184]. Zukünftige Studien sollten die Proteasomaktivität in den verschiedenen Phasen der Atherogenese untersuchen, um ein mögliches therapeutisches Fenster genauer zu definieren.

Trotz der zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse von Studien zu den Auswirkungen von Proteasominhibitoren im Gefäßsystem ist unstrittig, dass das UPS an der Regulation wichtiger Mediatoren der Atherosklerose bzw. der endothelialen Dysfunktion entscheidend beteiligt ist. Dabei wird die Wirkung von Proteasominhibition auf das Gefäßsystem von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst: Von Dosis, Zelltyp, Art des Proteasominhibitors, Art des verwendeten Modells, Art der Verabreichung des Proteasominhibitors und schließlich vom Stadium der Atherosklerose, in dem der Inhibitor verabreicht wird [185].

Auch am Menschen könnte es zukünftig möglich werden, den Einfluss von Proteasomin-

hibition auf die endotheliale Funktion zu untersuchen. Die Anwendung des Proteasominhibitors Bortezomib in der Therapie des multiplen Myeloms eröffnet zumindest die Möglichkeit, den Einfluss hoher tumortoxischer Konzentrationen auf das Gefäßsystem zu bestimmen. Zur Klärung dieser Frage könnte die Messung der flussvermittelten Endothelfunktion von mit Bortezomib behandelten Tumor-Patienten beitragen.

Anders als in der Prävention der Restenose [186], ist die Proteasominhibition aktuell, trotz vielversprechender Ergebnisse, noch weit von einer therapeutischen Nutzung im Rahmen der endothelialen Dysfunktion bzw. Atherosklerose entfernt. Es sind weitreichende, z. B. tierexperimentelle Studien nötig, um sowohl die Rolle des UPS als auch die Wirkung von Proteasominhibition in den verschiedenen Stadien der Atherosklerose zu untersuchen, um den Schritt in die Therapie zu rechtfertigen. Die Anwendung nichtselektiver Inhibitoren als Langzeittherapeutikum ist offenbar limitiert, da Langzeitproteasominhibition neurodegenerative Erkrankungen, kardiale Dysfunktion und Alterungsprozesse fördern kann [187–189]. Die Entwicklung neuer, spezifischerer Inhibitoren des UPS könnte jedoch neue Perspektiven für die therapeutische Nutzung von Proteasominhibitoren eröffnen.

## 4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die Verbesserung der Endothelfunktion in Aortenringen der Ratte durch niedrigdosierte Proteasominhibition im Rahmen einer experimentell induzierten endothelialen Dysfunktion. Die zugrundeliegenden Mechanismen konnten nicht vollständig aufgeklärt werden. Daher erscheinen weiterführende Untersuchungen in Zukunft sinnvoll.

Die TNF- $\alpha$ -induzierte Schädigung der Aortenringe und die Verbesserung der Endothelfunktion durch niedrigdosierte Proteasominhibition sind verbunden mit Expressionsänderungen der NAD(P)H-Oxidase, SOD1, ET-1 und eNOS. Ergänzend zu diesen Expressionsdaten könnten zukünftige Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren den Einfluss dieser einzelnen Komponenten näher charakterisieren.

Angesichts vielfältiger Wirkungen von TNF- $\alpha$  auf vaskuläre Zellen, jedoch moderater Expressionsveränderungen der genannten Mediatoren unter TNF- $\alpha$ -Behandlung in der vor-

liegenden Arbeit, ist von der Beteiligung weiterer, zur Schädigung beitragender Faktoren auszugehen. Da niedrigdosierte Proteasominhibition die TNF- $\alpha$ -induzierten Effekte verhindert und die Endothelfunktion verbessert, könnten diese Mechanismen auch einer Regulation durch das UPS unterliegen und interessante neue Ansätze für Proteasominhibitoren bieten.

Die abweichenden Resultate zwischen Aortenringen und Zellkulturmodell im Hinblick auf die eNOS-Expression unter Proteasominhibition machen die Schwierigkeit der Übertragung von Daten der Zellkultur auf intakte Organe deutlich. Zukünftig könnte ein detaillierter Vergleich beider Methoden Aufschluss darüber geben, welches Modell die in vivo Situation bestmöglich abbildet.

Es sind Tiermodelle der endotheliale Dysfunktion verfügbar. Bisherige Tierstudien weisen auf endothelprotektive Eigenschaften von Proteasominhibitoren hin [158, 190]. Ausgehend von den vorliegenden Daten sollte ein Tierversuch durchgeführt werden, um die endothelprotektiven Effekte niedrigdosierter Proteasominhibition auf die endotheliale Dysfunktion zu untersuchen.

Allgemein ist festzustellen, dass die Verwendung unterschiedlicher Inhibitoren und unterschiedlicher Konzentrationen die Vergleichbarkeit von Studien einschränkt. Deshalb sollten zukünftige Studien sowohl dosisabhängige Effekte von Proteasominhibitoren, als auch das zeitliche Ausmaß der Proteasominhibition, berücksichtigen. Die Langzeitinkubation von isolierten Gefäßringen ist in bezug auf das zeitliche Ausmaß der Proteasominhibition limitiert, ein Tierversuch erlaubt dagegen die systematische Untersuchung verschiedener, auch langfristiger Behandlungszeiträume.

Die vorliegende Arbeit weist auf eine bedeutende Rolle des UPS bei der Regulation wichtiger Mediatoren der endothelialen Funktion hin und trägt zum Verständnis der Wirkung von Proteasominhibition im Rahmen der endothelialen Dysfunktion bei. Zukünftig könnte das UPS demnach ein interessantes Angriffsziel in der Therapie vaskulärer Erkrankungen darstellen.

# Literaturverzeichnis

- [1] FÉLÉTOU, M. ; VANHOUTTE, P. M.: Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (2006), Sep, Nr. 3, S. H985–1002
- [2] FURCHGOTT, R. F. ; ZAWADZKI, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In: *Nature* 288 (1980), Nov, Nr. 5789, S. 373–376
- [3] IGNARRO, L. J. ; BUGA, G. M. ; WOOD, K. S. ; BYRNS, R. E. ; CHAUDHURI, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987), Dec, Nr. 24, S. 9265–9269
- [4] PALMER, R. M. ; FERRIGE, A. G. ; MONCADA, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. In: *Nature* 327 (1987), Nr. 6122, S. 524–526
- [5] BRUCKDORFER, R.: The basics about nitric oxide. In: *Mol Aspects Med* 26 (2005), Nr. 1-2, S. 3–31
- [6] SHIMOKAWA, H. ; YASUTAKE, H. ; FUJII, K. ; OWADA, M. K. ; NAKAIKE, R. ; FUKUMOTO, Y. ; TAKAYANAGI, T. ; NAGAO, T. ; EGASHIRA, K. ; FUJISHIMA, M. ; TAKESHITA, A.: The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 28 (1996), Nov, Nr. 5, S. 703–711
- [7] KUKOVETZ, W. R. ; HOLZMANN, S. ; WURM, A. ; PÖCH, G.: Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. In: *J Cyclic Nucleotide Res* 5 (1979), Dec, Nr. 6, S. 469–476
- [8] HALUSHKA, P. V. ; MAIS, D. E. ; MAYEUX, P. R. ; MORINELLI, T. A.: Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29 (1989), S. 213–239
- [9] FÉLÉTOU, M. ; VANHOUTTE, P. M.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006), Jun, Nr. 6, S. 1215–1225
- [10] FLEMING, I. ; BUSSE, R.: Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. In: *Hypertension* 47 (2006), Apr, Nr. 4, S. 629–633
- [11] SHIMOKAWA, H. ; MATOBA, T.: Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. In: *Pharmacol Res* 49 (2004), Jun, Nr. 6, S. 543–549

