

**PROTEKTIVE KARDIOVASKULÄRE EFFEKTE WEIBLICHER SEXUALSTEROIDE**  
**- ESTROGENREZEPTOREN REDUZIEREN DEN ALDOSTERON-INDUZIERTEN**  
**OXIDATIVEN STRESS IN GLATTEN GEFÄßMUSKELZELLEN**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES  
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON  
MELANIE MÜHLFELDER  
AUS OBERAURACH

WÜRZBURG 2011

EINGEREICHT AM: .....

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION:

VORSITZENDER: .....

GUTACHTER: HERR PD DR. MED. THEO PELZER

GUTACHTER: HERR PROF. DR. RER. NAT. GEORG KRONE

TAG DES PROMOTIONSKOLLOQUIUMS: .....

DOKTORURKUNDE AUSGEHÄNDIGT AM: .....

*Für meine Familie  
und Daniel*

---

# Inhalt

<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>Summary</b>	3
<b>1 Einleitung</b>	5
1.1 Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und ihre Risikofaktoren	5
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), oxidativer Stress und vaskuläre Dysfunktionen	6
1.2.1 ROS und oxidativer Stress	6
1.2.2 Die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und „NOS-Uncoupling“	8
1.2.3 Die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase und oxidativer Stress	10
1.3 Antioxidative Enzyme und Antioxidantien	12
1.3.1 Superoxid-Dismutasen (SOD)	12
1.3.2 Katalase	14
1.3.3 Glutathion-Peroxidasen (GPx), Glutathion und das Thioredoxin-System	15
1.3.4 Die Glukose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PDH)	19
1.3.5 Die Pyridinnukleotide Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP)	20
1.4 Estrogene und Estrogenrezeptoren (ER) im kardiovaskulären System	23
1.4.1 Allgemeine Aspekte von Estrogenen und Estrogenrezeptoren	23
1.4.2 Protektive kardiovaskuläre Effekte von Estrogenen	27
1.4.3 Estrogene und oxidativer Stress	29
1.5 Aldosteron (ALDO) und der Mineralocorticoidrezeptor (MR)	31
1.5.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ALDO und der MR	31
1.5.2 ALDO, der MR und kardiovaskuläre Erkrankungen	34
1.5.3 ALDO und oxidativer Stress	36
1.6 Ziel dieser Arbeit	38
<b>2 Material</b>	39
2.1 Geräte	39
2.2 Verbrauchsmaterial	40
2.2.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial	40

---

2.2.2 Chemikalien	41
2.3 Antikörper	41
2.3.1 Primärantikörper	41
2.3.2 Sekundärantikörper	42
2.4 Kommerzielle Kits	42
2.5 Steroidhormone, ER-Agonisten, ER-Antagonist	43
2.6 Zelllinie	43
2.7 Puffer, Lösungen und Medien	43
2.7.1 Puffer, Lösungen und Medien für die Isolation von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Rattenaorta (PRSMC)	43
2.7.2 Zellkultur	44
2.7.3 Western Blot	46
2.7.4 Immunhistochemie	49
2.7.5 Puffer für SOD Assay	50
2.7.6 Puffer und Lösungen für Katalase Assay	50
2.7.7 Puffer und Lösungen für Glutathion Assay	51
2.7.8 Puffer und Lösungen für G6PDH Assay	52
2.8 Software	53
<b>3 Methoden</b>	<b>54</b>
3.1 Zellbiologische Methoden	54
3.1.1 Isolierung und Kultivierung von PRSMC	54
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	55
3.1.3 Hormonbehandlung der PRSMC als primärer Schritt aller Experimente	55
3.2 Bestimmung der lokalen ROS-Generierung in hormonbehandelten PRSMC mittels Dihydroethidium (DHE)-Fluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung der DHE- Fluoreszenzintensität	56
3.2.1 DHE-Fluoreszenzmethode	56
3.2.2 Quantifizierung der DHE-Fluoreszenzintensität	57
3.3 Proteinanalytische Methoden	57
3.3.1 Proteinextraktion aus Zellen	57
3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	58
3.3.3 Western Blot zur Bestimmung der Proteinexpression	58

---

3.4 Immunhistochemie	59
3.5 Biochemische Untersuchungen	60
3.5.1 Enzymaktivitätsmessung der SOD	60
3.5.2 Enzymaktivitätsmessung der Katalase	61
3.5.3 Enzymaktivitätsmessung der GPx	62
3.5.4 Bestimmung der Glutathion-Konzentration	63
3.5.5 Quantifizierung der totalen NAD-Konzentration	64
3.5.6 Quantifizierung der totalen NADP- sowie der NADPH-Konzentration	65
3.5.7 Enzymaktivitätsmessung der G6PDH	66
3.6 Statistische Auswertung	67
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>68</b>
4.1 Isolation von PRSMC und Nachweis der ER $\alpha$ -, ER $\beta$ - und MR-Proteinexpression	68
4.2 Reduktion der ALDO-induzierten lokalen ROS-Generierung durch Estrogene	71
4.3 Proteinexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$ und des MR in hormonbehandelten PRSMC	76
4.4 Analyse der Proteinexpression der NADPH Oxidase Untereinheiten rac 1, p47 <sup>phox</sup> und p67 <sup>phox</sup> in PRSMC	78
4.5 Untersuchung der antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und GPx	81
4.6 Quantifizierung des intrazellulären Redox-Status hormonbehandelter PRSMC	85
4.7 NADPH reduziert die ALDO-induzierte lokale ROS-Generierung in PRSMC	89
4.8 Aktivität und Proteinexpression der G6PDH	91
<b>5 Diskussion</b>	<b>94</b>
<b>6 Literatur</b>	<b>103</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>130</b>
<b>Danksagung</b>	<b>132</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>133</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>134</b>

## Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) sind hochreaktive Biomoleküle, die in geringen Konzentrationen ubiquitär als Produkte des normalen zellulären Metabolismus entstehen. Zum Schutz vor irreversiblen oxidativen Schädigungen durch diese Moleküle, besitzt der Organismus antioxidative Enzyme und nicht-enzymatische Antioxidantien, die ROS neutralisieren. Eine pathophysiologische Zunahme der Generierung und Freisetzung von ROS und/oder verminderte zelluläre Abwehrmechanismen gegen diese können, in Folge einer gestörten Redox-Homöostase, zur Ausbildung des sog. „oxidativen Stresses“ führen, der unter anderem mit einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert ist.

Das Steroidhormon Aldosteron (ALDO), das der Gruppe der Mineralocorticoide angehört, besitzt für den Wasser- und Elektrolythaushalt eine essentielle Bedeutung. Als Agonist bindet ALDO an Mineralocorticoidrezeptoren (MR) in der Niere und im Kolon und stimuliert unter physiologischen Bedingungen über die Aktivierung des MR die renale Rückresorption von Natriumionen und Wasser. Epidemiologische Studien sowie *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnten einen kausalen Zusammenhang zwischen erhöhten ALDO-Serumwerten und/oder einer disproportional erhöhten MR-Aktivierung und einer gesteigerten ROS-Generierung im Herz-Kreislaufsystem belegen.

Im Gegensatz zu ALDO besitzt das Sexualsteroid 17 $\beta$ -Estradiol (E2) protektive kardiovaskuläre Effekte. E2 fungiert über zwei intrazelluläre Estrogenrezeptor (ER)-Subtypen, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , die nach ligandabhängiger Aktivierung als nukleäre Transkriptionsfaktoren die Expression spezifischer Zielgene regulieren. Neben ER-vermittelten vasodilatatorischen und antiinflammatorischen Wirkungen innerhalb der Blutgefäße und des Myokards besitzt E2 unter anderem auch antioxidative Eigenschaften und das Potential die zelluläre Redox-Homöostase günstig zu beeinflussen.

Auf Grund dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass E2 über einen ER-vermittelten Mechanismus dem ALDO-induzierten oxidativen Stress in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte (PRSMC, für engl. primary rat smooth muscle cells) entgegenwirkt. Zusätzlich sollte durch die Supplementation des ER $\alpha$ -spezifischen Agonisten 16 $\alpha$ -LE2 und des ER $\beta$ -spezifischen Agonisten 8 $\beta$ -VE2 zu ALDO-behandelten Zellen untersucht werden, ob die beiden ER-Subtypen redundante, spezifische oder gegensätzliche Effekte bezüglich der aufgestellten Hypothese, besitzen.

Durch Färbungen hormonbehandelter PRSMC mit dem ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium (DHE) und anschließender Quantifizierung der DHE-Fluoreszenzintensität konnte bestätigt werden, dass der ALDO-induzierte oxidative Stress durch die Kosupplementation von E2, 16 $\alpha$ -LE2 und 8 $\beta$ -VE2 über einen ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -vermittelten Mechanismus signifikant reduziert werden kann. Des Weiteren konnte im Verlauf dieser Arbeit belegt werden, dass die intrazelluläre Konzentration des Reduktionsäquivalents Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat in seiner reduzierten Form (NADPH) in ALDO+E2-, ALDO+16 $\alpha$ -LE2- und ALDO+8 $\beta$ -VE2-behandelten PRSMC im Vergleich zu nur mit ALDO-behandelten Zellen signifikant erhöht ist. Ferner konnte in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass die Kosupplementation von NADPH zu ALDO-behandelten Zellen, die DHE-Oxidation in diesen Zellen signifikant unterbindet.

Mittels Western Blot Analysen und Enzymaktivitätsassays hormonbehandelter PRSMC ließ sich schließlich nachweisen, dass ALDO die Enzymaktivität und Proteinexpression des NADPH-generierenden Enzyms Glukose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PDH) supprimiert. Weiter konnte innerhalb dieser Arbeit erstmalig bestätigt werden, dass E2 die Suppression der G6PDH-Aktivität durch ALDO unterbindet und die Enzymaktivität dieses Proteins wieder auf den basalen Wert anhebt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass E2 der ALDO-induzierten lokalen ROS-Generierung in PRSMC ER-vermittelt entgegenwirkt. Der zugrunde liegende Mechanismus dieses Effekts basiert auf einer Aufrechterhaltung der G6PDH-Enzymaktivität, wodurch die Bioverfügbarkeit des Reduktionsäquivalents NADPH, das eine Schlüsselrolle im zellulären antioxidativen System spielt, gewährleistet wird.



## Summary

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive bio-molecules produced as by-products during normal cellular metabolism. Cells are protected against ROS by cellular antioxidative defense mechanisms like antioxidative enzymes and reducing equivalents. However, if the cellular redox state is disrupted and the balance between ROS generation and ROS elimination is excessive, ROS are able to cause oxidative stress which plays an important pathophysiological role in the development of cardiovascular diseases.

The mineralocorticoid hormone aldosterone (ALDO) mediates electrolyte and volume balance via binding and activation of its mineralocorticoid receptor (MR) to elevate systemic blood pressure through renal effects. However, excessive or disproportional MR activation is associated with oxidative stress. This results in a decreased bio-availability of nitric oxide (NO) and inflammation in the vasculature leading to fibrosis, vascular remodelling and endothelial dysfunction thereby contributing to hypertension as well as renal and cardiac failure.

In contrast to ALDO, the sex hormone 17 $\beta$ -estradiol (E2) is known to have beneficial cardiovascular effects. E2 acts via its cognate intracellular estrogen receptor (ER) subtypes ER $\alpha$  and ER $\beta$  which are defined as nuclear ligand-activated transcription factors. E2 procure cardio- and vasoprotective effects among others by its antioxidative properties.

Based upon these findings we proposed the hypothesis that ALDO and E2 may have opposing effects on ROS generation in rat vascular smooth muscle cells (PRSMC). Furthermore, the co-treatment of E2 and the specific ER-agonists 16 $\alpha$ -LE2 and 8 $\beta$ -VE2 to ALDO-treated cells should reveal whether the two ER-subtypes mediate redundant, specific or opposing effects.

Respective experiments of dihydroethidium (DHE) fluorescent microphotography and quantification of its fluorescence intensity revealed that ALDO-induced oxidative stress can be attenuated by E2, 16 $\alpha$ -LE2 and 8 $\beta$ -VE2. This effect was mediated by ER $\alpha$  and ER $\beta$ .

Further experiments demonstrated that intracellular levels of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) were significantly increased in ALDO-treated PRSMC co-supplemented with E2, 16 $\alpha$ -LE2 and 8 $\beta$ -VE2. In good agreement with these findings, DHE fluorescence showed decreased ROS generation in ALDO treated cells after co-incubation with NADPH. Additionally, molecular and biochemical analyses gave evidence for restored activity and protein expression of the major intracellular NADPH generating enzyme

glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in ALDO+E2 co-treated PRSMC; ALDO treatment alone caused a decrease in G6PDH activity and protein expression.

Consequently, E2 can compensate the deleterious effects of ALDO in PRSMC via preservation of G6PDH activity. This enzyme stabilises bio-availability of NADPH, which in turn acts as a key player in cellular antioxidative defense.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und ihre Risikofaktoren

Der Begriff kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD für engl. cardiovascular diseases) umfasst im weitesten Sinne sämtliche Krankheiten des Herzens und des Blutkreislaufs wie z. B. Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankungen, Hypertonie, Arteriosklerose oder Apoplex. In den westlichen Industriestaaten führen CVD die Morbiditäts- und Mortalitätsstatistiken an. 2008 waren alleine in Deutschland rund 42 % aller Sterbefälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zurückzuführen und auch in den USA führt die Prävalenz der CVD die Todesursachenstatistik an. Laut der „Heart Disease and Stroke Statistic“ sind im Jahre 2005 in den USA 864.480 Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung verstorben, was in etwa einem Toten alle 37 Sekunden entspricht.<sup>1,2</sup>

Sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz von CVD unterliegen einer geschlechtsspezifischen Altersabhängigkeit. Epidemiologische Studien wie die „Framingham Heart Study“ belegen, dass das Risiko für CVD mit zunehmendem Alter steigt und dass das Lebenszeitrisko für Männer größer ist als für Frauen.<sup>3</sup> Im Durchschnitt erleiden Frauen 10 Jahre später ein primäres kardiovaskuläres Ereignis als Männer; erst ab einem Alter von 75 Jahren gleicht sich die Prävalenz von CVD zwischen beiden Geschlechtern an.<sup>4</sup> Besonders deutlich zeigt sich dies z. B. bei der arteriellen Hypertonie, von der bis zu einem Alter von 60 Jahren wesentlich häufiger Männer betroffen sind. In den Altersgruppen ab 70 Jahren leiden jedoch deutlich mehr Frauen als Männer an einem arteriellen Hypertonus.<sup>5</sup> Auch die koronare Herzerkrankung unterliegt bezüglich ihrer Inzidenz und Prävalenz einem geschlechtsspezifischen Unterschied und tritt vermehrt bei Männern auf, wohingegen die Wahrscheinlichkeit für zerebrovaskuläre Ereignisse für Frauen deutlich höher ist.<sup>6,7</sup>

Herz-Kreislaferkrankungen stehen mit einer Vielzahl von Risikofaktoren in einem kausalen Zusammenhang, die in klassische Risikofaktoren, prädisponierende Risikofaktoren und Risikoindikatoren eingeteilt werden können. Die klassischen Risikofaktoren umfassen arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, erhöhte LDL-Cholesterin- und erniedrigte HDL-Cholesterin-Serumwerte, Diabetes und Glukosetoleranz sowie Nikotinabusus.<sup>8</sup> Zu den prädisponierenden Faktoren zählen Adipositas, Bewegungsmangel, das männliche Geschlecht, die Postmenopause bei Frauen sowie eine positive Familienanamnese.<sup>9,10</sup>

Schließlich sind noch zirkulierende Biomarker als Risikoindikatoren zu erwähnen, die mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind. Hierbei sind erhöhte Serumlipidwerte wie Triglyceride und Lipoproteine zu nennen, prothrombotische Faktoren wie Fibrinogen und der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1 sowie Entzündungsmarker wie das C-reaktive Protein oder Zelladhäsionsmoleküle. Des Weiteren werden erhöhter oxidativer Stress sowie oxidierte LDL-Partikel (Low Density Lipoprotein, Lipoprotein niederer Dichte) mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertonie und Arteriosklerose in Verbindung gebracht.<sup>11-13</sup>

## 1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), oxidativer Stress und vaskuläre Dysfunktionen

### 1.2.1 ROS und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) sind hochreaktive Biomoleküle, die sich von molekularem Sauerstoff ableiten und denen im Organismus eine duale Rolle als nützliche und schädliche Agenzien zugesprochen wird.<sup>14</sup> Zu den ROS zählen zum einen freie Radikale, wie das Superoxid-Radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), das Hydroxylradikal ( $HO^{\bullet}$ ), das Peroxylradikal ( $ROO^{\bullet}$ ) und das Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$  auch NO geschrieben). Zum anderen zählen auch reaktive Sauerstoffverbindungen ohne Radikalcharakter, wie das Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Peroxynitrit-Anion ( $ONOO^-$ ) zu den ROS. Generiert werden ROS in geringen Konzentrationen ubiquitär als Produkte des normalen zellulären Metabolismus.<sup>15</sup>  $H_2O_2$  entsteht unter physiologischen Bedingungen beim oxidativen Abbau von bestimmten Molekülklassen in den Peroxisomen, aber vor allem durch den enzymatischen Abbau von  $O_2^{\bullet-}$  durch die Superoxid-Dismutasen (SOD).<sup>16,17</sup>  $O_2^{\bullet-}$  hingegen kann durch die Elektronentransportkette der Atmungskette im Zuge der Reduktion von molekularem Sauerstoff entstehen. Hierbei entweichen ca. 1-3 % der Elektronen in den Reaktionen um Komplex I und III, wodurch es zur Generierung von  $O_2^{\bullet-}$  kommt.<sup>15</sup> Auch die Multienzymkomplexe NADPH Oxidase (siehe 1.2.3), NADPH-Cytochrom-P<sub>450</sub>-Oxidoreduktase, Hypoxanthin/Xanthin Oxidase und die Cyclooxygenasen produzieren unter physiologischen Bedingungen  $O_2^{\bullet-}$ .<sup>18</sup>  $O_2^{\bullet-}$  spielt bei der Abwehr von infektiösen Erregern und als Signalmolekül bei Signaltransduktionskaskaden eine bedeutende Rolle.<sup>15,19</sup>

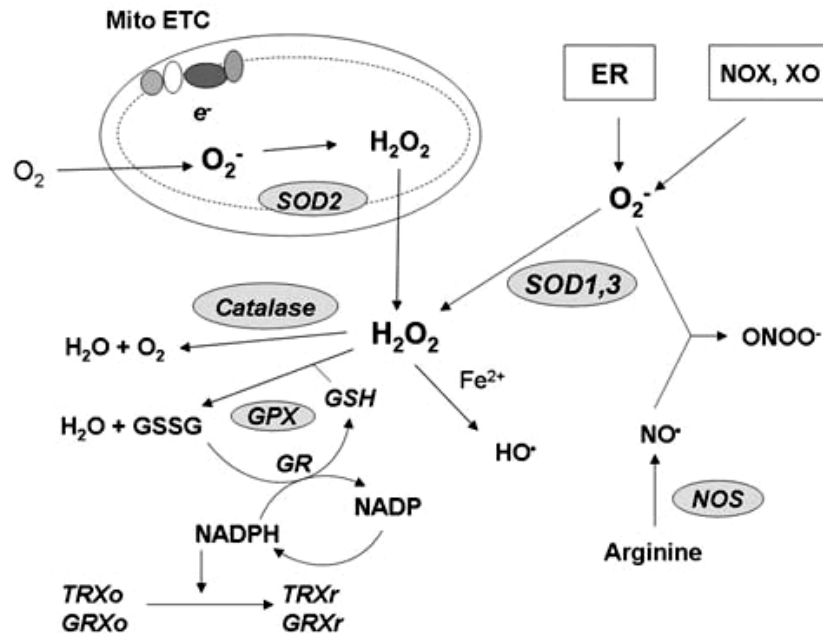
Im kardiovaskulären System üben ROS unter physiologischen Bedingungen einen Einfluss auf redoxsensitive Signalwege aus und werden innerhalb der Blutgefäße sowohl von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC, engl. vascular smooth muscle cells) und Zellen der Adventitia in geringen Konzentrationen generiert. Unter physiologischen Bedingungen beeinflussen ROS deren Wachstum und Differenzierung. Ferner sind sie an der Regulation des vaskulären Tonus beteiligt, da sie direkt (über  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das als vasoaktive Substanz wirken kann) oder indirekt (über die Bioverfügbarkeit von NO) auf die Vasodilatation der Blutgefäße einwirken können.<sup>20, 21</sup>

Neben ihren physiologischen Funktionen besitzen ROS indessen jedoch auch das Potential, einen schädigenden Einfluss auf das zelluläre System auszuüben. Durch ihre hohe Reaktivität und kurze Halbwertszeit sind sie in der Lage miteinander neue Verbindungen einzugehen. So kann z. B.  $\text{O}_2^{\bullet-}$  mit NO zu  $\text{ONOO}^-$  reagieren. Außerdem ist  $\text{O}_2^{\bullet-}$  in der Lage  $\text{Fe}^{2+}$  aus Enzymen freizusetzen, die Eisen-Schwefel-Cluster enthalten.  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert schließlich in der sog. Fenton-Reaktion mit diesem  $\text{Fe}^{2+}$ , wobei das hochreaktive  $\text{HO}^\bullet$  generiert wird.<sup>14, 22</sup>

Unter pathophysiologischen Bedingungen führen erhöhte ROS-Konzentrationen zur Oxidation und damit zur Schädigung von biologischen Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und der DNA. Zum Schutz vor diesen oxidativen Schädigungen existieren daher zelluläre Abwehrmechanismen gegen ROS. Antioxidative Enzyme, wie SOD, Katalase und Glutathion-Peroxidasen (GPx) sowie nicht-enzymatische Antioxidantien wie Glutathion (GSH), Vitamin C, Vitamin D und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) metabolisieren ROS in weniger aktive Zwischenformen und halten auf diese Weise das antioxidative Potential bzw. die Redox-Balance der Zellen aufrecht (Abb. 1).<sup>23</sup> Eine pathologische Zunahme der Generierung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen und/oder verminderte zelluläre Abwehrmechanismen gegen diese, können zur Ausbildung des sog. „oxidativen Stresses“ führen, der mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert ist. Definiert ist oxidativer Stress als ein Ungleichgewicht zwischen ROS-Generierung und ROS-Eliminierung, was eine veränderte Redox-Balance zur Folge hat.<sup>15</sup>

Im kardiovaskulären System ist oxidativer Stress meist mit vaskulären Dysfunktionen assoziiert, die wiederum mit kardiovaskulären Risikofaktoren und -indikatoren in einem kausalen Zusammenhang stehen.<sup>24-26</sup> Klinische Studien an Patienten mit essentieller Hypertonie haben belegt, dass diese Patienten eine erhöhte ROS-Generierung und Lipidperoxidation sowie eine verminderte antioxidative Kapazität aufweisen.<sup>27-29</sup> Außerdem konnte bestätigt werden, dass

durch ROS oxidiertes LDL-Cholesterin die Pathogenese einer Arteriosklerose ungünstig beeinflusst.<sup>30</sup> Auch vaskuläre Umbauprozesse und Entzündungsreaktionen sind auf veränderte redoxabhängige Signalwege zurückzuführen.<sup>31</sup>



**Abb. 1: Redox-Homöostase** (übernommen aus Trachootham *et al.*<sup>32</sup>)

Die intrazelluläre ROS-Generierung wird vor allem durch die mitochondriale Elektronentransportkette (Mito ETC), das endoplasmatische Retikulum (ER), die NADPH Oxidase (NOX) und die Xanthin Oxidase (XO) vermittelt. Die NO-Synthasen (NOS) sind für die Generierung von NO aus Arginin verantwortlich. Die antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und GPx neutralisieren ROS in weniger aktive Zwischenformen oder Wasser. Auch die Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP, NADPH) und Glutathion (GSH und GSSG) spielen bei der Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Status eine entscheidende Rolle. GSH dient als essentieller Kofaktor für die GPx und wird bei der Neutralisation von  $H_2O_2$  zu GSSG oxidiert. Durch NADPH, als Kofaktor für das Enzym Glutathion-Reduktase (GR), wird GSSG wieder zu GSH reduziert. Des Weiteren ist NADPH für die Überführung von oxidiertem Thiothionin (TRXo) und oxidiertem Glutaredoxin (GRXo) in ihre reduzierten Formen (TRXr, GRXr) essentiell.

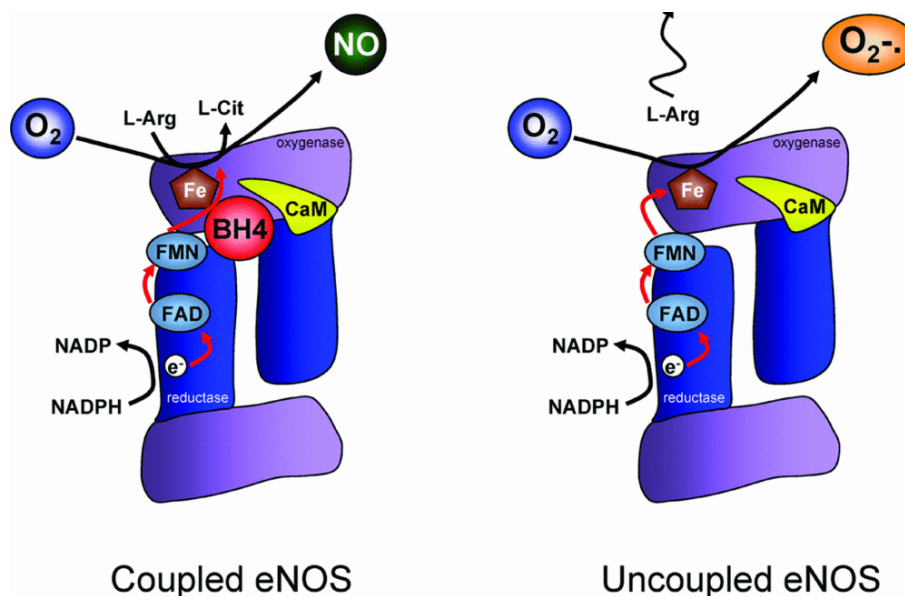
### 1.2.2 Die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und „NOS-Uncoupling“

Dem Radikal NO, früher auch als EDRF (engl. endothelium derived relaxing factor) bezeichnet, kommt im Herz-Kreislaufsystem eine Sonderstellung zu. 1978 konnte R.F. Furchgott belegen, dass dieses Radikal als Vasorelaxans Einfluss auf den vaskulären Tonus und damit auf den Blutdruck ausübt.<sup>33</sup> Des Weiteren ist NO u. a. an der Proliferation von VSMC, der Plättchenaggregation und der kardialen Kontraktilität beteiligt. Im neuronalen System wirkt dieses Radikal als Neurotransmitter. Darüber hinaus übernimmt es Aufgaben bei der Abwehr von Mikroorganismen und bei Entzündungsreaktionen.<sup>34, 35</sup> Synthetisiert wird NO durch die

NO-Synthasen (NOS), von denen 3 Isoformen bekannt sind: die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare (iNOS) NOS.

Alle NOS Isoformen katalysieren die Generierung von NO und L-Citrullin aus dem Substrat L-Arginin, wobei das Reduktionsäquivalent NADPH zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert und molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Als Kofaktor für diese Reaktion ist vor allem Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) in seiner reduzierten Form entscheidend.<sup>36</sup>

Durch die Generierung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und dem daraus resultierenden oxidativen Stress kann es zu einer Inaktivierung der NOS kommen und damit zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO. Dies wiederum hat eine eingeschränkte Endothel-vermittelte Vasodilatation zur Folge und einen Verlust der vasoprotektiven Effekte von NO, was zur Inzidenz eines Hypertonus beitragen kann.<sup>37</sup> Im Vergleich zu NO ist  $\text{ONOO}^-$  ein sehr schwaches Vasorelaxans, das überdies proinflammatorische Eigenschaften aufweist.<sup>38</sup> Die Generierung von  $\text{ONOO}^-$  führt außerdem zu einer Peroxynitrit-vermittelten Oxidation von  $\text{BH}_4$ , was zu einer  $\text{BH}_4$ -Defizienz und schließlich zu einem sog. „eNOS-Uncoupling“ führen kann (Abb. 2). Beim eNOS-Uncoupling ist der Elektronenfluss im Enzymkomplex gestört, wodurch die Elektronen des NADPH nicht auf L-Arginin sondern auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, was letztendlich eine weitere Quelle der  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Generierung darstellt.<sup>39</sup>



**Abb. 2: „Coupled versus uncoupled eNOS“** (übernommen aus Schmidt *et al.*<sup>40</sup>)

Links: Unter physiologischen Bedingungen steht  $\text{BH}_4$ , als Kofaktor, ausreichend zur Verfügung und gewährleistet die eNOS-Enzymaktivität. Hierbei werden Elektronen von NADPH über Flavine und  $\text{BH}_4$  bis zu einem Eisenkomplex in der Oxygenase-Domäne des Enzyms transportiert, was schließlich zur Generierung von L-Citrullin und NO aus den Substraten  $\text{O}_2$  und L-Arginin führt. Rechts: Unter pathophysiologischen Bedingungen, wenn die Bioverfügbarkeit von  $\text{BH}_4$  eingeschränkt ist, kommt es zum „Uncoupling“ von eNOS. Die Elektronen des NADPH können hierbei nicht auf L-Arginin übertragen werden, was zur Oxidation von  $\text{O}_2$  und damit zur Generierung von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  führt.

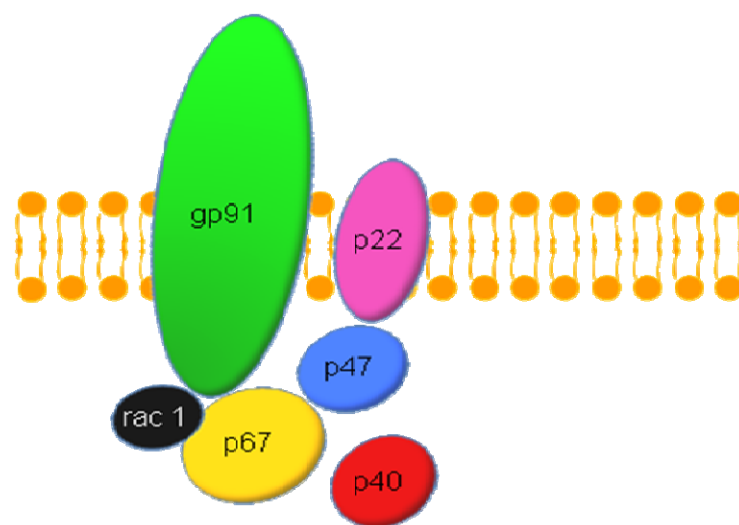
### 1.2.3 Die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase und oxidativer Stress

Der Multienzymkomplex NADPH Oxidase, spielt im kardiovaskulären System eine entscheidende Rolle bei der Generierung von ROS und damit bei der Pathophysiologie von CVD. Gemäß der folgenden Reaktion katalysiert das Enzym die Produktion des Superoxid-Radikals aus molekularem Sauerstoff und NADPH.<sup>41</sup>



Identifiziert und charakterisiert wurde die NADPH Oxidase erstmals in Leukozyten (Neutrophile, Eosinophile und Phagozyten), in denen das Enzym durch die Generierung großer Mengen  $\text{O}_2^{\bullet -}$  eine essentielle Funktion bei der unspezifischen mikrobiellen Immunabwehr besitzt.<sup>42</sup>

Der Multienzymkomplex besteht aus 2 membranständigen Untereinheiten. Die große katalytische Untereinheit gp91<sup>phox</sup> (91 kDa, phox: phagocyte oxidase), auch NOX2 genannt und die kleine 22 kDa schwere Untereinheit p22<sup>phox</sup>, die gemeinsam das heterodimere Cytochrom b<sub>588</sub> formieren. Des Weiteren existieren die 3 regulatorischen, zytosolischen Untereinheiten p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und p40<sup>phox</sup> sowie ein kleines Guaninnukleotid-bindendes Protein rac 1 oder rac 2 (Abb. 3).<sup>43</sup> Nach der Aktivierung des Enzyms durch Phosphorylierungsprozesse, translozieren die zytosolischen Untereinheiten an die Membran und interagieren mit dem Cytochrom b<sub>588</sub>-Komplex. Im aktivierten Enzymkomplex erfolgt schließlich, durch die katalytische Untereinheit, der Elektronentransfer von NADPH auf Sauerstoff.<sup>42, 44</sup>



**Abb. 3: Struktur der neutrophilen NADPH Oxidase** (mit freundlicher Genehmigung von Burkard N.<sup>45</sup>) gp91<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup> bilden gemeinsam die membranständigen Untereinheiten des Multienzymkomplexes, der nach Bindung der regulatorischen, zytosolischen Untereinheiten p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und p40<sup>phox</sup> und des kleinen G-Proteins rac 1 aktiviert wird.



Die Funktionen der verschiedenen Untereinheiten sind im Folgenden knapp zusammengefasst:

- gp91<sup>phox</sup>: Diese Untereinheit ist essentiell für die Funktionalität der NADPH Oxidase, da sie die für den Elektronentransport wichtigen prosthetischen Gruppen, FAD sowie 2 Häm-Gruppen, besitzt.
- p67<sup>phox</sup>: Diese zytosolische Untereinheit wird zum einen für die Aktivierung der NADPH Oxidase benötigt, zum anderen ist sie am Elektronentransport vom NADPH auf O<sub>2</sub> beteiligt.
- p47<sup>phox</sup>: Dieses Protein spielt eine essentielle Rolle bei der Aktivierung der Oxidase sowie bei der Translokation der zytosolischen Untereinheiten an die Membran. Durch Phosphorylierungsprozesse wird p47<sup>phox</sup> aktiviert und formiert mit den anderen zytosolischen Untereinheiten einen Komplex, der schließlich zur Membran transloziert und mit dem Cytochrom b<sub>588</sub> interagiert.<sup>42</sup>
- p40<sup>phox</sup>: Die Funktion dieser Untereinheit ist bis dato nicht eindeutig geklärt. Wahrscheinlich übernimmt p40<sup>phox</sup> jedoch eine Funktion bei der Stabilisierung des Multienzymkomplexes.<sup>44</sup>
- p22<sup>phox</sup>: Diese membranständige Untereinheit besitzt einen zytosolischen Abschnitt, mit dem die aktivierten und translozierten Untereinheiten interagieren.
- Rac: Das kleine G-Protein besitzt keinen direkten Einfluss auf die NADPH Oxidase, moduliert aber sehr wahrscheinlich die Funktion von p67<sup>phox</sup> und p47<sup>phox</sup>.<sup>42, 44</sup>

Zur neutrophilen NADPH Oxidase homologe Enzymkomplexe, mit divergenter Funktion, existieren auch im kardiovaskulären System. Vor allem für Endothelzellen, VSMC, Kardiomyozyten und Fibroblasten wurde die Existenz dieser Multienzymkomplexe beschrieben.<sup>46-48</sup> Zwischen der neutrophilen und der vaskulären NADPH Oxidase existieren jedoch einige charakteristische Unterschiede. So ist die neutrophile NADPH Oxidase unter basalen Bedingungen inaktiv und wird erst durch bestimmte Zytokine und Pathogene aktiviert. Außerdem entlässt das Enzym die in hohen Konzentrationen produzierten Superoxid-Radikale in den Extrazellularraum. Als Substrat dient dem Enzym hierbei NADPH. Die vaskuläre NADPH Oxidase hingegen ist konstitutiv aktiv, generiert in geringen Konzentrationen O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, die intrazellulär freigesetzt werden, und verwendet als Substrat sowohl NADH als auch NADPH.<sup>42, 44,</sup>

<sup>49</sup> Mehrere zu gp91<sup>phox</sup> homologe Proteine, NOX1-5 (NADPH Oxidase) genannt, mit unterschiedlichen Funktionen, existieren in den verschiedenen Zelltypen des Herz-Kreislaufsystems. NOX1 wird in VSMC exprimiert und spielt eine wichtige Rolle beim Zellwachstum. NOX2, ebenso wie NOX4, kommt in allen vaskulären Zelltypen sowie in Kardiomyozyten vor und wird außerdem in den Nieren exprimiert. Die Gegenwart von NOX3 im

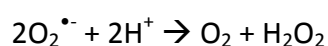
kardiovaskulären System ist in der Literatur nicht beschrieben, wohl aber die von NOX5, welches als einziges Protein der NOX-Familie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist.<sup>50</sup>

Als primäre Quelle der  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Generierung in den Gefäßen übernimmt die NADPH Oxidase eine entscheidende Rolle bei der Inzidenz und Progredienz vaskulärer Dysfunktionen. Aktiviert wird der Multienzymkomplex vor allem durch Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$ ), Wachstumsfaktoren (VEGF, PDGF) und vasoaktive Faktoren (Angiotensin II), ebenso wie durch physikalische Einflüsse (Dehnung, pulsatile Spannung, Scherkräfte).<sup>49, 51, 52</sup> Eine pathologische Zunahme der NADPH Oxidase-Aktivität und daraus resultierender oxidativer Stress sind, wie bereits erwähnt, mit arterieller Hypertonie, Arteriosklerose sowie vaskulären Umbauprozessen und Entzündungsreaktionen assoziiert. Experimentelle als auch klinische Studien haben gezeigt, dass erhöhte Angiotensin II (ANG II) Serumwerte die NADPH Oxidase nicht nur aktivieren, sondern auch zu einer gesteigerten Expression der einzelnen Untereinheiten führen.<sup>49, 53, 54</sup> Außerdem haben Heymes *et al.* nachgewiesen, dass Patienten mit einer kongestiven Kardiomyopathie eine erhöhte kardiale ROS-Generierung, auf Grund einer gesteigerten NADPH Oxidase-Aktivität im Herzen, aufweisen.<sup>48</sup> Des Weiteren konnten Guzik *et al.* belegen, dass eine erhöhte NADPH Oxidase-Aktivität und eine daraus resultierende eingeschränkte Endothel-vermittelte Vasodilatation, mit einer Erhöhung von arteriosklerotischen Risikofaktoren einhergehen.<sup>55</sup>

### 1.3 Antioxidative Enzyme und Antioxidantien

#### 1.3.1 Superoxid-Dismutasen (SOD)

Alle aeroben Lebewesen besitzen zum Schutz vor ROS und oxidativem Stress antioxidative Enzyme, die die zelluläre Redox-Homöostase aufrechterhalten. Eine Klasse dieser Enzyme ist die Superoxid-Dismutase-Familie, von denen 3 Isoformen in Säugern bekannt sind: Die Kupfer/Zink SOD (Cu/ZnSOD), die Mangan-haltige SOD (MnSOD) und die extrazelluläre SOD (ecSOD). Allen 3 Isoformen ist gemein, dass sie als Oxidoreduktasen, entsprechend der folgenden Reaktion, die Umwandlung von Superoxid-Radikalen zu Wasserstoffperoxid katalysieren:



Die SOD sind bemerkenswert leistungsfähige Enzyme, deren Reaktionen mit nahezu diffusionskontrollierter Geschwindigkeit ablaufen. Ihre Unterschiede beruhen auf ihrer

chromosomalen Lokalisation, Proteinstruktur, zellulären Verteilung und ihren metallischen Kofaktoren.<sup>56</sup>

Die Cu/ZnSOD war die erste SOD, die 1969 von McCord und Fridovich beschrieben wurde.<sup>57</sup> Das humane *sod1* Gen ist auf Chromosom 21q lokalisiert und besteht aus 5 Exons und 4 Introns. Das Enzym wird mit einem Molekulargewicht von 88 kDa konstitutiv exprimiert und ist im Zytoplasma, im Nukleus, in Mikrosomen und im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert.<sup>57, 58</sup> Die Cu/ZnSOD ist ein Homodimer, das im aktiven Zentrum jeder Untereinheit ein Kupfer- und ein Zink-Ion besitzt. Kupfer ist das redoxaktive Metall, das während der katalytischen Reaktion seinen Oxidationsstatus von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  verändert, wohingegen Zink einen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms ausübt.<sup>59</sup> Die katalytische Dismutation von  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , die bei allen SOD ähnlich verläuft, soll im Folgenden knapp anhand der Cu/ZnSOD beschrieben werden. Entscheidend bei dieser zweigeteilten Reaktion ist, dass  $\text{O}_2^{\bullet-}$  zugleich Reduktions- als auch Oxidationsmittel ist. In der ersten Teilreaktion bindet  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen, als Substrat an das  $\text{Cu}^{2+}$  im aktiven Zentrum, wobei dieses zu  $\text{Cu}^+$  reduziert und  $\text{O}_2^{\bullet-}$  zu molekularem Sauerstoff oxidiert wird. Bei dieser Teilreaktion wird das Enzym selbst reduziert. In der zweiten Teilreaktion schließlich wird, durch die Bindung eines weiteren  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , Peroxid gebildet, das durch die Aufnahme von 2 Protonen zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt wird. Hierbei gibt  $\text{Cu}^+$  ein Elektron ab und erhält wieder seinen ursprünglichen Oxidationszustand.<sup>60</sup>

Die ecSOD ist ebenfalls eine Cu/Zn-haltige SOD, die durch das *sod3* Gen auf Chromosom 4 codiert wird. Dieses Gen besteht aus 3 Exons und 2 Introns. Erstmals beschrieben wurde dieses Homotetramer 1982 durch Marklund *et al.*, die es in extrazellulären Flüssigkeiten nachgewiesen haben. Die ecSOD ist ein hydrophobes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 135 kDa, das nicht nur extrazellulär in Blut und Lymphe vorkommt, sondern auch an Plasmamembranen lokalisiert ist.<sup>61</sup> In den meisten Geweben ist ecSOD nur in geringen Mengen exprimiert. Im Gefäßsystem gehören allerdings 30-50 % der SOD der ecSOD-Isoform an. Hier spielt ecSOD auch eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung der NO-Bioverfügbarkeit. Da NO vor allem von Endothelzellen generiert wird, als Vasorelaxans aber auf VSMC einwirkt, bedeutet dies, dass NO zwischen den Zelltypen frei diffundieren muss. Bei diesem Prozess schützt die extrazelluläre SOD, durch die  $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Dismutation, NO davor mit  $\text{O}_2^{\bullet-}$  das toxische Peroxynitrit zu bilden, wodurch die Diffusion und Bioverfügbarkeit von NO gewährleistet wird.<sup>62</sup>

Die MnSOD fungiert ähnlich wie die Cu/ZnSOD, besitzt im aktiven Zentrum des Enzyms jedoch ein Mangan-Ion, das während der Katalyse seinen Oxidationszustand von  $Mn^{3+}$  zu  $Mn^{2+}$  und zurück verändert. Codiert wird dieses hoch konservierte Enzym durch das *sod2* Gen, welches auf Chromosom 6q25 lokalisiert ist.<sup>63</sup> Diese SOD-Isoform besteht aus vier 22 kDa schweren Untereinheiten, die einen homotetrameren Komplex formen, der ausschließlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist.<sup>64</sup> MnSOD ist die einzige SOD, die essentiell für das Überleben von aeroben Organismen ist. Ein Knockout dieses Enzyms in Mäusen führt postnatal auf Grund von dilatativen Kardiomyopathien und Neurodegenerationen zur Letalität.<sup>65, 66</sup> Beim Menschen hat sich indessen gezeigt, dass eine verminderte MnSOD-Aktivität mit Ovarialkarzinomen und Typ 1 Diabetes assoziiert ist.<sup>67, 68</sup>

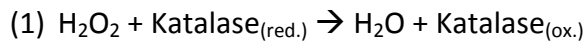
Reguliert wird die Genexpression aller 3 SOD-Isoformen durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren. Vor allem der redoxsensitive Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), der durch  $H_2O_2$  aktiviert wird, ist hierbei von besonderer Bedeutung. Aber auch proinflammatorische Zytokine und vasoaktive Faktoren spielen bei der SOD-Expression eine entscheidende Rolle.<sup>64</sup>

### 1.3.2 Katalase

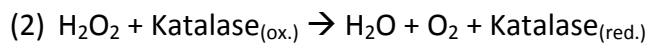
Ein weiteres antioxidatives Enzym, das an der Dismutation von  $O_2^{\bullet-}$  anknüpft, ist die Katalase. Bereits 1900 wurde die Existenz dieses Enzyms in aeroben Lebewesen durch Leow *et al.* beschrieben.<sup>69</sup> Bei der Katalase handelt es sich um eine Oxidoreduktase, die die Neutralisation von  $H_2O_2$  zu molekularem Sauerstoff und Wasser katalysiert. Das Enzym ist ein Tetramer aus 4 identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je ca. 60 kDa. Jede Untereinheit besitzt als prosthetische Gruppe ein Häm-Molekül sowie eine Bindestelle für NADPH.<sup>70</sup> Die Katalase ist eines der effizientesten Enzyme mit einer Umsatzrate von ca. 200.000 katalytischen Reaktionen pro Sekunde und Untereinheit, das in allen Organen und Geweben ubiquitär exprimiert wird. Auf zellulärer Ebene ist die Katalase vor allem in Peroxisomen, im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert.<sup>71</sup>

Der molekulare Katalysemechanismus ist bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt, ist aber sehr wahrscheinlich ein zweistufiger Mechanismus, bei dem das Eisen-Ion der Häm-Gruppe zwischenzeitlich seinen Oxidationszustand von  $Fe^{3+}$  nach  $Fe^{4+}$  verändert.

