

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Martin J. Lohse

**Einfluß der Atherosklerose auf den NO:cGMP Signalweg
am Modell des cholesteringefütterten Kaninchens**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Volker O. Melichar
aus Regensburg

Würzburg, März 2002

Referent: Prof. Dr. med. Harald H. H. W. Schmidt

Koreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Walter

Dekan: Prof. Dr. med. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2002

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

0. Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1 Überblick	1
1.2 <u>Pathogenese der Atherosklerose</u>	2
1.2.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Todesursache Nr. 1	2
1.2.2 Morphologische und physiologische Veränderungen in der Atherosklerose	3
1.2.3 Weitere Entwicklung der Läsionen und Stary's Klassifikation	5
1.3 <u>Der NO:cGMP-Signalweg</u>	8
1.3.1 Stickstoffmonoxid als Botenstoff	8
1.3.2 Bildung von NO durch NO-Synthasen	9
1.3.3 Wirkungen von Stickstoffmonoxid	10
1.3.4 NO, Superoxid und Peroxynitrit	11
1.3.5 NO-Rezeptor: Die lösliche Guanylatzyklase	14
1.3.6 Der Second Messenger cGMP	15
1.3.7 cGMP-abhängige Kinasen und VASP	17
1.3.8 Vasoprotektive Wirkungen des NO:cGMP-Signalwegs	18
1.3.9 Pathophysiologische Veränderungen in der Atherosklerose	18
2. Fragestellung	21
3. Material und Methoden	22
3.1 Chemikalien, Pharmaka, Reagenzien und Versuchstiere	22
3.2 Puffer und Lösungen	26
3.3 Geräte und Software	30
3.4 Herstellung der polyklonalen sGC Antikörper	32
3.5 Haltung der Kaninchen	33
3.6 Herstellung der Aortenhomogenate	33
3.7 Clearing der Aortenhomogenate von Kaninchenimmunglobulinen	34
3.8 Proteinbestimmung nach Bradford	35
3.9 Immunhistochemie	35
3.10 NOS-Aktivitätsassay (Citrullin-Assay)	36

3.11	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	37
3.12	sGC-Aktivitätsassay	39
3.13	Phosphodiesterase-Assay	39
3.14	Statistik	40
4.	Ergebnisse	41
4.1	Test der affinitätsgereinigten Antiseren auf Spezifität und Sensitivität	41
4.2	Serumlipidwerte und Gewicht der Kaninchen	42
4.3	Makroskopische und mikroskopische Aspekte der thorakalen Aorten	43
4.4	NO-Aktivität in den Gefäßhomogenaten ist nicht signifikant verändert	48
4.5	Expression der intrazellulären (Cu/Zn)-SOD ist reduziert	49
4.6	Immundetektion von Nitrotyrosin-Resten	50
4.7	Aktivität und Expression der löslichen Guanylatzyklase ist verringert.	51
4.8	Aktivität der cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen ist nicht verändert	55
4.9	Expression der cGMP-abhängigen Kinase-I ist in der Neointima verringert	56
4.10	Die Konzentration an Ser239-phosphoryliertem VASP ist verringert	58
5.	Diskussion	61
6.	Zusammenfassung	67
7.	Literaturverzeichnis	69
8.	Publikationen	88
9.	Danksagung	89
10.	Lebenslauf	91

0. Abkürzungen

ACh	Azetylcholin
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Entionisiertes Wasser
AU	Arbitrary Units, relative Optische Dichte
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cGK	cGMP abhängige Proteinkinase
cGK-I	cGMP abhängige Proteinkinase I
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-2-Hydroxy-1-Propansulfonat
CON	Kontrolle (Die Kontrollgruppe der Kaninchen)
cNOS	Konstitutionell exprimierte NOS-Isoformen, also NOS-I und -III
(Cu/Zn)-SOD	Superoxiddismutase, kupfer- und zinkhaltige, <i>intrazelluläre</i> Form
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EC-SOD	Superoxiddismutase, kupfer- und zinkhaltige, <i>extrazelluläre</i> Form
EDRF	Relaxationsfaktor des Endothels (Endothelium-derived relaxing factor)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoether)N',N',N',N'-Tetraessigsäure
EIA	Enzyme immunoassay
eNOS	Endotheliale NOS, NOS-III
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GSH	Glutathion, reduzierte Form

GTP	5'-Guanosintriphosphat
H ₄ Bip	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin
HC	Hypercholesterinämisch (Gruppe Kaninchen, die Cholesterin erhielt)
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HLA-II	humanes Leukozytenantigen, Klasse II
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL-1, IL-2, ...	Interleukin-1, Interleukin-2, u.s.w.
iNOS	Induzierbare NOS, NOS-II
kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoprotein
L-NAME	<i>N</i> ^{ω} -nitro-L-arginin-methylester
LPO	Lipoxygenase
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
Mn-SOD	Superoxiddismutase, manganhaltige, mitochondriale Form
MPO	Myeloperoxidase
MW	Molekulargewicht
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukeotid-Phosphat, reduzierte Form
nNOS	neuronale NOS, NOS-I
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS-I	NOS, Typ I (neuronale NOS, nNOS)
NOS-II	NOS, Typ II (induzierbare NOS, iNOS)
NOS-III	NOS, Typ III (endotheliale NOS, eNOS)
NOX	NADPH-Oxidase
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[3,4-a]quinoxalin-1-on (ein sGC-Inhibitor)
ONOO ⁻	Peroxynitrit-Anion

p38 ^{nt}	Nicht weiter indentifiziertes nitrosyliertes Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 38 kDa
p62 ^{nt}	Nicht weiter indentifiziertes nitrosyliertes Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 62 kDa
P _{ser239} -VASP	VASP, phosphoryliert an der Aminosäure Ser239
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet derived growth factor (Wachstumsfaktor, u.a. sezerniert von Thrombozyten)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumlaurylsulfat
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
SHR	Spontan hypertensive Ratten
SMC	Glatte Muskelzelle (smooth muscle cell)
SNP	Natriumnitroprussid
TEA	Triethanolamin
TNF- α , - β	Tumornekrosefaktor- α und - β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TBS	Tris Puffer (Tris buffered saline)
TBST	Tris Puffer (Tris buffered saline) mit Tween 20
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
XOD	Xanthinoxidase
YC-1	3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol (ein NO-unabhängiger sGC-Stimulator)

1. Einleitung

1.1 Überblick

Atherosklerose mit den Folgeerkrankungen Myokardinfarkt, Schlaganfall, Bluthochdruck und Herzinsuffizienz ist unbestrittene Haupttodesursache in den sogenannten entwickelten Ländern Europas¹ und Nordamerikas,² mit zunehmender Tendenz. Die Anlage zu atherosklerotischer Veränderung kann bereits in den Gefäßen von Kleinkindern gefunden werden und nimmt unaufhaltsam in Laufe des Lebens zu. Allerdings kann dieser Ablauf durch Risikofaktoren und -verhalten sowie Ernährungsgewohnheiten ganz erheblich beeinflusst werden.

Sind die morphologischen Aspekte atherosklerotischer Veränderungen schon seit Jahrhunderten bekannt, konnte doch erst in den letzten Jahrzehnten ein Teil der pathophysiologischen Grundlagen dieser hochkomplexen Krankheit aufgedeckt werden. Ein wichtiger Schritt dabei war die Entdeckung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation durch Furchgott und Zawadzki im Jahr 1980³, eine Entdeckung die 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurde. Bald schon wurde erkannt, daß Stoffe aus den atherosklerotischen Plaques, wie Superoxide und oxydierte Lipoproteine, den noch unbekanntem endothelialen Relaxationsfaktor (EDRF) abbauen und seine vasodilatierende Wirkung abschwächen.^{4,5} Trotzdem sollten noch einmal fast zehn Jahre vergehen, bis der EDRF als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert war.^{6,7} In den folgenden Jahren konnte in Tiermodellen der Atherosklerose verminderte NO-Produktion^{8,9} bzw. -Wirkung^{10,11} nachgewiesen werden, sowie vermehrter Abbau von NO durch Radikale wie Superoxid. Die Auswirkungen der Atherosklerose auf die weiteren Enzyme und Botenstoffe des NO-Signalwegs, wie lösliche Guanylatzyklase, cGMP, Phosphodiesterasen und cGMP-abhängige Proteinkinasen sind aber noch weitgehend unbekannt. Durch die Entwicklung neuer Pharmaka, unter den bekanntesten der Phosphodiesteraseinhibitor Sildenafil (Viagra[®]), werden diese Enzyme in zunehmenden Maßstab pharmakologisch beeinflussbar. Daher ist es von

herausragendem wissenschaftlichen Interesse, welchen Einfluß die Atherosklerose auf die Enzyme des gesamten NO:cGMP-Signalwegs hat.

1.2 Pathogenese der Atherosklerose

1.2.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Todesursache Nr. 1

Atherosklerose, neben Bluthochdruck Hauptursache kardiovaskulärer Erkrankungen, ist heute Haupttodesursache in den Ländern Europas, Nordamerikas und vielen Ländern Asiens, mit steigender Tendenz. Nach den Zahlen der Centers of Disease Control and Prevention und der American Heart Association verstarben im Jahre 1996 in den U.S.A. mehr als 962.000 Menschen an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, gefolgt von 538.000 Opfern maligner Erkrankungen und 61.000 Unfallopfern.^{2,12} Dies entspricht einem Anteil der Herz-Keislauf-Erkrankungen an den gesamten Todesursachen von mehr als 40%. Einen fast identischen prozentualen Anteil findet man in Europa auch in Deutschland¹, Dänemark und Großbritannien, aber auch in der Russischen Föderation und China, oder in Argentinien. Traditionell niedrigere Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen haben statistisch Länder wie Spanien und Frankreich in Europa, und Japan, allerdings auch mit zunehmender Tendenz.

Ursachen für den Anstieg sind zunehmendes Risikoverhalten, v.a. inhalatives Zigarettenrauchen, geänderte Ernährungs- und Lebensgewohnheiten sowie ein Zunehmen gefäßschädigender Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Bluthochdruck. Als Erkrankung des höheren Lebensalters tritt Atherosklerose, wie auch maligne Tumorerkrankungen, vermehrt als Todesursache auf, wenn andere Erkrankungen, v.a. Infektionskrankheiten, heute weitgehend therapierbar sind.

1.2.2 Morphologische und physiologische Veränderungen in der Atherosklerose

Insbesondere und ungünstigerweise in den Koronararterien können erste Veränderungen an der Lamina elastica interna und Intimaverdickungen schon bei Neugeborenen gefunden werden.^{13,14} Diese Veränderungen werden von einigen Autoren als ein normaler Vorgang des Alterns der Blutgefäße angesehen, sind aber eigentlich bereits eine Vorstufe der Atherosklerose.¹⁵

Die ersten histologischen Veränderungen der Atherosklerose werden vor allem in der Intima gefunden und sind charakterisiert durch eine Akkumulation von fettgefüllten Zellen, hauptsächlich Makrophagen. Ungeklärt ist nach wie vor, was diesen Prozess einleitet. Diskutiert werden Mikrotraumen in der Intima (die sog. Response-to-Injury Theorie) oder eine primäre Dysfunktion des Endotheliums (modifizierte Response-to-Injury Theorie).¹⁶ In beiden Fällen führt der initiale Stimulus zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen. Es kommt zu einer vermehrten Einwanderung von Monozyten aus der Blutbahn in die Gefäßwand, die sich in Makrophagen umwandeln.^{17,18} Durch die physiologische Transsudation von Blutlipiden schwimmen diese Zellen regelrecht in Lipoproteinen und Cholesterin. Ein weiterer wichtiger Faktor scheint die oxidative Veränderung dieser Cholesterine in der Gefäßwand zu sein, welche dann durch die Makrophagen über den Ox-LDL-Rezeptor und weitere Scavenger-Rezeptoren phagozytiert werden.^{19,20,21} Die Makrophagen sind jedoch nicht in der Lage das Übermaß an Cholesterin zu verstoffwechseln, sondern lagern es in Form von Cholesterinester-Tröpfchen intrazellulär ab. Mikroskopisch haben diese Zellen nach Entfettung des Präparats ein schaumiges Aussehen, und werden daher auch beschreibend "Foam Cells" genannt. Die Schaumzellen sezernieren Wachstumsfaktoren (M-CSF, GM-CSF) und Chemotaxine, was zum weiteren Einwandern von Leukozyten aus dem Blut führt.^{18,21,22} Die so entstehenden frühen, fettreichen aber bindegewebsarmen Plaques werden auch als "Fatty Streaks" bezeichnet.

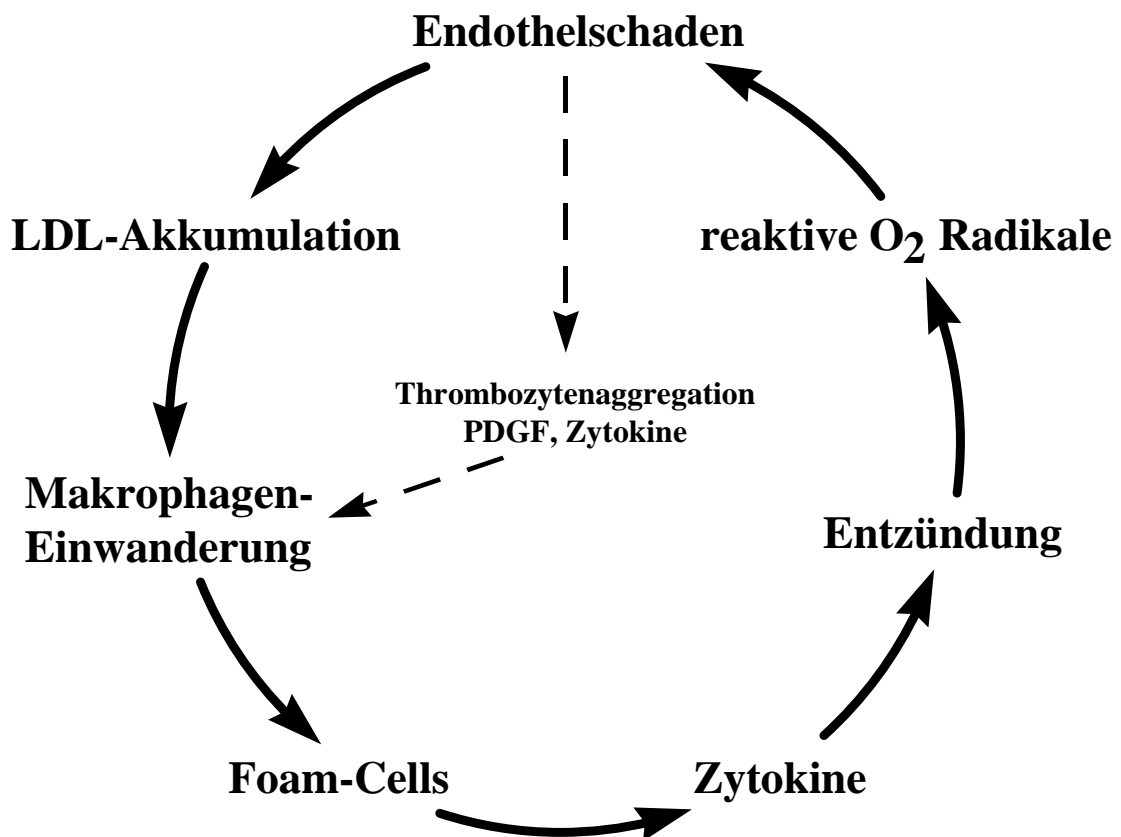


Abb. 1: Der Circulus vitiosus der Entstehung der Atherosklerose. Nach der "Response-to-Injury"-Theorie gehen der Entstehung atherosklerotischer Läsionen mikroskopische Endothelschädigungen voraus, die zur Lipidablagerung, Foam-Zell-Bildung und zur Entzündungsreaktion führen, die ihrerseits weitere Endothelläsionen hervorruft.^{18,23,24}

An Mikroverletzungen am Endothel anhaftende Thrombozyten sezernieren ebenfalls Wachstumsfaktoren, u.a. PDGF, welche glatte Muskelzellen aus der Media anlocken und deren Proliferation fördern.²⁵ Diese SMCs haben zwar kaum mehr kontraktile Eigenschaften, sezernieren aber in erheblichem Maße extrazelluläre Matrix und Kollagen, zusammen mit den ebenfalls vorhandenen Fibroblasten. Die gebildete fibromuskuläre Kappe bedeckt größtenteils den zentralen Lipid- und Schaumzell-Pool, was vorübergehend zu einer Stabilisierung der Plaques führt, allerdings auch nicht

unwesentlich zu deren allmählichen Größenzunahme beiträgt. Dieser Übergang von Fatty Streak zu Fibrous Plaque ist lokalisationsabhängig, findet aber meist schon zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr statt.

1.2.3 Weitere Entwicklung der Läsionen und Stary's Klassifikation

Neben der Grobeinteilung Fatty-Streak - Fibrous-Plaque wurde 1992 von H. C. Stary und der American Heart Association eine genauere Einteilung der Stadien der atherosklerotischen Läsionen eingeführt, die sogenannte Stary's Klassifikation^{26,27,28}. Die Entwicklung der Läsionen wird dabei nach ihren morphologischen Charakteristika in fünf Phasen eingeteilt:

Die **erste Phase** beschreibt kleine Läsionen, die oft schon in Gefäßen von Personen unter 30 Jahren gefunden werden können. Die Läsionen entwickeln sich über viele Jahre und Jahrzehnte hinweg und können weiter in Typ I bis Typ III eingeteilt werden. Typ I Läsionen zeichnen sich dabei durch eine diffuse Intimaverdickung aus, in der ggf. schon erste Makrophagen zu finden sind (s. Abb. 2). Typ II Läsionen bestehen dann schon aus lipidgefüllten Makrophagen (Foam-Zellen), die in großer Anzahl in der (Neo-) Intima zu finden sind. Bei weiterer Progression der Erkrankung bilden sich dann Typ III Läsionen aus, auch Präatherome genannt. Diese zeichnen sich durch kleine extrazelluläre Lipid-Pools aus, zusätzlich zum Fett in den Makrophagen.

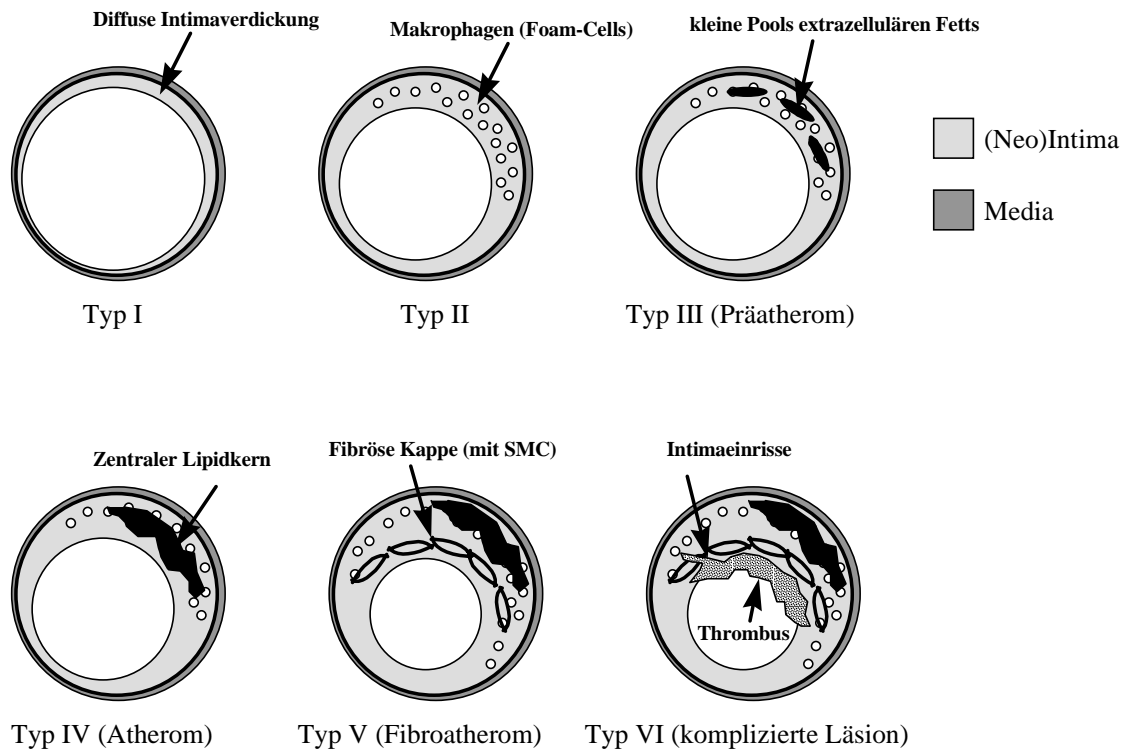


Abb. 2: Schematische Darstellung der Einteilung der atherosklerotischen Läsionen nach Sary et al. und der American Heart Association.²⁶⁻²⁸

Die **zweite Phase** ist durch Plaques charakterisiert, die noch nicht notwendigerweise das Lumen stark verengen. Die Läsionen zeichnen sich durch einen hohen Lipidgehalt aus, und neigen früher oder später zur Ruptur. In Typ IV Läsionen haben sich die extrazellulären Lipid-Pfützen bereits zu einem zentralen Pool vereinigt. In Typ V Läsionen findet man einen höheren Anteil von glatten Muskelzellen, die den Lipidpool oft wie eine Kappe überdecken (Fibrous cap) und die Plaque dadurch temporär stabilisieren. Die SMCs wandern, angezogen durch Chemokine und Wachstumsfaktoren, von der Media her ein. Sie verändern sich dabei morphologisch wie physiologisch und verhalten sich mehr wie Fibroblasten, produzieren extrazelluläre Matrix. Je nach Gehalt an SMCs und Bindegewebe werden Typ V Läsionen noch in Typen Va (wenig) bis Vc (viel Kollagen) unterteilt.

In **Phase drei** kommt es zu oberflächlichen Plaqueeinrissen, und zur randständigen Thrombusbildung. Diese komplizierten Läsionen (Typ VI) sind auch noch nicht notwendigerweise gefäßokkludierend, sie können direkt oder über die Phase vier in Phase fünf Läsionen übergehen. Ob es zu größeren Plaque-Rupturen kommt, also über die Phase 4, hängt in erster Linie von der Zusammensetzung der Läsion ab, welche wiederum v.a. von deren Lage im Gefäßbaum abhängt. Stark zu Plaquebildung und -progression neigen Gefäßabzweigungen, vermutlich da dort der laminare Blutfluß gestört ist, und Turbulenzen auftreten. Sehr lipidreiche Läsionen mit einem großen, zentralen Fettkern und nur einer dünnen fibrösen Kappe neigen besonders zur großflächigen Ruptur.^{29,30}

Phase vier ist durch großflächigere Endothleinrisse charakterisiert, und starker Thrombusbildung, welche recht schnell zum Gefäßverschluß und schließlich zu den typischen Symptomen der jeweiligen Gefäßerkrankung führen. Der Gefäßverschluß erfolgt dabei entweder direkt durch den Thrombus an der Läsion, oder auch weiter distal durch Embolisation durch freigerissenes Plaque-Material.

In **Phase fünf** schließlich organisiert sich der Plaque, der Thrombus wird häufig fibrotisch um- und in den Plaque mit eingebaut. Gehen Phase 3 Plaques allmählich und ohne großflächige Ruptur direkt in Phase 5 über, so kommt es weniger häufig zu akuter Symptomatik, das Gefäß verengt sich langsam und häufig können sich Kollateralen ausbilden.³¹ Hingegen gehen akute Myokardinfarkte und zerebrovaskuläre Insulte in mehr als 75% mit einer größeren Plaqueruptur einher (Phase 4).³²

1.3 Der NO:cGMP-Signalweg

1.3.1 Stickstoffmonoxid als Botenstoff

Bereits seit langem ist bekannt, daß eine Vielzahl von chemischen Substanzen und physiologischen Botenstoffen auf die glatte Muskulatur der Gefäße relaxierend und somit gefäßerweiternd wirkt. Azetylcholin oder Bradykinin binden an Rezeptoren der Gefäßwand und führen zur Verringerung des Gefäßtonus. Seit mehr als 100 Jahren ist auch bekannt, daß Nitrate wie Nitroglyzerin den vaskulären Tonus senken. Nitrate sind seit langem erfolgreich eingesetzte Medikamente zur Therapie der koronaren Herzkrankheit.^{33,34} Auf welche Art und Weise die physiologischen Signaltransmitter und die Nitrate wirken lag noch lange Zeit im Dunkeln.

Erst 1980 konnten Furchgott und Mitarbeiter zeigen, daß die durch Azetylcholin vermittelte Vasodilatation von einem intakten Endothel abhängig ist.³ Wurde das Endothel in den Gefäßen durch Abreiben zerstört, führt Azetylcholin zu keiner Gefäßerweiterung mehr, bzw. kommt es in hohen Konzentrationen sogar zur Vasokonstriktion durch direkte Wirkung des ACh an den glatten Muskelzellen. Die Botenstoffe binden also offensichtlich an Rezeptoren an den Endothelzellen und veranlassen diese einen weiteren Signaltransmitter zu sezernieren, der in den anliegenden glatten Muskelzellen eine Relaxation auslöst. Dieser noch unbekannte Botenstoff wurde als "Endothelium-Derived Relaxing Factor" oder EDRF bezeichnet. Noch vor der exakten Identifikation von EDRF konnte bereits gezeigt werden, daß Radikale wie Superoxid den Botenstoff sehr effektiv inaktivieren können.¹⁰

Identifiziert wurde der EDRF schließlich 1987 als das gasförmige Radikal Stickstoffmonoxid, NO,^{6,7} eine Entdeckung, die 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie für R. F. Furchgott, L. J. Ignarro und F. Murad ausgezeichnet wurde.