- [12] EDWARDS, G. ; DORA, K. A. ; GARDENER, M. J. ; GARLAND, C. J. ; WESTON, A. H.: K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. In: *Nature* 396 (1998), Nov, Nr. 6708, S. 269–272
- [13] BAUERSACHS, J. ; POPP, R. ; HECKER, M. ; SAUER, E. ; FLEMING, I. ; BUSSE, R.: Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. In: *Circulation* 94 (1996), Dec, Nr. 12, S. 3341–3347
- [14] LÜSCHER, T. F. ; BOULANGER, C. M. ; DOHI, Y. ; YANG, Z. H.: Endothelium-derived contracting factors. In: *Hypertension* 19 (1992), Feb, Nr. 2, S. 117–130
- [15] LÜSCHER, T. F. ; BARTON, M.: Biology of the endothelium. In: *Clin Cardiol* 20 (1997), Nov, Nr. 11 Suppl 2, S. II–3–10
- [16] BEHRENDT, D. ; GANZ, P.: Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. In: *Am J Cardiol* 90 (2002), Nov, Nr. 10C, S. 40L–48L
- [17] MÜNDEL, T. ; FEIL, R. ; MÜLSCH, A. ; LOHMANN, S. M. ; HOFMANN, F. ; WALTER, U.: Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. In: *Circulation* 108 (2003), Nov, Nr. 18, S. 2172–2183
- [18] LI, H. ; WALLERATH, T. ; FÖRSTERMANN, U.: Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. In: *Nitric Oxide* 7 (2002), Sep, Nr. 2, S. 132–147
- [19] ANDREW, P. J. ; MAYER, B.: Enzymatic function of nitric oxide synthases. In: *Cardiovasc Res* 43 (1999), Aug, Nr. 3, S. 521–531
- [20] GOVERS, R. ; RABELINK, T. J.: Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 280 (2001), Feb, Nr. 2, S. F193–F206
- [21] ALBRECHT, E. W. J. A. ; STEGEMAN, C. A. ; HEERINGA, P. ; HENNING, R. H. ; GOOR, H. van: Protective role of endothelial nitric oxide synthase. In: *J Pathol* 199 (2003), Jan, Nr. 1, S. 8–17
- [22] KAWASHIMA, S. ; YOKOYAMA, M.: Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004), Jun, Nr. 6, S. 998–1005
- [23] DIMMELER, S. ; FLEMING, I. ; FISSLTHALER, B. ; HERMANN, C. ; BUSSE, R. ; ZEIHNER, A. M.: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. In: *Nature* 399 (1999), Jun, Nr. 6736, S. 601–605
- [24] VALLANCE, P. ; LEIPER, J.: Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004), Jun, Nr. 6, S. 1023–1030
- [25] YOSHIZUMI, M. ; PERRELLA, M. A. ; BURNETT, J. C. ; LEE, M. E.: Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. In: *Circ Res* 73 (1993), Jul, Nr. 1, S. 205–209

- [26] BOULANGER, C. ; LÜSCHER, T. F.: Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. In: *J Clin Invest* 85 (1990), Feb, Nr. 2, S. 587–590
- [27] SPIEKER, L. E. ; NOLL, G. ; RUSCHITZKA, F. T. ; MAIER, W. ; LÜSCHER, T. F.: Working under pressure: the vascular endothelium in arterial hypertension. In: *J Hum Hypertens* 14 (2000), Nr. 10-11, S. 617–630
- [28] WAGNER, O. F. ; CHRIST, G. ; WOJTA, J. ; VIERHAPPER, H. ; PARZER, S. ; NOWOTNY, P. J. ; SCHNEIDER, B. ; WALDHÄUSL, W. ; BINDER, B. R.: Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Aug, Nr. 23, S. 16066–16068
- [29] HIRATA, Y. ; EMORI, T. ; EGUCHI, S. ; KANNO, K. ; IMAI, T. ; OHTA, K. ; MARUMO, F.: Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. In: *J Clin Invest* 91 (1993), Apr, Nr. 4, S. 1367–1373
- [30] DUPUIS, J. ; STEWART, D. J. ; CERNACEK, P. ; GOSSELIN, G.: Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. In: *Circulation* 94 (1996), Oct, Nr. 7, S. 1578–1584
- [31] HAYNES, W. G. ; WEBB, D. J.: Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. In: *Lancet* 344 (1994), Sep, Nr. 8926, S. 852–854
- [32] HAYNES, W. G. ; FERRO, C. J. ; O’KANE, K. P. ; SOMERVILLE, D. ; LOMAX, C. C. ; WEBB, D. J.: Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. In: *Circulation* 93 (1996), May, Nr. 10, S. 1860–1870
- [33] SCHIFFRIN, E. L.: State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. In: *Hypertension* 34 (1999), Oct, Nr. 4 Pt 2, S. 876–881
- [34] SAITO, Y. ; NAKAO, K. ; MUKOYAMA, M. ; IMURA, H.: Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. In: *N Engl J Med* 322 (1990), Jan, Nr. 3, S. 205
- [35] ROSSI, G. P. ; COLONNA, S. ; PAVAN, E. ; ALBERTIN, G. ; ROCCA, F. D. ; GEROSA, G. ; CASAROTTO, D. ; SARTORE, S. ; PAULETTO, P. ; PESSINA, A. C.: Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. In: *Circulation* 99 (1999), Mar, Nr. 9, S. 1147–1155
- [36] D’USCIO, L. V. ; MOREAU, P. ; SHAW, S. ; TAKASE, H. ; BARTON, M. ; LÜSCHER, T. F.: Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. In: *Hypertension* 29 (1997), Jan, Nr. 1 Pt 2, S. 435–441
- [37] DEANFIELD, J. ; DONALD, A. ; FERRI, C. ; GIANNATTASIO, C. ; HALCOX, J. ; HAL-LIGAN, S. ; LERMAN, A. ; MANCIA, G. ; OLIVER, J. J. ; PESSINA, A. C. ; RIZZONI, D. ; ROSSI, G. P. ; SALVETTI, A. ; SCHIFFRIN, E. L. ; TADDEI, S. ; WEBB, D. J.: Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. In: *J Hypertens* 23 (2005), Jan, Nr. 1, S. 7–17