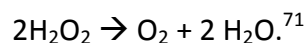
Im ersten Schritt bindet Wasserstoffperoxid an das Enzym und wird zu Wasser reduziert. Das Enzym wird dabei selbst oxidiert:



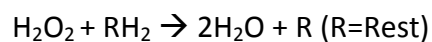
Im zweiten Schritt werden sowohl ein weiteres Molekül Wasserstoffperoxid als auch das Enzym reduziert. Sauerstoff wird bei diesem Schritt oxidiert und neben einem weiteren Molekül Wasser als Produkt freigesetzt.



Die Summengleichung lautet schließlich:



Als bifunktionelles Enzym ist die Katalase zudem in der Lage, bei niedrigen Substratkonzentrationen, durch seine peroxidative Aktivität, andere Substrate wie Methanol, Ethanol, Phenol oder Nitrit, gemäß der folgenden Reaktion, zu oxidieren.



Die physiologische Signifikanz dieser Reaktion ist bis dato allerdings noch nicht vollständig verstanden.<sup>72</sup>

Jede katalytische Untereinheit der Katalase besitzt, wie bereits erwähnt, eine Bindestelle für NADPH. Das Reduktionsäquivalent ist für die Enzymaktivität nicht essentiell, besitzt jedoch eine wichtige Funktion bei deren Aufrechterhaltung. Durch die Toxizität ihres Substrates  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird die Katalase langsam inaktiviert. Diese Inaktivierung kann allerdings durch die Oxidation von NADPH unterbunden bzw. umgekehrt werden.<sup>73</sup>

Die Funktionalität der Katalase ist für das Überleben nicht essentiell, was an Katalase-knockout Mäusen bestätigt wurde. Dennoch besitzt das Enzym einen wichtigen physiologischen Einfluss, da eine Katalase-Defizienz z. B. mit einem erhöhten Diabetes Typ II Risiko assoziiert ist.<sup>74,75</sup> An transgenen Mäusen, die Katalase überexprimieren und mit Norepinephrin bzw. ANG II behandelt wurden, konnte überdies bestätigt werden, dass diese Tiere im Vergleich zu ihren wildtypischen Kontrolltieren eine mildere Hypertonie ausbilden.<sup>76</sup>

### 1.3.3 Glutathion-Peroxidasen (GPx), Glutathion und das Thioredoxin-System

Glutathion-Peroxidasen (GPx) gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen und zählen wie die SOD und die Katalase zu den antioxidativen Enzymen. Alle GPx-Isoenzyme (GPx1-7) neutralisieren in einer Glutathion-abhängigen Reaktion toxisches  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie organische Peroxide, wobei die

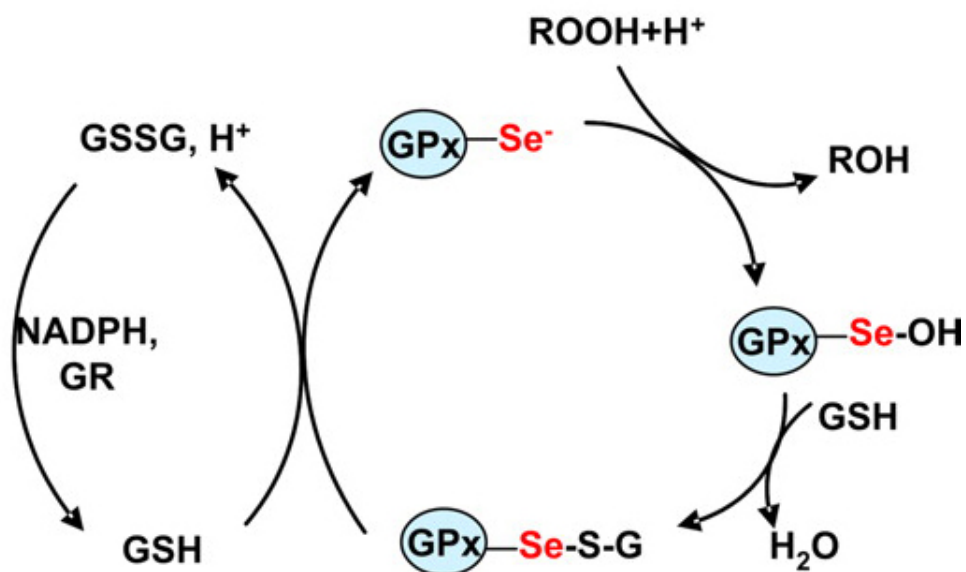
Substrate zu Wasser oder dem entsprechenden Alkohol reduziert werden. Die GPx werden durch verschiedene Gene codiert und divergieren hinsichtlich ihrer Abundanz, Lokalisation und Substratspezifität. 5 der 7 GPx-Isoenzyme (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx6) sind Selenoproteine, die in ihrem aktiven Zentrum anstelle der Aminosäure Cystein die Aminosäure Selenocystein enthalten (hier ist des Schwefelatom des Cysteins durch ein Selenatom ausgetauscht).<sup>77</sup> GPx sind Homotetramere, die aus 20-25 kDa Untereinheiten bestehen. Eine Ausnahme bildet die GPx4, die als ca. 20 kDa schwere Monome vorkommt. GP1x ist ein zytoplasmatisches Protein, das ubiquitär in hoher Konzentration in allen Zellen exprimiert wird und vor allem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat verwendet. GPx2 wird vorwiegend im Gastrointestinaltrakt sowie in der Leber gebildet und besitzt eine ähnliche Substratspezifität wie GPx1. Die GPx3 (auch extrazelluläre Glutathion-Peroxidase genannt) ist ein extrazelluläres Protein, das durch Endothelzellen des proximalen Tubulus in das Plasma sezerniert wird. Auch dieses Enzym neutralisiert vorwiegend Wasserstoffperoxid. GPx4, eine Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase, kommt in nahezu allen Geweben vor und kann neben freien Hydroperoxiden auch komplexe Esterlipid-Hydroperoxide reduzieren. Die zelluläre Verteilung der GPx4 differiert in verschiedenen Geweben. GPx5 und GPx7 sind Cystein-haltige Enzyme, die Selen-unabhängig sind. GPx5 wird spezifisch und ubiquitär im Nebenhoden exprimiert und durch Androgene reguliert. GPx7 ist wie GPx4 eine Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase und GPx6 wird vor allem während der Embryogenese und in Epithelzellen des olfaktorischen Systems exprimiert.<sup>78, 79</sup>

Sowohl GPx1, GPx3 als auch GPx4 besitzen einen protektiven Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Ardanaz *et al.* konnten zeigen, dass in ANG II behandelten GPx1-knockout Mäusen die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Dysfunktion progressiver verläuft als in wildtypischen Kontrolltieren.<sup>80</sup> Des Weiteren ist eine verminderte GPx3-Aktivität mit einem erhöhten Thromboserisiko assoziiert und spielt innerhalb des Gefäßsystems eine wichtige Rolle bei der Regulation der NO-Bioverfügbarkeit.<sup>81</sup> An transgenen Mäusen konnte überdies bestätigt werden, dass eine mitochondrienspezifische GPx4-Überexpression kardiale Dysfunktionen nach Ischämie-Reperfusion deutlich abmildert.<sup>82</sup>

Allen GPx-Isoformen ist gemein, dass sie als Glutathion-abhängige Enzyme GSH als Kofaktor benötigen. Die Neutralisation von Peroxiden verläuft in mehreren Schritten in einem Redox-Zyklus, dessen Reaktionsmechanismus in Abb. 4 am Beispiel der Selen-abhängigen GPx dargestellt ist. Zu Beginn dieses Zyklus liegt das Selenocystein im aktiven Zentrum des GPx Enzyms in der Selenolatform (Se<sup>-</sup>) vor. Durch die Reduktion des Peroxids zu Wasser bzw.

Alkohol wird dieser Rest zu Selenylsäure (Se-OH) oxidiert. Anschließend reagiert GSH mit dieser Säure und bildet unter Abspaltung eines Wasser-Moleküls ein Selensulfidaddukt (Se-S-G) aus. Schließlich erfolgt durch die Reaktion eines zweiten GSH-Moleküls die Regeneration der aktiven Enzymform, wobei oxidiertes Glutathion (GSSG) freigesetzt wird.<sup>83</sup>

Die Regeneration des GSH erfolgt durch das NADPH-abhängige Flavoprotein Glutathion-Reduktase (GR). Dieses Enzym überträgt Elektronen vom NADPH über ein FAD auf eine Disulfidbrücke innerhalb des Enzyms und schließlich auf das oxidierten GSSG. Bei dieser Katalyse wird der Kofaktor NADPH zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert.<sup>83</sup>



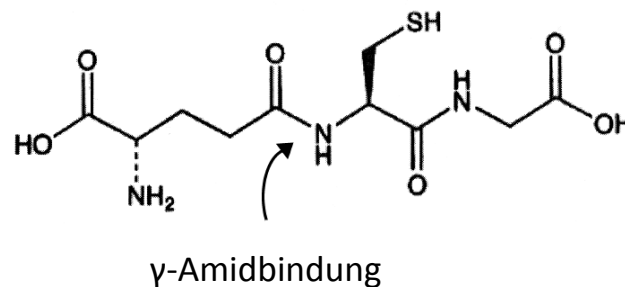
**Abb. 4: Katalytischer Mechanismus der GPx (schematisch)** (Übernommen aus Lu *et al.*<sup>83</sup>)

Das Peroxid (ROOH) oxidiert unter Abspaltung von Wasser bzw. Alkohol das Selenolat ( $\text{Se}^-$ ) der GPx zu Selenylsäure (Se-OH). Mittels GSH wird Se-OH unter Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  zu einem Selensulfidaddukt (Se-S-G) umgewandelt. Ein weiteres GSH regeneriert das Enzym, wobei GSSG (oxidiertes Glutathion) freigesetzt wird. GSSG wird schließlich durch die Glutathion-Reduktase (GR) wieder zu 2 Molekülen GSH reduziert.

Das Tripeptid Glutathion, auch  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin genannt, ist ein Thiol, welches aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin unter ATP-Verbrauch von den zwei Enzymen  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase und Glutathionsynthase synthetisiert wird. GSH ist kein echtes Tripeptid, da die Amidbindung zwischen der Glutaminsäure und dem Cystein über die  $\gamma$ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure ausgebildet wird und nicht über die  $\alpha$ -Carboxylgruppe, wie bei einer echten Peptidbindung (Abb. 5). Diese  $\gamma$ -Bindung hat jedoch zur Folge, dass GSH vor der Hydrolyse durch intrazelluläre Aminopeptidasen geschützt ist.<sup>84</sup>

GSH ist eines der wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien, da es im zellulären System ubiquitär als sog. Redox-Puffer fungiert. Die Oxidation von 2 Molekülen GSH führt zur

Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen diesen Molekülen, wobei diese von ihrer monomeren Form in ein Glutathion-Dimer (GSSG) übergehen.



**Abb. 5: Strukturformel des Glutathions** (Übernommen und modifiziert aus Sies<sup>84</sup>)

Der intrazelluläre Redox-Status spiegelt sich durch die [GSH]:[GSSG]-Ratio wider, die unter physiologischen Bedingungen >10 sein sollte. Als direktes Antioxidans ist GSH in der Lage, direkt auf ROS einzuwirken und diese zu reduzieren. Überdies kann das Thiol Cysteinreste in Proteinen durch das Enzym Glutaredoxin thiolieren und dadurch gemischte Disulfide (GSSR) formieren. Diese Glutathionylierung dient dem Schutz der Proteine vor einer irreversiblen Oxidation durch ROS. Als indirektes Antioxidans wirkt GSH, wie bereits beschrieben, als entscheidender Kofaktor bei der GPx-abhängigen Neutralisation von Peroxiden mit und besitzt zudem einen Einfluss auf Glutathion-S-Transferase-vermittelte Biotransformationen toxischer Stoffe. In nahezu allen Zellen kommt GSH in sehr hohen Konzentrationen vor. Ca. 85-90 % des zellulären GSH sind im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen die restlichen 10-15 % in der nukleären Matrix, den Mitochondrien und den Peroxisomen vorliegen.<sup>84-86</sup> Auch extrazellulär, im Plasma, ist GSH zu finden, was in zu geringen Konzentrationen ein Risikoindikator für CVD sein kann.<sup>87</sup>

Ähnlich wie das Glutathion-Glutaredoxin-System, existiert noch ein weiteres antioxidatives System innerhalb der Zellen, das daran beteiligt ist, die Oxidation von Sulfhydrylgruppen (-SH) in Proteinen durch ROS zu unterbinden. Dieses System ist das sog. Thioredoxin-System, das entscheidend dazu beiträgt, Proteine in ihrer reduzierten Form zu erhalten. Thioredoxin (Trx) ist ein ubiquitäres Enzym, das als Dithiol-Disulfid-Oxidoreduktase die Reduktion von Protein-Disulfiden katalysiert. Hierbei wird das Thioredoxin (Trx) selbst oxidiert und anschließend durch die NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktase (TrxR) wieder zur aktiven Enzymform reduziert (Abb. 6).

Drei humane Trx-Isoenzyme sind bekannt. Eine zytosolische und membrangebundene Form (Trx1), eine mitochondriale (Trx2) und eine trunkierte Form (Trx80), die extrazellulär vorkommt.



Allen Enzymen ist ihr hoch konserviertes aktives Zentrum gemein, das aus der Aminosäureabfolge Cystein-Glycin-Prolin-Cystein besteht. Innerhalb des Enzyms kann es, auf Grund der Struktur des aktiven Zentrums, durch die Reduktion des Substrats zur Ausbildung einer Disulfidbrücke kommen.<sup>86</sup>

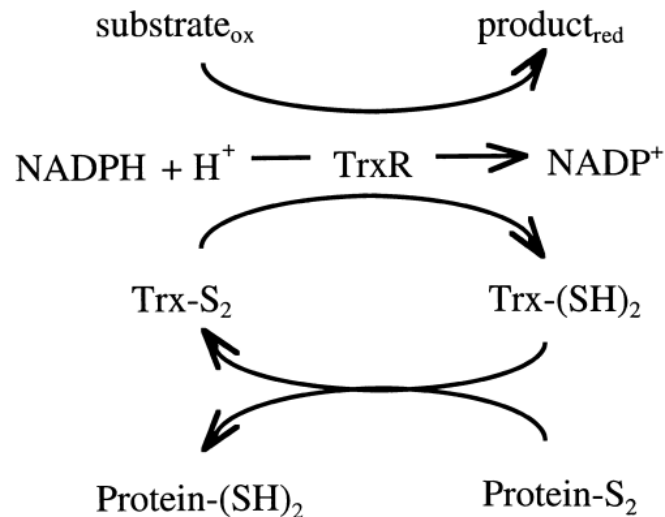


Abb. 6: Oxidoreduktase-Aktivität des Thioredoxin-Systems (schematisch) (Übernommen aus Arnér *et al.*<sup>86</sup>)

### 1.3.4 Die Glukose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PDH)

Die Glukose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PDH) ist das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym im oxidativen Zweig des Pentosephosphatwegs. Dieser Stoffwechselweg dient der Generierung von Ribose-5-phosphat und NADPH, das für reduktive Biosynthesen verwendet werden kann. Als antioxidatives Enzym spielt die G6PDH außerdem eine entscheidende Rolle im zellulären System. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Glukose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono- $\delta$ -lacton, wobei ein Molekül  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert wird.<sup>88</sup> Die G6PDH ist, wie die bereits beschriebenen antioxidativen Enzyme, eine Oxidoreduktase, die als Homodimer oder Homotetramer ubiquitär exprimiert wird. Lokalisiert ist dieses Enzym vor allem im Zytoplasma, wo es an intrazelluläre Membranen gebunden vorliegt. Nach seiner Aktivierung durch Phosphorylierungsprozesse transloziert das Enzym an die Membran, wo es seine katalytische Aktivität aufnimmt. Die G6PDH besitzt für  $\text{NADP}^+$  zwei Bindestellen. Eine N-terminale an die  $\text{NADP}^+$  als Kofaktor bindet und eine Bindestelle am C-Terminus des Enzyms, an die  $\text{NADP}^+$  als strukturelles Element bindet.<sup>89, 90</sup> Die Expression der G6PDH auf

Transkriptionsebene kann - obwohl dieses Gen als Haushaltsgen betrachtet wird - adaptiv reguliert werden. Hormone und Wachstumsfaktoren, wie z. B. Insulin und der „Epidermal Growth Factor“ aber auch Norepinephrin innerhalb des Myokards, sind in der Lage die G6PDH mRNA-Expression zu induzieren.<sup>90</sup>

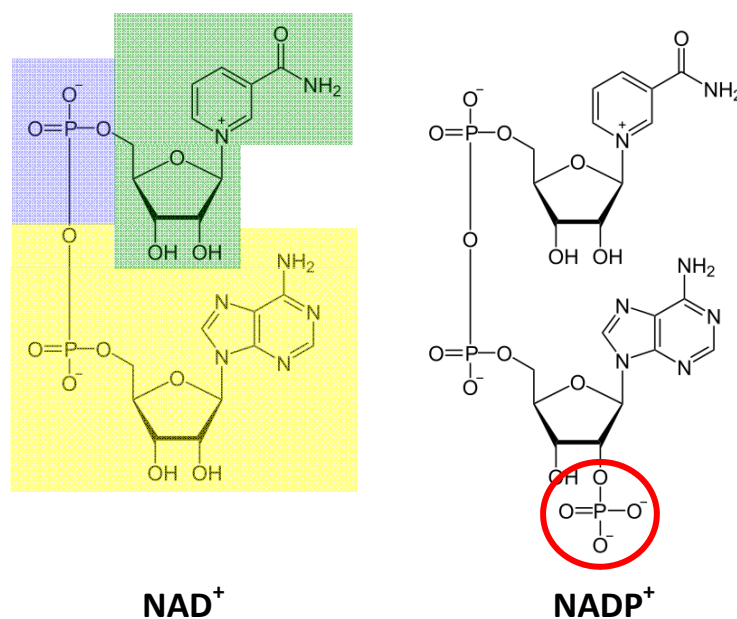
Das durch die G6PDH generierte NADPH ist entscheidend an der Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Status beteiligt. Vor allem im GSH- und Trx-System nimmt dieses Reduktionsäquivalent, wie bereits beschrieben, eine wichtige Funktion ein.

Das *G6PDH*-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, wodurch Mutationen innerhalb dieses Gens weit verbreitet sind. Ein daraus resultierender G6PDH-Mangel, von dem weltweit ca. 40 Millionen Menschen betroffen sind, ist die häufigste Enzymopathie. Der Enzymdefekt führt in den meisten Fällen zu moderaten Ausprägungen, die durch eine Hämolyse der Erythrozyten charakterisiert sind.<sup>23</sup> Dessen ungeachtet, konnte jedoch auch ein Zusammenhang zwischen G6PDH-Mangel und kardiovaskulären Ereignissen beschrieben werden. Leopold *et al.* konnten durch *in vitro* Experimente an glatten VSMC und Endothelzellen eine verminderte Schutzwirkung gegen ROS nachweisen, wenn die G6PDH-Aktivität experimentell inhibiert bzw. reduziert wurde. Die so induzierte G6PDH-Defizienz hatte eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit sowie eine Depletion der GSH-Menge zur Folge, was wiederum mit vaskulären Dysfunktionen assoziiert werden kann.<sup>91, 92</sup> Des Weiteren konnten Jain *et al.* durch *in vivo* Untersuchungen an G6PDH-defizienten Mäusen belegen, dass diese Tiere, im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren, innerhalb des Myokards sowohl strukturelle Umbauprozesse als auch eine verminderte Kontraktilität aufweisen. Bei diesen Tieren konnte außerdem ein progressiverer Verlauf einer myokardialen Dysfunktion nach Ischämie-Reperfusion beschrieben werden.<sup>93, 94</sup>

### **1.3.5 Die Pyridinnukleotide Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP)**

Die Pyridinnukleotide NAD und NADP in ihrer oxidierten und reduzierten Form ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  und  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ) bilden zusammen mit Glutathion (GSH/GSSG) die drei wichtigsten Redox-Systeme innerhalb des Organismus. Pyridinnukleotide sind als Metaboliten des ATP unter anderem Bestandteil der DNA und RNA und besitzen zudem essentielle Eigenschaften als

Kofaktoren für Reduktions-Oxidations-Reaktionen. Sowohl NAD als auch NADP bestehen aus einem Adenosin-Monophosphat-Nukleotid (AMP), das über eine Phosphatgruppe mit einem Nicotinamid-Ribonukleotid verbunden ist. Der einzige strukturelle Unterschied zwischen NAD und NADP besteht in einer zusätzlichen Phosphatgruppe am C2'-Atom der Adenosinriboseeinheit im NADP (Abb. 7). In der oxidierten Form ist das Stickstoffatom des Nicotinamid-Rings positiv geladen. Durch die Oxidation eines Substrates werden ein Hydridion und zwei Elektronen vom Nicotinamid-Ring aufgenommen und das Stickstoffatom geht in Folge dessen in einen neutralen Zustand über.<sup>88</sup>



**Abb. 7: Strukturformeln des NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup>**

Die Pyridinnukleotide NAD und NADP sind aus einer Nicotinamid-Ribonukleotideinheit (grün) und AMP (gelb) aufgebaut, die über eine Phosphatbindung (blau) miteinander verbunden sind. Der Unterschied zwischen NAD und NADP besteht in einer zusätzlichen Phosphatgruppe des NADP am C2'-Atom der Riboseeinheit des AMPs (roter Kreis).

Synthetisiert werden beide Reduktionsäquivalente entweder über den *de novo*-Weg, ausgehend von der Aminosäure Tryptophan oder über einen Recycling-Weg, bei dem Nicotinsäure oder Nicotinamid für die Regeneration von NAD<sup>+</sup> verwendet werden. NAD<sup>+</sup> ist das Vorläufermolekül von NADH, NADP<sup>+</sup> und NADPH. NADH wird während kataboler Prozesse durch Elektronenübertragung aus NAD<sup>+</sup> gewonnen. NADP<sup>+</sup> entsteht durch Phosphorylierung von NAD<sup>+</sup> mittels einer ATP-abhängigen NAD-Kinase und NADPH wird schließlich durch NADP<sup>+</sup>-abhängige

Dehydrogenasen (G6PDH, Isocitrat-Dehydrogenase, Malatenzym und Aldehyd-Dehydrogenase) aus  $\text{NADP}^+$  generiert.<sup>95</sup>

Das Redox-Paar  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ist ein wichtiger Elektronen-Carrier bei der Oxidation von Brennstoffen in der Glykolyse und dem Citratzyklus. Vor allem bei der Generierung von ATP in der Atmungskette spielt  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  eine entscheidende Rolle. Das Gleichgewicht zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand liegt unter physiologischen Bedingungen beim  $\text{NAD}^+$ , so dass es stets als Oxidationsmittel zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu besitzt das Redox-Paar  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  entscheidende Funktionen bei reduktiven Biosynthesen (Synthese von DNA, RNA, Fettsäuren und Steroiden) und verfügt ferner über essentielle Eigenschaften im antioxidativen System der Zelle. Das Gleichgewicht dieses Redox-Paares liegt unter physiologischen Bedingungen immer auf Seiten des Reduktionsmittels  $\text{NADPH}$ .<sup>96</sup> Kommt es unter pathophysiologischen Bedingungen zu einer erhöhten ROS-Generierung und damit zu oxidativem Stress, steht der Zelle durch das enorme Reduktionspotential des  $\text{NADPH}$  ein wirksamer Schutzmechanismus zur Verfügung.  $\text{NADPH}$  ist, als indirektes Antioxidans, entscheidend an der Aufrechterhaltung der zellulären  $[\text{GSH}]:[\text{GSSG}]$ -Ratio beteiligt, indem es als Kofaktor für die GR fungiert. Auch innerhalb des Thioredoxin-Systems und für die Aufrechterhaltung der Katalase-Aktivität nimmt  $\text{NADPH}$ , wie bereits beschrieben, eine zentrale Stellung ein. Bezüglich der Tatsache, dass  $\text{NAD}^+$  das Vorläufermolekül des  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  Redox-Paares ist, hat auch die Konzentration dieses Moleküls einen wichtigen Einfluss auf die antioxidative Kapazität der Zellen.<sup>95</sup>

Schließlich werden sowohl dem  $\text{NADH}$  als auch dem  $\text{NADPH}$  zusätzlich zu ihren indirekten auch direkte antioxidative Eigenschaften zugesprochen. Beide Moleküle können in ihrer reduzierten Form direkt auf freie Radikale einwirken, diese neutralisieren und dabei selbst zum Radikal umgewandelt werden. Ein Beispiel für eine solche Reaktion ist diejenige von  $\text{NADPH}$  mit dem Kohlenstofftrioxid-Radikal ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ), das neben dem Stickstoffdioxid-Radikal ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ) bei der Reaktion von Peroxynitrit mit Kohlenstoffdioxid entsteht. Bei dieser Reaktion wird das  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  direkt von  $\text{NADPH}$  abgefangen und zu  $\text{HCO}_3^-$  umgewandelt. Das dabei entstehende  $\text{NADP}^{\bullet}$ -Radikal reagiert in der Folge mit  $\text{O}_2$  zu  $\text{NADP}$  und  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Das Superoxid-Radikal wird durch die SOD in  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt und dieses schließlich durch die Katalase oder GPx neutralisiert.<sup>97</sup>

## 1.4 Estrogene und Estrogenrezeptoren (ER) im kardiovaskulären System

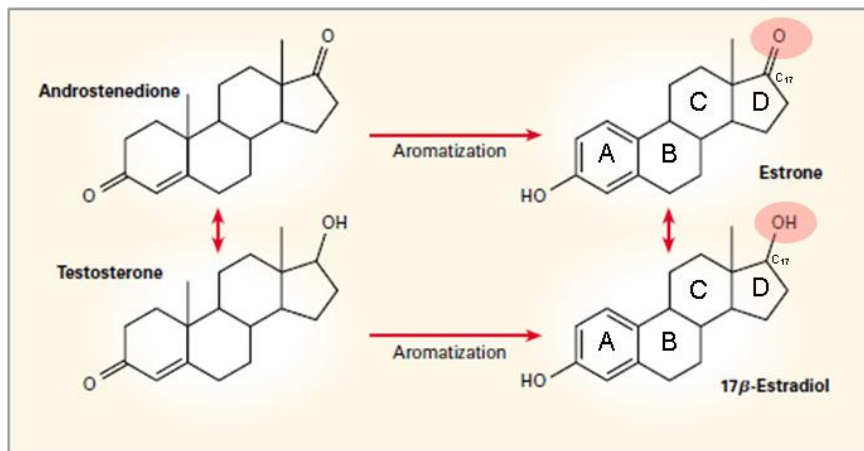
Steroidhormone sind Derivate des Cholesterins mit vielfältigen physiologischen Wirkungen unter anderem auf das kardiovaskuläre System. Es existieren 5 Klassen von Steroidhormonen, die in Corticosteroide und Sexualsteroiden eingeteilt werden können. Zu den Corticosteroiden zählen die Glucocorticoide (Cortisol und Corticosteron) und Mineralocorticoide (Aldosteron siehe 1.5). Die Progestagene (z. B. Progesteron und Pregnenolon), Androgene (z. B. Testosteron und Androsteron) und Estrogene (veraltet Östrogene, z. B. Estradiol, Estron und Estriol) gehören zur Klasse der Sexualsteroiden.<sup>88</sup> In den folgenden Abschnitten soll eingehend auf Estrogene, ihre Rezeptoren und ihre Bedeutung innerhalb des Herz-Kreislaufsystems eingegangen werden.

### 1.4.1 Allgemeine Aspekte von Estrogenen und Estrogenrezeptoren

Die endogen vorkommenden Estrogene  $17\beta$ -Estradiol (E2), Estron (E1) und Estriol (E3) sind die wichtigsten weiblichen Sexualsteroiden, die bei Frauen zyklusabhängig im Ovar gebildet werden und für die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsmerkmale essentiell sind. In geringeren Konzentrationen werden Estrogene, gleichermaßen bei Frauen und Männern, unter anderem in den Nebennieren, der Leber und in peripheren Geweben produziert.<sup>98</sup>

Die Biosynthese aller Steroidhormone erfolgt, ausgehend vom Cholesterin, durch Hydroxylierungsreaktionen sowohl in den Mitochondrien als auch im endoplasmatischen Retikulum. Katalysiert werden diese Hydroxylierungsreaktionen durch  $P_{450}$ -Monooxygenasen, die hierfür sowohl NADPH als auch  $O_2$  erfordern. Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Steroidogenese ist die Umwandlung von Cholesterin (27 C-Atome) in Pregnenolon (21 C-Atome). Über mehrere Zwischenstufen werden im Anschluss aus Pregnenolon die Androgene ( $C_{19}$ -Steroide), Androstendion und Testosteron, synthetisiert, die schließlich in Estrogene ( $C_{18}$ -Steroide) umgewandelt werden können. Durch eine Aromatisierung, katalysiert durch das Enzym Aromatase, entsteht aus Androstendion Estron und aus Testosteron  $17\beta$ -Estradiol. Das Enzym  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 7 ist ferner in der Lage E1 in E2 zu überführen. Das ausschließlich und nur in geringen Konzentrationen in der Leber, im Fettgewebe und der Plazenta synthetisierte Estriol, ist ein Metabolit aus E1 oder E2, mit deutlich schwächerer estrogener Wirkung. Gemein ist allen endogenen Estrogenen ihr

Estran-Grundgerüst aus 4 Kohlenstoff-Ringen (A, B, C und D), die am C<sub>3</sub>-Atom eine Hydroxylgruppe und am C<sub>17</sub>-Atom eine Hydroxyl- oder Ketongruppe besitzen (Abb. 8).<sup>88, 98, 99</sup>



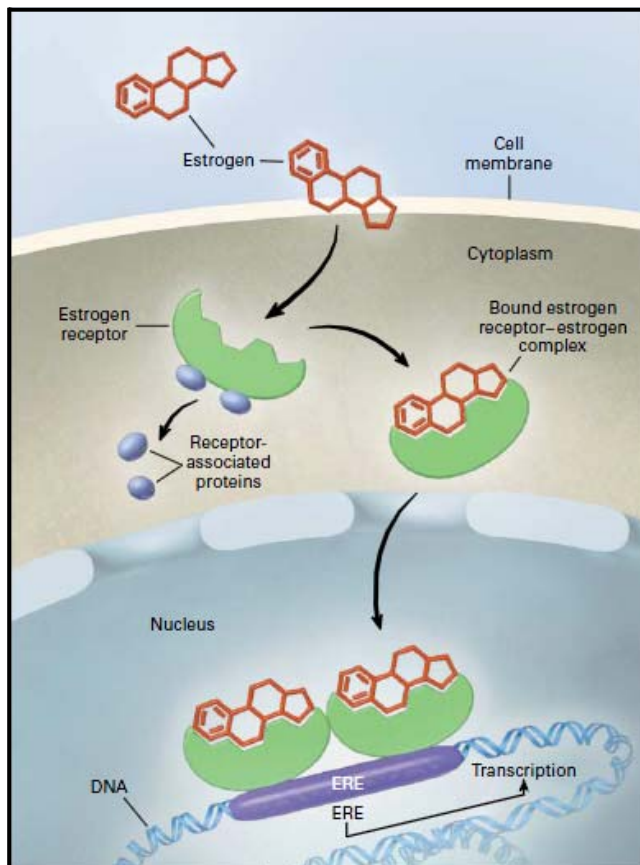
**Abb. 8: Struktur und Synthese von Estron und 17β-Estradiol** (Modifiziert aus Gruber *et al.*<sup>98</sup>) Die Androgene Androstendion bzw. Testosteron werden durch Aromatisierung in Estron bzw. 17β-Estradiol umgewandelt. Estron und 17β-Estradiol lassen sich durch Reduktion bzw. Oxidation ineinander überführen. Estron besitzt am C<sub>17</sub>-Atom eine Ketongruppe. 17β-Estradiol an diesem Atom eine Hydroxylgruppe.

Nach ihrer Synthese werden die Estrogene in den Blutkreislauf sezerniert und gelangen mit dem Blutfluss an ihre Zielorgane. Auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaften sind Steroidhormone in der Lage Lipidmembranen frei zu passieren. In der Zielzelle angelangt, binden Estrogene an Estrogenrezeptoren (ER), von denen 2 klassische Isoformen, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , existieren. ER gehören zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren, die nach ligandabhängiger Aktivierung in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren die Expression spezifischer Zielgene regulieren.<sup>100, 101</sup> Vor ihrer Aktivierung liegen die ER zytoplasmatisch und/oder nukleär als inaktive Monomere innerhalb der Zelle vor und sind von sog. Rezeptor-assoziierten Proteinen (z. B. HSP90) gebunden. Die Bindung des Liganden an den ER hat eine Konformationsänderung des Rezeptors und die Dissoziation von den Rezeptor-assoziierten Proteinen zur Folge. Der Estrogen-ER-Komplex transloziert daraufhin in den Zellkern und bindet als Homo- oder Heterodimer an spezifische DNA-Sequenzen, die sog. „Estrogen Response Elemente“ (ERE) im Promotor der Zielgene.<sup>99, 102-104</sup> ERE sind 13 bp lange palindromische DNA-Abschnitte mit der Konsensussequenz 5'GGTCAnnnTGACC3'.<sup>104</sup> Die Interaktion des Estrogen-ER-Komplexes mit zusätzlichen Transkriptionsfaktoren führt schließlich zur Expression spezifischer Zielgene durch die Transkriptionsmaschinerie (Abb. 9). Nur ein geringer Anteil, der durch Estrogene regulierten Gene besitzen in ihren Promotoren ein ERE mit der definierten Konsensussequenz. Bei vielen Genen fehlt diese Sequenz vollständig oder variiert in mehreren Basen. Die Transkription dieser Gene kann dennoch durch ER reguliert werden, indem der Estrogen-ER-Komplex mit bestimmten Koaktivatoren bzw.

Korepressoren und weiteren Transkriptionsfaktoren interagiert und deren Aktivität spezifisch moduliert.<sup>98, 104</sup>

Neben diesem „klassischen genomischen“ Mechanismus der ligandabhängigen ER-Aktivierung und der daraus resultierenden Expression spezifischer Zielgene, existiert noch ein weiterer alternativer Mechanismen, über den Estrogene auf ihre Zielzellen einwirken können. Bei diesem Mechanismus lösen Estrogene sehr schnelle, innerhalb von Sekunden oder Minuten ablaufende extranukleäre Effekte aus. Diese basieren auf der direkten Aktivierung von membranständigen ER durch Estrogene. Verschiedenste intrazelluläre Signalkaskaden können auf diese Weise reguliert werden. Beispiele hierfür sind die Aktivierung von MAP-Kinase- (MAP, engl. mitogen-activated protein) und Phosphatidylinositol 3-Kinasen/Akt-Signalwegen, die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Sekundären Botenstoffen wie cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  sowie die Stimulierung von Wachstumsfaktoren. Die Aktivierung dieser Signalwege erfolgt zelltypspezifisch und führt zu sehr schnellen physiologischen Veränderungen im Zielgewebe.<sup>105</sup>

Auch eine ligandunabhängige Aktivierung der ER z. B. durch Wachstumsfaktoren ist möglich, wenn die Konzentration dieser Wachstumsfaktoren hoch und/oder die Konzentration an endogenem Estrogen niedrig ist (z. B. bei postmenopausalen Frauen oder Männern).<sup>106, 107</sup>



**Abb. 9: Klassischer molekularer Mechanismus des Estrogens und seiner Rezeptoren** (Übernommen und modifiziert aus Gruber *et al.*<sup>98</sup>)

Die Diffusion des Estrogens durch die Zellmembran der Zielzelle und die ligandabhängige Bindung an den Estrogenrezeptor (ER) führt zu dessen Aktivierung. Der ER verändert seine Konformation, diffundiert von seinen Rezeptor-assoziierten Proteinen und transloziert als Estrogen-ER-Komplex in den Zellkern. Dort lagert sich der Komplex an spezifische DNA-Sequenzen (ERE) an und wirkt als Transkriptionsfaktor auf die Expression bestimmter Zielgene ein.

Wie bereits erwähnt existieren zwei ER-Subtypen, die durch unterschiedliche Gene codiert werden und auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Das humane *ESR1*-Gen, das für den ER $\alpha$  codiert, liegt auf Chromosom 6q und wurde 1986 von Green *et al.* das erste Mal kloniert.<sup>108</sup> 1996 beschrieben und klonierten Kuiper *et al.* einen zweiten ER, der in der Prostata und den Ovarien von Ratten exprimiert wird und den sie als ER $\beta$  benannten.<sup>100</sup> Der humane ER $\beta$  wird durch das *ERS2*-Gen codiert, das auf Chromosom 14q lokalisiert ist. Beide ESR-Gene bestehen aus 8 Exons und 7 Introns und besitzen eine ca. 44 %ige Homologie ihrer Aminosäuresequenz. Gemeinsam ist beiden ER-Subtypen, dass sie, wie die meisten nukleären Hormonrezeptoren, aus mehreren Domänen aufgebaut sind, die in A/B, C, D, E, und F unterteilt werden. Die A/B-Region am N-terminalen Ende des Proteins besitzt eine ligandunabhängige transkriptionelle Aktivierungsfunktion (AF1), die promotor- und zellspezifisch ist. Durch die geringe Homologie (<20 %) dieser Region zwischen den Rezeptor-Subtypen hat diese Domäne einen entscheidenden Einfluss auf die subtypenspezifische Aktivierung bestimmter Zielgene.<sup>109</sup> Die zentrale C-Domäne des ER, die in beiden Rezeptor-Subtypen hoch konserviert ist, beinhaltet die DNA-Bindedomäne (DBD). Diese DBD besitzt zwei Zinkfinger-Motive und ist an der spezifischen DNA-Bindung sowie der Rezeptor-Dimerisierung beteiligt.<sup>110</sup> Die D-Region ist wenig konserviert und verbindet die C- mit der E-Domäne. Außerdem ist diese Domäne an der Interaktion des Rezeptors mit Rezeptor-assoziierten Proteinen beteiligt und fördert durch ein nukleäres Lokalisationssignal die nukleäre Translokation.<sup>111</sup> Die E-Domäne enthält die Ligandbindedomäne (LBD) sowie eine hormonabhängige Aktivierungsfunktion (AF2). Eine bedeutende Funktionen dieser Region ist die ligandabhängige Aktivierung des Rezeptors aber auch ihr Einfluss auf die Rezeptor-Dimerisierung.<sup>109</sup> Die F-Domäne, die sich am C-terminalen Ende des ER befindet, weist nur eine sehr geringe Homologie zwischen den Rezeptor-Subtypen auf und besitzt sehr wahrscheinlich ebenfalls einen Einfluss auf die Dimerisierung und die Transkriptionsaktivierung der ER.<sup>112</sup>

Neben diesen beiden ER-Subtypen existiert noch ein dritter, strukturell nicht verwandter ER, der erst vor wenigen Jahren als 7-Helix-Transmembranrezeptor charakterisiert wurde. Dieser sog. G-Protein Rezeptor 30 (GPR30) wirkt über nicht-genomische Signalwege.<sup>113, 114</sup> Da die zelluläre Funktion dieses Rezeptors bis dato noch nicht eindeutig geklärt ist, wird in dieser Arbeit nicht näher auf ihn eingegangen.

Die Transkriptionsaktivität von ER $\alpha$  und ER $\beta$  als auch die daraus resultierende differenzielle Genexpression unterliegt, wie bereits erwähnt, einer ligandabhängigen Regulation. Das



Bindungsverhalten beider ER weist auf Grund der geringen Homologie (ca.55 %) ihrer LBD divergente Struktur-Wirkungsbeziehungen auf. Kuiper *et al.* haben durch *in vitro* Ligandbindungsanalysen bestätigt, dass 17 $\beta$ -Estradiol, das physiologisch prädominante Estrogen, beide ER mit gleicher und hoher Affinität bindet. E1 hingegen besitzt im Vergleich zu E2 eine deutlich moderatere Bindungsstärke und verfügt zudem gegenüber ER $\alpha$  über eine fast doppelt so große Bindungsaffinität als gegenüber ER $\beta$ . Ähnliches gilt für E3, das mit beiden Rezeptoren nur sehr schwach interagiert und eine fast doppelt so hohe Affinität für ER $\beta$  als für ER $\alpha$  besitzt. Die ER-Subtypen binden aber nicht nur endogene Estrogene mit unterschiedlicher Affinität, sondern auch Metaboliten dieser sowie pharmakologische Substanzen, welche die Transkriptionsaktivität der ER spezifisch modulieren können. ER-Agonisten wirken spezifisch und aktivierend auf einen der beiden ER ein, wohingegen ER-Antagonisten, wie beispielsweise Fulvestrant (ICI 182,780), die Aktivierung beider ER-Subtypen hemmen.<sup>98, 104, 115</sup> ER werden allerdings nicht nur ligandabhängig reguliert, sondern auch gewebe- und zelltypspezifisch. ER $\alpha$  wird vor allem im Endometrium, den Thekazellen des Ovars, in Stromazellen der Prostata und in der Hypophyse exprimiert; ER $\beta$  hingegen unter anderem in den Granulosazellen des Ovars, den Epithelzellen der Prostata und im Kolon. Im Uterus, dem Brustgewebe, dem zentralen Nervensystem sowie im kardiovaskulären System werden indessen beide Rezeptor-Subtypen koexprimiert. Die variable Verteilung beider Rezeptor-Subtypen in den verschiedenen Gewebe- und Zelltypen erhöht die Komplexität der Estrogen- und ER-Wirkung um ein Vielfaches, wodurch sich eine differentielle, z. T. nicht redundante physiologische Funktion beider ER erklären lässt.<sup>116</sup>

#### 1.4.2 Protektive kardiovaskuläre Effekte von Estrogenen

Epidemiologische Studien belegen, dass die Inzidenz für CVD altersabhängig zwischen Männern und Frauen divergiert. Vor der Menopause unterliegen Frauen wesentlich seltener einem kardiovaskulären Ereignis als gleichaltrige Männer, jedoch steigt die Prävalenz für CVD nach der Menopause rapide an.<sup>3, 4, 117-119</sup> Eine sehr wahrscheinliche Ursache dessen ist die Depletion von endogenem Estrogen, dem protektive kardiovaskuläre Eigenschaften zugesprochen werden.<sup>120,</sup><sup>121</sup> Eine Vielzahl großer und langjähriger prospektiver Studien, wie die „Nurse Health Study“ Mitte der 1970er Jahre, konnten belegen, dass postmenopausale Frauen, die sich einer Hormonsubstitution (HRT, engl. hormone replacement therapy) mit weiblichen Sexualsteroiden unterzogen, gegenüber unbehandelten Kontrollgruppen ein vermindertes CVD-Risiko

besitzen.<sup>122, 123</sup> Diese Ergebnisse sind jedoch kontrovers zu denjenigen aus randomisierten Kontrollstudien wie die „Heart Oestrogen Progestin Replacement Study“ oder „Women’s Health Initiative“, die einen Anstieg für kardiovaskuläre und thromboembolische Ereignisse durch HRT belegen.<sup>124-126</sup>

Ungeachtet dessen, haben zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen sowohl vasoprotektive als auch kardioprotektive ER-vermittelt Eigenschaften von Estrogenen bestätigt. Innerhalb des Gefäßsystems beeinflussen Estrogene den vaskulären Tonus und wirken strukturellen Umbauprozessen und Entzündungsreaktionen entgegen.

