

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Oxidiertes LDL und sein Bestandteil
Lysophosphatidylcholin potenzieren die Angiotensin-II-
vermittelte Vasokonstriktion über Stimulation von RhoA**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Alexander Tapio Mameghani

aus Bad Laer

Würzburg, Oktober 2009

Referent: Prof. Dr. Jan Galle

Koreferent: PD Dr. Giles Hamilton Vince

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 13.01.2011

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Familie

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1. Definition und Bedeutung des Bluthochdruckes	1
1.1.1 Ursachen des Bluthochdruckes.....	1
1.1.2 Bluthochdruckforschung	2
1.2 Das Renin-Angiotensin System	4
1.2.1 Angiotensin II	5
1.2.2 Angiotensin II - Rezeptoren	6
1.3 Vasomotorik.....	8
1.3.1 Vasokonstriktion.....	9
1.3.2 Vasodilatation	10
1.4 RhoA-Rho-Kinase Transduktionsweg.....	12
1.4.1 Rho	12
1.4.2 RhoA und ihr Effektor, die Rho-Kinase (ROCK)	13
1.4.3 Bedeutung der RhoA/Rho-Kinase für die Vasomotorik.....	13
1.5 Endothel und endotheliale Dysfunktion	15
1.5.1 Funktion des Endothels	15
1.5.2 Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) / NO.....	16
1.5.3 Endotheliale Dysfunktion	17
1.6 Oxidiertes Low Density Lipoprotein (OxLDL).....	18
1.6.1 Bildung und Vorkommen von OxLDL	19
1.6.2 OxLDL-Rezeptoren	19
1.6.3 Wirkung von OxLDL	20
1.7 Fragestellung der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Reagenzien und Geräte.....	22
2.1.1 Chemikalien und Pharmaka.....	22
2.1.2 Lösungen.....	23
2.1.3 Geräteliste und Verbrauchsmaterial	24
2.2 Isolation und Oxidation von LDL.....	25
2.2.1 Isolation von LDL	25

2.2.2 Oxidation von LDL zu OxLDL durch CuSO ₄	25
2.2.3 Analyse des Oxidationsgrades und Proteingehalts	26
2.3 Präparation des C3-ähnlichen Exotoxins.....	26
2.4 Gefäßpräparation	28
2.4.1 Versuchstiere.....	28
2.4.1 Entnahme der Aorta thoracalis	29
2.4.2 Präparation der Aortenringe.....	29
2.4.3 Deendothelialisierung	29
2.4.4 Zeitablauf	30
2.5 Organbad	30
2.5.1 Perfusion im offenen System	30
2.5.2 Perfusion im geschlossenen System (Zirkulation)	31
2.6 Versuchsdurchführung.....	32
2.6.1 Grundprinzipien der Versuche	32
2.6.2 Vorinkubationen im Brutschrank.....	33
2.6.3 Vasokonstriktion.....	33
2.6.4 Vor- und Ko-Inkubationen im Organbad	33
2.6.5 Acetylcholin-Dosis-Wirkungs-Kurven (Ach-DWK)	33
2.7 Einzelne Versuche	34
2.7.1 Vergleiche der Ach-DWK nach Vorinkubationen mit Ang II oder PE	34
2.7.2 Vergleiche der Ach-DWK nach Vorinkubation mit OxLDL und Ang II	34
2.7.3 Effekt der OxLDL-Koinkubation auf die Vasokonstriktion durch Ang II.....	35
2.7.4 Effekt der LPC-Koinkubation auf die Vasokonstriktion durch Ang II.....	35
2.7.5 Effekt der CalyA-Koinkubation auf die Vasokonstriktion durch Ang II.....	35
2.7.6 Effekt der CalyA-Koinkubation auf die Vasokonstriktion durch OxLDL.....	35
2.7.7 Effekt durch Inhibition der PKC durch Vor-Inkubation mit Staurosporin.....	36
2.7.8 Effekt durch Inhibition von RhoA durch Vor-Inkubation mit C3.....	36
2.7.9 Effekt durch Inhibition der RhoA-Kinase durch Y27632	36
2.8 Analyse und statistische Auswertung	36
2.8.1 Analyse der Vasomotorik	37
2.8.2 Statistische Verfahren.....	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Effekt der Vorinkubation mit Ang II und PE auf die Ach-DWK.....	38

3.1.1 Vergleich der Ach-DWK nach Vorinkubation mit Ang II oder PE.....	38
3.1.2 Behandlung mit EDTA ruft keinen Unterschied hervor.....	41
3.1.3 Behandlung mit Deferoxamin ruft keinen Unterschied hervor	42
3.1.4 Behandlung mit nLDL ruft keinen Unterschied hervor	43
3.2 Effekt der Vorinkubation mit OxLDL und Ang II auf die Ach-DWK	44
3.3 Effekt von OxLDL auf die Vasokonstriktion durch Ang II	45
3.3.1 Versuche an Endothel-intakten Gefäßen	45
3.3.2 Versuche an deendothelialisierten Gefäßen	46
3.4 Effekt von LPC auf die Vasokonstriktion durch Ang II.....	47
3.5 Effekt von CalyA auf die Vasokonstriktion durch Ang II.....	48
3.6 Effekt von CalyA auf die Vasokonstriktion durch OxLDL.....	49
3.7 Effekt von Staurosporin auf die Vasokonstriktion durch Ang II.....	51
3.8 Effekt von Staurosporin auf die Vasokonstriktion durch OxLDL	53
3.9 Effekt von C3 auf die Vasokonstriktion durch OxLDL.....	55
3.10 Effekt von C3 auf die Vasokonstriktion durch LPC	58
3.11 Effekt von Y27632 auf die Vasokonstriktion durch OxLDL.....	60
3.12 Effekt von Y27632 auf die Vasokonstriktion durch LPC.....	62
4. Diskussion.....	63
4.1 Stellenwert von isometrischen Untersuchungen im Organbad	63
4.2 Vasokonstriktoren und oxidativer Stress.....	64
4.3 Effekt des nativen LDL auf die Endothelfunktion.....	65
4.4. Interaktion von OxLDL und Ang II.....	65
4.5 Wirkmechanismus von OxLDL	66
4.6 Rolle von Lysophosphatidylcholin (LPC)	70
4.7 Klinische Bedeutung	70
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	73
7. Anhang.....	99
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	99
7.2 Veröffentlichungen	106
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	107
7.4 Danksagung.....	110

1. Einleitung

1.1. Definition und Bedeutung des Bluthochdruckes

Der Bluthochdruck ist von der World Health Organization (WHO) definiert als systolischer Blutdruckwert $\geq 140\text{mmHg}$ oder als diastolischer Blutdruckwert $\geq 90\text{mmHg}$. Es werden 3 Schweregrade unterteilt. Mit steigendem Blutdruckwert nimmt der Schweregrad zu. Die Einteilung erfolgt nach epidemiologischen und klinischen Kriterien (1) (2).

In ihrer 2003 veröffentlichten Leitlinie zur Behandlung des Bluthochdruckes schätzt die WHO den Bluthochdruck mit einer Häufigkeit von 4,5% als Ursache der gesamten weltweiten Krankheitslast ein (3) (4). Auf den Bluthochdruck gehen demnach jährlich 7,1 Millionen verfrühte Todesfälle (*premature deaths*) zurück. Erkrankungen wie z.B. Schlaganfall und die koronare Herzkrankheit stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Bluthochdruck (5).

Gleichzeitig wird betont, dass der Bluthochdruck durch eine moderne Therapie prinzipiell vermeidbar ist. Das Einstellen in den normotonen Blutdruckbereich ist das Ziel der modernen Medizin (6) (7). Die Messung des Blutdruckes ist einfach (8) (9).

Wenn es auch verschiedene Therapieansätze in der Behandlung der Hypertonie gibt, wie β -Blocker, ACE-Hemmer, AT_1 -Antagonisten, Calcium-Antagonisten, α -Blocker, Antisymphotonika, Diuretika oder Vasodilatoren (10), so kann oftmals ein kausaler Therapieansatz nicht verfolgt werden, da die Ursachen des Bluthochdruckes bei der Mehrheit der Patienten nicht bekannt sind.

1.1.1 Ursachen des Bluthochdruckes

Die Ursachen für Bluthochdruck sind vielfältig und nicht endgültig geklärt.

Die essentielle Hypertonie umfasst bis 85% aller chronischen Hypertoniefälle. Ursächlich für die essentielle Hypertonie erscheinen familiäre Dispositionen zu sein, die Interaktion von genetischen Faktoren mit diversen Umwelteinflüssen. Verschiedene Pathophysiologien bestehen hierbei nebeneinander (10). Die essentielle Hypertonie stellt eine Ausschlussdiagnose sekundärer Hypertonieformen dar (11).

Nach den Mendelschen Regeln vererbte, genetische Störungen sind sehr selten. Zu ihnen zählen u.a. das Liddle-Syndrom, das Gordon-Syndrom, der Glucocorticoid-sensitive Hyperaldosteronismus oder der 17 α -Hydroxylase Defekt (12) (13) (14). Sie werden autosomal-dominant oder rezessiv vererbt. Das Phäochromozytom ist ebenfalls zu den vererbten Hypertonieformen zu zählen, wenn eine Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A oder 2B vorliegt (MEN 2A oder MEN 2B), ein Hippel-Lindau-Syndrom oder die Neurofibromatose Typ 1.

Zu den sogenannten sekundären Hypertonien (ca. 15% der Patienten) zählen die renovaskuläre und renoparenchymatöse Hypertonie, die endokrine, die kardiovaskuläre und neurogene Hypertonie, die Schwangerschaftshypertonie, sowie die Hypertonie bei Bluterkrankungen oder durch Medikamente (11).

1.1.2 Bluthochdruckforschung

Dargestellt wird im Folgenden lediglich die Geschichte der Bluthochdruckforschung in Bezug auf das Renin-Angiotensin-System (15) (16).

In der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts dokumentierte Bright bei Nierenkranken einen erhöhten Blutdruck (17). Ein Jahrhundert später postuliert auch Volhard in seinen Werken, dass Bluthochdruck durch Nierenerkrankungen ausgelöst wird (18).

Historisch gesehen sind die Erkenntnisse des Finnen Tiegerstedt und seines Assistenten Bergman am Karolinska Institut in Stockholm Ende des 19. Jahrhunderts der Anfang der Erforschung des RAS (19) (20): Im Tierexperiment reagieren Kaninchen nach Injektionen aus frischen Nierenextrakten mit

Bluthochdruck. Die Forscher postulierten daher, dass es eine Substanz in Nieren selbst gibt, die einen Bluthochdruck auslösen kann (21). Die Arbeit wurde 1898 veröffentlicht. Später wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem beschriebenen Effekt um die Wirkung des Enzyms Renin handelt.

30 Jahre später gelang Goldblatt der Nachweis, dass eine Verminderung der Nierendurchblutung beim Hund einen Bluthochdruck auslöst (22). Dazu verursachte er eine Nierenarterienstenose, indem er einen Silberclip auf das Gefäß setzte. Auch konnte er aus der ipsilateralen Nierenvene Plasma gewinnen und mit Hilfe dieses Plasmas einen Bluthochdruck auslösen. Goldblatt konnte mit seinen Arbeiten so einen renalen Ursprung eines Bluthochdruckes beweisen (23).

Weitere Schritte in der Erkenntnis um die arterielle Hypertonie waren die Erkenntnisse durch Page, Helmer (beide U.S.A.) und Braun-Menendez (Argentinien), die unabhängig und nahezu zeitgleich zeigten, dass Renin eine Peptidase ist, die das stabile und dialysierbare Angiotensin als Substrat bildet (24) (25). Der Nachweis von Angiotensin I (Ang I) gelang Skeggs (26) und von Angiotensin II (Ang II) Skeggs, Lentz, sowie Elliot und Peart (27) (28). Skeggs et al. zeigten den Zusammenhang auf, dass Ang II aus Ang I durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gebildet wird (29) (30). ACE wurde von Yang und Erdös synthetisiert. Dadurch wurde die enge biochemische Kopplung der Bildung von Angiotensin mit dem Abbau von Bradykinin offensichtlich (31).

Die Erkenntnisse über das Renin-Angiotensin-System (RAS) und das Kallikrein-Kinin-System (KKS) führten zur Entwicklung der ACE-Hemmer, AT-II-Rezeptorantagonisten und der Renin-Inhibitoren als antihypertensive Therapeutika (20):

Ferreira beschrieb 1965 in dem Venom der Schlange *Bothrops jararaca* ein ACE-hemmendes und Bradykinin-verstärkendes Peptid (32). 1977 veröffentlichten Ondetti Arbeiten zum oral verfügbaren Captopril (33).

Anfang der Neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden die Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten entwickelt (34).

Die Arbeitsgruppe von Wood beschrieb 2003 den oral verfügbaren Renin-Inhibitor Aliskiren, der schließlich 2007 zugelassen wurde (35) (36) (37).

1.2 Das Renin-Angiotensin System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Blutdrucks. Das physiologische Grundprinzip hierbei ist die Kontrolle des Flüssigkeitsvolumen durch Steuerung des Salzgehaltes und Verhinderung einer Organischämie bei akuter Blutung (38) (39).

Sowohl ein niedriger Natriumgehalt als auch eine Hypotonie bewirken in der Niere die Freisetzung der Aspartylprotease Renin in den Blutkreislauf. Renin hat als einziges Substrat das hauptsächlich hepatisch gebildete Angiotensinogen, von dem es Angiotensin I (Ang I) als Dekapeptid abspaltet.

Ang I wird durch das Angiotensin Converting Enzym (ACE) in das Effektorhormon Angiotensin II (Ang II) umgewandelt, indem weitere 2 Aminosäuren abgespaltet werden.

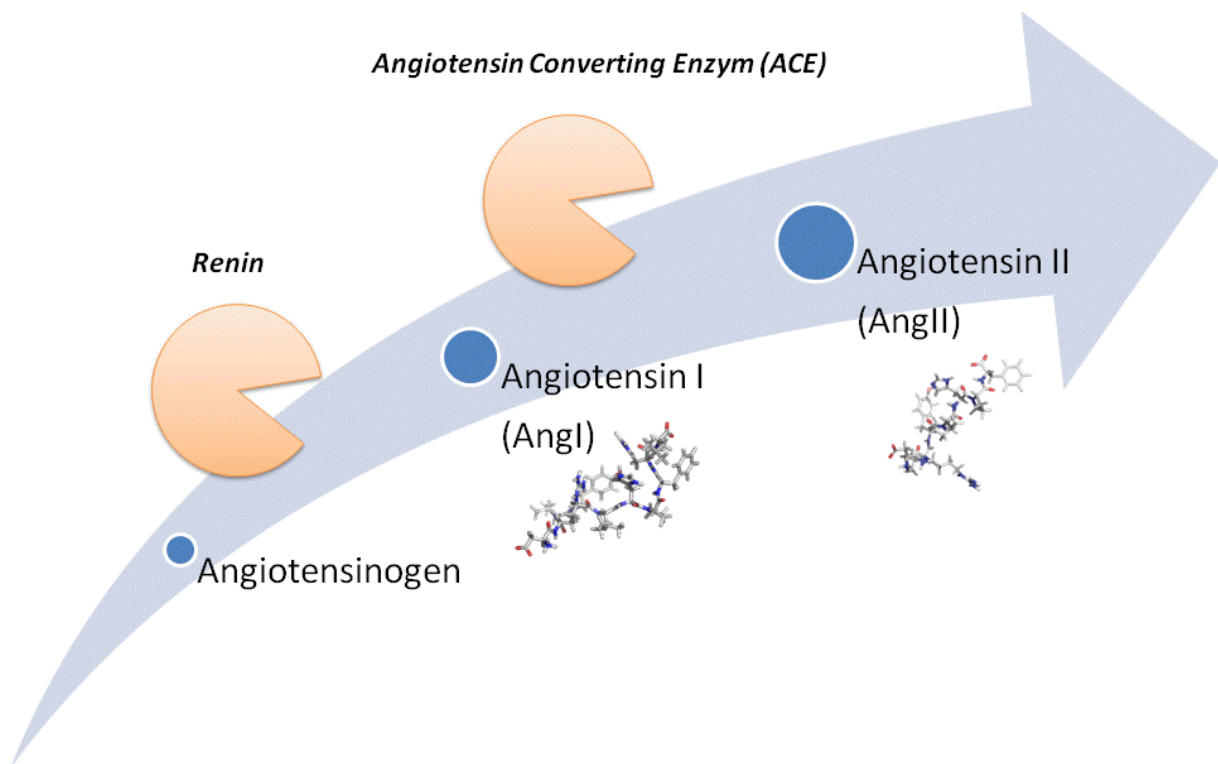


Abbildung 1: Bildung von Angiotensin II

1.2.1 Angiotensin II

Ang II ist ein Oktapeptid und besitzt die Aminosäuresequenz Asp-Arg-Val-Tyr-Iso-Hist-Pro-Phe (27). Ang II kann durch verschiedene Enzyme abgebaut werden (40) (41) (42).

Ang II bindet an seine Rezeptoren AT_1 und AT_2 . Es kann eine Blutdruckerhöhung verursachen über eine direkt vermittelte Vasokonstriktion oder indirekt über die Freisetzung von Aldosteron und konsekutiven Anstieg des Natrium- und Wassergehaltes im Körper. Es übt durch seine Rezeptoren aber auch Wirkungen aus, die nicht auf die Beeinflussung des Blutdrucks zielen.

Zudem ist Angiotensin II auch das Effektorhormon im gewebeständigen, auto- und parakrinen RAS (43) (44). Es werden so cardioprotektive und

cerebroprotektive Effekte beschrieben. Dabei spielen teilweise orts- und organspezifische Rezeptoren eine Rolle (45) (38).

1.2.2 Angiotensin II - Rezeptoren

Es gibt unterschiedliche Angiotensin-Rezeptoren (46). Neben Typ 1 (AT₁) und Typ 2 (AT₂) werden in der jüngsten Literatur auch Non-AT₁ und Non-AT₂-Bindungsstellen beschrieben, bei denen noch geklärt werden muss, ob es sich um Rezeptoren handelt (45).

AT₁ und AT₂ sind membranständige Rezeptoren. Ihr Vorkommen variiert abhängig vom Organsystem und von der Lebensentwicklung. So ist der AT₂-Rezeptor in der Embryonalentwicklung vermehrt nachweisbar, während beim Adulten der AT₁-Rezeptor in den Organen Niere, Leber oder Darm überwiegt (47) (48).

1.2.2.1 Angiotensin II – Rezeptor Typ 1 (AT₁)

Der AT₁-Rezeptor gehört zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (49) (50), die sieben charakteristische hydrophobe Domänen als transmembranäre Verankerung aufweisen. Das Gen für den AT₁-Rezeptor ist auf Chromosom 3 lokalisiert (51) (52). Die cDNA wurde Anfang der Neunziger Jahre isoliert (53) (49).

Der Rezeptor ist für Ang II sättigbar und weist eine hohe Affinität auf. In der Blutbahn zirkulieren Konzentrationen von 10⁻¹⁰M. Die Interaktion von Ang II mit dem AT₁-Rezeptor löst intrazellulär eine Signaltransduktion aus (54).

Sobald Ang II an den AT₁-Rezeptor bindet, wird intrazellulär von einem G-Protein, mehrheitlich vom G-Protein G_{q/11}, eine Untereinheit dissoziiert (55) (56) (57). Dieser Vorgang heißt Heterodimerisation. Die Untereinheit aktiviert die Phospholipase C dazu, Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) zu bilden. Inositoltriphosphat setzt Calcium aus intrazellulären Speichern frei. Zusammen mit Calmodulin wird die MLCK (Myosin-Leichtkette-Kinase)

aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert die MRLC. Daraus resultiert die Kontraktion als Myosin-Aktin-Interaktion.

Calcium und Diacylglycerol aktivieren weitere Enzyme, unter anderem Proteinkinase C, Phospholipase A₂ und Calcium-Calmodulin-Kinase (58).

Es sind für den AT₁-Rezeptor noch weitere Signaltransduktionen beschrieben worden, unter anderem für ras Protoonkogene und die MAP-Kinase-Kinase (59) (60), so dass Ang II über den AT₁-Rezeptor nicht nur die Kontraktion glatter Muskelzellen beeinflusst, sondern auch Zellwachstum und Proliferation, Hypertrophie des linken Herzventrikels oder der Gefäßmedia, endotheliale Dysfunktion und die Bildung von NO und des Superoxidanions O₂⁻ (61) (62) (63) (48).

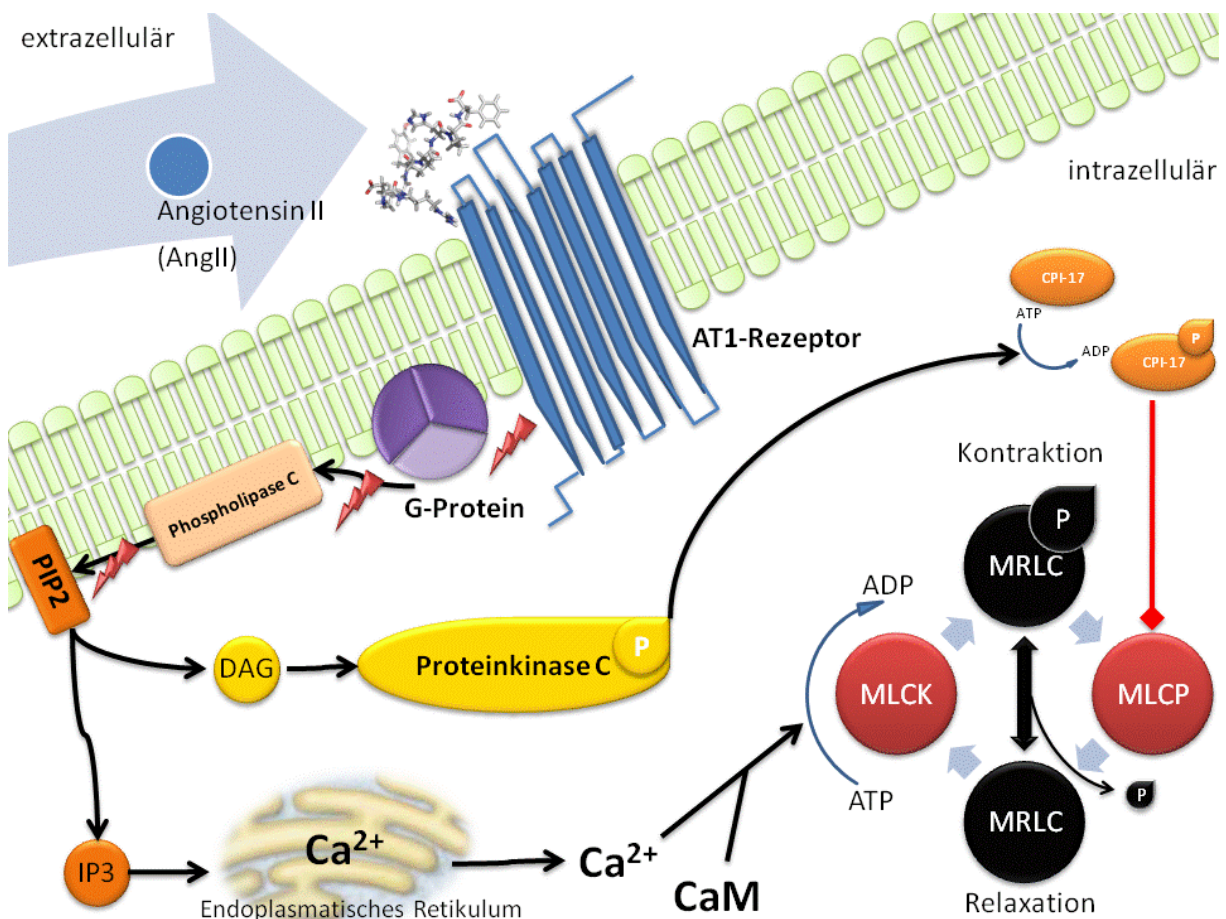


Abbildung 2: AT₁-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion. Ang II bindet an den extrazellulären Anteil des AT₁-Rezeptor. Dies bewirkt die Heterodimerisation eines G-Proteins. Die abgespaltene Untereinheit aktiviert Phospholipase C zur Bildung von IP₃ und DAG. IP₃ setzt Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum frei. Ca²⁺ kann zusammen mit Calmodulin (CaM) die MLC-Kinase (MLCK) aktivieren. MRLC (myosin regulatory light chain) wird durch die MLCK phosphoryliert. Die MLC-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert MRLC-P und bewirkt so eine Relaxation. Über DAG wird die Proteinkinase C aktiviert. Sie wiederum kann über die Phosphorylierung von CPI-17 die MLCP hemmen.

1.2.2.2 Angiotensin II – Rezeptor Typ 2 (AT₂)

Der AT₂-Rezeptor ist nur zu 32-34% homolog zum AT₁-Rezeptor, dennoch bindet an beiden Ang II. Auch der AT₂-Rezeptor gehört zur GPCR-Superfamilie. Jedoch wirkt das G-Protein inhibitorisch durch Aktivierung verschiedener Phosphatasen. Somit führt eine Aktivierung über den AT₂-Rezeptor im Gegensatz zur Aktivierung des AT₁-Rezeptors zur Vasodilatation und Natriuresis (48) (64).

Die Konzentration des AT₂-Rezeptors erhöht sich deutlich im Gewebe bei Gefäß- oder Nervenverletzungen, bei der kongestiven Herzinsuffizienz, beim Nierenversagen und bei der Myokard- und Hirnischämie (63) (65) (66).

Daher wird postuliert, dass AngII über den AT₂-Rezeptor eine gegensätzliche Wirkung hervorruft als über den AT₁-Rezeptor (48) (64) (46). Noch haben AT₂-Rezeptorliganden keine klinische Bedeutung. Mögliche Therapieansätze sind jedoch schon theoretisch formuliert worden (67).

1.3 Vasomotorik

Der Blutdruck wird maßgeblich durch die Vasomotorik beeinflusst. Relaxierende und kontrahierende Faktoren stehen sich als Antagonisten gegenüber, die den inneren Gefäßdurchmesser, das Gefäßlumen, regulierten. Der Blutdruck in einem Gefäß ist berechenbar durch das Ohmsche Gesetz und das Hagen-Poiseuillesches Gesetz II.

Ohmsches Gesetz: $P = Q \times R$

Hagen-Poiseuillesches Gesetz II: $R = \frac{8 \times \eta \times L}{p \times r^4}$

Dabei ist P der Blutdruck, Q der Blutfluss, R der Gefäßwiderstand, η die Viskosität, L die Gefäßlänge, p der Gefäßdruck und r der Gefäßradius. Beide Gesetze erklären, warum eine Veränderung des Gefäßradius den Gefäßdruck maßgeblich beeinflusst.

Die Vasomotorik kann sowohl durch Faktoren wie shear stress und die pulsatile Wanddehnung (68) (69) beeinflusst werden, als auch durch Agonisten wie z.B. Angiotensin II (70).

1.3.1 Vasokonstriktion

Der primäre Mechanismus der Vasokonstriktion ist die Phosphorylierung der Myosin-Regulator-Leichtkette (MRLC = myosin regulatory light chain) durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), wenn diese durch den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex (Ca^{2+} -CaM) phosphoryliert wird. Dieser Mechanismus ermöglicht Aktin, die Myosin-ATPase zu aktivieren (71).

Initial steht der rasche Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, der durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, vorwiegend dem endoplasmatischen Retikulum, erreicht wird. Das Ca^{2+} bildet dann mit Calmodulin den aktivierenden Komplex.

Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) bewirkt diese Ca^{2+} -Freisetzung. IP3 wird mit DAG aus der Spaltung von PIP2 durch die Phospholipase C gebildet. Die Phospholipase C wiederum steht unter dem Einfluss von G-Proteinen, die durch verschiedene Rezeptoren aktiviert werden können. Zu diesen G-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehören auch die AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren. Der AT_1 -Rezeptor aktiviert vornehmlich den $\text{G}_{q/11}$ -Signalweg (54).

Weitere Agonisten an GPCR sind z.B. Endothelin oder Phenylephrin. Deren Signaltransduktion entspricht dem Schema der Abbildung 2.

Unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration ist die Kontraktion, welche durch die Aktivierung von CPI-17 durch die Proteinkinase C hervorgerufen wird. CPI-17 hemmt die MLCP. Durch Anheben des Phosphorylierungsgrades der MRLC resultiert eine Kontraktion (72) (73) (74).

Ebenso Ca^{2+} -unabhängig ist die Hemmung der MLCP über die $\text{G}_{12/13}$ -Signalkaskade. Hier kommt es zu einer Aktivierung von Rho, einem kleinen G-Protein, das über seinen Effektor, die Rho-Kinase (ROCK), die MLCP phosphoryliert und somit inhibiert (75) (76).

Der Ca^{2+} -unabhängige Weg zur Kontraktion wird als Ca^{2+} -Sensitivierung (in englisch: Ca^{2+} -sensitization) genannt und meint eine Zunahme der Kontraktion bei konstanter zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration.

1.3.2 Vasodilatation

Der primäre Mechanismus der Vasodilatation ist die Dephosphorylierung der MRLC, bzw. die Herabsetzung des Phosphorylierungsgrades der MRLC (71). Ebenso wie es bei der Kontraktion einen Ca^{2+} -abhängigen und einen Ca^{2+} -unabhängigen Weg gibt, kann eine Vasodilatation über verschiedene Mechanismen erzielt werden (75).

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum über den $\text{G}_{q/11}$ -Signalweg mit Freisetzung von IP_3 kann durch die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGKI) gehemmt werden, indem das IP_3 -Rezeptor-assoziierte Protein IRAG (IP3-receptor associated cGKI substrate) durch cGKI β phosphoryliert und somit inhibiert wird (77) (78) (79) (80). Die Aktivierung von cGKI β erfolgt über cGMP, welches durch die Guanylatzyklase aus dem Substrat GTP gebildet wird. Die lösliche Guanylatzyklase wird in der glatten Muskelzelle stimuliert durch NO, das im Endothel durch NO-Synthasen gebildet wird.