- [38] LOCKETTE, W. ; OTSUKA, Y. ; CARRETERO, O.: The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. In: *Hypertension* 8 (1986), Jun, Nr. 6 Pt 2, S. II61–II66
- [39] VERBEUREN, T. J. ; COENE, M. C. ; JORDAENS, F. H. ; HOVE, C. E. V. ; ZONNEKEYN, L. L. ; HERMAN, A. G.: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. II. Influence of treatment with dipyridamole on endothelium-dependent and endothelium-independent responses in isolated aortas of control and hypercholesterolemic rabbits. In: *Circ Res* 59 (1986), Nov, Nr. 5, S. 496–504
- [40] LUDMER, P. L. ; SELWYN, A. P. ; SHOOK, T. L. ; WAYNE, R. R. ; MUDGE, G. H. ; ALEXANDER, R. W. ; GANZ, P.: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. In: *N Engl J Med* 315 (1986), Oct, Nr. 17, S. 1046–1051
- [41] DAVIGNON, J. ; GANZ, P.: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. In: *Circulation* 109 (2004), Jun, Nr. 23 Suppl 1, S. III27–III32
- [42] HERAS, M. ; SANZ, G. ; ROIG, E. ; PÉREZ-VILLA, F. ; RECASENS, L. ; SERRA, A. ; BETRIU, A.: Endothelial dysfunction of the non-infarct related, angiographically normal, coronary artery in patients with an acute myocardial infarction. In: *Eur Heart J* 17 (1996), May, Nr. 5, S. 715–720
- [43] VITA, J. A. ; TREASURE, C. B. ; NABEL, E. G. ; MCLENACHAN, J. M. ; FISH, R. D. ; YEUNG, A. C. ; VEKSHTEIN, V. I. ; SELWYN, A. P. ; GANZ, P.: Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. In: *Circulation* 81 (1990), Feb, Nr. 2, S. 491–497
- [44] SCHÄCHINGER, V. ; BRITTEN, M. B. ; ZEIHNER, A. M.: Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. In: *Circulation* 101 (2000), Apr, Nr. 16, S. 1899–1906
- [45] SUWAIDI, J. A. ; HAMASAKI, S. ; HIGANO, S. T. ; NISHIMURA, R. A. ; HOLMES, D. R. ; LERMAN, A.: Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. In: *Circulation* 101 (2000), Mar, Nr. 9, S. 948–954
- [46] HALCOX, J. P. J. ; SCHENKE, W.H. ; ZALOS, G. ; MINCEMOYER, R. ; PRASAD, A. ; WACLAWIW, M. A. ; NOUR, K. R. A. ; QUYYUMI, A. A.: Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. In: *Circulation* 106 (2002), Aug, Nr. 6, S. 653–658
- [47] FICHTLSCHERER, S. ; BREUER, S. ; ZEIHNER, A. M.: Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the vulnerable patient. In: *Circulation* 110 (2004), Oct, Nr. 14, S. 1926–1932
- [48] VITA, J. A. ; KEANEY, J. F.: Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? In: *Circulation* 106 (2002), Aug, Nr. 6, S. 640–642
- [49] DEANFIELD, J. E. ; HALCOX, J. P. ; RABELINK, T. J.: Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. In: *Circulation* 115 (2007), Mar, Nr. 10, S. 1285–1295

- [50] CAI, H. ; HARRISON, D. G.: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. In: *Circ Res* 87 (2000), Nov, Nr. 10, S. 840–844
- [51] HINK, U. ; LI, H. ; MOLLNAU, H. ; OELZE, M. ; MATHEIS, E. ; HARTMANN, M. ; SKATCHKOV, M. ; THAISS, F. ; STAHL, R. A. ; WARNHOLTZ, A. ; MEINERTZ, T. ; GRIENGLING, K. ; HARRISON, D. G. ; FORSTERMANN, U. ; MUNZEL, T.: Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. In: *Circ Res* 88 (2001), Feb, Nr. 2, S. E14–E22
- [52] DUERRSCHMIDT, N. ; WIPPICH, N. ; GOETTSCH, W. ; BROEMME, H. J. ; MORAWIETZ, H.: Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 269 (2000), Mar, Nr. 3, S. 713–717
- [53] RAMZY, D. ; RAO, V. ; TUMIATI, L. C. ; XU, N. ; SHESHGIRI, R. ; MIRIUKA, S. ; DELGADO, D. H. ; ROSS, H. J.: Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. In: *Circulation* 114 (2006), Jul, Nr. 1 Suppl, S. I319–I326
- [54] GRIENGLING, K. K. ; FITZGERALD, G. A.: Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. In: *Circulation* 108 (2003), Oct, Nr. 16, S. 1912–1916
- [55] MULLER, G. ; GOETTSCH, C. ; MORAWIETZ, H.: Oxidative stress and endothelial dysfunction. In: *Hamostaseologie* 27 (2007), Feb, Nr. 1, S. 5–12
- [56] MÜNDEL, T. ; DAIBER, A. ; ULLRICH, V. ; MÜLSCH, A.: Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (2005), Aug, Nr. 8, S. 1551–1557
- [57] GRIENGLING, K. K. ; SORESCU, D. ; USHIO-FUKAI, M.: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. In: *Circ Res* 86 (2000), Mar, Nr. 5, S. 494–501
- [58] GUZIK, T. J. ; WEST, N. E. ; BLACK, E. ; McDONALD, D. ; RATNATUNGA, C. ; PILLAI, R. ; CHANNON, K. M.: Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. In: *Circ Res* 86 (2000), May, Nr. 9, S. E85–E90
- [59] BENGTTSSON, S. H. M. ; GULLUYAN, L. M. ; DUSTING, G. J. ; DRUMMOND, G. R.: Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30 (2003), Nov, Nr. 11, S. 849–854
- [60] BRANDES, R. P. ; KREUZER, J.: Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. In: *Cardiovasc Res* 65 (2005), Jan, Nr. 1, S. 16–27
- [61] AGO, T. ; KITAZONO, T. ; OOBOSHI, H. ; IYAMA, T. ; HAN, Y. H. ; TAKADA, J. ; WAKISAKA, M. ; IBAYASHI, S. ; UTSUMI, H. ; IIDA, M.: Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. In: *Circulation* 109 (2004), Jan, Nr. 2, S. 227–233
- [62] RUECKSCHLOSS, U. ; QUINN, M. T. ; HOLTZ, J. ; MORAWIETZ, H.: Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells:

- protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002), Nov, Nr. 11, S. 1845–1851
- [63] LI, J.M. ; MULLEN, A. M. ; YUN, S. ; WIENTJES, F. ; BROUNS, G. Y. ; THRASHER, A. J. ; SHAH, A. M.: Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. In: *Circ Res* 90 (2002), Feb, Nr. 2, S. 143–150
- [64] CELERMAJER, D. S. ; SORENSEN, K. E. ; GEORGAKOPOULOS, D. ; BULL, C. ; THOMAS, O. ; ROBINSON, J. ; DEANFIELD, J. E.: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. In: *Circulation* 88 (1993), Nov, Nr. 5 Pt 1, S. 2149–2155
- [65] BRUNNER, H. ; COCKCROFT, J. R. ; DEANFIELD, J. ; DONALD, A. ; FERRANNINI, E. ; HALCOX, J. ; KIOWSKI, W. ; LÜSCHER, T. F. ; MANCIA, G. ; NATALI, A. ; OLIVER, J. J. ; PESSINA, A. C. ; RIZZONI, D. ; ROSSI, G. P. ; SALVETTI, A. ; SPIEKER, L. E. ; TADDEI, S. ; WEBB, D. J.: Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. In: *J Hypertens* 23 (2005), Feb, Nr. 2, S. 233–246
- [66] HIGASHI, Y. ; SASAKI, S. ; KURISU, S. ; YOSHIMIZU, A. ; SASAKI, N. ; MATSUURA, H. ; KAJIYAMA, G. ; OSHIMA, T.: Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. In: *Circulation* 100 (1999), Sep, Nr. 11, S. 1194–1202
- [67] HARRISON, D. G. ; ARMSTRONG, M. L. ; FREIMAN, P. C. ; HEISTAD, D. D.: Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. In: *J Clin Invest* 80 (1987), Dec, Nr. 6, S. 1808–1811
- [68] TAMAI, O. ; MATSUOKA, H. ; ITABE, H. ; WADA, Y. ; KOHNO, K. ; IMAIZUMI, T.: Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. In: *Circulation* 95 (1997), Jan, Nr. 1, S. 76–82
- [69] LEUNG, W. H. ; LAU, C. P. ; WONG, C. K.: Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients. In: *Lancet* 341 (1993), Jun, Nr. 8859, S. 1496–1500
- [70] DUPUIS, J. ; TARDIF, J. C. ; CERNACEK, P. ; THÉROUX, P.: Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. In: *Circulation* 99 (1999), Jun, Nr. 25, S. 3227–3233
- [71] LAUFS, U. ; WASSMANN, S. ; HILGERS, S. ; RIBAUDO, N. ; BÖHM, M. ; NICKENIG, G.: Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. In: *Am J Cardiol* 88 (2001), Dec, Nr. 11, S. 1306–1307
- [72] DAVIGNON, J.: Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. In: *Circulation* 109 (2004), Jun, Nr. 23 Suppl 1, S. III39–III43