Verschiedene Studien haben belegt, dass E2 einen protektiven Einfluss auf die Inzidenz einer Hypertonie ausübt, da es vasodilatative Eigenschaften besitzt. Zum einen beeinflusst E2 die Bioverfügbarkeit des Vasorelaxans NO.<sup>127</sup> Durch schnelle nicht-genomische Effekte moduliert Estrogen, über den ER $\alpha$ , die eNOS-Aktivität in Endothelzellen.<sup>128, 129</sup> Aber auch über die Expression der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase ist es in der Lage, die NO-Produktion günstig zu beeinflussen.<sup>130-132</sup> Estrogen moduliert überdies auch die Expression der Prostacyclinsynthase, die für die Synthese des Vasorelaxans Prostacyclin entscheidend ist.<sup>133, 134</sup> Ferner supprimiert das Steroidhormon die Expression des Vasokonstriktors Endothelin-1 und entfaltet eine inhibierende Wirkung auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (siehe 1.5.1), indem es die Expression des Angiotensin-konvertierenden Enzyms und des Angiotensinrezeptors 1 (AT<sub>1</sub>) vermindert.<sup>135-138</sup> *In vivo* Experimente an ER $\beta$ -defizienten Mäusen lassen darauf schließen, dass dieser ER-Subtyp eine essentielle Funktion bei der Blutdruckregulation übernimmt, da diese Tiere, im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren, neben einer vaskulären Dysfunktion auch einen arteriellen Hypertonus entwickeln.<sup>132</sup>

Neben der Ausbildung einer Hypertonie, spielen auch vaskuläre Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von CVD. E2 hat hierbei einen günstigen Einfluss, da es die Expression von Entzündungsmediatoren supprimiert und die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in geschädigtes Gewebe unterbindet.<sup>139, 140</sup> *In vitro* Untersuchungen in VSMC haben ferner eine ER-vermittelte Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bestätigt, der die Transkription von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen induziert.<sup>141, 142</sup> Estrogene beeinflussen außerdem das Wachstum von Endothelzellen und VSMC. *In vitro* Experimente konnten bestätigen, dass E2 direkt die Migration und Proliferation von VSMC unterbindet.<sup>143, 144</sup> Dem gegenüber erhöht E2 das Wachstum von Endothelzellen, unterdrückt deren Apoptose und erhöht die lokale Expression des VEGF (engl. vascular endothelial growth factor)<sup>145-147</sup> Auch

eine ER-vermittelte Suppression von vaskulären Umbauprozessen konnte durch *in vivo* Experimente nachgewiesen werden.<sup>148, 149</sup> All diese Estrogenwirkungen besitzen einen entscheidenden Einfluss auf die Reendothelialisierung der Blutgefäße nach vaskulärer Schädigung.<sup>146</sup>

Des Weiteren besitzt das weibliche Sexualsteroid das Potential, Serumlipid-Konzentrationen günstig zu beeinflussen, und hat überdies, indem es auf die Genexpression der entsprechenden Proteine einwirkt, fibrinolytische und antikoagulante Eigenschaften.<sup>120, 150</sup>

ER $\alpha$  und ER $\beta$  werden auch im Herzmuskel exprimiert und besitzen daher die Fähigkeit, in den verschiedenen Zelltypen des Myokards ihre protektiven Wirkungen zu entfalten.<sup>151</sup> Zhai *et al.* haben gezeigt, dass männliche ER $\alpha$ -knockout Mäuse eine schwere Herzschwäche nach Ischämie-Reperfusionsschaden entwickeln.<sup>152</sup> Ferner konnten Pelzer *et al.* in ER $\beta$ -knockout Mäusen belegen, dass diese Tiere, im Vergleich zu wildtypischen Kontrollmäusen, nach experimentellem Myokardinfarkt eine schwere Herzinsuffizienz entwickeln und eine erhöhte Mortalitätsrate aufweisen.<sup>153</sup> Diese Versuche belegen, dass Estrogene und ihre ER-Subtypen eine kritische Rolle bei der Integrität der Herzfunktion spielen. Des Weiteren besitzen Estrogene eine schützende Wirkung hinsichtlich der kardialen Kontraktilität und bezüglich struktureller Umbauprozesse nach Myokardinfarkt.<sup>154</sup> In verschiedenen Tiermodellen mit experimenteller Hypertonie konnte zudem gezeigt werden, dass E2 in der Lage ist, die Entstehung einer Myokardhypertrophie und einer endothelialen Dysfunktion zu vermindern, hämodynamische Funktionen zu verbessern, strukturelle Umbauprozesse abzumildern und positiv auf eine Hypertonie einzuwirken.<sup>155-158</sup> Die molekularen Mechanismen, die hierbei eine Rolle spielen, sind unter anderem eine ER-vermittelte Hemmung der Fibroblastenproliferation, eine verminderte Genexpression der Kollagene I und III sowie eine verminderte Expression der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP 2).<sup>159</sup>

### 1.4.3 Estrogene und oxidativer Stress

Die protektiven kardiovaskulären Effekte von Estrogenen sind, neben den bereits beschriebenen Wirkungen, auch auf antioxidative Effekte dieses Sexualsteroids zurückzuführen. Unter proinflammatorischen Stimuli erfolgt innerhalb der Blutgefäße eine erhöhte O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Generierung, sowohl in Endothelzellen als auch in VSMC. In Folge dessen kommt es durch die Reaktion von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mit NO zu einer vermehrten Generierung von Peroxynitrit, das wiederum

proinflammatorische Wirkungen besitzt.<sup>160</sup> Behl *et al.* postulierten, dass Estrogene auf Grund ihrer Hydroxylgruppe am C<sub>3</sub>-Atom des aromatischen A-Rings, unabhängig von genomischen Mechanismen, eine antioxidative Kapazität besitzen, indem sie O<sub>2</sub><sup>•-</sup> direkt neutralisieren können.<sup>161</sup> Dessen ungeachtet besitzt E2 auch das Potential, direkt auf die Konzentration von Antioxidantien und die Expression antioxidativer Enzyme einzuwirken und ferner die ROS-Generierung durch verschiedene Mechanismen zu unterbinden. So besitzt E2 einen Einfluss auf das antioxidative GRX/GSH System. In der kardialen H9c2 Zelllinie konnte gezeigt werden, dass E2 sowohl die Expression des Enzyms Glutaredoxin als auch die Expression der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der GSH-Synthese, ER-abhängig induziert.<sup>162</sup> Strehlow *et al.* konnten durch *in vitro* Experimente an VSMC der Ratte und an humanen Monozyten einen ER-vermittelten Expressionsanstieg der MnSOD und ecSOD nach Estrogenbehandlung nachweisen. Ferner haben die Autoren durch *in vivo* Untersuchungen an ovariectomierten Mäusen eine erhöhte ROS-Generierung in der Aorta im Vergleich zu den Kontrollmäusen gemessen, die durch Estrogensupplementation signifikant reduziert werden konnte.<sup>163</sup> Ähnliche Befunde existieren auch für ovariectomierte Ratten. Allerdings konnte in diesem Tiermodell gezeigt werden, dass die Gabe von E2 eine verminderte Expression der NADPH Oxidase Untereinheit p47<sup>phox</sup> zur Folge hat.<sup>164</sup> In VSMC der Ratte hat sich zudem gezeigt, dass E2 die ANG II-induzierte NADPH Oxidase-Aktivität und die daraus resultierende ROS-Generierung unterbinden kann. Dies beruht jedoch auf einer zeit- und dosisabhängigen ER-vermittelten Inhibierung der rac 1 GTPase-Proteinexpression.<sup>165</sup> Schließlich konnten Zang *et al.* in einem spontan hypertensiven Rattenmodell die Abnahme der p22<sup>phox</sup>-mRNA nach subkutaner E2-Injektion belegen.<sup>166</sup> Neben diesen Effekten auf die Aktivität der O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-generierenden NADPH Oxidase besitzt E2 zudem einen Einfluss auf die ROS-Generierung durch die Elektronentransportkette der Mitochondrien. Eine chronische *in vivo* Supplementation von E2 bei ovariectomierten Ratten hat nicht nur eine verbesserte oxidative Phosphorylierung zur Folge, sondern auch eine Reduktion der mitochondrialen ROS-Produktion.<sup>167</sup>

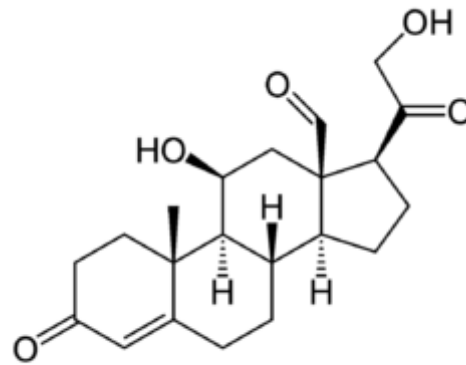
Die antioxidativen Effekte des Estrogens besitzen einen entscheidenden Einfluss auf die Integrität des Gefäßsystems, da sie z. B. die Oxidation von LDL-Cholesterin verhindern und somit der Progression einer Arteriosklerose entgegenwirken können.<sup>168</sup>

## 1.5 Aldosteron (ALDO) und der Mineralocorticoidrezeptor (MR)

### 1.5.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ALDO und der MR

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist eine Kaskade von verschiedenen Hormonen und Enzymen, welche essentiell an der Regulation des arteriellen Blutdrucks beteiligt sind. Das RAAS führt zu einer Erhöhung des Blutvolumens und des Blutdrucks, indem es zum einen direkt die Blutgefäße verengt und zum anderen die Elektrolyt- und Wasserretention in den Nieren und im Kolon induziert. Durch einen Abfall des systemischen Blutdrucks wird im sog. juxtaglomerulären Apparat der Nieren das Enzym Renin freigesetzt. Diese Endopeptidase induziert die Umsetzung des in der Leber synthetisierten Angiotensinogen in das Dekapeptid Angiotensin I. Dieses Prohormon wird anschließend durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE, engl. angiotensin converting enzyme) in ANG II umgewandelt. ACE ist in den Plasmamembranen vieler Zelltypen, wie den glatten Gefäßmuskelzellen der Blutgefäße und den Endothelzellen der Lunge, lokalisiert und vermittelt dadurch direkt am Wirkungsort des ANG II seine Aktivität. ANG II erfüllt bei der Regulation des Blutdrucks verschiedene Funktionen, die es über seine zwei Rezeptor-Subtypen ( $AT_1$  und  $AT_2$ ) vermittelt. Als Vasokonstriktor führt ANG II zu einer Gefäßverengung und wirkt somit direkt auf den vaskulären Tonus ein. In der Hypophyse führt ANG II zu einer vermehrten Freisetzung des antidiuretischen Hormons, das in den Nieren eine vermehrte Resorption von Wasser aus dem Primärharn bewirkt und somit der Konservierung von Wasser dient. Ein weiterer Mechanismus von ANG II in die Stimulation der Proliferation verschiedener Zelltypen im kardiovaskulären System, und nicht zuletzt fördert dieses Oktapeptid die Freisetzung des Hormons Aldosteron (ALDO) aus der Nebennierenrinde.<sup>169</sup>

ALDO ist ein natürliches Steroidhormon, das der Klasse der Mineralocorticoide ( $C_{21}$ -Steroide) angehört. Die Biosynthese von ALDO erfolgt, wie die der Estrogene, ausgehend vom Cholesterin durch Hydroxylierungsreaktionen über die Zwischenstufe Pregnenolon. Progesteron, das wiederum aus Pregnenolon hervorgeht, wird durch Monooxygenasen am  $C_{21}$ -Atom hydroxyliert, wodurch Desoxycorticosteron entsteht. Durch die Oxidation der  $C_{18}$ -Methylgruppe des Desoxycorticosterons zur Aldehydgruppe entsteht schließlich ALDO (Abb. 10).<sup>88, 170</sup>



Aldosteron

**Abb. 10: Strukturformel des Aldosterons**

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Synthese und Sekretion von ALDO in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde und wird durch Plasmakaliumwerte, das Adrenocorticotrope Hormon und das RAAS reguliert.<sup>171</sup>

ALDO bindet als Agonist an Mineralocorticoidrezeptoren (MR) in Epithelzellen der distalen Tubuli der Nieren und des Kolons und induziert die Rückresorption von Natriumionen und Wasser sowie die Sekretion von Kalium und Wasserstoffionen. Auf Grund dessen besitzt ALDO eine herausragende Bedeutung für die Wasser- und Elektrolythomöostase und einen entscheidenden Einfluss bei der Aufrechterhaltung bzw. der Erhöhung des Blutdrucks.<sup>170, 172</sup>

Der MR ist, wie die ER, ein Mitglied der nukleären Hormonrezeptorfamilie und fungiert nach ligandabhängiger Aktivierung als Transkriptionsfaktor.<sup>173</sup> Das *NR3C2*-Gen, das aus 10 Exons besteht, kodiert den humanen MR auf Chromosom 4q.<sup>174</sup> Das MR-Protein besteht aus drei funktionellen Domänen:

- Eine N-terminale Domäne (NTD), die zwei ligandunabhängige Aktivierungsfunktionen (AF1a und AF1b) sowie eine zentrale inhibitorische Region besitzt. Diese Regionen der NTD sind an der Modulation der Transkriptionsaktivität des MR beteiligt, indem sie mit verschiedenen Koregulatoren und Korepressoren der Transkription interagieren.<sup>175</sup>
- Die DNA-Bindedomäne (DBD), die aus zwei Zinkfingermotiven besteht, ist essentiell an der Bindung des Rezeptors an spezifische DNA-Sequenzen in der Promotorregion der Zielgene, den sog. „hormone response elements“ (HRE), beteiligt. Die Fähigkeit des MR mit anderen Steroidhormonrezeptoren, wie z. B. dem Glucocorticoidrezeptor (GR) oder dem Androgenrezeptor (AR) Heterodimere zu formen, erhöht die Komplexität der Transkriptionsregulation.<sup>176</sup>

- Die C-terminale Ligandbindedomäne (LBD) ist spezieübergreifend hoch konserviert (80-97 % Homologie) und besitzt eine ligandabhängige Aktivierungsfunktion (AF2). Die Ligandbindung führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Bindung von diversen Koaktivatoren und Korepressoren der Transkription an die AF2 ermöglicht wird.<sup>177</sup>

In seiner inaktiven Form liegt der MR zytoplasmatisch als Monomer vor und ist an verschiedene Proteine (z. B. Chaperone wie das HSP90 und HSP70) gebunden, die zur Rezeptorstabilisierung beitragen. Nach hormonabhängiger Aktivierung und Konformationsänderung des Rezeptors, dissoziiert dieser von seinen Rezeptor-assoziierten Proteinen ab, formt Homo- oder Heterodimere und transloziert in den Nukleus. Dort interagiert der Hormon-MR-Komplex mit HRE in der Promotorregion der Zielgene und reguliert durch die Bindung von Koaktivatoren bzw. Korepressoren die Transkription dieser Gene.<sup>178</sup> In der Niere und im Kolon führt die Aktivierung des MR zur Expression spezifischer Ionenkanäle. Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) sowie die basolaterale  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  Pumpe sollen nur als Beispiele für ALDO-induzierte Genprodukte genannt werden, die zur Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Wasserhomöostase beitragen.<sup>179</sup>

Neben diesen klassischen genomischen Signalwegen, kann ALDO aber auch über schnelle nicht-genomische Effekte auf seine Zielzellen einwirken. ALDO ist z. B. in der Lage sowohl in den Nieren, im Kolon und in VSMC über sekundäre Botenstoffe und Phosphorylierungskaskaden einen schnellen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sowie einen Anstieg des intrazellulären pH-Wertes zu induzieren. Auch in Kardiomyozyten sind verschiedene rapide Effekte des Aldosterons beschrieben. Diese werden über die Proteinkinase C $\epsilon$  vermittelt und führen zu einer verminderten Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und des  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporters, was zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration führt. Eine Vielzahl dieser Effekte, jedoch nicht alle, sind MR-vermittelt was bis dato die Frage offen lässt, ob noch ein weiterer Rezeptortyp existiert, über den ALDO zumindest seine nicht-genomische Wirkung entfalten kann.<sup>178</sup>

Der MR kann nicht nur durch die Bindung von ALDO aktiviert werden, sondern auch durch Glucocorticoide (Cortisol beim Menschen und Corticosteron beim Nager), die gegenüber ALDO eine vergleichbare Bindungsaffinität für den MR besitzen. Da die Plasmakonzentration der Glucocorticoide ca. 100-1000fach größer ist als die der Mineralocorticoide (physiologische ALDO-Konzentration: 30–160 pg/ml), wird in den Epithelzellen der distalen Tubuli der Nieren,

des Kolons, der Speichel- und Schweißdrüsen daher stets parallel zum MR das Enzym 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ2 (11 $\beta$ -HSD2) koexprimiert. Dieses Enzym metabolisiert biologisch aktives Cortisol (bzw. Corticosteron beim Nager) in sein inaktives 11 $\beta$ -Ketometabolit Cortison (bzw. 11-Desoxycorticosteron) und ermöglicht dadurch die Aktivierung des MR durch ALDO.<sup>170</sup>

Der MR wird nicht nur in den Epithelzellen der Nieren und des Kolons exprimiert, sondern auch in nicht-epithelialen Gewebe- und Zelltypen wie Gehirn, Herz und den Blutgefäßen.<sup>180-182</sup> In diesen nicht-epithelialen Gewebetypen wird das Enzym 11 $\beta$ -HSD2 nicht immer homogen mit dem MR koexprimiert.<sup>172, 183</sup> In glatten Gefäßmuskelzellen und in Endothelzellen des Gefäßsystems wird 11 $\beta$ -HSD2 exprimiert, weshalb ALDO in diesen Zelltypen als primärer Ligand für den MR agiert.<sup>184-186</sup> In Kardiomyozyten hingegen wird 11 $\beta$ -HSD2 nur in geringen Mengen bis gar nicht exprimiert, was dazu führt, dass der MR in diesen Zellen von Glucocorticoiden gebunden wird. Quin *et al.* konnten durch eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von 11 $\beta$ -HSD2 in Mäusen zeigen, dass diese eine kardiale Hypertrophie und Fibrose entwickeln, die durch Epleneron unterbunden werden kann. Diese Untersuchung bestätigt die Hypothese, dass Glucocorticoide die kardiale MR-Aktivierung durch ALDO unterbinden.<sup>187</sup>

Auf die physiologische und vor allem pathophysiologische Bedeutung von ALDO und der MR-Aktivierung soll im Folgenden, speziell im Hinblick auf das kardiovaskuläre System, eingegangen werden

### 1.5.2 ALDO, der MR und kardiovaskuläre Erkrankungen

Zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien sowie *in vitro* Untersuchungen konnten belegen, dass erhöhte ALDO-Serumwerte und/oder eine disproportional erhöhte MR-Aktivierung mit der Inzidenz und Progredienz von CVD, wie Hypertonie, Hypertrophie, vaskulären Dysfunktionen, Arteriosklerose oder Apoplex in einem kausalen Zusammenhang stehen.<sup>188-192</sup>

Bereits 1964 konnten Conn *et al.* zeigen, dass erhöhte ALDO-Serumwerte bei Patienten mit einem Hyperaldosteronismus mit der Ausbildung einer sekundären Hypertonie assoziiert sind.<sup>188</sup> Neuere Studien konnten schließlich bestätigen, dass ein pathologisch erhöhter oder disproportionaler ALDO-Serumspiegel für ca. 10 % aller Formen von Bluthochdruck verantwortlich ist.<sup>189</sup> Durch eine gesteigerte Aktivität des RAAS ist auch bei vielen herzinsuffizienten Patienten ein erhöhter ALDO-Serumwert zu beobachten. Dieser korreliert



wiederum direkt mit der Mortalitätsrate von schwer herzinsuffizienten Patienten, was durch die CONSENSUS-Studie (Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study) aufgezeigt werden konnte.<sup>193, 194</sup>

Ferner spielt auch eine übermäßige MR-Aktivierung, die nicht zwangsläufig mit pathologisch erhöhten ALDO-Konzentrationen assoziiert ist, bei der Pathophysiologie von CVD eine entscheidende Rolle.<sup>195</sup> Dies konnten unter anderem zwei groß angelegte klinische Studien, die RALES (Randomized Aldosterone Evaluation Study) und EPHEsus (Eplerenone Neurohormonal Efficacy and Survival Study) bestätigen, in denen chronisch herzinsuffiziente Patienten neben ihrer konventionellen Therapie zusätzlich mit MR-Antagonisten behandelt wurden. In der RALES-Studie konnte durch die MR-Blockade mittels Spironolacton die Morbiditäts- und Mortalitätsrate der Probanden um 30 % bzw. 35 % gesenkt werden.<sup>196</sup> Auch in der EPHEsus-Studie konnte eine signifikante Verminderung der Mortalitätsrate bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt durch den MR-Antagonisten Eplerenon nachgewiesen werden.<sup>196, 197</sup>

Der Pathomechanismus von ALDO und einer gesteigerten MR-Aktivierung ist nicht nur auf eine exzessive Kochsalz- und Wasserretention und eine damit verbundene Erhöhung des Blutvolumens und des Blutdrucks zurückzuführen, sondern auch auf funktionelle und strukturelle Umbauprozesse im Myokard und den Blutgefäßen auf Grund von inflammatorischen Mechanismen.<sup>170</sup>

Brilla *et al.* konnten durch eine chronische ALDO-Infusion im Rattenmodell, zusätzlich zu einer salzreichen Ernährung, neben der Entstehung einer Hypertonie auch die Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie, eine vermehrte Fibroblastenproliferation und eine erhöhte Kollagensynthese beschreiben, die zu einer interstitiellen und perivaskulären Fibrose im Myokard der Tiere führte.<sup>190-192</sup> Kollagen ist ein wichtiges strukturelles Element im kardiovaskulären System, jedoch führen erhöhte Kollageneinlagerungen und Fibrose zu pathologischen Gewebeveränderungen, welche die Integrität des jeweiligen Organs einschränken. Weitere Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen mit physiologischen ALDO-Serumwerten konnten schließlich belegen, dass diese fibrotischen Veränderungen unabhängig von hämodynamischen Effekten auftreten, und dass eine Blockade des MR diese ALDO-vermittelten Effekte unterbinden kann.<sup>190, 198, 199</sup> Einer Fibrose gehen stets lokale Entzündungsreaktionen voraus, die durch eine Monozyten- und Makrophageninfiltration in das Gewebe charakterisiert sind. Monozyten und Makrophagen fördern zum einen die Proliferation

von Fibroblasten. Zum anderen sezernieren sie inflammatorische Zytokine (z. B. Interleukin 6) und Entzündungsmediatoren wie Cyclooxygenase-2, Osteopontin, MCP-1 (engl. monocyte chemoattractant protein-1) und das intrazelluläre Adhäsionsmolekül 1, die wiederum mit strukturellen Umbauprozessen und Kollagenakkumulationen im entzündeten Gewebe einhergehen.<sup>200, 201</sup> Eine Inhibierung des RAAS sowie ein MR-Antagonismus kann diese pathologischen Prozesse günstig beeinflussen.<sup>191, 202-204</sup>

Obwohl ALDO direkt an kardialen und vaskulären Entzündungsreaktionen beteiligt ist, verstärkt dieses Mineralocorticoid überdies auch die proinflammatorischen Effekte des ANG II. Durch die MR-vermittelte Transkription des vaskulären ACE wird die lokale ANG II-Konzentration erhöht. Dies konnte z. B. in neonatalen Rattenkardiomyozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden.<sup>205, 206</sup> Außerdem fördert die ALDO-induzierte MR-Aktivierung die Expression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten, wodurch es zu einer Wirkungsverstärkung des ANG II kommt.<sup>207-209</sup> Diese Effekte führen wiederum zu einer Verstärkung der pathophysiologischen ANG II-Wirkungen und können als positiver Rückkopplungsmechanismus betrachtet werden, da ANG II letztendlich wieder die Synthese und Sekretion von ALDO induziert.<sup>210</sup>

ALDO supprimiert ferner die Expression der eNOS, wodurch die NO-Bioverfügbarkeit vermindert wird und die Endothel-abhängige Vasorelaxation beeinträchtigt wird.<sup>211</sup> Chun *et al.* konnten einen ähnlichen Effekt in ALDO-behandelten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte beobachten, in denen die iNOS-Expression MR-vermittelt herunterreguliert war.<sup>212</sup> In beiden experimentellen Ansätzen ließ sich dieser Effekt durch MR-Blockade aufheben.<sup>211, 212</sup>

### 1.5.3 ALDO und oxidativer Stress

Das RAAS besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die lokale ROS-Generierung und damit auf die Pathogenese von CVD. Wie bereits beschrieben, fördert ANG II die Aktivierung des O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-generierenden Enzymkomplexes NADPH Oxidase in Monozyten, Makrophagen, im Herz sowie in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen der Blutgefäße.<sup>46, 50, 51, 213</sup> Demgegenüber besitzt auch ALDO das Potential auf die lokale ROS-Generierung einzuwirken und auf diese Weise oxidativen Stress zu induzieren. Dies zum einen indirekt durch die Potenzierung der ANG II-Wirkung, zum anderen direkt durch die Aktivierung und Überexpression der NADPH Oxidase.<sup>207, 210, 214-217</sup> Callera *et al.* haben gezeigt, dass ALDO über nicht-genomische Effekte in

glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte die Aktivität der NADPH Oxidase über die Tyrosinkinase Src induziert und, dass dieser Effekt durch den MR-Antagonisten Epleneron aufgehoben werden kann.<sup>218</sup> Ferner haben mehrere Studien durch *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen eine ALDO/MR-vermittelte Überexpression der NADPH Oxidase Untereinheiten p22<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> (NOX2) und p47<sup>phox</sup> in Monozyten, Makrophagen, im Gefäßsystem und im Myokard nachgewiesen, die durch MR-Blockade unterbunden werden konnten.<sup>49, 219-224</sup> Die ALDO-induzierte NADPH Oxidase-abhängige O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Generierung hat eine Vielzahl von Effekten zur Folge, die sich ungünstig auf die Inzidenz und Progredienz kardiovaskulärer Erkrankungen auswirken. Entzündungsreaktionen und die daraus resultierenden fibrotischen und strukturellen Umbauprozesse im Myokard und den Blutgefäßen sind eine Folge erhöhter ROS-Konzentrationen. Vor allem redoxsensitive Transkriptionsfaktoren, wie der NF-κB oder des Aktivatorprotein 1, spielen hierbei eine entscheidende Rolle, da sie die Expression von Zytokinen und Chemokinen induzieren.<sup>190, 191, 225-228</sup> Ein weiterer pathophysiologischer Effekt ist die Verminderung der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit. Eine MR-Blockade erhöht die NO-Bioverfügbarkeit und verbessert dadurch die eingeschränkte endotheliale Funktion.<sup>229, 230</sup> Nagata *et al.* konnten außerdem demonstrieren, dass ALDO einen inhibitorischen Effekt auf die eNOS-Aktivität besitzt, da es durch die erhöhte ROS-Generierung zur Oxidation des eNOS Kofaktor BH<sub>4</sub> kommt.<sup>224</sup> Auch Bauersachs *et. al* konnten zeigen, dass im Rattenmodell mit experimenteller Herzinsuffizienz eine MR-Blockade mit Spironolacton zusätzlich zu einer Therapie mit einem ACE-Blocker, die vaskuläre O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Generierung reduziert, die eNOS-Expression erhöht und die vaskuläre Relaxation, auf Grund der daraus resultierenden Aufrechterhaltung der NO-Bioverfügbarkeit, abgemildert wird.<sup>230</sup>

Des Weiteren konnte durch *in vitro* Versuche in Kardiomyozyten der Ratte gezeigt werden, dass die Aktivitäten der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9, die eine kritische Rolle bei strukturellen Umbauprozessen des linken Ventrikels spielen, über einen ROS-abhängigen MEK/ERK-Signalweg erhöht werden.<sup>231</sup>

Einen anderen sehr interessanter Befund bezüglich der prooxidativen Wirkung von ALDO haben Leopold *et al.* publiziert. Mittels *in vitro* Experimenten in bovinen Endothelzellen der Aorta und *in vivo* Untersuchungen an Mäusen, konnten sie nachweisen, dass ALDO MR-vermittelt die Expression des antioxidativen Enzyms G6PDH supprimiert. Hieraus resultieren ein erhöhter oxidativer Stress, ein geringerer NO-Level und eine verschlechterte vaskuläre Reaktivität. Diese

Effekte ließen sich sowohl durch Spironolacton als auch durch einen G6PDH-Gentransfer unterbinden.<sup>232</sup>

## 1.6 Ziel dieser Arbeit

Estrogen- und Mineralocorticoidrezeptoren besitzen im kardiovaskulären System antagonistische Funktionen, die sehr wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und damit für die Regulation des Blutdrucks bedeutsam sind.

Arias-Loza *et al.* konnten belegen, dass die Supplementation von E2 zu ovariektomierten AST (engl. aldosterone salt treatment) Ratten den ungünstigen Effekten von ALDO wie Hypertonie, Herzhypertrophie, vaskulärer Fibrose und endothelialer Dysfunktion entgegenwirkt.<sup>158, 233</sup>

Anhand von Angaben aus der Literatur ist ferner bekannt, dass Estrogene im kardiovaskulären System eine antioxidative Wirkung besitzen und dadurch vaskuläre Entzündungsprozesse unterbinden können. ALDO hingegen besitzt durch seine aktivierende Wirkung auf die NADPH Oxidase das Potential, die  $O_2^{\bullet-}$ -Generierung zu erhöhen und damit oxidativen Stress im Herz-Kreislaufsystem zu induzieren.

Auf Grund dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass Estrogene über einen ER-vermittelten Mechanismus dem ALDO-induzierten oxidativen Stress entgegenwirken.

Ziel meiner Arbeit war es daher, diese Hypothese *in vitro* an glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte zu prüfen. Kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen stellen hierfür ein geeignetes und etabliertes System dar, da für beide Steroidhormone bereits zahlreiche Effekte in diesem vaskulären Zelltyp publiziert wurden.

Durch die Supplementation von  $17\beta$ -Estradiol, dem ER $\alpha$ -spezifischen Agonisten  $16\alpha$ -LE2 und dem ER $\beta$ -spezifischen Agonisten  $8\beta$ -VE2 zu ALDO behandelten Zellen sollte zusätzlich untersucht werden, ob die beiden ER-Subtypen redundante, spezifische oder gegensätzliche Effekte bezüglich der aufgestellten Hypothese besitzen.

Mit dieser Arbeit sollten neue Erkenntnisse über die vaskulären Effekte von Estrogenen und Aldosteron gewonnen werden und molekulare Wirkungsmechanismen aufgeklärt werden, die die pathophysiologische Wirkung erhöhter ALDO-Werte hemmen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Firma	Gerätebezeichnung
Autoklav	Systec	V150
Eismaschine	Scotsman	AF200
ELISA-Reader	Tecan	Tecan Spectra
ELISA-Reader	Dynex	Dynex MRX tc
Entwicklermaschine	Protec medical systems	Ecomax
Feinwaage	Sartorius	BP61
Fluoreszenzmikroskop	Keyence	Biozera BZ-8000K
Folienschweissgerät	Clatronic	FS 3261
Folienschweissgerät	Severin	Folio
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr	Economy, öko super
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch	economic
Gefrierschrank (-80°C)	National Lab	Profi Star
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus	Hera freeze
Gefrierschrank (-80°C)	Forma Scientific	-86C Freezer
Heizblock	Eppendorf	ThermoStat plus
Inkubator	Heraeus	Function line
Inkubator	Forma Scientific	Steri-Cult 200
Kühlschrank (4°C)	Siemens	KT14R31, KT14R30
Kühlschrank (4°C)	Liebherr	glass line, Premium, comfort
Lichtmikroskop	Leitz	Labovert
Lichttisch	Universität Würzburg	
Luminometer	Berthold Industries	Lumat LB9501
Magnetrührer	IKA Labortechnik	RH basic2, Ikamag RET, Ikamag RCT
Magnetrührer	Hartenstein	Hotplate Stirrer L-71, Hotplate Stirrer L-81
Photometer	Eppendorf	Bio-Photometer

Power Supply	Biometra	P25, PP4000
Power Supply	Hoefer	SX250
Scanner	Epson	Expression 1600
Schüttler	Hartenstein	L-40,Mini Rocker MR-1
Schüttler	Braun Biotech	Certomat R
Schüttler	Heidolph	Duomax 1030
Sonikator	Julabo	USR 05
Sterilbank	Steril S.p.A.	Antares 72
Vakuumpumpe	KNF	LAB Laboport
Vortexer	LMS	VTX-3000L
Vortexer	Lab 4 you	Bio Vortex V1
Vortexer	Heidolph	Reax 1 D R
Waage	Kern&Sohn	EW2200-2NM
Wasserbad	Haake	Thermo C10
Wasserbad	Inlabo	SW20C
Zentrifuge	Sigma	2K15, Sigma 2-15
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge pico
Zentrifuge	Beckman	GPKR Centrifuge

## 2.2 Verbrauchsmaterial

### 2.2.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial

Die allgemeinen Verbrauchsmaterialien wie z. B. Plastikröhrchen, Zellkulturschalen oder Pipettenspitzen wurden über die Universitätsklinik Würzburg (Medizinische Fakultät, Zentrallager), die Firma A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, Deutschland) oder die Firma Weckert Labor-, Röntgen- und Medizintechnik (Kitzingen, Deutschland) bezogen.

## 2.2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, über die Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg oder über die Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (München, Deutschland) und A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg, Deutschland) bezogen.

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primärantikörper

Primär-Antikörper	Firma	Katalog Nr.	Verdünnung
Mouse monoclonal anti-GAPDH	Chemicon, Schwalbach, Deutschland	MAB374	1:5000 WB
Mouse monoclonal anti-Catalase	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	C0979	1:1000 WB
Mouse monoclonal anti-p67 <sup>phox</sup>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	610912	1:500 WB
Mouse monoclonal anti-p47 <sup>phox</sup>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	610354	1:500 WB
Mouse monoclonal anti-Rac1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	610650	1:500 WB
Rabbit polyclonal anti MnSOD	Millipore, ehemals Upstate, Schwalbach, Deutschland	06-984	1:500 WB
Rabbit polyclonal anti-ER $\alpha$ (MC-20)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-542	1:250 WB 1:25 IHC
Rabbit polyclonal anti-ER $\beta$ (H-150)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-8974	1:200 WB 1:25 IHC
Rabbit polyclonal anti-G6PDH	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	HPA000247	1:2000 WB
Mouse monoclonal anti-Mineralocorticoid Receptor	Abcam, Cambridge, UK	ab 2774	1:250 WB 1:25 IHC
Mouse monoclonal anti-Smooth Muscle Actin, Clone 1A4	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	A2547	1:5000 WB 1:100 IHC

### 2.3.2 Sekundärantikörper

Sekundär-Antikörper	Firma	Katalog Nr.	Verdünnung
Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	A21203	1:200
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	A21202	1:200
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	A21207	1:200
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	A21206	1:200
ECL anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)	GE Healthcare, München, Deutschland	NA931V	1:2000 bei GAPDH 1:5000
ECL anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked F(ab') <sub>2</sub> (from donkey)	GE Healthcare, München, Deutschland	NA9340V	1:2000

### 2.4 Kommerzielle Kits

Kits	Firma	Katalog Nr.
Protein Assay Kit	Bio-Rad, München, Deutschland	500-0006
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München, Deutschland	RPN2106
Superoxid-Dismutase Assay Kit	Cayman Chemical, Michigan, USA	CAY-706002-96
Catalase Assay Kit	Cayman Chemical, Michigan, USA	CAY-707002-96
Glutathione Peroxidase Assay Kit	BioVision Research Products, Mountain View, USA	K762-100
Glutathione Assay Kit	Cayman Chemical, Michigan, USA	CAY-703002
NAD <sup>+</sup> /NADH Quantification Kit	BioVision Research Products, Mountain View, USA	K337-100
NADP <sup>+</sup> /NADPH Quantification Kit	BioVision Research Products, Mountain View, USA	K347-100



## 2.5 Steroidhormone, ER-Agonisten, ER-Antagonist

Hormone, ER-Agonisten, ER-Antagonist	Firma	Katalog Nr.
ALDO	Acros Organics, Geel, Belgien	215360050
17 $\beta$ -Estradiol	Sigma, München	E8875
3.17-dihydroxy-19-nor-17 $\alpha$ -pregna-1,3,5(10)-triene-21,16 $\alpha$ -lactone auch 16 $\alpha$ -LE2 genannt	Schering, Berlin	nicht kommerziell erhältlich
8-vinylestra-1,3,5(10)-triene-3,17 $\beta$ -diol auch 8 $\beta$ -VE2 genannt	Schering, Berlin	nicht kommerziell erhältlich
Fulvestrant (ICI 182,780)	Sigma, München	I4409

## 2.6 Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete primäre Zelllinie PRSMC wurde im Haus aus den Aorten von adulten weiblichen Wistar Ratten (Harlan Winkelmann, Deutschland) isoliert und in den Passagen 5 bis 10 für die beschriebenen Versuche herangezogen.