Der maßgebliche Mechanismus von cGMP auf die Vasodilatation ist die Aktivierung der cGKI-vermittelten Phosphorylierung Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle (BK_{Ca}) (81) (82). Die resultierende Hyperpolarisation der Zellmembran führt

dadurch zur Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (L-Typ). Der verminderte Ca^{2+} -Einstrom bewirkt eine niedrigere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (83).

cGMP aktiviert jedoch über cGKIα auch direkt die MLCP (84) (85). Die Dephosphorylierung der MRLC kann ebenso durch direkte Aktivierung der heterotrimerischen MLC-Phosphatase (MLCP) hervorgerufen werden. Hartshorne et al. beschrieben diese Phosphatase als SMMP-1M (smooth muscle myosin phosphatase 1M) (86). Somlyo et al. zeigten, dass die Dephosphorylierung der MRLC unabhängig von der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch G-Proteingekoppelte Signalwege über eine direkte Aktivierung der MLCP reguliert werden kann (87) (75).

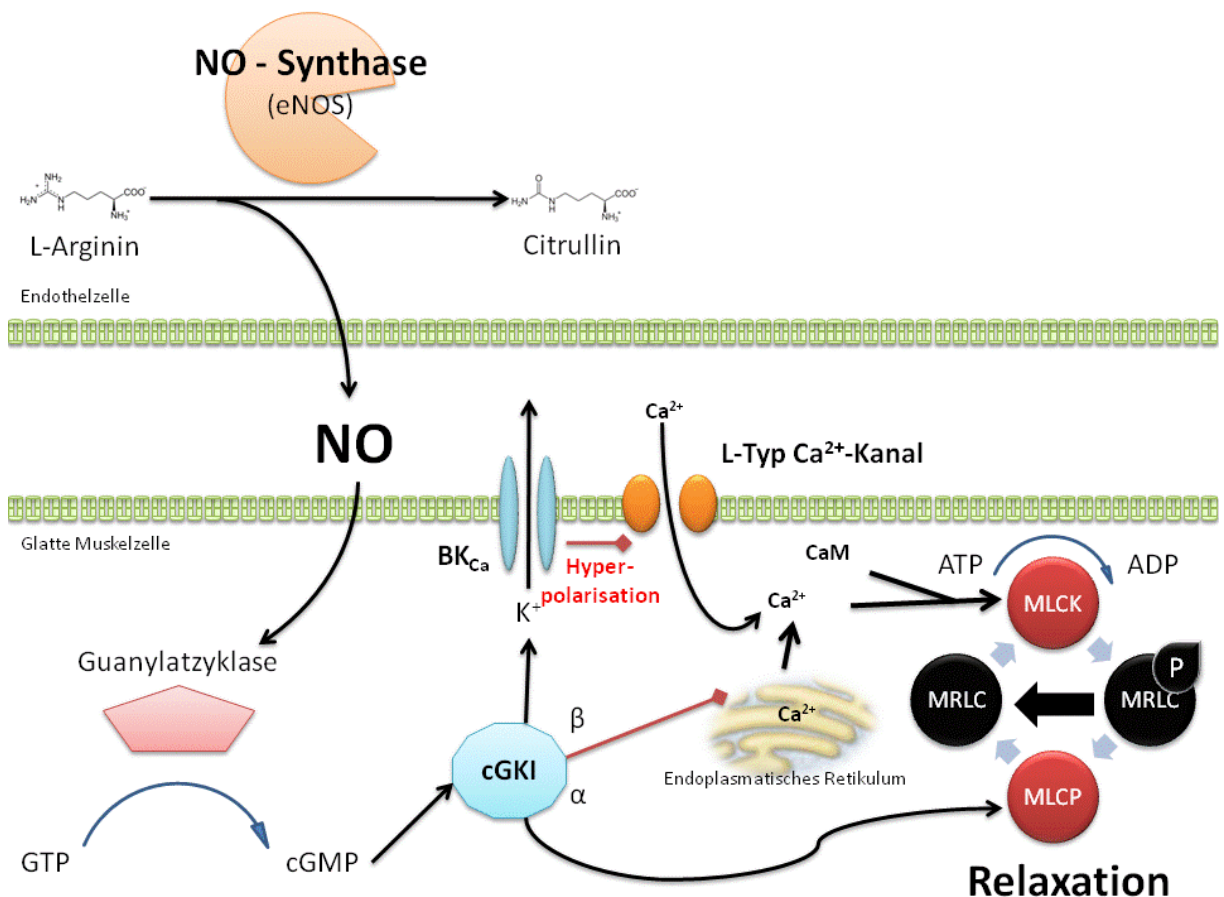


Abbildung 3: Das endothelial gebildete NO bewirkt in der glatten Muskelzelle einen Anstieg der cytoplasmatischen cGMP-Konzentration durch Stimulation der Guanylatzyklase (GC). Das aus GTP gebildete cGMP bewirkt über Aktivierung der (zytosolischen) cGKI verschiedene Mechanismen: (1)

Erhöhung der Offen-Wahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen (BK_{Ca}), was zu einer Hyperpolarisation führt. Dies hat zur Folge, dass Ca^{2+} -Kanäle, vornehmlich L-Typ-Kanäle, inhibiert werden und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration sinkt. (2) Am endoplasmatischen Retikulum wird IRAG inhibiert und somit wird der IP3-Rezeptor/ Ca^{2+} -Kanal inhibiert und der Ca^{2+} -Ausstrom ins Zytosol verhindert. (3) Ca^{2+} -unabhängig kann die MLCP aktiviert werden. Die Wirkung der NO/cGMP-Signaltransduktion ist die Herabsetzung des Phosphorylierungsgrades der MRLC und damit die Relaxation der glatten Muskelzelle.

1.4 RhoA-Rho-Kinase Transduktionsweg

Die Kontraktion der Gefäßmuskulatur wird nicht nur durch die intrazelluläre, zytosolische Calciumkonzentration über die Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten (MLC) bewirkt, sondern auch über Veränderungen der Aktivität der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP), die wiederum unter dem Einfluss des RhoA-Rho-Kinase-Transduktionswegs steht (75).

1.4.1 Rho

Rho-Proteine gehören zur Superfamilie der kleinen G-Proteine (small GTP-binding proteins, synonym: small GTPase) und bilden zusammen mit Rac-Proteinen und Cdc42-Proteinen eine Familie, die eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Reorganisation des Cytoskeletts und der Genexpression einnimmt (88). Etliche Rho-Proteine sind bekannt, denen gemeinsam ist, dass es sich um monomere, GTP-bindende Proteine handelt mit Größen zwischen 20 und 40kD, die auf ein Signal hin aktiviert werden können und in der aktivierten Form wiederum einen Effektor aktivieren. Da Rho-Proteine ihre Form interkonvertibel ändern können – inaktiv, wenn sie an GDP und aktiv, wenn sie an GTP binden – fungieren sie als Schalter bei der Transduktion (89).

Die Namensgebung Rho geht auf das 1984 in der Meeresschnecke *Aplysia* erstbeschriebene Rho-Gen zurück, das (90) homolog zu dem schon bekannten Gen des kleinen G-Protein Ras erschien (ras homologue).

1.4.2 RhoA und ihr Effektor, die Rho-Kinase (ROCK)

RhoA beeinflusst z.B. die Ausrichtung von Stressfilamenten auf Stimulation von Wachstumsfaktoren (91), die Neuriten-Retraktion in Nervenzellen (92) und auch die Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten (MLC) (93).

RhoA kann durch das Exotoxin des Bakteriums *Clostridium botulinum* C3 durch ADP-Ribosylierung der Bindestelle zum Effektor inaktiviert werden (94) (95) (96) (97). Durch RhoA-Inhibition und auch durch Mikroinjektionen von rekombinant gebildetem RhoA-Analogon konnte die Funktion von RhoA besser verstanden werden (98).

1.4.3 Bedeutung der RhoA/Rho-Kinase für die Vasomotorik

Für die Beeinflussung der Vasokonstriktion konnte RhoA eine wichtige Bedeutung zugeordnet werden, da RhoA durch Agonisten an GPCR, die zur $G_{12/13}$ -Familie gehören, den Effektor Rho-Kinase aktivieren kann (99) (100).

Die Rho-Kinase phosphoryliert die MLCP und inhibiert sie dadurch. Die Folge ist die Erhöhung des Phosphorylierungsgrades der MRLC und konsekutiv die Kontraktion in der glatten Muskelzelle (101) (102). Von den zwei bekannten Isoformen der Rho-Kinase ist die ROCK2 (synonym ROK α) die eigentliche Rho-Kinase. Ein pharmakologischer Inhibitor der Rho-Kinase ist Y27632.

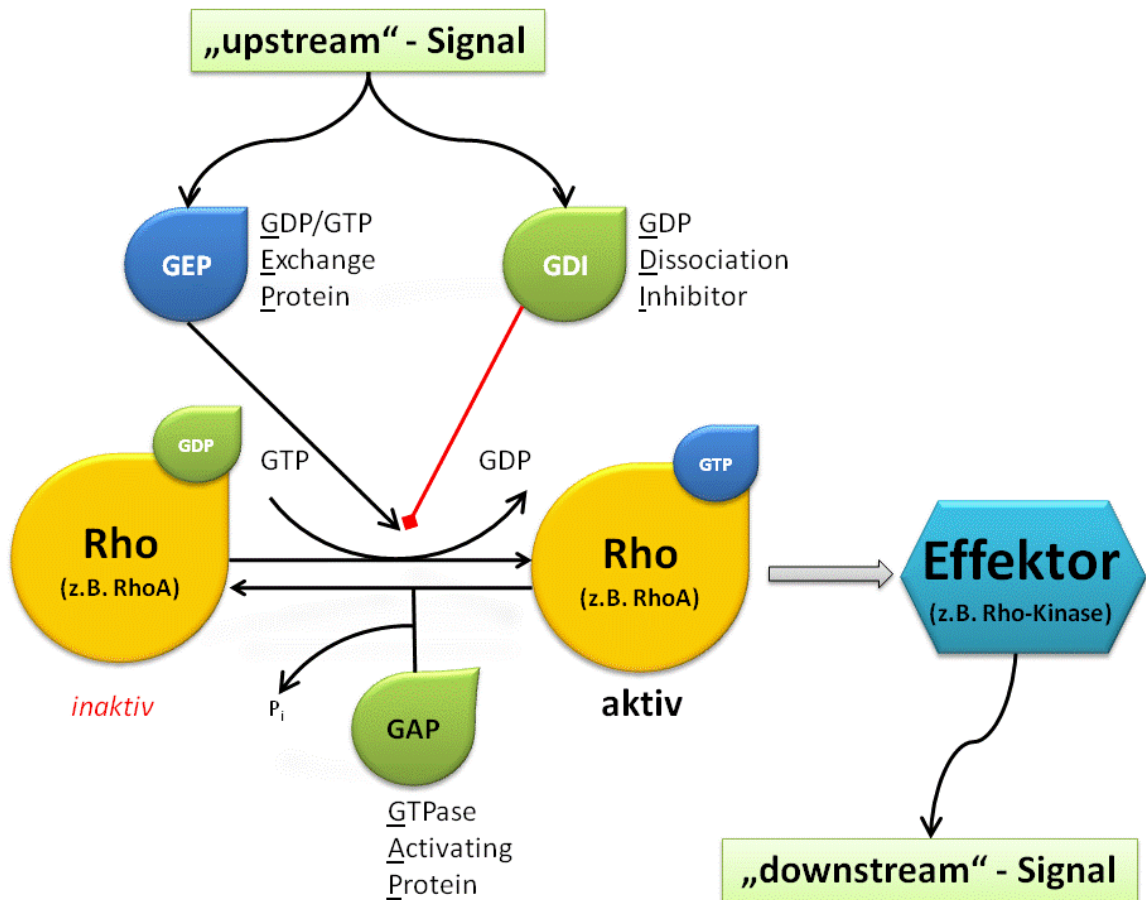


Abbildung 4: small GTP-binding proteins, zu denen die Familie der Rho-Proteine und dessen Vertreter RhoA gehören, werden durch ein „upstream signal“ aktiviert, indem GEP eine Dissoziation zwischen Rho und GDP bewirkt. Es kann dann GTP an Rho binden, was gleichbedeutend ist mit einer Aktivierung. Der Gegenspieler der Aktivierung ist GDI, das den Dissoziationsschritt unterbindet. Das aktivierte Rho kann dann den Effektor, für RhoA ist es die Rho-Kinase, aktivieren, und so das „downstream signal“ bewirken.

Im Tiermodell der spontan hypertensiven Ratte (SHR) konnte eine Hochregulation der RhoA-/Rho-Kinase-Aktivität gezeigt werden (103) (104). Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 verursacht in diesem Tiermodell eine größere Vasodilatation als in einem normotensiven Kontroll-Tiermodell (105), so dass postuliert werden kann, dass die RhoA/Rho-Kinase-Aktivität beim chronischen Bluthochdruck hochreguliert ist (106) (107). Dies stellt einen möglichen neuen therapeutischen Ansatzpunkt für eine Behandlung des chronischen Bluthochdrucks dar (108).

1.5 Endothel und endotheliale Dysfunktion

Gefäße sind dreischichtig aufgebaut. Der äußeren Schicht, der Tunica externa, liegt die Tunica media, kurz Media genannt, innenseitig an. In ihr liegen die glatten Muskelzellen. Die innere Schicht, Tunica intima, besteht aus elastischen Fasern, dem Spatium subendotheliale aus lockerem Bindegewebe und als innerste Auskleidung einer einlagigen Zellschicht (Monolayer), dem Endothel. Das Endothel des Menschen kleidet ein Lumen mit einer Fläche von ca. 1000m² aus und besitzt als endokrines/autokrines Organ eine Körpermasse von ca. 0,1kg (109).

Anfang der Achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass die Unversehrtheit des Endothels maßgeblich für die durch Acetylcholin oder Histamin vermittelte Vasodilatation ist (110). Furchgott und Zawadzki postulierten eine humorale Substanz, die im Endothel gebildet wird und die Vasodilatation vermittelt. Dieser zunächst „endothelium-derived relaxing factor“ (ERDF) genannte Faktor ist identisch mit Stickstoffmonoxid (NO) (111), vom dem schon bekannt war, dass es eine Signalmolekül sein kann (112). Die Erkenntnisse um die Bedeutung von NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System führten zur Auszeichnung von Furchgott, Murad und Ignarro mit dem Nobelpreis der Medizin 1998 (113).

1.5.1 Funktion des Endothels

Ogleich das Endothel aus morphologischer Sicht ein einfaches Organ ist, sind seine metabolischen Fähigkeiten extrem komplex.

Seit der erfolgreichen Kultivierung von Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (114) gelang der Nachweis, dass das Endothel neben einer Vielzahl von Enzymsystemen, u.a. das RAS (115), auch Prostaglandine produziert (116) und den Vasotonus beeinflusst (117), sowohl über relaxierende (118), als auch konstringierende Faktoren, z.B. Ang II. Der stärkste bekannte Vasokonstriktor, das Endothelin, wird im menschlichen Körper ebenfalls vom Endothel gebildet (119).

Ferner hat das Endothel Anteil am Gerinnungssystem (120) (121), nicht nur durch anti- sondern auch durch prothrombotische Komponenten. Das Endothel ist dadurch auch bei Entzündungsreaktionen, Leukozyteninteraktionen (122) und der Vermeidung der Atherosklerose von wichtiger Bedeutung (123) (124). Die endothelialen Funktionen sind dabei durch gleichzeitige Sekretion von diversen Agonisten und Antagonisten sehr komplex vermittelt (120) (125).

1.5.2 Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) / NO

Der von Furchgott und Zawadzki postulierte Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) ist identisch mit dem volatilen Gas und starken freien Radikal Stickstoffmonoxid (NO) (111) (126). NO wird im Endothel durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS III) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS II) gebildet. NO hat ein niedriges Molekulargewicht und diffundiert leicht durch Zellmembranen aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften. Die Bildung von NO durch NO-Synthasen kann durch Tetra-hydro-Biopterin beschleunigt werden. Während die konstitutive eNOS NO für eine kurze Zeit freisetzt auf Stimuli durch Acetylcholin oder Bradykinin, kann die iNOS ein Vielfaches an NO für eine längere Zeit freisetzen nach Stimulierung durch proinflammatorische Zytokine wie den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) (127) (128).

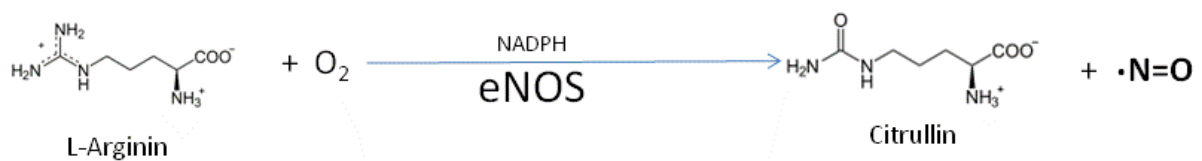


Abbildung 5: Die Bildung von NO aus Arginin. In Anwesenheit von Nicotinamid-Adenin –Dinucleotid-Phosphat (NADPH) und anderen Co-Faktoren konvertiert die eNOS die Aminosäure L-Arginin zu NO und Citrullin (129).

Durch die endotheliale, konstitutive NO-Synthase erfolgt eine basale NO-Bildung aus L-Arginin. *In vitro* kann die NO-Bildung verstärkt werden, z.B. durch Bradykinin (130), Histamin (131), ADP und ATP (132), Serotonin (133),

Substanz P (134), Acetylcholin (110) oder einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck (135). Insbesondere jedoch beeinflussen der „shear stress“ und die pulsatile Wanddehnung *in vivo* die NO-Freisetzung (68) durch spezialisierte Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (69). Der nach endoluminal gerichtete hochspezialisierte Endothelglycocalix, bestehend aus Glykolipiden, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen, ist für die Auslösung dieser Hyperpolarisation entscheidend notwendig (136).

In der Literatur werden unter den vielfältigen Wirkungen zwei Hauptwirkungen durch NO beschrieben: 1.) Die Hemmung der Plättchenaggregation (137) durch Sekretion ins Gefäßlumen und 2.) die Vasodilatation durch Sekretion nach abluminal zur Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase (120). In diesen Wirkungen ist NO synergistisch zu Prostacyclin (138) und dem Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (139).

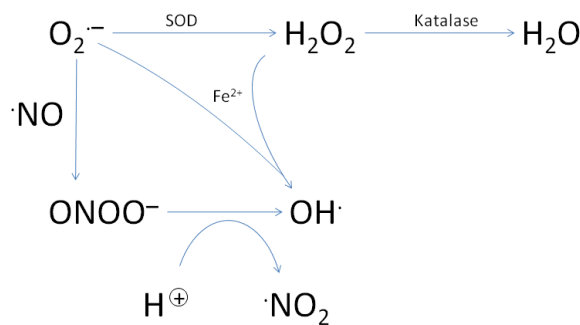


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Reaktion von NO und Superoxid-Anion zu Peroxynitrit (ONOO^-), Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) und Nitrogendioxid ($\text{NO}_2\cdot$). Die Superoxiddismutase (SOD) kann das Superoxid-Anion zu H_2O_2 umwandeln, welches wiederum

Substrat für die Katalase ist.

NO kann mit freien Radikalen wie z.B. dem Superoxid-Anion (O_2^-) reagieren (140), so dass eine Abschwächung der NO-Wirkung durch erhöhten oxidativen Stress möglich ist (141) (142). Gleichzeitig kann eine hohe NO-Konzentration einen oxidativen Stress bedeuten, so dass NO auch eine zytotoxische Wirkung zugeschrieben wird (143) (144).

1.5.3 Endotheliale Dysfunktion

Ist die Balance z.B. zwischen NO und Ang II gestört, können Vasokonstriktion und atherogene Effekte überwiegen (145). Bei Funktionsstörungen des

Endothels, diese Balance aufrechtzuerhalten, gestört, spricht man von endothelialer Dysfunktion.

Neben den klassischen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Rauchen oder Diabetes führen aber auch Hyperhomocysteinämie, Infektionen durch Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, Cytomegalievirus, Herpes zoster Virus (124) (146) direkt oder über die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP 60) zur NF- κ B-Stimulation und somit zur Produktion von pro-atherogenen Zytokinen wie TNF α , Interleukin IL-1 und IL-6, Adhäsionsmolekülen und Chemokinen (147) (148).

In dieser Arbeit wird die Bedeutung von oxidierten Lipoproteinen in der endothelialen Dysfunktion behandelt. Im Tierexperiment wurde gezeigt, dass eine Hypercholesterinämie zur endothelialen Dysfunktion führt (149). Ferner wurde aufgezeigt, dass nicht erst in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose bei ausgeprägten morphologischen Veränderungen die endotheliale Funktion beeinträchtigt ist, sondern bereits in einem sehr frühen Stadium (150).

Heute wird postuliert, dass die endotheliale Dysfunktion der Initialschritt der Atherosklerose ist (151).

1.6 Oxidiertes Low Density Lipoprotein (OxLDL)

Native LDL-Cholesterol Moleküle können leicht oxidiert werden (152). Während natives LDL (nLDL) keine inflammatorische Antwort hervorruft und nicht zur Bildung von Schaumzellen beiträgt, wenn es phagozytiert wird, ist oxidiertes LDL (OxLDL) hoch immunogen und bewirkt eine Hochregulation von Scavenger-Rezeptoren und toll-like-Rezeptoren. OxLDL findet sich in allen atherosklerotischen Läsionen und rufen die Bildung von spezifischen, gegen OxLDL gerichteten Antikörper hervor.

1.6.1 Bildung und Vorkommen von OxLDL

In atherosklerotischen Läsionen gelingt der Nachweis sowohl von nativem wie oxidiertem LDL. Mit den Arbeiten von Steinberg und Ylä-Herttuala wurde der Nachweis und die Bedeutung von OxLDL in diesen Läsionen geliefert (153).

OxLDL entsteht in der Gefäßwand aus nLDL: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), unter denen das Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$ eine herausragende Stellung einnimmt und zu denen auch Peroxynitrit ($ONOO^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxylradikal (OH) und Nitrogendioxid (NO_2) gehören, können den Lipidanteil von nLDL-Partikeln oxidieren (152). Die Bildung der Superoxidanionen erfolgt konstitutiv durch verschiedene Enzyme, hauptsächlich durch die endotheliale NAD(P)H-Oxidase (154) (155) (156).

1.6.2 OxLDL-Rezeptoren

OxLDL wird über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen (157): LOX-1 ist ein transmembranes Protein, das primär in Endothelzellen von Rinderaorten gefunden wurde (158). LOX-1 ist nicht spezifisch für OxLDL, sondern bindet auch AGEs (advanced glycation end-products), apoptotische Zellen und diverse Bakterien (159).

Zu den Zellen, die LOX-1 exprimieren gehören neben Endothel-Zellen auch Macrophagen und glatte Muskelzellen. In atherosklerotischen Läsionen findet sich LOX-1 (160).

Im Tiermodell der Watanabe Kaninchen (Watanabe rabbit) ist LOX-1 im Anfangsstadium der Atherosklerose überexprimiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch das Vorhandensein der LOX-1-Rezeptoren für die initialen Schritte der Atherosklerose wichtig ist (161). Die Bedeutung der LOX-1-Rezeptoren kann eventuell durch anstehende Untersuchungen an transgenen Mäusen weiter geklärt werden, in denen das *Lox1*-Gen ausgeschaltet wurde (*Lox1*^{-/-} deficient knock out mice).

1.6.3 Wirkung von OxLDL

OxLDL bewirkt die Freisetzung von Phospholipiden in der Gefäßintima und kann Endothelzellen aktivieren, Adhäsionsmoleküle zu präsentieren und in der Folge Monozyten zu binden (162) (163). Bedeutsam sind neben dem zytotoxischen Effekt die Stimulation pro-inflammatorischer Genaktivität und gleichwohl die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (164). OxLDL verursacht eine Thrombozytenaktivierung, eine Expression von Metalloproteinasen und begünstigt die Thrombogenese (165).

OxLDL aktivieren Monozyten, sich in Makrophagen umzuwandeln. Durch die gesteigerte Expression der Scavenger- und toll-like-Rezeptoren wird OxLDL phagozytiert. OxLDL wird in den Makrophagen jedoch nicht abgebaut (166), was zur Bildung der charakteristischen Schaumzellen in atherosklerotischen Läsionen führt. Schaumzellen wiederum triggern die Immunreaktion über Interaktion mit T-Lymphozyten (167).

Der oxidative Stress im Gewebe wird durch OxLDL beeinflusst, indem vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, z.B. durch Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in Endothelzellen (168) (169). Bestandteile von OxLDL, das Lysophosphatidylcholin (LPC), aktivieren die Proteinkinase C und Erhöhen über diesen Signalweg die Superoxidanionenkonzentration (170).

Die Rolle von OxLDL an glatten Muskelzellen ist nicht gänzlich geklärt. Dass hypercholesterinämische Kaninchen eine verminderte Vasodilatation auf Acetylcholin zeigen, konnten Galle et al. zeigen (171). Die erhöhte Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies scheint eine sinnvolle Erklärung zu sein. Ebenso führt OxLDL an isolierten Gefäßen zu einer verminderten Vasodilatation auf Acetylcholin, ruft jedoch an deendothelialisierten Gefäßen eine Vasokonstriktion hervor und potenziert die durch andere Agonisten bewirkte Vasokonstriktion (172) (173) (174).

1.7 Fragestellung der Arbeit

Hat OxLDL eine Wirkung auf die Angiotensin II-vermittelte Vasokonstriktion durch eine Ca^{2+} -Sensitivierung, indem der RhoA-/Rho-Kinase-Signaltransduktionsweg beeinflusst wird?

Zunächst wird untersucht, ob Angiotensin II oder andere Konstriktoren einen Einfluss auf die Dilatationsfähigkeit isolierter Kaninchenarterien besitzen, wenn diese über mehrere Stunden einer hohen Substanzkonzentration ausgesetzt sind. Weiter wird versucht, durch selektive Ausschaltung antioxidativer Systeme, den oxidativen Stress im Modell zu erhöhen und so einen Effekt auf die Dilatationsfähigkeit zu registrieren. Diese Vorversuche dienen zur Klärung der Frage, welche Rolle der oxidative Streß im verwendeten Modell spielt.

Es soll dann, ausgehend von den Arbeiten von Bolz, Galle, Pohl et al. (175), an isolierten Kaninchenarterien versucht werden, mit bekannten pharmakologischen Inhibitoren des Rho-/Rho-Kinase-Transduktionsweges, die OxLDL-vermittelte Gefäßantwort zu beeinflussen.

Vergleichend hierzu werden pharmakologische Inhibitoren anderer Signalwege, die eine Ca^{2+} -Sensitivierung bewirken, eingesetzt. Entfaltet OxLDL seine Wirkung auf die Angiotensin II-vermittelte Konstriktion über die Proteinkinase C oder die Myosin-Leichtketten-Phosphatase?

Parallel zu den OxLDL-vermittelten Gefäßantworten wird die LPC-vermittelte Gefäßantwort isolierter Kaninchenarterien untersucht mit der Frage, ob LPC die OxLDL-vermittelten Effekte in diesem Modell ebenso hervorrufen kann.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Pharmaka

Angiotensin II, Acetylcholin, L-Phenylephrin, Ethylen-diamin-Tetraacetylsäure, N^G-nitro-L-Arginin, Butyl-hydroxy-Toluen, Dimethylsulfoxid, Kaliumpyrophosphat, Deferoxamin (Desferrioxamin-mesylat), DDC (Diethyl-Dithiocarbamat) und Hepes wurden von der Firma Sigma, (München, Deutschland) bezogen.

Ethanol wurde von der Firma J.T. Baker BV (Deventer, Niederlande) bezogen.

Wasserfreie (D+) Glucose, Calcium-Triplex[®]-Dihydrat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid-Dihydrat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Brenztraubensäure-Natriumsalz, Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, Kupfersulfat und Gentamicin (Refobacin[®]) wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

PBS wurde von der Firma PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland, bezogen.

Natriumhydrogencarbonat und Kaliumdihydrogenphosphat wurden von der Firma Riedel-de Häen (Seelze Deutschland) bezogen und die Pharmaka Chloramphenicol (Paramyxin[®]) von der Firma Boehringer (Mannheim, Deutschland), Aprotinin (Trasylo[®]) von der Firma Bayer (Leverkusen, Deutschland), Felodipin von der Firma Astra Chemicals (Wedel, Deutschland), Losartan von der Firma Merck, Sharp & Dome (München, Deutschland), Quinapril von der Firma Gödecke AG (Freiburg, Deutschland) und Y27632 ((+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)) wurde freundlicherweise von der

Firma Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd (Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt.

FCS und RPMI wurden von der Firma Biochrom AG seromed[®], Berlin, Deutschland, bezogen.

Carbogen-Gas wurde von der Firma Tyczka-Industriegase (Mannheim, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Lösungen

2.1.2.1 Präparations- und Transportpuffer

Unmittelbar nach Entnahme der Gefäße wurden diese mit einer Tyrode durchspült, in dieser zum Labor transportiert und in dieser dort präpariert. Die Zusammensetzung der Tyrode war:

NaCl 132 mmol/l, KCl 4,0 mmol/l, CaCl₂-2H₂O 1,6 mmol/l, MgCl-6H₂O 1,0 mmol/l, NaH₂PO₄-2H₂O 11,9 mmol/l, NaHCO₃ 36,0 mmol/l, Ca²⁺-Triplex[®] 0,05 mmol/l, Glucose 5 mmol/l

2.1.2.2 Perfusionspuffer

Im Organbad wurden die Gefäße mit einem Puffer perfundiert, der durch Carbogen-Gas-Insufflation auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt worden war. Während des Versuchs wurde das Perfusat ununterbrochen mit einem Sauerstoff/Carbogen-Gasgemisch begast (95% O₂, 5% CO₂). Der Puffer hatte die Zusammensetzung:

CaCl(2H₂O) 1,87 mmol/l, KCl 2,6 mmol/l, MgCl₂(6H₂O) 0,5 mmol/l, NaCl 137 mmol/l, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acid (Hepes) 9,1 mmol/l, Glucose 2,8 mmol/l, NaH₂PO₄ 0,35 mmol/l

2.1.2.3 Antioxidationspuffer für Frischplasma

Der Antioxidationspuffer besteht aus EDTA als Antioxidans, Aprotinin als Proteasehemmer und den Antibiotika Gentamycin und Chloramphenicol in folgender Zusammensetzung:

EDTA 200 mmol/l, NaCl 300 mmol/l, Aprotinin 10 IE/ml, Gentamycin 40 mg/ml, Chloramphenicol 200mg/ml

2.1.2.4 Inkubationspuffer (RPMI)

Für Inkubationen wurden die Gefäße in RPMI-Puffer für mehrere Stunden gelegt. Der RPMI-Puffer, benannt nach dem Institut der Entwickler (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, USA), war serumfrei und mit Phenolrot als pH-Indikator versetzt.