- [73] LUDWIG, A. ; FRIEDEL, B. ; METZKOW, S. ; MEINERS, S. ; STANGL, V. ; BAUMANN, G. ; STANGL, K.: Effect of statins on the proteasomal activity in mammalian endothelial and vascular smooth muscle cells. In: *Biochem Pharmacol* 70 (2005), Aug, Nr. 4, S. 520–526
- [74] MANCINI, G. B. ; HENRY, G. C. ; MACAYA, C. ; O'NEILL, B. J. ; PUCILLO, A. L. ; CARERE, R. G. ; WARGOVICH, T. J. ; MUDRA, H. ; LÜSCHER, T. F. ; KLIBANER, M. I. ; HABER, H. E. ; UPRICHARD, A. C. ; PEPINE, C. J. ; PITT, B.: Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. In: *Circulation* 94 (1996), Aug, Nr. 3, S. 258–265
- [75] NEUTEL, J. M.: Effect of the renin–angiotensin system on the vessel wall: using ACE inhibition to improve endothelial function. In: *J Hum Hypertens* 18 (2004), Sep, Nr. 9, S. 599–606
- [76] COSENTINO, F. ; HÜRLIMANN, D. ; GATTI, C. D. ; CHENEVARD, R. ; BLAU, N. ; ALP, N. J. ; CHANNON, K. M. ; ETO, M. ; LERCH, P. ; ENSELEIT, F. ; RUSCHITZKA, F. ; VOLPE, M. ; LÜSCHER, T. F. ; NOLL, G.: Chronic treatment with tetrahydrobiopterin reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in hypercholesterolaemia. In: *Heart* 94 (2008), Apr, Nr. 4, S. 487–492
- [77] LEKAKIS, J. P. ; PAPATHANASSIOU, S. ; PAPAIOANNOU, T. G. ; PAPAMICHAEL, C. M. ; ZAKOPOULOS, N. ; KOTSIS, V. ; DAGRE, A. G. ; STAMATELOPOULOS, K. ; PROTOGEOUROU, A. ; STAMATELOPOULOS, S. F.: Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. In: *Int J Cardiol* 86 (2002), Dec, Nr. 2-3, S. 317–323
- [78] TADDEI, S. ; VIRDIS, A. ; GHIADONI, L. ; MAGAGNA, A. ; SALVETTI, A.: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. In: *Circulation* 97 (1998), Jun, Nr. 22, S. 2222–2229
- [79] LEE, D. H. ; GOLDBERG, A. L.: Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. In: *Trends Cell Biol* 8 (1998), Oct, Nr. 10, S. 397–403
- [80] GRONOSTAJSKI, R. M. ; PARDEE, A. B. ; GOLDBERG, A. L.: The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts. In: *J Biol Chem* 260 (1985), Mar, Nr. 6, S. 3344–3349
- [81] ROCK, K. L. ; GRAMM, C. ; ROTHSTEIN, L. ; CLARK, K. ; STEIN, R. ; DICK, L. ; HWANG, D. ; GOLDBERG, A. L.: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. In: *Cell* 78 (1994), Sep, Nr. 5, S. 761–771
- [82] CIECHANOVER, A.: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. In: *Cell* 79 (1994), Oct, Nr. 1, S. 13–21
- [83] COUX, O. ; TANAKA, K. ; GOLDBERG, A. L.: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. In: *Annu Rev Biochem* 65 (1996), S. 801–847
- [84] LÖWE, J. ; STOCK, D. ; JAP, B. ; ZWICKL, P. ; BAUMEISTER, W. ; HUBER, R.: Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. In: *Science* 268 (1995), Apr, Nr. 5210, S. 533–539

- [85] ZWICKL, P. ; GRZIWA, A. ; PÜHLER, G. ; DAHLMANN, B. ; LOTTSPEICH, F. ; BAUMEISTER, W.: Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. In: *Biochemistry* 31 (1992), Feb, Nr. 4, S. 964–972
- [86] KOPP, F. ; DAHLMANN, B. ; HENDIL, K. B.: Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. In: *J Mol Biol* 229 (1993), Jan, Nr. 1, S. 14–19
- [87] ORLOWSKI, M.: The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nov, Nr. 45, S. 10289–10297
- [88] FENTEANY, G. ; STANDAERT, R. F. ; LANE, W. S. ; CHOI, S. ; COREY, E. J. ; SCHREIBER, S. L.: Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. In: *Science* 268 (1995), May, Nr. 5211, S. 726–731
- [89] KISSELEV, A. F. ; AKOPIAN, T. N. ; GOLDBERG, A. L.: Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Jan, Nr. 4, S. 1982–1989
- [90] ZWICKL, P. ; KLEINZ, J. ; BAUMEISTER, W.: Critical elements in proteasome assembly. In: *Nat Struct Biol* 1 (1994), Nov, Nr. 11, S. 765–770
- [91] GROLL, M. ; BAJOREK, M. ; KÖHLER, A. ; MORODER, L. ; RUBIN, D. M. ; HUBER, R. ; GLICKMAN, M. H. ; FINLEY, D.: A gated channel into the proteasome core particle. In: *Nat Struct Biol* 7 (2000), Nov, Nr. 11, S. 1062–1067
- [92] GLICKMAN, M. H. ; CIECHANOVER, A.: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. In: *Physiol Rev* 82 (2002), Apr, Nr. 2, S. 373–428
- [93] BRAUN, B. C. ; GLICKMAN, M. ; KRAFT, R. ; DAHLMANN, B. ; KLOETZEL, P. M. ; FINLEY, D. ; SCHMIDT, M.: The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. In: *Nat Cell Biol* 1 (1999), Aug, Nr. 4, S. 221–226
- [94] FERRELL, K. ; WILKINSON, C. R. ; DUBIEL, W. ; GORDON, C.: Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. In: *Trends Biochem Sci* 25 (2000), Feb, Nr. 2, S. 83–88
- [95] DUBIEL, W. ; PRATT, G. ; FERRELL, K. ; RECHSTEINER, M.: Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nov, Nr. 31, S. 22369–22377
- [96] RECHSTEINER, M. ; HILL, C. P.: Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. In: *Trends Cell Biol* 15 (2005), Jan, Nr. 1, S. 27–33
- [97] TANAHASHI, N. ; MURAKAMI, Y. ; MINAMI, Y. ; SHIMBARA, N. ; HENDIL, K. B. ; TANAKA, K.: Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. In: *J Biol Chem* 275 (2000), May, Nr. 19, S. 14336–14345
- [98] THROWER, J. S. ; HOFFMAN, L. ; RECHSTEINER, M. ; PICKART, C. M.: Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. In: *EMBO J* 19 (2000), Jan, Nr. 1, S. 94–102