1.3.2 Bildung von NO durch NO-Synthasen

NO, bis in die 80er Jahre eher als hochtoxischer Bestandteil von Abgasen und Smog und als Verursacher chronischer Atemwegserkrankungen in Verruf, stellt somit eine völlig neue Art von Transmitter da. Die meisten "konventionellen" Signaltransmitter auf Protein- oder Aminosäurebasis binden an einen extrazellulären Rezeptor, und aktivieren so eine intrazelluläre Signalkaskade. NO hingegen diffundiert als Gas frei durch Zellmembranen und aktiviert dort intrazelluläre Rezeptoren, v.a. die lösliche Guanylatzyklase.³⁵ Als Radikal reagiert NO aber auch bereitwillig mit einer Vielzahl von Molekülen und Radikalen, vor allem Superoxid^{10,36} und Oxyhämoglobin.^{37,38} Gerade die Reaktion mit letzterem schränkt die Reichweite und physiologische Halbwertszeit des Gases NO erheblich ein. Je nach Umgebung liegt die Halbwertszeit im Millisekunden- bis Sekundenbereich, als maximale Reichweite werden ca. 100µm angegeben.³⁹ Spätestens dann trifft NO auf ein kleines Blutgefäß und wird durch Oxyhämoglobin inaktiviert.

NO wird im Körper durch die Enzymfamilie der NO-Synthasen gebildet.^{40,41} (s. S. 16, Abb. 4) Von diesen bis zu 320 kDa großen Enzyme sind bislang 3 Isoformen bekannt,⁴² die NO und die Aminosäure L-Zitrullin aus L-Arginin unter Verbrauch von O₂ und NADPH katalysieren.^{43,44} Für eine erfolgreiche NO-Produktion ist desweiteren Tetrahydrobiopterin als Kofaktor notwendig, wobei dessen Funktion noch nicht eindeutig geklärt werden konnte.⁴⁵

Von den drei Isoformen sind im kardiovaskulären Bereich vor allem die endotheliale NOS (NOS-III, eNOS) sowie die induzierbare NOS (NOS-II, iNOS) von Bedeutung. Die NOS-I Isoform (neuronal NOS oder nNOS) spielt hauptsächlich in Gehirn und Nervensystem bei der Signaltransmission eine Rolle, wird aber in einer Vielzahl anderer Zellen, auch Endothelzellen, gefunden.³⁴ NOS-I und NOS-III wird von Endothelzellen und zahlreichen anderen Zellen konstitutionell, d.h. ständig exprimiert, ihre Aktivität wird durch die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert. Funktionell lassen sich daher beide Isoformen auch unter cNOS, also konstitutionelle und Ca⁺⁺-abhängige

NOS, zusammenfassen. In der Endothelzelle binden Botenstoffe wie Azetylcholin oder Bradykinin an membranständige Rezeptoren und aktivieren dadurch die Produktion des Second-Messengers Inositol-1,4,5-triphosphat,⁴⁶ was zur Freisetzung von Ca^{++} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum führt. In der Folge bindet ein Komplex aus Ca^{++} und Calmodulin an die NOS und aktiviert sie dadurch.^{43,47,48} Die cNOS Isoformen bilden somit einen gut regulierbaren, basalen NO-Spiegel für die Feineinstellung des Gefäßtonus.⁴⁹

NOS-II hingegen ist ein induzierbares Enzym, das zunächst in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gefunden wurde.^{50,51} Inzwischen ist aber bekannt, daß auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen und eine Vielzahl weiterer Zellen NOS-II unter dem Einfluß von Entzündungsmediatoren wie IL-1 und IFN- γ exprimieren können.^{52,53,54} Die Regulation von NOS-II wird durch die Enzymtranskription reguliert;⁵⁵ einmal vorhanden, produziert die NOS-II Ca^{++} -unabhängig Stickstoffmonoxid in weitaus höheren Konzentrationen als die cNOS-Enzyme.⁵⁶ Die bis zum Abbau des Enzyms mehrere Stunden anhaltende Aktivität der NOS-II wird dadurch erklärt, daß diese Isoform Calmodulin hochaffin und schon bei sehr niedrigen Ca^{++} -Konzentrationen bindet.⁵⁷ Die mutmaßliche Hauptbedeutung der NOS-II liegt daher in der Produktion von hohen, zytotoxischen Konzentrationen von NO und anderen Radikalen im Rahmen von Entzündungsreaktion und Infektabwehr.⁵⁸

1.3.3 Wirkungen von Stickstoffmonoxid

Innerhalb seiner kurzen Halbwertszeit diffundiert NO als Gas frei durch Zellmembranen und andere Barrieren, um mit einer Vielzahl von Molekülen und Proteinen zu reagieren, vor allem mit hämeisenhaltigen Proteinen und Thiolgruppen.⁵⁹

So bildet NO mit Thiolen (wie Glutathion) sogenannte Nitrosothiole.⁶⁰ Dies entspricht einerseits einer Detoxifikation, da diese Thiole weniger reaktiv sind und weniger reaktive Sauerstoffverbindungen bilden.⁵⁹ Andererseits besitzen Nitrosothiole gewisse NO-Wirkungen an Rezeptorproteinen und sind viel stabiler als das Gas NO

selbst. Es wird daher diskutiert ob diese S-Nitrosothiole als längerlebige Speicherform von NO im Blutplasma fungieren können.⁶¹ Auch gibt es zahlreiche Hinweise darauf, daß S-Nitrosylierung von Cystein-Resten bei der Regulation der Aktivität von Enzymen und Ionenkanälen eine wichtige Rolle spielt, analog der Phosphorylierung von OH-Gruppen.^{62,63,64}

1.3.4 NO, Superoxid und Peroxynitrit

Schon bevor klar war, daß der EDRF NO oder eine NO-ähnliche Substanz ist, wurde bereits erkannt, daß der - damals in Endothelzellkultur produzierte - EDRF sehr effektiv durch Superoxid-Anionen (O_2^-) deaktiviert wird.^{10,65} Dies entspricht der Reaktion von NO mit O_2^- zu Peroxynitrit ($ONOO^-$), einem hochreaktiven, toxischen Anion, welches aber kaum mehr vasodilatierende Wirkung besitzt.^{66,67}

Das O_2^- kann auf vielfältige Art und Weise gebildet werden. Mitochondrien produzieren permanent kleine Mengen als ungewolltes Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung. NOS selbst kann, insbesondere wenn wenig Tetrahydrobiopterin als Kofaktor vorhanden ist, erhebliche Mengen Superoxid bilden.⁶⁸ Eine weitere wichtige O_2^- -Quelle ist unter Entzündungsbedingungen die Enzymfamilie der NADH/NADPH-Oxidasen (NOX). Diese Enzyme nutzen NADH bzw. NADPH als Substrate für den Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff und bilden dabei O_2^- und NAD^+ bzw. $NADP^+$. Zunächst in Leukozyten gefunden, spielen diese Enzyme wohl eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr durch Bildung von zytotoxischen Radikalen.^{69,70} Inzwischen konnten ähnliche Oxidasen auch in zahlreichen anderen Zellen, unter anderem Endothel- und glatten Muskelzellen, gefunden werden, wobei die Funktion in diesen Zellen noch nicht geklärt ist.^{71,72,73} Eine weitere Quelle für O_2^- , die erst kürzlich entdeckt wurde, ist im Blut zirkulierende Xanthinoxidase (XOD), welche an Heparinbindungsstellen der Endothelzellen bindet, und lokal verhältnismäßig hohe Spiegel des NO-abbauenden Radikals bilden kann.⁷⁴

In den Zellen wird normalerweise versucht den Spiegel an O_2^- und anderen Radikalen niedrig zu halten. Dafür sorgen die Enzyme der Superoxid-Dismutasen (SOD), von denen drei Formen bekannt sind. Eine intrazelluläre⁷⁵ und eine extrazelluläre⁷⁶ kupfer- und zinkhaltige SOD (auch als Cu/Zn-SOD und EC-SOD bezeichnet) und ein hauptsächlich mitochondrial lokalisiertes, manganhaltiges⁷⁷ Enzym, die sog. Mn-SOD. Diese Enzyme dismutieren O_2^- zu H_2O_2 , welches leicht über die ubiquitäre Katalase weiter abgebaut werden kann.

Jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion $NO + O_2^- \Rightarrow ONOO^-$ mindestens dreimal schneller als die Superoxiddismutasen O_2^- zu H_2O_2 dismutieren können.⁷⁸ Da sich die Reaktionen sowohl von NO als auch O_2^- aufgrund der kurzen Halbwertszeit beider Radikale in sehr lokal begrenztem Raum abspielen, können schon verhältnismäßig niedrige O_2^- -Konzentrationen erheblichen Einfluß auf die biologische Aktivität des gebildeten NO haben.³⁹

Das bei der Reaktion mit Superoxid entstehende Peroxynitrit ($ONOO^-$) kann je nach Konzentration unterschiedliche Eigenschaften haben. Niedrige Konzentrationen von $ONOO^-$ verhalten sich ähnlich wie NO und können zu Vasodilatation⁷⁹ und Thrombozyteninhibition⁸⁰ führen. Manche Autoren sehen daher in niedrigen Spiegeln von $ONOO^-$ auch physiologische NO-Donoren oder -Speicher, die sich durch reduzierende Thiole wieder zu NO reaktivieren lassen oder Nitrothiole mit NO-artiger Wirkung bilden können.⁸¹ Hohe Konzentrationen von $ONOO^-$ hingegen sind hoch zytotoxisch, u.a. durch die Bildung von weiteren hochreaktiven Radikalen wie peroxysalpetriger Säure⁸² und Hydroxyl-Radikalen,⁶⁶ sowie durch Proteinfragmentierung und Aminosäurenitrosylierung in Proteinen.³⁹

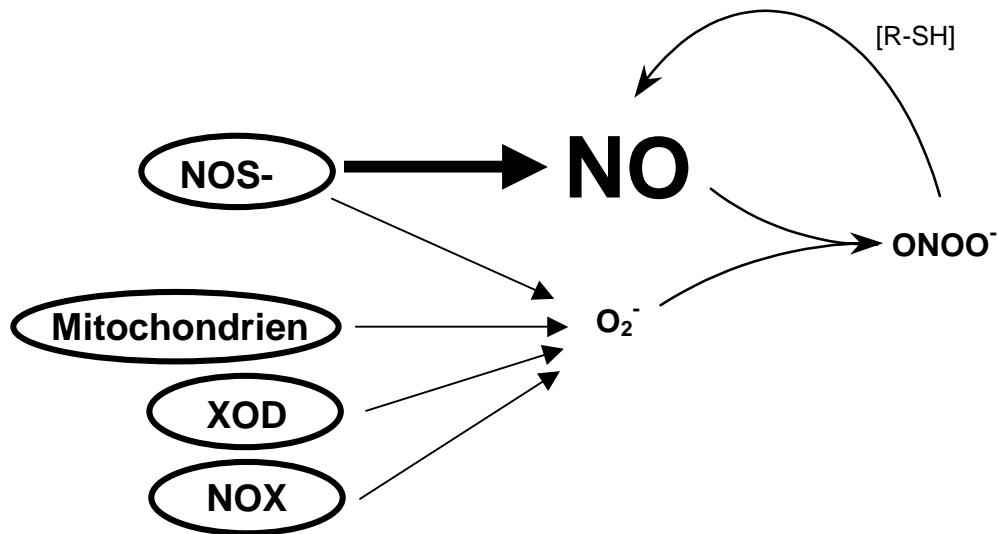


Abb. 3a: NO und O₂⁻ in der gesunden Gefäßwand: Unter physiologischen Bedingungen entstehen nur kleine Mengen ONOO⁻, die möglicherweise als schwach wirksamer NO-Donor agieren können (NOX: NADPH-Oxidase, XOD: Xanthinoxidase, R-SH: Thiole).

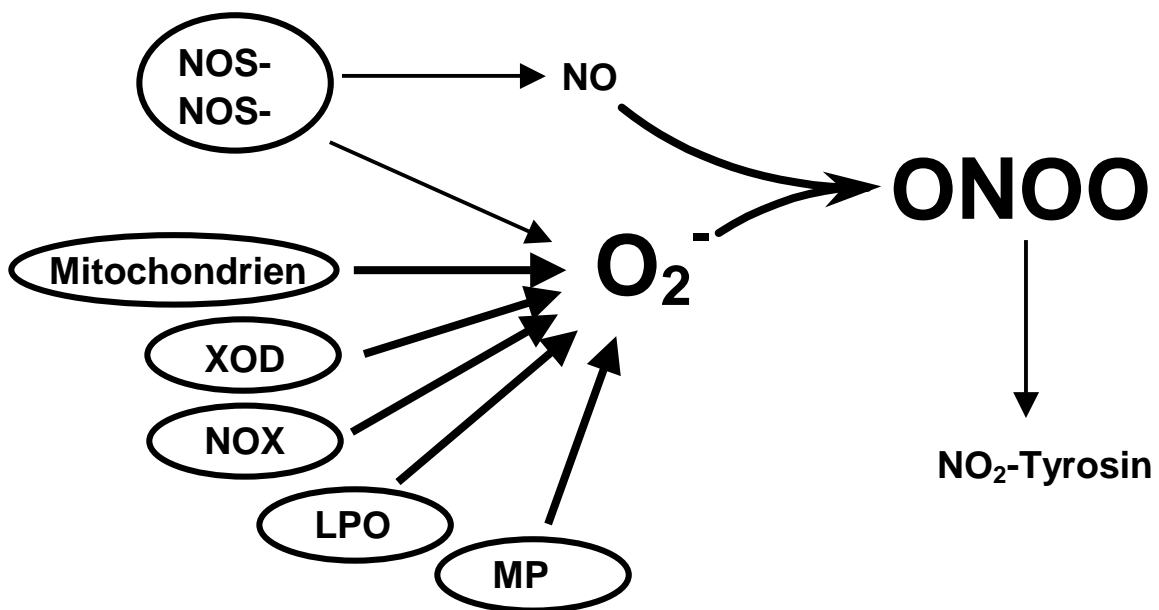


Abb. 3b: NO und O₂⁻ im atherosklerotischen Blutgefäß: Ist durch die Entzündungsreaktion die O₂⁻-Produktion erhöht, kommt es zur Bildung großer Mengen ONOO⁻ mit ihren zytotoxischen Wirkungen. NO-vermittelte Vasodilatation ist erheblich vermindert. (NOX: NADPH-Oxidase, XOD: Xanthinoxidase, MPO: Myeloperoxidase, LPO: Lipoxygenase)⁸³

1.3.5 NO-Rezeptor: Die lösliche Guanylatzyklase

Die Weiterleitung des Signals zur Relaxation der glatten Muskelzellen, und somit der Vasodilatation, erfolgt über den Second Messenger zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat. Gebildet wird dieser zweite Botenstoff durch die lösliche Guanylatzyklase (GTP-Pyrophospholyase, zyklisierend; sGC) aus 5'-Guanosintriphosphat unter Abspaltung von Pyrophosphat.^{84,85} Schon 1977 konnte gezeigt werden, daß lösliche Guanylatzyklase durch exogenes NO und Nitrate stimuliert werden kann, und durch einen Anstieg der cGMP-Konzentration zur Relaxation von glattem Muskel führt.⁸⁶ Der pharmakologische Mechanismus der Nitrate, in der Therapie der Angina pectoris seit langem erfolgreich in Gebrauch, konnte somit schon Jahre vor der Entdeckung des EDRF geklärt werden.

sGC ist ein heterodimeres, hämhaltiges Enzym bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, von denen jeweils zwei Isoformen bekannt sind.^{87,88,89} Funktionell aktiv sind lediglich die Dimere $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$, wobei erstere im kardiovaskulären Bereich offenbar die Hauptrolle spielt.⁹⁰ Aktiviert wird die sGC durch Binden von NO an die freie Ligandenstelle im Hämeisen. Das Eisen wird dadurch leicht aus der Ebene des Porphyrinrings gehoben, es kommt zur Konformationsänderung in der sGC, das Enzym ist aktiviert und produziert cGMP.⁹¹ Anzumerken ist, daß auch Kohlenmonoxid (CO) in der Lage ist sGC schwach zu stimulieren,^{92,93} und weitere, nicht-gasförmige sGC-Aktivatoren gefunden worden sind.⁹⁴

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß sGC in der Zelle zumindest teilweise membranassoziiert ist, möglicherweise assoziiert mit Caveolae.⁹⁵ Dadurch befindet sich der NO-Rezeptor in den SMC in unmittelbarer Nähe des Bildungsortes von NO in den Endothelzellen. NOS-III ist in den EC ebenfalls mit den Caveolae assoziiert.^{96,97,98} Dies könnte die Weiterleitung des NO-Signals an die SMC verbessern, insbesondere angesichts der kurzen Halbwertszeit von Stickstoffmonoxid.

Beeinflusst wird die Expression der sGC u.a. durch ihren Stimulator NO möglicherweise als physiologischer Regulationsmechanismus. Erhöhte NO-Spiegel führen zu verminderter Expression beider Untereinheiten α_1 und β_1 der sGC auf mRNA- und Proteinebene.^{99,100} Auch die zytokinvermittelte Herunterregulation von sGC scheint NO-vermittelt zu sein, ein wichtiger Aspekt für die Pathogenese der Atherosklerose, welche auch eine entzündliche Erkrankung darstellt.^{101,102} Zyklisches AMP, der "Bruder" von cGMP, scheint einen Einfluß auf die Expression der sGC zu haben. Erhöhte cAMP-Spiegel führten zur Reduktion von sGC-Aktivität, sGC-mRNA sowie -Protein.¹⁰³ Desweiteren beeinflussen verschiedene Spleißvarianten der α - und β -Untereinheiten der sGC deren Aktivität. Inaktive Spleißvarianten konkurrieren zumindest in vitro mit aktiven Varianten bei der Heterodimerbildung und können zur Abnahme der Gesamtaktivität führen.^{104,105} Inwiefern dies auch in vivo und besonders in der Atherosklerose als pathogenetischer Faktor eine Rolle spielt, ist noch unzureichend geklärt.

1.3.6 Der Second Messenger cGMP

cGMP hat in der Zelle zahlreiche potentielle Zielproteine. Es beeinflusst cGMP-abhängige Ionenkanäle in der Zellmembran; unter anderem aktiviert es einen Kaliumkanal, was zu einer Hyperpolarisierung der Zelle führen kann und damit zur Abnahme der Kontraktilität.^{106,107} Seinen eigenen Abbau und den von cAMP beeinflusst cGMP auch, es kann die Aktivität von bestimmten Phosphodiesterasen verändern.¹⁰⁸ Für die erfolgreiche Vasodilatation ist jedoch die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGK-I) unerlässlich. Bei Mäusen, deren cGK-I genetisch inaktiviert wurde (sog. Knockout-Mäuse), zeigten fast keine SMC Relaxation mehr auf Stimulation mit NO-Donoren.¹⁰⁹ Der cAMP-Signalweg blieb bei diesen Tieren vollständig intakt. Auch die antiatherogenen Qualitäten von NO in Bezug auf Zellproliferation und -migration, sowie Plättchenaggregation scheinen hauptsächlich cGK-I vermittelt zu sein.^{110,111,112}

Abgebaut wird der Second Messenger über die Enzymfamilie der Phosphodiesterasen, wobei für den Abbau von cGMP von den fünf bekannten Typen die Typ I und Typ V PDE wichtig sind.¹¹³ Die PDE sind auch der einzige Punkt im Signalweg unterhalb von NO auf den schon seit längerem pharmakologisch eingegriffen wird durch Phosphodiesteraseinhibitoren. Als Beispiele seien Methylxanthine wie Coffein und Theophyllin oder Stoffe wie Amrinon und Milrinon und neuerdings Sildenafil genannt.

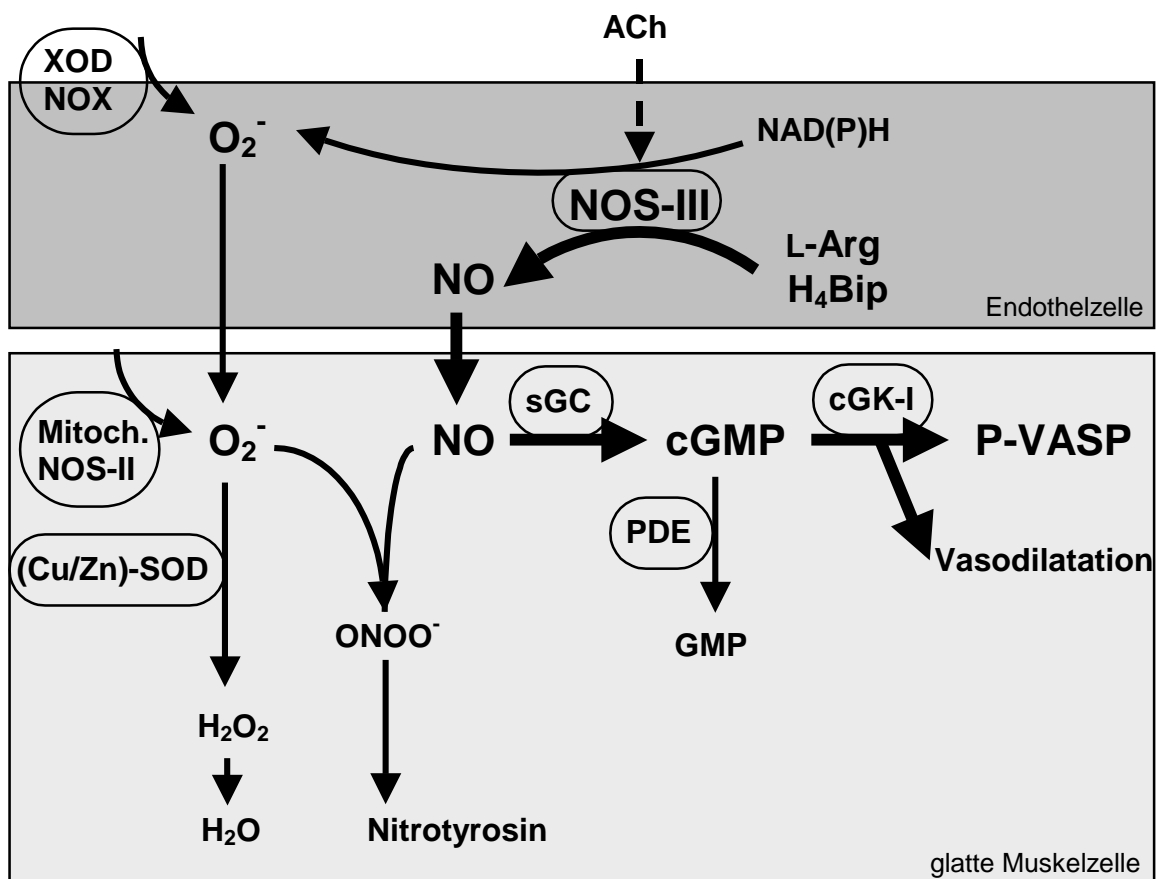


Abb. 4: Schematische Darstellung der NO:cGMP-Signaltransduktion in der Wand von Blutgefäßen.