2.1.3 Geräteliste und Verbrauchsmaterial

Lichtmikroskop Firma Zeiss, Deutschland

Thermostat Typ F1/D, Firma Haake, Deutschland

Rollenpumpe Typ IPC und Schläuche, Firma Ismatec, Deutschland

Glasgefäße Firma Kummer, Freiburg, Deutschland

Force Transducer F30 Typ 372, Firma HSE Hugo Sachs Elektronik, Deutschland

Dreikanalschreiber Typ R-63, Firma Rikadenki, Freiburg, Deutschland

Organbad, Firma HSE Hugo Sachs Elektronik, Deutschland

pH-Meter CG 825, Firma Schott, Mainz, Deutschland

Ultrazentrifuge Optima Beckman, Fullerton, USA

Zentrifugenröhrchen Beckman Quick Seal™ 36ml, Fullerton, USA

Dialyseschläuche Spectra/por® 6 membran, Spectrum Laboratori Products, Houston, USA

Millipore-Filter Centrifugal Ultrafree®-20 Firma Millipore Co., Bedford, USA

Brutschrank Heraeus instruments GmbH, Hanau, Deutschland

Six-wells, 96er-wells, Kryotubes NUNC GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland

Spektralphotometer Lambda 12, Firma Perkin-Elmer GmbH

Agarosegel Lipidophor Firma Immuno, Heidelberg, Deutschland

Eppendorf-Caps, Firma Eppendorf, Deutschland

Einwegspritzen, Firma Braun, Deutschland

Einwegkanülen, Firma Braun, Deutschland

2.2 Isolation und Oxidation von LDL

2.2.1 Isolation von LDL

LDL wurde gewonnen aus gepooltem Plasma von gesunden Spendern aus der lokalen Blutbank der Universitätsklinik Würzburg. LDL wurde während der Arbeiten alle 2 Wochen neu gewonnen. Galle und Wanner haben die Schritte zur Präparation von LDL und OxLDL u.a. 1998 beschrieben (176):

Zunächst wird dem frischen Plasma als Schutz vor unkontrollierter Oxidation, Proteolyse oder Endotoxin- und Bakterienkontamination der Antioxidationspuffer (s. 2.1.2.3) zugesetzt.

Es folgen dann drei Zentrifugationsschritte:

Zuerst wird mit Kaliumbromid die Dichte auf 1,063 g/ml justiert und für 8 Stunden bei 4°C und 20.000 U/min zentrifugiert. Von den dann vorhandenen drei Phasen wird die oberste Phase (Dichte ca. 1,055 g/ml) abgetrennt und erneut mit Kaliumbromid auf eine Dichte justiert von nun 1,04 g/ml.

Der zweite Zentrifugationsschritt, wiederum bei 4°C und 20.000 U/min, dauert 3 Stunden und trennt das LDL in der einen Phase von den VLDL und Chylomikronen in der anderen.

In einem dritten Zentrifugationsschritt gelingt die noch notwendige Konzentrierung des LDL, indem das bisher gewonnene LDL auf Millipore-Filter mit einer Porengröße von 10.000 Dalton aufgetragen wird und bei 4°C und 15.000 U/min für eine Stunde zentrifugiert wird.

2.2.2 Oxidation von LDL zu OxLDL durch CuSO₄

Um eine Oxidation erzielen zu können, muss in einem ersten Schritt das im zugesetzten Antioxidationspuffer (s. 2.1.2.3) enthaltene EDTA entfernt werden. Dies gelingt durch Dialyse. Das gewonnene LDL wird in einem Dialyseschlauch

mit einer Porengröße von 50 kD für 24 Stunden bei 4°C gegen einen sterilisierten Kaliumphosphatpuffer (KPP) im Verhältnis 1:500 dialysiert.

Der nun folgende Oxidationsschritt wird erzielt, indem eine weitere Dialyse für 30 Stunden bei 23°C folgt, wiederum gegen einen sterilisierten Kaliumphosphatpuffer, dem jedoch Kupfersulfat (CuSO_4) in einer Konzentration von $10\mu\text{mol/l}$ beigesetzt ist.

Abschließend wird eine dritte Dialyse mit dem Ziel durchgeführt, das CuSO_4 wieder zu eliminieren und weitere Oxidationen zu verhindern, indem für 48 Stunden bei 4°C gegen einen Kaliumphosphatpuffer dialysiert wird, dem EDTA in einer Konzentration von $200\mu\text{mol/l}$ beigesetzt wurde.

2.2.3 Analyse des Oxidationsgrades und Proteingehalts

Aufgrund der höheren negativen elektrischen Ladung von OxLDL (177) kann der Grad der Oxidation quantitativ bestimmt werden durch die relative Mobilität in der Agarose-Gel-Elektrophorese. Im Vergleich zu nLDL als Vergleichsindex ist OxLDL 2,5- bis 3-fach mobiler.

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt nach der Methode von Lowry (178).

2.3 Präparation des C3-ähnlichen Exotoxins

C3-ähnliche Transferasen, wie das in dieser Arbeit eingesetzte C3-ähnliche Exoenzym von *Clostridium limosum* (C3), inaktivieren RhoA durch eine ADP-Ribosylierung (179).

Das Exotoxin C2 von *Clostridium botulinum* ist ein binäres Toxin. Die Untereinheit C2I ist die intrazellulär wirksame Komponente und die Untereinheit C2IIa bildet eine Pore in der Zellwand, durch die C2I nach intrazellulär geschleust wird. C2I ist insofern Ligand von C2IIa (180). Anstelle von C2I können verschiedene Liganden durch C2IIa in Zellen eingeschleust werden (181).

Um zu ermöglichen, dass das C3 in die Zellen der untersuchten Gefäße aufgenommen wird, wurde ein Fusionsprotein konstruiert, exprimiert und gereinigt (94), das aus der Bindungskomponente des C2I-Toxins von *Clostridium botulinum* (C2IN) besteht und dem C3-ähnlichen Exoenzym von *Clostridium limosum* (in dieser Arbeit C3 genannt) (182).

C2IIa ist ein Heptamer und bildet die Pore in der Zellwand, über die C2I in die Zelle geschleust wird. C2I wird jedoch ersetzt durch das Fusionsprotein, welches aus dem N-terminalen Ende von C2I (C2IN) besteht, das mit C2IIa interagiert, und aus C3, das intrazellulär RhoA durch ADP-Ribolysierung inhibieren kann (179) (183).

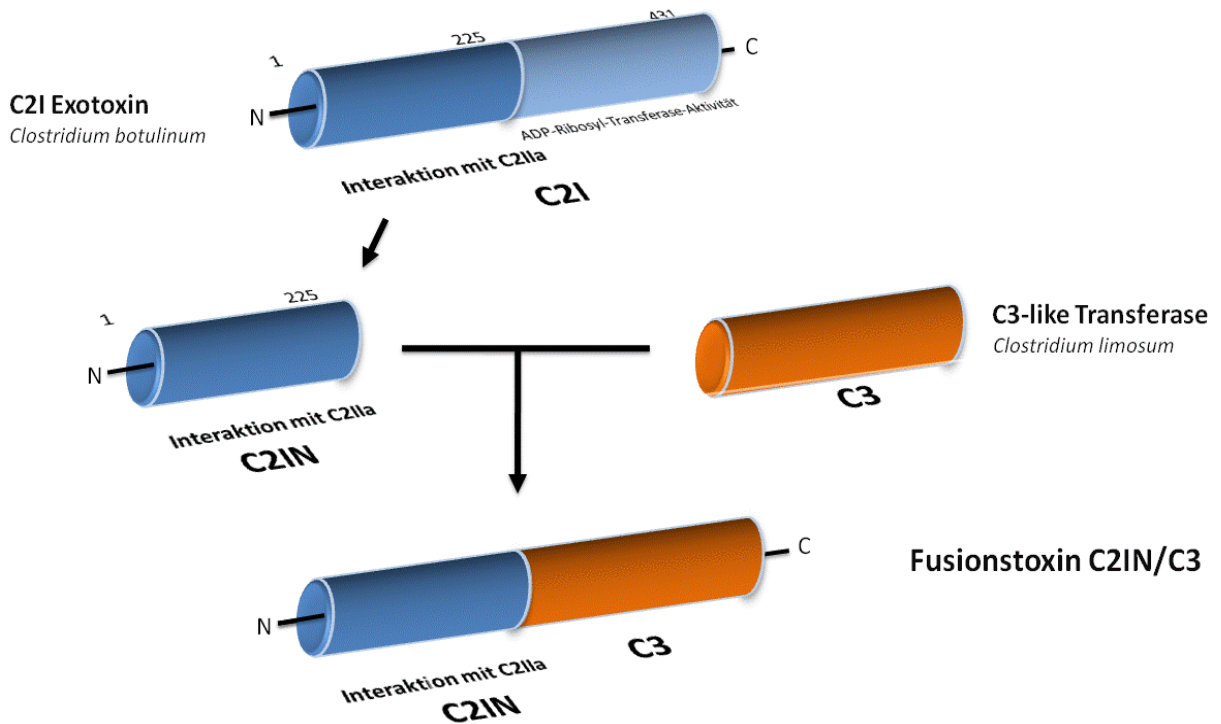


Abbildung 7: Bildung des Fusionstoxins (C2IN/C3) aus dem Exotoxin C2I von *Clostridium botulinum*, vom dem die Aminosäuresequenz 1-225 als N-terminales Ende abgespalten wird (C2IN), und dem C3-ähnlichen Exotoxin (C3) von *Clostridium limosum*

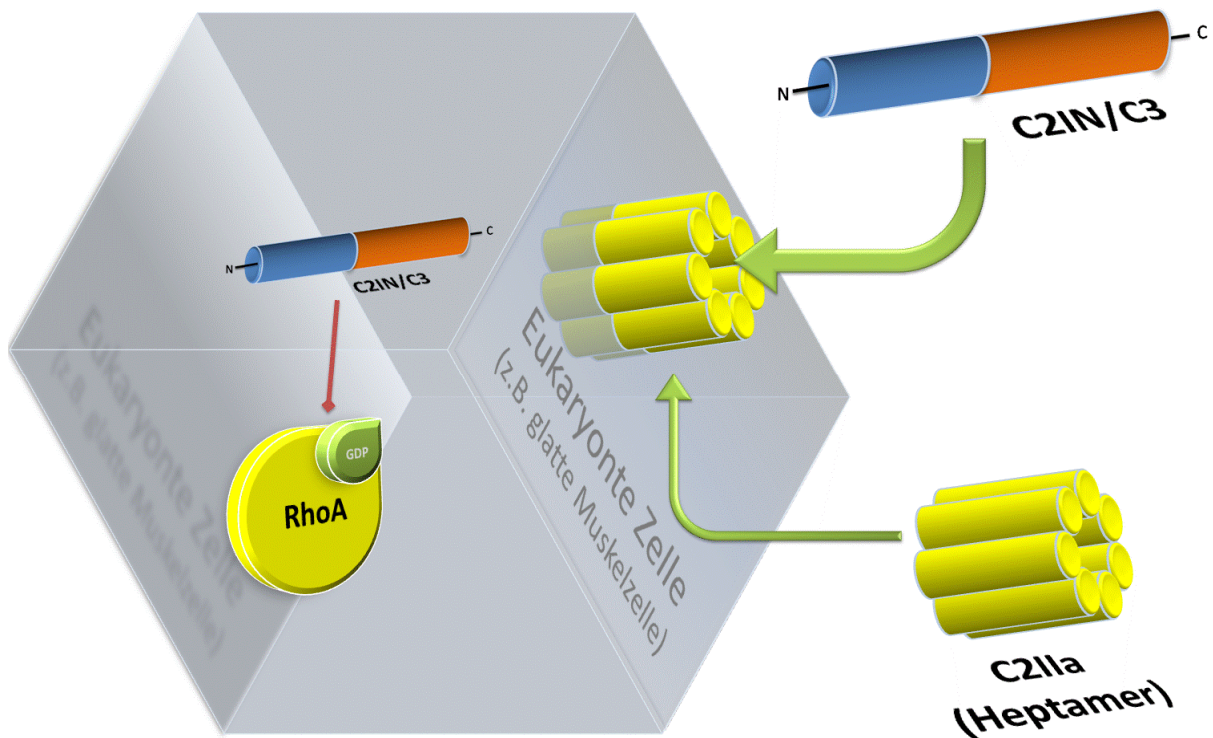


Abbildung 8: C2IIa bildet ein Heptamer, das eine Pore für das Fusionstoxin C2IN/C3 in die Zellwand eukaryonter Zellen darstellt. Intrazellulär kann C2IN/C3 die Inhibition von RhoA bewirken. C2IIa hat keinen Effekt auf die RhoA-Aktivität. C2IN/C3 besitzt nur intrazellulär einen Effekt auf RhoA und kann die Zellwand nicht ohne das C2IIa-Heptamer überwinden.

2.4 Gefäßpräparation

2.4.1 Versuchstiere

Die Gefäße wurden Chinchilla Bastarden entnommen. Diese waren 2-3 Monate alt und wogen 2,0 bis 2,5kg. Es wurde keine Selektion nach Geschlecht vorgenommen.

Die Chinchilla Bastarde wurden von der Charles River Deutschland GmbH bezogen und bis zur Organentnahme artgerecht im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg gehalten.

Die Entnahme der Gefäße erfolgte unter strikter Einhaltung des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) nach §6 Abs. 1 Satz 4, sowie §§ 8b, 9 Abs. 1 Satz 1, 3 und 4.

Die Erlaubnis von der Regierung von Unterfranken zur Entnahme von Aorten, Femoral- u. Nierenarterien aus Kaninchen nach Tötung in Narkose lag vor.

2.4.1 Entnahme der Aorta thoracalis

Nach Tötung des Tieres wurde der Thorax über einen Medianschnitt und parasternaler Längsthoracotomie eröffnet. Nach Kollabieren des linken Lungenflügels wurde die Aorta dargestellt. Unmittelbar distal des Aortenbogens und oberhalb des Diaphragmas wurde das Gefäß in situ abgesetzt und umgehend mit der Präparationstyrode (s. 2.1.2.1) durchgespült um die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen aus dem Blut bei Stase und intravasaler Koagulation zu verhindern. Die Aorta thoracalis wurde dann mit dem adventitiellen Gewebe exzidiert und in der Tyrode ins Labor zur Präparation gebracht.

2.4.2 Präparation der Aortenringe

Unter dem Lichtmikroskop wurde der entnommene Gewebekblock in der Präparationstyrode mit Mikroinstrumenten so präpariert, dass das umgebende Fett- und Bindegewebe von der Aorta thoracalis abgetrennt wurde. Das proximale und distale Ende wurde auf ca. 3mm abgetrennt. Durch die Präparation verletzte Gefäßabschnitte wurden ebenso verworfen. Die thorakale Aorta wurde dann mit dem Skalpell quer in 3-4mm breite Ringe geschnitten und in frischer Präparationstyrode bis zum jeweiligen Versuch bei 4°C aufbewahrt.

2.4.3 Deendothelialisierung

Für einen Teil der Versuche wurden deendothelialisierte Gefäße benötigt. Erst unmittelbar vor dem Einsetzen des Aortenrings in das Organbad erfolgte das Entfernen des Endothels in einem mechanischen Schritt, indem die Innenseite der Gefäße nach außen gedreht wurden und der Ring dann vorsichtig über einem Zellstoffpapier gerieben wurde. Zellreste des Endothels wurden abschließend vollständig durch Waschung des Gefäßes in Präparationstyrode entfernt. Die Innenseite wurde wieder nach innen gedreht. Dieser schon von

Furchgott beschriebene mechanische Schritt führt zu einer zuverlässigen und vollständigen Deendothelialisierung (110).

2.4.4 Zeitablauf

Da für die Endothelfunktion die Abwesenheit von Endothel-schädigenden Substanzen und Zuständen von entscheidender Bedeutung sind, wurden die Aorten den Tieren am Versuchstag entnommen und dabei schon in situ durchgespült. Unmittelbar danach erfolgte der Transport ins Labor und dort die Präparation der Aortenringe. Die Versuche ohne Vorinkubation fanden binnen 3-10 Stunden nach Aortenentnahme noch am selben Tag statt. Vorinkubationen verlängerten die Zeitspanne bis maximal 30 Stunden.

2.5 Organbad

Die Aortenringe wurde in ein Organbad mit einem Volumen von ca. 2ml zwischen zwei rigiden Metallhaken eingebracht. Während der eine Haken fest mit der Wand des Organbades verbunden war, vermittelte der andere Haken die sich entwickelnde Kraft an den Kraftmesser (Force Transducer F30 Typ 372, Firma HSE Hugo Sachs Elektronik, Deutschland).

Die in dem Organbad befindliche Pufferlösung (s. 2.1.2.2) wurde mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) kontinuierlich begast. Ein Wärmesystem hielt die Temperatur konstant bei 37°C.

Durch Rollenpumpen wurde eine konstante Flussrate von 30 ml/min hergestellt. Dadurch wurde eine schnelle Verteilung hinzugefügter Substanzen oder Pharmaka erreicht.

Es waren zwei Arten der Perfusion möglich.

2.5.1 Perfusion im offenen System

Im offenen System wird der Perfusionspuffer aus dem Reservoir (in Abbildung 7 mit (a) markiert) durch eine Rollenpumpe in das Organbad befördert und gelangt aus dem diesem in einen Ausgussbehälter. Das offene System wurde

zum Auswaschen der Gefäße und Eliminieren von Substanzen verwendet (wash out).

2.5.2 Perfusion im geschlossenen System (Zirkulation)

Im geschlossenen System wird durch die Rollenpumpen ein konstantes Volumen von 10ml zur Zirkulation gebracht. Dadurch kann eine Zugabe von Substanzen und Pharmaka in das bekannte Volumen mit gewünschter Konzentration erfolgen.

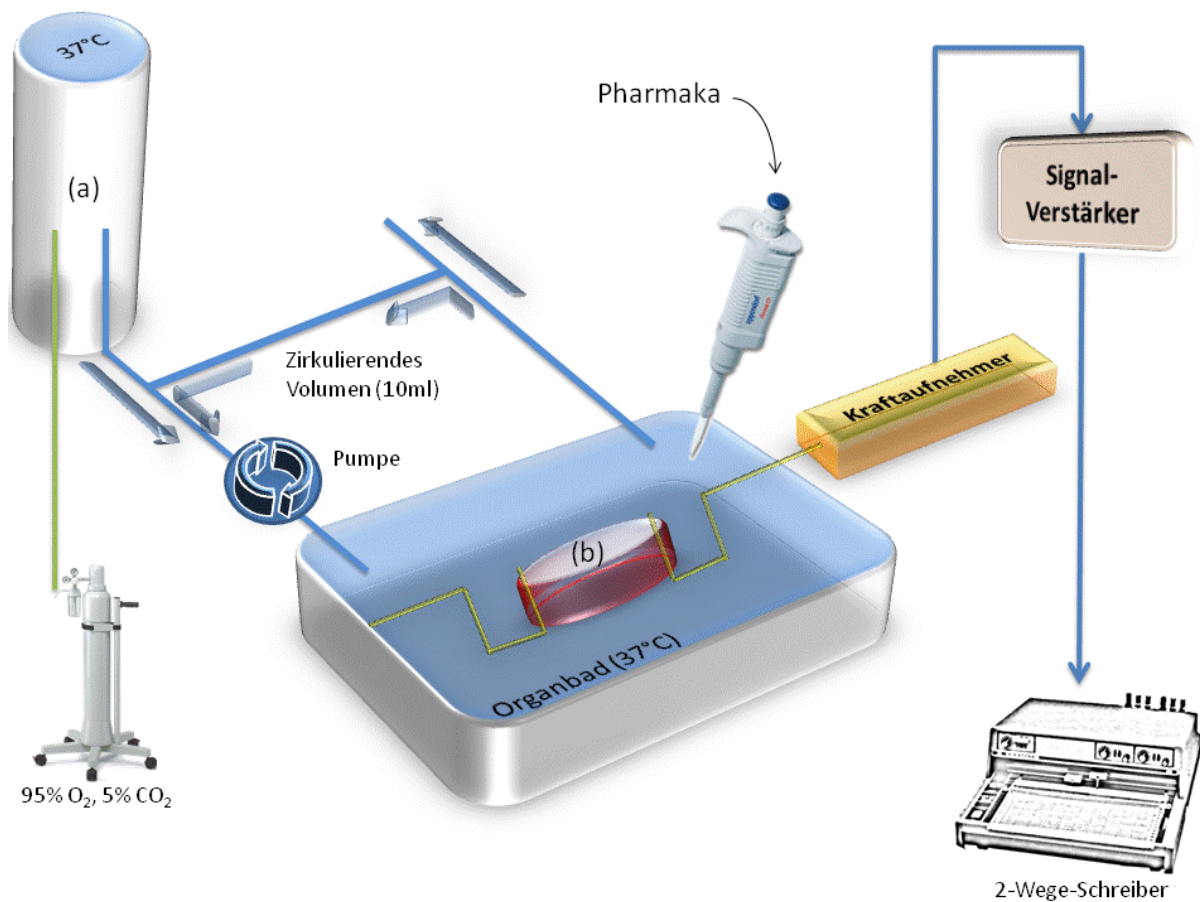


Abbildung 9: In dem Organbad ist das zu untersuchende Gefäß (b) als ringförmiges Gefäßsegment zwischen zwei Haken aufgespannt, von denen der eine an einen Kraftaufnehmer (Force Transducer F30 Typ 372, Firma HSE Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) angeschlossen ist. Im Organbad wird das Gefäß mit dem Perfusat (s. 2.1.2.2), das kontinuierlich begast (95% O₂, 5% CO₂) wird, umspült. In das dann auf Zirkulation eingestellte Volumen werden dann die Substanzen und Pharmaka mittels Eppendorfpipetten eingebracht. Das Signal der Kraftentfaltung wird über einen Verstärker an den 2-Wege-Schreiber (Dreikanalschreiber Typ R-63, Firma Rikadenki,

Freiburg, Deutschland) übertragen. Es wurden parallel 3 isolierte Organbäder betrieben.

2.6 Versuchsdurchführung

2.6.1 Grundprinzipien der Versuche

Für die Arbeiten standen drei verschiedene, voneinander unabhängige Organbäder zur Verfügung, so dass jeweils ein Aortenring als Kontrollgefäß behandelt werden konnte und die beiden anderen simultan zur Kontrolle als zu untersuchende Gefäße.

Vor jedem Versuch wurden die drei Kraftaufnehmer mit Hilfe von Eichgewichten justiert.

Nach Einbringen der Aortenringe zwischen die Haken in das mit dem Perfusionspuffer (s. 2.1.2.2) gefüllte Organbadsystem wurde stets als erstes eine Vorspannung von 20 N (\approx 2000mg) angelegt, indem die Grob- und Feinjustierung des Kraftaufnehmers die Distanz zwischen den Haken vergrößerte. Auf jede passive Dehnung reagierten die Aortenringe mit einer relativen Relaxation. Sämtliche Aortenringe wurden mit der Vorspannung von 2000mg versehen, die über einen Zeitraum von mindestens 30min konstant blieb.

Wenn Substanzen oder Pharmaka eliminiert werden sollten, wurde im Rahmen eines Waschvorgangs (wash out) im offenen System (s. 2.5.1) das Organbad (2 ml Volumen) mit dem Perfusionspuffer für 15 Minuten perfundiert, was bei einer eingestellten erhöhten Perfusionsgeschwindigkeit von 150ml/min einem Waschvolumen von ca. 2250ml entspricht.

Die Calciumkonzentration des Perfusats wurde während der Versuche nicht verändert.

2.6.2 Vorinkubationen im Brutschrank

Wenn die Aortenringe mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt werden mussten, wurden sie vor dem Einbringen ins Organbad in den RPMI-Ruffer (s. 2.1.2.4) eingebracht und bei 37°C unter 5% CO₂-Athmosphäre im Brutschrank (Heraeus instruments GmbH, Hanau, Deutschland) für die erforderliche Zeit inkubiert. Die Substanzen, deren Effekt untersucht werden sollten, wurden im RPMI-Puffer in Lösung gebracht.

2.6.3 Vasokonstriktion

Nach Anlegen einer konstanten Vorspannung von 2000mg über 30 Minuten wurden die Aortenringe im geschlossenen System mit verschiedenen Substanzen und Pharmaka zur Vasokonstriktion gebracht. Als potente Vasokonstriktoren wurden Angiotensin II (Ang II) und Phenylephrin (PE) eingesetzt.

2.6.4 Vor- und Ko-Inkubationen im Organbad

Da das zirkulierende Volumen mit 10ml bekannt war, konnten im Organbad die Aortenringe mit Substanzen und Pharmaka in gewünschter Konzentration inkubiert werden, entweder vor oder nach dem Hervorrufen einer Vasokonstriktion durch Ang II oder PE, jedoch stets nach Anlage der Vorspannung von 2000mg. Als Medium für diese Inkubationen diente der Perfusionspuffer (s. 2.1.2.2).

2.6.5 Acetylcholin-Dosis-Wirkungs-Kurven (Ach-DWK)

Acetylcholin ist am Gefäß mit intaktem Endothel ein potenter Vasodilatator (110). Deendothelialisierte Gefäße reagieren auf Acetylcholin mit Vasokonstriktion. Im geschlossenen System kann eine Acetylcholin-Dosis-Wirkungskurve (Ach-DWK) für einen Endothel-tragenden Aortenring nach durch ansteigende Konzentrationen von Acetylcholin von $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$ bis $3 \cdot 10^{-6} \text{M}$ erstellt werden, nachdem zuvor eine Vasokonstriktion angelegt wurde. Eine

vollständige Relaxation kann durch die Gabe des NO-Donors Nitroprussid-Na⁺ (SNP) erzielt werden.

Die jeweilige Relaxation durch eine bestimmte Dosis Acetylcholin wurde als Prozentwert von der vollständigen, durch SNP erzielten Vasodilatation angegeben.

2.7 Einzelne Versuche

2.7.1 Vergleiche der Ach-DWK nach Vorinkubationen mit Ang II oder

PE

Es wurden zunächst Aortenringe im Brutschrank für 6 Stunden inkubiert und entweder mit hohen Konzentrationen von Ang II oder PE oder als Kontrolle behandelt. Während der letzten 30 Minuten wurde DDC als SOD-Inhibitor zugegeben.

In weiteren Versuchen wurden allen Aortenringen während der Inkubation zusätzlich EDTA, Deferoxamin oder nLDL zugegeben.

Anschließend wurden die Aortenringen im Organbad mit PE zur Kontraktion gebracht und eine Ach-DWK erstellt.

2.7.2 Vergleiche der Ach-DWK nach Vorinkubation mit OxLDL und Ang

II

Aortenringe wurden im Brutschrank für 90 Minuten inkubiert und entweder mit OxLDL oder mit der Kombination aus OxLDL und Ang II oder als Kontrolle behandelt.

Anschließend wurden die Aortenringen im Organbad mit PE zur Kontraktion gebracht und eine Ach-DWK erstellt.

2.7.3 Effekt der OxLDL-Koinkubation auf die Vasokonstriktion durch Ang II

Ang II ist ein hochpotenter Vasokonstriktor. Bereits in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-11} \text{M}$ sind Gefäßkontraktionen zu beobachten. In einer Schwellenkonzentration von $3 \cdot 10^{-10} \text{M}$ ist durch Ang II eine signifikante, aber leichte Vasokonstriktion an den Aortenringen zu beobachten.

Es wurde nach Anlegen dieser Vasokonstriktion dann OxLDL in das geschlossene System inkubiert und der Effekt gemessen im Vergleich zur Kontrolle.

2.7.4 Effekt der LPC-Koinkubation auf die Vasokonstriktion durch Ang II

Analog zu dem Versuch in 2.7.3 wurde anstelle des OxLDL Lysophosphatidylcholin (LPC) in das geschlossene System pipettiert und der Effekt gemessen. LPC ist ein Bestandteil des OxLDL

2.7.5 Effekt der CalyA-Koinkubation auf die Vasokonstriktion durch Ang II

Calyculin A (CalyA) inhibiert die Myosin-Leichtketten-Phosphatase. Es wurde an Aortenringen eine Kontraktion durch eine Ang II-Schwellenkonzentration angelegt. Danach wurde CalyA zugegeben.

2.7.6 Effekt der CalyA-Koinkubation auf die Vasokonstriktion durch OxLDL

An Aortenringen wurde eine Kontraktion durch eine Ang II-Schwellenkonzentration angelegt. Wie unter 2.7.3 beschrieben wurde dann OxLDL in das System pipettiert. Nach voller Entfaltung des OxLDL-Effekts wurde anschließend CalyA in das System pipettiert und der zusätzliche Effekt

gemessen. In einem anderen Versuch wurde nach der Ang II-Applikation zuerst CalyA in die Zirkulation gebracht und dann OxLDL hinzugegeben.

2.7.7 Effekt durch Inhibition der PKC durch Vor-Inkubation mit Staurosporin

Aortenringe wurden durch eine Schwellenkonzentration Ang II als Kontrolle oder mit Ang II und OxLDL im Organbad behandelt. Nach voller Entfaltung des OxLDL-Effektes wurde der Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin in unterschiedlichen Konzentrationen für 30min in das Organbad pipettiert und der Effekt registriert.

2.7.8 Effekt durch Inhibition von RhoA durch Vor-Inkubation mit C3

Zunächst wurden die Aortenringe im Brutschrank 4,5 Stunden vorinkubiert mit entweder C2IIa oder mit C2IN/C3 oder mit beiden Komponenten C2IIa und C2IN/C3. Dabei dienen die Inkubationen mit C2IIa oder C2IN/C3 als Kontrolle, da hier keine RhoA-Inhibition erfolgen kann, da die wirksame Komponente C2IN/C3 nicht in die Zelle gelangt ohne die das C2IIa-Heptamer.

Es wurde nach den Vorinkubationen im Brutschrank der Effekt an Aortenringen im Organbad untersucht, die durch Ang II oder die Ko-Inkubation von Ang II und OxLDL, beziehungsweise Ang II und LPC, behandelt wurden.

2.7.9 Effekt durch Inhibition der RhoA-Kinase durch Y27632

Im Organbad wurden Aortenringe durch Ang II und OxLDL oder LPC behandelt. Es wurde dann versucht, den dadurch hervorgerufenen Effekt im geschlossenen System durch Ko-Inkubation mit dem spezifischen RhoA-Kinase-Inhibitor Y27632 zu beeinflussen.