## 2.7 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.7.1 Puffer, Lösungen und Medien für die Isolation von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Rattenaorta (PRSMC)

- 1x PBS pH 7,4

Inhaltsstoffe	Volumen/ 500 ml	Endkonzentration
1x PBS pH 7,4 (siehe 2.7.2)	498,0 ml	1x
Pen/Strep	1,0 ml	20 U/ml und 0,02 mg/ml
Fungizone Amphotericin B	1,0 ml	0,5 $\mu$ g/ml

- 0,9 %ige NaCl-Lösung für die PRSMC-Isolierung

Inhaltsstoffe	Volumen/ 250 ml	Endkonzentration
Pen/Strep	0,75 ml	30 U/ml und 0,03 mg/ml
Fungizone Amphotericin B	0,75 ml	0,75 µg/ml
0,9 % NaCl-Lösung	ad 250,0 ml	

- Collagenase-Lösung

Inhaltsstoffe	Volumen bzw. Gewicht/ 50 ml	Endkonzentration
Collagenase Typ 2 (Worthington, #46E8823)	0,2 g	920 U/ml
BSA	1,0 g	0,02 g/ml
PBS	ad 50,0 ml	1x
→ steril filtrieren		
Pen/Strep	0,1 ml	20 U/ml und 0,02 mg/ml
Fungizone	0,1 ml	0,5 µg/ml

- Medium

Inhaltsstoffe	Volumen/ 500 ml	Endkonzentration
FCS	75,0 ml	15 %
Pen/Strep	5,0 ml	100 U/ml und 2,5 mg/ml
Fungizone	5,0 ml	2,5 µg/ml
Medium M-199	ad 500,0 ml	1x

## 2.7.2 Zellkultur

- 1x PBS pH 7,4 zum Waschen der Zellen

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 5 l	Endkonzentration
NaCl [58,44]	40,0 g	137 mM
KCl [74,56]	1,0 g	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O [177,99]	7,2 g	8,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [136,09]	1,02 g	1,5 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 5,0 l	

- Wachstumsmedium für PRSMC

Inhaltsstoffe	Volumen/ 500 ml	Endkonzentration
FCS (Biochrom AG # S0615)	50,0 ml	10 %
Pen/Strep	5,0 ml	100 U/ml und 2,5 mg/ml
Fungizone	5,0 ml	2,5 µg/ml
Medium M-199 (Gibco, # 22340 )	ad 500,0 ml	1x

- Behandlungsmedium für PRSMC

Inhaltsstoffe	Volumen/ 500 ml	Endkonzentration
FCS steroidhormonfrei (cc pro # S-15-M)	50,0 ml	10 %
Pen/Strep	5,0 ml	100 U/ml und 2,5 mg/ml
Medium M-199 (Gibco, # 22340 )	ad 500,0 ml	1x

- Stocklösungen der Steroidhormone, ER-Agonisten und des ER-Antagonisten
  - DMSO-Stocklösungen

Komponente (MW [g/mol])	Gewicht/ 1 ml DMSO	Endkonzentration
ALDO [360,45]	5,0 mg	13,87 mM
E2 [272,4]	5,0 mg	18,35 mM
16α-LE2 [328,4]	5,0 mg	15,22 mM
8β-VE2 [298,4]	5,0 mg	16,76 mM
ICI 182,780 [606,7]	5,0 mg	8,24 mM

- Cyclodextrin-Stocklösungen

(2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (Cyclodextrin) (23 mg/ml H<sub>2</sub>O)

Komponente in DMSO (Konz.[mM])	Volumen/ ad 1 ml Cyclodextrin	Endkonzentration
ALDO [13,87]	14,42 µl	0,2 mM
E2 [18,35]	10,9 µl	0,2 mM
16α-LE2 [15,22]	13,1 µl	0,2 mM
8β-VE2 [16,76]	11,9 µl	0,2 mM
ICI 182,780 [8,24]	242,7 µl	2 mM

- PBS-Stocklösungen

Komponente in Cyclodextrin (Konz. [mM])	Volumen/ ad 1 ml 1x PBS	Endkonzentration
ALDO [0,2]	50,0 µl	10 µM
E2 [0,2]	50,0 µl	10 µM
16α-LE2 [0,2]	50,0 µl	10 µM
8β-VE2 [0,2]	50,0 µl	10 µM
ICI 182,780 <sup>4</sup>	500,0 µl	1 mM

- Medien für die Behandlung der PRSMC mit Steroidhormonen, ER-Agonisten und ER-Antagonist

Komponente in 1x PBS (Konz. [µM])	Volumen/ ad 1 ml Behandlungsmedium	Endkonzentration
ALDO [10]	10,0 µl	100 nM
E2 [10]	10,0 µl	100 nM
16α-LE2 [10]	10,0 µl	100 nM
8β-VE2 [10]	10,0 µl	100 nM
ICI 182,780 [1000]	100,0 µl	100 µM

- Einfriermedium

Inhaltsstoffe	Volumen/ 10 ml	Endkonzentration
Wachstumsmedium für PRSMC	6,0 ml	60 %
DMSO	2,0 ml	20 %
FCS (Biochrom AG # S0615)	2,0 ml	20 %

### 2.7.3 Western Blot

- RIPA-Puffer

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Stock-Lsg.	Volumen bzw. Gewicht/100 ml	Endkonzentration
NaCl [58,44]	1,0 M	15,0 ml	150,0 mM
Tris [121,14]	1,0 M	5,0 ml	50,0 mM
PMSF [174,19]	100,0 mM	1,0 ml	1,0 mM
IGEPAL CA-630		1,0 ml	1,0 %
DOC [416,6]	10 %	5,0 ml	0,50 %
SDS [288,38]	10 %	1,0 ml	0,10 %
dH <sub>2</sub> O		ad 100,0 ml	

- 4x Laemmli-Puffer

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 10 ml	Endkonzentration
1 M Tris pH 6,8	2,4 ml	0,24 M
SDS [288,38]	0,8 g	0,08 %
Glycerol [92,1]	4,0 ml	0,4 %
$\beta$ -Mercaptoethanol [78,13]	1,0 ml	0,1 %
Bromphenolblau [669,96]	0,1 ml	0,01 %
dH <sub>2</sub> O	2,8 ml	

- 1,5 M Tris pH 8,8

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
Tris [121,14]	18,15 g	1,5 M
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

- 1,0 M Tris pH 6,8

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
Tris [121,14]	12,0 g	1,0 M
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

- 10 % SDS pH 8,0

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
SDS [288,38]	10,0 g	10,0 %
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

- SDS-Gele

- Trenngel

Inhaltsstoffe	5 %	7,5 %	10 %	12 %	15 %
dH <sub>2</sub> O	11,39 ml	9,69 ml	8,02 ml	6,69 ml	4,69 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Acrylamid/Bis (30 %-Stock)	3,3 ml	5,0 ml	6,67 ml	8,0 ml	100,0 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

- Sammelgel

Inhaltsstoffe	Volumen 10 ml für 2 Gele
dH <sub>2</sub> O	5,65 ml
1,0 M Tris pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
Acrylamid/Bis (30 %-Stock)	1,7 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,01 ml

- 5x PBS pH 7,4

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 5 l	Endkonzentration (5x)	Endkonzentration (1x)
NaCl [58,44]	20,0 g	342,0 mM	68,4 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O [137,99]	11,73 g	85,0 mM	17,0 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [141,96]	41,17 g	290,0 mM	58,0 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 5,0 l		

- 5x Elektrophorese-Puffer pH 8,3

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 5 l	Endkonzentration (5x)	Endkonzentration (1x)
Tris [121,14]	75,0 g	0,62 M	124,0 mM
Glycin [75,07]	360,0 g	4,8 M	960,0 mM
SDS	25,0 g	0,50 %	0,10 %
dH <sub>2</sub> O	ad 5,0 l		

- Transfer-Puffer pH 8,3

Inhaltsstoffe	Stock-Lsg.	Volumen/ 1 l	Endkonzentration
5x Elektrophorese Puffer pH 8,3	5x	200,0 ml	1x
MeOH	100 %	200,0 ml	20,0 %
dH <sub>2</sub> O		ad 1,0 l	

- Waschlösung

Inhaltsstoffe	Stock-Lsg.	Volumen/ 1 l	Endkonzentration
5x PBS pH 7,4	5x	200,0 ml	1x
Tween20	100 %	0,5 ml	0,05 %
dH <sub>2</sub> O		ad 1,0 l	

- Blocklösung

Inhaltsstoffe	Stock-Lsg.	Volumen/ 100 ml	Endkonzentration
5x PBS pH 7,4	5x	20,0 ml	1x
Magermilchpulver		5,0 g	5,0 %
dH <sub>2</sub> O		ad 100,0 ml	

## 2.7.4 Immunhistochemie

- 4 % PFA

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
PFA [30,03 als Monomer]	4,0 g	4,0 %
1x PBS pH 7,4	ad 100,0 ml	

- Permeabilisierungslösung

Inhaltsstoffe	Volumen/ 50 ml	Endkonzentration
Nonidet P40	1,0 ml	2,0 %
1x PBS pH 7,4	ad 50,0 ml	

- Blockierlösung

Inhaltsstoffe	Volumen/ 5 ml	Endkonzentration
Eselserum	0,5 ml	10,0 %
1x PBS pH 7,4	ad 5,0 ml	

- DAPI

Inhaltsstoffe	Volumen/ 50 ml	Endkonzentration
DAPI [10 mg/ml]	0,1 ml	0,2 %
1x PBS pH 7,4	ad 50,0 ml	

### 2.7.5 Puffer für SOD Assay

- HEPES-Puffer pH 7,2

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
HEPES [238,3]	476,6 mg	20 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

- Homogenisierungspuffer

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
EGTA [380,35]	38,03 mg	1 mM
Mannitol [182,17]	3,82 g	210 mM
Sucrose [342,2]	2,39 g	70 mM
20 mM HEPES-Puffer pH 7,2	ad 100,0 ml	

### 2.7.6 Puffer und Lösungen für Katalase Assay

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [174,18]	1,74 g	1 M
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [136,09]	1,36 g	1 M
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

- 50 mM Kaliumphosphat-Lösung pH 7,4

Inhaltsstoffe	Volumen bzw. Gewicht/ 200 ml	Endkonzentration
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lsg.	6,15 ml	30 mM
1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lsg.	3,85 ml	20 mM
dH <sub>2</sub> O	190,0 ml	



- Homogenisierungspuffer pH 7,0

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
EDTA [372,24]	32,22 mg	1 mM
50 mM Kaliumphosphat-Lsg.	ad 100,0 ml	50 mM

### 2.7.7 Puffer und Lösungen für Glutathion Assay

- 50 mM MES-Puffer pH 6,5

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
MES [195,2]	0,976 g	50 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml	

- MES-Puffer

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
EDTA [372,24]	37,22 mg	1 mM
50 mM MES-Puffer pH 6,5	ad 100,0 ml	

- MPA-Lösung

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 50 ml	Endkonzentration
MPA [372,24]	5,0 g	10 %
dH <sub>2</sub> O	ad 50,0 ml	

- TEAM-Reagenz

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 1 ml	Endkonzentration
7,5 M TEAM [149,19]	0,531 ml	4 M
dH <sub>2</sub> O	ad 1,0 ml	

- 2-Vinylpyridin-Lösung

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 1 ml	Endkonzentration
9,26 M 2-Vinylpyridin [105,14]	0,108 ml	1 M
Ethanol	ad 1,0 ml	

### 2.7.8 Puffer und Lösungen für G6PDH Assay

- Tris-HCl-Puffer mit  $\text{MgCl}_2$  pH 7,8

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 1 l	Endkonzentration
TRIS [157,6]	8,67 g	55 mM
$\text{MgCl}_2$ [95,21]	314,2 mg	3,3 mM
$\text{dH}_2\text{O}$	ad 1,0 l	

- Glycin-Puffer

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 1 l	Endkonzentration
Glycin [75,07]	375,0 mg	5 mM
$\text{dH}_2\text{O}$	ad 1,0 l	

- 6 mM  $\text{NADP}^+$

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 10 ml	Endkonzentration
$\text{NADP}^+$ [743,41]	44,6 mg	6 mM
$\text{dH}_2\text{O}$	ad 10,0 ml	

- 100 mM Glukose-6-phosphat

Inhaltsstoffe (MW [g/mol])	Volumen bzw. Gewicht/ 10 ml	Endkonzentration
Glukose-6-phosphat [282,12]	282,12 mg	100 mM
$\text{dH}_2\text{O}$	ad 10,0 ml	

- Glukose-6-phosphat Dehydrogenase-Lösung

Inhaltsstoffe	Volumen bzw. Gewicht/ 1 ml	Endkonzentration
G6PDH [300 U/ml]	0,05 ml	6 U/ml
5mM Glycin-Puffer	ad 1,0 ml	

## 2.8 Software

- Microsoft Office 2003
- Adobe Photoshop 7.0
- SigmaStat 2.03
- MRXe Revelation
- Keyence BZ 8000, BZ image analysis application
- Keyence BZ 8000, BZ observation application
- ScanPack 3.0
- Epson Scan Expression 1600
- easyWIN basic

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolierung und Kultivierung von PRSMC

Die Isolation von PRSMC aus der Aorta von weiblichen Wistar Ratten erfolgte jeweils an 2 mit Avertin euthanasierten Tieren. Nach Herzstillstand erfolgten eine Thorakotomie und die zügige Entfernung des Herzens. Anschließend wurde die Aorta freigelegt und intakt in einem Stück entnommen. Die Aorten wurden in einer 0,9 %igen NaCl-Lsg. von Fett- und Bindegewebe befreit und anschließend dreimal in frischer und eiskalter 0,9 %ige NaCl-Lösung gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt: Die Aorten wurden longitudinal mit einer Schere geöffnet. Nach mechanischer Entfernung der Endothelzellen und der Adventitia mit der Klinge eines Skalpells (hierbei wurden die Aorten von beiden Seiten gründlich abgeschabt) wurden die Aorten in kleine Stücke (<2cm) zerteilt und in 1x PBS dreimal gründlich gewaschen. Die Aortenstücke wurden ein weiteres Mal mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert, bevor sie schließlich in einer Collagenase-Lsg. für 30 min bei geringster Geschwindigkeit auf einem Magnetrührer verdaut wurden. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellüberstand in FCS überführt und die verbleibenden Gewebestücke einem zweiten Collagenaseverdau unterzogen. Die Zellen wurden im Anschluss bei 1000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 5 ml Medium resuspendiert und schließlich auf 2 Wells einer 6 Well Platte ausplattiert. Die Inkubation der adhärenen, primären Zelllinie erfolgte bei 37°C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit einem Mediumwechsel im Zweitagesrhythmus.

Die Kultivierung der frisch isolierten Zellen erfolgte bis zur Semikonfluenz. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen in Zellkulturflaschen passagiert und die Kultivierung in höhere Passagen weiterverfolgt. Hierbei wurden die PRSMC alle 2 Tage mit 1x PBS gewaschen und das Wachstumsmedium erneuert.

Das Zellsplitting erfolgte bei ca. 80-90 %ige Konfluenz. Die Zellen wurden gewaschen, mit 0,05 % Trypsin-EDTA für 10 min bei 37°C enzymatisch vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst und bei 1000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend im Verhältnis 1:3 oder 1:5 auf neue Zellkulturgefäße aufgeteilt.

Die Reinheit der PRSMC-Kultur wurde zum einen lichtmikroskopisch anhand des für glatte Gefäßmuskelzellen typischen „Berg- und Talmusters“ des Zellverbandes verifiziert, zum anderen durch immunhistologische Fluoreszenzfärbungen mit einem monoklonalen anti-Smooth Muscle Actin Antikörper.

### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Um die Zellen für längere Zeit lagern zu können, wurden diese bei -80°C konserviert. Zellen, die 90-100 %ige Konfluenz besaßen, wurden mit 1x PBS gewaschen und durch die Zugabe von 0,05 % Trypsin-EDTA vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 10 min, RT) wurde das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und 1:3 in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden zunächst bei -20°C eingefroren (mehrere Stunden) und anschließend bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff konserviert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese für 30 sec im 37°C Wasserbad erwärmt. Durch Hinzupipettieren von 1 ml Kulturmedium tauten die Zellen vollständig auf. Je nach Verwendungszweck bzw. -zeitpunkt wurden die PRSMC auf eine entsprechende Anzahl Kulturgefäße mit definiertem Mediumvolumen separiert. Nach etwa 24 h waren die Zellen adhärent und das Wachstumsmedium konnte erneuert werden.

### **3.1.3 Hormonbehandlung der PRSMC als primärer Schritt aller Experimente**

Alle nachfolgend beschriebenen Experimente wurden an PRSMC in den Zellpassagen 5-10 durchgeführt, die einer Vorbehandlung mit Hormonen unterzogen waren. Die Zellen wurden in entsprechenden Zellkulturgefäßen (Chamber Slides, 10 cm Schalen) bis zu einer ca. 70 %igen Konfluenz kultiviert und anschließend, nach einem Waschschrift mit 1x PBS, für 48 h mit dem jeweiligen Behandlungsmedium (siehe 2.7.2) inkubiert. Der Zeitraum von 48 h wurde gewählt, um eine eventuelle differentielle Proteinexpression, beeinflusst durch die Hormonbehandlung, zu gewährleisten.

Die PRSMC wurden mit folgenden hormonversetzten Medien behandelt:

- Placebo-Lösung als Kontrolle , enthält keine Steroidhormone (Placebo)
- 100 nM ALDO (ALDO)
- 100 nM ALDO und 100 nM E2 (ALDO+E2)
- 100 nM E2 (E2)
- 100 nM ALDO und 100 nM 16 $\alpha$ -LE2 (ALDO+16 $\alpha$ -LE2)
- 100 nM ALDO und 100nM 8 $\beta$ -VE2 (ALDO+8 $\beta$ -VE2)

In ausgewählten Experimenten wurden die Zellen zusätzlich mit dem ER-Antagonisten ICI 182,780 (ICI) oder dem Reduktionsäquivalent NADPH für 48 h bzw. 3 h inkubiert.

## **3.2 Bestimmung der lokalen ROS-Generierung in hormonbehandelten PRSMC mittels Dihydroethidium (DHE)-Fluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung der DHE-Fluoreszenzintensität**

### **3.2.1 DHE-Fluoreszenzmethode**

Die Bestimmung der intrazellulären ROS-Generierung bzw. O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Generierung wurde *in-situ* mit dem Farbstoff Dihydroethidium (DHE, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) analysiert. DHE ist das reduzierte Derivat von Ethidium, das auf Grund seiner hydrophoben und chemisch neutralen Eigenschaften extra- und intrazelluläre Membranen frei passieren kann.<sup>234</sup> Durch O<sub>2</sub><sup>•-</sup> kann DHE durch eine 2-Elektronen-Oxidation zu Ethidium umgesetzt werden. Ethidium wiederum ist membranimpermeabel und interkaliert auf Grund seiner positiven Ladung in die nukleäre DNA, was eine rote Fluoreszenz der Nuklei zur Folge hat.<sup>235</sup> Die lokale ROS-Generierung der Zellen kann daher durch das rote Fluoreszenzsignal von Ethidium detektiert werden und mühelos von dem blauen und zytosolischen Fluoreszenzsignal von nicht-oxidiertem DHE unterschieden werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die lokale ROS-Generierung von hormonbehandelten PRSMC mittels der DHE-Fluoreszenzmethode untersucht. PRSMC wurden hierzu auf 4 bzw. 8 Well Chamber Slides ausplattiert und für 48 h mit den entsprechenden Hormonen inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das hormonversetzte Medium durch Medium ersetzt, das zusätzlich mit 100  $\mu$ M DHE angereichert war. Die PRSMC wurden anschließend für 30 min

bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit 1x PBS unter verminderter Lichteinstrahlung wurden die Zellen für 10 min mit 4 % PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt (10 min, RT, im Dunkeln). Die Zellen wurden ein weiteres Mal gründlich mit 1x PBS gewaschen und abschließend mit VectaShield Mounting Medium (Vector Laboratories, Oetzberg, Deutschland) eingedeckt. Die Auswertung der DHE-Fluoreszenz und die Fluoreszenzmikrophotographie erfolgte mit einem Fluoreszenz Imaging System (Keyence/Biozero, BZ 8000, BZ observation application, Neu-Isenburg, Deutschland).

### **3.2.2 Quantifizierung der DHE-Fluoreszenzintensität**

Um die DHE-Fluoreszenzintensität quantitativ zu erfassen und eine Aussage über die lokale ROS-Generierung in hormonbehandelten PRSMC treffen zu können, wurde die Pixeldichte von ca. 300 Zellen pro Behandlungsgruppe aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten bestimmt. Die unter identischen Bedingungen aufgenommenen Fluoreszenzmikrophotographien wurden mit Hilfe der BZ Analyzer Software (Keyence/Biozero, BZ 8000, BZ image analysis application, Neu-Isenburg, Deutschland) ausgewertet. Hierbei wurde sowohl die Pixeldichte der DAPI-Fluoreszenz als auch der DHE-Fluoreszenz bestimmt und in ein DHE/DAPI-Verhältnis gebracht. Diese Daten wurden schließlich zu denen der Placebo-Gruppen normalisiert und hierdurch eine relative DHE-Fluoreszenzintensität zur Placebogruppe errechnet.

## **3.3 Proteinanalytische Methoden**

### **3.3.1 Proteinextraktion aus Zellen**

Die Proteinextraktion aus hormonbehandelten PRSMC wurde stets vor allen proteinanalytischen und biochemischen Methoden durchgeführt. Hierbei wurde zuerst das Behandlungsmedium von den Zellen abgenommen und diese 2x mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Ein definiertes Volumen Extraktionspuffer (siehe jeweiliger Abschnitt) wurde auf die Zellen pipettiert, diese mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst, und die Zellsuspension anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die intrazellulär lokalisierten Proteine wurden durch einen Zellaufschluss in Lösung gebracht. Die Zellsuspension

wurde hierzu 8-10mal mit einer Insulinspritze aspiriert und mit Druck zurück durch die dünne Öffnung der Nadel gepresst. Die Suspension wurde durch Zentrifugation (10000 *g*, 15 min, 4°C) in Membranbestandteile und Zellüberstand separiert. Die Proteine blieben im Überstand, der in ein separates Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung konserviert wurde.

### 3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Zelllysate für weitere Analysen verwenden zu können, musste ihre Proteinkonzentration bestimmt werden. Dafür wurde ein 1976 von Bradford etabliertes Verfahren durchgeführt.<sup>236</sup> Zunächst wurden Lösungen mit definierten Proteinmengen von BSA hergestellt. Von jedem dieser Standards und der zu messenden Proben wurde 1 µl zu 799 µl dH<sub>2</sub>O zugegeben und mit 200 µl Bradford-Lösung (Bio-Rad, München, Deutschland) vermischt. Die Lösungen wurden in Küvetten überführt und in einem Photometer, das vorher mit einer Referenz (800 µl Wasser + 200 µl Bradford-Reagenz + 1 µl Extraktionspuffer) geeicht wurde, bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe der BSA-Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

### 3.3.3 Western Blot zur Bestimmung der Proteinexpression

Die differentielle Expression spezifischer Proteine und Enzyme hormonbehandelter PRSMC wurde mittels Western Blot Analysen und entsprechender Antikörpern bestimmt.

Zunächst wurden die Proteine der PRSMC extrahiert, indem die Zellen (10cm Zellkulturschale) in 200 µl RIPA-Puffer, versetzt mit einem Protease Inhibitor Cocktail (1:25 Roche Diagnostics GmbH, Germany), aufgeschlossen wurden.

Nach Bestimmung und Einstellung der Proteinkonzentration wurden die Proteinextrakte mit 4x Laemmli-Puffer (v/v 1:4) versetzt und bei 95°C für 10 min denaturiert. 20-40 µg Gesamtprotein jeder Probe wurden anschließend mittels 10-15 % SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine durch einen elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde nachfolgend für mindestens 2 h in Blocklösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnung in Blocklösung), der spezifisch an das zu



analysierende Protein bindet, erfolgte standardmäßig ÜN bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit 1x PBS/Tween gründlich gewaschen (mind. 5x für je 10 min) und mit einem speziesspezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 2 h bei RT inkubiert.

Nach weiteren Waschschritten (1x PBS/Tween, >3x je 10 min) erfolgte schließlich die Visualisierung des detektierten Proteins durch die ECL-Methode (GE Healthcare), nach Anleitung des Herstellers.

Um sicher zu stellen, dass unterschiedlich starke Proteinbanden tatsächlich aus einer differentiellen Proteinexpression resultieren, wurde bei jeder Membran stets eine Ladekontrolle der Proteinmenge bzgl. des ubiquitär exprimierten Proteins GAPDH durchgeführt. Die densitometrische Analyse der Proteinbanden im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH erfolgte mit der ScanPack 3.0 Software.

### **3.4 Immunhistochemie**

Für die intrazelluläre Detektion und Lokalisierung von spezifischen Proteinen innerhalb der hormonbehandelten PRSMC wurden immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern für das jeweils zu untersuchende Protein durchgeführt.

Hierbei wurden die hormonbehandelten PRSMC (kultiviert in 4 bzw. 8 Well Chamber Slides) nach Beendigung der 48-stündigen Inkubationszeit gründlich mit 1x PBS gewaschen (>2x), um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden im Anschluss mit 4 % PFA (10 min, RT) fixiert und erneut dreimalig mit 1x PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte mit Permeabilisierungslösung (10 min, RT) vor der Blockierung der unspezifischen Antikörperbindungen (Blockierlsg. >1 h, RT). Die Inkubation mit dem Primärantikörper (entsprechende Verdünnung in Blockierlsg.) erfolgte standardmäßig ÜN bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde die Primärantikörperlsg. gründlich abgewaschen (3x mit 1x PBS für mind. je 10 min) und die Zellen mit einem Spezies-spezifischen AlexaFluor gekoppelten Sekundärantikörper (entsprechende Verdünnung in Blockierlsg.) für 3 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper gründlich abgewaschen (3x mit 1x PBS für mind. je 10 min) und die Zellkerne mit DAPI angefärbt (10 min, RT, im Dunkeln). Nach den abschließenden Waschschritten (3x mit 1x PBS für mind. je 10 min) und dem Eindeckeln

der PRSMC mit VectaShield Mounting Medium wurde die immunhistochemische Färbung am Fluoreszenzmikroskop (Biozera BZ-8000K) analysiert.

### 3.5 Biochemische Untersuchungen

#### 3.5.1 Enzymaktivitätsmessung der SOD

Die Bestimmung der SOD-Enzymaktivität in hormonbehandelten PRSMC wurde mit dem Superoxid-Dismutase Assay Kit (Cayman) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Aktivität der zytosolischen und mitochondrialen SOD wurde hierbei indirekt mittels photometrischer Messung bei 450 nm mit dem Dynex MRC ELISA-Reader analysiert. Der Theorie dieses Assays liegt die Generierung eines wasserlöslichen Formazan Farbstoffes aus einem Tetrazoliumsalz in Anwesenheit von  $O_2^{\bullet -}$  zugrunde.  $O_2^{\bullet -}$  wird hierbei durch die Xanthin Oxidase aus molekularem Sauerstoff und Xanthin generiert und katalytisch durch die SOD der zu analysierenden Proben in molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid abgebaut. Die Umwandlung des Tetrazoliumsalzes zum Farbstoff Formazan und die damit assoziierte Absorptionsänderung sind umso geringer, je größer die SOD-Aktivität der Probe ist (Abb. 11). Eine SOD-Standardkurve aus boviner Erythrozyten-SOD bekannter Aktivität wurde für die Kalkulation der SOD-Aktivität in den analysierten Proben herangezogen.

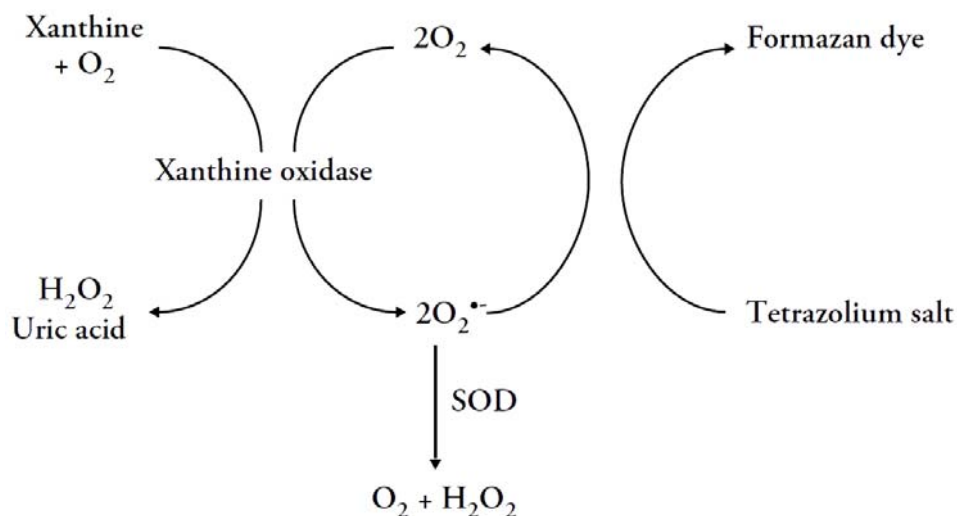


Abb. 11: Schema des Superoxid-Dismutase Assays © Cayman Chemical Company

Vor den eigentlichen Messungen der SOD-Aktivität war es erforderlich, durch Vorversuche die optimale Proteinkonzentration der Proben zu ermitteln, so dass sich die Messergebnisse innerhalb der SOD-Standardkurve befinden. Hierbei ergab sich eine Gesamtproteinmenge von 2,5 µg/Probe. Nach dem Abernten und Aufschließen der Zellen in 100 µl Homogenisierungspuffer wurde die Zellsuspension bei 1500 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt und die Zelllysate auf die ermittelte Proteinkonzentration von 0,25 µg/µl eingestellt. Die Proben wurden bei -80°C bis zur Messung ihrer SOD-Aktivität konserviert. Der Enzymassay sowie die Auswertung der SOD-Aktivität wurden nach Herstellerprotokoll ausgeführt. Die Enzymaktivität wurde in U/ml angegeben, wobei 1U als die Enzymmenge definiert ist, die benötigt wird um 50 % Dismutation des  $O_2^{\bullet-}$ -Radikals zu gewährleisten.

### 3.5.2 Enzymaktivitätsmessung der Katalase

Die Messung der Katalase-Aktivität erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit dem Catalase Assay Kit (Cayman). Der theoretische Hintergrund dieses Assays basiert auf der bifunktionellen Enzymaktivität der Katalase.<sup>72</sup> Das Enzym besitzt neben seiner katalytischen Aktivität, bei der Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff neutralisiert wird ( $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$ ), auch peroxidative Aktivität, indem kurzkettige aliphatische Alkohole, gleichzeitig als Substrat und Protonendonator zusammen mit Wasserstoffperoxid zu Wasser und Aldehyd umgewandelt werden ( $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow A + 2H_2O$ ). In dem hier durchgeführten Assay wird Methanol durch die Aktivität der Katalase in Gegenwart einer optimalen Konzentration von  $H_2O_2$  zu Wasser und Formaldehyd umgewandelt. Das generierte Formaldehyd wiederum bildet in einem zweiten Reaktionsschritt spezifisch mit dem Chromogen Purpald® (4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol) eine heterozyklische Zwischenverbindung, die durch Kaliumperiodat zu einem stabilen, violetten Farbstoff oxidiert wird.<sup>237, 238</sup> Die Generierung des Farbstoffs kann photometrisch nachgewiesen werden und ist direkt proportional zur gebildeten Formaldehydmenge und folglich zur Katalase-Aktivität. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt in Unit ([U] = [nmol/min/ml]) und ist definiert als die Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 nmol Formaldehyd pro Minute bei 25°C zu generieren. Für die Durchführung des Assays wurde vorab die einzusetzende Proteinmenge standardisiert. Hierbei ergab sich eine Gesamtproteinmenge von 5 µg/Probe als optimal. Das Abernten der

hormonbehandelten PRSMC erfolgte in 100 µl Homogenisierungspuffer. Nach dem Aufschließen der Zellen wurden diese bei 10000 *g* für 15 min bei 4°C zentrifugiert, die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt und auf 0,25 µg/µl eingestellt. Die Proteinlysate wurden bis zur Enzymaktivitätsmessung bei -80°C tiefgefroren. Der Assay sowie die Auswertung der Katalase-Aktivität wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die photometrische Bestimmung des generierten Farbstoffes erfolgte mit einem Tecan Spectra ELISA-Reader bei 540 nm.

### 3.5.3 Enzymaktivitätsmessung der GPx

Die Enzymaktivität der Glutathion-Peroxidase wurde mit dem Glutathion Peroxidase Assay Kit (BioVision) durch eine gekoppelte Reaktion mit dem Enzym Glutathion Reduktase (GR) bestimmt. Bei der katalytischen Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Wasser durch die GPx wird GSH zu GSSG oxidiert. GSSG wird durch die GR wiederum zu GSH reduziert, wobei NADPH als Reduktionsmittel dient und dabei selbst zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird.<sup>85</sup> Die Abnahme einer definierten NADPH-Konzentration ist hierbei direkt proportional zur GPx-Aktivität und kann photometrisch als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit bestimmt werden. Durch die Steigung einer NADPH-Standardkurve kann die Veränderung der NADPH-Konzentration in einer definierten Zeitspanne ermittelt werden und folglich die Enzymaktivität der GPx in nmol/min/ml kalkuliert werden. 1 nmol/min/ml = 1 mU/ml ist definiert als diejenige Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µmol NADPH pro Minute bei 25°C zu NADP<sup>+</sup> zu oxidieren. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Zellen wurden jedoch nur mit 100 µl Assay Puffer und einem Zellschaber von den Zellkulturschalen abgelöst. Die in Vorversuchen ermittelte optimale Proteinkonzentration betrug 0,75 µg/µl und die kinetische Bestimmung der Absorptionsänderung erfolgte mit einem Dynex MXR ELISA-Reader über 25 min, bei einer Wellenlänge von 340 nm, in einem Zeitintervall von 1 min.

### 3.5.4 Bestimmung der Glutathion-Konzentration

Die Bestimmung der Glutathion-Konzentration in hormonbehandelten PRSMC erfolgte mit dem Glutathion Assay Kit (Cayman) nach Anleitung des Herstellers. Durch die Quantifizierung der intrazellulären Gesamtglutathionmenge (reduzierte und oxidierte Form) und der Quantifizierung der GSSG-Menge, kann mit Hilfe dieses Assays die Gesamtmenge an reduziertem Glutathion in den Zellen kalkuliert werden.

Die Anwesenheit des Enzyms GR gewährleistet in einem ersten Reaktionsschritt die Reduktion von intrazellulärem GSSG zu GSH unter Verbrauch von NADPH. NADPH wird während des Assays durch die Zugabe von NADP<sup>+</sup> und Glukose-6-phosphat durch die G6PDH generiert. Die Gesamtglutathionmenge der Proben wird schließlich über folgenden Reaktionsweg bestimmt: Die Sulfhydrylgruppe des GSH reagiert mit dem Ellman's Reagenz DTNB (5',5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) zu TNB (2-Nitro-5-Thiobenzoessäure). Bei dieser Reaktion entsteht gleichzeitig ein Disulfid-Zwischenprodukt aus GSH und TNB, das sogenannte GSTNB. GSTNB wiederum wird durch die GR reduziert, wodurch GSH recycelt wird und zusätzlich weiteres TNB entsteht (Abb. 12). Die Rate der TNB-Generierung ist direkt proportional zu dieser Recycling Reaktion und damit wiederum direkt proportional zur gesamt GSH-Konzentration in der zu quantifizierenden Probe. Die TNB-Generierung kann photometrisch bei 405 nm bestimmt werden, und mittels einer Glutathion-Standardkurve kann die Glutathionmenge der analysierten Probe in [µM] kalkuliert werden.

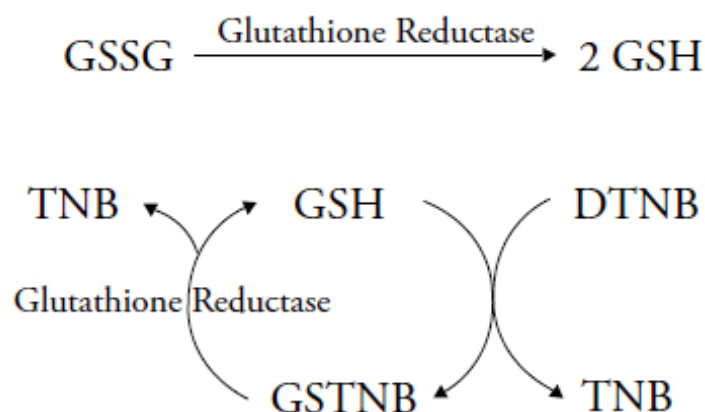


Abb. 12: GSH Recycling ©Cayman Chemical Company

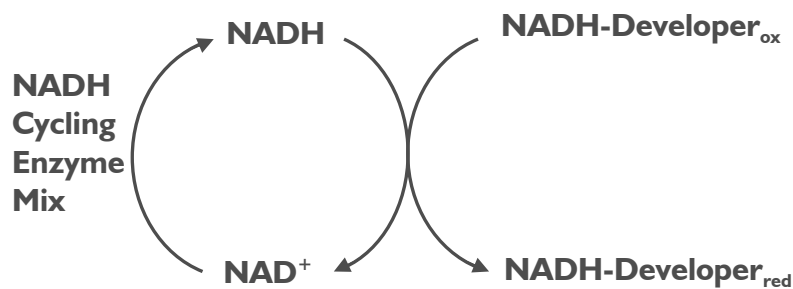
Die Quantifizierung der GSSG-Menge beruht auf demselben theoretischen Hintergrund wie die Quantifizierung der gesamten GSH-Menge, jedoch ist vor der Messung das reduzierte Glutathion mit 2-Vinylpyridin zu derivatisieren, so dass dieses im Reaktionszyklus nicht umgesetzt wird.<sup>239-242</sup>

Die Durchführung des Assays erfolgte mit Proteinlysaten von hormonbehandelten PRSMC nach dem Herstellerprotokoll. Die Zellen (10 cm Zellkulturschalen) wurden mit 200 µl MES-Puffer abgeerntet, aufgeschlossen und bei 10000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert, bevor ihre Proteinkonzentration bestimmt und mit MES-Puffer auf 0,5 µg/µl in einem Gesamtvolumen von 250 µl eingestellt wurde. Die Deproteinierung der Proben erfolgte im Anschluss mit TEAM-Reagenz (v/v 1:1) vor der Separierung der Proben. Die photometrische Bestimmung der Absorption von Standards und Proben erfolgte bei 405 nm mit dem Dynex MXR ELISA-Reader. Die intrazelluläre totale Glutathion-Konzentration bzw. die GSH-Konzentration der Zellen wurde anschließend mit Hilfe der Standardkurve in [µM] kalkuliert.

### 3.5.5 Quantifizierung der totalen NAD-Konzentration

Die Quantifizierung der intrazellulären NAD-Menge (totales NAD; reduziert und oxidiert) in PRSMC erfolgte mit dem NAD<sup>+</sup>/NADH Quantification Assay Kit (BioVision) nach Herstellerprotokoll. Die Theorie dieses Assays basiert auf der enzymatischen Reduktion des in den Proben enthaltenen NAD<sup>+</sup> zu NADH, durch einen für NAD<sup>+</sup> spezifischen „NAD Cycling Enzyme Mix“ (enthaltene Reagenzien und Enzyme vom Hersteller nicht veröffentlicht). Mittels dieser Reaktion wird das gesamte NAD<sup>+</sup> der Proben in NADH überführt, welches in einem nächsten Schritt, durch Hinzufügen des „NADH Developer“ (genaue Angaben zum Reagenz wurden vom Hersteller nicht veröffentlicht), wieder zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wird. Dieser Reaktionszyklus (Abb. 13) wird solange aufrechterhalten, bis er durch Zugabe einer „Stop Solution“ beendet wird. Der „NADH Developer“ dient nicht nur als Oxidationsmittel für NADH, sondern wird bei dieser Reaktion selbst reduziert. Die reduzierte Form des „NADH-Developers“ kann photometrisch bei 450 nm bestimmt werden und ist direkt proportional zur umgesetzten NADH-Menge der Proben.

Nach der Proteinextraktion der hormonbehandelten PRSMC wurde die Proteinkonzentration bestimmt, und auf die in Vorversuchen ermittelte optimale Proteinkonzentration von 2 µg/µl mit „Extraction Buffer“ eingestellt.



**Abb. 13:** Reaktionszyklus des NAD<sup>+</sup>/NADH Quantification Assays

Bis zur Durchführung des Assays wurden die Proben bei -80°C konserviert. Die photometrische Bestimmung der NADH-Standards und Proben erfolgte mit dem Dynex MRX ELISA-Reader bei 450 nm. Die totale NAD-Konzentration der Proben wurde mittels einer NADH-Standardkurve berechnet und in ng/mg Protein angegeben.

### 3.5.6 Quantifizierung der totalen NADP- sowie der NADPH-Konzentration

Die Quantifizierung der totalen NADP-Menge (NADP<sup>+</sup>+NADPH) in hormonbehandelten PRSMC erfolgte mit dem NADP<sup>+</sup>/NADPH Quantification Assay Kit (BioVision) nach Anleitung des Herstellers. Mit diesem Assay wurde ferner auch die NADPH-Menge in behandelten PRSMC bestimmt.

Der Assay basiert auf derselben Methode wie der NAD<sup>+</sup>/NADH Quantification Assay (siehe 3.5.5). Der „NADPH Cycling Enzyme Mix“ sowie der „NADPH Developer“ in diesem Assay sind jedoch spezifisch für NADPH.

Für die Quantifizierung der NADPH-Menge mussten die entsprechenden Proben für 30 min bei 60°C inkubiert werden, wodurch es zu einem Zerfall des NADP<sup>+</sup> der Zellen kam und aus diesem Grund ausschließlich NADPH gemessen werden konnte.

Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerprotokoll mit 0,5 µg/µl Protein. Die photometrische Bestimmung der NADPH-Konzentration erfolgte bei 450 nm mit dem Dynex MRX ELISA-Reader und die NADP- bzw. NADPH-Konzentrationen der Zellen wurden in ng/mg Protein errechnet.

### 3.5.7 Enzymaktivitätsmessung der G6PDH

Die in dieser Arbeit durchgeführte Enzymaktivitätsmessung der Glukose-6-phosphat Dehydrogenase basiert auf der Anleitung nach Worthington.<sup>243</sup> Bei der durch die G6PDH katalysierten Reaktion von Glukose-6-phosphat und  $\text{NADP}^+$  zu 6-Phosphoglucono- $\delta$ -lacton und NADPH umgewandelt. Das hierbei generierte NADPH lässt sich photometrisch bei 340 nm bestimmen und ist direkt proportional zur G6PDH-Aktivität.

Hormonbehandelte PRSMC (10cm Schalen) wurden nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem 1x PBS mit 2 ml 0,05 %igem Trypsin-EDTA enzymatisch vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst. Durch Zugabe von 4 ml kaltem Behandlungsmedium wurde die Reaktion abgestoppt, die Zellen in ein Falcon überführt und bei 2000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss mit 1 ml 1x PBS gewaschen, ein weiteres Mal zentrifugiert (15000 g, 10 min, 4°C) und schließlich in 100  $\mu\text{l}$  Glycin-Puffer resuspendiert. Nach dem Aufschließen der Zellen und der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde diese auf 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt. Ein Reaktionsansatz bestehend aus 270  $\mu\text{l}$  Tris-HCl-Puffer, 10  $\mu\text{l}$  100 mM Glukose-6-phosphat und 10  $\mu\text{l}$  6 mM  $\text{NADP}^+$  wurde in eine 96 Well Platte vorgelegt und bei 30°C für 7-8 min inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  (40  $\mu\text{g}$ ) der jeweiligen Probe hinzu pipettiert und die Absorptionsänderung der Probe photometrisch bei 340 nm über einen Zeitraum von 15 min bei 37°C in einem Zeitintervall von 1 min mit dem Dynex MRX ELISA-Reader bestimmt. Die Absorptionsänderung pro Minute konnte anschließend berechnet und mit der Formel

$$U/mg = \frac{\Delta A_{340}/min}{6,22 \times mg \text{ Enzym} / ml \text{ Reaktionsansatz}}$$

die Enzymaktivität der G6PDH kalkuliert werden.

Um sicherzustellen, dass die gemessenen Werte tatsächlich spezifisch für die G6PDH sind, wurde bei jeder Messung stets eine Positivkontrolle (6 U/ml Glukose-6-phosphat Dehydrogenase aus *S. cerevisiae*) anstelle der Probe eingesetzt. Außerdem wurde durch Zugabe von 100 mM 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzen, ein irreversibler Inhibitor der G6PDH,<sup>244</sup> die Inhibierung des Enzyms in jeder Probe nachgewiesen.



### 3.6 Statistische Auswertung

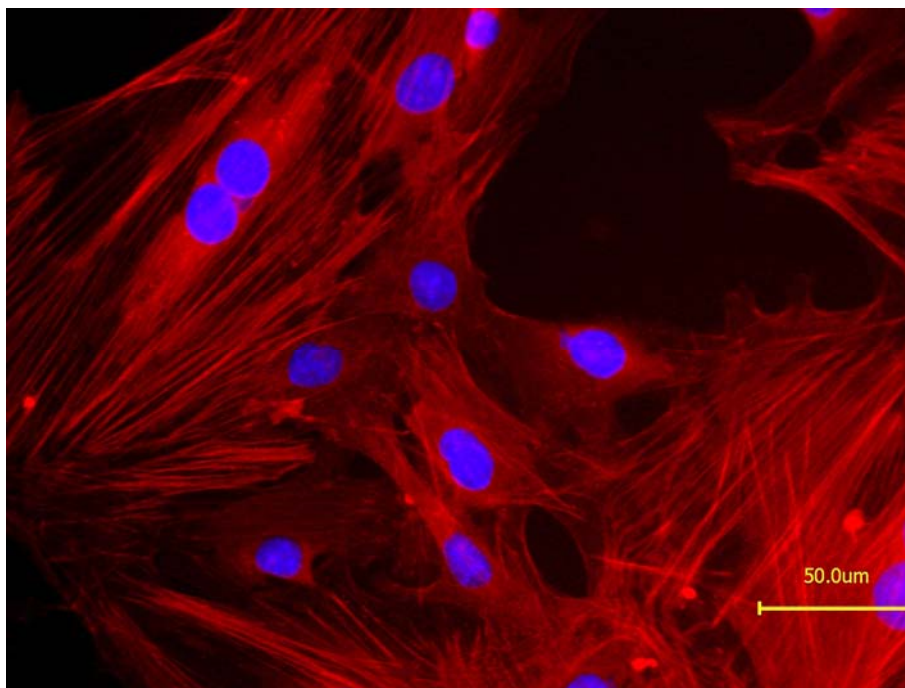
Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM, engl. standard error of the mean) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe der SigmaStat 2.03 Software durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (One Way ANOVA) von 3 oder mehr unabhängigen Datengruppen mit nachfolgendem Post hoc-Test, bei dem alle Gruppen paarweise miteinander verglichen wurden (Student-Newman-Keuls-Test).

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $*p < 0,05$  und  $**p < 0,001$  wurde als signifikant erachtet.