1.3.7 cGMP-abhängige Kinasen und VASP

Aktiviert cGK-I kann in der Zelle eine Vielzahl von Proteinen phosphorylieren, unter anderem Ionenkanäle und den Inositol-3-Phosphat Rezeptor. Für die NO-vermittelte Relaxation ist möglicherweise die Phosphorylierung und somit Inaktivierung der Myosin-Leichtkettenkinase verantwortlich.^{114,115} Die Expression der cGK-I ist ähnlich der sGC reguliert: Vor allem Stimulatoren (Nitrate, Theophyllin, cGMP und cAMP) führen zu einer verminderten Expression des Enzyms.¹¹⁶

Ein interessantes Substrat der cGMP- und cAMP-abhängigen Kinasen, ist das sogenannte Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), dessen genaue Funktion noch nicht endgültig geklärt ist.¹¹⁷ Dieses 46/50 kDa große Phosphoprotein besitzt insgesamt drei Phosphorylierungsstellen, cGK-I phosphoryliert dieses Protein bevorzugt an der Aminosäure Ser-239.^{118,119} Gefunden wird VASP intrazellulär assoziiert mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts und mit sogenannten fokalen Adhäsionen, bestimmten Zell-Zell Kontakten.¹²⁰ Bei der NO-vermittelten Thrombozyteninhibition scheint VASP eine essentielle Rolle zu spielen, für die Relaxation von SMC offensichtlich nicht.¹²¹ Unabhängig davon steht VASP ganz am Ende des gesamten NO:cGMP-Signalwegs. Mit monoklonalen Antikörpern ist es seit kurzem möglich, die Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 239 nachzuweisen.¹¹⁸ Das phosphorylierte P_{ser239}-VASP stellt einen funktionellen Marker der Aktivität des gesamten NO:cGMP-Signalwegs dar, wie erst kürzlich in Kaninchenaorta gezeigt werden konnte: Der Gehalt an P_{ser239}-VASP in der Aortenwand ließ sich durch NO-Donoren wie SNP und durch cGMP-Analoga erhöhen. Inhibitoren der NOS (L-NAME), sGC (ODQ) und cGK-I führten zu einem Absinken der Spiegel. Durch Entfernung des Endothel, also der natürlichen NO-Quelle sank, in Abwesenheit anderer Stimulatoren, der P_{ser239}-VASP Gehalt unter die Nachweisgrenze.¹²²

1.3.8 Vasoprotektive Eigenschaften des NO:cGMP-Signalwegs

NO selbst und der gesamte NO:cGMP-Signalweg haben eine Vielzahl von vasoprotektiven, antiatherogenen Wirkungen: cGMP-vermittelt wird die Aggregation von Thrombozyten, nach der "Response-to-Injury"-Theorie der erste Schritt der Atherogenese, wirkungsvoll inhibiert^{123,124}. Auch die chemotaktische Attraktion sowie endotheliale Anheftung und Immigration von Leukozyten, die über Zytokine die Entzündungsreaktion auslösen und unterhalten, wird durch NO vermindert.^{125,126} Expression von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 wird vermindert.¹²⁷

Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen, essentiell für die Ausbildung der Neointima, wird durch NO inhibiert.^{128,129,130,131,132} Mediiert wird dies durch ein NO-vermitteltes Festsetzen der SMC in der G₀/G₁-Ruhephase des Zellzyklus. Zumindest teilweise scheint dies ein Autoregulationsmechanismus der glatten Muskelzellen zu sein: Glatte Muskelzellen selbst exprimieren nach Endothelschädigung vermehrt NOS-II.¹³³ Schließlich konnte auch ein endothelprotektiver Effekt von NO nachgewiesen werden: Nach Endothelschädigung stimuliert NO Proliferation und Migration von Endothelzellen,^{134,135} Apoptose wird hingegen unterdrückt.^{136,137}

1.3.9 Pathophysiologische Veränderungen in der Atherosklerose

Schon seit den achtziger Jahren ist bekannt, daß in der Atherosklerose das Lumen der befallenen Gefäße nicht nur durch die mechanische Obstruktion durch Plaques und Thromben verkleinert wird. Zusätzlich zeichnen sich diese Gefäße durch eine verstärkte Vasokonstriktion bzw. verminderte Reaktion auf Vasodilatoren aus. In Tiermodellen kann Atherosklerose durch Cholesterin-angereichertes Futter herbeigeführt werden. Aortenringe dieser Tiere reagieren schon nach einigen Wochen Cholesterin-Fütterung vermindert auf Azetylcholin.^{4,138,139} Interessanterweise ist die Reaktion auf Nitrate und NO-Donoren zunächst noch erhalten, und histologisch sind häufig noch keine oder nur minimale Veränderungen zu sehen. Die Fehlfunktion liegt also offensichtlich zunächst

v.a. im Endothel. Erst nach mehrmonatiger Cholesterineinnahme war auch eine nachlassende Dilatation auf Nitrate zu verzeichnen und es fand sich eine pathologisch vermehrte Kontraktion auf Serotonin und eine Reihe weiterer Substanzen.^{139,140} Ähnliche vaskuläre Fehlfunktionen konnten auch am Menschen gefunden werden.¹⁴¹

Die pathophysiologische Grundlage der Dysfunktion der Endothelzellen beginnt schon oberhalb der Produktion von NO. In den letzten Jahren wurden vermehrt funktionelle Veränderungen der Rezeptoren von Azetylcholin und anderer endothelabhängiger Vasodilatoren beschrieben. Die G-Proteine der Rezeptoren werden durch oxidiertes LDL, Lysophosphatidylcholin und andere, durch die Entzündungsreaktion oxidativ geschädigte Stoffe beeinflusst bzw. die Expression verändert.^{142,143,144}

Die Expression und Aktivität der NO-Synthasen wird je nach Stadium in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Zytokine und Wachstumsfaktoren führen zu einer vermehrten Expression von NOS-II in Leukozyten, SMC und Endothelzellen, möglicherweise als temporärer Kompensationsmechanismus.^{145,146,147,148} Der Einfluß auf die konstitutionellen Isoformen ist nicht eindeutig geklärt.^{8,9,149,150,151}

Durch die Entzündungsreaktion ist die Produktion von Superoxiden und anderen Radikalen stark erhöht, was zu einem verstärkten Abbau von NO führt.^{71,72,73,152,153} Expression von vasoprotektiver EC-SOD ist verringert.¹⁵⁴ Der Spiegel an toxischem Peroxynitrit ist dadurch erhöht, nachweisbar durch erhöhte Tyrosinnitrierung.¹⁵⁵

Von den Enzymen unterhalb von NO ist bekannt, daß die Aktivität der sGC im Kaninchenmodell mit einem Cholesterin-Fütterungszeitraum von 4 Monaten bereits verringert ist.¹⁵⁶ Die Veränderung wird möglicherweise durch oxidiertes LDL, das in großen Mengen in atherosklerotischen Plaques vorkommt, mediiert.¹⁵⁷ Bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) wurde, vor allem bei alten Tieren, verminderte Expression von sGC α_1 und β_1 beschrieben, auf mRNA- und auf Proteinebene.^{158,159} Eine neue

Studien beschreibt sogar den kompletten Verlust der β -Untereinheit in SMC von alten Ratten.¹⁶⁰

Auch die mRNA des cGMP-Rezeptors cGK-I ist in spontan hypertensiven Ratten reduziert,^{158,159} was pathophysiologisch eine wichtige Rolle spielt: Gefäße von cGK-I-defizienten Mäusen zeigen keine Reaktion mehr auf NO und Nitrate.¹⁰⁹ Einzig die Phosphodiesteraseaktivität ist in atherosklerotischen Gefäßen reduziert, möglicherweise als physiologischer Kompensationsmechanismus.¹⁶¹

Somit beschränkt sich die Dysfunktion der NO-vermittelten Vasorelaxation in Atherosklerose nicht auf den NO-abhängigen Teil des Signalwegs. Weitergehende Zusammenhänge der Pathogenese im zweiten Teil des Signalwegs sind jedoch noch unzureichend geklärt.

2. Fragestellung:

Die Wichtigkeit der genauen Kenntnis der pathophysiologischen Veränderungen im NO:cGMP-Signalweg im Verlauf der atherosklerotischen Erkrankung kann nicht oft genug betont werden. NO-Donoren wie Nitroglycerin und Nitroprussid sind seit über hundert Jahren erfolgreich im Einsatz zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit, der Wirkmechanismus ist erst seit kurzem verstanden. Neue Pharmaka, die auch Enzyme unterhalb der NO-Produktion beeinflussen können, Phosphodiesteraseinhibitoren, direkte sGC-Stimulanzen und Stoffe die die cGK-I-Aktivität modifizieren können sind in Entwicklung oder in klinischen Tests.¹⁶²

Hingegen beschränken sich die meisten vorhandenen Forschungsergebnisse über den NO:cGMP-Signalweg in Atherosklerose weitgehend auf den endothelabhängigen Teil des Signalwegs, also die Rezeptoren, G-Proteine, die NO-Synthasen sowie den Abbau durch Superoxide. Über den endothelunabhängigen Teil unterhalb von NO ist nur wenig bekannt, die Ergebnisse sind teils widersprüchlich.

In dieser Arbeit soll daher insbesondere auf die Enzyme unterhalb von NO eingegangen werden. Zum Zwecke der Vergleichbarkeit mit anderen Studien wurde jedoch noch einmal NO-Produktion und O_2^- Abbau in die Studie mitaufgenommen.

Im einzelnen sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Wie ändert sich die Aktivität der Ca^{++} -abhängigen und -unabhängigen NO-Synthasen?
2. Ist die Expression der Cu/Zn-Superoxiddismutase verändert?
3. Ist die Nitrierung von Tyrosinresten erwartungsgemäß erhöht?
4. Ist die Expression und Aktivität der löslichen Guanylatzyklase erniedrigt?
5. In welcher Wandschicht ist die Aktivität der sGC erniedrigt?
6. Wie verhält sich die Expression der cGK-I und in welchen Wandschichten ist sie besonders vorhanden?
7. Inwiefern ist die Phosphorylierung des Endpunkt-Markers VASP verändert?

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Pharmaka, Reagenzien und Versuchstiere

die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Pharmaka waren von der höchsten verfügbaren analytischen Reinheit und wurden von den folgenden Herstellern bezogen:

Substanz	Bezugsquelle
(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin	Dr. Schircks Laboratories (Jona, Schweiz)
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie (Deisenhofen)
ACL Chemilumineszenz Kit	Amersham (Braunschweig)
Acrylamid (30%), Bisacrylamid (0,8%)	Roth (Karlsruhe)
Aceton	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Aprotinin	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Sigma Chemie (Deisenhofen)
BSA	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Calmodulin	Sigma Chemie (Deisenhofen)
cGMP	Sigma Chemie (Deisenhofen)
cGMP Direct Correlate EIA-Kit	Biotrend (Köln)
CHAPSO	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Citifluor	Agar Scientific (Essex, UK)
Coomassie Brilliant Blue	Sigma Chemie (Deisenhofen)
(Cu/Zn)-SOD, bovin	Sigma Chemie (Deisenhofen)
DTT	Sigma Chemie (Deisenhofen)
EDTA	Sigma Chemie (Deisenhofen)
EGTA	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Epoxy-aktivierte Sepharose	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Eriochrome Black (CI 14645)	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Ethanol (96%)	Sigma Chemie (Deisenhofen)

Substanz	Bezugsquelle
Ethanolamin	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Flavin-Adenin-Dinukleotid	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Flavin-Mononukleotid	Fluka (Buchs, Schweiz)
Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Biomol (Hamburg)
Glutathion, reduzierte Form	Boehringer Mannheim (Mannheim)
GTP	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Guanidiniumchlorid	Sigma Chemie (Deisenhofen)
IBMX	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Imidazol	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Kreatinkinase	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Kreatinphosphat	Sigma Chemie (Deisenhofen)
L-[2,3,4,5- ³ H]-Arginin	Amersham (Braunschweig)
L-Arginin	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Leupeptin	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Methanol	AppliChem (Darmstadt)
Molekulargewichtsstandard	Biorad (München)
NADPH	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natronlauge (1 mol L ⁻¹)	Sigma Chemie (Deisenhofen)
3-Nitrotyrosin	Sigma Chemie (Deisenhofen)
NP-40	Sigma Chemie (Deisenhofen)
OCT-Compund	Ames, Miles Laboratories (Elkart, U.S.A.)
Pepstatin	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Phosphorsäure (85%)	Sigma Chemie (Deisenhofen)
PMSF	Sigma Chemie (Deisenhofen)

Substanz	Bezugsquelle
Ponceau S Färbelösung	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Protein-A-Sepharose	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Rotiscint	Roth (Karlsruhe)
SDS	Sigma Chemie (Deisenhofen)
SNP	Sigma Chemie (Deisenhofen)
TEA	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma Chemie (Deisenhofen)
Trockenmilch, fettfrei	Nestlé (Solon, U.S.A.)
Tween 20	Serva (Heidelberg)

Wasser:

Wasser wurde deionisiert auf eine Leitfähigkeit von $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ (Milli-Q, Millipore, Eschborn), dieses wird im folgenden Aqua dest. genannt.

Antikörper für den Western Blot wurden von folgenden Quellen bezogen und im Western Blot in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

Antikörper (Anti-)	Typ	Bezugsquelle	Verdünnung
sGC α_1 (SA 3093)	polyklonal	selbst	1:2000
sGC β_1 (SA 2934)	polyklonal	selbst	1:1000
Cu/Zn SOD	polyklonal	Calbiochem (Bad Soden)	1:750
Nitrotyrosin	polyklonal	L. Otto Uttenthal, Madrid, Spanien	1:5000
Nitrotyrosin	monoklonal	Joseph Beckman, Birmingham, Alabama, U.S.A.	1:4000
cGK-I	polyklonal	Suzanne Lohmann, Würzburg	1:4000
P _{Ser239} -VASP	monoklonal	Ulrich Walter, Würzburg	1:2000
Kaninchen (HRP)	polyklonal	Amersham (Freiburg)	1:2000
Maus (HRP)	polyklonal	Amersham (Freiburg)	1:2000
Schaf (HRP)	polyklonal	Sigma (Deisenhofen)	1:1000

Versuchstiere

Die Kaninchen (männliche White New Zealand, 8 Wochen alt) wurden von Charles River (Frankreich) bezogen, Kaninchenfutter (Aliment pour lapin extralbo C15, teils mit Zusatz von 0,3% Cholesterin) von L. Pietrement Ets (Provins, Frankreich). Die Tiere wurden im Institut de Recherche Servier, Suresnes, Frankreich nach den geltenden Tierschutzauflagen gehalten.

3.2 Puffer und Lösungen

Antikörper-Affinitätsreinigung

Kopplungs-Puffer	NaHCO ₃ , pH 9,0	0,1 mol/L
	NaCl	0,5 mol/L
Blocklösung	Ethanolamin	1 mol/L
Waschpuffer 1	Na-Acetat, pH 4,0	0,1 mol/L
	NaCl	0,5 mol/L
Waschpuffer 2	Tris, pH 8,5	50 mmol/L
	NaCl	1 mol/L
	NP-40	2 mL/L
Elutionslösung pH	Glycin, pH 3,0	0,1 mol/L
Elutionslösung Gua	Guanidiniumchlorid	4 mol/L

Kaninchengewebehomogenisation

Marletta Puffer	TEA, pH 7,8	25 mmol/L
	EDTA	1 mmol/L
	DTT	5 mmol/L
	Leupeptin	1 µmol/L
	Trypsin Inhibitor	0,5 mg/L

Proteinbestimmung (nach Bradford)

Bradford-Reagenz	Ethanol (96%)	47 mL/L
	H ₃ PO ₄ (85%)	85 ml/L
	Coomassie Brilliant Blue G-250	0.1 g/L

Die Lösung wurde gefiltert und lichtgeschützt aufbewahrt

Immunhistofärbung

PBS	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	10 mmol/L
	NaCl	150 mmol/L

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurde zum Blocken 40g/L Rinderserumalbumin in PBS verwendet.

Citrullin-Assay

Assaypuffer 1	TEA, pH 7,5	50 mmol/L
	Calmodulin	1 mmol/L
	CHAPSO	250 µmol/L
	FAD	5 µmol/L
	FMN	5 µmol/L
	NADPH	1mmol/L
	Glutathion	7 mmol/L
	L-Arginin	5 µmol/L
	H ₄ Bip	10 µmol/L
je nach Versuch:	CaCl ₂	1 mmol/L
oder:	EGTA	5 mmol/L

Stoppuffer	Natriumacetat, pH 5,5	25 mmol/L
	EDTA	2 mmol/L

SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese und Western Blot

3 x Lämmli-Probenpuffer	Tris, pH 6,8	200 mmol/L
	SDS	60 g/L
	Glyzerin	240mL/L
	2-Mercaptoethanol	90mL/L
	Bromphenolblau	250 mg/L
4 x Trenngel Puffer	Tris, pH 8,8	1,5 mol/L
	SDS	4 g/L
4 x Sammelgel Puffer	Tris, pH 6,8	0,5 mol/L
	SDS	4 g/L
10 x Laufpuffer	Tris	250 mmol/L
	Glycin	2 mol/L
	SDS	10 g/L
Transfer Puffer	Tris	48,5 mmol/L
	Glycin	39 mmol/L
	SDS	1,3 mmol/L
	Methanol	200 mL/L
TBS	Tris, pH 7,5	20 mmol/L
	NaCl	200 mmol/L

TBST	Tris, pH 7,5	20 mmol/L
	NaCl	200 mmol/L
	Tween 20	0,5 mL/L
Block-Lösung	Fettfreie Trockenmilch	30 g/L in TBST

sGC Aktivitätsassay

Assaypuffer 2	TEA, pH 7,4	50 mmol/L
	IBMX	1 mmol/L
	MgCl ₂	3 mmol/L
	GTP	0,5 mmol/L
	DTT	3 mmol/L
	Kreatin-Phosphat	5 mmol/L
	Kreatin-Kinase	0,25 g/L

Phosphodiesterase Aktivitätsassay

Assaypuffer 3	Tris, pH 7,5	20 mmol/L
	Imidazol	20 mmol/L
	MgCl ₂	3 mmol/L
	Mg-Acetat	15 mmol/L
	Calmodulin	0,25 µmol/L
	CaCl ₂	0,25 µmol/L

3.3 Geräte und Software

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	BP 61	Sartorius (Göttingen)
Beta-Szintillationszähler	Tri-Carb 2500 TR	Canberra-Packard (Frankfurt/Main)
Computer	Macintosh Performa 450, Power PC 6100/66, Power PC 6030/200	Apple Computer Inc. (Cupertino, U.S.A.)
Chromatographiesäulen	Poly-prep (1 x 2,5 cm)	Biorad Laboratories (München)
Diapositivfilm	Ektachrome 400 ASA	Eastman Kodak (Rochester, U.S.A.)
Durchlichtscanner	PowerLook II	Umax Data Systems Inc. (Tsinchu, Taiwan)
Elektroblotter	Graphit Elektoblotter Milli-Blot	Millipore (Eschborn)
Feinwaage	sBA 52	Scaltec (Heiligenstadt)
Filterpapier	Whatman Paper	3M Inc. (Neuss)
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM IRB (50 W HBO Lampe)	Leica (Wetzlar)
Gelkammern	Mini Protean II	Millipore (Eschborn)
Homogenisator	Glass-Glass-Potter	Braun (Melsungen)
Horizontalschüttler	Doumax 1030	Heidolph (München)
Kamera	Leitz Wild MPS 45/62	Leica (Wetzlar)
Netzgerät	Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Nitrozellulosemembran	Hybond ECL	Amersham (Braunschweig)
Objektträger	Silanized Slides	Dako (Glostrup, Dänemark)
pH-Meter	Accumet Basic pH-Meter	Fisher Scientific (Ingolstadt)

Gerät	Typ	Hersteller
Photometer (Plate Reader)	SpektraMax 340	Molecular Devices (Menlo Park, U.S.A.)
Röntgenfilme	Biomax MR-1	Eastman Kodak (Rochester, U.S.A.)
	Tri-X-Pan 400	Eastman Kodak (Rochester, U.S.A.)
Rührwerk	RW 20	Janke & Kunkel (Staufen)
Schüttler	Reax 2000	Heidolph (München)
Thermomixer	Eppendorf 5436	Netheler-Hinz (Hamburg)
Zentrifugen	Hettich EBA 12	Hettich (Tuttlingen)
	Hettich Universal 16R	Hettich (Tuttlingen)
	Hettich Rotanda	Hettich (Tuttlingen)

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 3.0	Adobe Systems Inc. (San José, U.S.A.)
Claris Draw 1.0 v 2	Claris Corp. (Santa Clara, U.S.A.)
Cricket Graph 1.3.2	Cricket Software (Malvern, U.S.A.)
Mac Operating System 7.5.1	Apple Computer Inc. (Cupertino, U.S.A.)
Microsoft Excel 5.0	Microsoft Corp. (Redmond, U.S.A.)
Microsoft Windows 95	Microsoft Corp. (Redmond, U.S.A.)
Microsoft Word 7.0	Microsoft Corp. (Redmond, U.S.A.)
NIH-Image 1.55	National Institutes of Health (Bethesda, U.S.A.)
Prism Graph Pad 1.0.3	Graph Pad Software (San Diego, U.S.A.)

3.4 Herstellung polyklonaler sGC Antikörper

Die polyklonalen Antiseren gegen die sGC-Untereinheiten α_1 und β_1 wurden von der Firma Eurogentec (Liège, Belgien) produziert. Die Kaninchen (jeweils zwei pro Untereinheit) wurden wiederholt mit synthetischen Peptiden (ebenfalls von Eurogentec synthetisiert) immunisiert, die C-terminalen Aminosäuresequenzen der jeweiligen Untereinheit entsprechen. Nachdem Präimmun-Serum zur Kontrolle abgenommen worden war, wurden die Peptide zur Steigerung der Immunogenität über einen weiteren Cystein-Rest an Keyhole-Limpet-Hämozyanin gekoppelt und zusammen mit komplettem Freund'schen Adjuvans injiziert. Die Aminosäure-Sequenzen der Peptide waren: α_1 : Phe-Tyr-Pro-Arg-Ser-Arg-Glu-Glu-Leu-Pro-Pro-Asn-Phe-Pro, Aminosäuren 634-647; β_1 : Lys-Gly-Lys-Lys-Glu-Pro-Met-Gln-Val-Trp-Phe-Leu-Ser-Arg-Lys-Asn-Thr-Gly-Thr-Glu-Glu-Thr, Aminosäuren 593-614.

Nach zweimaliger Abnahme von Serum (erste und zweite Blutung) und gleichzeitiger Booster-Immunsierung wurde ein drittes Mal Serum entnommen (letzte Blutung) und die Tiere getötet. Nach qualitativer Bestimmung des Antikörpergehalts der unterschiedlichen Blutungen durch SDS-Gelelektrophorese wurden die Seren auf Spezifität und Sensitivität im Western-Blot getestet. Als Antigene wurden Homogenate von Rattenlunge, -Großhirn und -Kleinhirn verwandt, sowie als Positivkontrolle die jeweilige in Sf9-Zellen exprimierte komplette Untereinheit (α_1 oder β_1). Leider stellte sich heraus, daß die Spezifität der Seren nicht ausreichend war, und der starke Hintergrund sich nicht durch Modifikation der Puffer-, Antikörper- oder Trockenmilchkonzentrationen oder der Inkubationszeiten unterdrücken ließ.

Die letzten Blutungen der Seren wurden daher durch Affinitätsreinigung von den offensichtlich in größeren Mengen enthaltenen, unspezifischen Antikörpern befreit. Dazu wurden 10 mg des jeweiligen Peptids der Untereinheit (s.o.) in 3 mL Kopplungspuffer mit je 1 mg epoxyaktivierter Sepharose über Nacht im Schüttler inkubiert, und am nächsten Tag die gequollene Sepharose in Econo-Pak Chromatographiesäulen gefüllt. Ungekoppeltes Peptid wurde durch dreimaliges

Waschen mit 10 mL Kopplungspuffer eluiert. Unspezifische Bindungsstellen an der Sepharose wurden mit 10 mL Blocklösung bei 45°C abgesättigt (Inkubationszeit 6 Stunden). Nach zweimaligem Waschen mit 10 mL Waschpuffer 1 und viermaligem Waschen mit 10 mL Kopplungspuffer, waren die Säulen fertig zur Affinitätsreinigung. Die Säulen wurden am nächsten Tag dreimal mit 10 mL Waschpuffer 2 äquilibriert und anschließend mit 20 mL des Serums beladen. Der Durchlauf wurde noch ein zweites Mal auf die Säule geladen, um eine möglichst vollständige Bindung der spezifischen Antikörper zu gewährleisten. Unspezifische Antikörper wurden jetzt durch fünfmaliges Waschen mit je 5 mL Waschpuffer 2 eluiert. Die spezifisch an das Antigen gebundenen Antikörper wurden fraktioniert mit 4 x 2 mL des wenig stringenten Elutionspuffer pH und anschließend mit 4 x 2 mL der hochstringenten 4 M Guanidiniumchloridlösung eluiert. Nach dialysieren gegen 2L TBS über Nacht bei 4°C waren die Antikörperlösungen gebrauchsbereit.⁸⁶ Sensitivität und Spezifität wurden im Western-Blot geprüft (vgl. 4.1, Seite 41, sowie Abb. 5).

3.5 Haltung der Kaninchen

Eine Gruppe von Kaninchen (n = 9) erhielt ab dem Alter von 8 Wochen eine synthetische Nahrung, der 0,3% ± 0,02% Cholesterin zugesetzt war. Unter ansonsten identischen Bedingungen wurden Kontroll-Kaninchen (n = 7) gehalten, die das gleiche Futter ohne Cholesterin erhielten. Das Futter enthielt in beiden Fällen 3,2% Triglyzeride, die Tiere erhielten jeweils 200 g Futter pro Tag.^{5,140,148}

3.6 Herstellung der Aortenhomogenate

Nach 50 Wochen wurden die Kaninchen mit einer letalen Dosis Pentobarbital (30 mg/kg Körpergewicht) getötet, und Blutproben zur Bestimmung von Triglyzeriden, HDL und LDL entnommen. Schnell wurde der Brustkorb eröffnet und ein 1,2 cm langes Stück der thorakalen Aorta entnommen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis

durchgeführt. Das Aortenstück wurde vorsichtig von anhängenden Fett- und Bindegewebe gesäubert. Das Stück wurde naß gewogen und in zwei 0,6 cm lange Stücke zerteilt, um einmal Gesamthomogenat zu erhalten und einmal die einzelnen Gefäßschichten.