- [99] KISSELEV, A. F. ; GOLDBERG, A. L.: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. In: *Chem Biol* 8 (2001), Aug, Nr. 8, S. 739–758
- [100] SCHUBERT, U. ; ANTÓN, L. C. ; GIBBS, J. ; NORBURY, C. C. ; YEWDELL, J. W. ; BENNINK, J. R.: Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. In: *Nature* 404 (2000), Apr, Nr. 6779, S. 770–774
- [101] FAN, C. M. ; MANIATIS, T.: Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. In: *Nature* 354 (1991), Dec, Nr. 6352, S. 395–398
- [102] PALOMBELLA, V. J. ; RANDO, O. J. ; GOLDBERG, A. L. ; MANIATIS, T.: The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. In: *Cell* 78 (1994), Sep, Nr. 5, S. 773–785
- [103] PAHL, H. L.: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. In: *Oncogene* 18 (1999), Nov, Nr. 49, S. 6853–6866
- [104] YANG, Y. ; YU, X.: Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. In: *FASEB J* 17 (2003), May, Nr. 8, S. 790–799
- [105] KLOETZEL, P. M.: Antigen processing by the proteasome. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001), Mar, Nr. 3, S. 179–187
- [106] VINITSKY, A. ; MICHAUD, C. ; POWERS, J. C. ; ORLOWSKI, M.: Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. In: *Biochemistry* 31 (1992), Oct, Nr. 39, S. 9421–9428
- [107] MEINERS, S. ; LUDWIG, A. ; STANGL, V. ; STANGL, K.: Proteasome inhibitors: poisons and remedies. In: *Med Res Rev* 28 (2008), Mar, Nr. 2, S. 309–327
- [108] LEE, D. H. ; GOLDBERG, A. L.: Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mol Cell Biol* 18 (1998), Jan, Nr. 1, S. 30–38
- [109] LOPES, U. G. ; ERHARDT, P. ; YAO, R. ; COOPER, G. M.: p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. In: *J Biol Chem* 272 (1997), May, Nr. 20, S. 12893–12896
- [110] PAGANO, M. ; TAM, S. W. ; THEODORAS, A. M. ; BEER-ROMERO, P. ; SAL, G. D. ; CHAU, V. ; YEW, P. R. ; DRAETTA, G. F. ; ROLFE, M.: Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. In: *Science* 269 (1995), Aug, Nr. 5224, S. 682–685
- [111] MERIIN, A. B. ; GABAI, V. L. ; YAGLOM, J. ; SHIFRIN, V. I. ; SHERMAN, M. Y.: Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Mar, Nr. 11, S. 6373–6379
- [112] ANTWERP, D. J. V. ; MARTIN, S. J. ; VERMA, I. M. ; GREEN, D. R.: Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. In: *Trends Cell Biol* 8 (1998), Mar, Nr. 3, S. 107–111

- [113] GOLDBERG, A. L. ; ROCK, K.: Not just research tools—proteasome inhibitors offer therapeutic promise. In: *Nat Med* 8 (2002), Apr, Nr. 4, S. 338–340
- [114] RICHARDSON, P. G. ; BARLOGIE, B. ; BERENSON, J. ; SINGHAL, S. ; JAGANNATH, S. ; IRWIN, D. ; RAJKUMAR, S. V. ; SRKALOVIC, G. ; ALSINA, M. ; ALEXANIAN, R. ; SIEGEL, D. ; ORLOWSKI, R. Z. ; KUTER, D. ; LIMENTANI, S. A. ; LEE, S. ; HIDESHIMA, T. ; ESSELTINE, DL. ; KAUFFMAN, M. ; ADAMS, J. ; SCHENKEIN, D. P. ; ANDERSON, K. C.: A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. In: *N Engl J Med* 348 (2003), Jun, Nr. 26, S. 2609–2617
- [115] MIKHAEL, J. R. ; BELCH, A. R. ; PRINCE, H. M. ; LUCIO, M. N. ; MAIOLINO, A. ; CORSO, A. ; PETRUCCI, M. T. ; MUSTO, P. ; KOMARNICKI, M. ; STEWART, A. K.: High response rate to bortezomib with or without dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: results of a global phase 3b expanded access program. In: *Br J Haematol* 144 (2009), Jan, Nr. 2, S. 169–175
- [116] LAUBACH, J. P. ; MAHINDRA, A. ; MITSIADES, C. S. ; SCHLOSSMAN, R. L. ; MUNSHI, N. C. ; GHOBRIAL, I. M. ; CARREAU, N. ; HIDESHIMA, T. ; ANDERSON, K. C. ; RICHARDSON, P. G.: The use of novel agents in the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. In: *Leukemia* 23 (2009), Dec, Nr. 12, S. 2222–2232
- [117] RAJKUMAR, S. V. ; RICHARDSON, P. G. ; HIDESHIMA, T. ; ANDERSON, K. C.: Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. In: *J Clin Oncol* 23 (2005), Jan, Nr. 3, S. 630–639
- [118] VOORHEES, P. M. ; ORLOWSKI, R. Z.: The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46 (2006), S. 189–213
- [119] ELLIOTT, P. J. ; ZOLLNER, T. M. ; BOEHNCKE, WH.: Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. In: *J Mol Med* 81 (2003), Apr, Nr. 4, S. 235–245
- [120] WOJCIK, C. ; NAPOLI, M. D.: Ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibition: new strategies in stroke therapy. In: *Stroke* 35 (2004), Jun, Nr. 6, S. 1506–1518
- [121] PHILLIPS, J. B. ; WILLIAMS, A. J. ; ADAMS, J. ; ELLIOTT, P. J. ; TORTELLA, F. C.: Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. In: *Stroke* 31 (2000), Jul, Nr. 7, S. 1686–1693
- [122] PYE, J. ; ARDESHIRPOUR, F. ; MCCAIN, A. ; BELLINGER, D. A. ; MERRICKS, E. ; ADAMS, J. ; ELLIOTT, P. J. ; PIEN, C. ; FISCHER, T. H. ; BALDWIN, A. S. ; NICHOLS, T. C.: Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (2003), Mar, Nr. 3, S. H919–H926
- [123] GARRETT, I. R. ; CHEN, D. ; GUTIERREZ, G. ; ZHAO, M. ; ESCOBEDO, A. ; ROSSINI, G. ; HARRIS, S. E. ; GALLWITZ, W. ; KIM, K. B. ; HU, S. ; CREWS, C. M. ; MUNDY, G. R.: Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. In: *J Clin Invest* 111 (2003), Jun, Nr. 11, S. 1771–1782
- [124] SCHWARZ, K. ; GIULI, R. de ; SCHMIDTKE, G. ; KOSTKA, S. ; BROEK, M. van d. ; KIM, K. B. ; CREWS, C. M. ; KRAFT, R. ; GROETTRUP, M.: The selective proteasome inhibitors lactacystin and epoxomicin can be used to either up- or down-regulate

- antigen presentation at nontoxic doses. In: *J Immunol* 164 (2000), Jun, Nr. 12, S. 6147–6157
- [125] MEINERS, S. ; LUDWIG, A. ; LORENZ, M. ; DREGER, H. ; BAUMANN, G. ; STANGL, V. ; STANGL, K.: Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. In: *Free Radic Biol Med* 40 (2006), Jun, Nr. 12, S. 2232–2241
- [126] MEINERS, S. ; HOCHER, B. ; WELLER, A. ; LAULE, M. ; STANGL, V. ; GUENTHER, C. ; GODES, M. ; MROZIKIEWICZ, A. ; BAUMANN, G. ; STANGL, K.: Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome. In: *Hypertension* 44 (2004), Oct, Nr. 4, S. 471–477
- [127] STANGL, V. ; LORENZ, M. ; MEINERS, S. ; LUDWIG, A. ; BARTSCH, C. ; MOOBED, M. ; VIETZKE, A. ; KINKEL, HT. ; BAUMANN, G. ; STANGL, K.: Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. In: *FASEB J* 18 (2004), Feb, Nr. 2, S. 272–279
- [128] DREGER, H. ; WESTPHAL, K. ; WILCK, N. ; BAUMANN, G. ; STANGL, V. ; STANGL, K. ; MEINERS, S.: Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. In: *Cardiovasc Res* 85 (2010), Jan, Nr. 2, S. 395–403
- [129] LUDWIG, A. ; FECHNER, M. ; WILCK, N. ; MEINERS, S. ; GRIMBO, N. ; BAUMANN, G. ; STANGL, V. ; STANGL, K.: Potent anti-inflammatory effects of low-dose proteasome inhibition in the vascular system. In: *J Mol Med* 87 (2009), Aug, Nr. 8, S. 793–802
- [130] CHOMCZYNSKI, P. ; SACCHI, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Anal Biochem* 162 (1987), Apr, Nr. 1, S. 156–159
- [131] THE PERKIN-ELMER CORPORATION (Hrsg.): *SYBR Green PCR and RT-PCR Reagents. Protocol*. The Perkin-Elmer Corporation, 1998
- [132] DHEIN, S. ; MOHR, F. W. ; DELMAR, M.: *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005
- [133] THE PERKIN-ELMER CORPORATION (Hrsg.): *Sequence Detection Systems Quantitative Assay Design and Optimization*. The Perkin-Elmer Corporation, 2004
- [134] MÜNDEL, T. ; AFANAS'EV, I. B. ; KLESCHYOV, A. L. ; HARRISON, D. G.: Detection of superoxide in vascular tissue. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002), Nov, Nr. 11, S. 1761–1768
- [135] LIOCHEV, S. I. ; FRIDOVICH, I.: Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. In: *Arch Biochem Biophys* 337 (1997), Jan, Nr. 1, S. 115–120
- [136] TARPEY, M. M. ; FRIDOVICH, I.: Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. In: *Circ Res* 89 (2001), Aug, Nr. 3, S. 224–236
- [137] BUSSE, R. ; MÜLSCH, A.: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. In: *FEBS Lett* 275 (1990), Nov, Nr. 1-2, S. 87–90