## 4 Ergebnisse

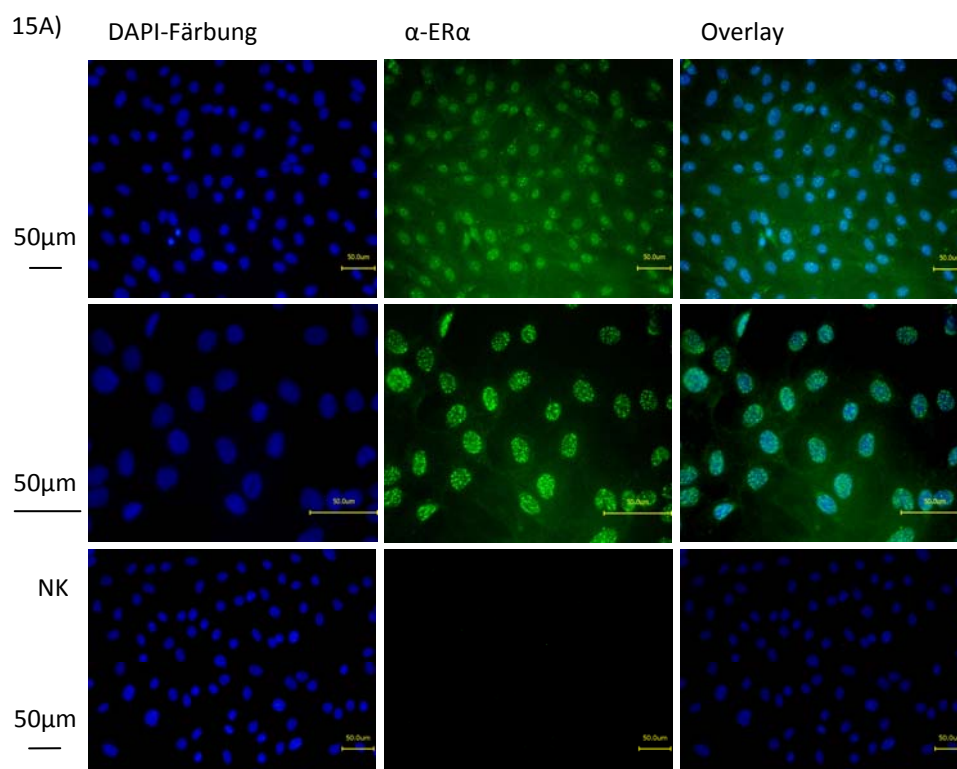
### 4.1 Isolation von PRSMC und Nachweis der ER $\alpha$ -, ER $\beta$ - und MR-Proteinexpression

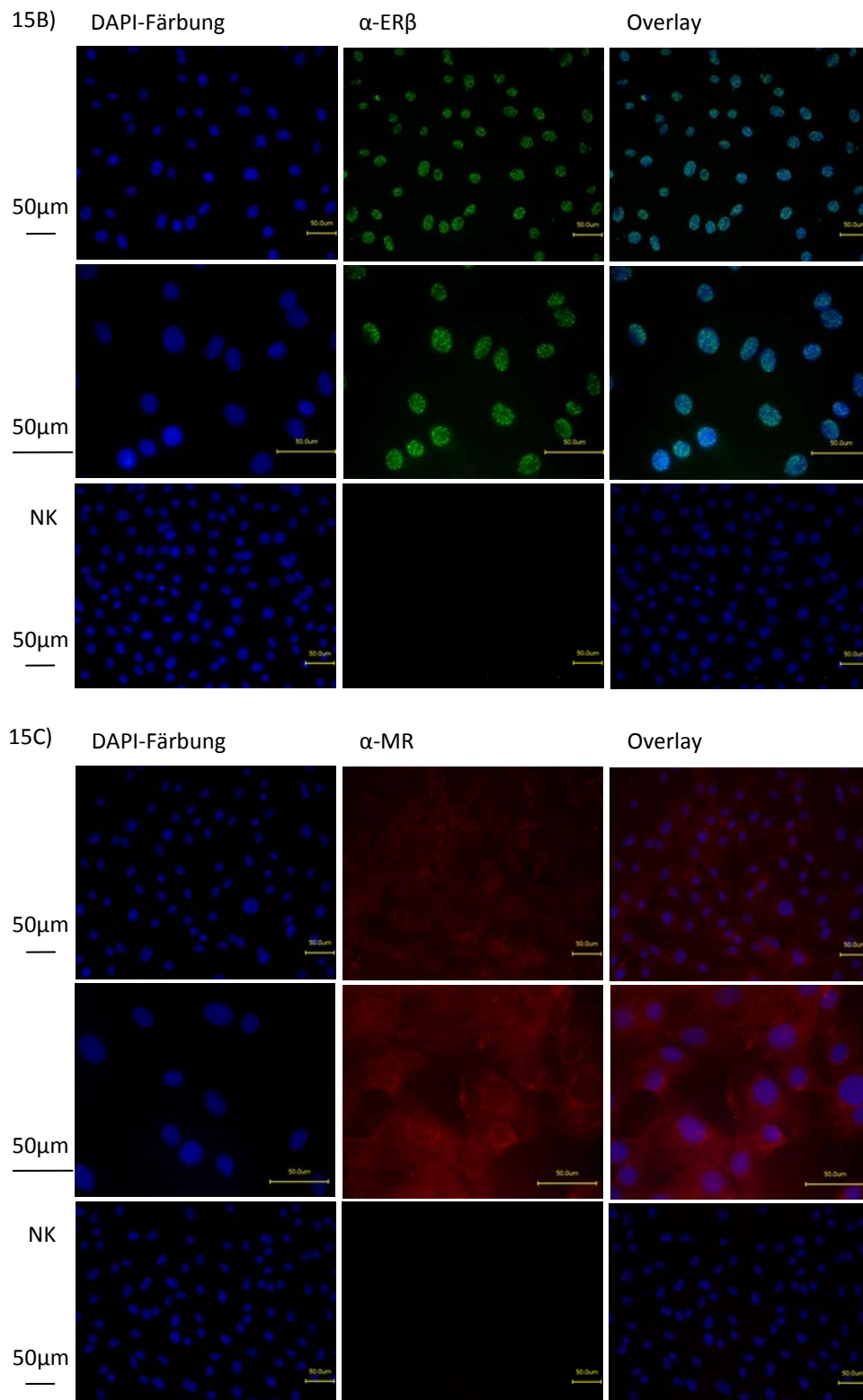
Alle Experimente dieser Arbeit wurden an PRSMC durchgeführt. In einem ersten Schritt dieses Projekts wurde daher ein standardisiertes Modell zur Isolierung und Kultivierung von PRSMC erfolgreich etabliert. Der Reinheitsgrad der hierbei gewonnenen Kulturen war >95%. Immunhistochemische Färbungen der Zellen (Abb. 14) mit einem Primärantikörper gegen das in glatten Gefäßmuskelzellen spezifische Protein des Zytoskeletts,  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ SMA), bestätigten die  $\alpha$ SMA-Expression in nahezu allen Zellen, wodurch eine Kontamination mit anderen Zelltypen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, auszuschließen war. Die Zellzahl und das Zellvolumen war zwischen der 4. und 12. Zellpassage konstant und frühestens ab Zellpassage 14 zeigten sich phänotypische Veränderungen der Zellmorphologie.



**Abb. 14:** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Färbung in PRSMC. PRSMC wurden mit  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (rot) angefärbt, blau: DAPI-Färbung der Zellkerne.

Mit spezifischen Antikörpern wurde ferner mittels Western Blot Analysen und immunhistochemischen Färbungen die Expression der beiden ER-Subtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  sowie des MR in PRSMC nachgewiesen. In Abb. 15 sind für jeden Rezeptortyp repräsentative mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen zusammengestellt, die die Proteinexpression der Rezeptoren in der etablierten Zelllinie belegen und ihre intrazelluläre Lokalisation darstellen. Der ER $\alpha$  (Abb. 15A) konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus der Zellen nachgewiesen werden. Der ER $\beta$  (Abb. 15B) konnte, basierend auf einer schwachen Bindungsaffinität des Antikörpers, lediglich im Nukleus detektiert werden, obwohl dieser Rezeptor auch zytoplasmatisch lokalisiert sein sollte. Auch für den MR (Abb. 15C) konnte nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden, das seine intrazelluläre Lokalisation zytoplasmatisch und innerhalb des perinukleären Bereichs nachwies und nicht, wie erwartet, auch im Nukleus. Die hier beschriebenen Befunde boten dennoch, auf Grund der Expression aller drei Rezeptortypen in den PRSMC, die Grundvoraussetzung für die Durchführung des Projekts. Alle nachfolgend beschriebenen Ergebnisse wurden *in vitro* an PRSMC zwischen der 5. und 10. Zellpassage gewonnen.





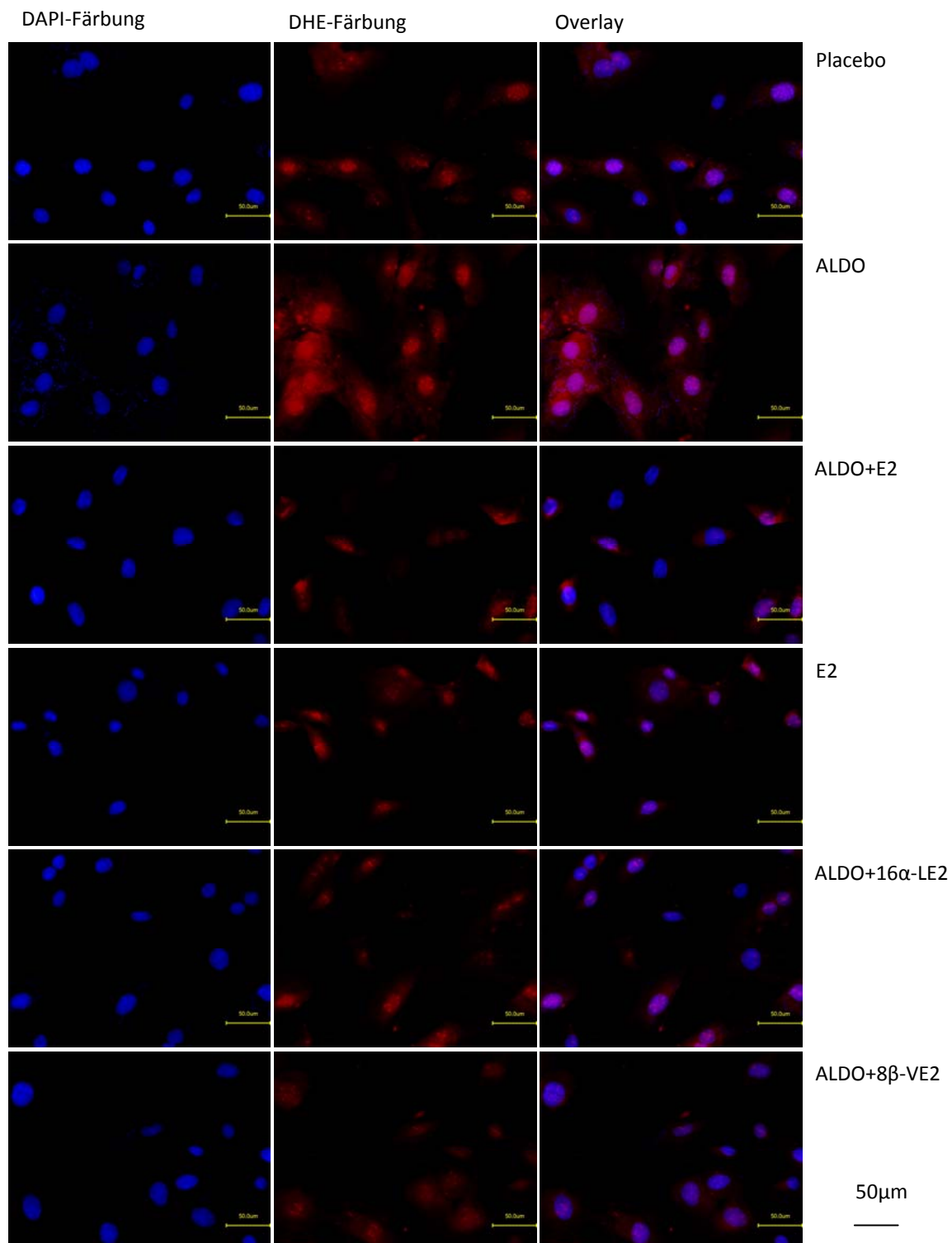
**Abb. 15: Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der immunhistochemischen Färbung von PRSMC gegen ER $\alpha$ , ER $\beta$  und den MR**

A) anti-ER $\alpha$ -Färbung: grün: spezifische Färbung des ER $\alpha$ . Die intrazelluläre Lokalisation des ER $\alpha$  ist sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär zu erkennen. blau: DAPI-Färbung der Zellkerne; In der Negativkontrolle (NK) war keine Autofluoreszenz der PRSMC zu detektieren. B) anti-ER $\beta$ -Färbung: grün: spezifische Färbung des ER $\beta$ . blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. Die Lokalisation des ER $\beta$  ist, auf Grund des schwachen Fluoreszenzsignals, lediglich im Nucleus zu erkennen. C) anti-MR-Färbung: rot: MR innerhalb der PRSMC. blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. Die Detektion des MR ergab nur ein schwaches Fluoreszenzsignal des MR, so dass seine Lokalisation vorwiegend zytoplasmatisch und perinukleär detektiert werden konnte.

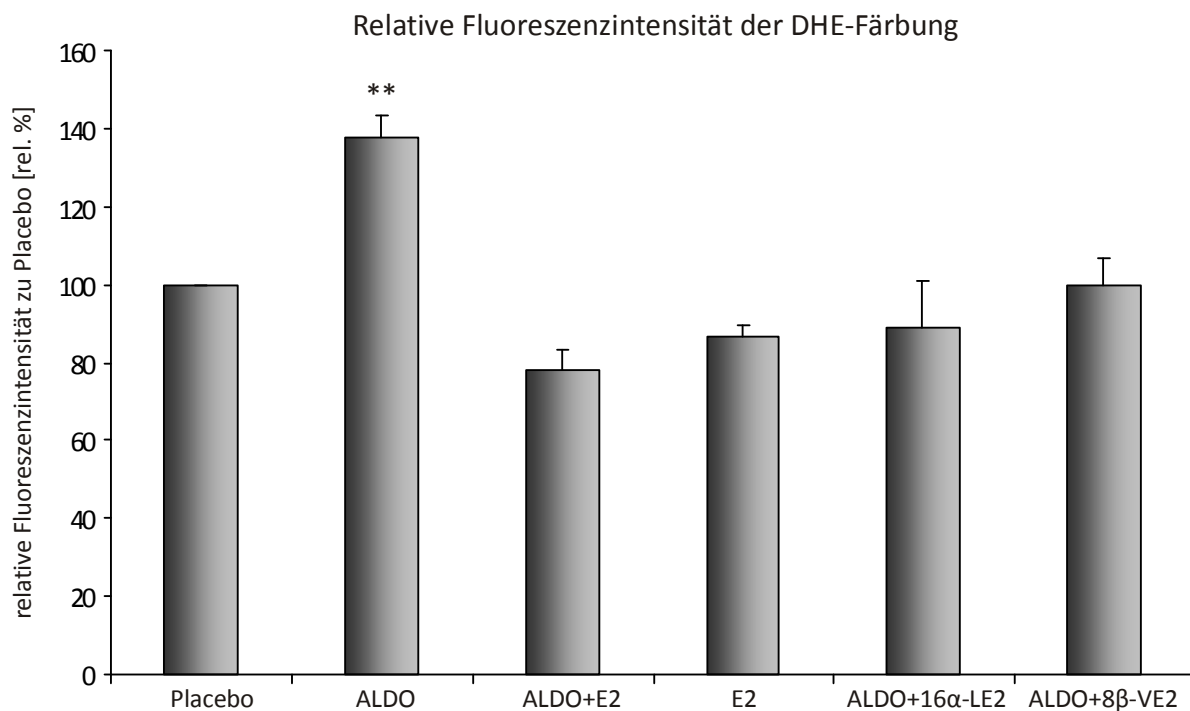
## 4.2 Reduktion der ALDO-induzierten lokalen ROS-Generierung durch Estrogene

Zur Überprüfung der Hypothese, ob Estrogene der lokalen ALDO-induzierten ROS-Generierung in glatten Gefäßmuskelzellen entgegenwirken, wurden PRSMC für 48 h mit Placebo-Lösung, 100 nM ALDO (ALDO), 100 nM ALDO und 100 nM E2 (ALDO+E2), 100 nM E2 (E2), 100 nM ALDO und 100 nM 16 $\alpha$ -LE2 (ALDO+16 $\alpha$ -LE2) sowie 100 nM ALDO und 100 nM 8 $\beta$ -VE2 (ALDO+8 $\beta$ -VE2) inkubiert. Die supra-physiologischen Konzentrationen von 100nM für die angegebenen Liganden, wurden auf Grund von Referenzwerten aus der Literatur gewählt, bei denen für die Hormone ein kausaler Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung bestand.<sup>163, 245</sup> Die ROS-Generierung in hormonbehandelten PRSMC wurde im Anschluss mittels DHE-Fluoreszenzmikroskopie untersucht und quantifiziert. In Abb. 16 sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der DHE-Färbungen zusammengestellt. Anhand der Oxidation des DHE (rot) war deutlich zu erkennen, dass ALDO-behandelte Zellen im Vergleich zur Placebo-Gruppe eine erhöhte O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Generierung und damit einen erhöhten oxidativen Stress aufwiesen. Die Kosupplementation von E2 zu ALDO-behandelten Zellen hatte hingegen eine wesentlich geringere DHE-Oxidation zur Folge. Dies belegt anschaulich, dass E2 einen Effekt bezüglich der O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Produktion in ALDO-behandelten Zellen besitzt. Auch die spezifischen ER-Agonisten 16 $\alpha$ -LE2 und 8 $\beta$ -VE2 besaßen das Potential der lokalen ALDO-induzierten ROS-Generierung entgegenzuwirken und zeigten, ähnlich wie Placebo-, ALDO+E2- und E2-inkubierte Zellen, nur eine geringe lokale O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Produktion. Die Quantifizierung der DHE-Fluoreszenzintensität von 4 unabhängigen Versuchen (Abb. 17) ergab schließlich, dass die Behandlung der PRSMC mit ALDO (137,37 $\pm$ 6,22 rel. %; n=4; p<0,001) eine signifikant erhöhte ROS-Generierung im Vergleich zur Placebo-Gruppe (100 rel. %; n=4) zur Folge hatte. Die Kosupplementation von E2 zu ALDO-behandelten Zellen (78,21 $\pm$ 4,71 rel. %; n=4) führte zu einer signifikanten Verminderung der lokalen ROS-Generierung, die geringer war als die der Placebo-Gruppe, und in etwa der O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Generierung von nur mit E2-inkubierten Zellen (86,72 $\pm$ 2,64 rel. %; n=4) entsprach. Auch die quantitative Auswertung von ALDO+16 $\alpha$ -LE2-behandelten (89,12 $\pm$ 11,86 rel. %; n=4) und ALDO+8 $\beta$ -VE2-behandelten PRSMC (99,69 $\pm$ 6,93 rel. %; n=4) ergab, dass sowohl der ER $\alpha$ -spezifische als auch der ER $\beta$ -spezifische Agonist den ALDO-induzierten oxidativen Stress signifikant unterbinden konnte.

Durch die Ergebnisse dieser ersten Versuche wurde bestätigt, dass Estrogene das Potential besitzen, dem in PRSMC durch ALDO-induzierten oxidativen Stress entgegenzuwirken.



**Abb. 16: Repräsentative Bilder einer DHE-Fluoreszenzfärbung von placebo- und hormonbehandelten PRSMC**  
PRSMC wurden für 48 h mit Placebo, und je 100 nM ALDO, ALDO+ E2, E2, ALDO+16α-LE2 und ALDO+8β-VE2 behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min mit 100 µM DHE inkubiert, gewaschen, fixiert, DAPI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop auf die DHE-Fluoreszenzintensität untersucht. blau: DAPI-Färbung der Zellkerne; rot: Oxidiertes DHE innerhalb der PRSMC.

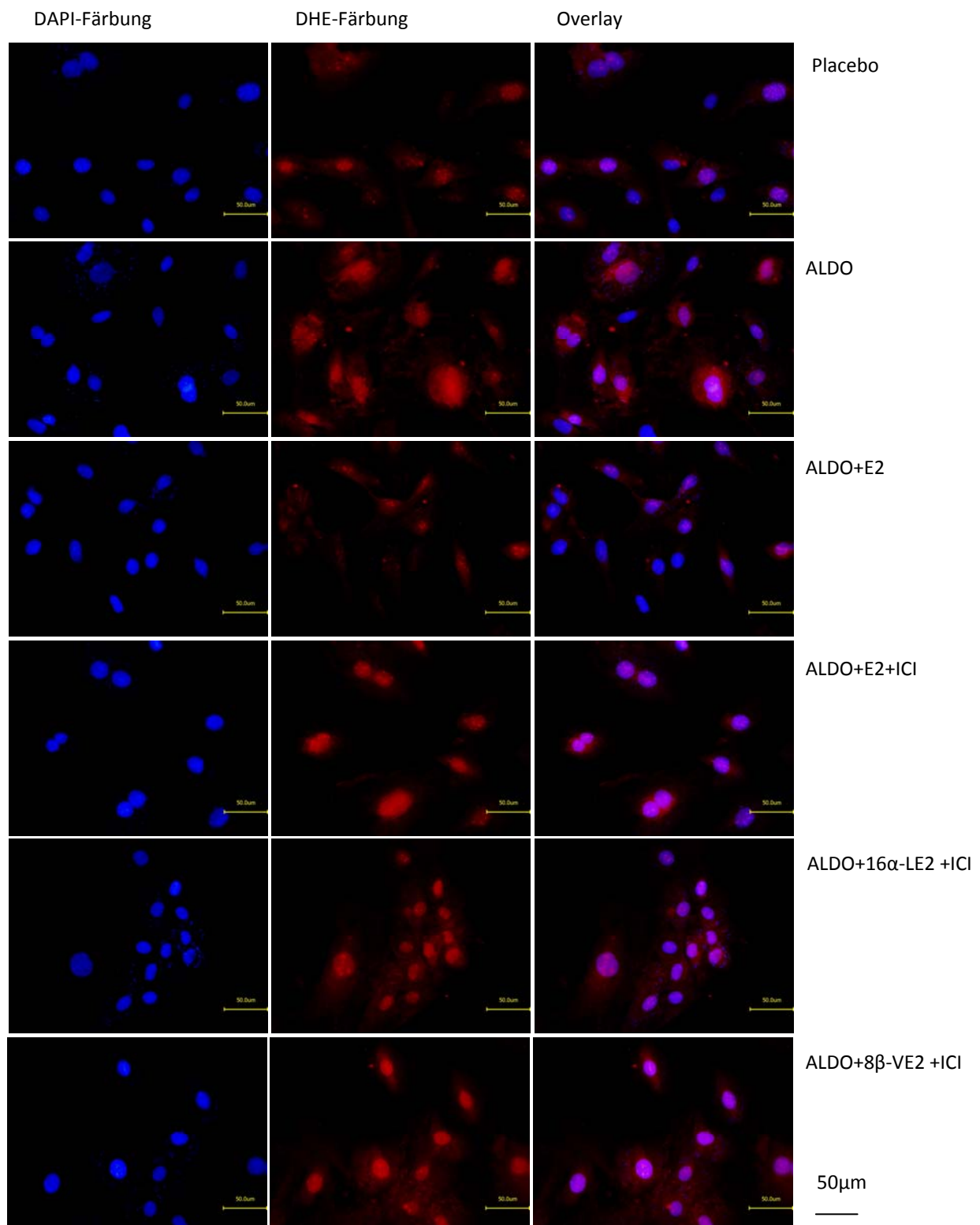


**Abb. 17: Quantifizierung der relativen DHE-Fluoreszenzintensität**

Die DHE-Fluoreszenzintensität wurde relativ zu der DHE-Fluoreszenzintensität von Placebo bestimmt. MW±SEM in relativen Prozent [rel. %] aus n=4 unabhängigen Versuchen.

\*\*p<0,001 ALDO (137,37±6,22 rel. %; n=4) vs. Placebo (100 rel. %; n=4), ALDO+E2 (78,21±4,71 rel. %; n=4), E2 (86,72±2,64 rel. %; n=4), ALDO+16α-LE2 (89,12± 11,86 rel. %; n=4) und ALDO+8β-VE2 (99,69±6,93 rel. %; n=4).

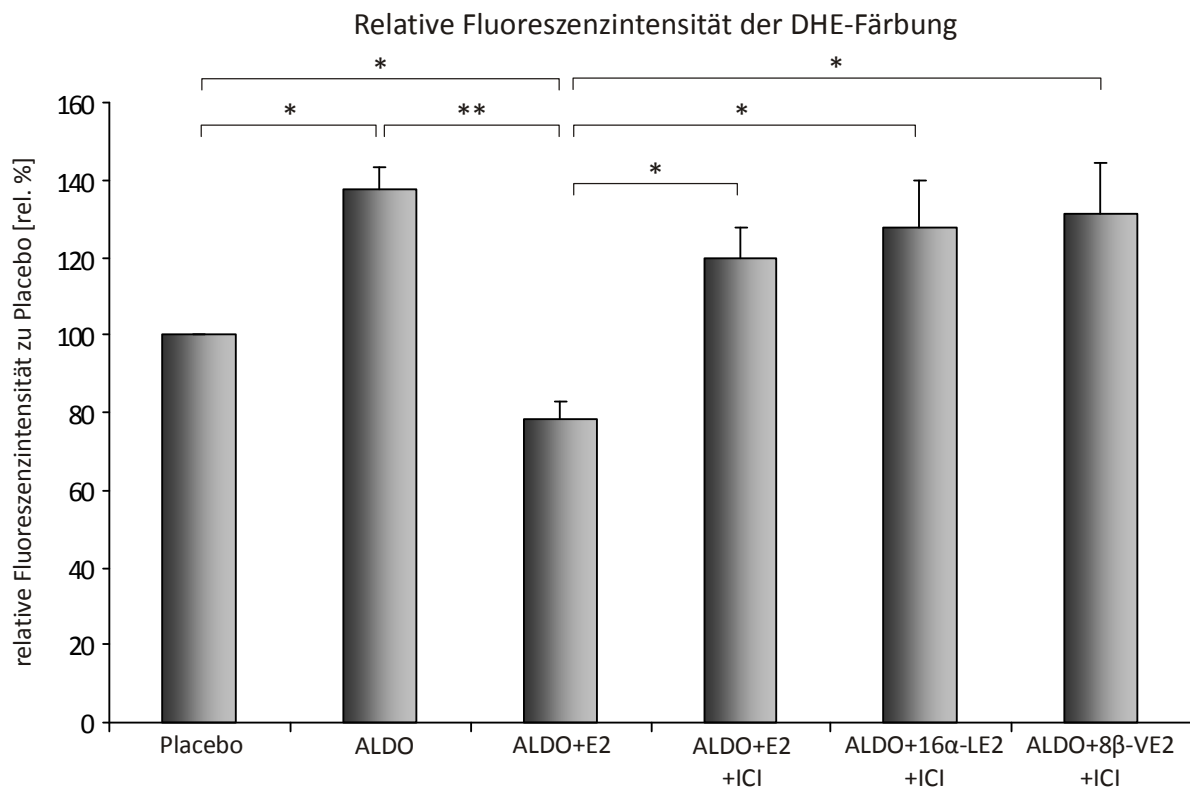
Im Anschluss an diese Versuche sollte überdies die Frage geklärt werden, ob die beobachteten und gemessenen Effekte der Estrogene ER-vermittelt sind. Aus diesem Grund wurden ALDO+E2-, ALDO+16α-LE2- und ALDO+8β-VE2-behandelte PRSMC zusätzlich für 48 h mit 100 μM des ER-spezifischen Antagonisten ICI 182,780 (ICI) inkubiert. Die DHE-Färbungen (Abb. 18) sowie die Quantifizierung der relativen DHE-Fluoreszenzintensität (Abb. 19) der einzelnen Behandlungsgruppen konnten den Nachweis erbringen, dass eine ER-Blockade durch ICI zu einer signifikant erhöhten ROS-Generierung in ALDO+E2+ICI- (119,67±8,54 rel. %, n=3; p<0,05), ALDO+16α-LE2+ICI- (128,0±11,84 rel. %, n=3; p<0,05) und ALDO+8β-VE2+ICI-behandelten Zellen (131,0±13,12 rel. %, n=3; p<0,05), im Vergleich zur ALDO+E2-Gruppe (78,21±4,71 rel. %, n=4), führte. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in den Zellen, die zusätzlich mit ICI behandelt waren, entsprachen in etwa den kalkulierten Werten von ALDO-behandelten Zellen (137,37±6,22 rel. %, n=4). Infolgedessen konnte bestätigt werden, dass die Wirkung von E2, 16α-LE2 und 8β-VE2 auf die ALDO-induzierte ROS-Generierung ER-vermittelt ist.



**Abb. 18: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DHE-Färbung von PRSMC, die zusätzlich zu ihrer jeweiligen Hormonbehandlung mit dem ER-spezifischen Antagonisten ICI inkubiert waren**

PRSMC wurden für 48 h mit Placebo, 100 nM ALDO, ALDO+E2 (je 100 nM), ALDO+E2 (je 100 nM) + 100 µM ICI, ALDO+16α-LE2 (je 100 nM) + 100 µM ICI und ALDO+8β-VE2 (je 100 nM) + 100 µM ICI behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 100 µM DHE inkubiert, gewaschen, fixiert, DAPI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop auf die DHE-Fluoreszenzintensität analysiert. blau: DAPI-Färbung der Zellkerne, rot: Oxidiertes DHE innerhalb der PRSMC.





**Abb. 19: Quantifizierung der relativen DHE-Fluoreszenzintensität von hormonbehandelten PRSMC, die zusätzlich mit ICI inkubiert waren**

Die DHE-Fluoreszenzintensität von PRSMC, die neben den Steroidhormonen zusätzlich mit dem ER-spezifischen Antagonisten ICI behandelt waren, wurde relativ zu der DHE-Fluoreszenzintensität von Placebo-behandelten Zellen bestimmt. MW±SEM in relativen Prozent [rel. %] aus n=3-4 unabhängigen Versuchen.

\*\*p<0,001 ALDO (137,37±6,22 rel. %; n=4) vs. ALDO+E2 (78,21±4,71 rel. %; n=4).

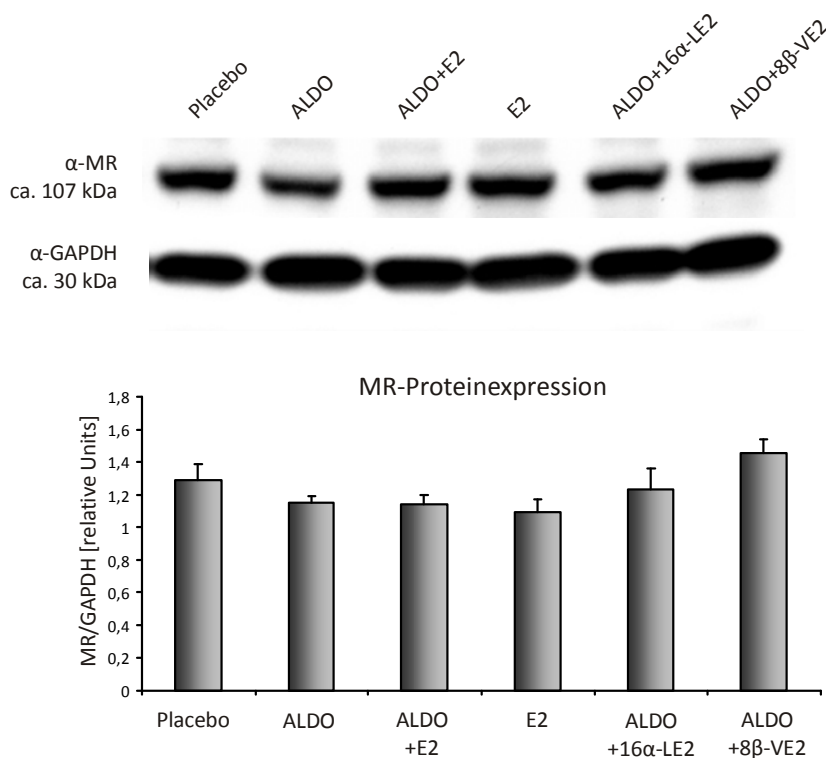
\*p<0,05 ALDO vs. Placebo (100 rel. %; n=4);

\*p<0,05 ALDO+E2 vs. Placebo (100 rel. %; n=4), ALDO+E2+ICI (119,67±8,54 rel. %; n=3), ALDO+16α-LE2+ICI (128,0±11,84 rel. %; n=3) und ALDO+8β-VE2+ICI (131,0±13,12 rel. %; n=3).

### 4.3 Proteinexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$ und des MR in hormonbehandelten PRSMC

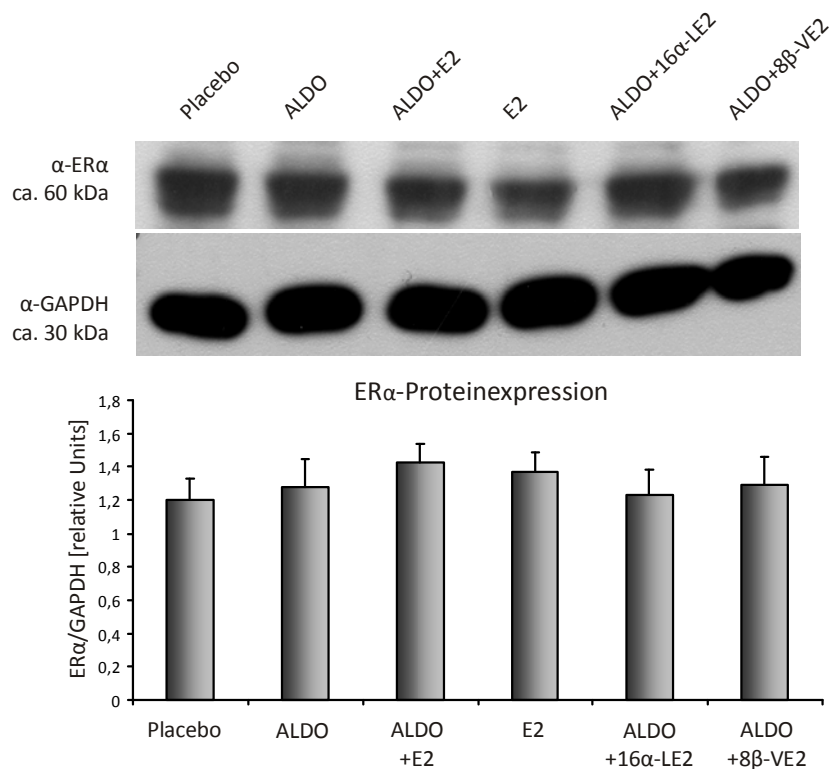
Die beiden ER-Subtypen und der MR induzieren bzw. supprimieren als Transkriptionsfaktoren nach ihrer ligandabhängigen Aktivierung die Expression zahlreicher Zielgene.<sup>98, 178, 179</sup> Es ist daher vorstellbar, dass ALDO MR-vermittelt die Expression des ER $\alpha$  und/oder des ER $\beta$  beeinflusst. Auch die Aktivierung der Estrogenrezeptoren könnte zu einer Suppression der MR-Expression führen oder aber die eigene Expression bzw. die des anderen ER-Subtyps induzieren. Aus diesem Grund sollte mittels Western Blot Analysen in PRSMC untersucht werden, ob die unterschiedlichen Hormonbehandlungen der Zellen eine Wirkung auf die ER $\alpha$ -, ER $\beta$ - und/oder MR-Expression besitzen und eventuell auf diese Weise einen Einfluss auf die lokale ROS-Generierung ausüben.

Die densitometrische Expressionsanalyse des MR (Abb. 20), des ER $\alpha$  (Abb. 21) und des ER $\beta$  (Abb. 22) im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH, ergab für keinen der drei Steroidhormonrezeptoren eine differenzielle Proteinexpression infolge der jeweiligen Hormonbehandlung der Zellen. Somit lässt sich ein Effekt der unterschiedlichen Hormone, zumindest auf die Proteinexpression der Rezeptoren, ausschließen.



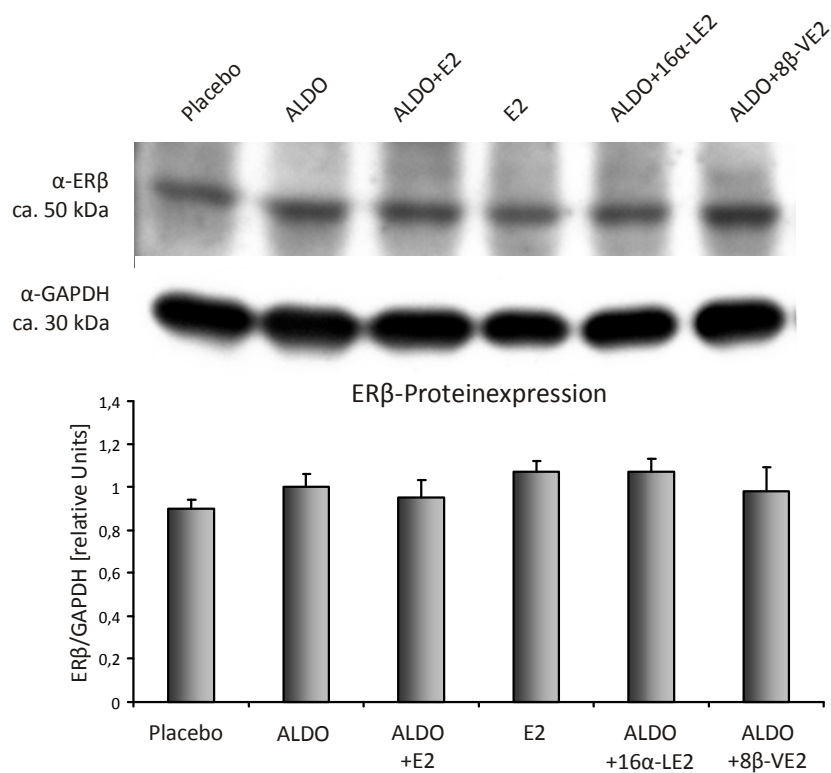
**Abb. 20: Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der MR-Proteinexpression von hormonbehandelten PRSMC**

Die Proteinexpression des MR zur Ladekontrolle GAPDH in PRSMC, die für 48 h mit Placebo (1,29 $\pm$ 0,10 rel. U.; n=6), ALDO (1,15 $\pm$ 0,04 rel. U.; n=7), ALDO+E2 (1,14 $\pm$ 0,06 rel. U.; n=7), E2 (1,09 $\pm$ 0,08 rel. U.; n=7), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 (1,23 $\pm$ 0,13 rel. U.; n=7) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 (1,45 $\pm$ 0,09 rel. U.; n=7) inkubiert waren, wurde durch die Hormone nicht signifikant beeinflusst. MW $\pm$ SEM in relativen Units [rel. U.]. n.s.



**Abb. 21: Repräsentativer Western Blot und densitometrische Analyse der ERα-Proteinexpression von hormonbehandelten PRSMC**

Die Proteinexpression des ERα zur Ladekontrolle GAPDH in PRSMC, die für 48 h mit Placebo (1,20±0,13 rel. U.; n=8), ALDO (1,28±0,17 rel. U.; n=8), ALDO+E2 (1,43±0,11 rel. U.; n=8), E2 (1,37±0,12 rel. U.; n=8), ALDO+16α-LE2 (1,23±0,15 rel. U.; n=8) und ALDO+8βVE2 (1,29±0,17 rel. U.; n=8) behandelt waren, ergab keinen signifikanten Unterschied der ERα Bande. MW±SEM in relativen Units [rel. U.] aus n=8 unabhängigen Versuchen. n.s.



**Abb. 22: Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der ERβ-Expression von hormonbehandelten PRSMC**

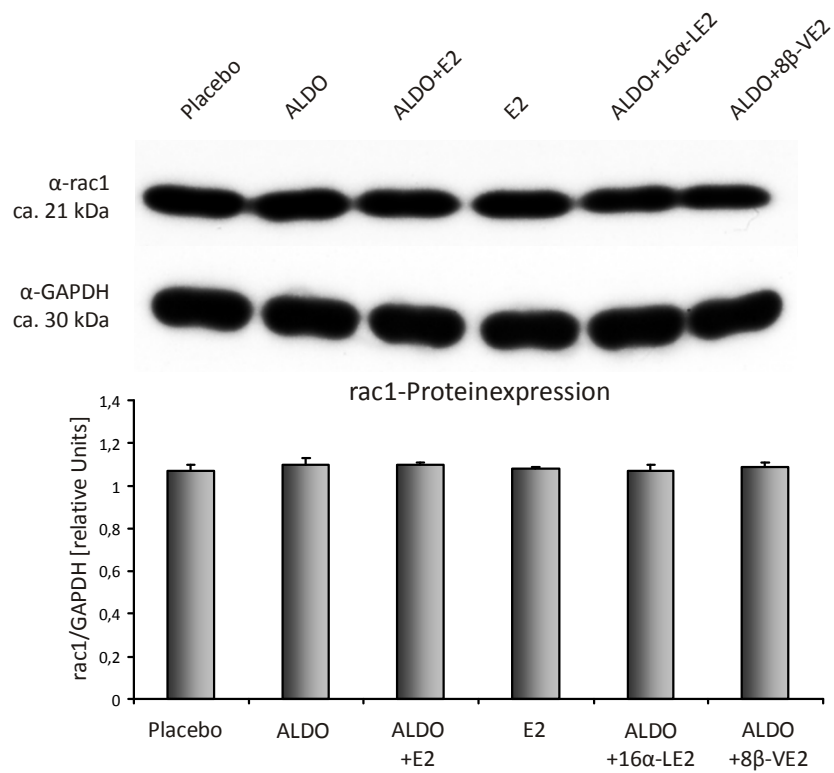
Die Proteinexpression des ERβ zur Ladekontrolle GAPDH in PRSMC, die für 48 h mit Placebo (0,90±0,04 rel. U.; n=7), ALDO (1,00±0,06 rel. U.; n=7), ALDO+E2 (0,95±0,08 rel. U.; n=7), E2 (1,07±0,05 rel. U.; n=7), ALDO+16α-LE2 (1,07±0,06 rel. U.; n=7) und ALDO+8β-VE2 (0,98±0,11 rel. U.; n=7) behandelt waren, wurde durch die Hormone nicht differenziell reguliert. MW±SEM in relativen Units [rel. U.] aus n=7 unabhängigen Versuchen. n.s.

#### 4.4 Analyse der Proteinexpression der NADPH Oxidase Untereinheiten rac 1, p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> in PRSMC

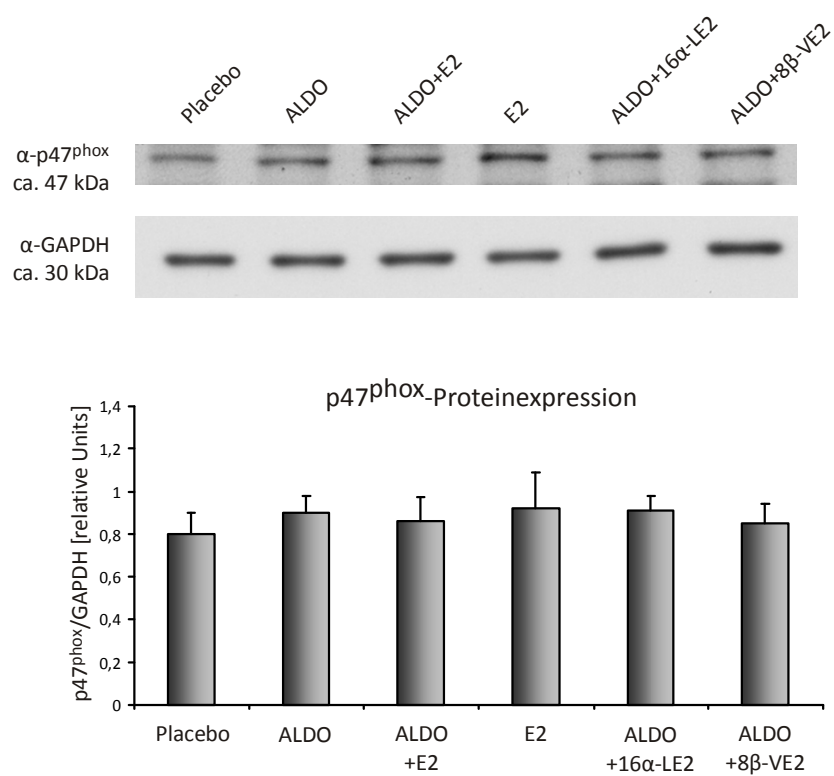
Da bekannt ist, dass ALDO über eine MR-vermittelte Überexpression der NADPH Oxidase Untereinheiten eine erhöhte ROS-Generierung induzieren kann,<sup>49, 220, 223</sup> und E2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Expression der NADPH Oxidase Untereinheiten supprimieren kann,<sup>164-166</sup> sollte die Frage geklärt werden, ob die Kosupplementation von E2 und/oder der ER-spezifischen Agonisten zu ALDO-behandelten Zellen eine divergente Wirkung auf die Proteinexpression der NADPH Oxidase entfalten. Aus diesem Grund wurde die Proteinexpression der NADPH Oxidase Untereinheiten rac 1, p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> in hormonbehandelten PRSMC mittels Western Blot Analysen untersucht und quantitativ erfasst (Abb. 23). Die densitometrische Analyse der Proteinbanden des kleinen G-Proteins rac 1 im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH ergab keinen signifikanten Unterschied der rac 1-Proteinexpression (Abb. 23A). Auch die p47<sup>phox</sup>-Proteinexpression wurde durch die jeweilige Hormonbehandlung der Zellen nicht beeinflusst (Abb. 23B).