Für das Gesamthomogenat wurde das Stückchen in einem Glas-Glas Potter Homogenisator mit 1 mL Homogenisationspuffer (Marletta-Puffer) homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann bei 10000 g bei 4°C 30 min lang in Pellet und Überstand getrennt, anschließend beides in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Das übrige Stück wurde vorsichtig in Adventitia, Media und Neointima (letztere ist nur in den atherosklerotischen Gefäßen vorhanden) disseziert, jede Schicht für sich wie oben beschrieben homogenisiert, gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.7 Clearing der Aortenhomogenate von Kaninchenimmunglobulinen

Die Aortenhomogenate enthalten bedeutende Konzentrationen an Kaninchen-Immunglobulinen, Homogenate von atherosklerotischen Gefäßen, aufgrund des entzündlichen Charakters der Erkrankung, sogar sehr hohe Konzentrationen. Diese Kaninchen Igs stören sowohl Western-Blots, die mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern durchgeführt werden, als auch Enzym-Immunoassays, die ebenfalls mit Kaninchen Igs arbeiten. Um die Konzentration von störenden Antikörpern in den Homogenaten zu senken, wurden die Proben einem Clearing mit Protein-A-Sepharose unterzogen. Dazu wurde jeweils 50 µL der Probe mit 50 µL in TBS aufgeschwemmter Protein-A-Sepharose vermischt und eine Stunde auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose durch zentrifugieren für 2 min bei 500 rpm abgetrennt und der Überstand vorsichtig abgenommen. Der Prozeß wurde einmal wiederholt, und der Ig-Gehalt im Western Blot qualitativ bestimmt, wobei nur der Zweit-(anti-Kaninchen-Ig)-Antikörper verwendet wurde. Die Konzentration von

Kaninchen Igs ließ sich so in den Kontrollproben unter die Nachweisgrenze drücken, und in den HC-Homogenaten auf eine Konzentration, die eine Western-Blot Analyse mit polyklonalen Kaninchenantikörpern zuließ.

3.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen in den nicht denaturierten Proben wurde nach der für Mikrotiterplatten adaptierten Methode nach Bradford gemessen. Die Homogenate wurden in 1 mol/L NaOH solubilisiert. Je nach zu erwartender Proteinkonzentration wurden die Proben nochmal entsprechend in NaOH verdünnt und davon jeweils 50 µL in Triplikaten auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Standards aus gereinigtem Rinderserumalbumin, ebenfalls in NaOH, wurden in den Konzentrationen 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, und 160 mg/L eingesetzt. Nach Zugabe von 200 µL Bradford-Lösung in jedes Well wurde die Absorption nach 10 min im Platereader-Fotometer gelesen. Gegen die BSA-Standardkurve konnte dann nach Multiplikation mit dem Versünnungsfaktor die Proteinkonzentrationen in mg/L ausgelesen werden.

3.9 Immunhistochemie

Für die histologische Aufarbeitung wurde einigen Kaninchen ein weiteres 1 cm langes Stück der thorakalen Aorta entnommen und gesäubert von anhaftenden Fett und Bindegewebe. Ein kleines Stück (0,3 cm) wurde für die Standard-Färbungen (HE und Orcein) nach schrittweiser Entwässerung in Paraffin eingebettet; Mikrotomschnitte von 5 µm wurden gemacht und anschließend nach Protokoll gefärbt. Der Rest wurde in OCD Compound eingebettet, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Aus diesen Proben wurde für die Immunhistofärbung frisch 7 µm dicke Kryotomschnitte angefertigt, auf silanisierte Objektträger aufgebracht, und 30 min luftgetrocknet. Die Schnitte wurden anschließend durch Eintauchen in Aceton für 15 min fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Blocken für 10 min mit 4% BSA Lösung

in PBS abgesättigt. Von zwei aneinanderliegenden Schnitten wurde der erste mit dem primären Antikörper in 0,5% BSA in PBS für zwei Stunden inkubiert. Der andere wurde als Negativkontrolle verwendet, und ohne Antikörper nur mit 0,5% BSA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit 0,5% BSA in PBS mit 0,2% Tween 20 fünf Minuten lang gewaschen. Mit dem entsprechenden biotinylierten Zweitantikörper, verdünnt in 0,5% BSA in PBS, wurde eine Stunde lang inkubiert, und ein weiterer Waschschrift, wie oben, durchgeführt. Nach Inkubation für eine Stunde mit FITC-konjugiertem Streptavidin und drei weiteren Waschschriften, wurden die Schnitte mit einer 3 g/L Lösung von Eriochrome Black in PBS gefärbt, um störende Autofluoreszenz zu eliminieren. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in Citifluor getaucht, sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und zur Archivierung auf Diapositivfilm fotografiert.

3.10 NOS Aktivitätsassay (Citrullin-Assay)

Der Citrullin-Assay bestimmt die Aktivität der NO-Synthasen durch Messung des Reaktionsproduktes L-Citrullin, das bei der Reaktion aus L-Arginin entsteht. Hierzu wird dem Inkubationsansatz eine geringe Menge radioaktiv markiertes L-Arginin zugesetzt, das dann, proportional zur gesamten enzymatischen Aktivität von NOS, zu radioaktivem L-Citrullin umgesetzt wird, welches szintillationsspektrometrisch bestimmt wird.

Dazu wurden 10 µL Gesamthomogenat 15 min lang bei 37°C mit Assaypuffer in einem Gesamtvolumen von 100µL inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7,4 kBq radioaktivem L-[2,3,4,5-³H]-Arginin-HCl gestartet, bis zu diesem Zeitpunkt wurde der Ansatz auf Eis gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 900 µl Stoppuffer bei 4°C abgestoppt. Das aus L-Arginin gebildete L-Citrullin wurde aus dem restlichen Reaktionsgemisch durch Ionenaustausch-Chromatographie abgetrennt. Hierzu wurde eine Kationentauscher-Säule verwendet, die zuvor mit 2 mL Stoppuffer equilibriert worden war. Sowohl der Säulendurchlauf als auch 2 ml

wässriges Eluat wurden vereinigt und mit 9 ml Szintillatorflüssigkeit (Rotiscint) versetzt. Der Gehalt an [³H]-L-Citrullin wurde über dessen β-Strahlung durch Flüssigszintillationszählung in einem Betacounter gemessen. Aus den so ermittelten Counts konnte dann, bei bekanntem Verhältnis [³H]-L-Arginin/L-Arginin sowie bekannter Enzymmenge und Inkubationszeit die spezifische Aktivität der jeweiligen Probe in pmol L-Citrullin/mg NOS/min errechnet werden. Die Hintergrundstrahlung und der Leerwert wurden in Abwesenheit von Enzym, aber Anwesenheit aller anderen Assaykomponenten bestimmt und von den gemessenen Werten subtrahiert. Soweit nicht anders angegeben, repräsentieren die angegebenen Werte Mittelwerte ± Standardfehler.

3.11 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden nach der Methode von Laemmli 10%ige bzw 12%ige Polyacrylamid-Gele verwendet, die zwischen zwei Glasplatten gegossen wurden. Dazu wurden 333 mL/L bzw. 400 mL/L der Acrylamid/Bisacrylamid Lösung mit 250 mL/L 4 x Laufgelpuffer in Aqua dest. verdünnt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 14 mL/L APS-Lösung (100 g/L) und 1,4 mL/L TEMED gestartet, die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen und mit Aqua dest. überschichtet. Als 4%iges Sammelgel wurde nach abgeschlossener Polymerisation folgende Lösung aufgetragen und ein Kamm eingesteckt: 113 mL/L Acrylamid/Bisacrylamid und 250 mL/L 4 x Sammelgelpuffer, ebenfalls gestartet mit APS und TEMED. Die Gele wurden in die Gelhalter eingebaut, der Tank mit Laufpuffer (aus 10 x Laufpuffer verdünnt) gefüllt, und die Geltaschen mit einer entsprechenden Proteinmenge (solubilisiert bei 70°C, 10 min in 3 x Laemmli-Probenpuffer), bzw. Positivkontrolle oder Molekulargewichtsstandard geladen. Zur Konzentrierung der Proteine im Sammelgel wurde zunächst bei 80 V Spannung gelaufen, nach Eintritt der Lauffront ins Trenngel wurde die Spannung auf 120 V gesteigert. Die Elektrophorese wurde mit Erreichen des Gelendes durch die Lauffront beendet.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine zur immunologischen Detektion (Western Blot) im Semi-Dry Elektrobplot-Verfahren auf Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das Gel auf die zugeschnittene Nitrozellulose aufgebracht und zwischen je drei in Blotpuffer getränkten Filterpapieren luftblasenfrei auf dem Elektrobplotter plaziert, wobei das Gel kathodenseitig, die Nitrozellulose anodenseitig zu liegen kam. Durch die angelegte geregelte Stromstärke von $1,1 \text{ mA/cm}^2$ wurden die durch das SDS negativ geladenen Proteine in 60 min fast vollständig auf die Nitrozellulose übertragen. Zum Prüfen der gleichen Proteinbeladung der Banden und zum Sichtbarmachen des Molekulargewichtsstandards wurden die Membranen mit Ponceau S Lösung gefärbt, und mit Aqua dest. soweit entfärbt, daß die Banden gut sichtbar wurden. Die Membranen wurden auf Frischhaltefolie gelegt und zur Dokumentation fotokopiert, die Molekulargewichtsstandards angezeichnet. Anschließend wurden die Membranen mit TBST vollständig entfärbt.

Um unspezifische Antikörperbindung auf der Nitrozellulose zu blocken, wurden die Membranen 60 min in 3% Trockenmilch in TBST inkubiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte ebenfalls in einer Lösung von 3% Trockenmilch in TBST über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Am nächsten Morgen wurden die Membranen dreimal 10 min mit TBST gewaschen und eine Stunde mit dem Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper in Trockenmilchlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneut dreimal 10 min Waschen. Die Nitrozellulose wurde mit der Lösung des ECL (enhanced Chemiluminescence) Kit für eine Minute überschichtet, in Frischhaltefolie eingeschlagen und auf aufgelegte Röntgenfilme belichtet. Die Belichtungszeiten waren, abhängig von der Stärke des Signals, zwischen einer Minute und 24 Stunden.

Nach Entwicklung und Trocknung der Filme wurden die Banden der Molekulargewichtsstandards zum Vergleich mit den Signalbanden auf den Film übertragen. Zur Quantifizierung wurden die Filme mit einem Durchlichtscanner bei einer Auflösung von 300 dpi gescanned, und mit dem Computerprogramm NIH-Image in relative Optische Dichte-Werte (Arbitrary Units, AU \pm Standardfehler) umgerechnet.

3.12 sGC-Aktivitätsassay

Die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase wurde bestimmt, indem 10 µL der Überstand-Fraktion der Proben (Gesamthomogenat oder Tunicas) mit 90 µL Assaypuffer 2 auf Eis gemischt wurden. Die Reaktion wurde gestartet, indem die Reaktionsgefäße auf 37°C gebracht wurden und entweder 100 µmol/L SNP (in 1 mmol/L Na-Acetat-Puffer, pH 5,0) zur Ermittlung der voll stimulierten Aktivität, oder Na-Acetat-Puffer alleine, zur Messung der Basalaktivität zugegeben wurden. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 95°C gestoppt. Der Gehalt an gebildetem cGMP wurde quantitativ durch einen kommerziellen Direct Correlate Enzyme Immunoassay auf Mikrotiterplatten gegen bekannte cGMP Standards (0,2; 0,8; 4; 20; 100; 500 pmol/mL) gemäß der Anleitung des Herstellers bestimmt. Die optische Dichte des gebildeten Farbstoffs wurde im Fotometer bestimmt, und ist umgekehrt proportional zum vorhandenen cGMP. Anhand der Standardkurve konnte das gebildete cGMP in pmol errechnet werden und, da der Proteingehalt der eingesetzten Proben bekannt war, die Aktivität in pmol (gebildeten) cGMP/mg Protein/min \pm Standardfehler angegeben werden.

3.13 Phosphodiesterase Assay

Der PDE-Assay entspricht der Umkehrung des sGC-Assays. 10 µL Probe wurden mit 90 µL Assaypuffer 3 gemischt und bei 37°C inkubiert. Das als Substrat eingesetzte cGMP wird durch die (diesmal nicht durch IBMX inhibierten) Phosphodiesterasen in Abhängigkeit von deren Aktivität abgebaut. Aliquots wurden bei 0, 2,5, 5 und 10 min entnommen und 10 min bei 95°C deaktiviert. Das verbliebene cGMP wurde dann, wie im sGC-Assay beschrieben, im EIA bestimmt. Die Aktivität ist in pmol (abgebauten) cGMP/mg Protein/min \pm Standardfehler angegeben.

3.14 Statistik

Sofern nicht anders gekennzeichnet, sind die Ergebnisse in Mittelwert \pm Standardfehler [SEM; wobei SEM = Standardabweichung / $\sqrt{(n-1)}$] angegeben. Datenberechnung und Auswertung erfolgte größtenteils mit dem Computer unter Benutzung von Microsoft Excel. Statistische Signifikanz wurde, je nach Fragestellung, mit dem ein- oder dem zweiseitigen Student's t-Test bestimmt, wobei ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde.

4. Ergebnisse

4.1 Test der affinitätsgereinigten Antiseren auf Spezifität und Sensitivität

Nach der Affinitätsreinigung wurden die Antiseren gegen lösliche Guanylatzyklase im Western Blot gegen Rattengewebe bzw., als Positivkontrolle, gegen in Sf9-Zellen exprimierte sGC α_1 bzw. β_1 Untereinheit getestet. Ein repräsentativer Blot mit den 2., 3. und 4. Guanidium-Fractionen der sGC α_1 Antikörper ist in Abb. 5 dargestellt. Als Gewebeextrakte wurden je 20 μg Rattenkortex (Spur 2), Rattenkleinhirn (Spur 3) und Rattenlunge (Spur 4) aufgetragen. In der Spur eins wurde exprimierte α_1 -Untereinheit geladen. Die Hauptbande bei ca. 70 kDa erkennt in allen drei Gewebetypen die α_1 -Untereinheit. Die Spezifität dieses Signals konnte bewiesen werden, da sich das Signal durch einstündige Präinkubation des Antikörpers mit 100 $\mu\text{g/L}$ gereinigter sGC vollständig unterdrücken ließ. Die kleineren Banden zwischen 40 und 50 kDa sind wahrscheinlich der Proteolyse zuzuschreiben, und waren insbesondere im Zerebellumextrakt zu finden, in dem auch das eigentliche sGC-Signal schwächer ausgeprägt war. Während das β_1 -Serum spezifisch nur eine Bande bei 50 kDa erkannte, band das α_1 -Antiserum zusätzlich an eine höhermolekulare Bande bei ca. 160 kDa (Abb. 5). Auch dieses Signal, welches in den verschiedenen Gehirnproben und anderen Organen gefunden werden konnte, ließ sich durch Präinkubation blocken. Ob es sich dabei um nicht vollständig denaturierte sGC- α_1 Polymere handelt oder um Kreuzreaktivität mit einem anderen Protein, konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Ersten Sequenzierungsversuchen zufolge scheint es sich dabei um eine Laktatdehydrogenase zu handeln. Dieses Signal war in den Aortenhomogenaten der Kaninchen nur sehr schwach ausgeprägt und gut von der sGC-Bande zu trennen, so daß es keinen Einfluß auf die Bestimmung der sGC- α_1 Untereinheit hatte.

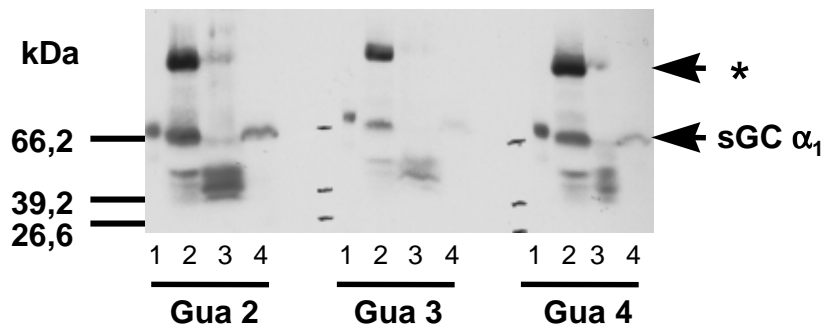


Abb. 5: Western Blot zum Test der Sensitivität der sGC-Antiseren. In diesem Fall wurde die zweite, dritte und vierte Guanidinium-Fraktion des α_1 -Antiserums gegen Großhirn (Spur 2), Zerebellum (3) und Lunge (4) der Ratte benutzt. In Spur 1 als Positivkontrolle in Zellkultur exprimierte α_1 -Untereinheit. * Höhermolekulare, kreuzreaktive Bande bei ca. 160 kDa (p160).

4.2 Serumlipidwerte und Gewicht der Kaninchen

Vor der Tötung der Kaninchen wurden Blutproben entnommen und die Tiere gewogen, um den allgemeinen Einfluß der fast einjährigen Cholesterinernährung auf Blutfettwerte und Gedeihen der Tiere zu vergleichen. Wie man dem Diagramm der Abb. 6a entnehmen kann, beeinflusste die Ernährung mit 0,2% Cholesterin weder die Serum-Triglyzerid Konzentrationen noch das High-Density-Lipoprotein, welchem vasoprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden, signifikant. Lediglich die Konzentration des (Gesamt-) Cholesterins ist mehr als sechzigfach erhöht ($0,32 \pm 0,09$ mg/L versus $19,62 \pm 1,77$ mg/L, $p < 0,001$). In Abb. 6b erkennt man, daß die hypercholesterinämischen Kaninchen ein signifikant geringeres Körpergewicht aufwiesen, im Vergleich zu den Kontrolltieren (CON: $4,66 \pm 0,13$ kg; HC: $3,90 \pm 0,11$ kg, $p < 0,001$).

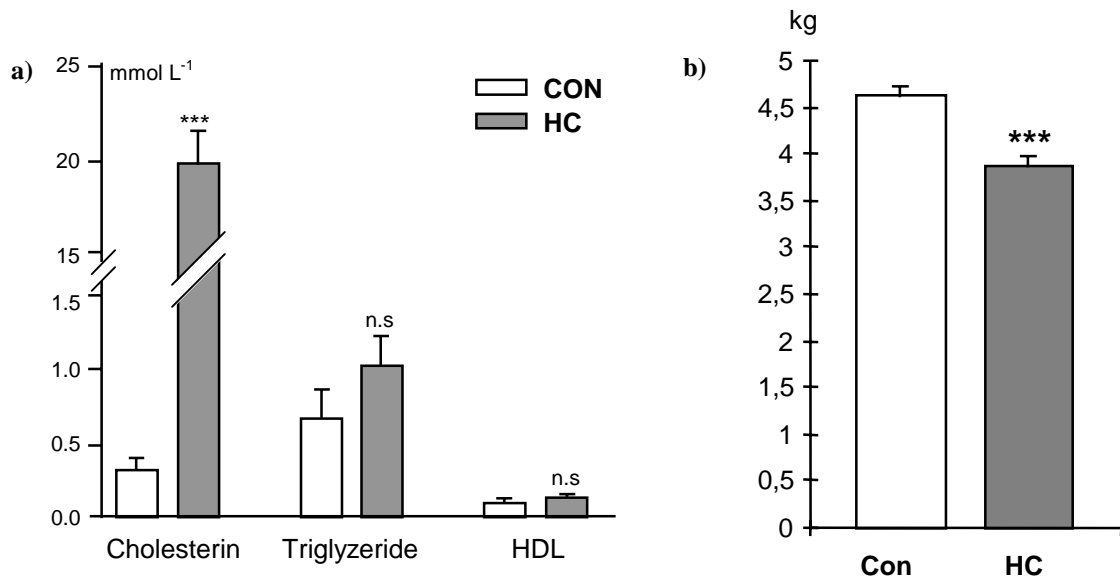


Abb. 6a: Serum-Lipidwerte der Kontroll- (CON) sowie der hypercholesterinämischen (HC) Kaninchen. Abb. 6b: Durchschnittliches Körpergewicht der Kaninchen nach 50 Wochen (in kg). (***) $p < 0,001$

4.3 Makroskopische und mikroskopische Aspekte der thorakalen Aorten

Der histologische und immunhistochemische Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Delphine Behr-Roussel und Dr. Tony J. Verbeuren am Institut de Recherches Servier, Suresnes, Frankreich durchgeführt.

Schon makroskopisch fiel bei der Präparation der Aorten der Unterschied im morphologischen Aufbau und im Fettgehalt auf. Durch Dissektion und Wiegen der einzelnen Wandschichten kann der relative Anteil der jeweiligen Tunica am Wandaufbau errechnet werden. Schon am Gesamtgewicht kann man den proliferativen Charakter der Atherosklerose erahnen, die durchschnittliche Gesamtmasse des Aortenstückchens eines hypercholesterinämischen Kaninchen beträgt 265% der eines Kontrolltieres. Interessant ist auch die Aufteilung der Gefäßwandschichten (Abb. 7): In der Kontrollkaninchenaorta teilen sich Adventitia und Media mit $55,9 \pm 9,4\%$ und $44,1 \pm 5,0\%$ die Gefäßwand auf. Dagegen nimmt im atherosklerotischen Gefäß schon

allein die im Verlauf der Erkrankung neugebildete Neointima $62,5\% \pm 12,5\%$ der Masse ein, Adventitia und Media entsprechen nur mehr $25,0 \pm 4,4\%$ und $12,5 \pm 1,9\%$ respektive.

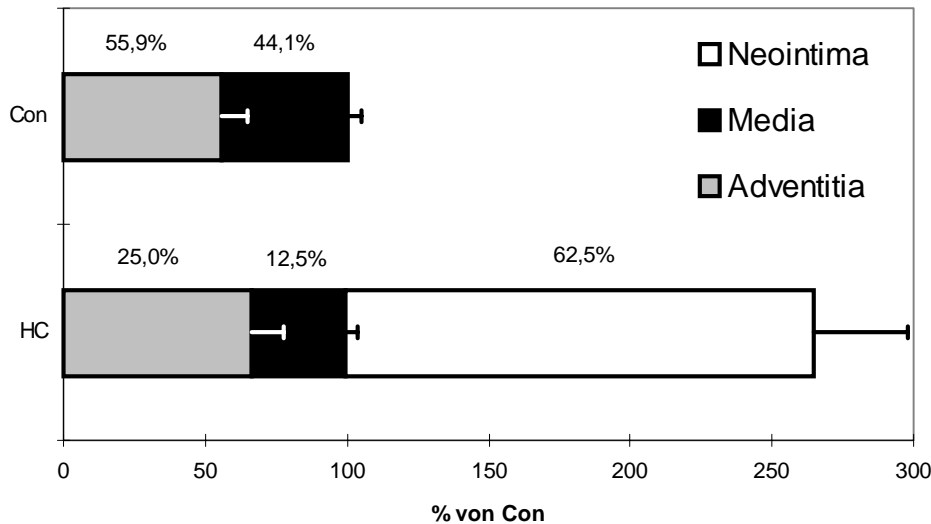


Abb. 7: Prozentualer Anteil der Tunica Adventitia, Media und Neointima an der Gesamtmasse von Kontroll- (CON) und atherosklerotischen (HC) Aorten.

Um einen Eindruck der Histologie der atherosklerotischen Gefäße zu bekommen wurden die Schnitte mit den Standardfärbungen HE und Orcein gefärbt. In der HE-Färbung (Abb. 8a, b und c), die hauptsächlich Zellen und Zellkerne anfärbt, erkennt man schön die Unterschiede zwischen atherosklerotischen (8b, c) und den Kontrollgefäßen (8a). Während in CON neben der Adventitia (A) und Media (M) in der dargestellten Vergrößerung das Endothel nicht auszumachen ist (L: Lumen), sieht man in der Gefäßwand der HC Kaninchen luminal der Media eine stark ausgeprägte Neointima (N), welche von extrazellulärer Matrix und unorganisierten Zellen ausgefüllt ist. In stärkerer Vergrößerung (8b) findet man auch schaumig aussehende Zellen, die fettgefüllten Makrophagen, den sog. Foam-Cells entsprechen. In der Orcein-Färbung (Abb. 8d) erkennt man die wohlorganisierten elastischen Fasern in der Media, die Neointima hingegen färbt sich nicht an, da sie keine elastischen Fasern enthält.