2.8 Analyse und statistische Auswertung

Die Kraftentwicklung wurde vom Kraftaufnehmer über den Signalverstärker an den 2-Wege-Schreiber (Y-t-Schreiber, Y = Kraftentfaltung in N bzw. mg, t =

Zeit bei konstantem Papiervorschub) übertragen und auf einem Papierbogen registriert.

2.8.1 Analyse der Vasomotorik

Der Ruhetonus nach Anlage der Vorspannung wurde als base-line genommen für sich entwickelnde Vasokonstriktionen.

Vasokonstriktionen (contractile response) wurden angegeben in mg.

Vasodilatationen, hervorgerufen durch Ach, wurden als Prozentwert der maximalen Dilatation durch Nitroprussid-Na⁺ (SNP) in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6} \text{M}$ angegeben.

2.8.2 Statistische Verfahren

Die folgenden Diagramme, sowohl Balken- wie Kurvendiagramme, geben den arithmetischen Mittelwert (Mean) wieder. Der Standardfehler (standard error of the mean, SEM) ist in jedem Diagramm als vertikaler Balken eingefügt worden.

Der Standardfehler berechnet sich nach der Formel: $\sigma_n = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$, wobei σ_n der

Standardfehler ist, σ die Standardabweichung (standard deviation, SD) und n der Stichprobenumfang.

Da gepaarte Stichproben vorlagen, wurde der student's-t-test durchgeführt, um einen signifikanten Unterschied in der Stichprobenverteilung zu untersuchen. Dabei wurde das Erreichen einer statistischen Signifikanz (Signifikanzniveau) durch ein $p > 0,05$ definiert und durch ein Asterisk (*) im Diagramm gekennzeichnet.

Für wiederholte Messungen wurde das ANOVA-Verfahren (analysis of variance) als univariante Varianzanalyse verwendet, um die Zulässigkeit der Anwendung der student's-t-Tests zum paarweisen Einzelvergleich zu beweisen.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt der Vorinkubation mit Ang II und PE auf die Ach-DWK

3.1.1 Vergleich der Ach-DWK nach Vorinkubation mit Ang II oder PE

Zunächst wurden Aortenringe im Brutschrank über 4,5 Stunden vorinkubiert. Die zu vergleichenden Gruppen waren die Kontrollgruppe mit einer Behandlung in reinen RPMI-Puffer, die Ang II-Gruppe mit einer Ang II -Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ M und die PE-Gruppe mit einer PE-Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ M.

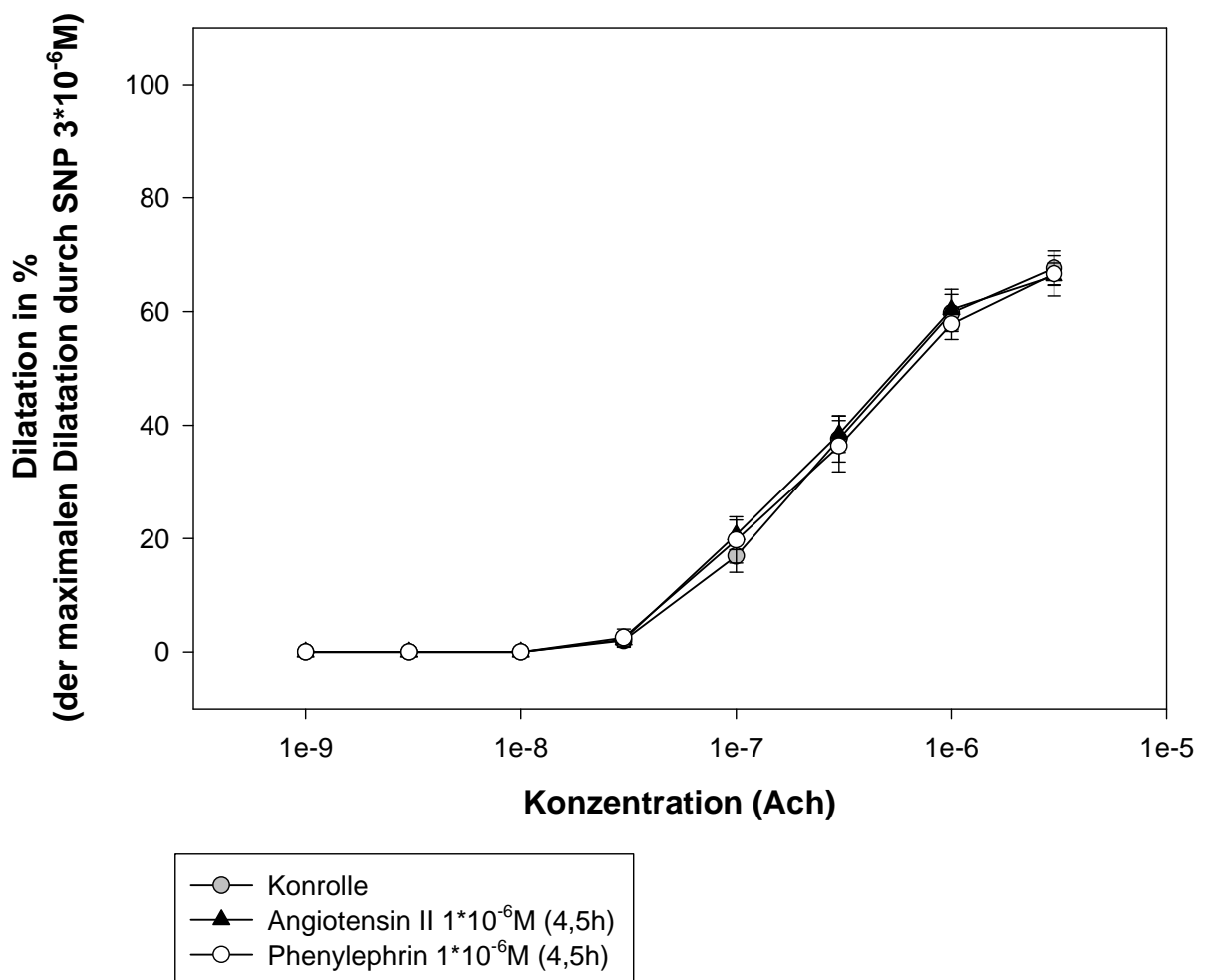


Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit entweder Ang II ($1 \cdot 10^{-6}$ M), PE ($1 \cdot 10^{-6}$ M) oder reinem Puffer für 4,5 Stunden. Zusatz von DDC für die letzten 30min bei allen Gruppen zur Inhibition der Superoxid-Dismutase. Es zeigt sich keine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen; $n=12$; exemplarisch: $p=0,85$ bei $C_{Ach}=1 \cdot 10^{-7}$ M zwischen Ang II und PE

Die letzten 30 Minuten wurde zusätzlich allen Gefäßen der SOD-Inhibitor DDC in einer Konzentration von 10mM zugegeben. Anschließend wurden alle Gefäße mit PE ($3 \cdot 10^{-6}$ M) zur Kontraktion gebracht.

Bei der Ach-DWK gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen.

3.1.2 Behandlung mit EDTA ruft keinen Unterschied hervor

Eine zusätzliche Applikation von EDTA ($C_{\text{EDTA}}=1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) in den RPMI-Puffer bei allen Gefäßen während der 4,5 Stunden Inkubationszeit, ruft keine Unterschiede in der Ach-DWK hervor.

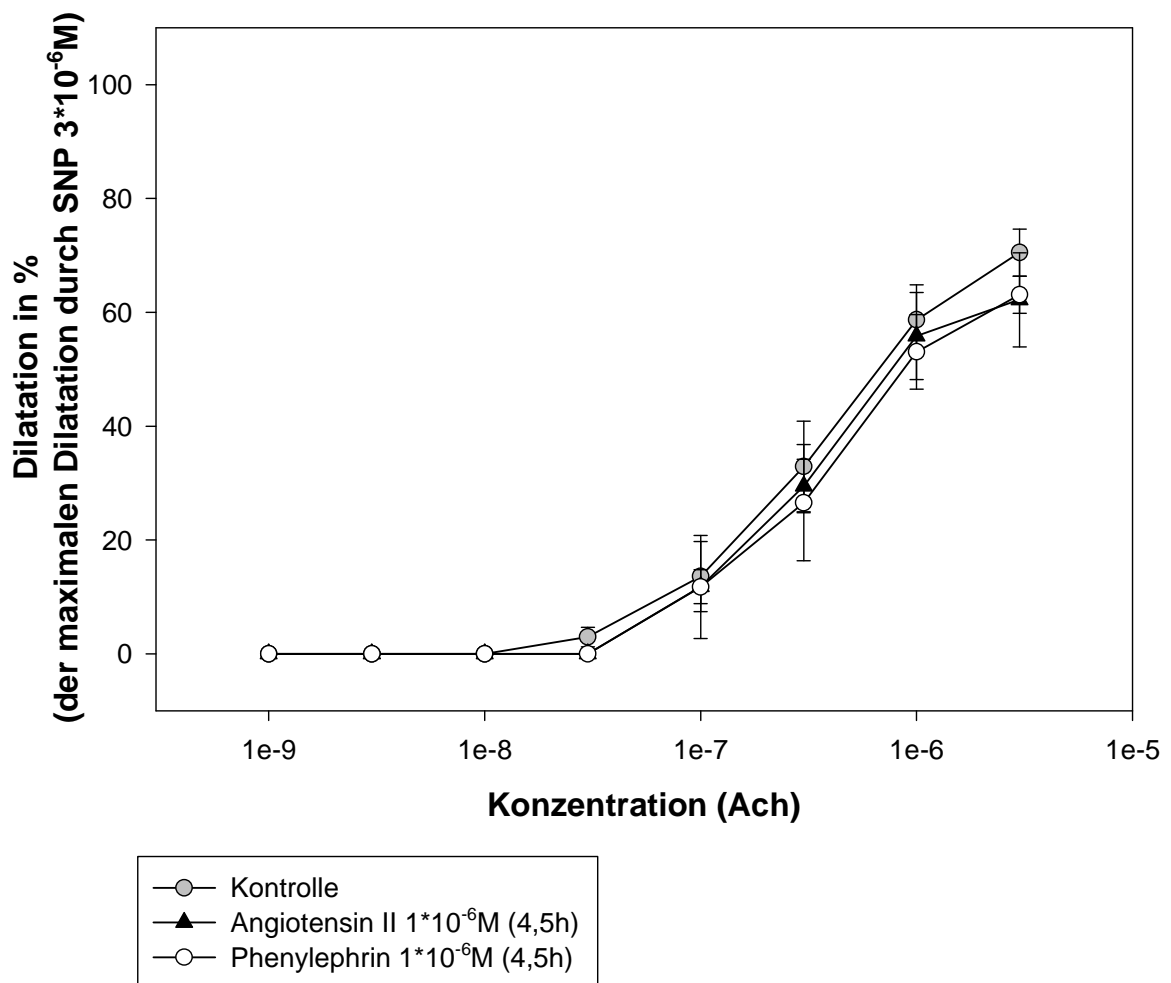


Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit EDTA ($1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) und entweder Ang II ($1 \cdot 10^{-6} \text{M}$), PE ($1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) oder reinem Puffer für 4,5 Stunden. Zusatz von DDC für die letzten 30min bei allen Gruppen zur Inhibition der Superoxid-Dismutase. Es zeigt sich keine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen; $n=4$, exemplarisch: $p=0,24$ bei $C_{\text{Ach}}=3 \cdot 10^{-6} \text{M}$ zwischen Kontrolle und PE

3.1.3 Behandlung mit Deferoxamin ruft keinen Unterschied hervor

Eine zusätzliche Applikation von Deferoxamin ($C_{\text{deferoxamine}}=1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) in den RPMI-Puffer bei allen Gefäßen während der 4,5 Stunden Inkubationszeit, ruft keine Unterschiede in der Ach-DWK hervor.

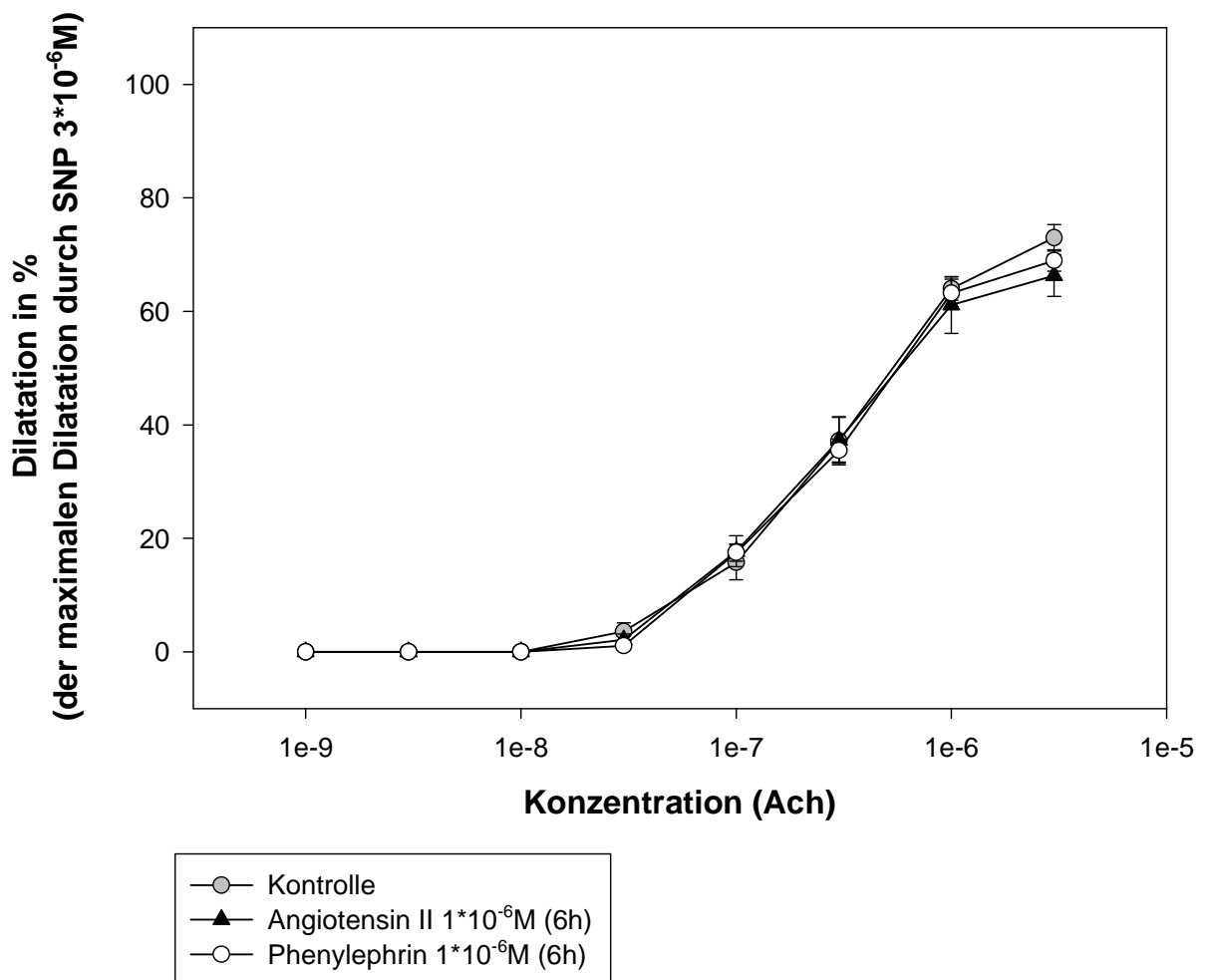


Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit Deferoxamin ($1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) und entweder Ang II ($1 \cdot 10^{-6} \text{M}$), PE ($1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) oder reinem Puffer für 4,5 Stunden. Zusatz von DDC für die letzten 30min bei allen Gruppen zur Inhibition der Superoxid-Dismutase. Es zeigt sich keine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen; $n=7$, exemplarisch: $p=0,16$ bei $C_{\text{Ach}}=3 \cdot 10^{-6} \text{M}$ zwischen Kontrolle und Ang II

3.1.4 Behandlung mit nLDL ruft keinen Unterschied hervor

Eine zusätzliche Applikation von nLDL ($c_{\text{nLDL}}=100 \mu\text{g/ml}$) in den RPMI-Puffer bei allen Gefäßen während der 14 Stunden Inkubationszeit, ruft keine Unterschiede in der Ach-DWK hervor.

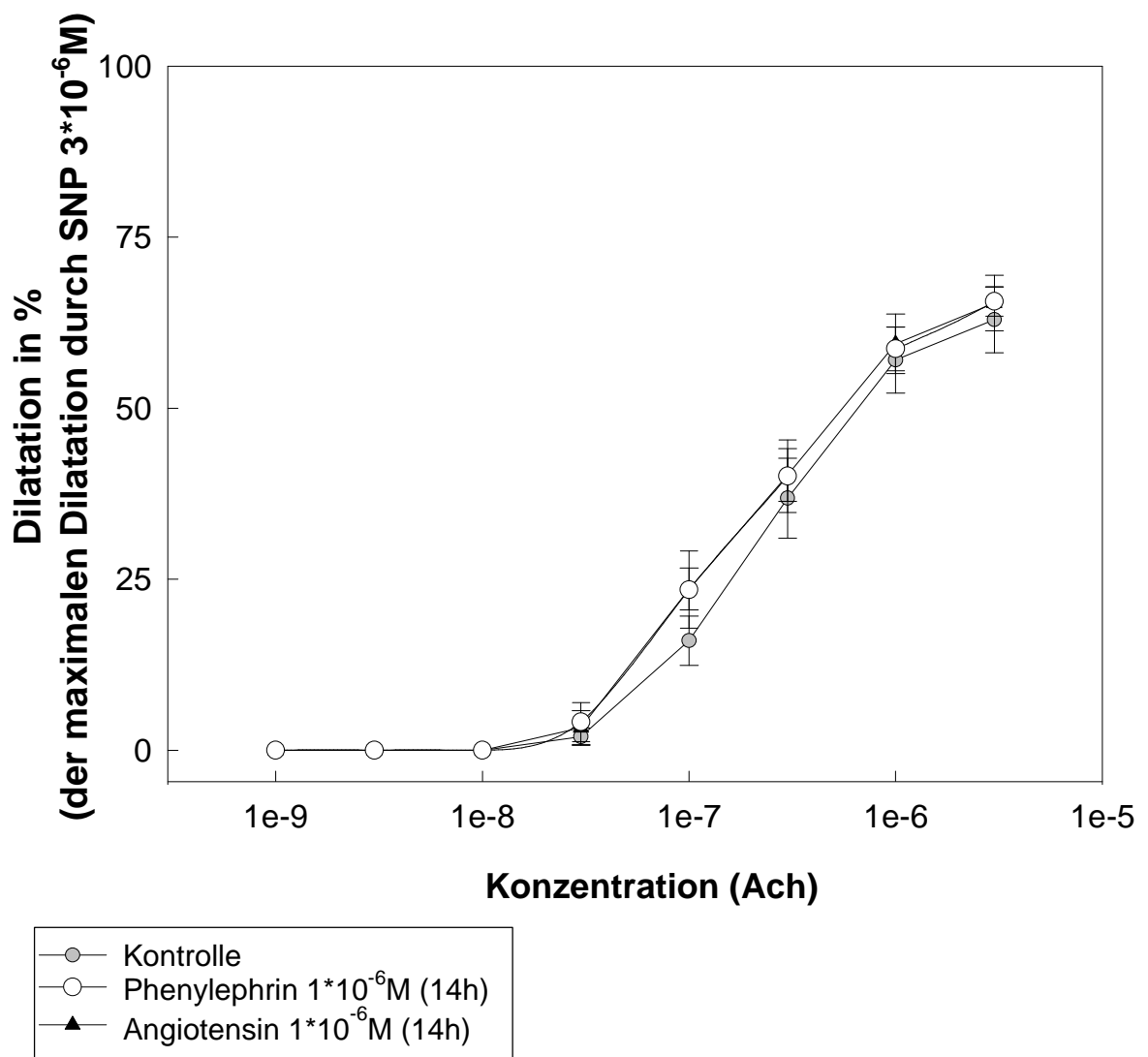


Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit nLDL ($c_{\text{nLDL}}=100 \mu\text{g/ml}$) und entweder Ang II ($1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), PE ($1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) oder reinem Puffer für 14 Stunden. Zusatz von DDC für die letzten 30min bei allen Gruppen zur Inhibition der Superoxid-Dismutase. Es zeigt sich keine

signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen; n=6, exemplarisch:
p=0,14 zwischen Ang II und Kontrolle bei $c_{Ach}=1 \cdot 10^{-7} M$

3.2 Effekt der Vorinkubation mit OxLDL und Ang II auf die Ach-

DWK

Eine Inkubation über 90 Minuten mit OxLDL ($c_{OxLDL}=100 \mu g/ml$) oder der Kombination von OxLDL ($c_{OxLDL}=100 \mu g/ml$) und Ang II ($1 \cdot 10^{-6} M$) ruft eine signifikante Herabsetzung der Dilatationswirkung von Ach hervor im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, jedoch nicht im direkten Vergleich zueinander.

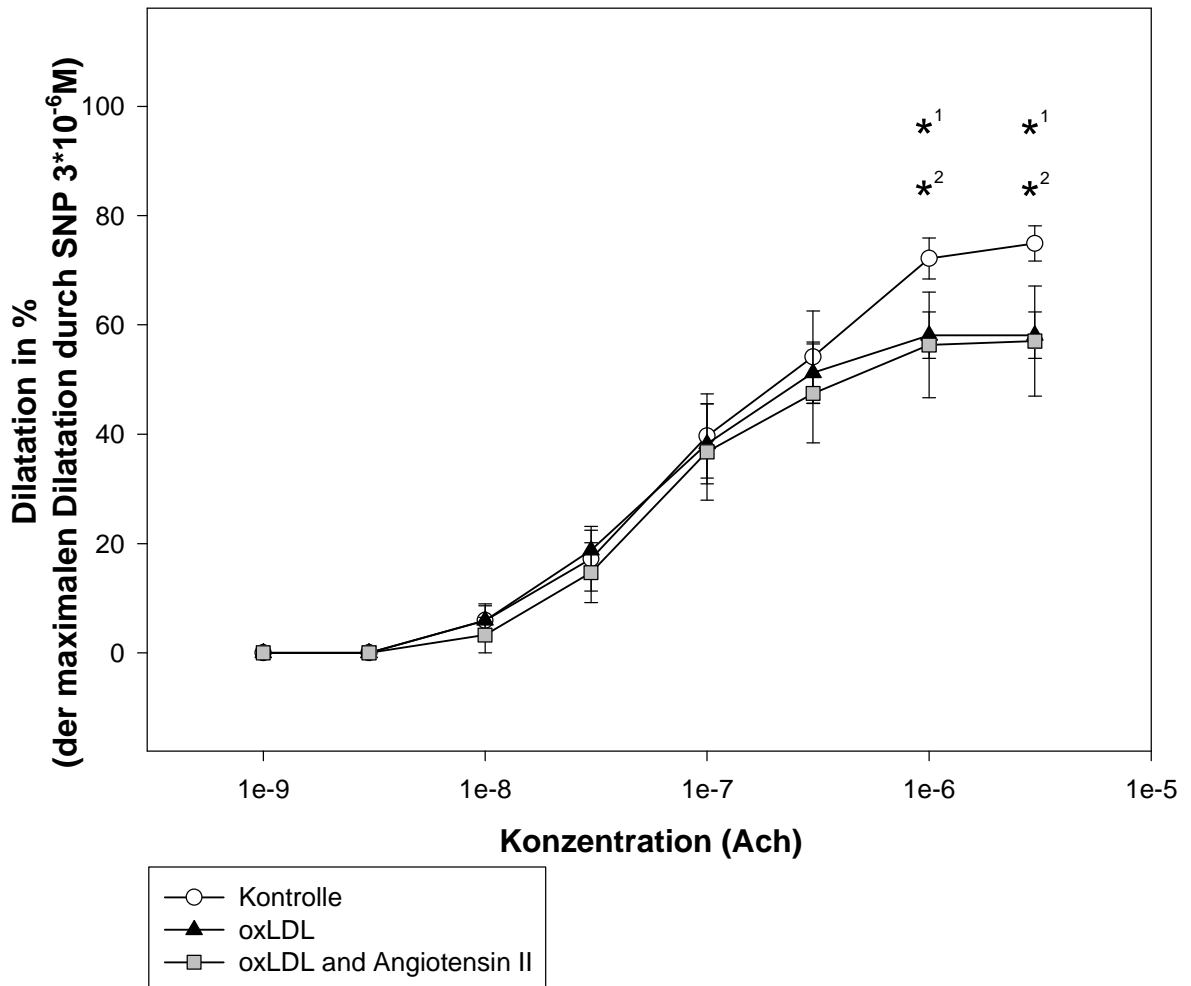


Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit OxLDL (100µg/ml) , OxLDL (100µg/ml) und Ang II (1*10⁻⁶ M) oder reinem Puffer für 90 Minuten. Es zeigt sich eine signifikante Herabsetzung der Acetylcholin-vermittelten Vasodilatation für die mit OxLDL behandelten Aortenringe; n=8, p<0,05 für OxLDL gegenüber Kontrolle und OxLDL und Ang II gegenüber Kontrolle (Asterisk 1 und 2). Eine zusätzliche Gabe von Ang II kann den OxLDL-Effekt nicht beeinflussen; n=4, p=0,92 für OxLDL gegenüber OxLDL und Ang II

3.3 Effekt von OxLDL auf die Vasokonstriktion durch Ang II

3.3.1 Versuche an Endothel-intakten Gefäßen

Ang II löst in einer Schwellenkonzentration von $3 \cdot 10^{-10} \text{M}$ eine leichte Vasokonstriktion aus. In den folgenden Versuchen wurden Aortenringe mit dieser Schwellenkonzentration Ang II behandelt, so dass eine konstante Konstriktion entstand. Auf diese vorkonstringierten Gefäße wurde im geschlossenen System OxLDL hinzugegeben.

OxLDL potenziert die durch Ang II vermittelte Vasokonstriktion.

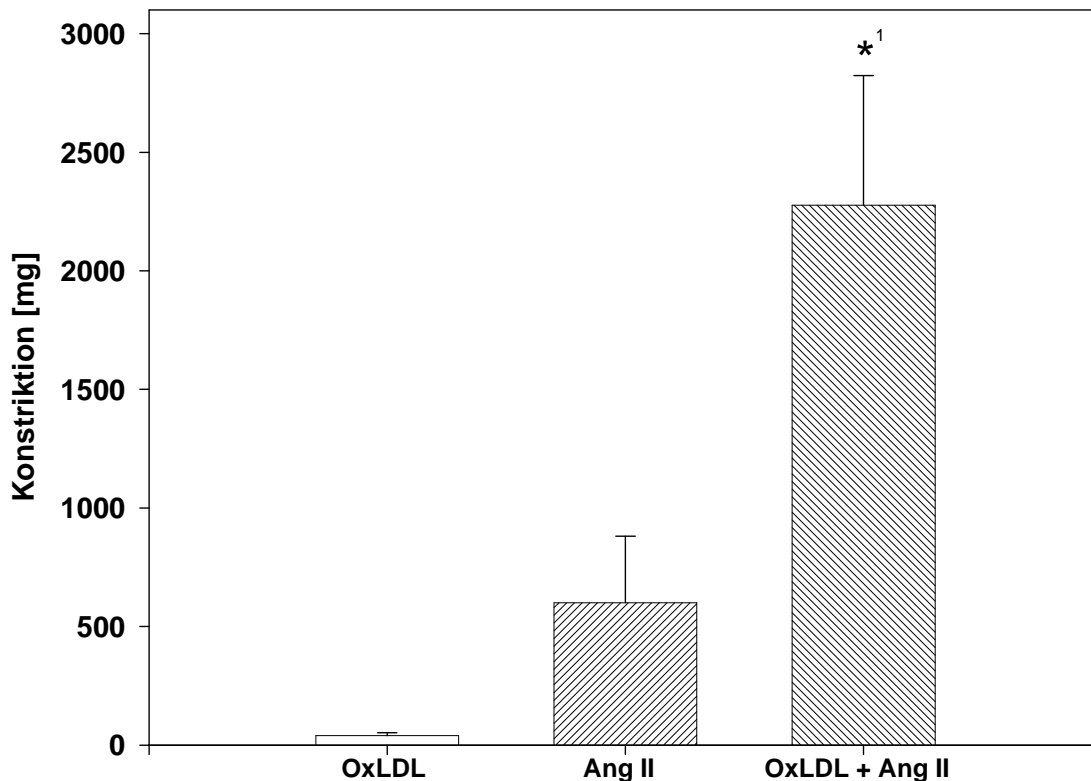


Abbildung 15: OxLDL (100µg/ml) verursacht keine Konstriktion. Ang II wurde in der Schwellenkonzentration von $3 \cdot 10^{-10} \text{M}$ appliziert, so dass eine leichte Konstriktion hervorgerufen wurde. Diese Konstriktion wird durch additive Gabe von OxLDL potenziert (Asterisk 1); $n=6$, $p=0,021$ zwischen Ang II allein gegenüber OxLDL mit Ang II zusammen.

3.3.2 Versuche an deendothelialisierten Gefäßen

Nach Deendothelialisierung wurden die Aortenringe analog zu 3.3.1 mit Ang II und OxLDL behandelt. OxLDL potenziert die durch Ang II vermittelte Vasokonstriktion auch an deendothelialisierten Gefäßen.

3.4 Effekt von LPC auf die Vasokonstriktion durch Ang II

Lysophosphatidylcholin ist ein Bestandteil von OxLDL. Um zu untersuchen, ob LPC einen ähnlichen Effekt hat wie OxLDL, wurden Aortenringe mit einer Schwellenkonzentration von Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) behandelt und auf diesen Effekt hin mit LPC ($c_{\text{LPC}} = 100 \mu\text{g/ml}$) koinkubiert.

Auch LPC potenziert die durch Ang II vermittelte Vasokonstriktion.