Die Quantifizierung der p67<sup>phox</sup>-Proteinexpression wies hingegen eine signifikant erhöhte Expression der 67 kDa schweren NADPH Oxidase Untereinheit bei denjenigen Zellen auf, die mit ALDO behandelt bzw. kosupplementiert waren (Abb. 23C). Die Gruppen ALDO (0,40±0,04 rel. Units; n=9), ALDO+E2 (0,46±0,03 rel. Units; n=9), ALDO+16α-LE2 (0,48±0,04 rel. Units; n=9) und ALDO+8β-VE2 (0,45±0,04 rel. Units; n=9) zeigten eine signifikant erhöhte Proteinexpression von p67<sup>phox</sup> im Vergleich zur Placebo- (0,28±0,03 rel. Units; n=9; p<0,05) und E2-Gruppe (0,29±0,02 rel. Units; n=9; p<0,05). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die erhöhte ROS-Generierung in ALDO-behandelten PRSMC auf eine erhöhte p67<sup>phox</sup>-Expression der NADPH Oxidase zurückzuführen ist. Inwiefern E2 und die spezifischen ER-Agonisten 16α-LE2 und 8β-VE2 der lokalen ALDO-induzierten O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Produktion, die durch die Quantifizierung der DHE-Färbung gemessen wurde, entgegenwirken, kann mit diesem Ergebnis jedoch nicht geklärt werden. Vielmehr deutet dieser Befund darauf hin, dass nicht die ROS-Generierung, sondern sehr wahrscheinlich die ROS-Neutralisation durch die Estrogene beeinflusst wird.

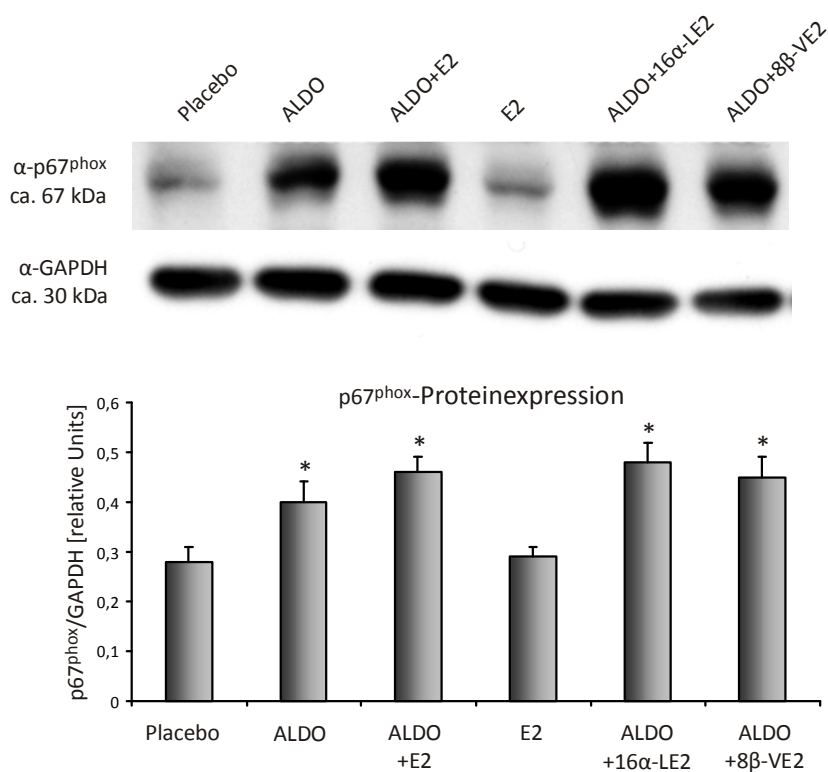
23A)



23B)



23C)



**Abb. 23: Proteinexpression der NADPH Oxidase Untereinheiten rac 1, p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> von hormonbehandelten PRSMC**

Repräsentative Western Blot Analysen und densitometrische Quantifizierung der rac 1- (A), p47<sup>phox</sup>- (B) und p67<sup>phox</sup>- (C) Proteinexpression zur Ladekontrolle GAPDH von PRSMC die für 48 h mit je 100 nM Placebo, ALDO, ALDO+E2, E2, ALDO+16 $\alpha$ -LE2 und ALDO+8 $\beta$ -VE2 inkubiert waren. MW $\pm$ SEM in relativen Units [rel. U.] aus n=4-9 unabhängigen Versuchen.

A) rac 1-Proteinexpression: Placebo (1,07 $\pm$ 0,03 rel. U.; n=5), ALDO (1,10 $\pm$ 0,03 rel. U.; n=5), ALDO+E2 (1,10 $\pm$ 0,01 rel. U.; n=6), E2 (1,08 $\pm$ 0,01 rel. U.; n=6), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 (1,07 $\pm$ 0,03 rel. U.; n=6) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 (1,09 $\pm$ 0,02 rel. U.; n=6). n.s.

B) p47<sup>phox</sup>-Proteinexpression: Placebo (0,80 $\pm$ 0,10 rel. U.; n=4), ALDO (0,90 $\pm$ 0,08 rel. U.; n=4), ALDO+E2 (0,86 $\pm$ 0,11 rel. U.; n=4), E2 (0,92 $\pm$ 0,17 rel. U.; n=4), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 (0,91 $\pm$ 0,07 rel. U.; n=4) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 (0,85 $\pm$ 0,09 rel. U.; n=4). n.s.

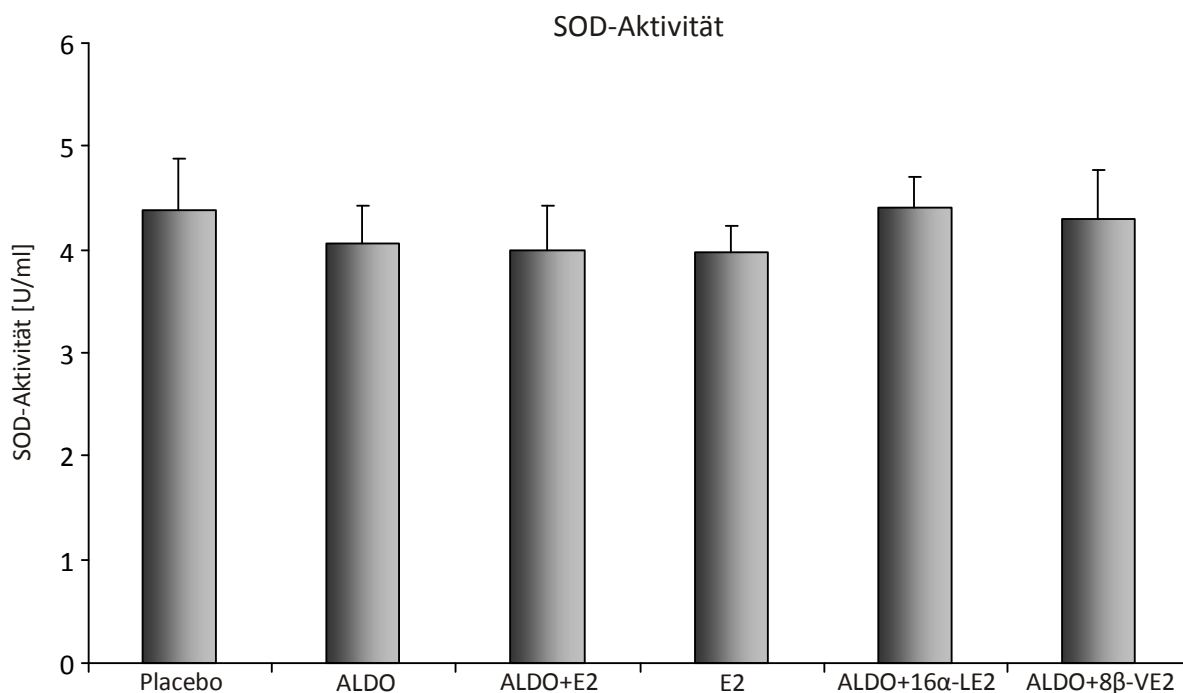
C) p67<sup>phox</sup>-Proteinexpression: \*p<0,05 ALDO (0,40 $\pm$ 0,04 rel. U.; n=9), ALDO+E2 (0,46 $\pm$ 0,03 rel. U.; n=9), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 (0,48 $\pm$ 0,04 rel. U.; n=9) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 (0,45 $\pm$ 0,04 rel. U.; n=9) vs. Placebo (0,28 $\pm$ 0,03 rel. U.; n=9) und E2 (0,29 $\pm$ 0,02 rel. U.; n=9).

#### 4.5 Untersuchung der antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und GPx

Die antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und GPx sind direkt an der Neutralisation von ROS beteiligt und üben daher einen entscheidenden Einfluss auf die antioxidative Kapazität der Zellen aus.<sup>23</sup> Aus diesem Grund sollte geklärt werden, ob die Kosupplementation der Estrogene E2, 16 $\alpha$ -LE2 und 8 $\beta$ -VE2 zu ALDO-behandelten PRSMC dem ALDO-induzierten oxidativen Stress entgegenwirken, indem sie die Enzymaktivität und/oder die Expression dieser Proteine beeinflussen.

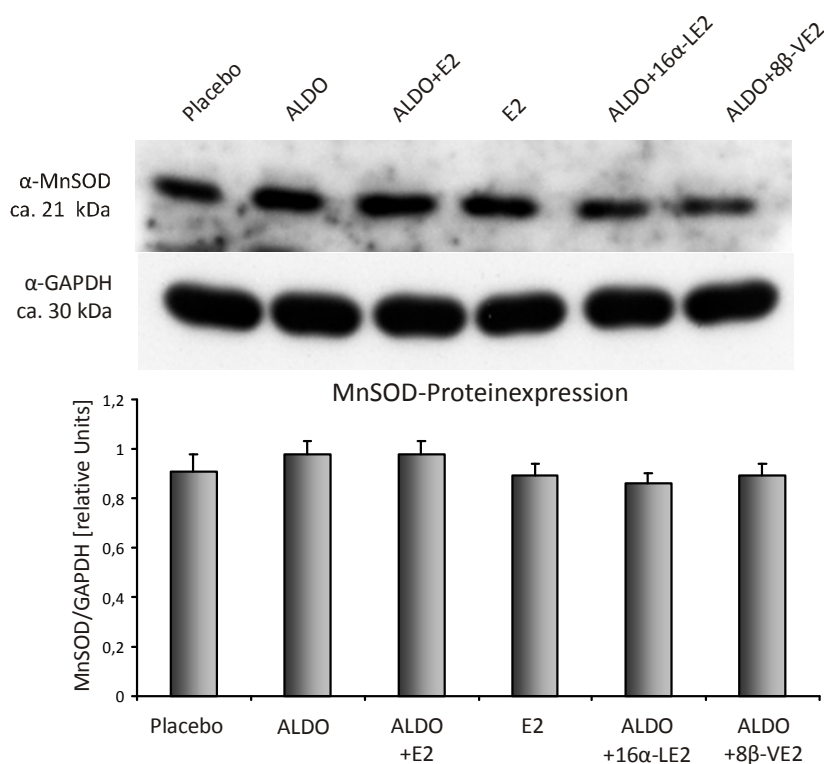
Mittels Enzymaktivitätsassays und Western Blot Analysen wurde die Aktivität und Proteinexpression dieser antioxidativen Enzyme bestimmt. Die SOD-Aktivitätsmessung (Abb. 24) ergab keinen signifikanten Unterschied der Enzymaktivität bei ALDO-behandelten Zellen ( $4,06 \pm 0,36$  U/ml; n=21) und denjenigen Zellen, die zusätzlich zu ALDO mit E2 ( $4,00 \pm 0,43$  U/ml; n=21), 16 $\alpha$ -LE2 ( $4,40 \pm 0,31$  U/ml; n=21) und 8 $\beta$ -VE2 ( $4,29 \pm 0,49$  U/ml; n=21) kosupplementiert waren. Auch die Quantifizierung von Placebo-behandelten Zellen ( $4,39 \pm 0,48$  U/ml; n=21) und Zellen, die nur mit E2 inkubiert waren ( $3,97 \pm 0,25$  U/ml; n=21), wies keinen Unterschied der SOD-Enzymaktivität im Vergleich zu den anderen Gruppen auf. Ferner konnte auch die Analyse der MnSOD-Proteinexpression (Abb. 25) kein verändertes Expressionsprofil infolge der unterschiedlichen Hormonbehandlungen der Zellen belegen.

Die Untersuchung des Enzyms Katalase in PRSMC, die für 48 h mit den verschiedenen Steroidhormonen inkubiert waren, erbrachte ebenfalls weder eine signifikante Veränderung der Enzymaktivität (Abb. 26) noch eine differenzielle Proteinexpression (Abb. 27).



**Abb. 24: Quantifizierung der SOD-Aktivität**

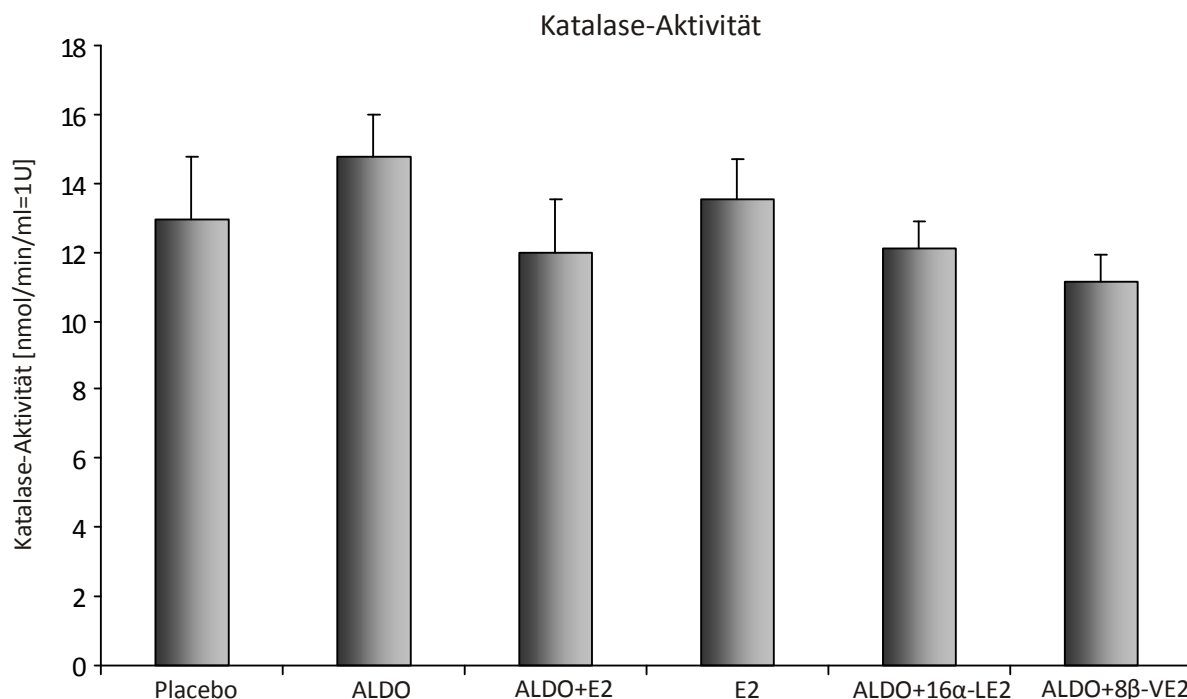
PRSMC wurden für 48 h mit Placebo, ALDO, ALDO+E2, E2, ALDO+16α-LE2 und ALDO+8β-VE2 inkubiert (je 100 nM). Die SOD-Aktivität wurde anschließend mittels eines Superoxid-Dismutase Assay Kits bestimmt. MW±SEM in Units/ml [U/ml] aus n=21 unabhängigen Versuchen. 1U ist definiert als die Menge Enzym, die benötigt wird um 50 % Dismutation des Superoxidradikals zu erreichen. Placebo (4,39±0,48 U/ml; n=21), ALDO (4,06±0,36 U/ml; n=21), ALDO+E2 (4,00±0,43 U/ml; n=21), E2 (3,97±0,25 U/ml; n=21), ALDO+16α-LE2 (4,40±0,31 U/ml; n=21) und ALDO+8β-VE2 (4,29±0,49 U/ml; n=21). n.s.



**Abb. 25: Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der MnSOD-Proteinexpression**

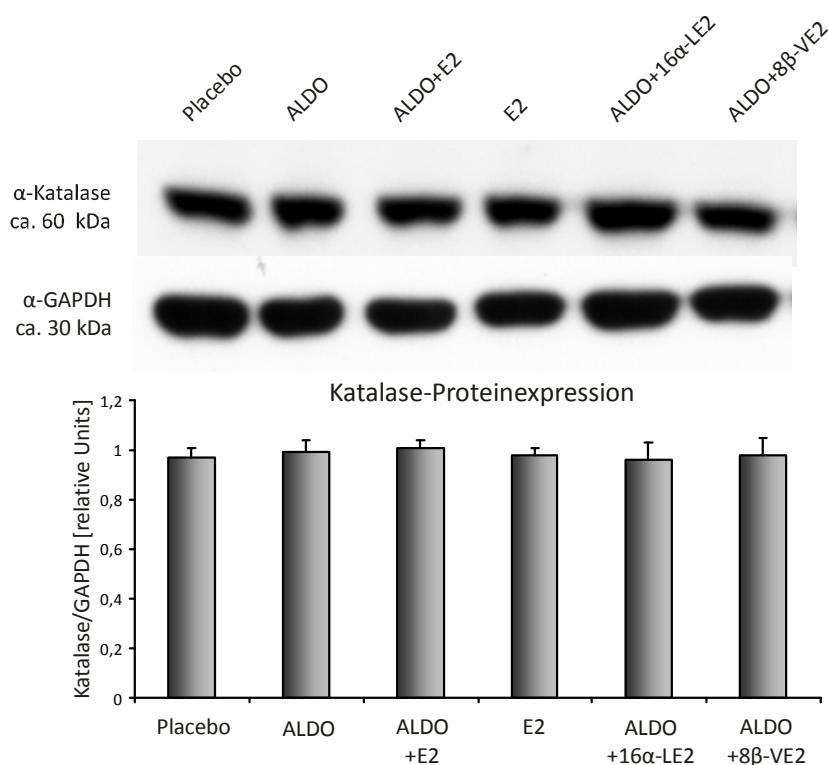
Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der MnSOD-Proteinexpression zur Ladekontrolle GAPDH von hormonbehandelten PRSMC. MW±SEM in [rel. U.] aus n=6 unabhängigen Versuchen. Placebo (0,91±0,07 rel. U.; n=6), ALDO (0,98±0,05 rel. U.; n=6), ALDO+E2 (0,98±0,05 rel. U.; n=6), E2 (0,89±0,05 rel. U.; n=6), ALDO+16α-LE2 (0,86±0,04 rel. U.; n=6) und ALDO+8β-VE2 (0,89±0,05 rel. U., n=6). n.s.





**Abb. 26: Analyse der Katalase-Enzymaktivität in hormonbehandelten PRSMC**

PRSMC wurden für 48 h mit Placebo, ALDO, ALDO+E2, E2, ALDO+16α-LE2 und ALDO+8β-VE2 behandelt (je 100 nM). Die Enzymaktivität der Katalase wurde anschließend mit Hilfe eines Katalase Assay Kits bestimmt. MW±SEM in Units [U] aus n=5-7 unabhängigen Versuchen. 1U ist definiert als die Enzymmenge, die 1 nmol Formaldehyd pro Minute bei 25°C generiert. Placebo (12,95±1,84 U; n=5), ALDO (14,77±1,20 U; n=7), ALDO+E2 (11,96±1,60 U; n=7), E2 (13,52±1,18 U; n=7), ALDO+16α-LE2 (12,09±0,78 U; n=7) und ALDO+8β-VE2 (11,13±0,76 U; n=7). n.s.

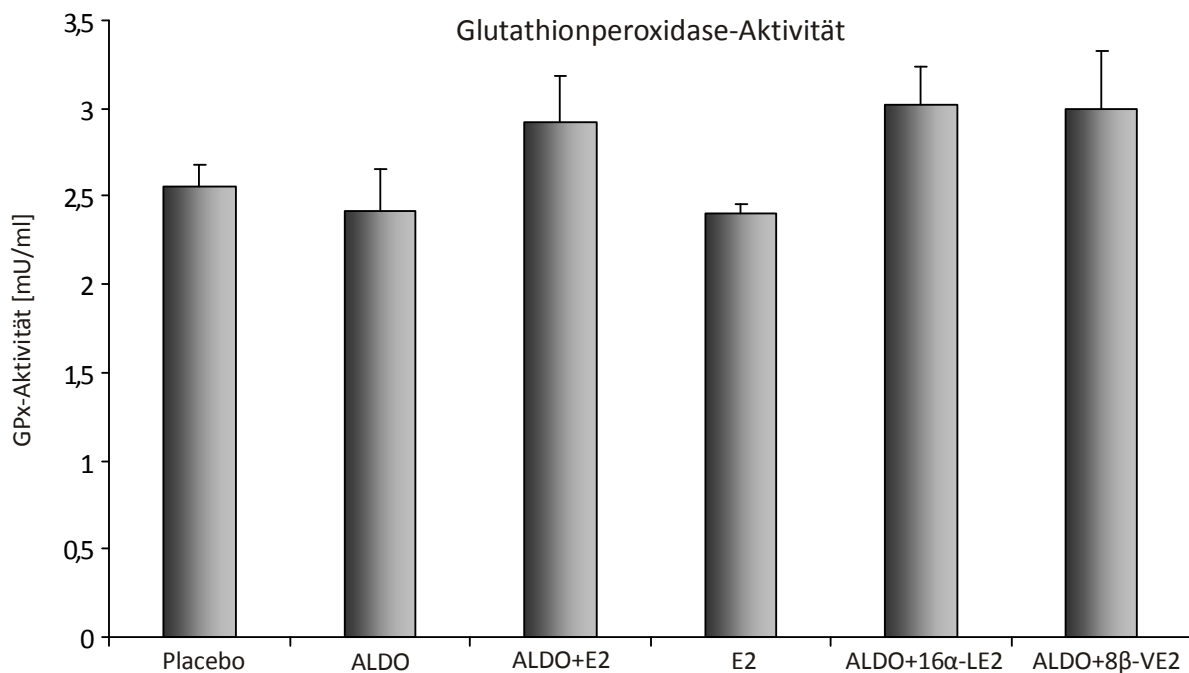


**Abb. 27: Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der Katalase-Proteinexpression**

Die Western Blot Analyse der Katalase-Proteinexpression im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH in PRSMC die für 48 h mit Placebo (0,97±0,04 rel. U.; n=6), ALDO (0,99±0,05 rel. U.; n=7), ALDO+E2 (1,01±0,03 rel. U.; n=7), E2 (0,98±0,03 rel. U.; n=7), ALDO+16α-LE2 (0,96±0,07 rel. U.; n=7) und ALDO+8β-VE2 (0,98±0,07 rel. U.; n=7) behandelt waren, erbrachte keinen signifikanten Unterschied. MW±SEM in relativen Units [rel. U.]. n.s.

Die Quantifizierung der GPx-Aktivität (Abb. 28) in PRSMC, die für 48 h mit den entsprechenden Hormonen vorbehandelt waren, ergab für ALDO+E2 ( $2,92 \pm 0,26$  mU/ml; n=6), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 ( $3,02 \pm 0,21$  mU/ml; n=6) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 ( $3,00 \pm 0,32$  mU/ml; n=6) eine tendenzielle Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zu Placebo- ( $2,55 \pm 0,13$  mU/ml; n=6), ALDO- ( $2,42 \pm 0,24$  mU/ml; n=6) und E2-behandelte Zellen ( $2,40 \pm 0,06$  mU/ml; n=6). Dieser Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant.

Durch die hier beschriebenen Ergebnisse konnte somit ausgeschlossen werden, dass E2 und die ER-spezifischen Agonisten, 16 $\alpha$ -LE2 und 8 $\beta$ -VE2, der ALDO-induzierten lokalen ROS-Generierung, durch eine Erhöhung der Aktivität und/oder Expression der antioxidativen Enzymen SOD, Katalase und GPx entgegenwirken.

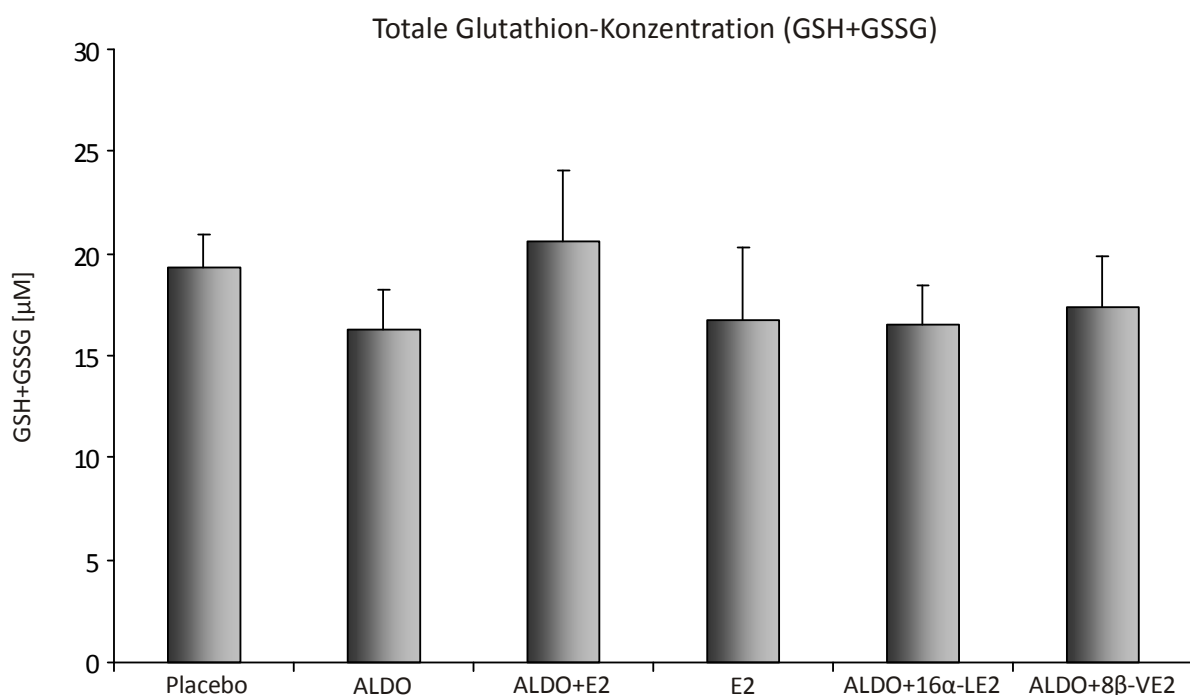


**Abb. 28: Quantifizierung der GPx-Enzymaktivität in hormonbehandelten PRSMC**

PRSMC waren für 48 h mit Placebo, ALDO, ALDO+E2, E2, ALDO+16 $\alpha$ -LE2 und ALDO+8 $\beta$ -VE2 behandelt (je 100 nM), bevor die Enzymaktivität der GPx mit Hilfe des Glutathione Peroxidase Assay Kits bestimmt wurde. MW $\pm$ SEM in [mU/ml] aus n=6 unabhängigen Versuchen. 1U ist definiert als die Enzymmenge, die 1  $\mu$ mol NADPH pro Minute bei 25°C zu NADP<sup>+</sup> oxidiert. Placebo ( $2,55 \pm 0,13$  mU/ml; n=6), ALDO ( $2,42 \pm 0,24$  mU/ml; n=6), ALDO+E2 ( $2,92 \pm 0,26$  mU/ml; n=6), E2 ( $2,40 \pm 0,06$  mU/ml; n=6), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 ( $3,02 \pm 0,21$  mU/ml; n=6) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 ( $3,00 \pm 0,32$  mU/ml; n=6). n.s.

#### 4.6 Quantifizierung des intrazellulären Redox-Status hormonbehandelter PRSMC

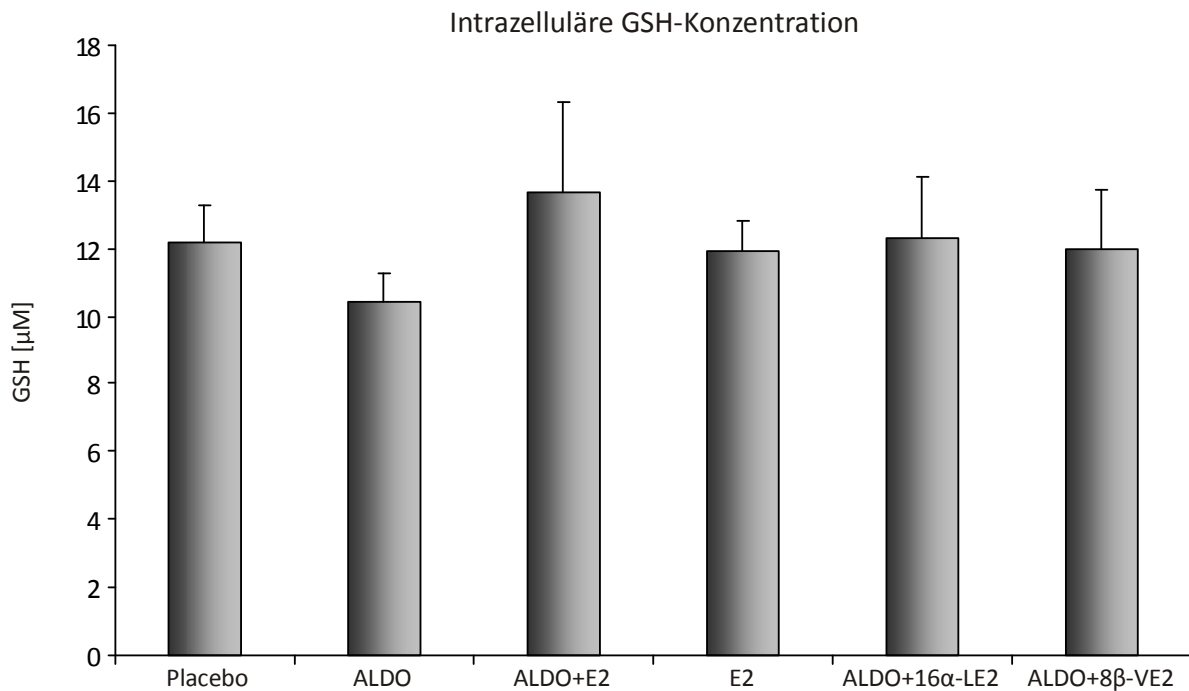
Da die antioxidativen Enzyme in PRSMC weder durch die ALDO-Behandlung noch durch die Kosupplementation von Estrogenen beeinflusst wurden, sollte im Anschluss an diese Versuche die Frage geklärt werden, ob der intrazelluläre Redox-Status durch die verschiedenen Steroidhormone verändert wird. Hierzu wurde die intrazelluläre Glutathion-Konzentration in den hormonbehandelten PRSMC untersucht. Die Quantifizierung der totalen Glutathionmenge (GSH+GSSG) (Abb. 29) ergab eine tendenzielle Erhöhung der Glutathion-Konzentration bei der Placebo- ( $19,28 \pm 1,62 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ) und ALDO+E2-Gruppe ( $20,56 \pm 3,41 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), im Vergleich zu den ALDO- ( $16,30 \pm 1,91 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), E2- ( $16,69 \pm 3,56 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO+16 $\alpha$ -LE2- ( $16,49 \pm 1,99 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ) und ALDO+8 $\beta$ -VE2-behandelten Zellen ( $17,33 \pm 2,49 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ).



**Abb. 29: Quantifizierung der totalen Glutathion-Konzentration in hormonbehandelten PRSMC**

PRSMC wurden für 48 h mit je 100 nM Placebo, ALDO, ALDO+E2, E2, ALDO+16 $\alpha$ -LE2 und ALDO+8 $\beta$ -VE2 inkubiert. Die intrazelluläre Konzentration an reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH+GSSG) wurde anschließend mit Hilfe des Glutathione Assay Kits bestimmt. MW $\pm$ SEM in  $\mu\text{M}$  GSH+GSSG [ $\mu\text{M}$ ] aus  $n=5$  unabhängigen Versuchen. Placebo ( $19,28 \pm 1,62 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO ( $16,30 \pm 1,91 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO+E2 ( $20,56 \pm 3,41 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), E2 ( $16,69 \pm 3,56 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 ( $16,49 \pm 1,99 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 ( $17,33 \pm 2,49 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ). n.s.

Die Quantifizierung der intrazellulären Konzentration an GSH (Abb. 30) derselben Proben ergab, dass Placebo- ( $12,16 \pm 1,13 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO+E2- ( $13,63 \pm 2,66 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), E2- ( $11,89 \pm 0,94 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO+16 $\alpha$ -LE2- ( $12,27 \pm 1,82 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ) und ALDO+8 $\beta$ -VE2-behandelte Zellen ( $11,97 \pm 1,76 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ) im Vergleich zu ALDO-inkubierten Zellen ( $10,44 \pm 0,85 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ) eine tendenzielle Erhöhung der GSH-Konzentration aufwiesen.



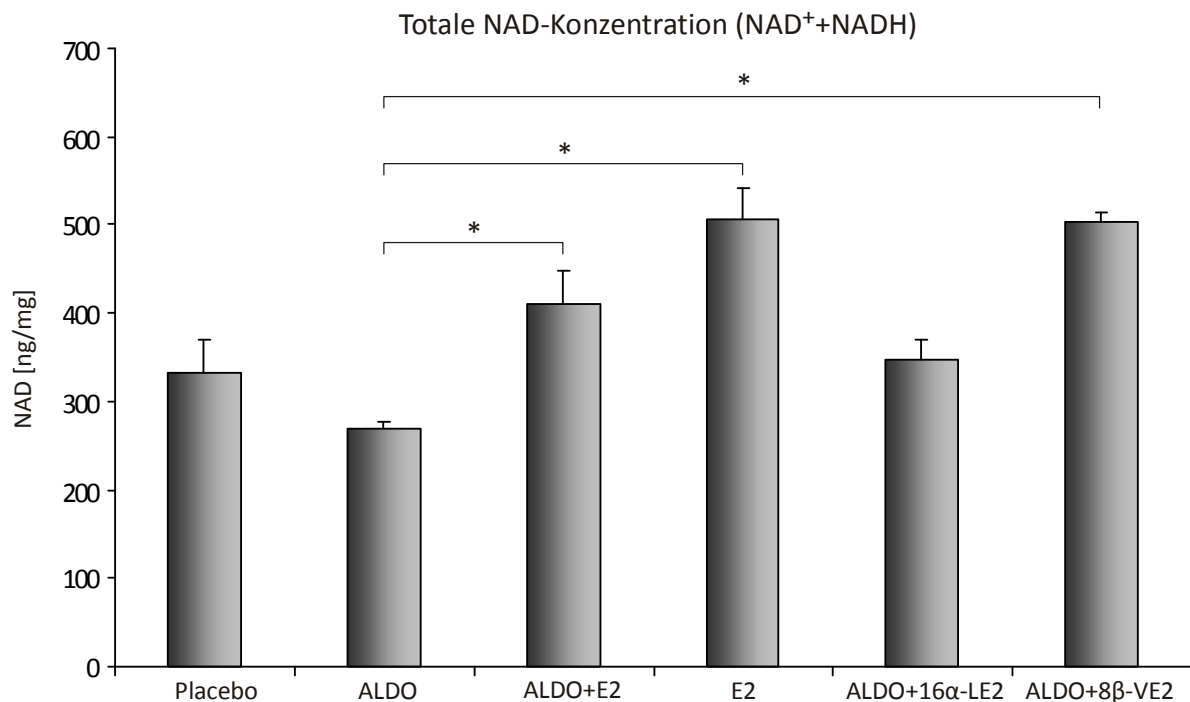
**Abb. 30: Quantifizierung der intrazellulären GSH-Konzentration in hormonbehandelten PRSMC**

PRSMC wurden für 48 h mit je 100 nM Placebo, ALDO, ALDO+E2, E2, ALDO+16 $\alpha$ -LE2 und ALDO+8 $\beta$ -VE2 behandelt. Die intrazelluläre Konzentration an GSH wurde anschließend mit Hilfe des Glutathione Assay Kits bestimmt. MW±SEM in  $\mu\text{M}$  GSH [ $\mu\text{M}$ ] aus  $n=5$  unabhängigen Versuchen. Placebo ( $12,16 \pm 1,13 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO ( $10,44 \pm 0,85 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO+E2 ( $13,63 \pm 2,66 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), E2 ( $11,89 \pm 0,94 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 ( $12,27 \pm 1,82 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 ( $11,97 \pm 1,76 \mu\text{M}$ ;  $n=5$ ). n.s.

Des Weiteren wurden auch die intrazellulären Konzentrationen der Reduktionsäquivalente NAD und NADP in den hormonbehandelten Zellen bestimmt, da diese ebenfalls einen Einfluss auf den Redox-Status der Zellen ausüben.

Die Analyse der totalen Konzentration ( $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$ ) des Redox-Kofaktors NAD (Abb. 31) erbrachte den Beweis, dass ALDO-behandelte Zellen ( $270 \pm 8 \text{ ng/mg}$ ;  $n=5$ ) im Vergleich zu ALDO+E2- ( $410 \pm 37 \text{ ng/mg}$ ;  $n=5$ ;  $p < 0,05$ ), E2- ( $506 \pm 35 \text{ ng/mg}$ ;  $n=3$ ;  $p < 0,001$ ) und ALDO+8 $\beta$ -VE2-inkubierten PRSMC ( $505 \pm 10 \text{ ng/mg}$ ;  $n=4$ ;  $p < 0,001$ ) eine signifikant reduzierte NAD-Menge aufweisen.

Die NAD-Konzentration der Placebo- ( $332\pm 38$  ng/mg;  $n=5$ ) und ALDO+16 $\alpha$ -LE2-Gruppen ( $348\pm 23$  ng/mg;  $n=3$ ) waren ebenfalls im Vergleich zur ALDO-Gruppe erhöht, dieser Unterschied konnte jedoch nicht als statistisch signifikant erachtet werden.

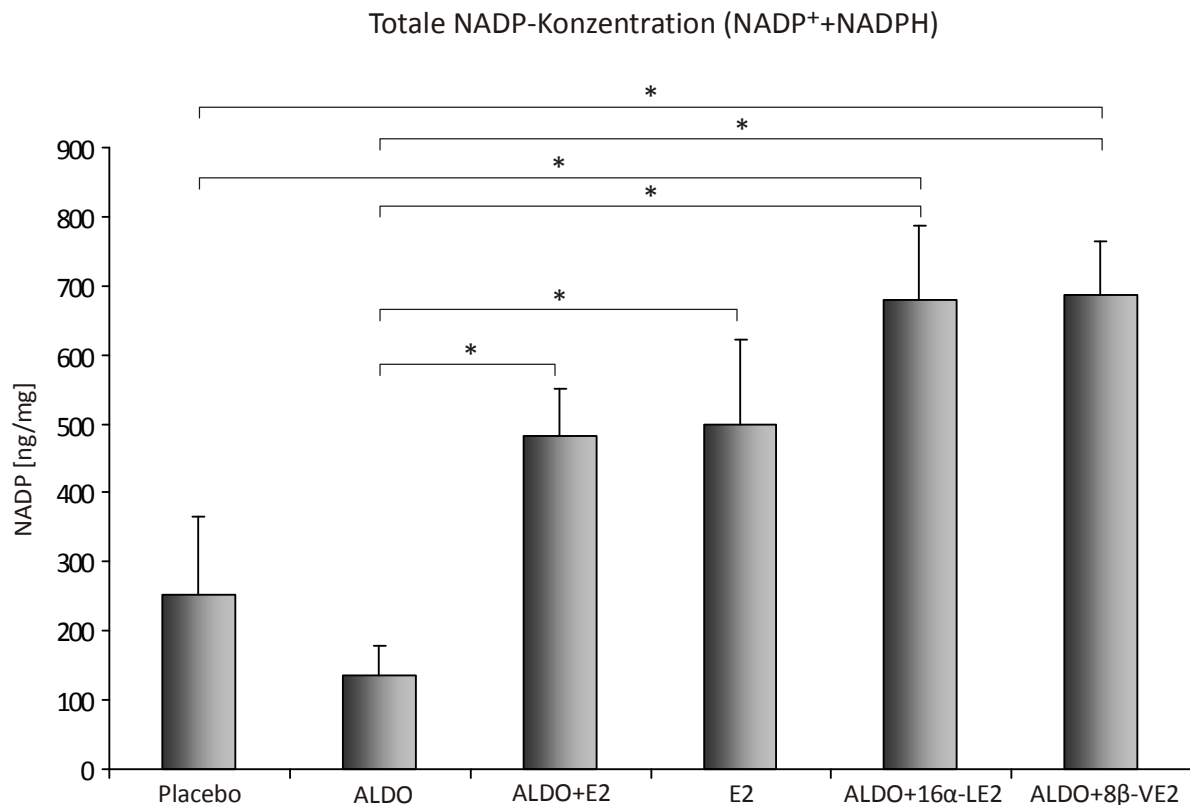


**Abb. 31: Quantifizierung der totalen NAD-Konzentration (NAD<sup>+</sup>+NADH) in PRSMC**

Die totale NAD-Konzentration (NAD<sup>+</sup>+NADH) von PRSMC, die für 48 h mit den unterschiedlichen Steroidhormonen behandelt waren, wurde mittels eines NAD Quantification Assay Kits bestimmt. MW $\pm$ SEM in ng NAD/mg Protein [ng/mg] aus  $n=3-5$  unabhängigen Versuchen. Placebo ( $331,66\pm 37,92$  ng/mg;  $n=5$ ), ALDO ( $269,87\pm 8,16$  ng/mg;  $n=5$ ), ALDO+E2 ( $410,26\pm 36,80$  ng/mg;  $n=5$ ), E2 ( $505,78\pm 35,06$  ng/mg;  $n=3$ ), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 ( $347,97\pm 22,88$  ng/mg;  $n=3$ ) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 ( $504,62\pm 9,86$  ng/mg;  $n=4$ ).

\*\* $p<0,001$  ALDO vs. E2. \*\* $p<0,001$  ALDO vs. ALDO+8 $\beta$ -VE2. \* $p<0,05$  ALDO vs. ALDO+E2.

Ein ähnlicher Effekt der Estrogene war auch bei der Quantifizierung der totalen NADP-Konzentration (NADP<sup>+</sup>+NADPH) von hormonbehandelten PRSMC zu beobachten (Abb. 32). ALDO+E2-kosupplementierte Zellen ( $482\pm 69$  ng/mg;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ) und Zellen, die nur mit E2 ( $500\pm 122$  ng/mg;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ) behandelt waren, besaßen eine signifikant erhöhte intrazelluläre NADP-Konzentration im Vergleich zu ALDO-behandelten Zellen ( $135\pm 42$  ng/mg;  $n=5$ ). Ferner konnte auch in den Gruppen ALDO+16 $\alpha$ -LE2 ( $679\pm 107$  ng/mg;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 ( $688\pm 75$  ng/mg;  $n=5$ ;  $p<0,05$ ) eine signifikant erhöhte intrazelluläre NADP-Konzentration im Vergleich zu Placebo- ( $251\pm 114$  ng/mg;  $n=5$ ) und ALDO-behandelten Zellen nachgewiesen werden.