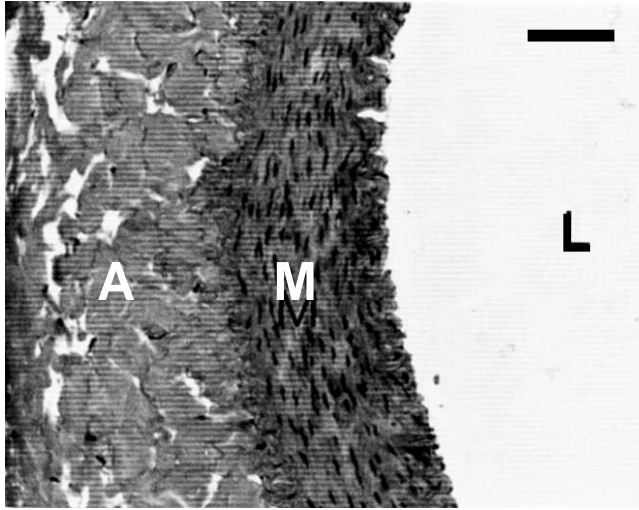


Abb. 8a (Kontrolle; Hämatoxylin-Eosin)

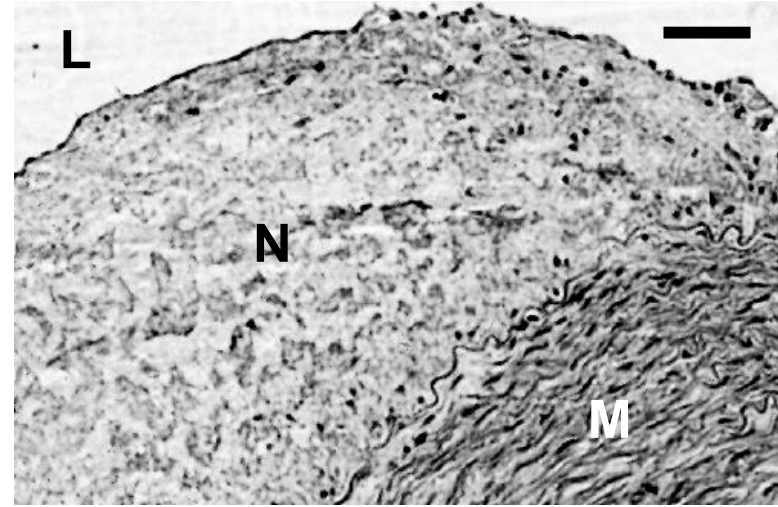


Abb. 8b (HC; Hämatoxylin-Eosin)

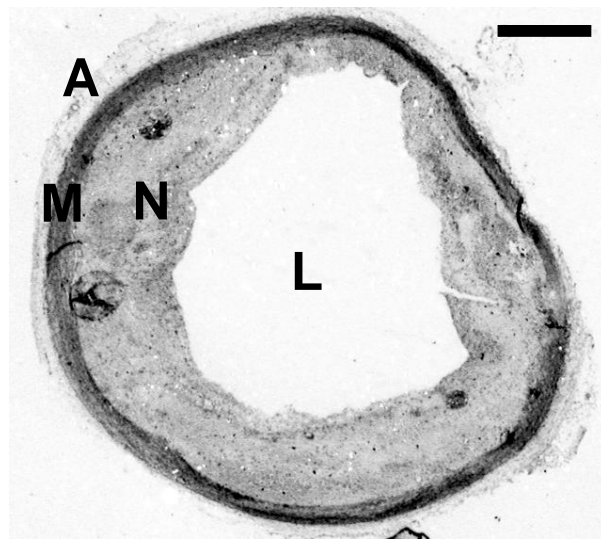


Abb. 8c (HC; Hämatoxylin-Eosin)

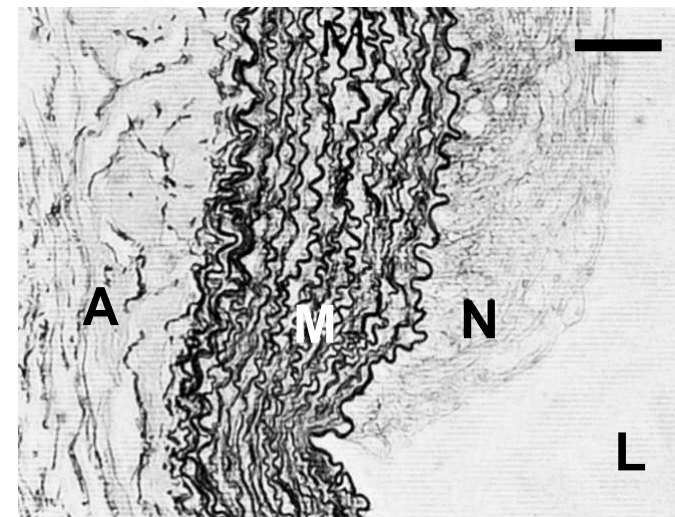


Abb. 8d (HC; Orcein)

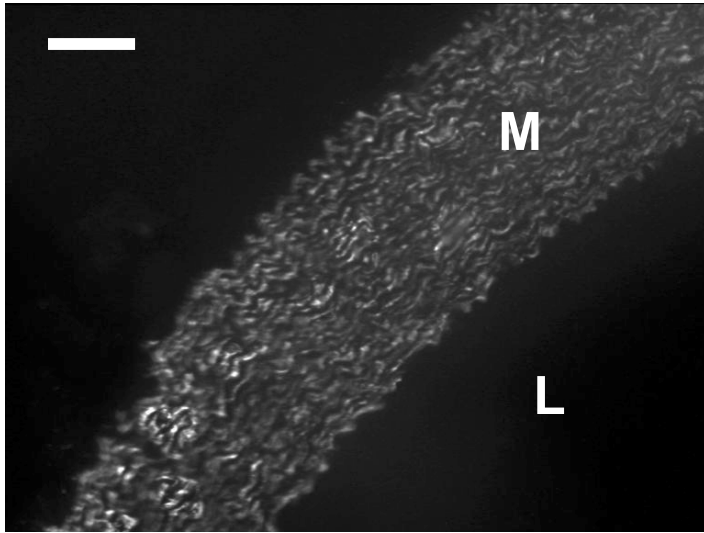


Abb. 9a (Kontrolle; α -Aktin)

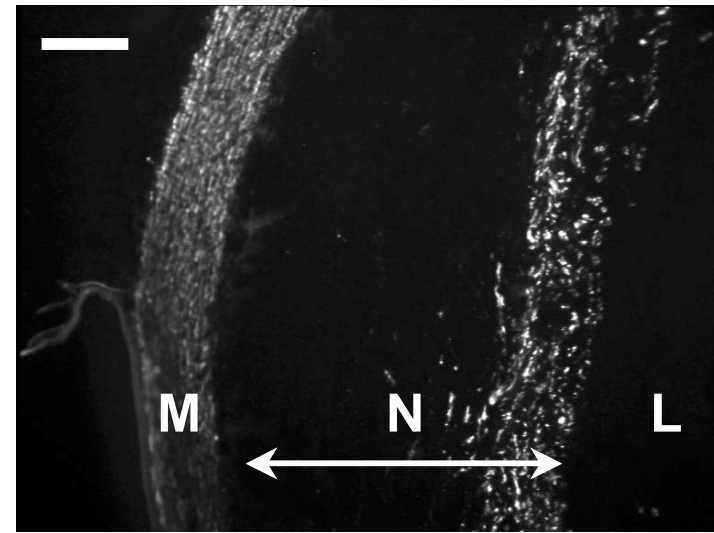


Abb. 9b (HC; α -Aktin)

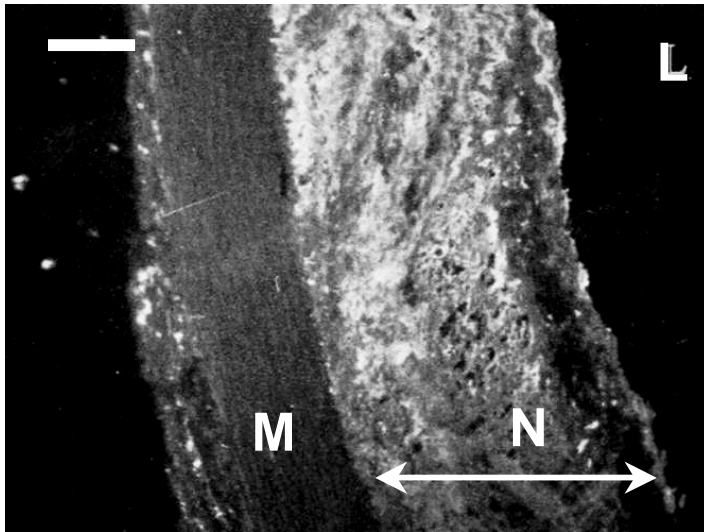


Abb. 9c (HC; Makrophagen)

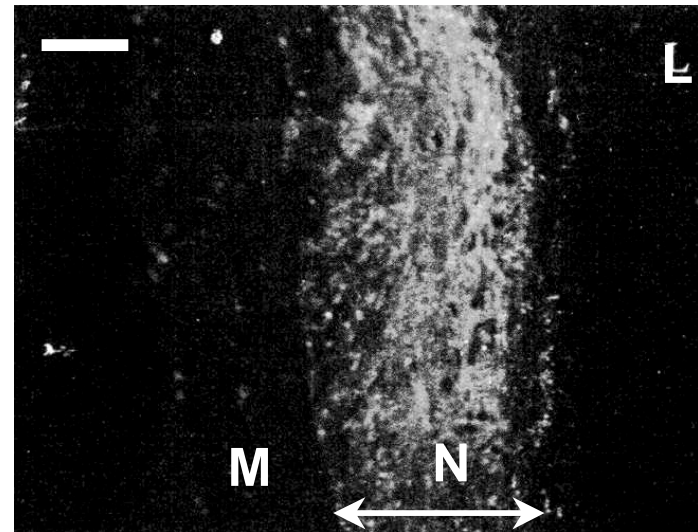


Abb. 9d (HC; B-Lymphozyten)

(Legenden zu den Abbildungen der vorhergehenden Seiten:)

Abb. 8a, b: Mikroskopische Abbildung eines Ausschnitts aus der Gefäßwand von Kontroll- (8a) bzw. HC-Kaninchen (8b) in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Vergrößerung $\times 200$, der Balken oben rechts entspricht $50\mu\text{m}$. Abb 8c: Gesamtdurchschnitt durch die Aorta eines HC-Tieres in HE-Färbung. Vergrößerung $\times 9$, der Balken entspricht 1mm . Abb. 8d: Ausschnitt aus der Gefäßwand eines HC-Kaninchens in Orceinfärbung, welche elastische Fasern darstellt. Vergrößerung $\times 200$, der Balken entspricht $50\mu\text{m}$. (A: Adventitia; M: Media; N: Neointima; L: Lumen)

Abb. 9a-d: Immunhistochemische Anfärbung mikroskopischer Schnitte von Aortenwänden. Vergrößerungsmaßstab aller Abbildungen $\times 200$, der Balken oben links entspricht jeweils $50\mu\text{m}$. Abb. 9a: CON-Kaninchen, Färbung gegen α -Aktin (glatte Muskelzellen). Abb. 9b: HC-Kaninchen, Färbung gegen α -Aktin. Abb. 9c: HC-Kaninchen, Färbung gegen Makrophagen. Abb. 9d: HC-Kaninchen, Färbung gegen B-Lymphozyten. (A: Adventitia; M: Media; N: Neointima; L: Lumen)

Genaueren Aufschluß auf die zelluläre Zusammensetzung der Wandschichten kann die immunhistochemische Anfärbung (Abb. 9) geben: Bei Färbung gegen das α -Aktin kann man relativ spezifisch die glatten Muskelzellen darstellen. Während diese in den Kontrollkaninchen ausschließlich in der Media gefunden wurden (9a), zeigt sich in den Aorten der HC-Kaninchen auch starke Anfärbung im luminalen Teil der Neointima (9b). Dabei ist die wesentlich unorganisiertere Anordnung dieser Zellen in der Neointima gut erkennbar. Die luminale Anhäufung von SMC in der Neointima wird gewöhnlich als fibromuskuläre Kappe bezeichnet und zählt zu den morphologischen Charakteristika der Läsionen bei fortgeschrittener Atherosklerose. Bei Färbung gegen RAM-11, einem Makrophagenmarker, findet man sehr starke Färbung in der Neointima (Abb. 9c), die von den oben bereits beschriebenen Foam-Cells herrührt. Immunodetektion von B-Lymphozyten Antigen (Abb. 9d) erkennt auch diesen Zelltyp in höherer Konzentration in der Neointima, was auf den chronisch-entzündlichen Charakter der fortgeschrittenen Atherosklerose hinweist.

4.4 NOS-Aktivität in den Gefäßhomogenaten ist nicht signifikant verändert

In den Gesamthomogenaten wurde zunächst die NOS-Aktivität in Abwesenheit von Ca^{++} -Ionen (durch Zugabe des Chelators EGTA) bestimmt, was der Aktivität der Calcium-unabhängigen, induzierbaren NOS-II (iNOS) entspricht. Durch Messung bei Zugabe von Ca^{++} kann man die Gesamtaktivität aller NO-Synthasen (NOS-I, -II und -III) bestimmen, durch Subtraktion der Werte erhält man die Aktivität der Ca^{++} -abhängigen Isoformen, NOS-I und -III (zusammen auch cNOS bezeichnet).

In Abb. 10 kann man erkennen, daß die Aktivität der NO-Synthasen in den atherosklerotischen Gefäßen in diesem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung keinesfalls reduziert ist. Zwar erreicht, durch relativ starke interindividuelle Unterschiede der Kaninchen einer Gruppe, keine der Isoformen eine signifikante Hochregulation, der mehr als dreifache Anstieg der induzierbaren NOS-II zeigt aber einen deutlichen Trend nach oben ($0,21 \pm 0,12 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ versus $0,68 \pm 0,20 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $p < 0,10$), möglicherweise als physiologischen Kompensationsmechanismus.

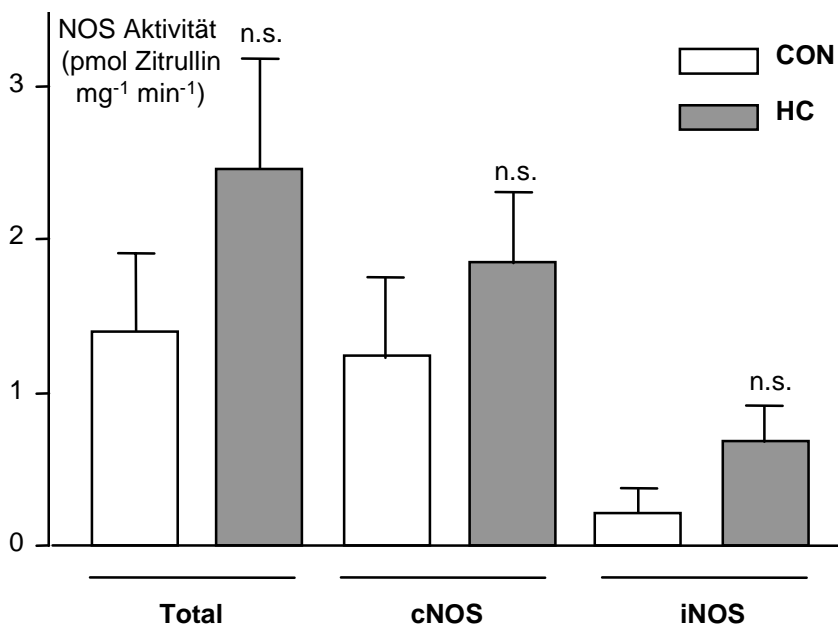


Abb. 10: Aktivität der NOS-Isoformen im Citrullin-Assay: Die Ca^{++} -abhängige, konstitutionelle NOS (cNOS) entspricht den Isoformen NOS-I und -III; die induzierbare NOS (iNOS = NOS-II) ist Ca^{++} -unabhängig, ihre Aktivität wurde in Gegenwart des Chelators EGTA bestimmt. (n.s.: nicht signifikant)

4.5 Expression der intrazellulären (Cu/Zn)-SOD ist stark reduziert

Insbesondere unter dem Aspekt der stark erhöhten Produktion von Superoxidradikalen in atherosklerotischen Gefäßen kommt der (Cu/Zn)-Superoxiddismutase als NO-protectives Enzym eine besonders wichtige Rolle im NO:cGMP Signalweg zu. Im Western-Blot konnten wir die Expression dieses Enzyms in Kontroll- und in hypercholesterinämischen Kaninchen auf Proteinebene vergleichen. Wie man in Abb. 11a sehen kann, ist die Expression in den HC-Aorten in eindrucksvoller Weise reduziert. Dieses schon subjektiv überzeugende Ergebnis konnte durch densitometrische Auswertung bestätigt werden (Abb. 11b). Signifikanzanalyse ergab einen p-Wert von $< 0,001$. Die Spezifität des Signals konnte durch Präinkubation des Antiserums mit 0,2 mg/mL nativer Rinder-(Cu/Zn)-SOD für sechs Stunden auf einem Schüttler gezeigt werden. Während schwächere Banden im höheren Molekularbereich nach wie vor zu sehen waren, wurde die SOD-Bande bei ca. 30 kDa vollständig geblockt.

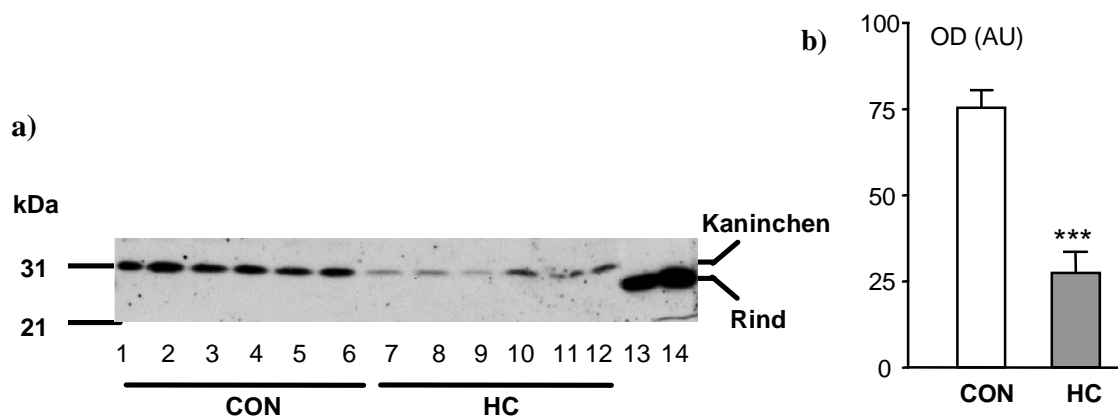


Abb. 11a: Western-Blot gegen (Cu/Zn)-SOD: Spur 1-6: CON, Spur 7-12: HC, jeweils 20 μ g pro Spur, Spuren 13 und 14: 50 bzw. 100 μ g bovine (Cu/Zn)-SOD. Dieses Signal war vollständig blockierbar durch Präinkubation der Antikörper mit nativer (Cu/Zn)-SOD. Abb. 11b: Densitometrische Auswertung des Blots, $p < 0,001$.

4.6 Immunodetektion von Nitrotyrosin-Resten

Aus dem vorherigen Ergebnis kann man folgern, daß die Superoxid-Konzentration in der Gefäßwand der hypercholesterinämischen Tiere erhöht ist. Superoxid verbindet sich mit NO zum sogenannten Peroxynitrit (ONOO⁻), einem zytotoxischen Stoff und starken Oxidator mit extrem kurzer Halbwertszeit. Es ist daher schwer, ONOO⁻ direkt in Geweben nachzuweisen. Der oxidative Stress durch ONOO⁻ in einem Gewebe kann jedoch durch immunologischen Nachweis von nitrierten Tyrosin-Resten in Proteinen nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, die von kooperierenden Arbeitsgruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden: Einmal ein monoklonaler Antikörper, der gegen nitriertes Rinderserumalbumin hergestellt wurde,¹⁵⁵ und ein polyklonales Antiserum gegen nitriertes Keyhole-Limpet-Haemocyanin.¹⁶³

Wie man den Blots in Abb. 12a und 12c entnehmen kann, erkannten die beiden Antikörper unterschiedliche nitrierte Proteine. Das Antiserum (Abb. 12a) erkannte eine spezifische Bande bei 38 kDa (im folgenden Protein p38^{nt}), der monoklonale Antikörper detektierte eine Bande bei 62 kDa (p62^{nt}). Um die Spezifität der Signale zu zeigen, wurden die Antikörper auch hier präinkubiert, und zwar mit 50 µmol/L freiem 3-Nitrotyrosin. Während sich p38^{nt} dadurch vollständig blocken ließ, konnte das Signal von p62^{nt} nicht unterdrückt werden. Die Signale des monoklonalen Antikörpers waren auch in Experimenten mit anderen Geweben nicht mit Nitrotyrosin vollständig zu blocken, so daß die Spezifität dieses Signals kritisch betrachtet werden muß.

Interessant ist die Auswirkung der Atherosklerose auf die Tyrosinnitrierung: Während p62^{nt}, wie erwartet, in den Aortenhomogenaten der HC Kaninchen verstärkt nachzuweisen war (Abb. 12c, $p < 0,01$), war die Nitrierung von p38^{nt} signifikant verringert (Abb. 12a, $p < 0,001$). Die entsprechenden densitometrischen Auswertungen können den Abb. 12b bzw. 12d entnommen werden.

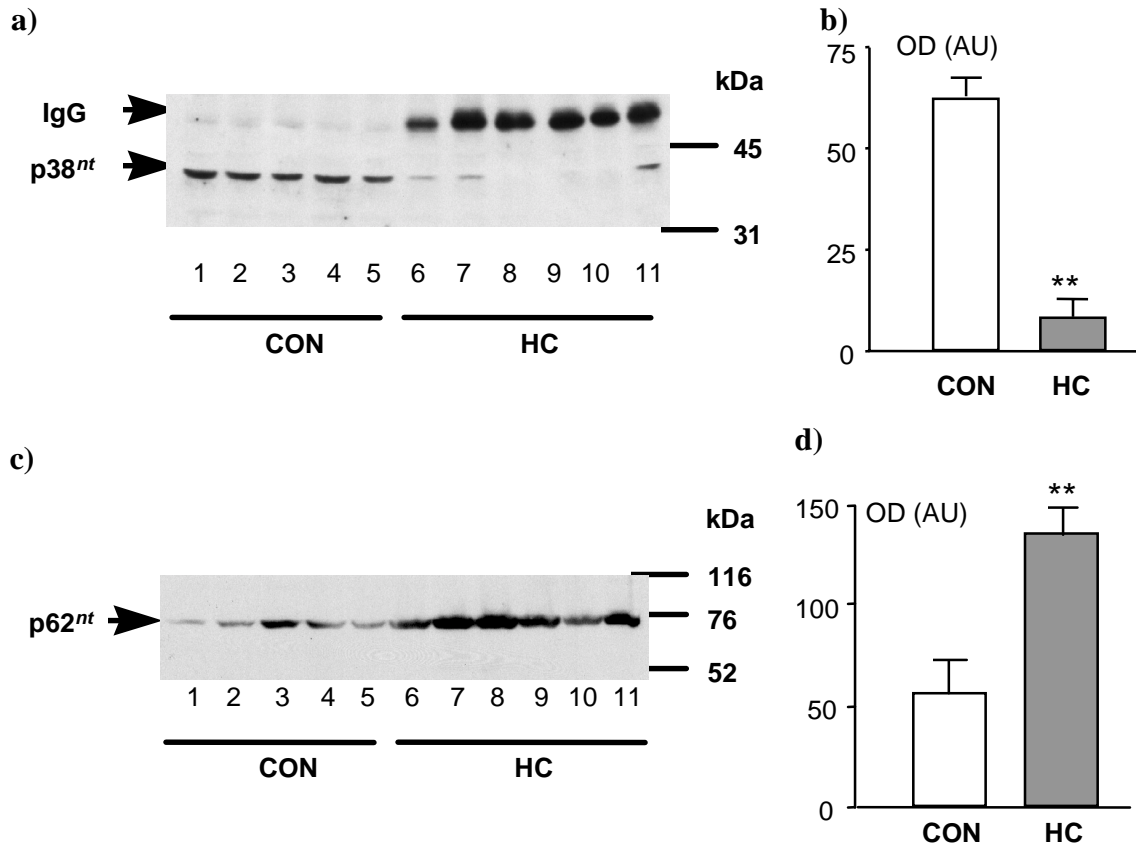


Abb. 12a und 12b: Western-Blot mit polyklonalem Antiserum gegen Nitrotyrosin sowie die densitometrische Auswertung (***) $p < 0,001$). Abb. 12c und 12d: Derselbe Blot mit dem monoklonalem Antikörper gegen Nitro-BSA, sowie die Densitometrie (** $p < 0,01$). Auf beiden Blots findet man in Spur 1-5: 20 μ g Gesamthomogenat der Aorten der Kontrollkaninchen und in Spur 6-11: 20 μ g Aortenhomogenat der hypercholesterinämischen Tiere.

4.7 Aktivität und Expression der sGC ist v.a. in der Neointima verringert

Das erste Enzym im NO- und damit auch endothelunabhängigen, zweiten Teil des Signalwegs ist die lösliche Guanylatzyklase. Als das wichtigste bekannte Zielprotein von NO ist sie für die Weiterleitung des Signals in der glatten Muskelzelle (SMC) der Gefäßwand verantwortlich, was sie in Form des Second Messengers zyklisches Guanosin-monophosphat (cGMP) tut. Die wichtigste aktive Isoform in SMCs ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α_1 - und einer β_1 -Untereinheit.

Im Western Blot ist es nach ausreichendem Clearing der Proben von störendem Kaninchen-Igs gelungen, beide Untereinheiten nachzuweisen (Abb. 13a und 13c). Die Identität der Banden wurde durch Vergleich des scheinbaren Molekulargewichts mit Molekulargewichtsstandards sowie mit der jeweiligen gereinigten Untereinheit als Positivkontrolle festgestellt. Die densitometrische Auswertung (Abb. 13b und 13d) zeigt, daß die Expression beider Untereinheiten in HC signifikant verringert ist ($p < 0,05$).