- [138] VILA, E. ; SALAICES, M.: Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 (2005), Mar, Nr. 3, S. H1016–H1021
- [139] DREXLER, H. ; HORNIG, B.: Endothelial dysfunction in human disease. In: *J Mol Cell Cardiol* 31 (1999), Jan, Nr. 1, S. 51–60
- [140] BHAGAT, K. ; VALLANCE, P.: Effects of cytokines on nitric oxide pathways in human vasculature. In: *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8 (1999), Jan, Nr. 1, S. 89–96
- [141] WANG, P. ; BA, Z. F. ; CHAUDRY, I. H.: Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. In: *Am J Physiol* 266 (1994), Jun, Nr. 6 Pt 2, S. H2535–H2541
- [142] GREENBERG, S. ; XIE, J. ; WANG, Y. ; CAI, B. ; KOLLS, J. ; NELSON, S. ; HYMAN, A. ; SUMMER, W. R. ; LIPPTON, H.: Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelium-dependent relaxation. In: *J Appl Physiol* 74 (1993), May, Nr. 5, S. 2394–2403
- [143] WIMALASUNDERA, R. ; FEXBY, S. ; REGAN, L. ; THOM, S. A M. ; HUGHES, A. D.: Effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries in vitro. In: *Br J Pharmacol* 138 (2003), Apr, Nr. 7, S. 1285–1294
- [144] NAKAMURA, M. ; YOSHIDA, H. ; ARAKAWA, N. ; SAITOH, S. ; SATOH, M. ; HIRAMORI, K.: Effects of tumor necrosis factor-alpha on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 36 (2000), Oct, Nr. 4, S. 487–492
- [145] AREND, W. P. ; DAYER, J. M.: Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Rheum* 38 (1995), Feb, Nr. 2, S. 151–160
- [146] DESSEIN, P. H. ; JOFFE, B. I. ; SINGH, S.: Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Res Ther* 7 (2005), Nr. 3, S. R634–R643
- [147] HÜRLIMANN, D. ; FORSTER, A. ; NOLL, G. ; ENSELEIT, F. ; CHENEVARD, R. ; DISTLER, O. ; BÉCHIR, M. ; SPIEKER, L. E. ; NEIDHART, M. ; MICHEL, B. A. ; GAY, R. E. ; LÜSCHER, T. F. ; GAY, S. ; RUSCHITZKA, F.: Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. In: *Circulation* 106 (2002), Oct, Nr. 17, S. 2184–2187
- [148] BOOTH, A. D. ; JAYNE, D. R W. ; KHARBANDA, R. K. ; MCENIERY, C. M. ; MACKENZIE, I. S. ; BROWN, J. ; WILKINSON, I. B.: Infliximab improves endothelial dysfunction in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation. In: *Circulation* 109 (2004), Apr, Nr. 14, S. 1718–1723
- [149] FICHTLSCHERER, S. ; RÖSSIG, L. ; BREUER, S. ; VASA, M. ; DIMMELER, S. ; ZEIHNER, A. M.: Tumor necrosis factor antagonism with etanercept improves systemic endothelial vasoreactivity in patients with advanced heart failure. In: *Circulation* 104 (2001), Dec, Nr. 25, S. 3023–3025

- [150] ANDERSON, H. D. I. ; RAHMUTULA, D. ; GARDNER, D. G.: Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Jan, Nr. 2, S. 963–969
- [151] NEUMANN, P. ; GERTZBERG, N. ; JOHNSON, A.: TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286 (2004), Feb, Nr. 2, S. L452–L459
- [152] VAZIRI, N. D. ; NI, Z. ; OVEISI, F.: Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. In: *Hypertension* 31 (1998), Jun, Nr. 6, S. 1248–1254
- [153] HARUNA, Y. ; MORITA, Y. ; KOMAI, N. ; YADA, T. ; SAKUTA, T. ; TOMITA, N. ; FOX, D. A. ; KASHIHARA, N.: Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase. In: *Arthritis Rheum* 54 (2006), Jun, Nr. 6, S. 1847–1855
- [154] MUZAFFAR, S. ; JEREMY, J. Y. ; ANGELINI, G. D. ; STUART-SMITH, K. ; SHUKLA, N.: Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. In: *Thorax* 58 (2003), Jul, Nr. 7, S. 598–604
- [155] KLEMM, P. ; WARNER, T. D. ; HOHLFELD, T. ; CORDER, R. ; VANE, J. R.: Endothelin 1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokines. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Mar, Nr. 7, S. 2691–2695
- [156] CORDER, R. ; CARRIER, M. ; KHAN, N. ; KLEMM, P. ; VANE, J. R.: Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3 (1995), S. S56–S58
- [157] MARSDEN, P. A. ; BRENNER, B. M.: Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. In: *Am J Physiol* 262 (1992), Apr, Nr. 4 Pt 1, S. C854–C861
- [158] TAKAOKA, M. ; ITOH, M. ; KOHYAMA, S. ; SHIBATA, A. ; OHKITA, M. ; MATSUMURA, Y.: Proteasome inhibition attenuates renal endothelin-1 production and the development of ischemic acute renal failure in rats. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 36 (2000), Nov, Nr. 5 Suppl 1, S. S225–S227
- [159] OKAMOTO, H. ; TAKAOKA, M. ; OHKITA, M. ; ITOH, M. ; NISHIOKA, M. ; MATSUMURA, Y.: A proteasome inhibitor lessens the increased aortic endothelin-1 content in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. In: *Eur J Pharmacol* 350 (1998), May, Nr. 1, S. R11–R12
- [160] CHADE, A. R. ; HERRMANN, J. ; ZHU, X. ; KRIER, J. D. ; LERMAN, A. ; LERMAN, L. O.: Effects of proteasome inhibition on the kidney in experimental hypercholesterolemia. In: *J Am Soc Nephrol* 16 (2005), Apr, Nr. 4, S. 1005–1012
- [161] OHKITA, M. ; TAKAOKA, M. ; KOBAYASHI, Y. ; ITOH, E. ; UEMACHI, H. ; MATSUMURA, Y.: Involvement of proteasome in endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. In: *Jpn J Pharmacol* 88 (2002), Feb, Nr. 2, S. 197–205