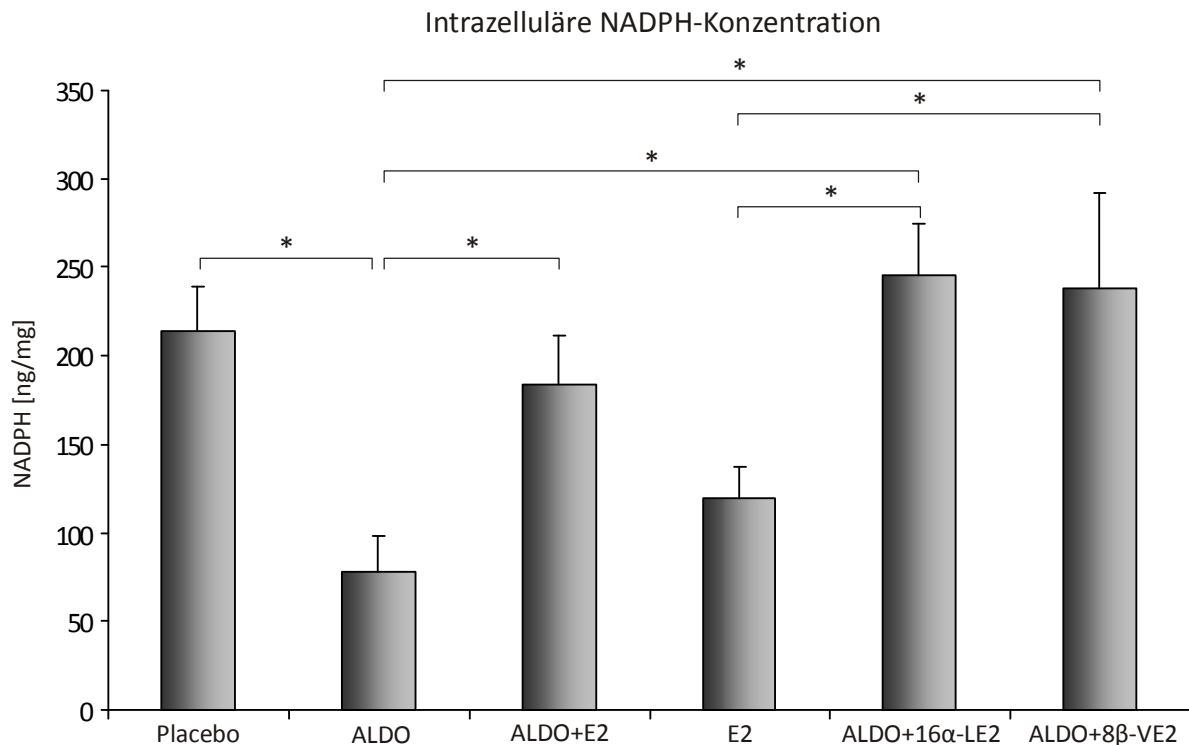
**Abb. 32: Analyse der totalen NADP-Konzentration (NADP<sup>+</sup>+NADPH) in PRSMC**

Die totale NADP-Konzentration (NADP<sup>+</sup>+NADPH) von hormonbehandelten PRSMC wurde mittels eines NADP<sup>+</sup>/NADPH Quantifikation Kits bestimmt. MW±SEM in ng NADP/mg Protein [ng/mg] aus n=5 unabhängigen Versuchen.

Placebo (250,92±113,51 ng/mg; n=5), ALDO (135,12±42,39 ng/mg; n=5), ALDO+E2 (481,83±68,70 ng/mg; n=5), E2 (500,02±121,75 ng/mg; n=5), ALDO+16α-LE2 (678,81±106,56 ng/mg; n=5) und ALDO+8β-VE2 (687,90±74,69 ng/mg; n=5).

\*p<0,05 ALDO vs. ALDO+E2, E2, ALDO+16α-LE2 und ALDO+8β-VE2. \*p<0,05 Placebo vs. ALDO+16α-LE2 und ALDO+8β-VE2.

Da NADPH durch sein hohes Reduktionspotential über essentielle Eigenschaften im antioxidativen System der Zelle verfügt, wurde die intrazelluläre NADPH-Konzentration dieses Reduktionsäquivalents in hormonbehandelten PRSMC eingehender untersucht. Die Analyse (Abb. 33) ergab, dass die NADPH-Konzentration in ALDO-behandelten Zellen (78±20 ng/mg, n=5) signifikant geringer war als die in Placebo- (214±24 ng/mg, n=3; p<0,05), ALDO+E2- (184±28 ng/mg, n=5; p<0,05), ALDO+16α-LE2- (246±28 ng/mg, n=5; p<0,05) und ALDO+8β-VE2-kosupplementierten PRSMC (238±54 ng/mg, n=4; p<0,05). Im Vergleich mit der ALDO+16α-LE2- und ALDO+8β-VE2-Gruppe zeigten E2-behandelte Zellen (120±18 ng/mg, n=5; p<0,05) ferner eine signifikant geringere intrazelluläre NADPH-Konzentration auf.



**Abb. 33: Quantifizierung der intrazellulären NADPH-Konzentration in hormonbehandelten PRSMC**

In PRSMC, die für 48 h mit Placebo, ALDO, ALDO+E2, E2, ALDO+16α-LE2 und ALDO+8β-VE2 behandelt waren (je 100 nM), wurde die Konzentration an NADPH mittels eines NADP<sup>+</sup>/NADPH Quantification Kits bestimmt. MW±SEM in ng NADPH/mg Protein [ng/mg] aus n=3-5 unabhängigen Versuchen. Placebo (214,39±24,28 ng/mg; n=3), ALDO (77,94±19,96 ng/mg; n=5), ALDO+E2 (183,62±27,65 ng/mg; n=5), E2 (120,10±17,75 ng/mg; n=5), ALDO+16α-LE2 (245,60±28,30 ng/mg; n=5) und ALDO+8β-VE2 (238,49±54,20 ng/mg; n=4).

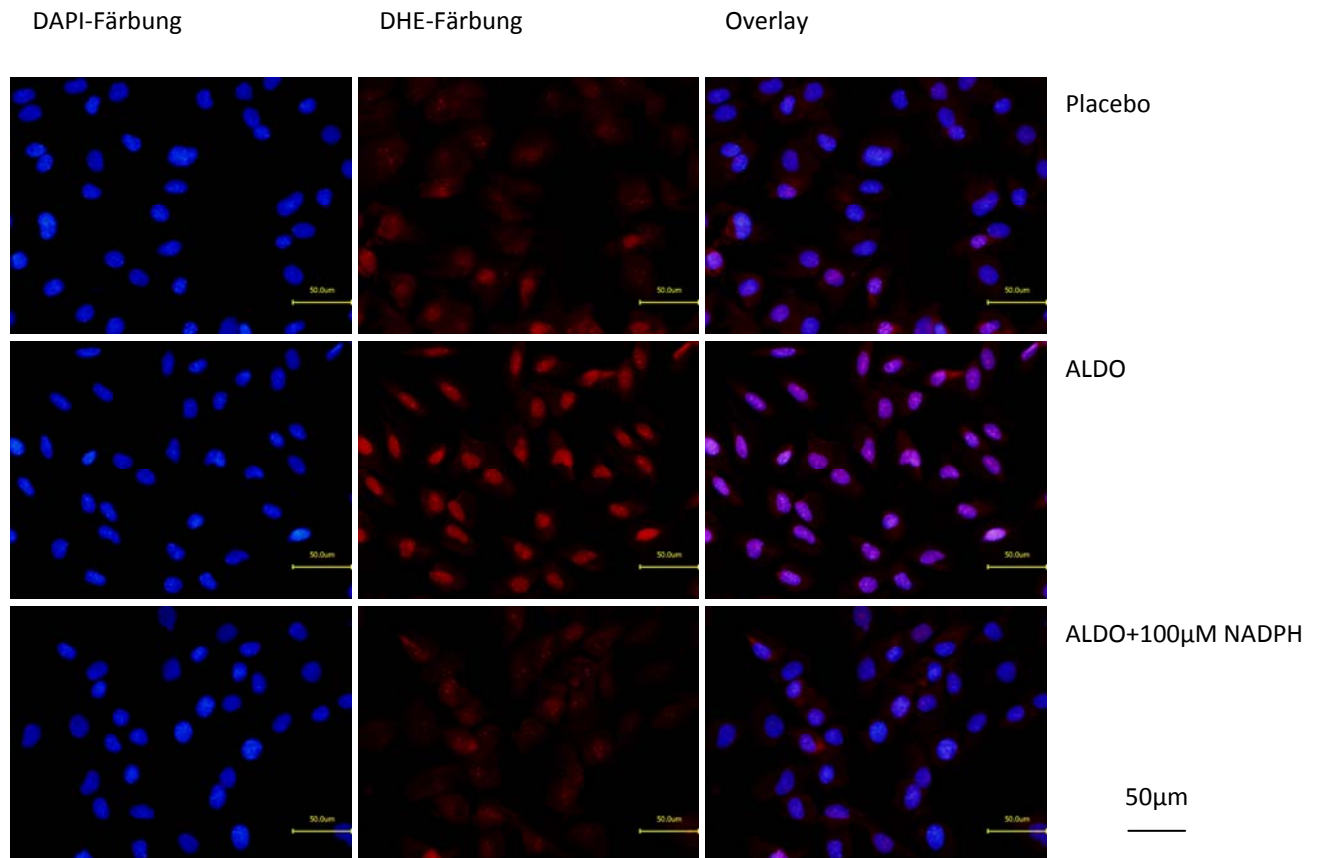
\*p<0,05 ALDO vs. Placebo, ALDO+E2, ALDO+16α-LE2, ALDO+8β-VE2. \*p<0,05 E2 vs. ALDO+16α-LE2 und ALDO+8β-VE2.

#### 4.7 NADPH reduziert die ALDO-induzierte lokale ROS-Generierung in PRSMC

Da PRSMC, die mit Estrogenen kosupplementiert wurden, eine höhere intrazelluläre NADPH-Konzentration aufwiesen, als ALDO-behandelte Zellen, sollte in einem nächsten Schritt geklärt werden, ob NADPH tatsächlich einen Einfluss auf die ROS-Generierung in diesen Zellen besitzt. Aus diesem Grund sollte die O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Produktion von ALDO-behandelten Zellen mit der von PRSMC verglichen werden, die zusätzlich zu ALDO für die letzten 3h der Inkubationszeit mit 100 μM NADPH kosupplementiert wurden. Die lokale ROS-Generierung dieser Zellen wurde erneut mittels DHE-Färbung analysiert (Abb. 34) und ihre relative DHE-Fluoreszenzintensität (Abb. 35) quantitativ erfasst.

Die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen ließen eine deutliche Verminderung der DHE-Oxidation in den Zellen, die mit ALDO und NADPH gleichzeitig inkubiert wurden, erkennen.

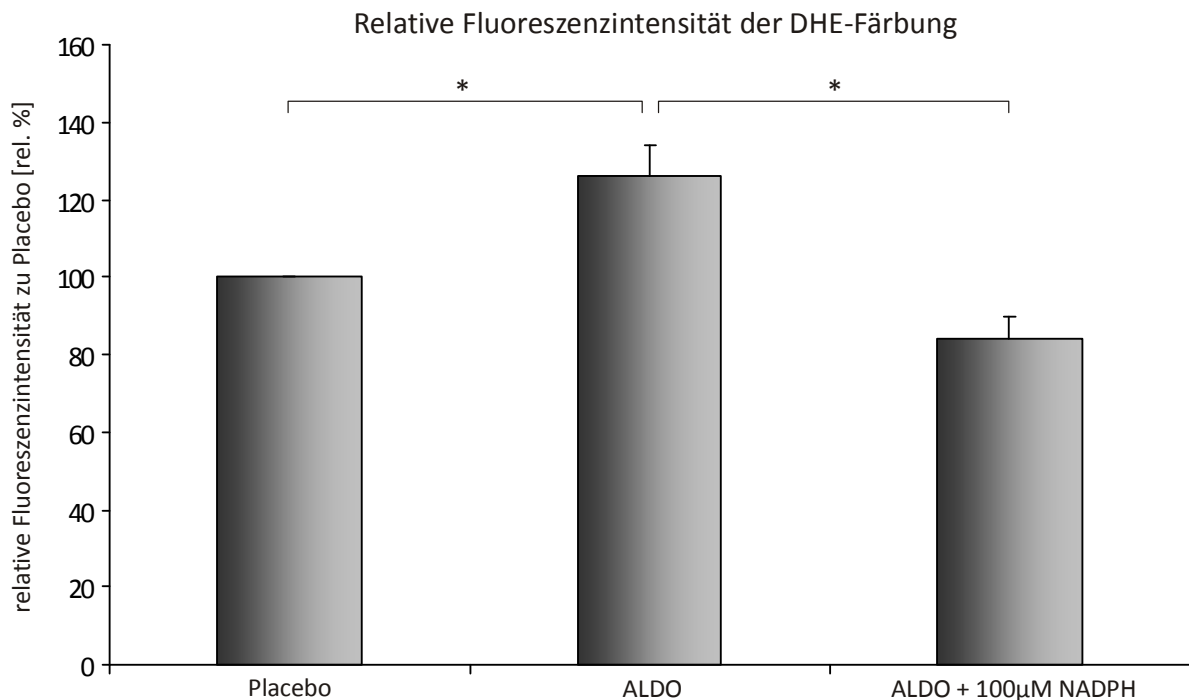
Die quantitative Analyse der DHE-Fluoreszenzintensität bestätigte schließlich, dass die NADPH-Kosupplementation ( $84,24 \pm 5,26$  rel. %;  $n=4$ ;  $p < 0,05$ ) zu einer signifikant reduzierten ROS-Generierung im Vergleich zu ALDO-behandelten Zellen ( $126,02 \pm 8,25$  rel. %;  $n=4$ ) führt und überdies geringer ausfiel als die der Placebo-Gruppe (100 rel. %;  $n=4$ ).



**Abb. 34: Repräsentative Bilder einer DHE-Färbung von PRSMC behandelt mit Placebo, ALDO und ALDO+100 µM NADPH**

Mehrere Sets von PRSMC wurden für 48 h mit Placebo und ALDO inkubiert. 3h vor der DHE-Färbung der Zellen wurde einem Teil der ALDO-behandelten PRSMC 100 µM NADPH ins Medium supplementiert. Die Zellen wurden im Anschluss für 30 min mit 100 µM DHE inkubiert, gewaschen, fixiert, DAPI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop auf die DHE-Oxidation hin untersucht. blau: DAPI-Färbung der Zellkerne. rot: DHE-Oxidation in PRSMC.





**Abb. 35: Quantifizierung der DHE-Fluoreszenzintensität von PRSMC behandelt mit Placebo, ALDO und ALDO+100 μM NADPH**

Die DHE-Fluoreszenzintensität wurde relativ zu der DHE-Fluoreszenzintensität von Placebo bestimmt.

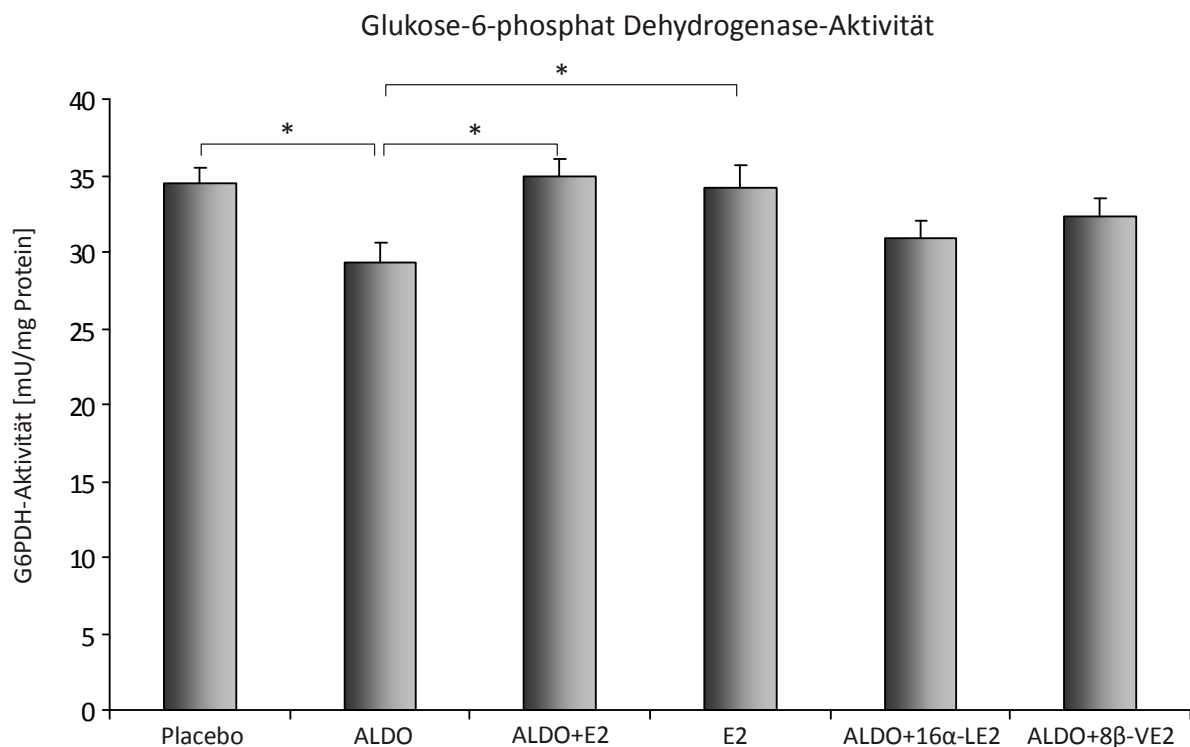
MW±SEM in relativen Prozent [rel. %] aus n=4 unabhängigen Versuchen. Placebo (100 rel. %; n=4), ALDO (126,02±8,25 rel. %; n=4) und ALDO+100 μM NADPH (84,24±5,26 rel. %; n=4).

\*p<0,05 ALDO vs. Placebo und ALDO+100 μM NADPH.

#### 4.8 Aktivität und Proteinexpression der G6PDH

Die G6PDH reduziert bei der katalytischen Reaktion von Glukose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono-δ-lacton  $\text{NADP}^+$  zu NADPH, und ist eines der wichtigsten NADPH-generierenden Enzyme im zellulären Metabolismus.<sup>88</sup> Hinsichtlich dieser Tatsache sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht werden, ob ALDO, E2 und/oder die ER-spezifischen Agonisten einen Einfluss auf die G6PDH-Aktivität bzw. auf die G6PDH-Proteinexpression besitzen. Mittels eines G6PDH Assays wurde die Aktivität dieses Enzyms verifiziert (Abb. 36). Hierbei ergab sich eine signifikant erhöhte G6PDH-Enzymaktivität von Placebo- (34,52±1,01 mU/mg; n=8; p<0,05), ALDO+E2- (34,89±1,23 mU/mg; n=8; p<0,05) und E2-behandelten PRSMC (34,22±1,48 mU/mg; n=8; p<0,05) im Vergleich zu ALDO-behandelten Zellen (29,24±1,32 mU/mg; n=8).

Die Aktivität der G6PDH in Zellen, die mit ALDO+16 $\alpha$ -LE2- (30,82 $\pm$ 1,14 mU/mg; n=7) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 (32,30 $\pm$ 1,15 mU/mg; n=7) inkubiert waren, war gleichfalls höher als die in ALDO-behandelten Zellen, dieser Unterschied konnte jedoch nicht als statistisch signifikant belegt werden.

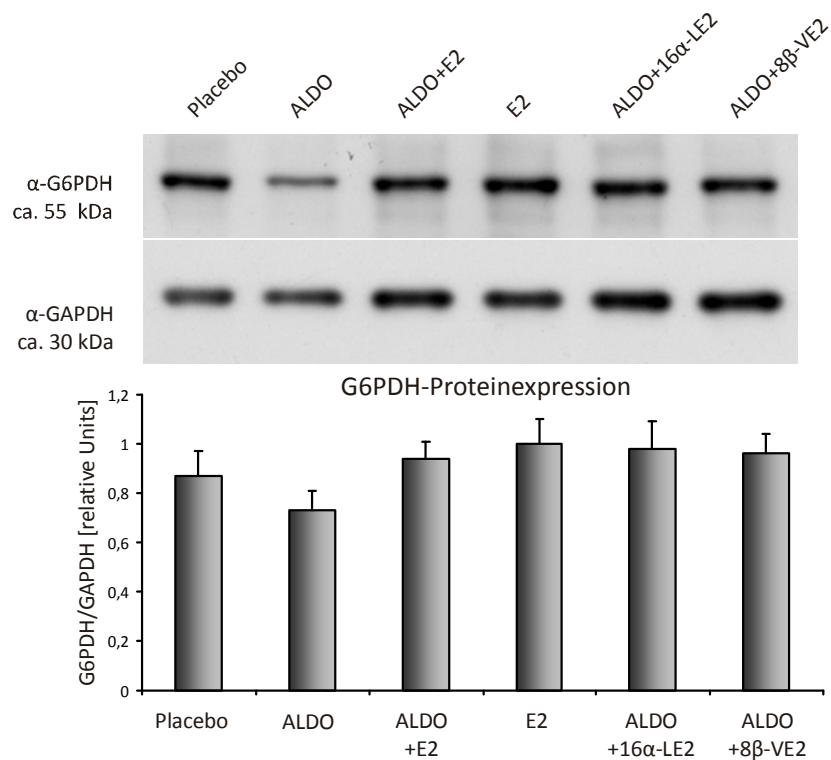


**Abb. 36: Quantifizierung der G6PDH-Aktivität in hormonbehandelten PRSMC**

Die Enzymaktivität der G6PDH in PRSMC, die für 48 h mit Placebo, ALDO, ALDO+E2, E2, ALDO+16 $\alpha$ -LE2 und ALDO+8 $\beta$ -VE2 behandelt waren (je 100 nM), wurde mittels eines G6PDH Assays bestimmt. MW $\pm$ SEM in mU/mg Protein [mU/mg] aus n=7-8 unabhängigen Versuchen.

\*p<0,05 ALDO (29,24 $\pm$ 1,32 mU/mg; n=8) vs. Placebo (34,52 $\pm$ 1,01 mU/mg; n=8), ALDO+E2 (34,89 $\pm$ 1,23 mU/mg; n=8) und E2 (34,22 $\pm$ 1,48 mU/mg; n=8). ALDO+16 $\alpha$ -LE2 (30,82 $\pm$ 1,14 mU/mg; n=7) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 (32,30 $\pm$ 1,15 mU/mg; n=7) n.s.

Die Untersuchung der Proteinexpression der G6PDH mittels Western Blot Analysen und die densitometrische Auswertung der Proteinbanden im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH (Abb. 37), ergab ferner eine reduzierte Proteinexpression bei ALDO-behandelten PRSMC (0,73 $\pm$ 0,08 rel. U.; n=7) im Vergleich zu den Placebo- (0,87 $\pm$ 0,10 rel. U.; n=7), ALDO+E2- (0,94 $\pm$ 0,07 rel. U.; n=7), E2- (1,00 $\pm$ 0,10 rel. U.; n=7), ALDO+16 $\alpha$ -LE2- (0,98 $\pm$ 0,11 rel. U.; n=7) und ALDO+8 $\beta$ -VE2-Gruppen (0,96 $\pm$ 0,08 rel. U.; n=7). Dieser Unterschied war deutlich zu erkennen, konnte allerdings nicht als statistisch signifikant erachtet werden.



**Abb. 37: Repräsentativer Western Blot und densitometrische Analyse der G6PDH-Proteinexpression**

Western Blot Analyse der G6PDH im Verhältnis zur Ladekontrolle GAPDH in PRSMC die für 48 h mit den Steroidhormonen ALDO ( $0,73 \pm 0,08$  rel. U.;  $n=7$ ), ALDO+E2 ( $0,94 \pm 0,07$  rel. U.;  $n=7$ ), E2 ( $1,00 \pm 0,10$  rel. U.;  $n=7$ ), ALDO+16 $\alpha$ -LE2 ( $0,98 \pm 0,11$  rel. U.;  $n=7$ ) und ALDO+8 $\beta$ -VE2 ( $0,96 \pm 0,08$  rel. U.;  $n=7$ ) sowie mit Placebo ( $0,87 \pm 0,10$  rel. U.;  $n=7$ ) behandelt waren. MW $\pm$ SEM in relativen Units [rel. U.] aus  $n=7$  unabhängigen Versuchen. n.s.

## 5 Diskussion

Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies und daraus resultierender oxidativer Stress spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie vaskulärer Dysfunktionen.<sup>24-26, 30, 31</sup>

Zahlreiche Studien belegen, dass pathophysiologisch erhöhte Serumwerte des Mineralocorticoids ALDO und/oder eine exzessive Aktivierung des Mineralocorticoidrezeptors zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und zur Progredienz hypertrophischer, entzündlicher und fibrosierender Umbauprozesse im Herz-Kreislaufsystem führen.<sup>246, 247</sup> Hierbei spielen vor allem die erhöhte Generierung und Freisetzung von ROS und der daraus resultierende oxidative Stress eine kausale Rolle. Innerhalb des Gefäßsystems führt der MR-induzierte oxidative Stress zu Einschränkungen der Gefäßfunktion. Daraus kann durch eine lokale Inflammation der Gefäßwände und einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit eine endotheliale Dysfunktion und ein dauerhafter pathologischer Umbau der Gefäßwände resultieren.<sup>190, 191, 195, 209, 211, 216, 221, 223</sup>

Im Gegensatz zum Steroidhormon ALDO werden dem weiblichen Sexualsteroid Estrogen protektive Eigenschaften im Herz-Kreislaufsystem zugesprochen. Epidemiologische Studien belegen, dass das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen mit dem Beginn der Menopause und einer damit charakterisierten Depletion von endogenem Estrogen drastisch steigt.<sup>117, 118, 248, 249</sup> Estrogene hemmen über die Bindung an ihre zwei Estrogenrezeptor-Subtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  die Entwicklung einer Myokardhypertrophie, sie tragen zur Aufrechterhaltung der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit bei, besitzen einen günstigen Einfluss auf den vaskulären Tonus und wirken überdies antiinflammatorisch und antikoagulierend.<sup>155-157, 250, 251</sup> Außerdem besitzen Estrogene antioxidative Eigenschaften, die wiederum einen entscheidenden und protektiven Einfluss auf die Integrität der Gefäße ausüben.<sup>141, 162, 164, 252</sup>

Ziel dieser Arbeit war die Arbeitshypothese „Estrogene und Aldosteron besitzen divergente / antagonistische Effekte auf die lokale ROS-Generierung in glatten Gefäßmuskelzellen“. Ferner sollten neue Erkenntnisse über die protektiven und molekularen Wirkungsmechanismen von Estrogenen im Hinblick auf die pathophysiologische Wirkung einer verstärkten MR-Aktivierung durch ALDO gewonnen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate bestätigen erstmalig, dass E2 und die spezifischen ER-Agonisten 16 $\alpha$ -LE2 und 8 $\beta$ -VE2 über einen ER-vermittelten Wirkungsmechanismus das Potential besitzen, die ALDO-induzierte lokale ROS-Generierung in PRSMC zu unterbinden. Dieser Effekt basiert auf der Aufrechterhaltung der G6PDH-Aktivität durch E2, wodurch die intrazelluläre NADPH-Bioverfügbarkeit gewährleistet wird.

Das Reduktionsäquivalent NADPH besitzt im antioxidativen System der Zellen eine besondere Funktion, da es die zelluläre Redox-Homöostase entscheidend beeinflusst.

NADPH ist zum einen für die Regeneration von reduziertem aus oxidiertem Glutathion essentiell, da es der Glutathion-Reduktase als Kofaktor bei der Reduktion von GSSG zu GSH dient. GSH wiederum fungiert innerhalb der Zelle sowohl als indirektes als auch als direktes Antioxidant und begünstigt auf diese Weise das zelluläre Redox-Potential. Als Kofaktor für die zwei Enzyme Glutathion-Peroxidase und Glutaredoxin ist GSH indirekt an der Neutralisation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O sowie am Schutz zytoplasmatischer Proteine vor irreversibler Oxidation durch ROS beteiligt. Außerdem ist GSH in der Lage ROS direkt zu reduzieren.<sup>83-85</sup>

NADPH übt ferner auch einen Einfluss auf die Integrität des Thioredoxin-Systems aus, das, wie das Glutaredoxin-System, dazu beiträgt Proteine in ihrer reduzierten Form zu erhalten und somit vor oxidativer Schädigung zu schützen. Die Thioredoxin-Enzyme werden bei dieser Reaktion selbst oxidiert. Erst durch die Aktivität der Thioredoxin-Reduktase (deren Aktivität im Verlauf dieser Arbeit nicht analysiert wurde), die ebenfalls auf NADPH als Kofaktor angewiesen ist, werden diese Enzyme wieder reduziert.<sup>86</sup>

Daneben benötigt auch das antioxidative Enzym Katalase für die Erhaltung seiner Enzymaktivität NADPH. Da die Katalase durch ihr toxisches Substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> langsam inaktiviert wird, und dieser Prozess durch die Oxidation von NADPH unterbunden bzw. umgekehrt werden kann, kommt dem NADPH hierbei eine weitere und wichtige Funktion bei der Neutralisation von reaktiven Peroxiden zu.<sup>73, 253</sup>

Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ALDO oxidativen Stress durch eine vermehrte lokale ROS-Generierung in PRSMC induziert. Ferner konnte eine signifikant reduzierte intrazelluläre NADPH-Konzentration in ALDO-behandelten Zellen im Vergleich zu Placebo- und Estrogen-kosupplementierten PRSMC belegt werden. Die Supplementation von NADPH zu ALDO-behandelten Zellen erbrachte schließlich den Nachweis, dass NADPH das

antioxidative Potential in diesen Zellen günstig beeinflusst und der lokalen ALDO-induzierten ROS-Generierung entgegenwirkt.

Diese Befunde sowie die Tatsache, dass ALDO+E2-, ALDO+16 $\alpha$ -LE2- und ALDO+8 $\beta$ -VE2-behandelte PRSMC signifikant erhöhte intrazelluläre NADPH-Konzentrationen und eine gleichzeitig reduzierte ROS-Generierung aufweisen, lassen den Schluss zu, dass das Reduktionsäquivalent NADPH eine zentrale Rolle im antioxidativen System der PRSMC spielt.

Die G6PDH, das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Pentosephosphatwegs, fungiert als ein Schlüsselenzym bei der intrazellulären Synthese von NADPH, weshalb die G6PDH auch als antioxidatives Enzym betrachtet wird.<sup>88, 254</sup> Durch zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurden diesem Enzym unter anderem im kardiovaskulären System wichtige antioxidative Funktionen nachgewiesen. So konnte z. B. in Ischämie-Reperfusionen Versuchen gezeigt werden, dass Mäuse mit einer myokardialen G6PDH-Defizienz auf die Progredienz einer kontraktile und diastolischen Dysfunktion sensibler reagieren. Zudem ließ sich bestätigen, dass die G6PDH-Aktivität und die intrazellulären GSH-Konzentration direkt miteinander korrelieren, und dass eine G6PDH-Überexpression in vaskulären Endothelzellen zu einer verminderten ROS-Generierung und infolgedessen zu einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit in diesen Zellen führt.<sup>92-94</sup> Leopold *et al.* belegten darüber hinaus, dass ALDO konzentrationsabhängig und MR-vermittelt in bovinen Endothelzellen die Akkumulation von ROS induziert, und dass dies auf einer Verminderung der G6PDH-Expression und damit auf einer geringeren G6PDH-Aktivität basiert.<sup>232</sup>

Dieser supprimierende ALDO-vermittelte Effekt auf die G6PDH-Aktivität, und die daraus resultierende Verminderung der intrazellulären NADPH-Konzentration, konnten innerhalb dieser Arbeit in PRSMC verifiziert werden. Zusätzlich und überdies zum ersten Mal wurde außerdem gezeigt, dass die Kosupplementation von E2 zu ALDO-behandelten PRSMC die G6PDH-Aktivität, entsprechend den Werten von Placebo-behandelten und nur mit E2-behandelten Zellen, konserviert bzw. die ALDO-induzierte Verminderung der G6PDH-Aktivität blockiert.

Eine Erhöhung der G6PDH-Aktivität durch E2 konnte bereits in MCF-7 Zellen, einer Brustkrebszelllinie, beschrieben werden;<sup>255</sup> ein Nachweis dieses Estrogen-Effekts in vaskulären Zellen und bezüglich der konträren Wirkung zu ALDO, erfolgte jedoch erstmalig in der vorliegenden Arbeit. E2 besitzt damit das Potential, der ALDO-induzierten ROS-Generierung in

PRSMC entgegenzuwirken, indem es durch eine erhöhte G6PDH-Aktivität die NADPH Bioverfügbarkeit gewährleistet und auf diese Weise das antioxidative Potential in diesen Zellen aufrecht erhält (Abb. 38).

Die Untersuchungen der intrazellulären Glutathion-Konzentrationen stützen diesen Mechanismus. Obwohl die Glutathion-Konzentration in ALDO+E2-behandelten Zellen im Vergleich zu nur mit ALDO-behandelten Zellen nicht signifikant erhöht war, ließ sich dennoch eine tendenzielle Erhöhung sowohl der totalen Glutathion-Konzentration als auch der GSH-Konzentration belegen, die wiederum mit der erhöhten NADPH-Konzentration in diesen Zellen korreliert.

E2 behandelte Zellen wiesen zwar eine erhöhte NAD- und NADP-Konzentration sowie eine im Vergleich zu ALDO-behandelten PRSMC signifikant erhöhte G6PDH-Aktivität auf, jedoch war die intrazelluläre NADPH-Konzentration in diesen Zellen nicht erhöht. Eine Ursache hierfür ist bislang noch nicht gefunden. Es wäre jedoch denkbar, dass es in E2-behandelte Zellen, die keine erhöhte ROS-Generierung aufweisen, keiner Erhöhung des antioxidativen Potentials bedarf und das durch die G6PDH generierte NADPH vermehrt für reduktive Biosynthesen verwendet wird.

Die beiden klassischen Estrogenrezeptor-Subtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  werden bei Männern und Frauen, in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen, und während der Progredienz bestimmter Erkrankungen, nicht nur unterschiedlich stark exprimiert, sondern besitzen nach ligandabhängiger Aktivierung zudem z. T. divergente Wirkungen. Dies wurde durch eine Vielzahl an *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen sowie durch Studien an ER-knockout Tieren belegt.<sup>256-259</sup>

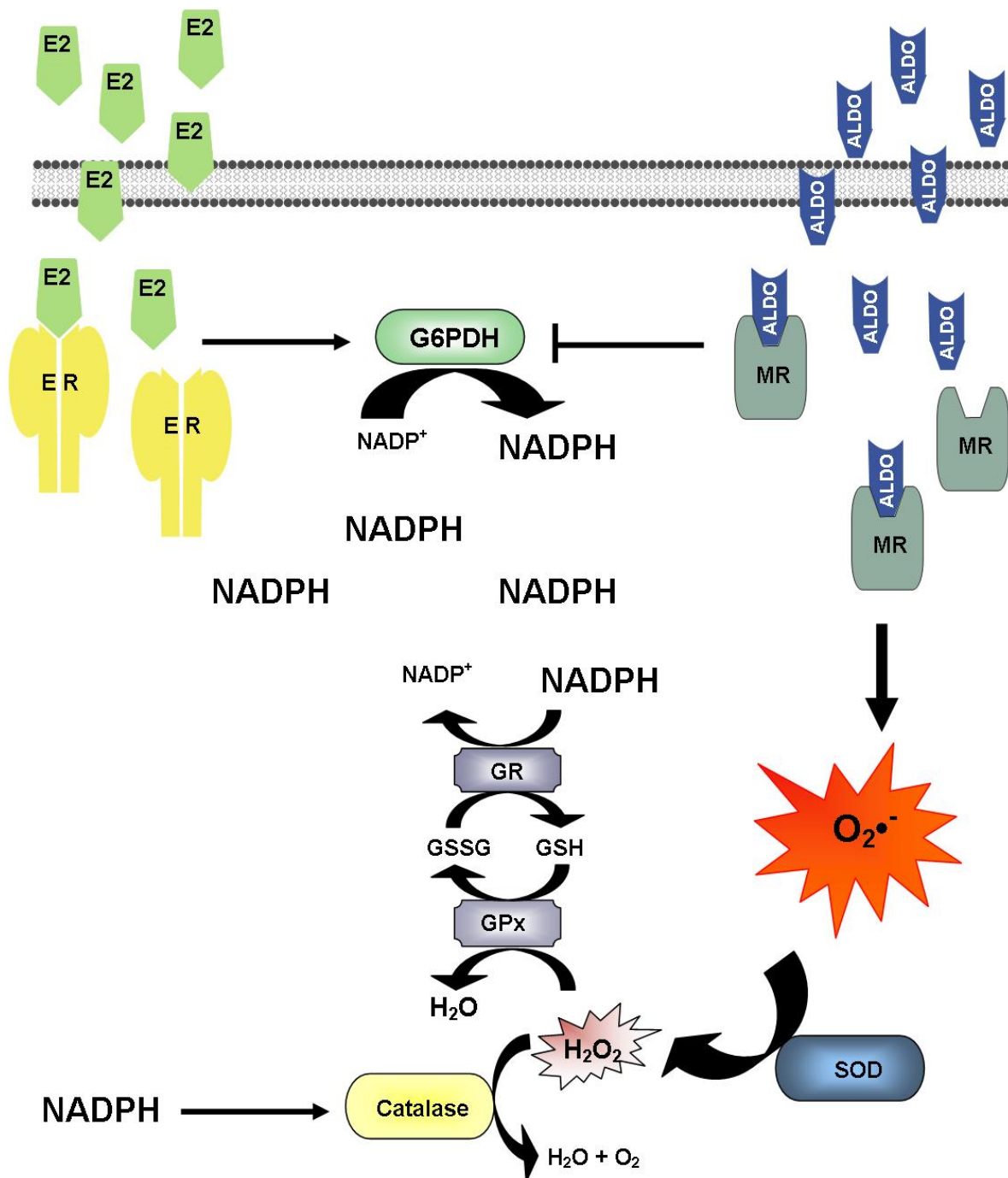
In ER $\alpha$ -knockout Mäusen konnte z. B. gezeigt werden, dass eine E2-vermittelte Schutzwirkung bezüglich vaskulärer Entzündungsreaktionen, im Vergleich zu wildtypischen Kontrollmäusen, fast vollständig inhibiert ist, und dass der ER $\alpha$ , im Gegensatz zum ER $\beta$ , bei vaskulären Entzündungsreaktionen protektive Wirkungen entfaltet.<sup>148, 260</sup> Der ER $\alpha$  besitzt zudem eine protektive Wirkung bei der Entwicklung endothelialer Dysfunktionen sowie eine wichtige Funktion bei der Regulation der eNOS-Expression und -Aktivität in Endothelzellen, wodurch die NO-Bioverfügbarkeit in diesen Zellen erhöht wird.<sup>128, 129, 261, 262</sup> Dem ER $\beta$  wiederum wird eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation zugesprochen, da ER $\beta$ -knockout Mäuse, im Vergleich zu wildtypischen Kontrollmäusen, eine Hypertonie entwickeln.<sup>132</sup> Außerdem konnte gezeigt werden, dass 8 $\beta$ -VE2, nicht jedoch 16 $\alpha$ -LE2, oder E2 das Potential besitzt, einen erhöhten systolischen Druck in ovariektomierten, spontan hypertensiven Ratten zu senken.<sup>157</sup> In dieser

Arbeit galt es daher mit den spezifischen ER-Agonisten 16 $\alpha$ -LE2 und 8 $\beta$ -VE2 zu prüfen, inwiefern die beiden ER-Subtypen redundante, spezifische oder gegensätzliche Effekte auf die ALDO-induzierten ROS-Generierung besitzen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beide ER-Subtypen in den PRSMC exprimiert werden, und dass ihre Proteinexpression, unabhängig von der jeweiligen Hormonbehandlung, nicht variierte und den basalen Werten entsprach. Sowohl 16 $\alpha$ -LE2 als auch 8 $\beta$ -VE2 konnten der ALDO-induzierten lokalen ROS-Generierung, ER $\alpha$ - sowie ER $\beta$ -vermittelt, entgegenwirken. Die ER-Abhängigkeit dieses Effekts konnte durch die Supplementation der Zellen mit dem ER-spezifischen Antagonisten ICI verifiziert werden, wodurch die Wirkung beider ER-Subtypen hinsichtlich der ALDO-induzierten ROS-Generierung als redundant erachtet werden konnte.

Des Weiteren ließ sich eine signifikante Erhöhung der NADPH-Konzentration in ALDO+16 $\alpha$ -LE2- sowie in ALDO+8 $\beta$ -VE2-behandelten Zellen im Vergleich zu nur mit ALDO-behandelten PRSMC nachweisen, was ebenfalls auf eine redundante Wirkung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  hindeutet. Jedoch konnte in diesen zwei Behandlungsgruppen keine erhöhte G6PDH-Aktivität im Vergleich zu ALDO-behandelten Zellen belegt werden, was in diesem Fall auf einen additiven Effekt beider ER-Subtypen vermuten lässt.

Ein weiterer interessanter Befund hinsichtlich der ER-Spezifität betraf die totale NAD-Konzentration in hormonbehandelten PRSMC. ALDO+16 $\alpha$ -LE2-behandelte Zellen wiesen bezüglich ihrer totalen NAD-Konzentration keinen signifikanten Unterschied zu nur mit ALDO behandelten Zellen auf. In ALDO+8 $\beta$ -VE2-behandelten Zellen war die totale NAD-Konzentration jedoch signifikant erhöht. Die totale NADP- und NADPH-Konzentration in den mit 16 $\alpha$ -LE2 kosupplementierten Zellen zeigten jedoch wieder signifikant erhöhte Werte, im Vergleich zu ALDO-behandelten Zellen. Es bleibt zu klären, ob die Enzyme der NAD-Synthese und/oder die NAD-Kinase differenziell durch die ER-Subtypen reguliert werden. Zum einen wäre denkbar, dass die NAD-Synthese verstärkt durch den ER $\beta$  beeinflusst wird, womit sich die signifikant erhöhten NAD-Konzentrationen bei ALDO+E2-, E2- und ALDO+8 $\beta$ -VE2-behandelten Zellen erklären ließen. Des Weiteren könnte die ATP-abhängige NAD-Kinase, welche NAD<sup>+</sup> zu NADP<sup>+</sup> phosphoryliert,<sup>95</sup> verstärkt über den ER $\alpha$  reguliert werden. Auf diese Weise wären die erhöhten NADP- und NADPH-Konzentrationen in dieser Behandlungsgruppe nachvollziehbar. Eine Verifizierung dieser Hypothesen steht noch aus.





**Abb. 38: Die gegensätzlichen Effekte von ALDO und E2 auf das antioxidative System von PRSMC (schematisch)**

Die ligandabhängige Aktivierung des MR durch ALDO führt zu einer gesteigerten Generierung von Superoxidradikalen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) sowie zu einer verminderten Aktivität des NADPH generierenden Enzyms G6PDH.

Im Gegensatz dazu führt eine ligandabhängige Aktivierung der ER durch Estrogen (E2) zu einer Aufrechterhaltung der G6PDH-Aktivität, selbst wenn eine erhöhte MR-Aktivierung innerhalb der Zellen vorliegt. Hieraus resultiert eine konstante Bioverfügbarkeit des Reduktionsäquivalents NADPH, das eine zentrale Rolle im antioxidativen System der Zellen spielt. NADPH wird für die Regeneration von reduziertem (GSH) aus oxidiertem (GSSG) Glutathion durch die katalytische Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR) benötigt. GSH wiederum dient den Glutathion-Peroxidasen (GPx) als essentieller Kofaktor. Des Weiteren wird NADPH für die Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität der Katalase benötigt und besitzt wichtige Funktionen im Glutaredoxin- und Thioredoxin-System (hier nicht gezeigt), zwei weitere wichtige antioxidative Systeme der Zellen. GPx und Katalase neutralisieren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das durch die Enzymaktivität der Superoxid-Dismutasen (SOD) aus O<sub>2</sub><sup>•-</sup> generiert wird.

Abschließend lässt sich im Hinblick auf die Spezifität der beiden ER-Subtypen für den oben beschriebenen Mechanismus noch keine klare Aussage treffen. Eine gegensätzliche Funktion von ER $\alpha$  und ER $\beta$  lässt sich jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse weitgehend ausschließen.

Da ALDO-behandelte Zellen nicht nur signifikant geringere totale NADP- und NADPH-Konzentrationen, sondern auch eine signifikant verminderte intrazelluläre NAD-Konzentration aufwiesen, bleibt zukünftig noch zu klären, ob die verminderte NAD-Menge in diesen Zellen mit einer erhöhten Aktivität NAD<sup>+</sup>-verbrauchender Enzyme in einem kausalen Zusammenhang steht und/oder ob Estrogene eine inhibierende Wirkung auf diese Enzyme entfalten.