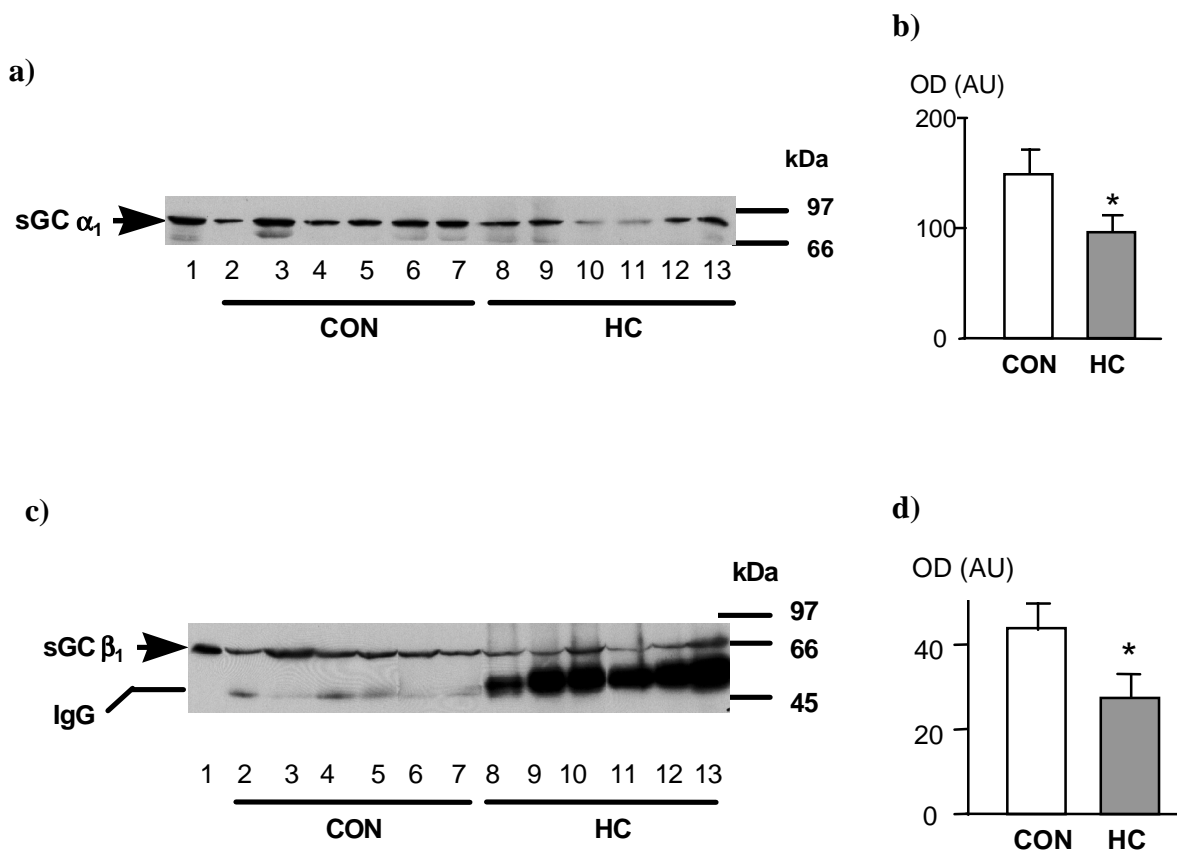


Abb. 13a und 13b: Western-Blot mit sGC- α_1 -Antiserum sowie die Densitometrie. Abb. 13c und 13d: Derselbe Blot mit sGC- β_1 -Serum und densitometrische Auswertung. Aufgetragen wurde jeweils 20 mg Gesamtaortenhomogenat, in Spur 2-7 der Kontrolltiere, in Spur 8-13 der HC-Kaninchen. Spur 1 enthält als Positivkontrolle die in Sf9-Zellen exprimierte jeweilige Untereinheit. (* $p < 0,05$)

Bestätigt werden konnte dieses Ergebnis durch Messung der Aktivität der sGC im Assay. Bestimmt wurde hierbei sowohl die unstimulierte Basalaktivität, als auch die Maximalaktivität in Gegenwart von 100 $\mu\text{mol/L}$ des NO-Donors Natrium-Nitroprussid. Das Ergebnis ist in Abb. 14 dargestellt. Die Reduktion der Basalaktivität ($52,16 \pm 5,50$ auf $35,71 \pm 4,69$ $\text{pmol cGMP mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, $p < 0,05$) um mehr als 30% unterstützt die im Western-Blot gefundene, verminderte Expression des Enzyms in den Homogenaten der HC Kaninchen. Die weitaus stärkere Reduktion der maximal stimulierten Aktivität ($401,96 \pm 116,95$ auf $157,48 \pm 36,91$ $\text{pmol cGMP mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, $p < 0,05$) um mehr als 60% läßt zusätzlich auf eine Dysfunktion der noch vorhandenen sGC schließen.

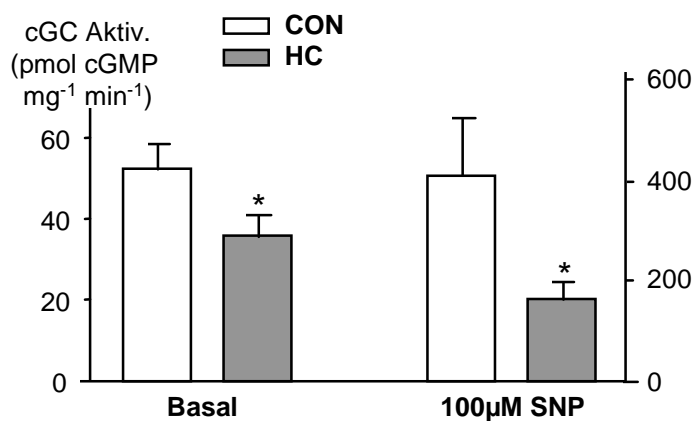


Abb. 14: Aktivität der sGC in den Gesamthomogenaten. Die Aktivität wurde im Enzym-Assay sowohl unter basalen, als auch unter Stimulation mit 100 μM SNP bestimmt. (Nota: zwei Abszissen, links basale Aktivität, rechts unter Stimulation. * $p < 0,05$ gegen CON)

Im Angesicht der weiter oben beschriebenen morphologischen Unterschiede der thorakalen Aorten der HC und der Kontroll-Kaninchen wäre es interessant, zu wissen, ob die verringerte sGC-Aktivität gleichmäßig über alle Wandschichten verteilt ist, oder ob eine Wandschicht besonders betroffen ist. Dazu wurde die stimulierte sGC Aktivität in den einzelnen Tunicae bestimmt (Abb. 15). Wie man der Abbildung entnehmen kann, ist die Aktivität des Enzyms in den äußeren Tunicae, Adventitia und Media keinesfalls erniedrigt, in der Adventitia ist sie sogar signifikant erhöht, was möglicherweise als physiologischer Kompensationsversuch interpretiert werden kann. Die Neointima hingegen, die mehr als 62% der Gesamtgefäßmasse ausmacht und einen Großteil der

glatten Muskelzellen enthält, verfügt nur über eine verschwindend geringe stimulierbare sGC-Aktivität [50 ± 12 pmol cGMP $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, dagegen 419 ± 100 (Adventitia) und 353 ± 151 pmol cGMP $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Media)]. Offenbar ist die reduzierte Aktivität der sGC in den Gesamthomogenaten vor allem auf die geringe Aktivität in der innersten Wandschicht der atherosklerotischen Gefäße zurückzuführen.

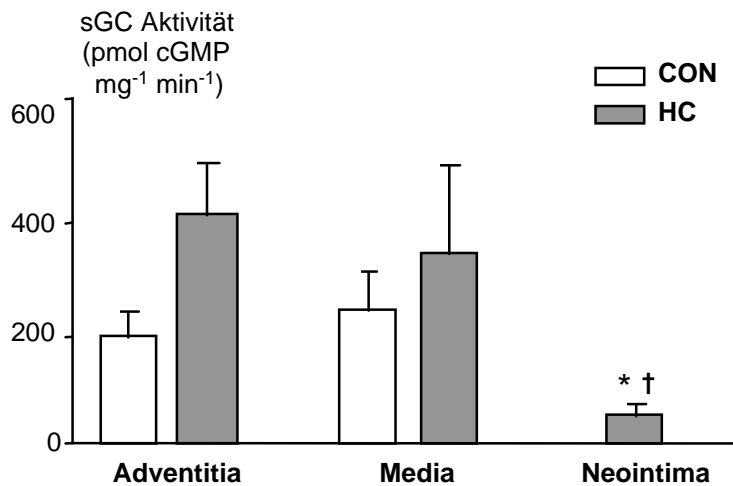


Abb. 15: sGC-Aktivität in den einzelnen Schichten der Aorten, gemessen unter Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ SNP. Die Neointima kommt nur in atherosklerotischen Gefäßen vor, und hat daher keine Kontrolle (* $p < 0,05$ gemessen gegen HC Adventitia; † $p < 0,05$ gegen CON Adventitia und CON Media)

4.8 Aktivität der cGMP-abbauenden Phosphodiesterasen ist nicht verändert

Wie schon bei NO beeinflusst natürlich auch beim second messenger nicht nur die Produktion, in diesem Fall durch die Guanylatzyklasen, sondern auch der Abbau des Signalmoleküls dessen Halbwertszeit und biologische Aktivität. Der Abbau wird im Falle von cGMP durch die Phosphodiesterasen gewährleistet. Bislang sind fünf Isoformen bekannt (PDE-I, -II, -III, -IV und -V), wovon offenbar die Isoformen PDE-I und PDE-V die wesentliche Rolle im Abbau von cGMP spielen. Der hier verwendete PDE-Assay misst die Aktivität des cGMP-Abbaus unabhängig von der Isoform und, durch Zugabe von Ca^{++} und Calmodulin auch unabhängig von einer ggf. nötigen Ca^{++} -Aktivierung. Die Ergebnisse können Abb. 16 entnommen werden. Der Unterschied zwischen den Gruppen erreicht weder Signifikanz noch Trend. Man kann also folgern, daß im Kaninchenmodell der fortgeschrittenen Atherosklerose keine für den Krankheitsprozeß wichtige Änderung der Gesamtaktivität der Phosphodiesterasen vorhanden ist.

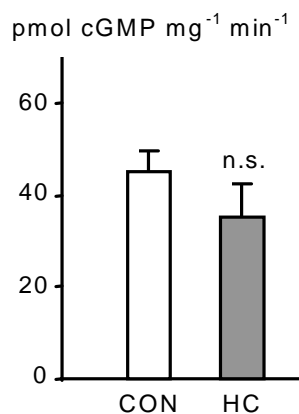


Abb. 16: Aktivität der PDE dargestellt in abgebauten pmol cGMP mg⁻¹ min⁻¹. Im Assay werden alle Isoformen der PDE erfaßt, durch Zugabe von Ca^{++} -Calmodulin auch die calciumabhängigen. Die Aktivität ist nicht signifikant verändert (n.s.: nicht signifikant).

4.9 Expression der cGMP-abhängigen Kinase-I in Neointima ist verringert

Der nächste Schritt im Signalweg sind die Zielproteine des cGMP. Für die Weiterleitung des vasorelaxierenden Signals von NO ist die cGK-I essentiell. Ihre Expression wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antiserums im Western-Blot untersucht. Das Ergebnis in den Gesamthomogenaten (Abb. 17a, 17b) zeigte allerdings keinen Unterschied zwischen den Gruppen, der eine Signifikanz oder auch Trend darstellen würde.

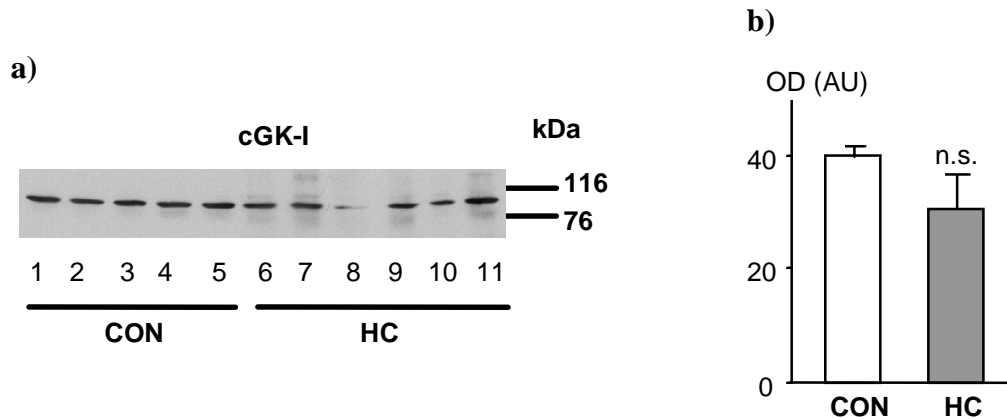


Abb. 17a und 17b: Expression der cGK-I im Western-Blot und densitometrische Auswertung. In Spur 1-5 ist 20 μ g Gesamthomogenat der Aorten der Kontrollkaninchen aufgetragen, in 6-11 dasselbe der hypercholesterinämischen Kaninchen. Keine signifikante Veränderung konnte in den Gesamthomogenaten festgestellt werden. (n.s.: nicht signifikant)

Erst durch Untersuchung der einzelnen Wandschichten konnte gezeigt werden, daß, gleichsam der sGC-Aktivität, die Expression der cGK-I in der Neointima signifikant reduziert ist (Abb. 18a, b). Wiederum ist es die innerste Tunica, die, obwohl sie mehr als die Hälfte der betroffenen Gefäße ausmacht, sehr arm an essentiellen Enzymen des NO:cGMP-Signalwegs ist.

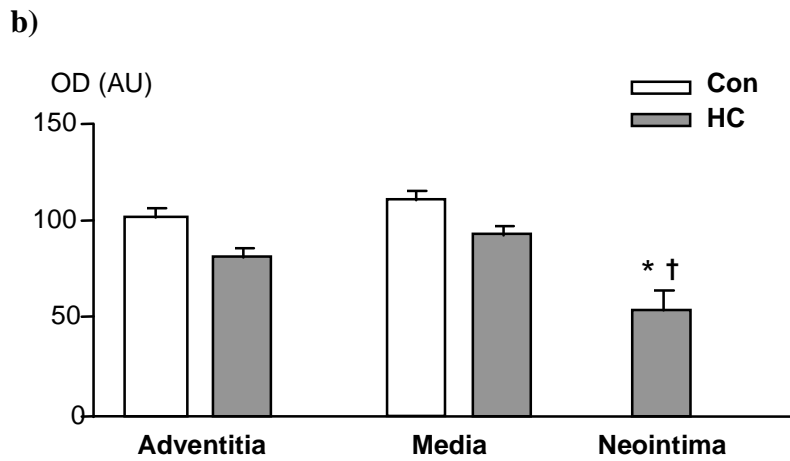
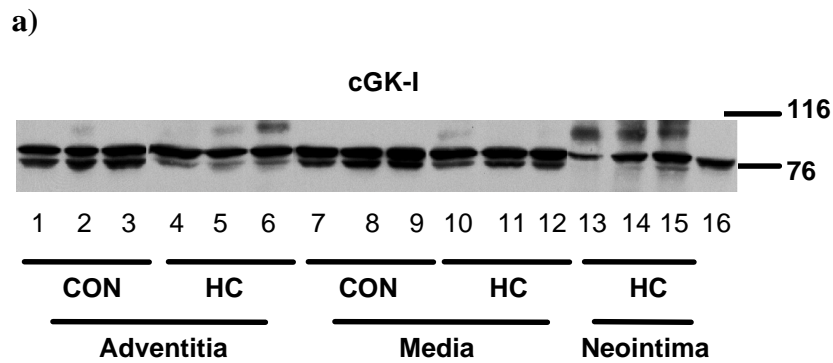


Abb. 18a: Expression der cGK-I in den einzelnen Wandschichten. Pro Spur wurde 20 μg des jeweiligen Homogenats aufgetragen, Spur 16 enthält als Positivkontrolle Thrombozytenhomogenat. Abb. 18b: Densitometrie des Blots. * $p < 0,05$ verglichen mit HC Media; † $p < 0,05$ gegen CON Adventitia und CON Media.

4.10 Konzentration von Ser239-Phospho-VASP ist hochgradig verringert

Die direkte Bestimmung der Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinasen im Enzym-Assay ist, vor allem bedingt durch die Vielzahl der Substrate dieser Enzymgruppe, schwierig. Ein erst kürzlich entdecktes und beschriebenes Substrat der cGMP- und auch cAMP-abhängigen Kinasen ist das sogenannte Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein oder VASP. Unlängst ist es gelungen, monoklonale phosphospezifische Antikörper herzustellen, welche VASP spezifisch nur in der Ser239-phosphorylierten Form (P_{ser239}-VASP) erkennen.¹¹⁸ Dies ermöglicht nun eine quantitative Untersuchung des Gehalts an P_{ser239}-VASP durch Western-Blot, und somit einen Rückschluß auf die Aktivität der cGMP-abhängigen Kinasen.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abb. 19a und 19b wiedergegeben. Schon mit bloßem Augen ist der verminderte Gehalt an P_{ser239}-VASP in den atheroskerotischen Proben zu erkennen. Durch densitometrische Auswertung (Abb. 19b) erkennt man, daß die durchschnittliche relative optische Dichte auf fast ein Viertel reduziert ist, bei einem $p < 0,001$. Dies bestätigt einerseits die reduzierte Aktivität der cGMP-abhängigen Kinasen, andererseits spiegelt es auch die Insuffizienz des gesamten NO:cGMP-Signalwegs wieder, da sich ja VASP ganz am Ende dessen befindet.

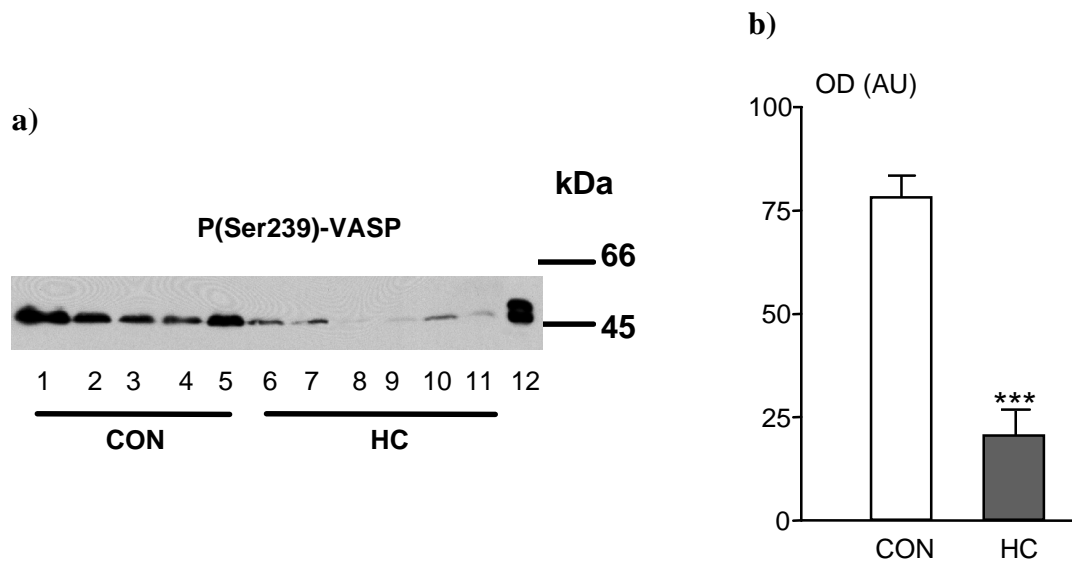


Abb. 19a und b: Western-Blot mit dem phosphospezifischen VASP-Antikörper, sowie densitometrische Auswertung. Spur 1-5: 20 µg Gesamthomogenat der CON Aorten, Spur 6-11: 20 µg HC Aorten, Spur 12: Als Positivkontrolle Plättchenhomogenat, das 10 min mit 100 mmol/L SNP inkubiert wurde. *** $p < 0,001$.

Interessant wäre es zu wissen, ob es sich dabei um Reduktion der Phosphorylierung einer normalen zellulären Konzentration an VASP handelt, oder ob die Menge an exprimiertem VASP-Protein reduziert ist, und dadurch auch die Menge an P_{ser239}-VASP. Leider handelt es sich bei den vorhandenen "Gesamt-VASP"-Antikörpern um polyklonale Seren. Es ist in mehreren Versuchen leider nicht gelungen, die VASP-Bande mit 46 bzw. 50 kDa durch Elektrophorese genügend von der schweren Kette der verbleibenden Kaninchen Immunglobuline (ca. 50 kDa) zu trennen. Eine Aussage über den Gesamt-VASP-Gehalts in den Homogenaten ist daher nicht möglich.

5. Diskussion

Das benutzte Tiermodell entspricht einem fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose. Die histologischen Veränderungen in den thorakalen Anteilen der Aorten lassen eine Einteilung nach Stary in Typ IV bzw. V zu.²⁶ Es finden sich fibromuskuläre Kappe und Lymphozyten in den Plaques, beides Hinweise auf das chronische Stadium. Da dasselbe Tiermodell in nur leicht veränderter Form bereits in zahlreichen Studien verwendet wurde,^{4,5,140,145,164,165} ist es besonders geeignet die Ergebnisse dieser Studie aus dem endothelunabhängigen Teil des Signalwegs mit den vorhandenen Studien zu vergleichen.

Die Expression und Aktivität der NO-Synthasen wird durch die Artherosklerose in erheblichem Maße beeinflusst, allerdings in sehr unterschiedlichem Umfang, je nach Isoform, Tiermodell und Stadium der Atherosklerose. Die Freisetzung und die Aktivität des EDRF im Bioassay ist in frühen Stadien der Atherosklerose reduziert.⁵ Eine Assoziation mit verminderter NO-Produktion ist zu vermuten, da Verabreichung von Tetrahydrobiopterin oder L-Arginin diesen Verlust zumindest teilweise ausgleichen kann.^{166,167} In anderen Modellen ist zwar die EDRF-Aktivität reduziert, die Gesamtproduktion von Stickstoffoxiden im betroffenen Gefäß ist jedoch erhöht, was auf vermehrten Abbau von NO hinweist.¹⁶⁸ Die Expression der NOS wird beeinflusst, unter anderem durch Zytokine, die im Rahmen der Entzündungsreaktion von Leukozyten sezerniert werden. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung findet man eine Überexpression der induzierbaren NOS-II Isoform, was die vermehrte Stickoxidproduktion erklären kann.^{145,146,147} Möglicherweise versucht das Gefäß dadurch den vermehrten Abbau von NO zu kompensieren. Nicht eindeutig geklärt ist der Effekt auf die Expression der endothelialen NOS-III. Je nach Stadium und Tiermodell werden hier sowohl Zunahme als auch Abnahme der Expression berichtet.^{8,9,149,150,151} In unserer Studie konnten wir keine signifikanten Unterschiede in den Aktivitäten der NO-Synthasen finden. Der deutliche Trend nach oben bei der Ca^{++} -unabhängigen NOS-II bestätigt aber die zahlreichen Publikationen, die eine Induktion dieser Isoform durch Zytokine beschreiben. Bei den konstitutionell expri-

mierten NOS-Isoformen kann in diesem Stadium auf jeden Fall eine Herunterregulation der Aktivität nicht festgestellt werden. Insgesamt ist die NOS-Aktivität also tendenziell erhöht, so daß eine verminderte Bildung von NO nicht für die Endotheldysfunktion in diesem Stadium verantwortlich gemacht werden kann.

Der erhebliche Einfluß der Superoxid-Radikale auf den NO-Signalweg wurde schon oben erwähnt. Die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale in den atherosklerotischen Plaques ist bekannterweise stark erhöht, wichtigste Quelle ist der entzündliche Charakter der Erkrankung. Chemotaxin-attrahierte Leukozyten sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen, die zur Expression bzw. Aktivierung O_2^- -produzierender NADH/NADPH-Oxidasen führen.^{71,72,73,152,153} NO-Synthasen können zusätzlich erhebliche Mengen O_2^- bilden, insbesondere unter pathologischen Bedingungen.⁶⁸ Zusätzlich heftet sich zirkulierende Xanthinoxidase durch die veränderten Oberflächenantigene vermehrt im Bereich atherosklerotischer Plaques an und trägt zum oxidativen Streß bei.^{74,169} Die gesamte O_2^- -Produktion ist in atherosklerotischen Gefäßen bis zu dreimal höher als in gesunden.¹⁷⁰ Desweiteren ist die Expression der EC-SOD, des wichtigsten protektiven Enzyms in der Gefäßwand, in fortgeschrittenen Läsionen verringert.¹⁵⁴ In früheren Stadien ist die Aktivität der EC-SOD zwar zwischenzeitlich kompensatorisch erhöht, Marker für oxidativen Stress werden aber trotzdem vermehrt gefunden, so daß höchstens eine inkomplette Kompensation vorliegt.^{76,171} In unserer Studie konnte eine signifikant erniedrigte Expression der intrazellulären Cu/Zn-SOD in den Homogenaten der atherosklerotischen Gefäße gefunden werden. Zusammen mit der schon erniedrigten EC-SOD könnte dies die Spiegel von O_2^- weiter erhöhen, und vasoprotektives NO abbauen. Daß die vorhandene Menge an SOD auch funktionell einen Einfluß auf die Aktivität von NO und NO-Donoren hat, belegen zahlreiche Studien. So ließ sich durch pharmakologische Inhibition allein der kupfer- und zinkhaltigen SODs die Wirkung von Azetylcholin und NO erheblich reduzieren.¹⁷² Exogene Zufuhr von SOD konnte die eingeschränkte Vasodilatation zumindest teilweise wieder herstellen.^{173,174,175}

Erhöhte O_2^- -Spiegel führen zur vermehrten Bildung von $ONOO^-$, das in den dann vorliegenden hohen Konzentrationen nicht mehr vasodilatierend wirkt, sondern toxisch. Bildung hochreaktiver Radikale,^{66,82} Oxidierung von eisen-schwefelhaltigen Enzymen,¹⁷⁶ Zinkfingern¹⁷⁷ oder Thiolen¹⁷⁸ sowie Nitrierung von Tyrosinresten³⁹ in Proteinen zählen zum weiten Wirkungsbereich von $ONOO^-$. Gerade durch letzteres verrät es sich jedoch und hinterläßt einen dauerhaften Fingerabdruck, der mittels nitrotyrosinspezifischer Antikörper im Western-Blot nachweisbar und quantifizierbar ist.^{155,179} Mit den zwei unterschiedlichen Antikörpern konnten wir zwei unterschiedliche nitrotyrosinhaltige Proteine nachweisen, p38^{nt} und p63^{nt}. Der Einfluß der Atherosklerose auf das Ausmaß der Tyrosinnitrierung der beiden Proteine ist genau gegenläufig. Man könnte sogar versucht sein, abzuschätzen, daß bei der stärkeren Verminderung der Nitrierung bei p38^{nt} und der leichteren Erhöhung bei p63^{nt} die Gesamt-Tyrosinnitrierung in den Homogenaten der atherosklerotischen Gefäße reduziert ist. Dabei muß man aber bedenken, daß es sich bei den Proben um Gesamthomogenate handelt und $ONOO^-$ in unterschiedlichem Ausmaß in den Gefäßwandschichten gebildet wird. Die erkannten Proteine können auch unterschiedlich lokalisiert sein. Von p63^{nt}, welches vermutlich nitrosyliertes Serumalbumin darstellt und v.a. in den lumennahen Gefäßschichten akkumuliert ist, ist bekannt, daß es in atherosklerotischen Gefäßen vermehrt gefunden wird.¹⁵⁵ Hingegen ist p38^{nt} möglicherweise ein mehr abluminal exprimiertes Protein, das schon unter Normalbedingungen nitriert ist. Durch die Verdickung der Wandschichten in der Atherosklerose erreicht das $ONOO^-$ dieses Protein nun vermindert. Zu beachten ist auch, daß erst kürzlich die Bildung von $ONOO^-$ aus NO und O_2^- unter physiologischen Bedingungen gänzlich in Frage gestellt wurde, und somit auch die Relevanz der nitrierten Proteine als $ONOO^-$ -Biomarker.¹⁸⁰ Diese Frage muß auf jeden Fall noch einmal mit anderen, direkteren Nitrotyrosin-Nachweisverfahren angegangen werden.