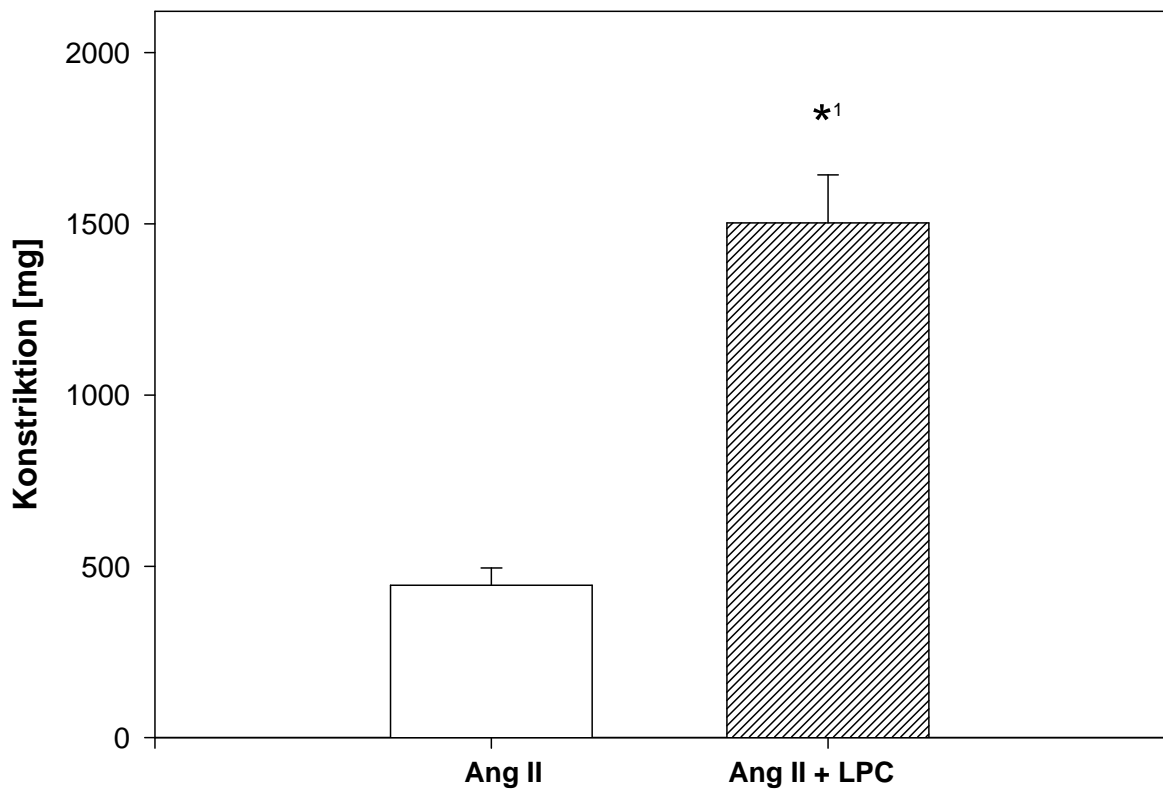


Abbildung 16: Ang II allein wurde in der Schwellenkonzentration von $3 \cdot 10^{-10} \text{M}$ appliziert, so dass eine leichte Konstriktion hervorgerufen wurde. Diese Konstriktion wird durch additive Gabe von LPC potenziert (Asterisk 1); $n=7$, $p < 0,001$

3.5 Effekt von CalyA auf die Vasokonstriktion durch Ang II

Calyculin A (CalyA) ist ein Inhibitor der Myosin-Leichtkettenphosphatase. In einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$ hat CalyA keinen signifikanten Effekt auf die Vasokonstriktion, die durch Ang II in der Schwellenkonzentration verursacht worden ist.

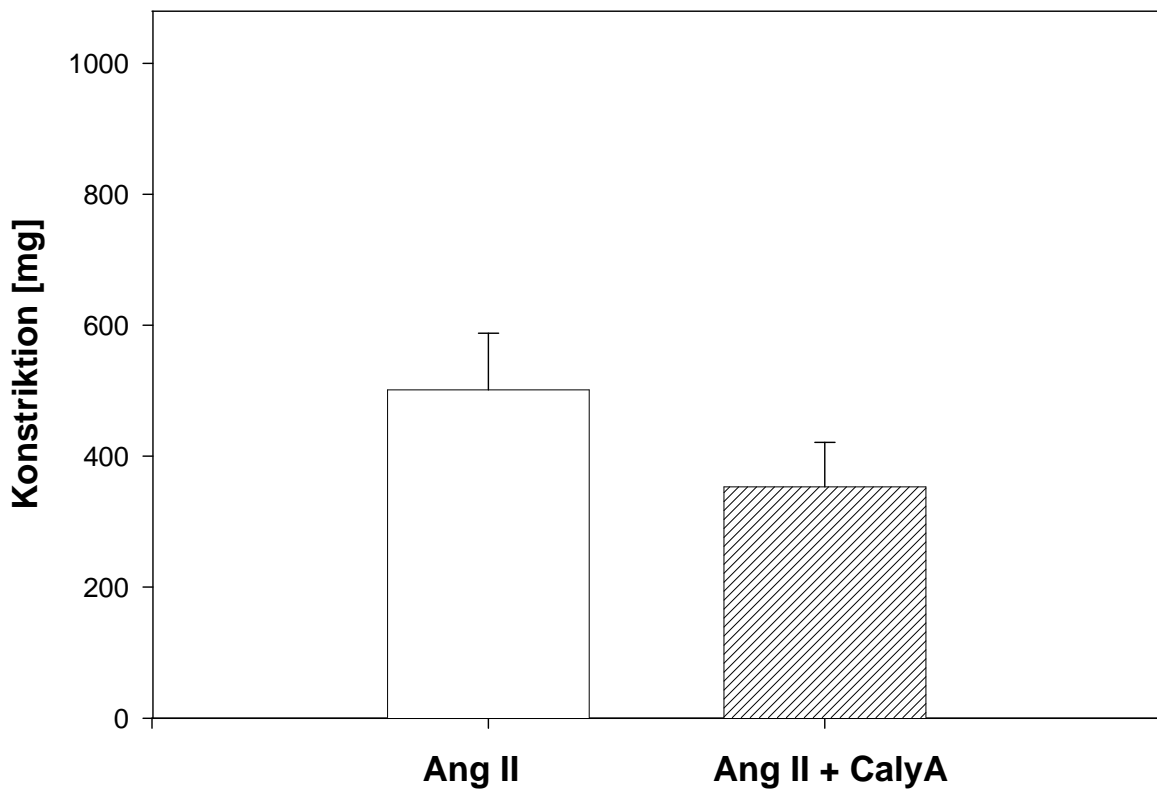


Abbildung 17: Die Ko-Inkubation von CalyA ($c_{\text{CalyA}} = 1 \cdot 10^{-8} \text{M}$) hat keinen signifikanten Effekt auf die Vasokonstriktion durch Ang II in einer Schwellenkonzentration ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$); $n=6$, $p=0,31$

3.6 Effekt von CalyA auf die Vasokonstriktion durch OxLDL

Der nächste Schritt war die Untersuchung des CalyA-Effektes auf die Wirkung von OxLDL.

CalyA ($1 \cdot 10^{-8} \text{M}$) schwächt den OxLDL-Effekt ($100 \mu\text{g/ml}$) auf die Vasokonstriktion von Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) partiell ab. Der Effekt ist identisch, wenn der Aortenring vor der OxLDL-Gabe oder nach der OxLDL-Gabe mit CalyA über 30 Minuten behandelt wird.

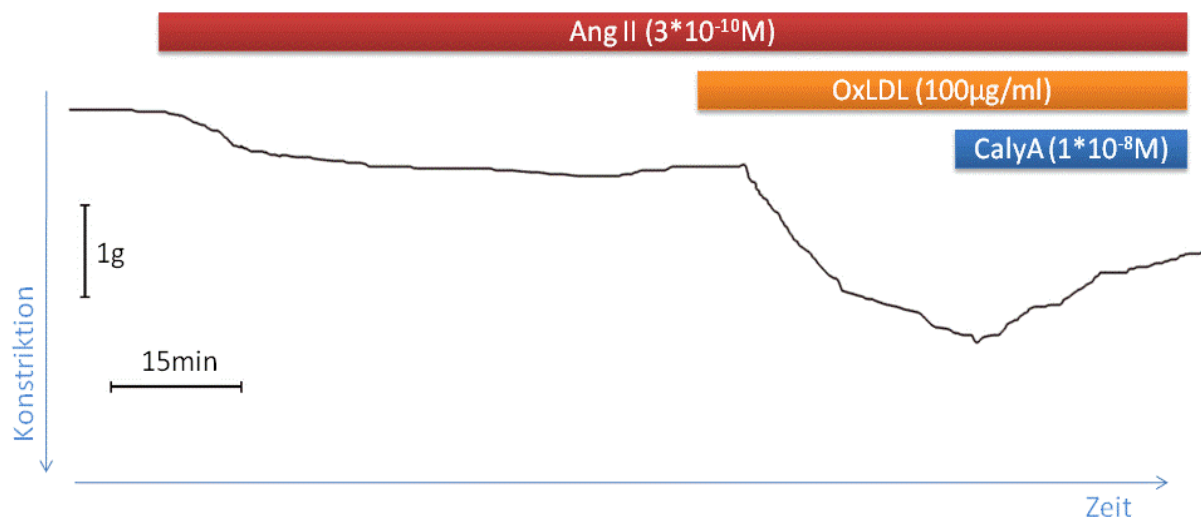


Abbildung 18: Originalregistratur (schwarze Linie) mit deutlicher Darstellung der leichten Konstriktion durch Ang II in der Schwellenkonzentration. Nach Applikation von OxLDL kommt es zu einer verstärkten Konstriktion, die wiederum nach Calyculin A – Gabe (30min) partiell abgeschwächt wird

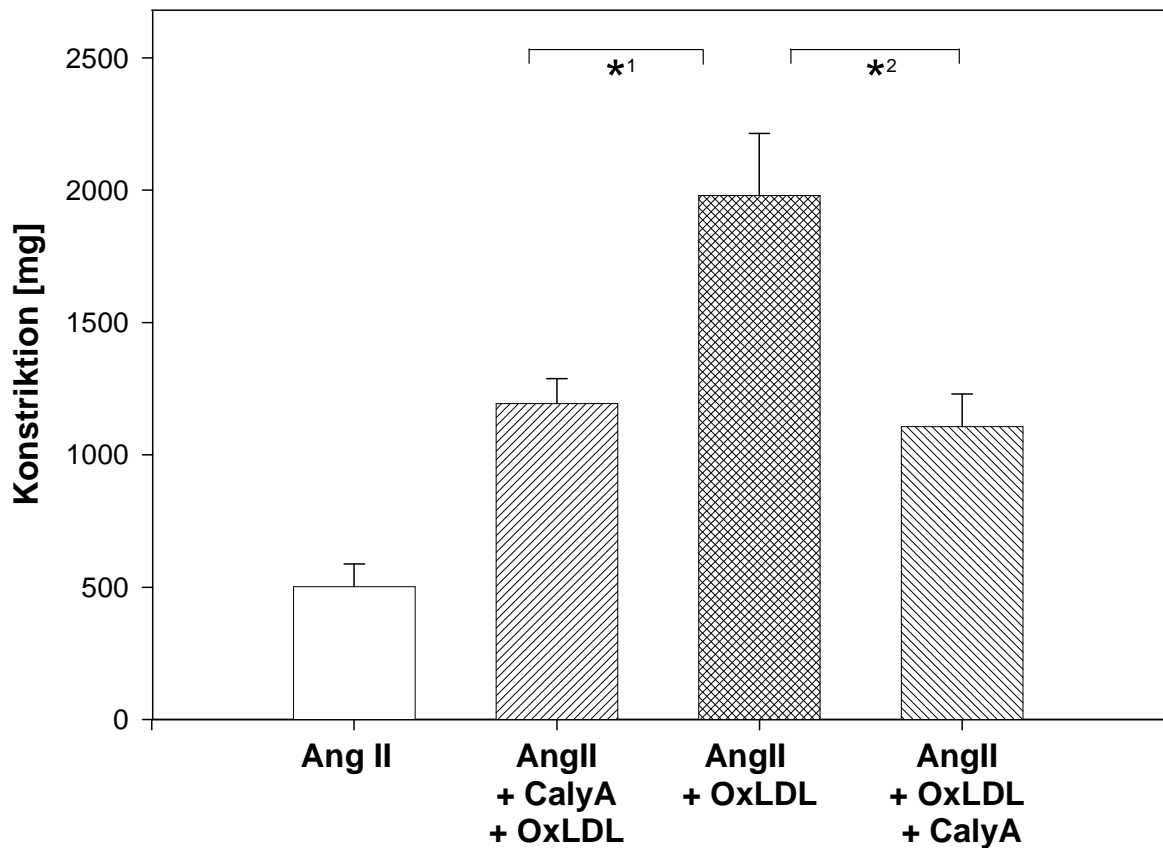


Abbildung 19: An Aortenringen, die durch eine Schwellenkonzentration ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) zur Konstriktion gebracht wurden, potenziert die Ko-Inkubation mit OxLDL [100mg/ml] die Vasokonstriktion. Diese Wirkung wird durch CalyA ($1 \cdot 10^{-8} \text{M}$) partiell inhibiert, sei es durch vorherige (Asterisk 1) oder nachträgliche Ko-Inkubation (Asterisk 2) über 30 Minuten; $n=6$, $p=0,02$ für Asterisk 1 und $p=0,01$ für Asterisk 2

3.7 Effekt von Staurosporin auf die Vasokonstriktion durch Ang

II

Staurosporin (Stsp) ist ein nicht-selektiver Inhibitor der Proteinkinase C (PKC), hemmt jedoch ein breites Spektrum von Kinasen, Tyrosinkinasen und Serin-Threonin-Kinasen. Auf die mit einer Schwellenkonzentration ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) von Ang II vorkonstringierten Aortenringe hatte Staurosporin eine dosisabhängige, partiell abschwächende Wirkung. Das Signifikanzniveau wurde erst bei einer Staurosporinkonzentration von $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$ erreicht mit einer Abschwächung der Ang II – Konstriktion um 68,75% (Mean).

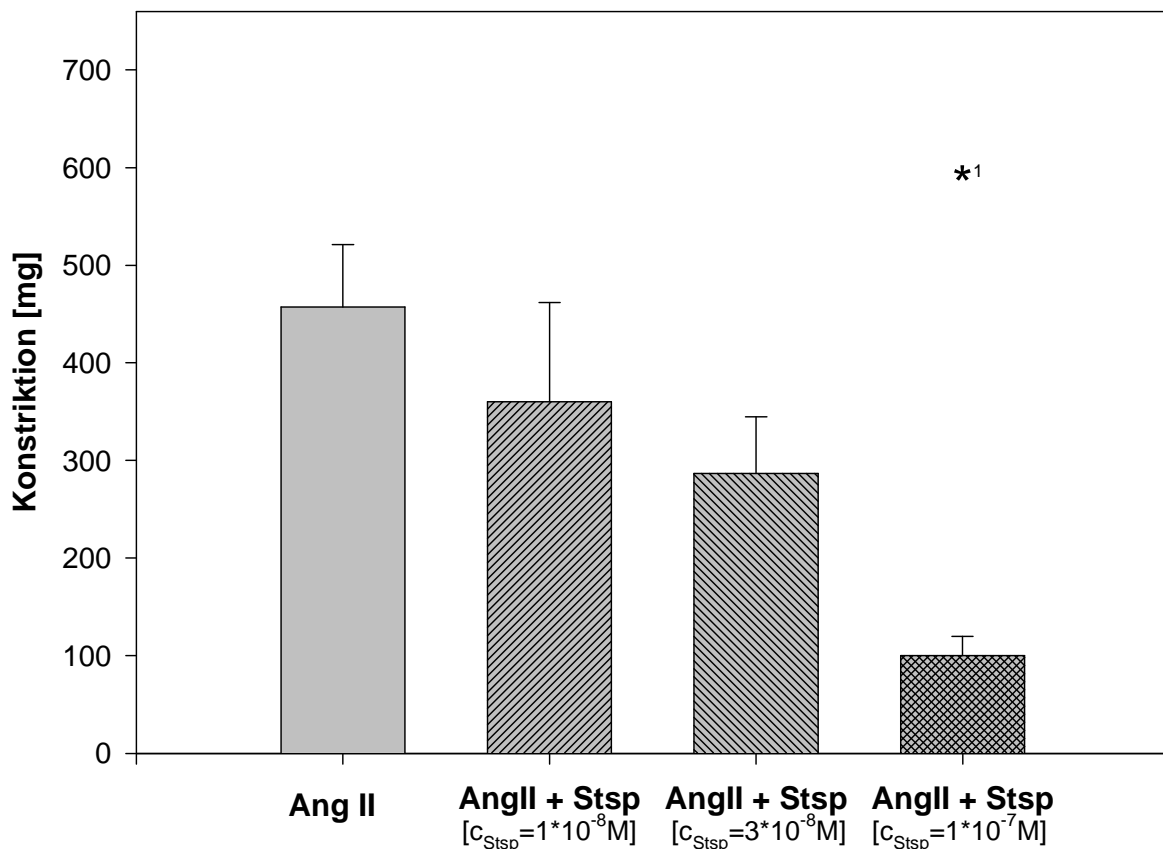


Abbildung 20: Staurosporin reduziert die Konstriktion, die durch eine Schwellenkonzentration ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) Ang II verursacht wurde. Eine

signifikante Reduktion lag bei einer Staurosporinkonzentration c_{Stsp} von $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$ vor mit einer 68,75%igen Abschwächung der Ang II – Wirkung; $n=8$, $p=0,025$ (Asterisk 1). Im Vergleich zwischen Ang II alleine und der Koinkubation mit Staurosporin in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-8} \text{M}$ wurde $p=0,077$ erreicht. Eine Erhöhung der Versuchszahl n kann eventuell eine Signifikanz herausarbeiten, jedoch zeigt bereits die hier aufgezeigte Tendenz, dass eine Inhibition der Proteinkinase C (und anderer Kinasen) durch Staurosporin die Ang II – vermittelte Vasokonstriktion in hoher Konzentration depletieren kann.

3.8 Effekt von Staurosporin auf die Vasokonstriktion durch

OxLDL

Auf die mit einer Schwellenkonzentration ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) von Ang II und einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ OxLDL konstringierten Aortenringe hatte Staurosporin ebenfalls eine dosisabhängige, partiell abschwächende Wirkung. Das Signifikanzniveau wurde jedoch bereits bei einer Staurosporinkonzentration von $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$ erreicht. In der Konzentration von $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$ wurde die Wirkung um 92,35% (Mean) abgeschwächt.

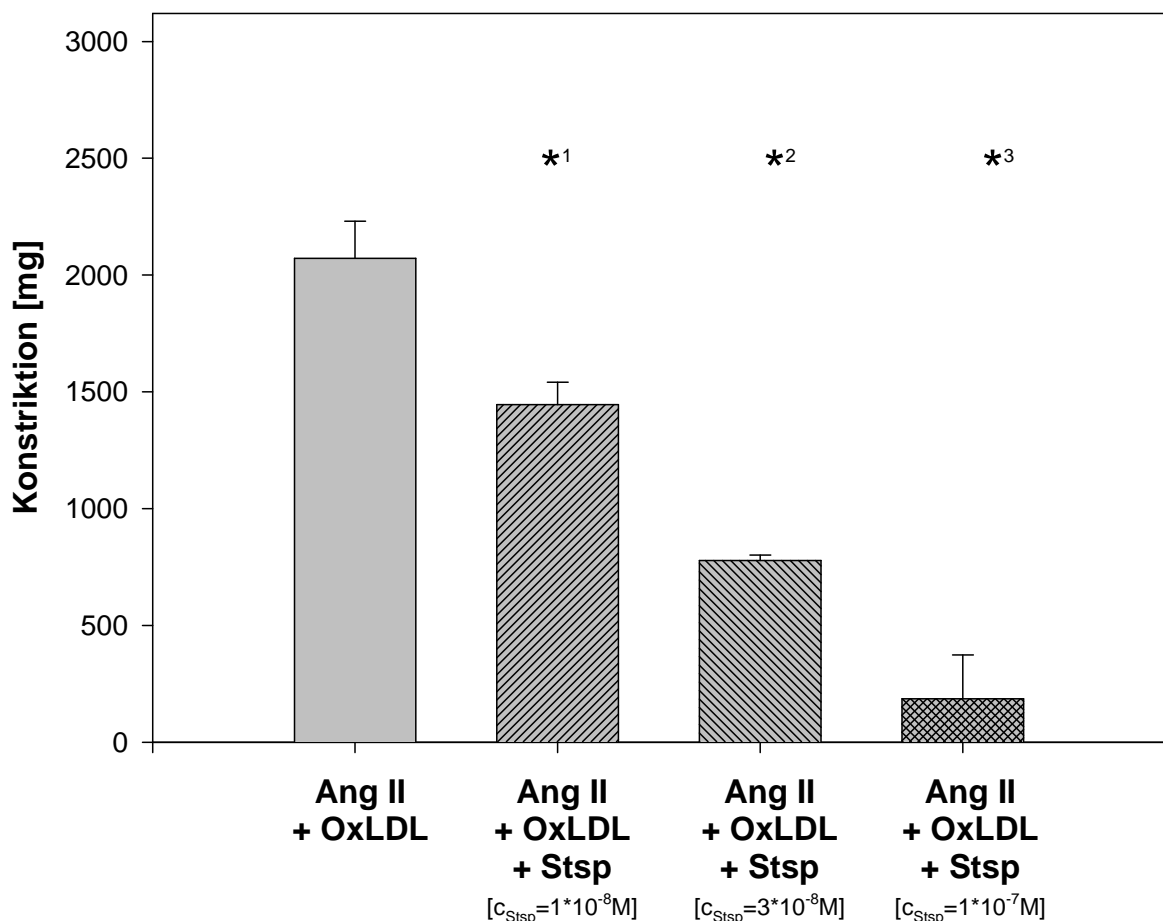


Abbildung 21: Staurosporin reduziert die Konstriktion, die durch eine Schwellenkonzentration ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) Ang II und OxLDL ($100 \mu\text{g/ml}$)

verursacht wurde, signifikant (Asterisk 1 bis 3). Eine signifikante Reduktion lag bereits vor bei einer Staurosporinkonzentration c_{Stsp} von $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$. Bei $c_{\text{Stsp}} = 1 \cdot 10^{-7} \text{M}$ lag eine 92,35%ige Abschwächung der Ang II – Wirkung vor; $n=8$, exemplarisch: $p < 0,006$ (Asterisk 1).

3.9 Effekt von C3 auf die Vasokonstriktion durch OxLDL

Das C3-ähnliche Exotoxin (C3) von *Clostridium limosum*, der wirksame Bestandteil des C2IN/C3-Fusionstoxin, kann nur durch Interaktion mit dem C2IIa-Toxin (C2IIa) von *Clostridium botulinum* nach intrazellulär gelangen und dort RhoA durch eine ADP-Ribosylierung inhibieren. Das Fusionstoxin (C2IN/C3) inhibiert nach Vor-Inkubation von 5 Stunden im Brutschrank in Anwesenheit von C2IIa partiell die durch OxLDL (100mg/ml) potenzierte Vasokonstriktion durch Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$). Die einzelnen Komponenten C2IIa (400ng/ml) und C2IN/C3 (100ng/ml) können keinen Effekt erzielen.

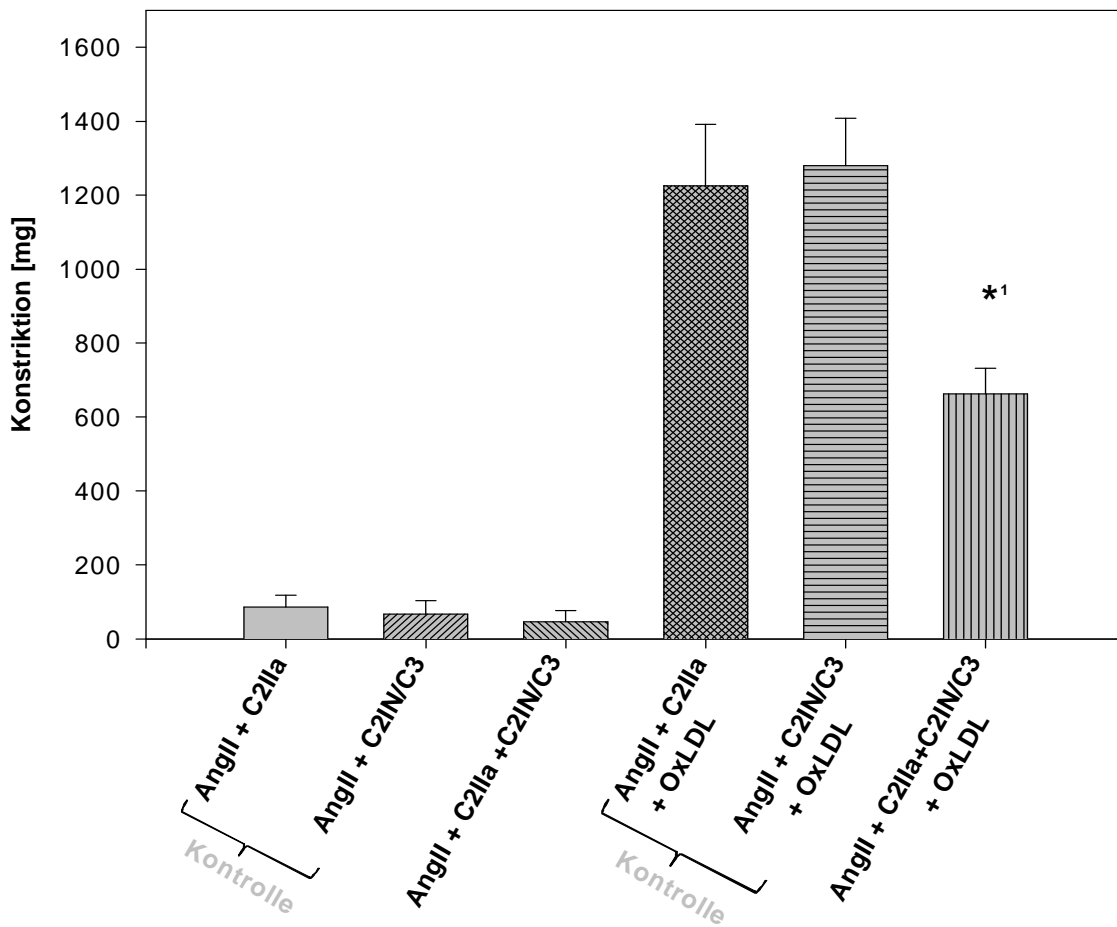


Abbildung 22: Vor-Inkubation mit beiden Komponenten ($C_{C2IIa}=400\text{ng/ml}$, $C_{C3}=100\text{ng/ml}$) zusammen über 5 Stunden im Brutschrank inhibiert partiell den Effekt von OxLDL ($100\mu\text{g/ml}$) in seiner Potenzierung der Ang II-vermittelten Vasokonstriktion der Aortenringe. Die Vorinkubation mit C2IIa oder C2IN-C3 allein hat keinen Effekt auf die Ang II-vermittelte oder OxLDL-vermittelte Vasokonstriktion und sind in diesem Diagramm als Kontrolle angezeigt, $n=7$, $p=0,008$ (Asterisk 1)

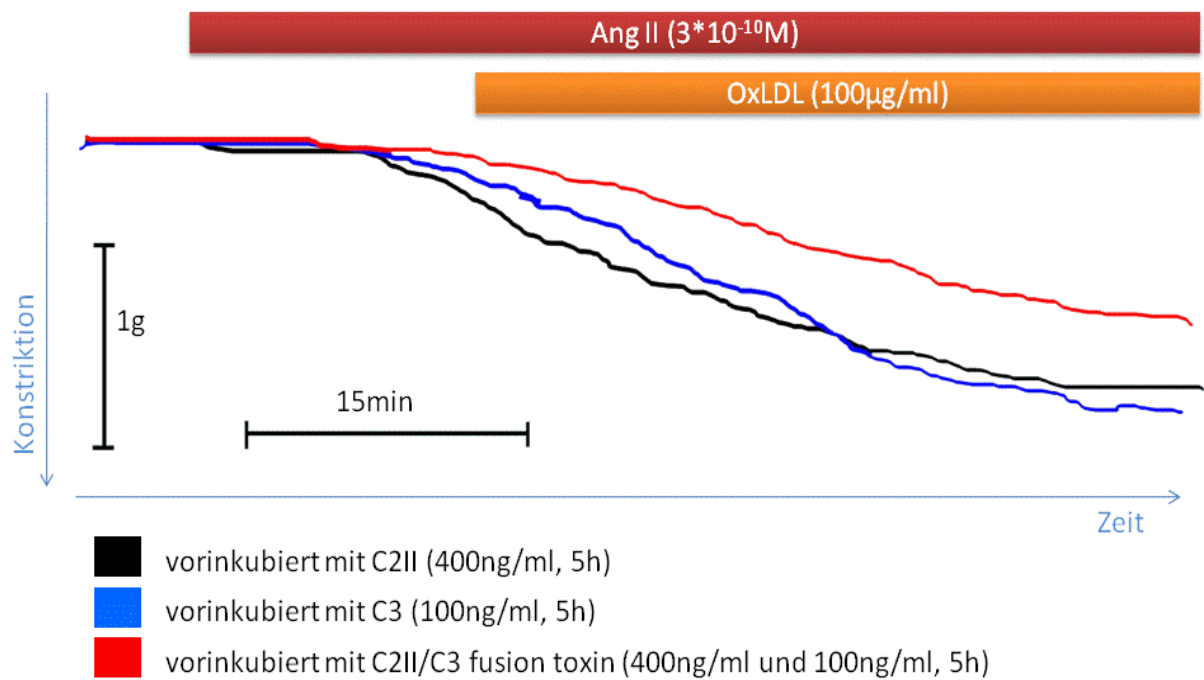


Abbildung 23: repräsentative Originalregistratur (jede farbige Linie (rot, blau, schwarz) zeichnet die Vasomotorik eines Aortenrings auf); an allen Gefäßen wird durch eine Schwellenkonzentration Ang II eine leichte Konstriktion hervorgerufen. Durch OxLDL-Gabe wird diese potenziert. Lediglich in Anwesenheit von C2IIa und C2IN/C3 in der Kombination wird die konstriktive Antwort des Aortenringes abgeschwächt

3.10 Effekt von C3 auf die Vasokonstriktion durch LPC

Die identische Vorbehandlung der Aortenringe (analog zu 3.9) mit C2IIa (400ng/ml) oder C2IN/C3 (100ng/ml) oder der Ko-Inkubation beider Komponenten über 5 Stunden im Brutschrank ruft an Aortenringen, denen nach Vorkonstriktion durch eine Schwellenkonzentration Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) LPC (100mg/ml) zugegeben wurde (analog zu 3.4), kann den unter 3.9 beschriebenen Effekt wiederholen.