- [162] QUASCHNING, T. ; KOCAK, S. ; BAUER, C. ; NEUMAYER, H.H. ; GALLE, J. ; HOCHER, B.: Increase in nitric oxide bioavailability improves endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. In: *Nephrol Dial Transplant* 18 (2003), Mar, Nr. 3, S. 479–483
- [163] QUASCHNING, T. ; VOSS, F. ; RELLE, K. ; KALK, P. ; VIGNON-ZELLWEGER, N. ; PFAB, T. ; BAUER, C. ; THEILIG, F. ; BACHMANN, S. ; KRAEMER-GUTH, A. ; WANNER, C. ; THEURING, F. ; GALLE, J. ; HOCHER, B.: Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice. In: *J Am Soc Nephrol* 18 (2007), Mar, Nr. 3, S. 730–740
- [164] ZAEDI, S. ; JESMIN, S. ; MAEDA, S. ; SHIMOJO, N. ; YAMAGUCHI, I. ; GOTO, K. ; MIYAUCHI, T.: Alterations in gene expressions encoding preproET-1 and NOS in pulmonary tissue in endotoxemic rats. In: *Exp Biol Med (Maywood)* 231 (2006), Jun, Nr. 6, S. 992–996
- [165] TAN, M.S. ; CHAI, C.Y. ; WU, J.R. ; YEH, J.L. ; CHEN, I.J. ; KWAN, A.L. ; JENG, A. Y. ; YANG, H.Y. ; LEE, M.H. ; DAI, Z.K.: Differential change in expression of pulmonary ET-1 and eNOS in rats after chronic left ventricular pressure overload. In: *Exp Biol Med (Maywood)* 231 (2006), Jun, Nr. 6, S. 948–953
- [166] UNGVARI, Z. ; CSISZAR, A. ; EDWARDS, J. G. ; KAMINSKI, P. M. ; WOLIN, M. S. ; KALEY, G. ; KOLLER, A.: Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003), Mar, Nr. 3, S. 418–424
- [167] GERTZBERG, N. ; NEUMANN, P. ; RIZZO, V. ; JOHNSON, A.: NAD(P)H oxidase mediates the endothelial barrier dysfunction induced by TNF-alpha. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286 (2004), Jan, Nr. 1, S. L37–L48
- [168] AFONSO, V. ; SANTOS, G. ; COLLIN, P. ; KHATIB, A. M. ; MITROVIC, D. R. ; LOMRI, N. ; LEITMAN, D. C. ; LOMRI, A.: Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human Cu/Zn superoxide dismutase 1 promoter via JNK/AP-1 signaling pathway. In: *Free Radic Biol Med* 41 (2006), Sep, Nr. 5, S. 709–721
- [169] SHAFFER, J. B. ; TREANOR, C. P. ; VECCHIO, P. J. D.: Expression of bovine and mouse endothelial cell antioxidant enzymes following TNF-alpha exposure. In: *Free Radic Biol Med* 8 (1990), Nr. 5, S. 497–502
- [170] SIEMANKOWSKI, L. M. ; MORREALE, J. ; BRIEHL, M. M.: Antioxidant defenses in the TNF-treated MCF-7 cells: selective increase in MnSOD. In: *Free Radic Biol Med* 26 (1999), Apr, Nr. 7-8, S. 919–924
- [171] KEULENAER, G. W. D. ; ALEXANDER, R. W. ; USHIO-FUKAI, M. ; ISHIZAKA, N. ; GRIENGLING, K. K.: Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. In: *Biochem J* 329 ( Pt 3) (1998), Feb, S. 653–657
- [172] MUZAFFAR, S. ; SHUKLA, N. ; ANGELINI, G. ; JEREMY, J. Y.: Nitroaspirins and morpholinosydnnonimine but not aspirin inhibit the formation of superoxide and the expression of gp91phox induced by endotoxin and cytokines in pig pulmonary artery

- vascular smooth muscle cells and endothelial cells. In: *Circulation* 110 (2004), Aug, Nr. 9, S. 1140–1147
- [173] PICCHI, A. ; GAO, X. ; BELMADANI, S. ; POTTER, B. J. ; FOCARDI, M. ; CHILIAN, W. M. ; ZHANG, C.: Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. In: *Circ Res* 99 (2006), Jul, Nr. 1, S. 69–77
- [174] GAUSS, K. A. ; NELSON-OVERTON, L. K. ; SIEMSEN, D. W. ; GAO, Y. ; DELEO, F. R. ; QUINN, M. T.: Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. In: *J Leukoc Biol* 82 (2007), Sep, Nr. 3, S. 729–741
- [175] YAMAMOTO, N. ; SAWADA, H. ; IZUMI, Y. ; KUME, T. ; KATSUKI, H. ; SHIMOHAMA, S. ; AKAIKE, A.: Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress: relevance to Parkinson disease. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Feb, Nr. 7, S. 4364–4372
- [176] HERRMANN, J. ; SAGUNER, A. M. ; VERSARI, D. ; PETERSON, T. E. ; CHADE, A. ; OLSON, M. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A.: Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. In: *Circ Res* 101 (2007), Oct, Nr. 9, S. 865–874
- [177] LEE, M. H. ; HYUN, D. H. ; JENNER, P. ; HALLIWELL, B.: Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production. In: *J Neurochem* 78 (2001), Jul, Nr. 1, S. 32–41
- [178] POLYTARCHOU, C. ; PAPADIMITRIOU, E.: Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. In: *Eur J Pharmacol* 510 (2005), Mar, Nr. 1-2, S. 31–38
- [179] FONTAINE, D. ; FONTAINE, J. ; DUPONT, I. ; DESSY, C. ; PIECH, A. ; CARPENTIER, Y. ; BERKENBOOM, G.: Chronic hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition and endothelial function of the normocholesterolemic rat: comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 40 (2002), Aug, Nr. 2, S. 172–180
- [180] HERNÁNDEZ-PERERA, O. ; PÉREZ-SALA, D. ; SORIA, E. ; LAMAS, S.: Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. In: *Circ Res* 87 (2000), Sep, Nr. 7, S. 616–622
- [181] KISSELEV, A. F. ; CALLARD, A. ; GOLDBERG, A. L.: Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Mar, Nr. 13, S. 8582–8590
- [182] XU, J. ; WU, Y. ; SONG, P. ; ZHANG, M. ; WANG, S. ; ZOU, M. H.: Proteasome-dependent degradation of guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I causes tetrahydrobiopterin deficiency in diabetes mellitus. In: *Circulation* 116 (2007), Aug, Nr. 8, S. 944–953
- [183] HERRMANN, J. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A.: On to the road to degradation: atherosclerosis and the proteasome. In: *Cardiovasc Res* 85 (2010), Jan, Nr. 2, S. 291–302

- [184] VERSARI, D. ; HERRMANN, J. ; GÖSSL, M. ; MANNHEIM, D. ; SATTLER, K. ; MEYER, F. B. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A.: Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006), Sep, Nr. 9, S. 2132–2139
- [185] FUKAI, T.: Targeting proteasome worsens atherosclerosis. In: *Circ Res* 101 (2007), Oct, Nr. 9, S. 859–861
- [186] MEINERS, S. ; LAULE, M. ; ROTHER, W. ; GUENTHER, C. ; PRAUKA, I. ; MUSCHICK, P. ; BAUMANN, G. ; KLOETZEL, P. M. ; STANGL, K.: Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. In: *Circulation* 105 (2002), Jan, Nr. 4, S. 483–489
- [187] CIECHANOVER, A. ; BRUNDIN, P.: The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. In: *Neuron* 40 (2003), Oct, Nr. 2, S. 427–446
- [188] HERRMANN, J. ; CIECHANOVER, A. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A.: The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases—a hypothesis extended. In: *Cardiovasc Res* 61 (2004), Jan, Nr. 1, S. 11–21
- [189] ZOLK, O. ; SCHENKE, C. ; SARIKAS, A.: The ubiquitin-proteasome system: focus on the heart. In: *Cardiovasc Res* 70 (2006), Jun, Nr. 3, S. 410–421
- [190] TAKAOKA, M. ; OKAMOTO, H. ; ITO, M. ; NISHIOKA, M. ; KITA, S. ; MATSUMURA, Y.: Antihypertensive effect of a proteasome inhibitor in DOCA-salt hypertensive rats. In: *Life Sci* 63 (1998), Nr. 4, S. PL65–PL70