Wie schon früh erkannt wurde, ist im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose zusätzlich zur gestörten NO-Produktion auch die Reaktion der Gefäße auf NO-unabhängige Vasodilatoren verringert.⁴ Über die Veränderungen der Enzymexpression und -aktivität im endothelunabhängigen Teil des Signalwegs ist allerdings nur wenig

bekannt. Die vorhandenen Daten sprechen für eine verringerte Aktivität der sGC im fortgeschrittenen Stadium.¹⁵⁶ Dies konnte in unserer Studie bestätigt werden. Sowohl basale aber viel mehr noch die stimulierte sGC-Aktivität ist in den atherosklerotischen Gefäßen signifikant verringert, die stimulierte um mehr als 60%. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf die signifikant verminderte Expression beider Untereinheiten α_1 und β_1 des Enzyms, die wir im Western-Blot nachweisen konnten. Dieser Aktivitätsverlust nicht gleichmäßig über die gesamte Gefäßwand verteilt; die äußeren Wandschichten zeigen eine eher erhöhte sGC-Aktivität als in den Kontrollgefäßen. Interessanterweise war jedoch die Aktivität in der innersten Wandschicht, der neugebildeten Neointima, extrem erniedrigt mit nur ca. 10% - 15% der Aktivität der äußeren Wandschichten. Die Neointima, reich an Lipiden, extrazellulärer Matrix und glatten Muskelzellen, macht in den atherosklerotischen Gefäßen mehr als 60% der Gesamtmasse aus. Die Ausbildung der Neointima mit ihrer niedrigen sGC-Aktivität ist also möglicherweise für die Verringerung der Gesamtaktivität dieses Enzyms im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung verantwortlich. Anscheinend wird das Enzym durch den hohen Gehalt an oxydierten Lipiden inhibiert.¹⁵⁷ Dies hat nicht nur Einfluß auf die Hyperkontraktilität der betroffenen Gefäße, sondern auch auf die Proliferation der glatten Muskelzellen selbst. NO hat starke antiproliferative Eigenschaften, die sGC-vermittelt sind.¹²⁷⁻¹³² Möglicherweise ist die beobachtete sGC-Inhibition nicht Folge der Atherosklerose, sondern Teil des primären Krankheitsmechanismus, der zu verstärkter SMC-Migration und -Proliferation führt. Erst kürzlich wurde gezeigt, daß sGC-Gentransfer die Ausbildung der Neointima verringern kann, sicherlich ein interessanter Therapieansatz der Zukunft.¹¹⁰

Das verantwortliche Enzym für die Weiterleitung des cGMP-Signals sowohl für die vasodilatorische als auch für die antiproliferative Wirkung ist die cGMP-abhängige Proteinkinase-I.^{109,111,112} Gleichsam mit der sGC ist die Expression dieses Enzyms in der Neointima stark reduziert, während die äußeren Wandschichten keine Veränderung erkennen lassen. Dies bekräftigt die These, daß SMCs und andere Zellen in der Neointima eine hochgradig gestörte NO:cGMP-Signaltransduktion aufweisen, welche durch Hyperkontraktilität und Proliferationsneigung den Krankheitsprozeß weiter

vorantreibt. Analog dem Circulus Vitiosus der O_2^- -Produktion/Endothelschädigung (Abb. 1) läßt sich im endothelunabhängigen Teil des Signalwegs ein ähnlicher Kreis postulieren:

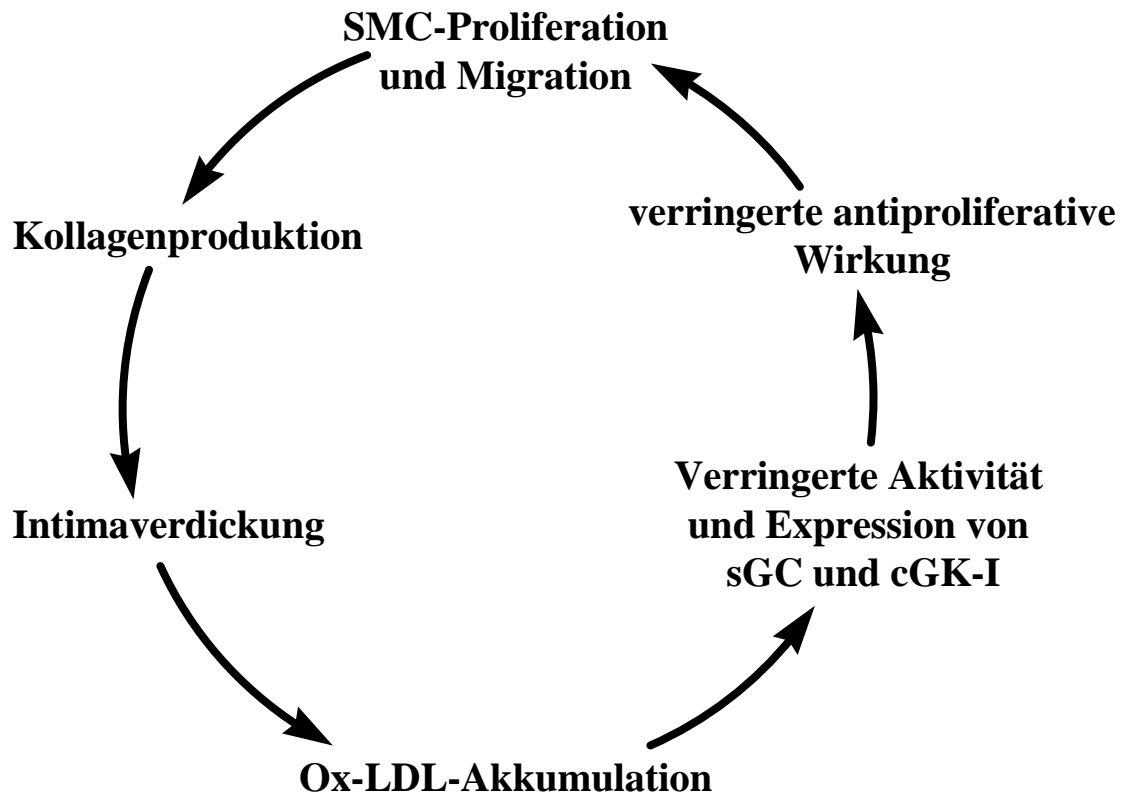


Abb. 20: Hypothese zum Circulus Vitiosus der Inhibition der sGC und cGK-I und somit des Verlusts der antiproliferativen Wirkung des NO:cGMP-Signalwegs in der Atherosklerose.¹⁸¹

Ganz am Ende des NO:cGMP Signalwegs steht das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein, VASP. Obwohl die exakte Funktion dieses Proteins noch nicht vollständig bekannt ist - VASP spielt bei fokalen Zell-Zell-Adhäsionen eine Rolle und wird in hoher Konzentration in Thrombozyten gefunden - ist es als Substrat der zyklischen-Nukleotid-abhängigen Kinasen bereits gut charakterisiert.^{117,118,119,122} VASP verfügt über drei Phosphorylierungsstellen: Die Aminosäuren Ser157, Ser239 und Thr278. Die Phosphorylierung der Aminosäuren erfolgt zwar nicht durch eine der Kinasen spezifisch, jedoch bevorzugen bei physiologischen Konzentrationen cAMP-

Kinasen die Aminosäure Ser157, cGMP-Kinasen Ser239. Die Phosphorylierung an Ser157 läßt sich relativ leicht nachweisen, da das Protein dadurch im Western-Blot einen Shift des scheinbaren Molekulargewichts von 46 auf 50 kDa erfährt.

Bei der für den NO:cGMP wichtigeren Ser239-Phosphorylierung verändert sich das scheinbare Molekulargewicht nicht, so daß hier ein anderer Nachweis nötig ist, z.B. mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper. Ganz am Ende des Signalwegs stehen VASP und P_{ser239}-VASP hinter der cGK-I als neuartige Marker für die Aktivität des gesamten NO:cGMP-Signalwegs.^{118,122} P_{ser239}-VASP zeigt sozusagen an, wieviel des ursprünglichen NO-Signals auch tatsächlich am Ende ankommt, trotz Regulations- und Kompensationsmechanismen im Verlauf des Signalwegs. Das Ergebnis ist eindeutig: Ser239-phosphorylierung des Proteins ist densitometrisch mehr als 70% reduziert. Dies zeigt erstmals und sehr anschaulich die hochgradige Dysfunktion des gesamten NO:cGMP-Signalwegs in diesem fortgeschrittenen Stadium der atherosklerotischen Erkrankung.

6. Zusammenfassung:

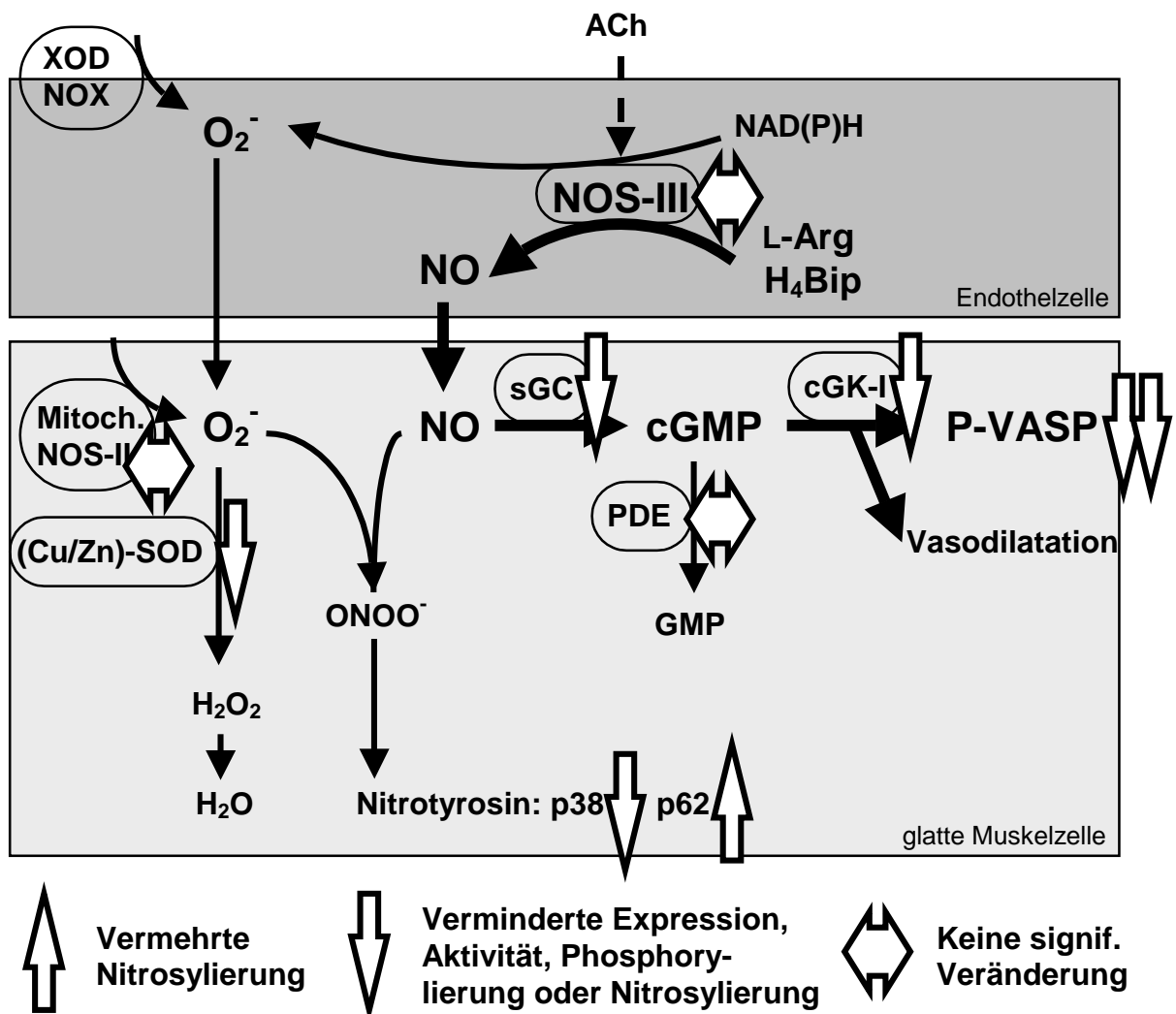


Abb. 21: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Studie

Die neue Erkenntnis dieser Studie ist, daß nicht nur der endothelabhängige Teil des NO:cGMP-Signalwegs im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose erheblich gestört ist. Sowohl die lösliche Guanylat-Zyklase als auch die cGMP-abhängige Proteinkinase-I sind in Aktivität und/oder Expression signifikant verringert, insbesondere in der Neointima, die mehr als 60% der Gesamtmasse des Gefäßes ausmacht. Beide Enzyme sind essentiell für die antikonstriktorische, antiproliferative und thrombozyten-aggregationshemmende Wirkung, also die antiatherogene Wirkung

von Stickstoffmonoxid. Die beobachtete verringerte Aktivität ist somit nicht nur Folge des atherosklerotischen Prozesses sondern zugleich auch Ursache weiterer Progression der Läsionen, ein Circulus vitiosus (Abb. 20). Der neuartige Marker der Aktivität des NO:cGMP-Signalwegs, P_{ser239}-VASP, zeigt in beeindruckender Weise an, wie erschreckend wenig vom ursprünglichen NO-Signal am Ende tatsächlich noch ankommt, seine Phosphorylierung ist um mehr als 70% reduziert.

In zunehmendem Maße werden nun auch die Enzyme des endothelunabhängigen Teils des NO:cGMP-Signalwegs Ansatzpunkt neuer Therapiekonzepte. Neuere, isoformspezifische Phosphodiesteraseinhibitoren können den Abbau von cGMP hemmen,¹¹³ und direkte sGC-Stimulatoren, wie YC-1, trotz hoher O₂⁻-Spiegel die sGC aktivieren.⁹⁴ Erste in-vitro und in-vivo Ergebnisse von Gentransfer von Enzymen des endothelunabhängigen Teils des NO:cGMP-Signalwegs liegen bereits vor. Es zeigen sich eindrucksvolle Veränderungen in Phenotyp und Morphologie der immigrierten SMC und insgesamt eine protektive Wirkung vor Neointimabildung und -progression.^{111,136,182} Der Ansatz der Gentherapie eröffnet völlig neue Therapieprinzipien der Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Todesursache Nummer 1 in Europa. Zahlreiche neue Ergebnisse auf diesem Gebiet sind in den nächsten Jahren zu erwarten.

7. Literaturverzeichnis:

1. Bericht des Statistischen Bundesamts, 1996-1999, <http://www.statistisches-bundesamt.de>
2. National Center for Health Statistics and American Heart Association, U.S.A., 1995, <http://www.cdc.org>
3. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V.: The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, **288**: 373-376
4. Verbeuren T.J., Jordaens F.H., Zonnekeyn L.L., Van Hove C.E., Coene M.C., Herman A.C.: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res.* 1986, **58**: 552-564
5. Verbeuren T.J., Jordaens F.H., Van-Hove C.E., Van-Hoydonck A.E., Herman A.G.: Release and vascular activity of endothelium-derived relaxing factor in atherosclerotic rabbit aorta. *Eur J Pharmacol.* 1990, **191**: 173-184
6. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chadhuri, G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1987, **84**: 9265-9269
7. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S.: Nitric oxide accounts for the activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987, **327**: 524-526
8. Buttery L.D., Chester A.H., Springall D.R., Borland J.A., Michel T., Yacoub M.H., Polak J.M.: Explanted vein grafts with intact endothelium demonstrate reduced focal expression of endothelial nitric oxide synthase specific to atherosclerotic sites. *J Pathol.* 1996, **179**: 197-203
9. Oemar B.S., Tschudi M.R., Godoy N., Brovkovich V., Malinski T., Lüscher T.F.: Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998, **97**: 2494-2498

10. Gryglewski R.J., Palmer R.M.J., Moncada S.: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986, **320**: 454-456
11. Münzel, T. and Harrison, D.G.: Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J Mol Med.* 1997, **75**: 891-900
12. Breslow, J.L.: Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med.* 1997, **3**: 600-601
13. Gotlieb, A.I., Havenith, M.G.: Atherosclerotic lesions and pathogenesis. In: Silver, M.D.: *Cardiovascular Pathology*, 2nd Edition, Churchill Livingstone, New York, 1991, S. 225-265
14. Woolf, N.: *Pathology of Atherosclerosis*. Butterworth Scientific, London, 1982
15. Baroldi, G.: Diseases of the coronary arteries. In: Silver, M.D.: *Cardiovascular Pathology*, 2nd Edition, Churchill Livingstone, New York, 1991, S. 317-329
16. Moreno, P.R., Falk, E., Palacios, I.F., Mewell, J.B.F., Uster, V., Fallon, J.T.: Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. *Circulation*, 1994, **90**: 775-778
17. Lendon, C.L., Davies, M.J., Born, G.V.R., Richardson, P.D.: Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophage density is increased. *Atherosclerosis* 1991, **87**: 87-90
18. Ross. R.: Atherosclerosis, an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999, **340**: 115-126
19. Fuster, V., Ross, R., Topol, E.J., Hsg.: *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996
20. Ross, R., Gloomset, J.A.: The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1976, **295**: 369-377
21. Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N Engl J Med.* 1986, **314**: 488-500
22. Lybby, P.: Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 1995, **91**: 2844-2850

23. Vogel, R.A.: Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol.* 1997, **20**: 426-432
24. Yutani, C., Imakita, M., Ishibashi-Ueda, H., Tsukamoto, Y., Nishida, N., Ikeda, Y.: Coronary atherosclerosis and intervention: pathological sequences and restenosis. *Pathology International* 1999, **48**: 273-290
25. Davies, M.J., Thomas, A.: Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med.* 1984, **310**: 1137-1140
26. Stary, H.C., Blankenhorn, D.H., Chandler, A.B., Glagov, S., Insull, W. Jr, Richardson, M., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D.: A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council in Vascular Lesions, American Heart Association. *Circulation* 1992, **85**: 391-405
27. Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W.: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council in Vascular Lesions, American Heart Association. *Circulation* 1994, **89**: 2462-2478
28. Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W.: A definition of advanced lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council in Vascular Lesions, American Heart Association. *Circulation* 1995: **92**: 1355-1374
29. Hao, H., Yutani, C., Imakita, M.: Histopathological analysis on plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model. *J Cardiol.*, 1993, **23** (Suppl. XXXV): 105
30. Abela, G.S., Picon, P.D., Friedl, S.E., Gebara, D.C., Miyamoto, A., Federman, M., Tofler, G.H., Müller, J.E.: Triggering of plaque disruption and arterial thrombosis in an atherosclerotic rabbit model, *Circulation*, 1995, **91**: 776-784

31. Farb, A., Burke, A.P., Tang, A.L., Liang, T.Y., Mannen, P., Smialek, J, Virmani, R.: Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. *Circulation*, 1996, **93**: 1354-1363
32. Falk, E., Shah, P.K., Fuster, V.: Coronary plaque disruption. *Circulation*, 1995, **92**: 657-671
33. Schmidt, H.H.H.W., Walter, U., Kochsiek, K.: Bildung und Wirkungen von Stickstoffmonoxid im vaskulären System. *Der Internist*, 1997, **38**: 406-410
34. Schmidt, H.H.H.W.: NO, endogener Botenstoff und Zellgift. *Med Mo Pharm.*, 1994, **17**: 168-176
35. Snyder, S.H.: Nitric Oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science*, 1992, **257**: 494-496
36. Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., Beckman, J.S.: Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 1992, **5**: 834-842
37. Doyle, M.P., Hoekstra, J.W.: Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem.* 1981, **14(4)**: 351-358
38. Goretski, J., Hollocher, T.C.: Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J Biol Chem.*, 1988, **263**: 2316-2323
39. Beckman, J.S., Koppenol, W.H.: Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and the ugly. *Am J Physiol.*, 1996, **271**: C1424-C1437
40. Palmer, R.M.J., Ashton, D.C., Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988, **333**: 664-666
41. Schmidt, H.H.H.W., Nau, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K.-E., Klein, M.M., Niroomand, F., Böhme, E.: Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 1988, **154**: 213-216
42. Nathan, C., Xie, Q.-W.: Nitric Oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell*, 1994, **78**: 915-918
43. Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Förstermann, U., Murad, F.: Type I guanylyl cyclase-activating factor (GAF) synthase is a Ca²⁺/calmodulin-,

- NADPH- and tetrahydrobiopterin-dependent homodimer. *FASEB J.*, 1991, **5**: A1591
44. Marletta, M.A.: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1994, **268**: 12231-12234
 45. Reif, A., Fröhlich, L.G., Kotsonis, P., Frey, A., Bömmel, H.M., Wink, D.A., Pfleiderer, W., Schmidt, H.H.H.W.: Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase; *J Biol Chem.*, 1999, **275**: 24921-24929
 46. Dinerman, J.L., Löwenstein, C.J., Snyder, S.H.: The surprising life of nitric oxide. *Chem Engin News.* Dec. 20, 1993, 26-38
 47. Abu-Soud, H.M., Stuehr, D.J.: Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993, **90**: 10769-10772
 48. Stuehr, D.J., Griffith, O.W.: Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Related Areas Molec Biol.* 1992, **65**: 287-346
 49. Ignarro, L.J.: Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res.* 1989, **65**: 1-21
 50. Marletta, M.A., Yoon, R.S., Iyengar, R., Leaf, C.D., Wichnote, J.S.: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide as an intermediate. *Biochemistry* 1988, **27**: 8706-8711
 51. Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K., Ohkawa, S., Ohnishi, K., Terao, S., Kawai, C.: Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem.* 1991, **266**: 3369-3371
 52. Drapier, J.C., Hibbs, J.B.: Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol.* 1988, **140**: 2829-2838
 53. Stuehr, D.J., Marletta, M.A.: Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon. *J Immunol.* 1987, **139**: 518-525

54. Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D.J.: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol.* 1988, **141**: 2407-2412
55. Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Trao, T., Nathan, C.: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992, **256**: 525-528
56. Welch, G., Loscalzo, J.: Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Cardiac Surg.* 1994, **74**: 1121-1125
57. Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Nathan, C.: Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med.* 1992, **176**: 599-604
58. Nathan, C., Hibbs, J.B.: Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 1991, **3**: 65-70
59. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J.: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992, **258**: 1898-1902
60. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jakari, O., Michel, T., Singel, D.J., Loscalzo, J.: S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992, **89**: 444-448
61. Stamler, J.S., Jakari, O., Osborne, J.A., Simon, D.I., Keaney, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C.R., Loscalzo, J.: Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992, **89**: 7674-7677
62. Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., Stamler, J.S.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993, **364**: 626-632
63. Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P., Snyder, S.H.: Protein-S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 2001, **3**: 193-197

64. Perez-Mato, I., Castro, C., Ruiz, F.A., Corrales, F.J., Mato, J.M.: Methionin adenosyltransferase S-nitrosylation is regulated by the basic and acidic amino acids surrounding the target thiol. *J Biol Chem.* 1999, **274**: 17075-17079
65. Rubany, G.M., Vanhoutte, P.M.: Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1986, **250**: H815-H821
66. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J.C., Marshall, P.A., Freeman, B.A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications of endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990, **87**: 1620-1624
67. Darley-Usmar, V.M., Gogg, N, O'Leary, V.J., Wilson, M.T., Moncada, S.: The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 1992, **17**: 9-20
68. Pou, S., Pou, W.S., Bredt, D.S., Snyder, S.H., Rosen, G.M.: Generation of superoxide by purified rat brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992, **267**: 24173-24176
69. Clark, R.A., Leidal, K.G., Pearson, D.W., Nauseef, W.M.: NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activable superoxide-generating system. *J Biol Chem.* 1987, **262**: 4065-4074
70. Amit, N., Huu, T.P., Sourbier, P., Marquetty, C., Hakim, J.: Role of cytochrome b-559 in arachidonic acid activation of resting human neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 1988, **944**: 437-443
71. Griedling, K., Ollerenshaw, J.D., Minieri, C.A., Alexander, R.W.: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994, **74**: 1141-1148
72. Pagano, P., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P., Tauber, A., Cohem, R.: An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol.* 1995, **268**: H2274-2280