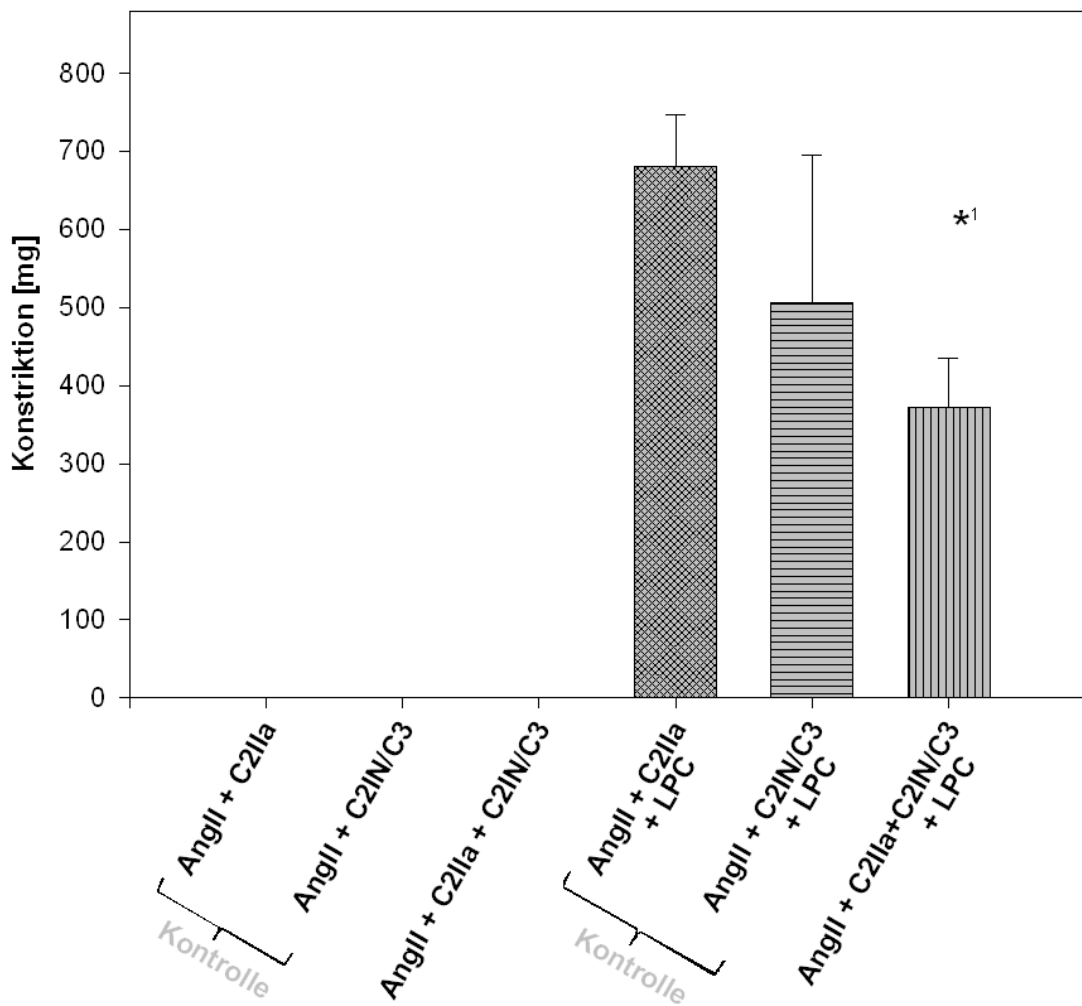


Abbildung 24: Vor-Inkubation mit beiden Komponenten ($c_{C2IIa}=400\text{ng/ml}$, $c_{C3}=100\text{ng/ml}$) zusammen über 5 Stunden im Brutschrank inhibiert partiell den Effekt von LPC ($100\mu\text{g/ml}$) in seiner Potenzierung der Ang II-vermittelten Vasokonstriktion der Aortenringe. Die Vorinkubation mit C2IIa oder C2IN-C3 allein hat keinen Effekt auf die Ang II-vermittelte oder LPC-vermittelte Vasokonstriktion und sind in diesem Diagramm als Kontrolle angezeigt, $n=7$, $p=0,001$ (Asterisk 1)

3.11 Effekt von Y27632 auf die Vasokonstriktion durch OxLDL

Der spezifische RhoA-Kinase-Inhibitor Y27632 verhindert die OxLDL-vermittelte Potenzierung der Ang II – vermittelten Vorkonstriktion.

Nachdem Aortenringe wie unter 3.4 beschrieben mit Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) oder Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) und OxLDL ($100 \mu\text{g/ml}$) behandelt worden sind, wurde Y27632 mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7} \text{M}$ in das Organbad pipettiert. Sowohl der Ang II, als auch der OxLDL-Effekt wurden verhindert.

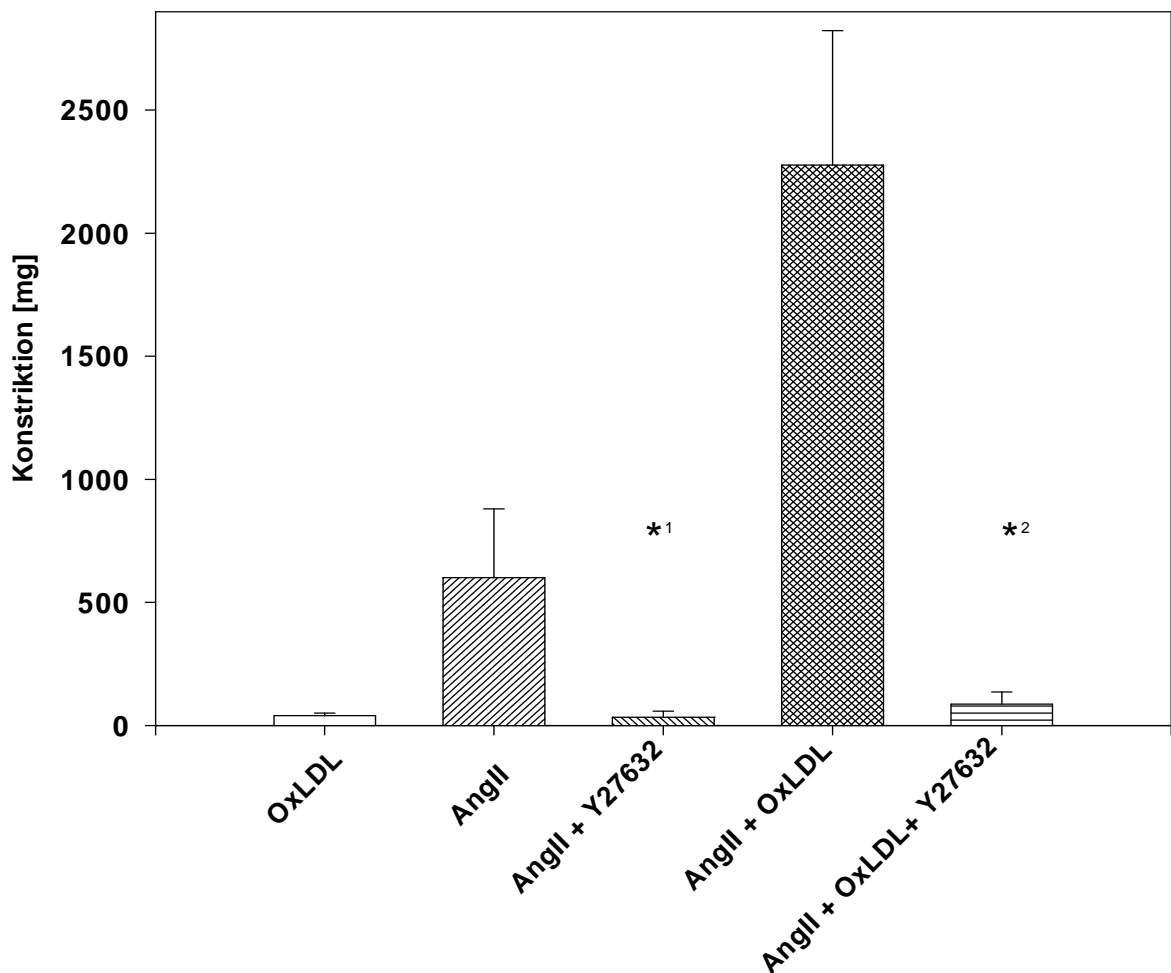


Abbildung 25: Der RhoA-Kinase-Inhibitor Y27632 ($c_{Y27632} = 3 \cdot 10^{-7} \text{M}$) verhindert die Wirkung auf den Gefäßtonus von Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) und die

potenzierte Wirkung von OxLDL (100µg/ml) auf die durch Ang II vorkonstringierten Aortenringe; n=7, p<0,0001 für Ang II allein versus Ang II + Y27632 (Asterisk 1) und Ang II + OxLDL versus Ang II + OxLDL + Y27632 (Asterisk 2)

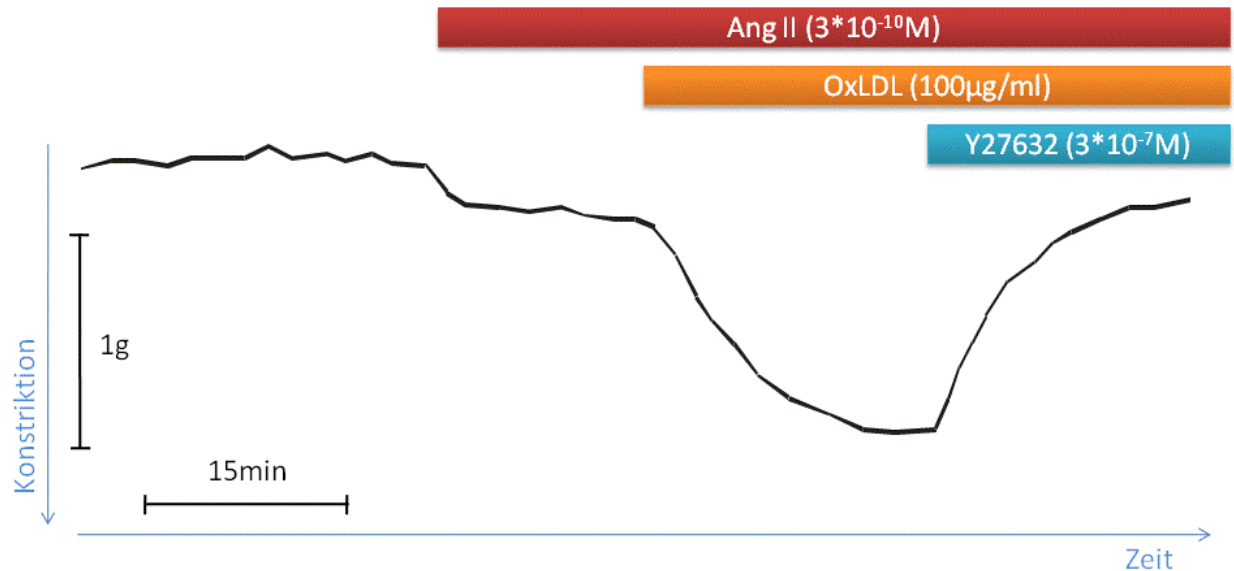


Abbildung 26: repräsentative Originalregistratur (schwarze Linie). Auf einen konstanten Gefäßtonus nach Anlegen einer Vorspannung wird Ang II in der Schwellenkonzentration appliziert. Auf die leichte Konstriktion entfaltet OxLDL seinen potenziierenden Effekt, der wiederum durch Y27632 komplett aufgehoben wird

3.12 Effekt von Y27632 auf die Vasokonstriktion durch LPC

Identisch zur Wirkung von Y27632 auf Aortenringe, die mit Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) und OxLDL ($100 \mu\text{g/ml}$) vorbehandelt wurden (s. 3.10), kann Y27632 die LPC-vermittelte Potenzierung der Vasokonstriktion von Ang II verhindern.

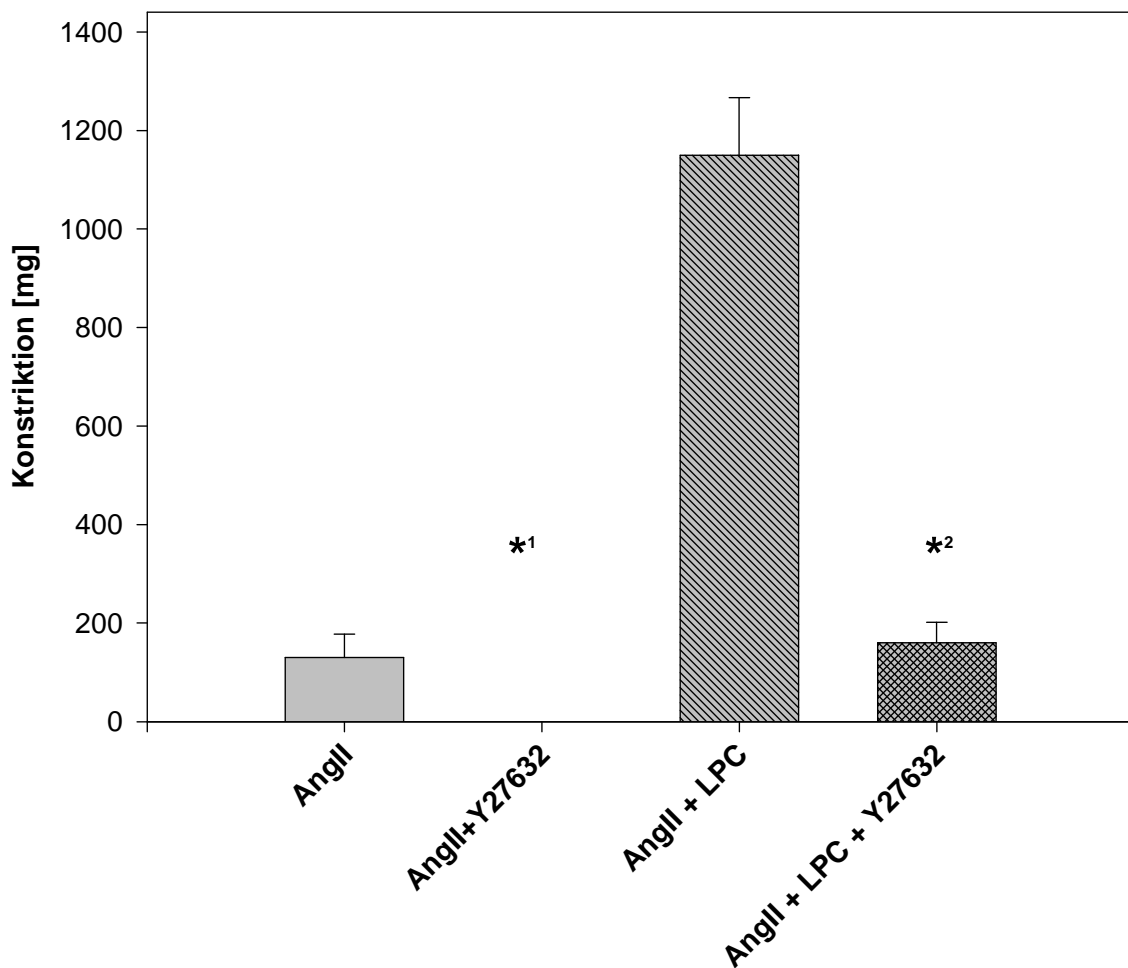


Abbildung 27: Der RhoA-Kinase-Inhibitor Y27632 ($c_{Y27632} = 3 \cdot 10^{-7} \text{M}$) verhindert die Wirkung auf den Gefäßtonus von Ang II ($3 \cdot 10^{-10} \text{M}$) und die potenzierte Wirkung von LPC ($100 \mu\text{g/ml}$) auf die durch Ang II vorkonstringierten Aortenringe; $n=6$, $p < 0,0001$ für Ang II allein versus Ang II + Y27632 (Asterisk 1) und Ang II + LPC versus Ang II + LPC + Y27632 (Asterisk 2)

4. Diskussion

Mit dieser Arbeit haben wir den Einfluss von OxLDL und seinem Bestandteil LPC auf den Gefäßtonus und auf die Gefäßantwort nach Stimulation mit dem Vasokonstriktor Ang II an isolierten Aortenringen von Kaninchen untersucht. OxLDL und LPC hatten keinen Einfluss auf den basalen Vasotonus, aber beide erhöhen stark die Konstriktion, die Ang II in einer niedrigen Konzentration verursacht. Da Substanzen, die die Ca^{2+} -sensitivierenden Kaskaden beeinflussen, auch den OxLDL- und LPC-Effekt beeinflussen und Felodipin nur eine partielle Wirkung auf die OxLDL-vermittelte Potenzierung der Vasokonstriktion besitzt (Versuche durch Görg M (184)), sind die Ergebnisse am besten so zu deuten, dass OxLDL und LPC eine Ca^{2+} -Sensitivierung in der glatten Muskulatur hervorrufen. Durch die partielle oder vollständige Reversion des OxLDL- und LPC-Effekts durch Inhibitoren des RhoA-/RhoA-Kinase-Signalweges, ist zu postulieren, dass OxLDL und sein Bestandteil LPC über eine Stimulation von RhoA und RhoA-Kinase ihren Effekt vermitteln.

4.1 Stellenwert von isometrischen Untersuchungen im Organbad

Die in dieser Arbeit verwendete Methodik der Untersuchung von Aortenringen in einem Organbad mit der Möglichkeit, die Kraftentfaltung unter isometrischen Bedingungen zu messen, eignet sich hervorragend für *in vitro*-Untersuchungen des funktionell und morphologisch hoch komplexen vaskulären Systems. Bereits Furchgott hat in den fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts das Grundprinzip der isometrischen Versuchsanordnung verwendet (185). Interessanterweise hat er zunächst die Tieraorten nicht in Ringe geschnitten, sondern durch helikales Schneiden Gefäßstreifen erhalten. An diesen hat – im Gegensatz zu den Untersuchungen an den Ringen – Acetylcholin einen konstriktiven Effekt ausgeübt. Diese Beobachtung war durch die Endothelschädigung zu erklären, die die helikale Präparation der Gefäße

verursachte. An Aortenringen ist Acetylcholin – analog zum bekannten klinischen Effekt - in niedriger Konzentration ein potenter Vasodilatator.

Die Bedeutung des Endothels auf den in einem System bestehenden Vasotonus ist durch die verwendete Methodik aufgezeigt worden (110) (185). In dieser Arbeit konnte die intakte Endothelfunktion durch die Acetylcholingabe stets überprüft werden.

Beim Verwenden von Aortenringen sind entscheidende Schritte die schnelle Arbeitsweise bei der Gefäßentnahme, dem Transport und der Lagerung, jedoch sicherlich am Bedeutsamsten ist die vorsichtige Präparation der Aortenringe unter dem Lichtmikroskop mit den Mikroinstrumenten.

Prinzipiell kann mit der verwendeten Methodik jede Substanz in ihrer Wirkung und Kinetik auf einen isolierten Gefäßabschnitt untersucht werden. Durch die Möglichkeit, das Endothel zuverlässig zu entfernen (s. 2.4.3), kann dabei die Rolle des Endothels herausgearbeitet werden.

4.2 Vasokonstriktoren und oxidativer Stress

Es gelang in dieser Arbeit nachzuweisen, dass Inkubationen von Aortenringen mit hohen Konzentrationen der Vasokonstriktoren Ang II und PE allein keine Schädigung der Endothelfunktion verursacht.

Weder durch Zugabe von Deferoxamin als Chelatbildner, der die für den Abbau von Radikalen notwendige Eisenionen komplexiert und somit den oxidativen Stress erhöht (s. 1.5.2), noch durch EDTA als unspezifischer Chelatbildner für z.B. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} und Co^{3+} konnte ein Effekt hervorgerufen werden.

Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit bis 22 Stunden (Daten nicht gezeigt) konnte keinen Unterschied in den verschieden behandelten Gefäßen hervorrufen. Jedoch nahm die Endothelfunktion erwartungsgemäß global bei allen Gefäßen deutlich ab.

Auf der anderen Seite ist die Blockade des RAS in vielen *in vitro*-Studien als protektiv gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen worden (186) (187). Ang II führt *in vivo* zu einer Stimulation der O₂⁻-Synthese (188) (48) (63). Man muss davon ausgehen, dass der Ang II während der Inkubationen entweder nicht effektiv war oder aber der Effekt durch die intakte Endothelfunktion wieder kompensiert wurde.

Bedeutsam sind die Ergebnisse unter 3.1.1 bis 3.1.4 für die durchgeführten folgenden Versuche, dass postuliert werden kann, die gezeigten Effekte sind durch die Lipoproteine oder deren Bestandteile verursacht, nicht durch den Vasokonstriktor Ang II.

4.3 Effekt des nativen LDL auf die Endothelfunktion

Natives LDL führt zu keiner Beeinflussung der Acetylcholin-vermittelten NO-Freisetzung aus dem Endothel nach Vorinkubation über 14 Stunden in Anwesenheit einer hohen Konzentration eines Vasokonstriktors (Ang II oder PE).

Dieses Ergebnis geht einher mit den Beobachtungen an kultivierten Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC) (189) (190) (191).

4.4. Interaktion von OxLDL und Ang II

Die Fragestellung, die zu den Analysen des OxLDL-Effekts auf die Ang II-vermittelte Vasokonstriktion führte, ergibt sich aus den Nachweisen, dass beide Substanzen in atherosklerotischen Läsionen ko-lokalisiert sind (192) (193), dass die Vasomotorik bei der Hypercholesterinämie und Atherosklerose verändert ist (194) (195) (196) und dass sowohl OxLDL als auch Ang II den Vasotonus individuell beeinflussen können.

Diese Arbeit konzentriert sich den Effekt der Interaktion der beiden Substanzen auf die glatten Muskelzellen.

OxLDL potenziert die Ang II-vermittelte Erhöhung des Vasotonus.

Während gut bekannt ist, dass sowohl OxLDL als auch Ang II die Endothel-abhängige Vasodilatation abschwächen (197) (198) (199) und dadurch die Konstriktion durch Norepinephrin oder andere Agonisten verstärken (200), konnte in dieser Arbeit zunächst gezeigt werden, dass der OxLDL-Effekt auf die Ang II-vermittelte Vasokonstriktion unabhängig von der Endothelfunktion ist (s. 3.3.2). Auch durch pharmakologische Inhibition der NO-Synthase mit NG-nitro-L-Arginin war die Interaktion der Substanzen unbeeinflusst.

Der Hinweis, dass OxLDL direkt die glatten Muskelzellen stimuliert, findet sich bereits in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Galle (174), in denen eine lineare Beziehung der Konstriktionsantwort deendothelialisierter Gefäße zur Konzentration und zum Oxidationsgrad von LDL aufgezeigt wurde. In jenen Untersuchungen wurden als Agonisten Norepinephrin, Phenylephrin und Serotonin verwendet.

Die Wirkung von OxLDL in dieser Arbeit scheint nicht spezifisch auf die Ang-II-vermittelte Vasokonstriktion zu sein, jedoch ist die Bedeutung der Interaktion für die Entstehung eines erhöhten Vasotonus (201) (202) aufgrund der Ko-Lokalisation beider Substanzen in atherosklerotischen Läsionen signifikant.

4.5 Wirkmechanismus von OxLDL

In dieser Arbeit wurde untersucht, auf welchem Weg OxLDL die Vasomotorik der glatten Muskelzelle beeinflusst.

Der AT₁-Rezeptorantagonist Losartan hat die Kontraktionsantwort durch Ang II erwartungsgemäß vollkommen aufgehoben (Versuche durch Görg M (184)). Unter AT₁-Blockade konnte auch OxLDL keinen Effekt verursachen.

Felodipin verhindert als Calciumkanalblocker den Einstrom von Ca²⁺ nach intrazellulär.

Unter Felodipingabe (Versuche durch Görg M (184)) jedoch war die OxLDL-Potenzierung auf die Ang II-Konstriktion nur zu ca. 50% reduziert, so dass

postuliert werden kann, dass die OxLDL-Wirkung nicht vollständig Ca^{2+} -abhängig ist sondern zu einem gewissen Anteil Ca^{2+} -unabhängig.

Eine sehr wichtige Bedeutung bei der Ca^{2+} -unabhängigen Vasokonstriktion hat die Aktivität der Myosin-Leichtkettenphosphatase (MLCP), die die regulierende Myosin-Leichtkette (MRLC) durch einen dephosphorylierenden Schritt inaktiviert, wodurch die Myosin-Leichtketten (MLC_{20}) nicht mit Aktin interagieren kann (71) (86) (87) (203).

Ist die MLCP dephosphoryliert, ist sie aktiv. Sie kann inhibiert werden durch eine Phosphorylierung (76) (204).

Ein in vitro-Inhibitor ist das in dieser Arbeit verwendete Calyculin A (205). Andere Inhibitoren sind Okadasäure, Microcystin, Nodularin, Tautomycin oder Cantharidin, die alle unterschiedlich stark die MLCP hemmen (206) (86).

Durch die Behandlung der Aortenringe mit CalyA wurde die Vasokonstriktion von Ang II in der Schwellendosis nicht beeinflusst (s. 3.5), jedoch wurde die OxLDL-vermittelte Antwort signifikant herabgesetzt.

CalyA ist jedoch als Induktor einer Vasokonstriktion beschrieben worden (205) (207). Für höhere Konzentrationen von Ang II und CalyA haben wir in der Interaktion dieser beiden Substanzen den bekannten synergistischen Effekt nachvollziehen können.

Die in der veröffentlichten Literatur eingesetzten Konzentrationen von CalyA waren jedoch im Bereich von $1 \cdot 10^{-7} \text{M}$. Wir hingegen verwendeten eine Konzentration von $1 \cdot 10^{-8} \text{M}$, so dass wir wahrscheinlich keine Vollständige Inhibition der MLCP erreicht haben und somit sowohl für Ang II, als auch CalyA Schwellenkonzentrationen verwendet haben.

Die überraschende und nicht geklärte Herabsetzung des OxLDL-Effekts durch die niedrige Konzentrationen von Ang II und CalyA lässt vermuten, dass OxLDL über einen Ca^{2+} -unabhängigen Weg die Vasomotorik beeinflusst.

Die Inhibition der Proteinkinase C (PKC) durch Staurosporin diminuiert den OxLDL-Effekt dosisabhängig. PKC aktiviert CPI-17 dazu, die MLCP durch einen Phosphorylierungsschritt zu inhibieren. Wird die PKC durch Staurosporin gehindert, CPI-17 zu aktivieren, unterbleibt die Inhibition der MLCP. Daraus kann eine Vasokontraktion erfolgen (208) (75).

In den durchgeführten Versuchen gelang es nicht, durch Staurosporin die Kontraktionsantwort zu erhöhen. Im Gegensatz zu den Versuchen mit CalyA wurden die Aortenringe, die mit Ang II in einer Schwellenkonzentration konstringiert worden sind, dosisabhängig durch die Gabe von Staurosporin relaxiert.

Der OxLDL-Effekt auf die Vasokonstriktion durch die Schwellenkonzentration Ang II wurde ebenfalls dosisabhängig aufgehoben, so dass auch hier – analog zu den Ergebnissen der versuche mit CalyA – die Erklärung darin gesucht werden muss, dass OxLDL über einen Ca^{2+} -unabhängigen Weg die Vasomotorik beeinflusst.

Die MLCP ist auch Substrat der RhoA-Kinase (ROCK), die unter dem Einfluss des kleinen G-Proteins RhoA steht (75) (76). Eine Stimulation von RhoA oder ROCK führt zur Ca^{2+} -Sensitivierung (204), so dass postuliert werden kann, dass der RhoA/ROCK-Signalweg eine besondere Bedeutung in der Ca^{2+} -unabhängigen Regulation des Vasotonus besitzt (209) (210) und bei der Entstehung eines chronischen Bluthochdruckes aktiviert ist (211).

Essler et al. wiesen in Endothelzellen eine Kontraktion nach, die durch OxLDL von mittlerem Oxidationsgrad über eine RhoA-Aktivierung und konsekutiver MLCP-Inhibition vermittelt wurde (212).

In dieser Arbeit wurde an Aortenringen untersucht, ob OxLDL über diesen Signalweg einen Effekt auf die Ang II-vermittelte Vasokonstriktion ausübt.

Zuerst konnte der OxLDL- und LPC-Effekt auf den Vasotonus durch spezifische Inhibition von RhoA mit dem Fusionstoxin C2IN/C3 zu annähernd 50% verringert werden.

Schließlich ist durch den spezifischen ROCK-Inhibitor Y27632 (213) jedweder Effekt von OxLDL und LPC in dieser Versuchsanordnung aufgehoben worden.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass OxLDL über RhoA eine Wirkung erzielt ist die von der Arbeitsgruppe nachgewiesene Translokation von RhoA aus dem Zytosol in die Zellmembran nach OxLDL-Applikation (Versuche durch Bolz SS (184)). Diese Translokation bedeutet eine Ca^{2+} -Sensitivierung (214).

Aus den zuletzt genannten drei Ergebnissen kann postuliert werden, dass OxLDL über eine Aktivierung des RhoA-/RhoA-Kinase-Signaltransduktionswegs Einfluss auf den Vasotonus nimmt.

Da das Fusionstoxin jedoch nur eine Abschwächung des Vasotonus um 50% bewirkt, scheint OxLDL seinen Effekt noch über andere Signalwege auszuüben. Eine andere Erklärung findet sich in einer nur unvollständigen ADP-Ribosylierung von RhoA durch C2IN/C3.

Interessanterweise stimuliert Ang II ebenfalls den RhoA/ROCK-Signalweg in Mesenterialgefäßen von Ratten (215) oder Kardiomyozyten von Ratten (216).

Die in den Gewebeschnitten mit Hilfe der Immunfärbung nachgewiesene Translokation von RhoA aus dem Zytosol in die Membran nach Stimulation von Ang II ohne OxLDL (184) und das Ausbleiben dieses Effektes nach Y27632-Behandlung, gibt Ang II neben seiner Bedeutung in der Ca^{2+} -abhängigen auch eine Bedeutung in der Ca^{2+} -unabhängigen Beeinflussung des Vasotonus.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass OxLDL alleine keine Vasokonstriktion verursacht. Aber in Anwesenheit eines Vasokonstriktors tritt eine deutliche kontraktile Antwort auf.

4.6 Rolle von Lysophosphatidylcholin (LPC)

Weiter wurde gezeigt, dass Lysophosphatidylcholin (LPC) als Bestandteil von OxLDL (217), der durch die Veresterung von Cholesterol bei der oxidativen Modifikation von OxLDL entsteht, die Wirkungen von OxLDL nachahmt.