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems . . . . .	15
1.2	Strukturformeln der verwendeten Proteasominhibitoren. . . . .	17
2.1	Der Messplatz für isolierte Gefäßringe. . . . .	25
2.2	Messanordnung für isolierte Aortenringe. . . . .	26
3.1	Proteasomaktivität nach 12-stündiger Inkubation der aortalen Gefäßringe mit 50 bzw. 100 nM MG132 und 500 pM MG262 . . . . .	46
3.2	Endothelabhängige Vasorelaxation von frisch präparierten Aortenringen im Vergleich zu inkubierten Aortenringen . . . . .	47
3.3	Vasorelaxation TNF- $\alpha$ -inkubierter Aortenringe . . . . .	49
3.4	Repräsentative Originalregistrierung der Vasorelaxation von Aortenringen . .	50
3.5	Verhinderung der TNF- $\alpha$ -induzierten endothelialen Dysfunktion durch MG132	51
3.6	Verhinderung der TNF- $\alpha$ -induzierten endothelialen Dysfunktion durch MG262	52
3.7	Vasorelaxation MG132-behandelter Gefäßringe im Vergleich zu unbehandelten Kontrollringen . . . . .	53
3.8	Expression der eNOS in Aortenringen . . . . .	56
3.9	Relative Expression der iNOS mRNA in Aortenringen . . . . .	57
3.10	NOS-Aktivität in Lysaten von Aortenringen . . . . .	58
3.11	Relative cGKI mRNA-Expression in Aortenringen . . . . .	58
3.12	cGMP-Gehalt in Aortenringen nach Stimulation mit Acetylcholin . . . . .	59
3.13	Endothelinexpression in Aortenringen . . . . .	61
3.14	Relative mRNA-Expression von NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten . . . . .	62
3.15	Relative mRNA-Expression von Lipoxygenase und Xanthinoxidase in Aortenringen . . . . .	64
3.16	Die Expression von Superoxiddismutase (SOD1) und Katalase . . . . .	65
3.17	Lucigenin-Chemilumineszenz von intakten Aortenringen . . . . .	66

# Tabellenverzeichnis

1.1	Auswahl endothelialer Vasodilatoren und -konstriktoren . . . . .	4
1.2	Funktionsbereiche ausgewählter Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems	16
2.1	Einheitlicher Versuchsablauf für die Testung der endothelabhängigen und der endothelunabhängigen Vasorelaxation . . . . .	27
2.2	Cycling-Parameter für quantitative Real-Time RT-PCR . . . . .	36
2.3	Primer-Optimierungsmatrix . . . . .	36
2.4	Für Real-Time RT-PCR verwendete Forward- und Reverse-Primer . . . . .	37
3.1	Relative mRNA-Expression von NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten . . . . .	63

# A Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ach	Acetylcholin
Akt	Proteinkinase B
AT II	Angiotensin II
AT <sub>1</sub>	Angiotensinrezeptor 1
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxidisulfat
bcl-2	Abk. für engl. B-cell lymphoma 2
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CPAE	calf pulmonary artery endothelial cells
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSSR	Dahl-Salz-sensitive Ratten
ECE	Endothelin Converting Enzyme
ECL	Enhanced Chemiluminescence Lösung
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EET	Epoxyeicosatriensäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetales Kälberserum
FMD	flow-mediated dilation
FMN	Flavinmononukleotid
GPx	Glutathionperoxidase
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HO-1	Hämoxygenase 1
HRP	horseradish peroxidase (dt. Meerrettichperoxidase)
Hsp	heat shock protein

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
I $\kappa$ B	inhibitor kappa B
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP-Rezeptor	Prostazyklin-Rezeptor (oder: Prostaglandin I <sub>2</sub> Rezeptor)
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	NF-E2-related factor 2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> , Prostazyklin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (GTPase der Rho-Familie)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SHR-Ratten	Spontan hypertensive Ratten
SOD	Superoxiddismutase
Suc-LLVY-MCA	Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-4-Methyl-7-Coumarylamid
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1

## B Danksagung

Es sei mir an dieser Stelle erlaubt, mich zuallererst bei meiner lieben Familie zu bedanken, ohne die das Studium sowie diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Verena Stangl und Herrn Prof. Dr. Karl Stangl für die Überlassung des Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen sowie die wertvolle wissenschaftliche Kommunikation.

Bei Prof. Dr. Gert Baumann bedanke ich mich für die Möglichkeit, im Kardiologischen Forschungslabor der Med. Klinik für Kardiologie und Angiologie CCM zu arbeiten.

Dr. rer. nat. Mario Lorenz danke ich für die umfassende wissenschaftliche Betreuung sowie den freundschaftlichen Umgang im Labor und außerhalb.

Für ihre wertvollen Anregungen möchte ich Dr. rer. nat. Antje Ludwig und PD Dr. rer. nat. Silke Meiners danken.

Liebes Team im Labor Ziegelstraße: Ich habe Eure Hilfe und Anleitung, den netten Umgang und die Aufmunterung stets genossen. Vielen Dank an Euch alle. Besonderer Dank gilt Angelika Westphal, Angelika Vietzke, Mino Moobed, Wanda Michaelis und Thomas Düsterhöft.

Last but not least: Danke, liebe Ulrike, für Deine Unterstützung, Zeit und Geduld. Danke, lieber Willem, für Deine Geduld in der gesamten Zeit.

# C Lebenslauf

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

# D Eidesstattliche Erklärung

Ich, Nicola Wilck, erkläre an Eides statt, dass ich die im Fachbereich Humanmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

*Verbesserung einer experimentell induzierten endothelialen Dysfunktion durch  
Proteasominhibition in Gefäßringen der Ratte*

im Kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik für Kardiologie und Angiologie CCM unter Leitung von Prof. Dr. Gert Baumann ohne sonstige (unzulässige) Hilfe durch Dritte selbst durchgeführt habe und die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Ich bestätige, bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt und die entsprechende Literatur vollständig angegeben zu haben. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Berlin, 03.03.2010

Nicola Wilck

# E Publikationsverzeichnis

1. Teile der vorliegenden Arbeit wurden in

M. Lorenz, **N. Wilck**, S. Meiners, A. Ludwig, G. Baumann, K. Stangl, V. Stangl. Proteasome inhibition prevents experimentally-induced endothelial dysfunction. *Life Sci*, 2009, 84, 929-934

publiziert.

2. H. Dreger, K. Westphal, **N. Wilck**, G. Baumann, V. Stangl, K. Stangl, and S. Meiners. Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovasc Res*, 2010, 85, 395-403
3. A. Ludwig, M. Fechner, **N. Wilck**, S. Meiners, N. Grimbo, G. Baumann, V. Stangl, K. Stangl. Potent anti-inflammatory effects of low-dose proteasome inhibition in the vascular system. *J Mol Med*, 2009, 87, 793-802
4. S. Wessler, C. Otto, **N. Wilck**, V. Stangl, KH. Fritzemeier. Identification of estrogen receptor ligands leading to activation of non-genomic signaling pathways while exhibiting only weak transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006, 98(1), 25-35