73. Mohazzab, K.M., Kaminski, P.M., Wolin, M.S.: NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol.* 1994, **266**: H2568-2572
74. White, C.R., Brock, T.A., Chang, L.Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W.A., Gianturco, S.H., Gore, J., Freeman, B.A.: Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994, **91**: 1044-1048
75. Sherman, L., Dafni, N., Lieman-Hurwitz, J., Groner, Y.: Nucleotide sequence and expression of human chromosome 21-encoded superoxide dismutase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1983, **18**: 5465-5469
76. Fukui, T., Galis, Z.S., Meng, X.P., Parthasarathy, S., Harrison, D.G.: Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998, **101**: 2101-2111
77. Beck, Y., Oren, R., Amit, B., Levaron, A., Gorecki, M., Hartman, J.R.: Human Mn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 1987, **15**: 9076
78. Harrison, D.G.: Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthases: Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997, **100**: 2153-2157
79. Liu, S., Beckman, J.S., Ku, D.D.: Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994, **268**: 1114-1121
80. Ku, D.D., Liu, S., Dai, J.: Coronary vascular and antiplatelet effects of peroxynitrite in human tissues. *Endothelium* 1995, **3**: 309-319
81. Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Lizasoain, I., Su, Y., Knowles, R.G., Radomski, M.W., Moncada, S.: The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol.* 1995, **116**: 1999-2004
82. Pryor, W.A., Squadrito, G.L.: The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide and superoxide. *Am J Physiol.* 1995, **268**: L699-L722
83. Wever, R.M.F., Lüscher, T.F., Cosentino, F., Rabelink, T.J.: Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998, **97**: 108-112

84. Hardmann, J.G., Sutherland, E.W.: Guanylate cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine-3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem.* 1969, **244**: 6363-6370
85. Garbers, D.L.: Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem.* 1979, **254**: 240-243
86. Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., Murad, F.: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1977, **74**: 3203-3207
87. Kamisaki, Y., Saheki, S., Nakane, M., Palmieri, J.A., Kuno, T., Chang, B.Y., Waldman, S.A., Murad, F.: Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem.* 1986, **261**: 7236-7241
88. Koesling, D., Böhme, E., Schulz, G.: Guanylyl cyclases as effectors of hormone and neurotransmitter receptors. *New Comprh Biochem.* 1993, **24**: 325-336
89. Zabel, U., Weeger, M., La, M., Schmidt, H.H.H.W.: Human guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J.* 1998, **335**: 51-57
90. Behrends, M., Harteneck, C., Schulz, G., Koessling, D.: A variant of the α_2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J Biol Chem.* 1995, **270**: 21109-21113
91. Stone, J.R., Sands, R.H., Dunham, R., Marletta, M.A.: Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, **207**: 572-577
92. Utz, J., Ullrich, V.: Carbon monoxide relaxes ileum smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol.* 1991, **41**: 1195-1201
93. Morita, T., Perrella, M.A., Lee, M.E., Kourembanas, C.: Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995, **92**: 1475-1479

94. Friebe, A., Koesling, D.: Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 1998, **53**: 123-127
95. Zabel, U., Kleinschnitz, C., H.H.H.W. Schmidt *et al.*: noch nicht publizierte Beobachtung
96. Liu, J., Garcia-Cardena, G., Sessa, W.C.: Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry* 1996, **15**: 13277-13281
97. Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T.W., Kelly, R.A., Michel, T.: Endothelial nitric oxide targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996, **271**: 22810-22814
98. Prabhakar, P., Cheng, V., Michael, T.: A chimeric transmembrane domain directs endothelial nitric oxide synthase palmitoylation and targeting to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem.* 2000, **275**: 19416-19421
99. Ujiie, K., Hogarth, L., Danziger, R., Drewett, J.G., Yuen, P., Pang, I.H., Star, R.: Homologous and heterologous desensitization of a guanylyl cyclase-linked nitric oxide receptor in cultured rat medullary interstitial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994, **270**: 761-767
100. Filippov, G., Bloch, D., Bloch, K.: Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1997, **100**: 942-948
101. Papapetropoulos, A., Go, C., Murad, F., Catravas, J.: Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1996, **117**: 147-155
102. Papapetropoulos, A., Abou-Mohammed, G., Marczin, N., Murad, F., Caldwell, R.W., Catravas, J.: Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 β . *Br J Pharmacol.* 1996, **118**: 1359-1366
103. Papapetropoulos, A., Marczin, N., Mora, G., Milici, A., Murad, F., Catravas, J.: Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity,

- mRNA and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension* 1995, **26**: 696-704
104. Behrends, S., Harteneck, C., Schultz, G., Koessling, D.: A variant of the α_2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J Biol Chem.* 1995, **270**: 21100-21113
 105. Ritter, D., Taylor, J., Hoffmann, J., Carnaghi, L., Giddings, S., Zakeri, H., Kwok, P.Y.: Alternative splicing for the α_1 subunit of guanylate cyclase. *Biochem J.* 2000, **346**: 811-816
 106. Cowan, C.L., Palacino, J.J., Najibi, S., Cohen, R.A.: Potassium channel mediated relaxation to acetylcholine in rabbit arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993, **266**: 1482-1489
 107. Waldman, S.A., Murad, F.: Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev.* 1987, **39**: 163-196
 108. Grant, P.G., Mannarino, A.F., Colman, R.W.: Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from cytosol of human platelets. *Thromb Res.* 1990, **59**: 105-119
 109. Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiß, C., Wang, G.-X., Korth, M., Aszódi, A., Anderson, K.-E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fässler, R., Hofmann, F.: Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 1998, **17**: 3045-3051
 110. Walter, U., Waldmann, R., Nieberding, M.: Intracellular mechanism of action of vasodilators. *Eur Heart J.* 1988, **9**: Suppl. H, 1-6
 111. Lincoln, T.M., Dey, N.B., Boerth, N.J., Cornwell, T.L., Soff, G.A.: Nitric oxide - cyclic GMP pathway regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation: implications in vascular diseases. *Acta Physiol Scand.* 1998, **164**: 507-515
 112. Dey, N.B., Boerth, N.J., Murphy-Ullrich, J.E., Chang, P.-L., Prince, C.W., Lincoln, T.M.: Cyclic GMP-dependent protein kinase inhibits osteopontin and thrombospondin production in rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998, **82**: 139-146

113. Raeburn, D., Advenier, C.: Isoenzyme selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. Effects on airway smooth muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995, **27**: 29-37
114. Hathaway, D.R., Konicki, M.V., Coolican, S.A.: Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP and cGMP dependent protein kinases. *J Mol Cell Cardiol.* 1985, **17**: 841-850
115. Nishikawa, M., de Lanerolle, P., Lincoln, T.M., Adelstein, R.S.: Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1984, **259**: 8429-8436
116. Soff, G.A., Cornwell, T.L., Cundiff, D.L., Gately, S., Lincoln, T.M.: Smooth muscle cell expression of type I cyclic GMP-dependent protein kinase is suppressed by continuous exposure to nitrovasodilators, theophylline, cyclic GMP and cyclic AMP. *J Clin Invest.* 1997, **100**: 2580-2587
117. Waldmann, R., Nieberding, M., Walter, U.: Vasodilator-stimulated protein phosphorylation is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur J Biochem.* 1987, **167**: 441-448
118. Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Hönig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H., Walter, U.: Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1998, **273**: 20029-20035
119. Halbrügge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbächer, P., Walter, U.: Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Biol Chem.* 1990, **265**: 3088-3093
120. Draijer, R., Vaandrager, A.B., Nolte, C., De Jonge, H.R., Walter, U., Van Hinsbergh, V.M.W.: Expression of cGMP-dependent protein kinase-I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ Res.* 1995, **77**: 897-905
121. Aszódi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X.H., Ny, L., Andersson, K.E., Kehrel, B., Offermanns, S., Fässler, R.: The vasodilator-

- stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 1999, **18**: 37-48
122. Ibarra-Alvarado, C., Galle, J., Melichar, V.O., Mameghani, A., Schmidt, H.H.H.W.: Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol Pharmacol.* 2002, **61**: 312-319
123. Mellion, B.T., Ignarro, L.J., Myers, C.B., Ohlstein, E.H., Ballot, B.A., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J.: Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. *Mol Pharmacol.* 1983, **23**: 653-664
124. Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S.: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1996, **27**: 154-158
125. Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N.: Nitric Oxide: an endogenous modulator of leucocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991, **88**: 4651-4655
126. Hickey, M.J.: Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. *Clin Sci (Colch).* 2001, **100**: 1-12
127. Peng, H.B., Spiecker, M., Liao, J.K.: Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. *J Immunol.* 1998, **161**; 1970-1976
128. Garg, U.C., Hassid, A.: Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989, **83**: 1774-1777
129. McNamara, D.B., Bedi, B., Aurora, H., Tena, L., Ignarro, L.J., Kadowitz, P.J., Akers, D.L.: L-Arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993, **193**: 291-296
130. Marks, D.S., Vita, J.A., Folts, J.D., Keane, J.F., Welch, G.N., Loscalzo, J.: Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest.* 1995, **96**: 2630-2638

131. Dubey, R.K., Jackson, E.K., Luscher, T.F.: Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cells. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin-I receptors. *J Clin Invest.* 1995, **96**: 141-149
132. Sarkar, R., Meinberg, E.G., Stanley, J.C., Gordon, D., Webb, R.C.: Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1996, **78**: 225-230
133. Hansson, G.K., Geng, Y.J., Holm, J., Hardhammar, P., Wennmalm, A., Jennische, E.: Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *J Exp Med.* 1994, **180**: 733-738
134. Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H.J., Maggi, C.A., Geppetti, P., Ledda, F.: Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994, **94**: 2036-2044
135. Guo, J.P., Panday, M.M., Consigny, P.M., Lefer, A.M., Mechanisms of vascular preservation by a novel NO donor following rat carotid artery intimal injury. *Am J Physiol* 1995, **269**: H1122-H1131
136. Tzeng, E., Kim, Y.M., Pitt, B.R., Lizonova, A., Kovesdi, I., Billiar, T.R.: Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. *Surgery* 1997, **122**: 255-263
137. Dimmeler, S., Haendeler, J., Niels, M., Zeiher, A.M.: Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med.* 1997, **185**: 601-607
138. Freiman, P.C., Mitchell, G.C., Heistad, D.D., Armstrong, M.L., Harrison, D.G.: Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombine in primates. *Circ Res.* 1986, **58**: 783-789
139. Verbeuren, T.J., Jordaens, F.H., Zonnekyn, L.L., Van Hove, C.E., Coene, M.C., Herman, A.G.: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit: influence of treatment with dipyridamole on endothelium-dependent and endothelium-independent responses in isolated aortas of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res.* 1986, **59**: 496-504

140. Simonet, S., Porro de Bailliencourt, J., Descombes, J.-J., Mennecier, P., Laubie, M., Verbeuren, T.J.: Hypoxia causes abnormal contractile response in the atherosclerotic rabbit aorta. *Circ Res.* 1993, **72**: 616-630
141. Greager, M.A., Cooke, J.P., Mendelsohn, M.E.: Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.* 1990, **86**: 228-234
142. Borg-Capra, C., Fournet-Bourguignon, M.P., Janiak, P., Villeneuve, N., Bidouard, J.P., Vilaine, J.P., Vanhoutte, P.M.: Morphological heterogeneity with normal expression but altered function of G_i proteins in cultured regenerated porcine coronary endothelial cells. *FASEB J.* 1996, **10**: A605
143. Flavahan, N.A.: Lysophosphatidylcholine modifies G-protein dependent signaling in porcine endothelial cells. *Am J Physiol* 1993, **264**: H722-H727
144. Liao, J.K., Clark, S.L.: Regulation of G-Protein α_{2i} subunit expression by oxidized low-density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995, **95**: 1457-1463
145. Verbeuren, T.J., Bonhomme, E., Laubie, M., Simonet, S.: Evidence for induction of nonendothelial NO synthase in aortas of cholesterol-fed rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993, **21**: 841-845
146. Yan, Z.-Q., Hansson, G.K.: Overexpression of inducible nitric oxide synthase by neointimal smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998, **82**: 21-29
147. Esaki, T., Hayashi, T., Asai, Y., Kumar, T.N., Kano, H., Muto, E., Iguchi, A.: Expression of inducible nitric oxide synthase in T lymphocytes and macrophages in vessels with advanced atherosclerosis. *Heart Vessels.* 1997, **Suppl 12**: 89-92
148. Behr-Roussel, D. Rupin, A., Fabiani, J.-N., Verbeuren, T.J.: Distribution and prevalence of inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic vessels of long-term cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999, **142**: 335-344
149. Kanazywa, K., Kawashima, S., Mikami, S., Miwa, Y., Hirata, K., Suematsu, M., Hayashi, Y., Itoh, H., Yokoyama, M.: Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA is increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol.* 1996, **148**:1949-1956

150. Ramasamy, S., Parthasarathy, S., Harrison, D.G.: Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res.* 1998, **39**: 268-276
151. Zembowicz, A., Tang, J.-L., Wu, K.K.: Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem.* 1995, **270**: 17006-17010
152. Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griendling, K.K., Harrison, D.G.: Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NAHPH oxidase activation: contribution to alteration of vascular tone. *J Clin Invest.* 1996, **97**: 1916-1923
153. Fukai, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, J.B., Capers, Q., Taylor, W.R., Harrison, D.G., de León, H., Wilcox, J.N., Griendling, K.K.: p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res.* 1997, **80**: 45-51
154. Strålin, P., Karlsson, K., Johansson, B.O., Marklung, S.L.: The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1995, **15**: 2032-2036
155. Beckman, J.S., Ye, Y.Z., Anderson, P.G., Chen, J., Accavitti, M.A., Tarpey, M.M., White, C.R.: Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1994, **375**: 81-88
156. Schmidt, K., Klatt, P., Mayer, B.: Hypercholesterolemia is associated with a reduced response of smooth muscle guanylyl cyclase to nitrovasodilators. *Arterioscler Thromb.* 1993, **13**: 1159-1163
157. Schmidt, K., Klatt, P., Graier, W.F., Kostner, G.K., Kukovetz, W.R.: High density lipoprotein antagonizes the inhibitory effect of oxidized low-density lipoprotein and lysolecithin on soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992, **182**: 302-308

158. Ruetten, H., Zabel, U., Linz, W., Schmidt, H.H.H.W.: Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1999, **85**: 534-541
159. Bauersachs, J., Bouloumie, A., Mülsch, A., Wiemer, G., Fleming, I., Busse, R.: Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res.* 1998, **37**: 772-779
160. Kloss, S., Bouloumie, A., Mülsch, A.: Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 2000, **35**: 43-53
161. Tertov, V.V., Orekhov, A.N., Grigorian, G.Y., Kurennaya, G.S., Kudryashov, S.A., Tkatchuk, V.A., Smirnov, V.N.: Disorders in the system of cyclic nucleotides in atherosclerosis: cyclic AMP and cyclic GMP content and activity of related enzymes in human aorta. *Tissue Cell* 1987, **19**: 21-28
162. Teng, C.M., Wu, C.C., Ko, F.N., Kuo, S.C.: YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylyl cyclase, inhibits platelet-rich thrombosis in mice. *Eur J Pharmacol.* 1997, **320**: 616-622
163. Uttenthal, L.O., Alonso, D., Fernandez, A.P., Cambell, R.O., Moro, M.A., Leza, J.C., Lizasoain, I., Esteban, F.J., Barroso, J.B., Valderrama, R., Pedrosa, J.A., Peinado, M.A., Serrano, J., Richart, A., Bentura, M.L., Santacana, M., Martinez-Murillo, R., Rodrigo, J.: Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc Res Tech.* 1998, **43**: 75-88
164. Habib, J.B., Bossaller, C., Wells, S., Williams, C., Morrisett, J.D., Henry, P.D.: Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit by treatment with the calcium-blocker PN 200110. *Circ Res.* 1986, **58**: 305-309
165. Jayakody, L., Senaratne, M., Thomson, A., Kappagoda, T.: Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit. *Circ Res.* 1987, **60**: 251-264

166. Stroes, E., Kastelein, J., Cosentino, F., Erkelens, W., Wever, R., Koomans, H., Lüscher, T., Rabelink, T.: Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1997, **99**: 41-46
167. Wang, B.Y., Ho, H.K., Lin, P.S., Schwarzacher, S.P., Pollman, M.J., Gibbons, G.H., Tsao, P.S., Cooke, J.P.: Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation* 1999, **99**: 1236-1241
168. Minor, R.L., Myers, P.R., Guerra, R., Bates, J.N., Harrison, D.G.: Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest.* 1990, **86**: 2109-2116
169. Ohara, Y., Peterson, T.E., Harrison, D.G.: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.* 1993, **91**: 2546-2551
170. Miller, F.J., Gutterman, D.D., Rios, C.D., Heistad, D.D., Davidson, B.L.: Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res.* 1998, **82**: 1298-1305
171. Luoma, J.S., Strålin, P., Marklund, S.L., Hiltunen, T.P., Särkioja, T., Ylä-Herttua, S.: Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: collocation with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1998, **18**: 157-167
172. Lynch, S.M., Frei, B., Morrow, J.D., Roberts, L.J., Xu, A., Jackson, T., Reyna, R., Klevay, L.M., Vita, J.A., Keaney, J.F.: Vascular superoxide dismutase deficiency impairs endothelial vasodilator function through direct inactivation of nitric oxide and increased lipid peroxidation. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1997, **17**: 2975-2981
173. Mügge, A., Elwell, J.H., Peterson, T.E., Hofmeyer, T.G., Heistad, D.D., Harrison, D.G.: Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res.* 1991, **69**:1293-1300
174. Greenwald, R.A.: Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents of human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med.* 1990, **8**: 201-209

175. Hattori, Y., Kawasaki, H., Abe, K., Kanno, M.: Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol.* 1991, **261**: H1086-H1094
176. Castro, L., Rodríguez, M., Radi, R.: Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994, **269**: 29409-29415
177. Crow, J.P., Beckman, J.S., McCord, J.M.: Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry* 1995, **34**: 3544-3552
178. Radi, R., Rodríguez, M., Castro, L., Telleri, R.: Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1994, **308**: 89-95
179. Moriel, P., Abdalla, D.S.: Nitrotyrosine bound to β -VLDL-apoproteins: a biomarker of peroxynitrite formation in experimental atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, **232**: 332-335
180. Pfeiffer, S., Mayer, B.: Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological pH. *J Biol Chem.* 1998, **273**: 27280-27285
181. Autor
182. Sinnaeve, P., Chiche, J.D., Nong, Z., Varenne, O., Pelt, N.V., Gerard, R.D., Collen, D., Bloch, K., Jansens, S.: Adenovirus-mediated transfer of soluble guanylyl cyclase α_1 and β_1 subunits increases nitric oxide responsiveness and reduces neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* 1998, **Supplement: I-319**

8. Publikationen:

Veröffentlichungen:

Ibarra-Alvarado, C., Galle, J., Melichar, V.O., Mameghani, A., Schmidt, H.H.H.W.: Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol Pharmacol.* 2002, **61**: 312-319

Melichar, V.O., Behr-Roussel, D., Zabel, U., Uttenthal, L.O., Rodrigo, J., Rupin, A., Verbeuren, T.J., Schmidt, H.H.H.W.: Signaling downstream of nitric oxide is impaired in atherosclerosis. (Zur Veröffentlichung eingereicht)

Kongressbeiträge:

Melichar, V.O., Zabel, U., Behr, D., Verbeuren, T.J. and Schmidt, H.H.H.W.: Einfluß der Atherosklerose auf den NO:cGMP-Signalweg. Vortrag auf der 65. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim, März 1999

Melichar, V.O., Zabel U., Behr D., Verbeuren, T.J. und Schmidt, H.H.H.W.: Alterations of the NO:cGMP-Pathway in Hypercholesterolemia induced Atherosclerosis in Rabbits. Vortrag auf dem 3. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, Erlangen, April 1999

Melichar, V.O., Zabel, U., Behr, D., Verbeuren, T.J. and Schmidt, H.H.H.W.: Dysfunction of cGMP synthesis and signaling in hypercholesterolemia induced atherosclerosis. Poster auf der 40. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Mai 1999

9. Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Vorstand Prof. Dr. Martin J. Lohse) durchgeführt.

An erster Stelle sei Prof. Dr. Harald H.H.W. Schmidt für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit gedankt. Ich hatte in ihm einen Doktorvater, der mich in der teilweise schwierigen Zeit stets unterstützte, mit neuen Anstößen und Vorschlägen versorgte, aber auch viel Eigeninitiative und Ideen forderte. Für die jahrelange Unterstützung bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet. Seiner Vermittlung und seiner Empfehlung habe ich es auch zu verdanken, daß ich am Austauschprogramm des BMEP teilnehmen und ein dreiviertel Jahr in den U.S.A. verbringen konnte.

Prof. Dr. Ulrich Walter sei herzlich für die Übernahme des Koreferats gedankt; Prof. Dr. Martin J. Lohse danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut in kollegialer Atmosphäre zu arbeiten.

Dr. Ulrike Zabel betreute zum großen Teil diese Arbeit und vermittelte mir nicht nur viele Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens, sondern war auch unersetzliche Ratgeberin bei der Vorbereitung von Abstracts, Vorträgen und Poster. Für dies und das freundschaftliche Verhältnis über die Jahre hinweg bin ich ihr sehr dankbar.

Bei meinen übrigen Laborkollegen, allen voran Dr. Christoph Kleinschnitz, mit dem ich an ähnlicher Thematik zusammenarbeitete, aber auch bei Dr. Andreas Reif, Dr. Lothar Fröhlich, Dr. Peter Kotsonis, Dipl. Chem. César Ibarra Alvarado, Dr. Mylinh La, Dr. Armin Frey, Dr. Christoph Häusler und Dipl. Chem. Pavel Nedvezky möchte ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Für die technische Unterstützung und die Vermittlung von wissenschaftlichen Arbeitstechniken aber vor allen für die nette Zusammenarbeit bin ich Birgit Wagner,

Monika Weeger, Birgit Thur und Manfred Bernhard sehr dankbar. Den nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schmidt, sowie zahlreichen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie sowie des Instituts für Medizinische Biochemie, sei für die Hilfsbereitschaft und Freundschaftlichkeit gedankt, die ich erfahren durfte.

Bei Dr. Delphine Behr-Roussel, Dr. Alain Rupin und Dr. Tony J. Verbeuren vom Institut de Recherches Servier, Suresnes, Paris, Frankreich bedanke ich mich für die jahrelange Zusammenarbeit. Ich danke ihnen besonders für die Überlassung der Aortenhomogenate sowie für die Unterstützung mit den immunhistochemischen Experimenten und die nette Einladung nach Paris.

Dr. L. Otto Uttenthal, Madrid, Spanien, Dr. Joseph Beckman, Birmingham, Alabama, U.S.A., Dr. Suzanne Lohmann, Würzburg sowie Dr. Albert Smolenski, Würzburg haben mir dankenswerterweise Antikörper für die Western-Blot Experimente dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Dr. David G. Harrison vom Institut für Kardiologie der Emory University, Atlanta, Georgia, U.S.A. hat mir ermöglicht im Rahmen des BMPE-Austauschprogramms mehrere Monate in seinem Labor auf dem Gebiet der Sauerstoffradikale mitzuarbeiten und zahlreiche neue Arbeitstechniken im Bereich der Zellkultur, Molekularbiologie und Electron-Spin Resonance zu erlernen. Dipl. Chem. Graciela A. Gamez und den anderen Mitarbeitern der Harrison-Group danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die Vermittlung von Arbeitstechniken und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Prof. Dr. Hilmar Stolte von der Medizinischen Hochschule Hannover, Gründer und Koordinator des Biomedical Sciences Exchange Program (BMPE) danke ich für die Aufnahme in das Programm, das mir die Möglichkeit dieses großartigen U.S.A.-Aufenthalts gegeben hat.

Schließlich danke ich meinen Eltern und Freunden für die anhaltende Unterstützung.

10. Lebenslauf:

Persönliche Daten

Name	Volker Otto Melichar
Geburtsdatum	8. Dezember 1973
Geburtsort	Regensburg

Schulbildung

09/1980 - 07/1984	Grundschule Passau-Grubweg
09/1984 - 08/1993	Gymnasium Leopoldinum Passau

Zivildienst

08/1993 - 10/1994	Bayerisches Rotes Kreuz, Kreisverband Passau
-------------------	--

Hochschulausbildung

11/1994 - 08/1996	Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
11/1996 - 08/2000	Klinisches Studium an der Universität Würzburg und der Emory University, Atlanta, Georgia, U.S.A.
10/2000-10/2001	Praktisches Jahr an der Universität Würzburg und der Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua.

Auszeichnungen

03/1999	Förderpreis "Fortschritte in der Medizin - Studenten forschen" des 10. Deutschen Ärztekongreß EUROMED in Leipzig für meine Arbeit auf dem Gebiet der NO:cGMP Signalgebung
04/1999	Aufnahme ins Academic Year Program des Biomedical Sciences Exchange Program der MH-Hannover

Würzburg, 10.3.2002,

Volker Melichar.