Synthetisches LPC wurde deswegen verwendet, um zu zeigen, dass nur oxidativ verändertes LDL oder dessen Bestandteile, nicht hingegen natives LDL (174), einen Effekt auf den Vasotonus besitzt.

Die Ergebnisse der Versuche mit LPC unterstützen die Hypothese, dass LPC der entscheidende Bestandteil von OxLDL ist, der für die Wirkung auf den Vasotonus verantwortlich ist.

4.7 Klinische Bedeutung

Hypercholesterinämie und Atherosklerose gehen mit einer endothelialen Dysfunktion einher und diese beeinträchtigt die komplexe Regulation des Vasotonus. Neben der Beeinträchtigung der Endothel-vermittelten Vasodilatation ist auch eine Hochregulation des RhoA/ROCK-Signalweges für die Vasotonuserhöhung als Ursache möglich. So konnten Kandabashi et al. an Schweinekoronarien nachweisen, dass eine isolierte Hochregulation von ROCK zu Vasospasmen führt (209). Aber auch bei diesen Versuchen war für die Tonuserhöhung die Anwesenheit eines Vasokonstriktors notwendig.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass OxLDL, unabhängig von den Einflüssen auf die Endothelfunktion, eine Ca^{2+} -Sensitivierung der Myofilamente in glatten Muskelzellen bewirkt über eine Stimulation des kleinen G-Proteins RhoA und der RhoA-Kinase, die zu einer verstärkten Kontraktionsantwort gegenüber Ang II führt.

Diese Beobachtungen liefern weitere Argumente für die Erklärung, warum Vasospasmen auftreten können und warum bei Patienten mit Hypercholesterinämie ein Bluthochdruck aufgrund eines erhöhten Gefäßwiderstandes entsteht.

Die Ko-Lokalisation von OxLDL und Ang II in atherosklerotischen Läsionen (192) (193) verleiht der Interaktion beider Substanzen durch die OxLDL-vermittelte Ca^{2+} -Sensitivierung eine besondere Bedeutung in der Entstehung von Vasospasmen in diesen Regionen.

5. Zusammenfassung

RhoA stimuliert den Vasotonus durch eine Ca^{2+} -Sensitivierung der glatten Muskelzellen, z.B. bei der Hypercholesterinämie oder Atherosklerose.

Diese Studie untersuchte den Einfluss von oxidierten Lipoproteinen (OxLDL), die in atherosklerotischen Läsionen akkumulieren, auf den durch Angiotensin II (Ang II) erhöhten Vasotonus an isolierten Kaninchenaorten mit besonderem Augenmerk auf den RhoA/RhoA-Kinase-Signalweg.

Zunächst wurde die Dilatationsfähigkeit des Endothels nach Vorinkubationen mit Ang II und Erhöhung des oxidativen Stresses überprüft und gezeigt, dass auch nach mehrstündiger Behandlung mit hohen Dosen des Vasokonstriktors die Endothel-abhängige Dilatationsfähigkeit voll erhalten blieb.

OxLDL hatte keinen Einfluss auf den Vasotonus eines unstimulierten Gefäßes, potenzierte aber die Kontraktionsantwort durch Ang II. Dieser Effekt wurde durch die Behandlung mit Calyculin A und Staurosporin abgeschwächt.

Eine RhoA-Kinase-Inhibition mit Y27632 hat den OxLDL-Effekt vollkommen aufgehoben und die RhoA-Inhibition durch die C3-ähnliche Transferase von *Clostridium limosum* deutlich abgeschwächt um ca. 50%.

Lysophosphatidylcholin (LPC), ein Bestandteil von OxLDL, ruft denselben Effekt hervor wie OxLDL auf die Kontraktionsantwort von Ang II-stimulierten Aorten und dieser wird ebenso durch Y27632 vollkommen antagonisiert, wie durch die C3-ähnliche Transferase partiell vermindert.

OxLDL und sein Bestandteil LPC vermitteln Ihren Effekt durch eine Stimulation des RhoA/RhoA-Kinase-Signaltransduktionsweg, was in atherosklerotischen Gefäßen zur Entstehung von Vasospasmen beitragen kann.

6. Literaturverzeichnis

1. *2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension; The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. **Mansia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Struijker Boudier HA, Zanchetti A**, 2007, *Journal of Hypertension*, Bd. 25, S. 1105–1187.
2. *1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee*. **World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH)**. 1999, *J Hypertens*, Bd. 17, S. 151-183.
3. *2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension*. **World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) Writing Group**. 2003, *Journal of Hypertension*, Bd. 21(11), S. 1983-1992.
4. **World Health Organization (WHO)**. *World Health Report 2002: Risks to Health 2002*. Geneve : World Health Organization.
5. *Blood pressure, stroke, and coronary heart disease*. **Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA**. 7. Apr 1990, *Lancet*, Bd. 335(8693), S. 827-38.
6. *Impact of high-normal pressure on the risk of cardiovascular disease*. **Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, et al.**, 1. Nov 2001, *N Engl J Med*, Bd. 345(18), S. 1291-7.

7. *The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different parts of the world.* **Van den Hoogen PCW, Feskens EJM, Nagelkerke NJD, Menotti A, Nissinen A, Kromhout D, for the Seven Countries Study Research Group.**, 6. Jan 2000, N Engl J Med, Bd. 342(1), S. 1–8.
8. *Un nuovo sfigmomanometro.* **Riva-Rocci S.** 1896, Gazz Med Torino , S. 47.
9. *On methods of studying blood pressure.* **Korotkoff NS.** 1905, Izv Voennomed Akad. , S. 365-370.
10. **Kotchen TA.** Hypertensive Vascular Disease. [Hrsg.] Eugene Braunwald, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, and Joseph Loscalzo, Eds., Anthony S. Fauci. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 17th edition. 2008, Bde. 5. Vascular Disease, Chapter 241, ISBN 978-0-07-147691-1.
11. **Krämer, BK.** Primäre arterielle Hypertonie. [Hrsg.] Diehl, Kochsiek Classen. *Innere Medizin.* s.l. : Urban & Schwarzenberg, 1998, 20.10, S. 1217.
12. *Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel.* **Shimkets RA, Warnrock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR, Ulick S, Milora RV, Findling JW,** 1994, Cell, Bd. 97, S. 1780–4.
13. *Neonatal presentation of Gordon syndrome.* **Gereda JE, Bonilla-Felix M, Kalil B, Dewitt SJ,** 1996, J Pediatr, Bd. 129(4), S. 615–7.
14. *Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism and adrenal tumors occurring in a single French pedigree.* **Pascoe L, Jeunemaitre X, Lebrethon MC, Curnow KM, Gomez-Sanchez CE, Gasc JM, Saez JM, Corvol P.** 1995, J Clin Invest, Bd. 96, S. 2236–46.
15. *History About the Discovery of the Renin-Angiotensin System.* **Nidia Basso, Norberto A. Terragno.** 2001, Hypertension, Bd. 38, S. 1246-1249.

16. **Robertson, JIS.** *Renin and angiotensin: a historical review.* [Hrsg.] Nicholls MG, eds., Robertson JIS. London, UK: Gower Medical Publishing : s.n., 1993. S. 1.1–1.18. Bd. 1.
17. *Tubular view of the morbid appearances in 100 cases connected with albuminous urine: With observations.* **Bright R.** 1836, Guy's Hosp Rep., Bd. 1, S. 380–400.
18. **Volhard F.** Nieren und ableitende Harnwege. [Buchverf.] Staehelin R, Bergmann G. *Handbuch der Inneren Medizin.* Berlin : Springer Verlag, 1931, Bd. 6, S. 1-1023.
19. *A Memorial to Robert Tiegerstedt : The Centennial of Renin Discovery.* **Inagami, Tadashi.** 1998, Hypertension, Bd. 32, S. 953-957.
20. *The ACE and I: how ACE inhibitors came to be.* **Erdös, EG.** 2006, The FASEB Journal, Bd. 20, S. 1034-103.
21. *Niere und Kreislauf.* **Tiegerstedt R, Bergman PG,** 1898, Skandinavisches Archiv für Physiologie, Bd. 8, S. 223-271.
22. *Studies on experimental hypertension I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia.* **Goldblatt H, Lynch J, Hanzal R.F., Summerville W.W, , 1934(59): p. 347.** 1934, Journal of experimental Medicine, Bd. 59, S. 347-379.
23. *The renal origin of hypertension.* **Goldblatt H.** 1947, Physiological Reviews, Bd. 27/1, S. 120-165.
24. *The substance causing renal Hypertension.* **Braun-Menendez E., Fasciolo J.C., Leloir L.F, Muñoz J.M,** 1940, Journal of Physiology, Bd. 98, S. 283-298.
25. *A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator.* **Page IH, Helmer O,** 1940, Journal of experimental Medicin, S. 29-42.

26. *The isolation and assay of hypertensin from blood.* **Skeggs LT Jr., Kahn JR, Shumway NP**, März 1952, J Exp Med, Bd. 95(3), S. 241-6.
27. *The amino acid sequence of hypertensin II.* **Skeggs LT Jr., Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP, Woods KR**, 1. August 1956, J Exp Med, Bd. 104(2), S. 193–197.
28. *The amino acid sequence in a hypertensin.* **Elliott DF, Peart WS**. Februar 1957, Biochem J., Bd. 65(2), S. 246–254.
29. *The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I.* **Lentz KE, Skeggs LT Jr., Woods KR, Kahn JR, Shumway NP**, 1. August 1956, J Exp Med, Bd. 104(2), S. 183–191.
30. *The Chemistry of Renin Substrate.* **Skeggs LT Jr., Lentz KE, Hochstrasser H, Kahn JR**, 25. January 1964, Can Med Assoc J, Bd. 90(4), S. 185–189.
31. *Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme).* **Yang HYT, Erdös EG, Levin Y**, 1971, Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics, Bde. 1, Vol. 177, S. 291-300.
32. *A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca.* **Ferreira, SH**. February 1965, Br J Pharmacol Chemother, Bd. 24(1), S. 163–169.
33. *Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents.* **Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW**, 22. Apr 1977, Science, Bd. 196(4288), S. 441-4.
34. *Angiotensin II receptor antagonists: an emerging new class of cardiovascular therapeutics.* **Timmermans, PB**. Jul 1999, Hypertens Res, Bd. 22(2), S. 147-53.

35. *Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor.* **Wood JM, Mainbaum J, Rahuel J, Grutter MG, Cohen NC, Rasetti V, Ruger H et al.** 2003, *Biochem Biophys Res Commun*, Bd. 303, S. 698–705.
36. *Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren.* **Stanton A, Jensen C, Nussberger J, O'Brien E.** 2003, *Hypertension*, Bd. 42, S. 1137–1143.
37. **(EMA), European Medicines Agency.** *Scientific discussion.* [Online] 2007. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDF/EPAR/rasilez/H-780-en6.pdf>.
38. *Targeting Cardiovascular Protection: The Concept of Dual Renin-Angiotensin System Control.* **Unger, T.** 2008, *Medscape J Med*, Bd. 10(Supp): S4.
39. *Angiotensin receptor blockers: therapeutic targets and cardiovascular protection.* **Ruilope LM, Rosei EA, Bakris GL, et al.,** 2005, *Blood Press*, Bd. 14, S. 196–209.
40. *Angiotensin.* **Page IH, Bumpus FM,** 1961, *Physiol. Rev.*, Bd. 41, S. 331.
41. *Plasma angiotensinase activity in patients with hypertension and edema.* **Hickler RB, Lauler DP, Thorn GW,** May 1963, *J Clin Invest.* , Bd. 42(5), S. 635–648.
42. *Hydrolysis of angiotensin I by peptidase in homogenates of rat lung and aorta.* **Johnson H, Drummer OH,** 1988, *Biochem Pharmacol*, Bd. 37, S. 1131–36.
43. *Angiotensin receptors.* **Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Höhle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ,** *Hypertens Suppl.* , Bd. 14, S. S95-103.
44. *Extrarenal aspects of angiotensin II function.* **Csikós T, Gallinat S, Unger T,** Apr 1997 , *Eur J Endocrinol.* , Bd. 136, S. 349-58.

45. *Human brain contains a novel non-AT1, non-AT2 binding site for active angiotensin peptides.* **Karamyan VT, Stockmeier CA, Speth RC**, 22. Jul 2008, Life Sci. .
46. *International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.* **de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T**, 2000, Pharmacol Rev , Bde. 52:415-472.
47. *Angiotensin receptors.* **Lin S-Y, Goodfriend TL**, 1970, Am J Physiol , Bd. 218, S. 1319-28.
48. *Angiotensin AT1/ AT2 Receptors: Regulation, Signaling and Function.* **Kaschina E, Unger T**, 2003, Blood pres, Bd. 24(2), S. 93-101.
49. *Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor.* **Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE**, 16. May 1991, Nature, Bd. 351(6323), S. 233-6.
50. *Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor.* **Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T**, 16. May 1991 , Nature, Bd. 351(6323), S. 230-3.
51. *Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors.* **Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ**, 1993, J Biol Chem , Bd. 268, S. 24539-42.
52. *Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene.* **Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, et al**, 1993, J Hypertens, Bd. 11, S. 919-25.
53. *Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes.* **Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M**, 30. Aug 1989 , Biochem Biophys Res Commun., Bd. 163(1), S. 284-91.

54. *Angiotensin II receptor and signal transduction mechanisms. In: Raizada MK, Phillips MI, Summers C, eds. Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system. Catt KJ, Sandberg K, Balla T, Boca Raton, Fla. : s.n., 1993, CRC Press, S. 307-56.*
55. *Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor type I: studies by site-directed mutagenesis. Ohyama K, Yamano Y, Chaki S, Kondo T, Inagami T, 1992, Biochem Biophys Res Commun , Bd. 189, S. 677-83.*
56. *G Protein-coupled Receptors. Lefkowitz, Robert J. 24. July 1998, J Biol Chem, Vol. 273, , Bd. 30, S. 18677-18680.*
57. *Regulation of G Protein–Coupled Receptor Signaling by Scaffold Proteins. Hall RA, Lefkowitz RF, 2002, Circ. Res., Bd. 91, S. 672-680.*
58. *Angiotensin-II- and endothelin-induced protein phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. Tsuda T, Griendling KK, Ollerenshaw JD, Lassegue B, Alexander RW, 1993, J Vasc Res, Bd. 30, S. 241-9.*
59. *The heterotrimeric G q protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. Sadoshima J, Izumo S, 15. February 1996 , EMBO J., Bd. 15(4), S. 775–787.*
60. *In vivo effects of angiotensin II on vascular smooth muscle contraction and blood pressure are mediated through a protein tyrosine kinase-dependent mechanism. Sauro MD, Sudakow R, Burns S, 1996 , J Pharmacol Exp Ther. , S. 1744–1750.*
61. *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK, 1988, Circ Res. , Bd. 62, S. 749 –756.*
62. *Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal–Regulated Kinase Inhibition Attenuates Angiotensin II–Mediated Signaling and Contraction in Spontaneously*

- Hypertensive Rat Vascular Smooth Muscle Cells.* **Touyz RM, El Mabrouk M, He G, Wu XH, Schiffrin EL.** 1999, *Circulation Research*, Bd. 84, S. 505-515.
63. *AT1 and AT2 Receptor in the Kidney: Role in Health and Disease.* . **Siragy HM.** 2004, *Seminars in Nephrology*, Bd. 24(2), S. 93-100.
64. *The Angiotensin II AT2 Receptor Is An AT1Receptor Antagonist.* **Said A, Adel-Tawab Ahmed M., Quitterer U,** 2001, *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 273(43), S. 39721-39726.
65. *Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT1 receptors.* **Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N,** 1996, *J Biol Chem*, Bd. 271(37), S. 22729-35.
66. *Non-AT(1)-receptor-mediated protective effect of angiotensin against acute ischaemic stroke in the gerbil.* **Dalmay F, Mazouz H, Allard J, Pesteil F, Achard JM, Fournier A,** Jun 2001, *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, Bd. 2(2), S. 103-106.
67. *Angiotensin AT(2) Receptor Ligands :Do They Have Potential as Future Treatment for Neurological Disease?* **Rosenstiel P, Gallinat S, Arlt A, Unger T, Sievers J, Lucius R,** 2002, *CNS Drugs*, Bd. 16(3), S. 145-53.
68. *Go with the flow.* **Cooke JP, Tsao PS,** 2001, *Circulation* , Bd. 103, S. 2773-2775.
69. *Flow-induced dilation of human coronary arterioles: important role of Ca(2+)-activated K(+) channels.* **Miura H, Watchel RE, Liu Y, Loberiza F, Saito T, Miura M, Gutterman DD,** 2001, *Circulation* , Bd. 103, S. 1992-1998.
70. **Mitchell BM, Chitaleky KC, Webb RC,** Vascular smooth muscle contraction and relaxation. [Hrsg.] Black HR, Izzo JL. *Hypertension Primer: The Essentials of High Blood Pressure.* Dallas, Tex: American Heart Association : s.n., 2003, S. 97–99.

71. *Smooth muscle contraction and relaxation.* **Webb RC.** 2003, Adv Physiol Educ, Bd. 27, S. 201-206.
72. *A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization.* **Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F,** 1995, J Biochem (Tokyo), Bd. 118, S. 1104-1107.
73. *Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility.* **Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, Brautigan DL,** 2000, J Biol Chem, Bd. 275, S. 9897-9900.
74. *Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle.* **Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, Khalequzzaman M,** 2003, J Physiol, Bd. 546, S. 879-889.
75. *Signal transduction and regulation in smooth muscle.* **Somlyo AP, Somlyo AV.** 17. November 2002, Nature, Bd. 372, S. 231-236.
76. *Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II.* **Somlyo AP, Somlyo AV,** 2000, J Physiol, Bd. 522 Pt 2, S. 177-185.
77. *Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies.* **Keilbach A, Ruth P, Hofmann F,** 1992, Eur J Biochem, Bd. 208, S. 467-473.
78. *Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β .* **Ammendola A, Geiselhoring A, Hofmann F, Schlossmann J,** 2001, J. Biol. Chem., Bd. 276, S. 24153-24159.
79. *Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I β .* **Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K,**

Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P, 2000, *Nature*, Bd. 404, S. 197-201.

80. *IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase.* **Geiselhoringer A, Werner M, Sigl K, Smital P, Worner R, Acheo L, Stieber J, Weinmeister P, Feil R, Feil S, Wegener J, Hofmann F, Schlossmann J**, 2004, *Embo J*, Bd. 23, S. 4222-4231.

81. *The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo.* **Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L**, 1998, *J. Biol. Chem.* , Bd. 273, S. 32950-32956.

82. *Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072.* **Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD**, 1999 , *J. Biol. Chem.* , Bd. 274 , S. 10927-10935.

83. *Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation.* **Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P, Hofmann F**, 2000 , *Circ. Res.* , Bd. 87 , S. 825-830.

84. *Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha.* **Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME**, 1999 , *Science* , Bd. 286 , S. 1583-1587.

85. *Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase.* **Nakamura M, Ichikawa K, Ito M, Yamamori B, Okinaka T, Isaka N, Yoshida Y, Fujita S, Nakano T**, 1999 , *Cell Signal* , Bd. 11, S. 671-676.

86. *Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation.* **Hartshorne DJ, Ito M, Erdödi F**, May 1998 , *J Muscle Res Cell Motil*, Bd. 19(4), S. 325-41.

87. *Modulation of Ca²⁺-sensitivity and of the time course of contraction in smooth muscle: a major role of protein phosphatases? .* **Somlyo AP, Kitazawa T, Himpens B, Matthijs G, Horiuti K, Kobayashi S, Goldman YE, Somlyo AV.** 1989, *Advances in Protein Phosphatases*, Bd. 5, S. 181-195.
88. *Small GTP-Binding Proteins.* **Takai Y, Sasaki T, Matozaki T,** 2001, *Physiol Rev* , Bd. 81, S. 153-208.
89. *The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions.* **Bourne HR, Sanders DA, McCormick F,** 1990, *Nature* , Bd. 348, S. 125–132.
90. *A novel ras-related gene family.* **Madaule P, Axel R,** 1985, *Cell*, Bd. 41, S. 31–40.
91. *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.* **Ridley AJ, Hall A,** 1992, *Cell*, Bd. 70, S. 389 –399.
92. *Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho.* **Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH,** 1994, *J Cell Biol*, Bd. 126, S. 801-810.
93. *Requirement for Rho-mediated myosin light chain phosphorylation in thrombin-stimulated cell rounding and its dissociation from mitogenesis.* **Majumdar M, Seasholtz TM, Goldstein D, de Lanerolle P, Brown JH,** 1998, *J Biol Chem*, Bd. 273, S. 10099 –10106.
94. *Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes.* **Aktories K, Rosener S, Blaschke U, Chhatwal GS,** 1988, *Eur J Biochem*, Bd. 172, S. 445–450.

95. *ADP-ribosylation of the bovine brain rho protein by botulinum toxin type C1.* **Kikuchi A, Yamamoto K, Fujita T, Takai Y**, 1988, J Biol Chem , Bd. 263, S. 16303–16308.
96. *Substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase, Gb, has an amino acid sequence homologous to a putative rho gene product.* **Narumiya S, Sekine A, Fujiwara M**, 1988, J Biol Chem , Bd. 263, S. 17255–17257.
97. *Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase.* **Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S**, 1989, J Biol Chem, Bd. 264, S. 8602–8605.
98. *Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology.* **Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A**, 1990, J Cell Biol, Bd. 111, S. 1001–1007.
99. *G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets.* **Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G**, 1994, Proc Natl Acad Sci U S A, Bd. 91, S. 504 –508.
100. *Reconstitution of receptors and GTPbinding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor-G protein coupling.* **Barr AJ, Brass LF, Manning DR**, 1997, J Biol Chem, Bd. 272, S. 2223–2229.
101. *Involvement of rho in GTP γ S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity.* **FEBS Lett. Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K, Takuwa Y**, 1995, FEBS Lett. , Bd. 367, S. 246–250.
102. *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase).* **Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K**, 1996, Science, Bd. 273, S. 245–248.

103. *RHO signaling in vascular diseases.* **Seasholtz TM, Brown JH**, 2004, Mol Interv, Bd. 4, S. 348 –357.
104. *Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature.* **Lee DL, Webb RC, Jin L**, 2004, Hypertension, Bd. 44, S. 796 –799.
105. *Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats.* **Asano M, Nomura Y**, 2003, Hypertens Res. , Bd. 26, S. 97–106.
106. *Evidence that Rho-kinase activity contributes to cerebral vascular tone in vivo and is enhanced during chronic hypertension: comparison with protein kinase C.* **Chrissobolis S, Sobey CG**, 2001, Circ Res. , Bd. 88, S. 774 –779.
107. *Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans.* **Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A**, 2001, Hypertension, Bd. 38, S. 1307–1310.
108. *Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension.* **Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K, Takeshita A**, 2001, FASEB J. , Bd. 15, S. 1062–1064.
109. *Cell biology of endothelial cells.* **Jaffe EA**. 1987, Hum Pathol, Bd. 18, S. 234-239.
110. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* **Furchgott RF, Zawadzki JV**, 1980, Nature, Bd. 288, S. 373-376.
111. *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.* **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G**. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 84, S. 9265-9269.

112. *Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin.* **Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H**, 1978, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, Bd. 9, S. 145-158.
113. **The Nobel Foundation.** Medicine 1998. *nobelprize.org*. [Online] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/index.html.
114. *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria.* **Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR**, 1973, *J Clin Invest* , Bd. 52, S. 2745-2756.
115. *Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization.* **Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL**, 1976, *Science* , Bd. 191, S. 1050-1051.
116. *Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells.* **Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA**, 1977, *Proc Natl Acad Sci USA*, Bd. 74, S. 3922-3926.
117. *Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion.* **Lerman A, Burnett JC Jr.**, 1992, *Circulation*, Bd. 86 Suppl., S. 12-19.
118. *Characterization of vascular relaxant factor released from cultured endothelial cells.* **Lückhoff A, Busse R, Winter I, Bassenge E**, 1987, *Hypertension*, Bd. 9, S. 295-303.
119. *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.* **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masak T**, 1988, *Nature* , Bd. 332, S. 411-415.
120. *Endothelium and haemorheology.* **Gori T, Dragoni S, Di Stolfo G, Forconi S**, 2007, *Ann Ist Super Sanita*, Bd. 43, S. 124-129.
121. *Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation.* **Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S**, 1986, *Br J Pharmacol* , Bd. 88, S. 411-415.

122. *Interactions between neutrophils and endothelial cells.* **Godin C, Caprani A, Dufaux J, Flaud P**, 2, 1993, J Cell Sci , Bd. 106, S. 441-51.
123. *Inflammation and atherosclerosis.* **Libby P, Ridker PM, Maseri A**, 2002, Circulation, Bd. 105, S. 1135–1143.
124. *Inflammation in atherosclerosis.* **Libby P**. 2002, Nature, Bd. 420, S. 868–874.
125. *Physiology of the endothelium.* **Galley HF, Webster NR**, 2004, Br J Anaesth , Bd. 93, S. 105-13.
126. *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.* **Alderton WK, Cooper CE , Knowles RG**, 2001, Biochem J, Bd. 357, S. 593-615.
127. *Nitric oxide and its role in the cardiovascular system.* **Loscalzo J, Welch G**, 1995, Prog Cardiovasc Dis , Bd. 38, S. 87-104.
128. *Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal.* **Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA**, 23. Feb 2006 , Cardiovasc Diabetol, Bd. 5:4.
129. *Nitric oxide in adult lung disease.* **CM., Hart.** (5), 1. May 1999, Chest, Bd. 15, S. 1407-17.
130. *The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin.* **Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D**, 1982, Proc Natl Acad Sci, Bd. 79, S. 2106-2110.
131. *Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine.* **VanDeVoorde J, Leusen I**, 1983, Eur J Pharmacol, Bd. 87, S. 113-120.
132. *Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries.* **DeMey JG, Vanhoutte PM**, 1981, J Physiol , Bd. 316, S. 347-355.

133. *Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin.* **Cocks TM, Angus JA**, 1983, *Nature*, Bd. 305, S. 627-630.
134. *Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle.* **Furchgott RF**. 1983, *Circ Res* , Bd. 53, S. 557-573.
135. *Hypoxia stimulates the release of endothelium-derived relaxant factor (EDRF).* **Pohl U, Busse R**, 1989, *Am J Physiol* , Bd. 256, S. H1595-H1600.
136. *The endothelial surface layer.* **Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P**, 2000, *Pflugers Arch* , Bd. 440, S. 653-66.
137. *Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide.* **Radomski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S**, 1993, *Cardiovasc Res*, Bd. 27, S. 1380-2.
138. *Effects of PGI₂ and PGI analogues on cAMP levels in cultured endothelial and smooth muscle cells derived from bovine arteries.* **Dembinska-Kiec A, Rücker W, Schönhöfer PS**, 1980, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* , Bd. 311, S. 67-70.
139. *Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BKCa channels.* **Archer SL, Gragasin FS, Michelakis ED, et al**, 2003, *Circulation*, Bd. 107, S. 769–776.
140. *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor.* **Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S**, 1986, *Nature*, Bd. 320, S. 454-456.
141. *The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide.* **Pryor WA, Squadrito GL**, 1995, *Am J Physiol* , Bd. 268, S. L699-L722.

142. *Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor.* **Rubanyi GM, Vanhoutte PM**, 1986, Am J Physiol, Bd. 250, S. H822-H827.
143. *The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury.* **JS., Beckman.** 1991, J Dev Physiol, Bd. 15, S. 53-59.
144. *Physiological importance of nitric oxide.* **J., Collier.** 1991, Br Med J, Bd. 302, S. 1289-1290.
145. *Is NO an endogenous antiatherogenic molecule?* **Cooke JP, Tsao PS**, 1994, Arterioscler Thromb , Bd. 14, S. 753-759.
146. *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndrome.* **P., Libby.** 2001, Circulation , Bd. 104, S. 365-372.
147. *The nuclear factor-kappa B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis.* **Thurberg B, Collins T**, 1998, Curr Opin Lipidol , Bd. 9, S. 387-396.
148. *PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells.* **Marx N, Sukhova GK, Collins T**, 1999, Circulation , Bd. 99, S. 3125-31.
149. *Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits.* **Verbeuren T, Jordaens F, Zonnekeyn L, Van Hove C, Coene M, Herman A**, 1986, Circ Res , Bd. 58, S. 552-564.
150. *Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis.* **Zeiber AM, Drexler H, Wollschläger H, Just HJ**, 1991, Circulation, Bd. 83, S. 391-401.
151. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* **R., Ross.** 6423, 29. Apr 1993, Nature, Bd. 362, S. 801-9.

152. *Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids.* **Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D,** 1984, Proc Natl Acad S.
153. *Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man.* **Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D,** 4, Oct 1989 , J Clin Invest. , Bd. 84, S. 1086-95.
154. *Free radical production and angiotensin.* **G., Wolf.** 2000, Curr Hypertens Rep, Bd. 2, S. 167-173.
155. *NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium.* **Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS.** 1994, Am J Physiol, Bd. 266, S. H2568-2572.
156. *NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis.* **Rueckschloss U, Duerrschmidt N, Morawietz H,** 2, Apr 2003, Antioxid Redox Signal, Bd. 5, S. 171-80.
157. *Receptors for oxidized low density lipoprotein.* **UP, Steinbrecher.** Biochim Biophys Acta, Bd. 1436, S. 279-298.
158. *An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein.* **Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T,** 1997, Nature, Bd. 386, S. 73–77.
159. *Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders.* **Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G,** 2006, Cardiovasc Res., Bd. 69, S. 36–45.
160. *Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions.* **Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami**

M, Moriwaki H, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Hashimoto N, Kita T, 1999, *Circulation*, Bd. 99, S. 3110–3117.

161. *Increased expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in initial atherosclerotic lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.* **Chen M, Kakutani M, Minami M, Kataoka H, Kume N, Narumiya S, Kita T, Masaki T, Sawamura T,** 2000, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Bd. 20, S. 1107–1115.

162. *Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low density lipoproteins.* **Amberger A, Jurgens G, Michaelis D, Schet G, Eberl T, Jindal S, Xu Q, Wick G,** 1997, *Cell Stress Chaper*, Bd. 2, S. 94-103.

163. *Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL mediated up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells.* **Li D, Mehta JL,** 2000, *Circulation*, Bd. 101, S. 2889-2895.

164. *Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis.* **N, Leitinger.** 2003, *Curr Opin Lipido*, Bd. 14, S. 421-430.

165. *Measuring circulating oxidized low density lipoprotein to evaluate coronary risk.* **Tsimikas S, Witztum JL,** 2001, *Circulation*, Bd. 103, S. 1930-1932.

166. *Oxidized low density lipoprotein is resistant to cathepsins and accumulates within macrophages.* **Lougheed M, Zhang HF, Steinbrecher UP,** 22, 5. Aug 1991, *J Biol Chem.*, Bd. 266, S. 14519-25.

167. *Up-regulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX 1) by oxidized and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors.* **Li D, Mehta JL,** 2000, *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, Bd. 20, S. 1116-1122.

168. *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production.* **Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG**, Jun 1993, J Clin Invest, Bd. 91, S. 2546-51.
169. *Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells.* **Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J**, Oct 2000, J Am Soc Nephrol, Bd. 11, S. 1819-25.
170. *Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation.* **Ohara Y, Peterson TE, Zheng B, Kuo JF, Harrison DG**. Jun 1994, Arterioscler Thromb, Bd. 14, S. 1007-13.
171. *Hypercholesterolemia and Atherosclerosis change vascular reactivity in Rabbits by Different Mechanism.* **Galle J, Busse R, Bassenge E**, 6, Nov-Dec 1991, Arteriosclerosis and Thrombosis, Bd. 11, S. 1712-8.
172. *Inhibition of cyclic AMP- and cyclic GMP-mediated dilations in isolated arteries by oxidized low density lipoproteins.* **Galle J, Bauersachs J, Busse R, Bassenge E**, Feb 1992, Arterioscler Thromb, Bd. 12, S. 180-6.
173. *Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of endothelium-derived relaxing factor.* **Galle J, Mülsch A, Busse R, Bassenge E**, Jan-Feb 1991, Arterioscler Thromb, Bd. 11, S. 198-203.
174. *Oxidized low density lipoproteins potentiate vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle.* **Galle J, Bassenge E, Busse R**, May 1990, Circ Res, Bd. 66, S. 1287-93.
175. *Oxidized LDL increase the sensitivity of the contractile apparatus in isolated resistance arteries for Ca²⁺ via a Rho- and Rho-kinase-dependent mechanism.* **Bolz SS, Galle J, Derwand R, De Wit C, Pohl U**, 2000, Circulation , Bd. 102, S. 2402–2410.
176. *Oxidized LDL and Lp(a). Preparation, modification, and analysis.* **Galle J, Wanner C**, 1998, Methods Mol Biol, Bd. 108, S. 119-130.

177. *Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism.* **Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D**, 1987, *Arteriosclerosis*, Bd. 7, S. 135–143.
178. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ**, 1951, *J Biol Chem*, Bd. 19, S. 265-275.
179. *Botulinum ADP-ribosyltransferase C3: A new tool to study low molecular weight GTP-binding proteins.* **Aktories K, Hall A**, 1989, *Trends Pharmacol Sci*, Bd. 10, S. 415–418.
180. *Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires oligomerization and acidification.* **Barth H, Blocker D, Behlke J, Bergsma Schutter W, Brisson A, Benz R, Aktories K**, *J Biol Chem* , Bd. 275, S. 18704–18711.
181. *The binary Clostridium botulinum C2 toxin as a protein delivery system: identification of the minimal protein region necessary for interaction of toxin components.* **Barth H, Roebing R, Fritz M, Aktories K**, 2002, *J Biol Chem*, Bd. 277, S. 5074–5081.
182. *The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary Clostridium botulinum C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP- ribosylating C3-like fusion toxin.* **Barth H, Hofmann F, Olenik C, Just I, Aktories K**, 1998, *Infect Immun* , Bd. 66, S. 1364–1369.
183. *Uptake of binary actin ADP-ribosylating toxins.* **Barth H**. 2004, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* , Bd. 152, S. 165–182.
184. *Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced.* **Galle J, Mameghani A, Bolz SS, Gambaryan S, Görg M, Quaschnig T, Raff U, Barth H, Seibold S, Wanner C, Pohl U**, Jun 2003, *J Am Soc Nephrol*, Bd. 14, S. 1471-9.

185. **Furchgott RF.** Endothelium-derived relaxing factor -discovery, early studies, and identification as nitric oxide. [Hrsg.] Stockholm) Hans Jornvall (Karolinska Institutet. *Nobel Lectures in Physiology or Medicine 1996-2000*. s.l. : World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 2003.
186. *Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide.*
Tomasian D, Keaney JF, Vita JA, 2000, Cardiovasc Res. , Bd. 47, S. 426–435
187. *Pulsatile Stretch Induces Release of Angiotensin II and Oxidative Stress in Human Endothelial Cells: Effects of ACE Inhibition and AT(1) Receptor Antagonism.* **Gatti CD, Osto E, Kouroedov A, Eto M, Shaw S, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F,** Oct 2008 , Clin Exp Hyperten, Bd. 30, S. 616-27.
188. *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation.*
Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T et al., 1996, J Clin Invest, Bd. 97, S. 1916–1923.
189. *Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of EDRF.* **Galle J, Mülsch A, Busse R, Bassenge E,** 1991, Arterioscler Thromb, Bd. 11, S. 198-203.
190. *Influence of low-density lipoproteins (LDL) on the reactivity of atherosclerotic arteries.* **Galle J, Bassenge E,** 1991, Z Kardiol , Bd. 80, S. 15-20.
191. *Effects of native and oxidized low density lipoproteins on endothelium-dependent and endothelium-independent vasomotion.* **Galle J, Bassenge E,** 1991, Basic Res Cardiol, Bd. 86, S. 127-142.
192. *Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II.* **Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD,** 1998, Circulation , Bd. 98, S. 800–807.

193. *Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques — Potential implications for inflammation and plaque instability.* **Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H**, 2000, *Circulation*, Bd. 101, S. 1372–1378.
194. *Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as the mechanism responsible for impaired endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients.* **Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA**, 1994, *J Am Coll Cardiol* , Bd. 23, S. 844-850.
195. *Endothelial function in human coronary arteries in vivo — Focus on hypercholesterolemia.* **Drexler H, Zeiher AM**, 1991, *Hypertension*, Bd. 18, S. 90–99.
196. *Inhibition by a stable factor derived from neutrophils of endothelium-dependent relaxation in rat aorta.* **Liu JJ, Chen JR, Wiley J, Johnston CC, Buxton BF**, 1993, *Am J Physiol*, Bd. 265, S. H1454–H1459.
197. *Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction — Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide. activity,* **Flavahan NA**, 1992, *Circulation* , Bd. 85, S. 1927–1938.
198. *Oxidized lipoproteins and nitric oxide.* **W., Jessup**. 1996, *Curr Opin Lipidol* , Bd. 7, S. 274–280.
199. *Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis — Evidence for involvement of the renin-angiotensin system.* **Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T**, 1999, *Circulation*, Bd. 99, S. 2027–2033.
200. *Arterial size determines the enhancement of contractile responses after suppression of endothelium-derived relaxing factor formation.* **Galle J**,

Bauersachs J, Bassenge E, Busse R, 1993, *Pflugers Arch* , Bd. 422, S. 564–569.

201. *Vasoconstriction: A novel activity for low density lipoprotein.* **Sachinidis A, Locher R, Mengden T, Steiner A, Vetter W**, 1989, *Biochem Biophys Res Commun* , Bd. 163, S. 315–320.

202. *Low-density lipoprotein elevates intracellular Calcium and pH in vascular smooth muscle cells and fibroblasts without mediation of LDL recepto.* **Sachinidis A, Locher R, Mengden T, Vetter W**, 1990, *Biochem Biophys Res Commun* , Bd. 167, S. 353–359.

203. *Smooth muscle myosin: regulation and properties.* **Somlyo AV, Khromov AS, Webb MR, Ferenczi MA, Trentham DR, He ZH, Sheng S, Shao Z, Somlyo AP**, 2004, *Phil. Trans. R. Soc. B*, Bd. 359, S. 1921–1930.

204. *Ca²⁺-sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase.* **Somlyo AP, Somlyo AV**, 2003, *Physiol. Rev.* , Bd. 83, S. 1325–1358.

205. *Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity.* **Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D**, 1989, *Biochem Biophys Res Commun* , Bd. 159, S. 871-877.

206. *Inhibitors of protein kinases and phosphatases.* **MacKintosh C, MacKintosh RW**, 1994, *Trends Biochem Sci* , Bd. 19, S. 444-448.

207. *Nitric Oxide-Induced Decrease in Calcium Sensitivity of Resistance Arteries Is Attributable to Activation of the Myosin Light Chain Phosphatase and Antagonized by the RhoA/Rho Kinase Pathway .* **Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Derwand R, de Wit C, Loirand G, Pohl U**, 24. Jun 2003 , *Circulation* , Bd. 107, S. 3081-7.

208. *Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle.* **G., Pfitzer.** 2001, J Appl Physiol , Bd. 91, S. 497-503.
209. *Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1.* **Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Kawano Y, Fukata Y, Higo T, Egashira K, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A,** 2000, Circulation , Bd. 101 , S. 1319–1323.
210. *Rho-kinase inhibitors prevent agonist-induced vasospasm in human internal mammary artery.* **Batchelor TJP, Sadaba JR, Ishola A, Pacaud P, Munsch CM, Beech DJ,** 2001, Br J Pharmacol , Bd. 132, S. 302–308.
211. *Evidence that Rho-kinase activity contributes to cerebral vascular tone in vivo and is enhanced during chronic hypertension - Comparison with protein kinase C.* **Chrissobolis S, Sobey CG,** 2001, Circ Res , Bd. 88, S. 774–779.
212. *Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/ Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase.* **Essler M, Retzer M, Bauer M, Heemskerk JW, Aepfelbacher M, Siess W,** 1999, J Biol Chem , Bd. 274, S. 30361–30364.
213. *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension.* **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S,** 1997, Nature , Bd. 389, S. 990–994.
214. *Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle.* **Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV, Somlyo AP,** 1997, J Biol Chem , Bd. 272, S. 10704–10709.
215. *Involvement of rho-kinase and the actin filament network in angiotensin II-Induced contraction and extracellular signal-regulated kinase activity in intact rat mesenteric resistance arteries.* **Matrougui K, Tanko LB, Loufrani L,**

Gorny D, Levy BI, Tedgui A, Henrion D, 2001, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , Bd. 21, S. 1288–1293.

216. *Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: a critical role of RhoA in angiotensin II induced premyofibril formation.* **Aoki H, Izumo S, Sadoshima J**, 1998, *Circ Res* , Bd. 82, S. 666–676.

217. *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.* **Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G**, 1992, *Free Rad. Biol Med* , Bd. 13, S. 341–390.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung von Angiotensin II..... 5

Abbildung 2: AT₁-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion. Ang II bindet an den extrazellulären Anteil des AT₁-Rezeptor. Dies bewirkt die Heterodimerisation eines G-Proteins. Die abgespaltene Untereinheit aktiviert Phospholipase C zur Bildung von IP₃ und DAG. IP₃ setzt Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum frei. Ca²⁺ kann zusammen mit Calmodulin (CaM) die MLC-Kinase (MLCK) aktivieren. MRLC (myosin regulatory light chain) wird durch die MLCK phosphoryliert. Die MLC-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert MRLC-P und bewirkt so eine Relaxation. Über DAG wird die Proteinkinase C aktiviert. Sie wiederum kann über die Phosphorylierung von CPI-17 die MLCP hemmen. 8

Abbildung 3: Das endothelial gebildete NO bewirkt in der glatten Muskelzelle einen Anstieg der cytoplasmatischen cGMP-Konzentration durch Stimulation der Guanylatzyklase (GC). Das aus GTP gebildete cGMP bewirkt über Aktivierung der (zytosolischen) cGKI verschiedene Mechanismen: (1) Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen (BK_{Ca}), was zu einer Hyperpolarisation führt. Dies hat zur Folge, dass Ca²⁺-Kanäle, vornehmlich L-Typ-Kanäle, inhibiert werden und die zytosolische Ca²⁺-Konzentration sinkt. (2) Am endoplasmatischen Retikulum wird IRAG inhibiert und somit wird der IP₃-Rezeptor/Ca²⁺-Kanal inhibiert und der Ca²⁺-Ausstrom ins Zytosol verhindert. (3) Ca²⁺-unabhängig kann die MLCP aktiviert werden. Die Wirkung der NO/cGMP-

Signaltransduktion ist die Herabsetzung des Phosphorylierungsgrades der MRLC und damit die Relaxation der glatten Muskelzelle..... 11

Abbildung 4: small GTP-binding proteins, zu denen die Familie der Rho-Proteine und dessen Vertreter RhoA gehören, werden durch ein „upstream signal“ aktiviert, indem GEF eine Dissoziation zwischen Rho und GDP bewirkt. Es kann dann GTP an Rho binden, was gleichbedeutend ist mit einer Aktivierung. Der Gegenspieler der Aktivierung ist GDI, das den Dissoziierungsschritt unterbindet. Das aktivierte Rho kann dann den Effektor, für RhoA ist es die Rho-Kinase, aktivieren, und so das „downstream signal“ bewirken..... 14

Abbildung 5: Die Bildung von NO aus Arginin. In Anwesenheit von Nicotinamid-Adenin –Dinucleotid-Phosphat (NADPH) und anderen Co-Faktoren konvertiert die eNOS die Aminosäure L-Arginin zu NO und Citrullin (126)..... 16

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Reaktion von NO und Superoxid-Anion zu Peroxynitrit (ONOO^-), Hydroxylradikal (OH) und Nitrogendioxid (NO_2). Die Superoxiddismutase (SOD) kann das Superoxid-Anion zu H_2O_2 umwandeln, welches wiederum Substrat für die Katalase ist. 17

Abbildung 7: Bildung des Fusionstoxins (C2IN/C3) aus dem Exotoxin C2I von *Clostridium botulinum*, vom dem die Aminosäuresequenz 1-225 als N-terminales Ende abgespalten wird (C2IN), und dem C3-ähnlichen Exotoxin (C3) von *Clostridium limosum*..... 27

Abbildung 8: C2IIa bildet ein Heptamer, das eine Pore für das Fusionstoxin C2IN/C3 in die Zellwand eukaryontischer Zellen darstellt. Intrazellulär kann C2IN/C3 die Inhibition von RhoA bewirken. C2IIa hat keinen Effekt auf die RhoA-Aktivität. C2IN/C3 besitzt nur intrazellulär einen Effekt auf RhoA und kann die Zellwand nicht ohne das C2IIa-Heptamer überwinden. 28

Abbildung 9: In dem Organbad ist das zu untersuchende Gefäß (b) als ringförmiges Gefäßsegment zwischen zwei Haken aufgespannt, von denen der eine an einen Kraftaufnehmer (Force Transducer F30 Typ 372, Firma HSE Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) angeschlossen ist. Im Organbad wird das Gefäß mit dem Perfusat (s. 2.1.2.2), das kontinuierlich begast (95% O₂, 5% CO₂) wird, umspült. In das dann auf Zirkulation eingestellte Volumen werden dann die Substanzen und Pharmaka mittels Eppendorfpipetten eingebracht. Das Signal der Kraftentfaltung wird über einen Verstärker an den 2-Wege-Schreiber (Dreikanalschreiber Typ R-63, Firma Rikadenki, Freiburg, Deutschland) übertragen. Es wurden parallel 3 isolierte Organbäder betrieben..... 31

Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit entweder Ang II (1*10⁻⁶ M), PE (1*10⁻⁶ M) oder reinem Puffer für 4,5 Stunden. Zusatz von DDC für die letzten 30min bei allen Gruppen zur Inhibition der Superoxid-Dismutase. Es zeigt sich keine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen; n=12; exemplarisch: p=0,85 bei C_{Ach}=1*10⁻⁷M zwischen Ang II und PE 40

Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit EDTA (1*10⁻⁶M) und entweder Ang II (1*10⁻⁶ M), PE (1*10⁻⁶ M) oder reinem Puffer für 4,5 Stunden. Zusatz von DDC für die letzten 30min bei allen Gruppen zur Inhibition der Superoxid-Dismutase. Es zeigt sich keine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen; n=4, exemplarisch: p=0,24 bei C_{Ach}=3*10⁻⁶M zwischen Kontrolle und PE 41

Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit Deferoxamin (1*10⁻⁶M) und entweder Ang II (1*10⁻⁶ M), PE (1*10⁻⁶ M) oder reinem Puffer für 4,5 Stunden. Zusatz von DDC für die letzten 30min bei allen Gruppen zur Inhibition der Superoxid-Dismutase. Es zeigt sich keine signifikante

Unterscheidung zwischen den Gruppen; n=7, exemplarisch: p=0,16 bei $C_{Ach}=3*10^{-6}M$ zwischen Kontrolle und Ang II..... 42

Abbildung 13: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit nLDL ($C_{nLDL}=100\mu g/ml$) und entweder Ang II ($1*10^{-6} M$), PE ($1*10^{-6} M$) oder reinem Puffer für 14 Stunden. Zusatz von DDC für die letzten 30min bei allen Gruppen zur Inhibition der Superoxid-Dismutase. Es zeigt sich keine signifikante Unterscheidung zwischen den Gruppen; n=6, exemplarisch: p=0,14 zwischen Ang II und Kontrolle bei $C_{Ach}=1*10^{-7}M$ 43

Abbildung 14: Dosis-Wirkungskurve für Ach nach Vor-Inkubation mit OxLDL ($100\mu g/ml$) , OxLDL ($100\mu g/ml$) und Ang II ($1*10^{-6} M$) oder reinem Puffer für 90 Minuten. Es zeigt sich eine signifikante Herabsetzung der Acetylcholin-vermittelten Vasodilatation für die mit OxLDL behandelten Aortenringe; n=8, $p<0,05$ für OxLDL gegenüber Kontrolle und OxLDL und Ang II gegenüber Kontrolle (Asterisk 1 und 2). Eine zusätzliche Gabe von Ang II kann den OxLDL-Effekt nicht beeinflussen; n=4, $p=0,92$ für OxLDL gegenüber OxLDL und Ang II.... 45

Abbildung 15: OxLDL ($100\mu g/ml$) verursacht keine Konstriktion. Ang II wurde in der Schwellenkonzentration von $3*10^{-10}M$ appliziert, so dass eine leichte Konstriktion hervorgerufen wurde. Diese Konstriktion wird durch additive Gabe von OxLDL potenziert (Asterisk 1); n=6, $p=0,021$ zwischen Ang II allein gegenüber OxLDL mit Ang II zusammen..... 46

Abbildung 16: Ang II allein wurde in der Schwellenkonzentration von $3*10^{-10}M$ appliziert, so dass eine leichte Konstriktion hervorgerufen wurde. Diese Konstriktion wird durch additive Gabe von LPC potenziert (Asterisk 1); n=7, $p<0,001$ 47

Abbildung 17: Die Ko-Inkubation von CalyA ($c_{\text{CalyA}}=1*10^{-8}\text{M}$) hat keinen signifikanten Effekt auf die Vasokonstriktion durch Ang II in einer Schwellenkonzentration ($3*10^{-10}\text{M}$); $n=6$, $p=0,31$ 48

Abbildung 18: Originalregistratur (schwarze Linie) mit deutlicher Darstellung der leichten Konstriktion durch Ang II in der Schwellenkonzentration. Nach Applikation von OxLDL kommt es zu einer verstärkten Konstriktion, die wiederum nach Calyculin A – Gabe (30min) partiell abgeschwächt wird 49

Abbildung 19: An Aortenringen, die durch eine Schwellenkonzentration ($3*10^{-10}\text{M}$) zur Konstriktion gebracht wurden, potenziert die Ko-Inkubation mit OxLDL [100mg/ml) die Vasokonstriktion. Diese Wirkung wird durch CalyA ($1*10^{-8}\text{M}$) partiell inhibiert, sei es durch vorherige (Asterisk 1) oder nachträgliche Ko-Inkubation (Asterisk 2) über 30 Minuten; $n=6$, $p=0,02$ für Asterisk 1 und $p=0,01$ für Asterisk 2..... 50

Abbildung 20: Staurosporin reduziert die Konstriktion, die durch eine Schwellenkonzentration ($3*10^{-10}\text{M}$) Ang II verursacht wurde. Eine signifikante Reduktion lag bei einer Staurosporinkonzentration c_{Stsp} von $1*10^{-7}\text{M}$ vor mit einer 68,75%igen Abschwächung der Ang II – Wirkung; $n=8$, $p=0,025$ (Asterisk 1). Im Vergleich zwischen Ang II alleine und der Koinkubation mit Staurosporin in einer Konzentration von $3*10^{-8}\text{M}$ wurde $p=0,077$ erreicht. Eine Erhöhung der Versuchszahl n kann eventuell eine Signifikanz herausarbeiten, jedoch zeigt bereits die hier aufgezeigte Tendenz, dass eine Inhibition der Proteinkinase C (und anderer Kinasen) durch Staurosporin die Ang II – vermittelte Vasokonstriktion in hoher Konzentration depletieren kann..... 51

Abbildung 21: Staurosporin reduziert die Konstriktion, die durch eine Schwellenkonzentration ($3*10^{-10}\text{M}$) Ang II und OxLDL (100µg/ml) verursacht wurde, signifikant (Asterisk 1 bis 3). Eine signifikante Reduktion lag bereits vor bei einer Staurosporinkonzentration c_{Stsp} von $1*10^{-8}\text{M}$. Bei $c_{\text{Stsp}}=1*10^{-7}\text{M}$ lag

eine 92,35%ige Abschwächung der Ang II – Wirkung vor; n=8, exemplarisch:
p<0,006 (Asterisk 1). 53

Abbildung 22: Vor-Inkubation mit beiden Komponenten ($c_{C2IIa}=400\text{ng/ml}$,
 $c_{C3}=100\text{ng/ml}$) zusammen über 5 Stunden im Brutschrank inhibiert partiell den
Effekt von OxLDL ($100\mu\text{g/ml}$) in seiner Potenzierung der Ang II-vermittelten
Vasokonstriktion der Aortenringe. Die Vorinkubation mit C2IIa oder C2IN-C3
allein hat keinen Effekt auf die Ang II-vermittelte oder OxLDL-vermittelte
Vasokonstriktion und sind in diesem Diagramm als Kontrolle angezeigt, n=7,
p=0,008 (Asterisk 1) 56

Abbildung 23: repräsentative Originalregistratur (jede farbige Linie (rot, blau,
schwarz) zeichnet die Vasomotorik eines Aortenrings auf); an allen Gefäßen
wird durch eine Schwellenkonzentration Ang II eine leichte Konstriktion
hervorgerufen. Durch OxLDL-Gabe wird diese potenziert. Lediglich in
Anwesenheit von C2IIa und C2IN/C3 in der Kombination wird die konstriktive
Antwort des Aortenringes abgeschwächt..... 57

Abbildung 24: Vor-Inkubation mit beiden Komponenten ($c_{C2IIa}=400\text{ng/ml}$,
 $c_{C3}=100\text{ng/ml}$) zusammen über 5 Stunden im Brutschrank inhibiert partiell den
Effekt von LPC ($100\mu\text{g/ml}$) in seiner Potenzierung der Ang II-vermittelten
Vasokonstriktion der Aortenringe. Die Vorinkubation mit C2IIa oder C2IN-C3
allein hat keinen Effekt auf die Ang II-vermittelte oder LPC-vermittelte
Vasokonstriktion und sind in diesem Diagramm als Kontrolle angezeigt, n=7,
p=0,001 (Asterisk 1) 59

Abbildung 25: Der RhoA-Kinase-Inhibitor Y27632 ($c_{Y27632}=3*10^{-7}\text{M}$) verhindert
die Wirkung auf den Gefäßtonus von Ang II ($3*10^{-10}\text{M}$) und die potenzierte
Wirkung von OxLDL ($100\mu\text{g/ml}$) auf die durch Ang II vorkonstringierten
Aortenringe; n=7, p<0,0001 für Ang II allein versus Ang II + Y27632 (Asterisk
1) und Ang II + OxLDL versus Ang II + OxLDL + Y27632 (Asterisk 2)..... 60

Abbildung 26: repräsentative Originalregistratur (schwarze Linie). Auf einen konstanten Gefäßtonus nach Anlegen einer Vorspannung wird Ang II in der Schwellenkonzentration appliziert. Auf die leichte Konstriktion entfaltet OxLDL seinen potenzierenden Effekt, der wiederum durch Y27632 komplett aufgehoben wird 61

Abbildung 27: Der RhoA-Kinase-Inhibitor Y27632 ($c_{Y27632}=3 \cdot 10^{-7} M$) verhindert die Wirkung auf den Gefäßtonus von Ang II ($3 \cdot 10^{-10} M$) und die potenzierte Wirkung von LPC (100µg/ml) auf die durch Ang II vorkonstringierten Aortenringe; n=6, $p < 0,0001$ für Ang II allein versus Ang II + Y27632 (Asterisk 1) und Ang II + LPC versus Ang II + LPC + Y27632 (Asterisk 2)..... 62

7.2 Veröffentlichungen

Originalarbeit

Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced. **Galle J, Mameghani A, Bolz SS, Gambaryan S, Görg M, Quaschnig T, Raff U, Barth H, Seibold S, Wanner C, Pohl U,** Jun 2003, J Am Soc Nephrol, Bd. 14, S. 1471-9 (184)

Poster und Präsentationen

OxLDL and its compound LPC potentiate AngII-induced vasocontraction by direct stimulation of Rho **Galle J, Mameghani A, Quaschnig T, Gambaryan S, Bolz S, Pohl U, Wanner C,** Münster, 2001

Ang II-induced vasocontractions are potentiated by OxLDL through stimulation of Rho and Rho-kinase **Galle J, Mameghani A, Görg M, Bolz SS, Pohl U, Wanner C,** Annual meeting of the American Society of Nephrology (ASN), Toronto, 2000

OxLDL potenziert die Angiotensin II-induzierte Vasokonstriktion durch Aktivierung der Rho-Kinase **Görg M, Mameghani A, Wanner C, Galle J,** Junge Niere, Bad Mergentheim, 2000

OxLDL potenziert die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion durch Aktivierung der Rho-Kinase **Görg M, Mameghani A, Wanner C, Galle J,** Medizinische Universitätsklinik Würzburg, Bad Brückenau, 1999

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AGE	advanced glycation endproducts
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
AT ₁	Angiotensin II Rezeptor vom Typ 1
AT ₂	Angiotensin II Rezeptor vom Typ 2
Ach	Acetylcholin
Ach–DWK	Acetylcholin-Dosis-Wirkungskurve
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ApoB	Apolipoprotein B100
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
BK _{Ca}	Calcium-aktivierter Kaliumkanal
C _{index}	Konzentration der als Index angegebenen
Substanz	
C2IN	Exotoxin von <i>Clostridium botulinum</i> , 1.
Bestandteil des	
	Fusionsproteins
C2IIa	Exotoxin von <i>Clostridium botulinum</i>
C3	Exotoxin von <i>Clostridium limosum</i>
	(<i>clostridium botulinum</i> C3-exotoxin-like), 2.
Bestandteil	
	des Fusionsproteins
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	Calciumion
CalyA	Calyculin A
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CPI-17	protein-kinase C-potentiated myosin
phosphatase inhibitor	
CSF	Colony Stimulating Factor
D	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DDC	Diethyl-Dithiocarbamat
DMSO	Dimethylsulfoxid

EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDRF	endothelium derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FT	Fusionsprotein aus C2IN und C3
G _{12/13}	G-Protein Typ 12/13
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
G _{q/11}	G-Protein Typ Q/11
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	Endothelzellkultur aus humanen
Umbilikalvenen	
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IL-2, IL-6	Interleukin 2, Interleukin 6
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRAG	IP3-receptor associated cGKI substrate
kD	Kilo-Dalton
KKS	Kallikrein-Kinin-System
LDL	Low Density Lipoproteins
LOX-1	lectin-like oxidized LDL-receptor (OxLDL-
Rezeptor) Typ 1	
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPC	Lysophosphatidylcholin
M	molare Konzentration (mol/l)
MEN 2A	Multiple endokrine Neoplasie Typ 2A
MEN 2B	Multiple endokrine Neoplasie Typ 2B
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MRLC	regulierende Myosin-Leichtketten
MLC ₂₀	Myosin Leichtkette
MLCP	Myosin-Leichtkettenphosphatase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
n	Anzahl der Versuche
n-LDL	natives LDL
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	nuclear factor kappa B

NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
NOS	NO-Synthase
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
OxLDL	Oxidativ modifiziertes Low Density Lipoprotein
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphat buffered saline
PE	Phenylephrin
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RAS	Renin-Angiotensin-Systems
Rho	Proteinfamilie (<u>ras</u> <u>homologue</u>)
RhoA	Rho-Protein Typ A
ROCK oder ROKα)	Rho-Kinase oder RhoA-Kinase (syn. ROCK2)
RPMI-Puffer	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> - Puffer
scavenger cell	Fresszelle
SHR	spontan hypertensive Ratte (Tiermodell)
SNP	Nitroprussid-Natrium
SOD	Superoxid-Dismutase
Stsp	Staurosporin
t-PA	tissue-Plasminogen-Aktivator
TierSchG	Tierschutzgesetz
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor Alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
WHO	World Health Organization
Y27632	(+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)

7.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jan Galle bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Dissertation durch seine ausgezeichnete Betreuung durchzuführen und zu vollenden, der mich während des Studiums in seine Arbeitsgruppe integriert und gefördert hat und der mich gelehrt hat, an eine wissenschaftliche Fragestellung heranzugehen und die Ergebnisse kritisch zu hinterfragen.

Ich danke Frau Dr. med. Maria Görg als Kollegin und treue Freundin für Ihre Zusammenarbeit und Hilfe im Labor und beim Niederschreiben der Arbeit.

Ich danke Frau Dr. med. Ulrike Raff als treue Freundin, die ich stets um Rat fragen konnte.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Kathrin Heermeier für die Unterstützung im Labor bei besonders kniffligen Fragen in der Herangehensweise. Sie wusste immer eine Lösung!

Frau Traudel Baier, Frau Elke Baumeister und ganz herzlichst Frau Margarethe Röder danke ich für ihre unermüdliche Bereitschaft mir zu helfen. Ohne ihre freundschaftliche Mithilfe wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Vor allem aber danke ich meiner Familie: meinen lieben Eltern, die mir dieses wunderbare Studium ermöglicht haben und die mir durch ihr Vertrauen in mich gezeigt haben, dass auch schwierige Zeiten sicher überstanden werden können. Ich danke meinen Geschwistern, dass sie immer für mich da waren. Und ich danke meiner geliebten Ehefrau Thabea, ohne die ich diese Arbeit wohl nicht vollendet hätte und die mich immer ermutigt, weiterzugehen und nicht aufzugeben. Und ich danke meinem Sohn Julian für sein Lächeln und seine fröhliche Art.