Eine Familie dieser Enzyme sind die Poly(ADP-Ribose)Polymerasen (PARP). PARP sind nukleäre Proteine, die durch verschiedene pathophysiologische Prozesse wie DNA-Strangbrüche infolge erhöhter ROS-Konzentrationen oder oxidativer Zellschädigungen aktiviert werden. Die Pathogenese zahlreicher CVD, wie z. B. Myokardinfarkt, Ischämie-Reperfusion, Herzinsuffizienz oder endotheliale Dysfunktion, ist mit einer erhöhten PARP-Aktivierung assoziiert.<sup>263</sup> PARP-1, die Hauptisoform dieser Enzymfamilie, fungiert als ein „Sensorprotein“ für DNA-Schädigungen, wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche, und benötigt nach seiner Aktivierung NAD<sup>+</sup> als Substrat. Bei der enzymatischen Reaktion von PARP-1 wird eine ADP-Ribose Einheit des NAD<sup>+</sup> auf nukleäre Proteine wie Histone oder aber auf das PARP-1 Enzym selbst übertragen, wodurch es zu einer schnellen Depletion des intrazellulären NAD<sup>+</sup>- und ATP-Pools kommt. Als Folge dieses Prozesses werden die Glykolyse und die mitochondriale Elektronentransportkette negativ beeinflusst, was wiederum zu zellulären Dysfunktionen führen kann.<sup>263-265</sup> Szabo *et al.* konnten eine dosisabhängige ANG II-induzierte Steigerung der PARP-1-Aktivität in murinen Endothelzellen belegen sowie eine verminderte endotheliale Dysfunktion in ANG II behandelten Mäusen, die entweder PARP-defizient waren oder mit PARP-Inhibitoren kosupplementiert wurden.<sup>266</sup> Dieser PARP-1 vermittelte Mechanismus könnte auch in ALDO-behandelten PRSMC von Bedeutung sein, wofür nicht nur die signifikant verminderte NAD-Menge spricht, sondern auch die signifikant erhöhte lokale ROS-Generierung und die verminderte antioxidative Kapazität in diesen Zellen. Eine *in vitro* Untersuchung an humanen Lungenepithelzellen und murinen Makrophagen belegte des Weiteren, dass E2 über einen ER $\alpha$ -vermittelten Effekt einen Einfluss auf die PARP-Aktivierung besitzt. In Abwesenheit von endogenem und exogenem

Estrogen kommt es nur zu einer moderaten Interaktion zwischen ER $\alpha$  und PARP, so dass dieses Enzym katalytisch aktiv ist und in der Lage ist DNA-Strangbrüche ausfindig zu machen. Durch die Supplementation von exogenem E2 zu den Zellen verstärkt sich die Interaktion zwischen ER $\alpha$  und PARP, wodurch PARP fest an die DNA bindet und dadurch seine Fähigkeit verliert, DNA-Schädigungen zu erkennen. Hierdurch wird die Aktivierung von PARP unterbunden und der NAD<sup>+</sup>-Depletion entgegengewirkt.<sup>267</sup>

PARP-1 spielt ferner auch eine wichtige Rolle bei der Induktion der Zellapoptose. Das Enzym reguliert hierbei in oxidativ geschädigten Zellen u.a. die Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors aus den Mitochondrien in den Nukleus, was schließlich die Fragmentierung der genomischen DNA zur Folge hat.<sup>268-270</sup> Bei diesem Apoptose-Mechanismus ist ebenfalls, durch die Inhibierung der PARP-Aktivität, mittels des aktivierten ER $\alpha$ , ein protektiver Effekt durch E2 vorstellbar. Auch die Befunde von Pelzer *et al.*, die eine signifikante Inhibierung der Zellapoptose durch E2, in Staurosporin-behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten, nachwiesen,<sup>271</sup> könnten durch diesen Mechanismus eine weitere Erklärung liefern.

Als Ursache für die ALDO-induzierte lokale ROS-Generierung in PRSMC kann eine gesteigerte Expression der NADPH Oxidase Untereinheit p67<sup>phox</sup> angesehen werden. p67<sup>phox</sup> besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der NADPH Oxidase und damit auf die Generierung von O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.<sup>42</sup> Eine Überexpression von p67<sup>phox</sup> sowie eine Erhöhung der ROS-Generierung konnte weder in Placebo- noch in nur mit E2-behandelten PRSMC gemessen werden. Folglich kann der Schluss gezogen werden, dass der Einfluss von ALDO auf die Expression der p67<sup>phox</sup> NADPH Oxidase Untereinheit in einem kausalen Zusammenhang mit der erhöhten ROS-Generierung in ALDO-behandelten Zellen steht. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien belegen einen Einfluss erhöhter ALDO-Serumwerte und/oder einer gesteigerten MR-Aktivierung auf die NADPH Oxidase Funktion.<sup>49, 219-224</sup> Dworakowski *et al.* wiesen ferner eine erhöhte p67<sup>phox</sup>-Expression in Patienten mit koronarer Herzerkrankung nach, und Pechánová *et al.* konnten zeigen, dass eine gesteigerte p67<sup>phox</sup>-Expression in Aorta und linkem Ventrikel von spontan hypertensiven Ratten, durch eine chronische Behandlung der Tiere mit dem NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin, nicht nur verringert werden kann, sondern dass die Apocynin-Applikation gleichfalls zu einer signifikanten Senkung des systolischen Blutdrucks führt.<sup>272, 273</sup>

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen der NADPH Oxidase Untereinheiten in dieser Arbeit belegen überdies, dass weder die Kosupplementation von E2 noch die spezifischen ER-Agonisten einen Einfluss auf die ALDO-induzierte Expression bzw. Aktivität der vaskulären NADPH Oxidase besitzen. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die signifikant geringere DHE-Oxidation in diesen Zellen nicht auf eine Estrogen-vermittelte Reduktion der  $O_2^{\bullet-}$ -Generierung, sondern vielmehr auf eine erhöhte ROS-Neutralisation zurückzuführen ist. Dies konnte, wie bereits beschrieben, auf Grund der erhöhten NADPH-Konzentrationen und der gesteigerten G6PDH-Expression und -Aktivität in den Zellen, die mit Estrogenen kosupplementiert wurden, tatsächlich gezeigt werden.

Strehlow *et al.* wiesen nach, dass E2 die ANG II-induzierte ROS-Generierung in glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta durch eine Erhöhung der ecSOD- und MnSOD-Expression und -Aktivität unterbinden kann.<sup>163</sup> Eine ähnliche ER-vermittelte Wirkung konnte innerhalb dieser Arbeit nicht belegt werden. Ursache hierfür kann zum einen sein, dass Strehlow *et al.* eine 10fach höhere Konzentration an E2 (1  $\mu$ M) verwendeten, als dies in der vorliegenden Arbeit der Fall war (100 nM E2). Zum anderen analysierten die Autoren den Estrogen-vermittelten Effekt nur in unbehandelten bzw. E2-behandelten Zellen und nicht in Kosupplementations-Experimenten in Anwesenheit von ANG II. In dieser Arbeit jedoch wurde die Wirkung von Estrogenen stets in ALDO-kosupplementierten Zellen untersucht.

Eine statistisch signifikante Erhöhung der Aktivität und/oder Proteinexpression der anderen antioxidativen Enzyme, wie Katalase und GPx, konnte ebenfalls nicht belegt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass 17 $\beta$ -Estradiol, 16 $\alpha$ -LE2 und 8 $\beta$ -VE2 dem ALDO-induzierten oxidativen Stress in PRSMC entgegenwirken, indem sie ER-vermittelt die ROS-Neutralisation über eine erhöhte NADPH-Bioverfügbarkeit in den Zellen, dies zumindest bei E2 über das NADPH-generierende Enzym G6PDH, begünstigen. Es konnte somit eine antioxidative und damit protektive Wirkung von Estrogenen bezüglich der ungünstigen Effekte von ALDO bzw. einer gesteigerten MR-Aktivierung, durch einen bislang nicht beschriebenen Mechanismus, belegt werden. Die innerhalb dieser Arbeit erzielten Befunde bleiben jedoch *in vivo* noch zu prüfen, ebenso wie die Spezifität dieser Estrogenwirkung in den unterschiedlichen kardivaskulären Gewebetypen und hinsichtlich einer geschlechtsspezifischen Abhängigkeit.

## 6 Literatur

1. Statistisches Bundesamt. Deutschland. Todesursachen. Herz-/Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigsten Todesursache. Available at: <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.psml>.
2. National Center for Health Statistics CfDCaP. Compressed mortality file: underlying cause of death, 1979to 2005. Available at: <http://wonder.cdc.gov/mortSQL.html>. Accessed September 15, 2008.
3. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. May 8 1999;353(9164):1547-1557.
4. National Institutes of Health NH, Lung, and Blood Institute. Incidence and Prevalence: 2006 Chart Book on Cardiovascular and Lung Diseases. Bethesda, Md: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2006. Available at: [http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/06a\\_ip\\_chtbk.pdf](http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/06a_ip_chtbk.pdf). Accessed October 17, 2007.
5. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. Mar 1995;25(3):305-313.
6. Pilote L, Dasgupta K, Guru V, Humphries KH, McGrath J, Norris C, Rabi D, Tremblay J, Alamian A, Barnett T, Cox J, Ghali WA, Grace S, Hamet P, Ho T, Kirkland S, Lambert M, Libersan D, O'Loughlin J, Paradis G, Petrovich M, Tagalakis V. A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease. *Cmaj*. Mar 13 2007;176(6):S1-44.
7. Peeters A, Mamun AA, Willekens F, Bonneux L. A cardiovascular life history. A life course analysis of the original Framingham Heart Study cohort. *Eur Heart J*. Mar 2002;23(6):458-466.
8. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. May 12 1998;97(18):1837-1847.
9. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. May 16 2001;285(19):2486-2497.
10. Pearson TA. New tools for coronary risk assessment: what are their advantages and limitations? *Circulation*. Feb 19 2002;105(7):886-892.

11. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Jr., Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*. Sep 28 1999;100(13):1481-1492.
12. Martins e Silva J, Saldanha C. Cardiovascular risk factors: hemorheologic and hemostatic components. *Rev Port Cardiol*. Feb 2007;26(2):161-182.
13. Grossman E. Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care*. Feb 2008;31 Suppl 2:S185-189.
14. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. Mar 10 2006;160(1):1-40.
15. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
16. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. Nov 2004;266(1-2):37-56.
17. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*. Aug-Oct 2005;26(4-5):340-352.
18. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. Jan 1999;11(1):1-14.
19. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. May 2004;11(9):1163-1182.
20. Kajiya M, Hirota M, Inai Y, Kiyooka T, Morimoto T, Iwasaki T, Endo K, Mohri S, Shimizu J, Yada T, Ogasawara Y, Naruse K, Ohe T, Kajiya F. Impaired NO-mediated vasodilation with increased superoxide but robust EDHF function in right ventricular arterial microvessels of pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 2007;292(6):H2737-2744.
21. Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res*. Jun 2004;49(6):543-549.
22. Liochev SI, Fridovich I. The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO<sub>2</sub>·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. Jan 1994;16(1):29-33.
23. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 2005;25(7):1332-1340.
24. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. Apr 2001;280(4):C719-741.
25. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. Nov 10 2000;87(10):840-844.

26. Griending KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 2000;20(10):2175-2183.
27. Prabha PS, Das UN, Koratkar R, Sagar PS, Ramesh G. Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Sep 1990;41(1):27-33.
28. Lip GY, Edmunds E, Nuttall SL, Landray MJ, Blann AD, Beevers DG. Oxidative stress in malignant and non-malignant phase hypertension. *J Hum Hypertens.* May 2002;16(5):333-336.
29. Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, Corrocher R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* Sep 1998;16(9):1267-1271.
30. Ruef J, Peter K, Nordt TK, Runge MS, Kubler W, Bode C. Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemost.* Sep 1999;82 Suppl 1:32-37.
31. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* Oct 2004;122(4):339-352.
32. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* Aug 2008;10(8):1343-1374.
33. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep.* Aug 1999;19(4):235-251.
34. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* Jun 2008;10(6):1115-1126.
35. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* Dec 30 1993;329(27):2002-2012.
36. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* Aug 1 2001;357(Pt 3):593-615.
37. Tschudi MR, Mesaros S, Luscher TF, Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension.* Jan 1996;27(1):32-35.
38. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett.* Apr 11 2003;140-141:105-112.
39. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 4 1998;95(16):9220-9225.

40. Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. Jul 2007;113(2):47-63.
41. Ago T, Nunoi H, Ito T, Sumimoto H. Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*. Nov 19 1999;274(47):33644-33653.
42. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*. Jan 15 2002;397(2):342-344.
43. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. Mar 1 1999;93(5):1464-1476.
44. DeLeo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol*. Dec 1996;60(6):677-691.
45. Burkard N. *Conditional overexpression of neuronal nitric oxide synthase is cardioprotective in ischemia-reperfusion*. Würzburg: Biologische Fakultät, Julius-Maximilians-Universität; 2010.
46. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. Jun 1994;74(6):1141-1148.
47. Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2000;20(8):1903-1911.
48. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*. Jun 18 2003;41(12):2164-2171.
49. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Aug 2003;285(2):R277-297.
50. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. Feb 2008;31 Suppl 2:S170-180.
51. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Nov 2004;287(5):R1014-1030.
52. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res*. Jun 13 2003;92(11):e80-86.
53. Touyz RM. Activated oxygen metabolites: do they really play a role in angiotensin II-regulated vascular tone? *J Hypertens*. Dec 2003;21(12):2235-2238.



54. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. Feb 4 1997;95(3):588-593.
55. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. May 12 2000;86(9):E85-90.
56. Parge HE, Hallewell RA, Tainer JA. Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 1 1992;89(13):6109-6113.
57. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. Nov 25 1969;244(22):6049-6055.
58. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. Oct 19 2001;276(42):38388-38393.
59. Hough MA, Hasnain SS. Structure of fully reduced bovine copper zinc superoxide dismutase at 1.15 Å. *Structure*. Aug 2003;11(8):937-946.
60. Shin DS, Didonato M, Barondeau DP, Hura GL, Hitomi C, Berglund JA, Getzoff ED, Cary SC, Tainer JA. Superoxide dismutase from the eukaryotic thermophile *Alvinella pompejana*: structures, stability, mechanism, and insights into amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Biol*. Feb 6 2009;385(5):1534-1555.
61. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1982;79(24):7634-7638.
62. Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension*. Sep 2006;48(3):473-481.
63. Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol*. Nov 1994;13(11):1127-1136.
64. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. Aug 15 2009;47(4):344-356.
65. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. Dec 1995;11(4):376-381.
66. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3 1996;93(18):9782-9787.

67. Nishida T, Sugiyama T, Kataoka A, Tashiro M, Yakushiji M, Ishikawa M. Serum manganese superoxide dismutase (MnSOD) and histological virulence of ovarian cancer. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol*. Dec 1993;19(4):427-431.
68. Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, Dinarello CA, Nerup J. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity*. 1994;19(3):169-178.
69. Loew O. A New Enzyme Of General Occurrence In Organisms. *Science*. May 4 1900;11(279):701-702.
70. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol*. Feb 11 2000;296(1):295-309.
71. Boon EM DA, Marcey D. "Proposed Mechanism of Catalase". Available at: <http://biology.kenyon.edu/BMB/Chime/catalase/frames/cattx.htm>. Accessed 2007-02-11.
72. Angermuller S, Islinger M, Volkl A. Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. *Histochem Cell Biol*. Apr 2009;131(4):459-463.
73. Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem*. Jan 15 1987;262(2):660-666.
74. Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem*. Jul 30 2004;279(31):32804-32812.
75. Goth L. Catalase deficiency and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. Dec 2008;31(12):e93.
76. Yang H, Shi M, VanRemmen H, Chen X, Vijg J, Richardson A, Guo Z. Reduction of pressor response to vasoconstrictor agents by overexpression of catalase in mice. *Am J Hypertens*. Jan 2003;16(1):1-5.
77. Stoytcheva ZR, Berry MJ. Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. *Biochim Biophys Acta*. Nov 2009;1790(11):1429-1440.
78. Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci*. Aug 2009;66(15):2457-2478.
79. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*. Aug 15 2007;43(4):477-503.
80. Ardanaz N, Yang XP, Cifuentes ME, Haurani MJ, Jackson KW, Liao TD, Carretero OA, Pagano PJ. Lack of glutathione peroxidase 1 accelerates cardiac-specific hypertrophy and dysfunction in angiotensin II hypertension. *Hypertension*. Jan;55(1):116-123.
81. Freedman JE, Loscalzo J, Benoit SE, Valeri CR, Barnard MR, Michelson AD. Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. *J Clin Invest*. Feb 15 1996;97(4):979-987.

82. Dabkowski ER, Williamson CL, Hollander JM. Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction. *Free Radic Biol Med*. Sep 15 2008;45(6):855-865.
83. Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem*. Jan 9 2009;284(2):723-727.
84. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. Nov 1999;27(9-10):916-921.
85. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. Mar 2004;134(3):489-492.
86. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. Oct 2000;267(20):6102-6109.
87. Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, Kitazono T, Tanizaki Y, Kubo M, Ueno H, Ibayashi S, Fujishima M, Iida M. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*. Sep 2004;35(9):2072-2077.
88. Berg MJ TJ, Stryer L. *Biochemie*. Vol 5. Auflage: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin; 2003.
89. UniProtKB/Swiss-Prot. Universität Genf, Schweiz; 2006.
90. Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *Faseb J*. Feb 1994;8(2):174-181.
91. Leopold JA, Loscalzo J. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Nov 2000;279(5):H2477-2485.
92. Leopold JA, Cap A, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *Faseb J*. Aug 2001;15(10):1771-1773.
93. Jain M, Brenner DA, Cui L, Lim CC, Wang B, Pimentel DR, Koh S, Sawyer DB, Leopold JA, Handy DE, Loscalzo J, Apstein CS, Liao R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates cytosolic redox status and contractile phenotype in adult cardiomyocytes. *Circ Res*. Jul 25 2003;93(2):e9-16.
94. Jain M, Cui L, Brenner DA, Wang B, Handy DE, Leopold JA, Loscalzo J, Apstein CS, Liao R. Increased myocardial dysfunction after ischemia-reperfusion in mice lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Circulation*. Feb 24 2004;109(7):898-903.
95. Ying W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*. Feb 2008;10(2):179-206.

96. Pollak N, Dolle C, Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem J.* Mar 1 2007;402(2):205-218.
97. Kirsch M, De Groot H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *Faseb J.* Jul 2001;15(9):1569-1574.
98. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* Jan 31 2002;346(5):340-352.
99. Smiley DA, Khalil RA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Curr Med Chem.* 2009;16(15):1863-1887.
100. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11 1996;93(12):5925-5930.
101. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scraze G, Waterfield M, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1985;82(23):7889-7893.
102. Mueller SO, Korach KS. Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr Opin Pharmacol.* Dec 2001;1(6):613-619.
103. Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev.* Jun 2008;60(2):210-241.
104. Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab.* Mar 2004;15(2):73-78.
105. Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology.* Dec 2006;147(12):5557-5563.
106. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science.* Dec 1 1995;270(5241):1491-1494.
107. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J.* May 1 1996;15(9):2174-2183.
108. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* Mar 13-19 1986;320(6058):134-139.
109. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell.* Nov 3 1989;59(3):477-487.

110. Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol*. May 2002;16(5):938-946.
111. Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto KR. Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul*. Feb 1990;1(3):291-299.
112. Yang J, Singleton DW, Shaughnessy EA, Khan SA. The F-domain of estrogen receptor-alpha inhibits ligand induced receptor dimerization. *Mol Cell Endocrinol*. Nov 25 2008;295(1-2):94-100.
113. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol*. Feb 2007;265-266:138-142.
114. Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, Otto C. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids*. Aug-Sep;75(8-9):603-610.
115. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. Mar 1997;138(3):863-870.
116. Gustafsson JA. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci*. Sep 2003;24(9):479-485.
117. Crabbe DL, Dipla K, Ambati S, Zafeiridis A, Gaughan JP, Houser SR, Margulies KB. Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts. *J Am Coll Cardiol*. Jan 15 2003;41(2):300-306.
118. Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med*. Oct 1976;85(4):447-452.
119. Hayward CS, Kelly RP, Collins P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res*. Apr 2000;46(1):28-49.
120. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. Jun 10 1999;340(23):1801-1811.
121. Knopp RH, Zhu X, Bonet B. Effects of estrogens on lipoprotein metabolism and cardiovascular disease in women. *Atherosclerosis*. Oct 1994;110 Suppl:S83-91.
122. Dubey RK, Imthurn B, Zacharia LC, Jackson EK. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: what went wrong and where do we go from here? *Hypertension*. Dec 2004;44(6):789-795.
123. Manson JE, Martin KA. Clinical practice. Postmenopausal hormone-replacement therapy. *N Engl J Med*. Jul 5 2001;345(1):34-40.

124. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama*. Jul 3 2002;288(1):49-57.
125. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. Jul 17 2002;288(3):321-333.
126. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama*. Aug 19 1998;280(7):605-613.
127. Miller VM, Mulvagh SL. Sex steroids and endothelial function: translating basic science to clinical practice. *Trends Pharmacol Sci*. Jun 2007;28(6):263-270.
128. Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res*. Nov 1997;81(5):885-892.
129. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest*. Feb 1999;103(3):401-406.
130. McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN, Kontos HA. Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke*. Oct 1999;30(10):2186-2190.
131. Stirone C, Chu Y, Sunday L, Duckles SP, Krause DN. 17 Beta-estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Pharmacol*. Sep 30 2003;478(1):35-38.
132. Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science*. Jan 18 2002;295(5554):505-508.
133. Ospina JA, Krause DN, Duckles SP. 17beta-estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase. *Stroke*. Feb 2002;33(2):600-605.
134. Sherman TS, Chambliss KL, Gibson LL, Pace MC, Mendelsohn ME, Pfister SL, Shaul PW. Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. May 2002;26(5):610-616.

135. Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension*. Feb 2001;37(2 Part 2):640-644.
136. Best PJ, Berger PB, Miller VM, Lerman A. The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. Feb 15 1998;128(4):285-288.
137. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*. Jan 1999;33(1 Pt 2):323-328.
138. Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*. Jun 9 1998;97(22):2197-2201.
139. Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen YF, Oparil S. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation*. Sep 21 2004;110(12):1664-1669.
140. Xing D, Miller A, Novak L, Rocha R, Chen YF, Oparil S. Estradiol and progestins differentially modulate leukocyte infiltration after vascular injury. *Circulation*. Jan 20 2004;109(2):234-241.
141. Speir E, Yu ZX, Takeda K, Ferrans VJ, Cannon RO, 3rd. Antioxidant effect of estrogen on cytomegalovirus-induced gene expression in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*. Dec 12 2000;102(24):2990-2996.
142. Sharma RV, Gurjar MV, Bhalla RC. Selected contribution: estrogen receptor-alpha gene transfer inhibits proliferation and NF-kappaB activation in VSM cells from female rats. *J Appl Physiol*. Nov 2001;91(5):2400-2406; discussion 2389-2490.
143. Kolodgie FD, Jacob A, Wilson PS, Carlson GC, Farb A, Verma A, Virmani R. Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Pathol*. Mar 1996;148(3):969-976.
144. Bhalla RC, Toth KF, Bhatta RA, Thompson LP, Sharma RV. Estrogen reduces proliferation and agonist-induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*. Apr 1997;272(4 Pt 2):H1996-2003.
145. Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation*. Feb 1 1995;91(3):755-763.
146. Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation*. Apr 1 1997;95(7):1768-1772.

147. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation*. Mar 18 1997;95(6):1505-1514.
148. Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation*. Jan 23 2001;103(3):423-428.
149. Karas RH, Hodgin JB, Kwoun M, Kregge JH, Aronovitz M, Mackey W, Gustafsson JA, Korach KS, Smithies O, Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 21 1999;96(26):15133-15136.
150. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *Jama*. Jan 18 1995;273(3):199-208.
151. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*. Oct 13 1997;416(1):107-112.
152. Zhai P, Eurell TE, Cooke PS, Lubahn DB, Gross DR. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 2000;278(5):H1640-1647.
153. Pelzer T, Loza PA, Hu K, Bayer B, Dienesch C, Calvillo L, Couse JF, Korach KS, Neyses L, Ertl G. Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction. *Circulation*. Mar 29 2005;111(12):1492-1498.
154. Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Seeland U, Hetzer R. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circ J*. 74(7):1265-1273.
155. Widder J, Pelzer T, von Poser-Klein C, Hu K, Jazbutyte V, Fritzscheier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Bauersachs J. Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor-alpha stimulation in ovariectomized SHR. *Hypertension*. Nov 2003;42(5):991-996.
156. Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, Bonz AW, Muck J, Fritzscheier KH, Hegele-Hartung C, Ertl G, Neyses L. The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. Sep 1 2005;67(4):604-612.
157. Jazbutyte V, Arias-Loza PA, Hu K, Widder J, Govindaraj V, von Poser-Klein C, Bauersachs J, Fritzscheier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Ertl G, Pelzer T. Ligand-dependent activation of ER{beta} lowers blood pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. Mar 1 2008;77(4):774-781.



158. Arias-Loza PA, Hu K, Dienesch C, Mehlich AM, König S, Jazbutyte V, Neyses L, Hegele-Hartung C, Heinrich Fritzemeier K, Pelzer T. Both estrogen receptor subtypes, alpha and beta, attenuate cardiovascular remodeling in aldosterone salt-treated rats. *Hypertension*. Aug 2007;50(2):432-438.
159. Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Fritschka S, Pham TH, Regitz-Zagrosek V. 17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts. *Cardiovasc Res*. Mar 1;85(4):719-728.
160. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. Aug 2007;6(8):662-680.
161. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*. Apr 1997;51(4):535-541.
162. Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J, Inoue S, Kondo T. 17Beta-estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardial H9c2 cells. *J Biol Chem*. May 12 2006;281(19):13092-13102.
163. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*. Jul 25 2003;93(2):170-177.
164. Florian M, Freiman A, Magder S. Treatment with 17-beta-estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. *Steroids*. Dec 2004;69(13-14):779-787.
165. Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Böhm M, Nickenig G. Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem*. Feb 21 2003;278(8):5956-5962.
166. Zhang L, Fujii S, Kosaka H. Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*. Feb 2007;25(2):407-414.
167. Duckles SP, Krause DN, Stirone C, Procaccio V. Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol Interv*. Feb 2006;6(1):26-35.
168. Sack MN, Rader DJ, Cannon RO, 3rd. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet*. Jan 29 1994;343(8892):269-270.
169. Horn F MI, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G. *Biochemie des Menschen*. Vol 3. Auflage: Thieme; 2005.
170. Yoshimoto T, Hirata Y. Aldosterone as a cardiovascular risk hormone. *Endocr J*. Jun 2007;54(3):359-370.
171. Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Mar 2008;17(2):174-180.

172. Fuller PJ, Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension*. Dec 2005;46(6):1227-1235.
173. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids*. Feb 2000;65(2):61-73.
174. Morrison N, Harrap SB, Arriza JL, Boyd E, Connor JM. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum Genet*. Jun 1990;85(1):130-132.
175. Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol*. Sep 2005;19(9):2211-2221.
176. Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 19 1995;92(26):12480-12484.
177. Hultman ML, Krasnoperova NV, Li S, Du S, Xia C, Dietz JD, Lala DS, Welsch DJ, Hu X. The ligand-dependent interaction of mineralocorticoid receptor with coactivator and corepressor peptides suggests multiple activation mechanisms. *Mol Endocrinol*. Jun 2005;19(6):1460-1473.
178. Gekle M, Grossmann C. Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflugers Arch*. Jun 2009;458(2):231-246.
179. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal*. 2007;5:e012.
180. Moguilewsky M, Raynaud JP. Evidence for a specific mineralocorticoid receptor in rat pituitary and brain. *J Steroid Biochem*. Jan 1980;12:309-314.
181. Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res*. Sep 1992;71(3):503-510.
182. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension*. Feb 2007;49(2):355-364.
183. Funder JW. Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Mol Cell Endocrinol*. Mar 31 2004;217(1-2):263-269.
184. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Campbell J. Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*. Oct 1989;125(4):2224-2226.
185. Hadoke PW, Christy C, Kotelevtsev YV, Williams BC, Kenyon CJ, Seckl JR, Mullins JJ, Walker BR. Endothelial cell dysfunction in mice after transgenic knockout of type 2, but not type 1, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Circulation*. Dec 4 2001;104(23):2832-2837.
186. Christy C, Hadoke PW, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR, Walker BR. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mouse aorta: localization and influence on response to glucocorticoids. *Hypertension*. Oct 2003;42(4):580-587.

187. Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ, Funder JW, McMahon EG. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*. Jul 11 2003;93(1):69-76.
188. Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM. Clinical Characteristics Of Primary Aldosteronism From An Analysis Of 145 Cases. *Am J Surg*. Jan 1964;107:159-172.
189. Giacchetti G, Turchi F, Boscaro M, Ronconi V. Management of primary aldosteronism: its complications and their outcomes after treatment. *Curr Vasc Pharmacol*. Apr 2009;7(2):244-249.
190. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol*. May 1993;25(5):563-575.
191. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med*. Dec 1992;120(6):893-901.
192. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 1994;26(7):809-820.
193. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med*. Jun 4 1987;316(23):1429-1435.
194. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation*. Nov 1990;82(5):1730-1736.
195. Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, Meinitzer A, Boehm BO, Marz W. Plasma aldosterone levels are associated with increased cardiovascular mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Eur Heart J*. May;31(10):1237-1247.
196. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. Sep 2 1999;341(10):709-717.
197. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. Apr 3 2003;348(14):1309-1321.
198. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*. Dec 1990;67(6):1355-1364.
199. Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res*. Jul 1991;69(1):107-115.

- 
200. Rocha R, Stier CT, Jr., Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, Adler GK. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology*. Oct 2000;141(10):3871-3878.
201. Sun Y, Zhang J, Lu L, Bedigian MP, Robinson AD, Weber KT. Tissue angiotensin II in the regulation of inflammatory and fibrogenic components of repair in the rat heart. *J Lab Clin Med*. Jan 2004;143(1):41-51.
202. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology*. Dec 2002;143(12):4828-4836.
203. Cleland JG, Tendera M, Adamus J, Freemantle N, Polonski L, Taylor J. The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *Eur Heart J*. Oct 2006;27(19):2338-2345.
204. Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet*. Sep 6 2003;362(9386):777-781.
205. Harada E, Yoshimura M, Yasue H, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, Mizuno Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Ito T, Nakamura S, Kuwahara K, Saito Y, Nakao K, Ogawa H. Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation*. Jul 10 2001;104(2):137-139.
206. Sugiyama T, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Gochou N, Hirono Y, Tateno T, Fukai N, Shichiri M, Hirata Y. Aldosterone induces angiotensin converting enzyme gene expression via a JAK2-dependent pathway in rat endothelial cells. *Endocrinology*. Sep 2005;146(9):3900-3906.
207. Schiffrin EL, Franks DJ, Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*. Dec 1985;63(12):1522-1527.
208. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*. Apr 1999;33(4):981-986.
209. Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, Vinson GP. Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension*. Sep 2004;44(3):340-345.
210. Whaley-Connell A, Johnson MS, Sowers JR. Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. Mar-Apr;52(5):401-409.
211. Cachofeiro V, Miana M, de Las Heras N, Martin-Fernandez B, Ballesteros S, Fernandez-Tresguerres J, Lahera V. Aldosterone and the vascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Apr 2008;109(3-5):331-335.

212. Chun TY, Bloem LJ, Pratt JH. Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*. May 2003;144(5):1712-1717.
213. Hazan-Halevy I, Levy T, Wolak T, Lubarsky I, Levy R, Paran E. Stimulation of NADPH oxidase by angiotensin II in human neutrophils is mediated by ERK, p38 MAP-kinase and cytosolic phospholipase A2. *J Hypertens*. Jun 2005;23(6):1183-1190.
214. Ullian ME, Schelling JR, Linas SL. Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension*. Jul 1992;20(1):67-73.
215. Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M. Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jun 2007;292(6):E1790-1800.
216. Viridis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*. Oct 2002;40(4):504-510.
217. Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *Faseb J*. Jul 2006;20(9):1546-1548.
218. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension*. Apr 2005;45(4):773-779.
219. Calo LA, Zaghetto F, Pagnin E, Davis PA, De Mozzi P, Sartorato P, Martire G, Fiore C, Armanini D. Effect of aldosterone and glycyrrhetic acid on the protein expression of PAI-1 and p22(phox) in human mononuclear leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. Apr 2004;89(4):1973-1976.
220. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, Coleman R, Hayek T, Hamoud S, Aviram M. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation*. May 11 2004;109(18):2213-2220.
221. Hirono Y, Yoshimoto T, Suzuki N, Sugiyama T, Sakurada M, Takai S, Kobayashi N, Shichiri M, Hirata Y. Angiotensin II receptor type 1-mediated vascular oxidative stress and proinflammatory gene expression in aldosterone-induced hypertension: the possible role of local renin-angiotensin system. *Endocrinology*. Apr 2007;148(4):1688-1696.
222. Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens Res*. Nov 2005;28(11):925-936.
223. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol*. Nov 2002;161(5):1773-1781.

224. Nagata D, Takahashi M, Sawai K, Tagami T, Usui T, Shimatsu A, Hirata Y, Naruse M. Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension*. Jul 2006;48(1):165-171.
225. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. Jun 1994;93(6):2578-2583.
226. Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest*. Aug 15 1996;98(4):1063-1068.
227. Benetos A, Lacolley P, Safar ME. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jun 1997;17(6):1152-1156.
228. Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C, Benetos A. Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol*. Feb 2001;37(2):662-667.
229. Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation*. Feb 15 2000;101(6):594-597.
230. Bauersachs J, Heck M, Fraccarollo D, Hildemann SK, Ertl G, Wehling M, Christ M. Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Am Coll Cardiol*. Jan 16 2002;39(2):351-358.
231. Rude MK, Duhane TA, Kuster GM, Judge S, Heo J, Colucci WS, Siwik DA, Sam F. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension*. Sep 2005;46(3):555-561.
232. Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B, Loscalzo J. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med*. Feb 2007;13(2):189-197.
233. Arias-Loza PA, Hu K, Schafer A, Bauersachs J, Quaschnig T, Galle J, Jazbutyte V, Neyses L, Ertl G, Fritzeimer KH, Hegele-Hartung C, Pelzer T. Medroxyprogesterone acetate but not drospirenone ablates the protective function of 17 beta-estradiol in aldosterone salt-treated rats. *Hypertension*. Nov 2006;48(5):994-1001.
234. Laurindo FR, Fernandes DC, Santos CX. Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. *Methods Enzymol*. 2008;441:237-260.
235. Fernandes DC, Wosniak J, Jr., Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, Santos CX. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jan 2007;292(1):C413-422.

- 
236. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7 1976;72:248-254.
237. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem.* Oct 1988;174(1):331-336.
238. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW, Jr. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem.* Feb 1 1990;184(2):193-199.
239. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* Mar 1969;27(3):502-522.
240. Eyer P, Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Anal Biochem.* Feb 15 1986;153(1):57-66.
241. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem.* Nov 1 1990;190(2):360-365.
242. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* Jul 15 1980;106(1):207-212.
243. <http://www.worthington-biochem.com/zf/assay.html>.
244. Milhausen M, Levy HR. Evidence for an essential lysine in glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Eur J Biochem.* Jan 2 1975;50(2):453-461.
245. Zhang A, Jia Z, Guo X, Yang T. Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin. *Am J Physiol Renal Physiol.* Sep 2007;293(3):F723-731.
246. Vasan RS, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sundstrom J, Murabito JM, Sam F, Colucci WS, Wilson PW. Relations of serum aldosterone to cardiac structure: gender-related differences in the Framingham Heart Study. *Hypertension.* May 2004;43(5):957-962.
247. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, McMahon EG, Delyani JA. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Nov 2002;283(5):H1802-1810.
248. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* Apr 30 1987;316(18):1105-1110.
249. Wenger NK, Speroff L, Packard B. Cardiovascular health and disease in women. *N Engl J Med.* Jul 22 1993;329(4):247-256.
250. Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol.* Jun 20 2002;89(12A):12E-17E; discussion 17E-18E.

251. Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res*. Sep 2003;36(9):1143-1158.
252. Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Mar 2009;29(3):289-295.
253. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 1984;81(14):4343-4347.
254. Xu Y, Zhang Z, Hu J, Stillman IE, Leopold JA, Handy DE, Loscalzo J, Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice have increased renal oxidative stress and increased albuminuria. *Faseb J*. Feb;24(2):609-616.
255. Kim KB, Seo KW, Kim YJ, Park M, Park CW, Kim PY, Kim JI, Lee SH. Estrogenic effects of phenolic compounds on glucose-6-phosphate dehydrogenase in MCF-7 cells and uterine glutathione peroxidase in rats. *Chemosphere*. Mar 2003;50(9):1167-1173.
256. Luksha L, Kublickiene K. The role of estrogen receptor subtypes for vascular maintenance. *Gynecol Endocrinol*. Feb 2009;25(2):82-95.
257. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev*. Dec 2006;58(4):773-781.
258. Hodges YK, Tung L, Yan XD, Graham JD, Horwitz KB, Horwitz LD. Estrogen receptors alpha and beta: prevalence of estrogen receptor beta mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation*. Apr 18 2000;101(15):1792-1798.
259. Cruz MN, Agewall S, Schenck-Gustafsson K, Kublickiene K. Acute dilatation to phytoestrogens and estrogen receptor subtypes expression in small arteries from women with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. Jan 2008;196(1):49-58.
260. Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res*. May 31 2002;90(10):1087-1092.
261. Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, Rubanyi GM. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet*. Apr 19 1997;349(9059):1146-1147.
262. Sumi D, Ignarro LJ. Estrogen-related receptor alpha 1 up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 25 2003;100(24):14451-14456.
263. Pacher P, Szabo C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev*. Fall 2007;25(3):235-260.
264. Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*. Sep 2002;54(3):375-429.



- 
265. Hassa PO, Hottiger MO. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci.* Sep 2002;59(9):1534-1553.
266. Szabo C, Pacher P, Zsengeller Z, Vaslin A, Komjati K, Benko R, Chen M, Mabley JG, Kollai M. Angiotensin II-mediated endothelial dysfunction: role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Mol Med.* Jan-Jun 2004;10(1-6):28-35.
267. Mabley JG, Horvath EM, Murthy KG, Zsengeller Z, Vaslin A, Benko R, Kollai M, Szabo C. Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Pharmacol Exp Ther.* Nov 2005;315(2):812-820.
268. Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 28 2006;103(48):18308-18313.
269. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* Jul 12 2002;297(5579):259-263.
270. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 28 2006;103(48):18314-18319.
271. Pelzer T, Schumann M, Neumann M, deJager T, Stimpel M, Serfling E, Neyses L. 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 5 2000;268(1):192-200.
272. Dworakowski R, Walker S, Momin A, Desai J, El-Gamel A, Wendler O, Kearney MT, Shah AM. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived superoxide and vascular endothelial dysfunction in human heart failure. *J Am Coll Cardiol.* Apr 8 2008;51(14):1349-1356.
273. Pechanova O, Jendekova L, Vrankova S. Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneous hypertension. *Pharmacol Rep.* Jan-Feb 2009;61(1):116-122.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$\alpha$	alpha; anti (bei Antikörper)
16 $\alpha$ -LE2	3.17-dihydroxy-19-nor-17 $\alpha$ -pregna-1,3,5(10)-triene-21,16 $\alpha$ -lactone
$\beta$	beta
8 $\beta$ -VE2	8-vinylestra-1,3,5(10)-triene-3,17 $\beta$ -diol
11 $\beta$ -HSD2	11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ2
$\mu$	mikro
A	Aldehyd
Abb.	Abbildung
ad	bis/auf
ACE	engl. angiotensin converting enzyme, Angiotensin-konvertierendes Enzym
AF	Aktivierungsfunktion
AH <sub>2</sub>	kurzkettiger Alkohol
ALDO	Aldosteron
AMP	Adenosin-Monophosphat-Nukleotid
ANG II	Angiotensin II
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AR	Androgenrezeptor
AST	engl. aldosterone salt treatment, Aldosteronbehandlung bei Ratten in Zusammenhang mit einer salzreichen Ernährung
AT	Angiotensinrezeptor
ATP	Adenosin-Triphosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosin-Monophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CO <sub>3</sub> <sup>•-</sup>	Kohlenstofftrioxid-Radikal
CONSENSUS	Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study

---

Cu	Kupfer
CU/ZnSOD	Kupfer/Zink Superoxid-Dismutase
CVD	engl. cardiovascular diseases, Herz-Kreislaufkrankungen
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DHE	Dihydroethidium
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdeoxycholat
DTNB	5',5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
E1	Estron
E2	17 $\beta$ -Estradiol; 1,3,5-Estratriene-3,17 $\beta$ -diol
E3	Estriol
ECL	enhanced chemiluminescence system
ecSOD	extrazelluläre Superoxid-Dismutase
EDRF	engl. endothelium derived relaxing factor, NO
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ENaC	epithelialer Natriumkanal, engl. epithelial sodium channel
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPHESUS	Eplenerone Neurohormonal Efficacy and Survival Study
ER	Estrogenrezeptor(en), auch Endoplasmatisches Reticulum
ERE	engl. estrogen response elements, Estrogen Response Elemente
<i>et al.</i>	und Andere
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	foetal calf serum; Fötales Kälberserum
Fe	Eisen
g	Gramm
<i>g</i>	9,81 m/s <sup>2</sup> , Erdbeschleunigung
G6PDH	Glukose-6-phosphat Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

---

Gly	Glycin
GPx	Glutathion-Peroxidase(n)
GPR30	G-Protein Rezeptor 30
GR	Glutathion-Reduktase und Glucocorticoidrezeptor
GRX	Glutaredoxin
GSH	reduzierte Form des Glutathions
GSSG	oxidierte Form des Glutathions
GSSR	gemischtes Disulfid
GSTNB	Zwischenprodukt aus reduziertem Glutathion und 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
HDL	High Density Lipoprotein, Lipoprotein hoher Dichte
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HO <sup>•</sup>	Hydroxylradikal
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRE	engl. hormone response element, Hormon Response Elemente
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HRT	engl. hormone replacement therapy, Hormonersatztherapie
HSP	Hitzeschockprotein
ICI	ICI 182,780, Fulvestrant
IGEPAL	Polyoxyethylen-2-iso-octylphenyl Ether
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IHC	Immunhistochemie
iNOS	induzierbare NO-Synthase
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LBD	Ligandbindedomäne
LDL	Low Density Lipoprotein, Lipoprotein niederer Dichte
Lsg.	Lösung

---

M	Molar
m	milli
MAP	engl. mitogen-activated protein
MCP-1	engl. monocyte chemoattractant protein-1
MeOH	Methanol
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mito ETC	mitochondriale Elektronentransportkette
Mn	Mangan
MnSOD	Mangan- oder Eisen-haltige Superoxid-Dismutase
mol	Stoffmenge
MPA	Metaphosphorsäure
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MW	Mittelwert, Molekulargewicht in [g/mol]
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte und oxidierte Form
NAD <sup>+</sup>	oxidierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte und oxidierte Form
NADP <sup>+</sup>	oxidierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats
NADPH	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphats
NADPH Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat Oxidase
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NF-κB	engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, spezifischer Transkriptionsfaktor
NHS	Nurse Health Study
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO <sup>•</sup> , NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Stickstoffdioxid-Radikal

---

NOS	NO-Synthase
NOX	NADPH Oxidase
NOX2	katalytische Untereinheit gp91 <sup>bnox</sup> der NADPH Oxidase
NTD	N-terminale Domäne
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxid-Radikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit-Anion
ox	oxidiert
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PDGF	engl. platelet-derived growth factor
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Protease Inhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PRSMC	engl. primary rat smooth muscle cells; Primäre Zellkultur aus glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte
R	Rest
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rac	kleines Guaninnukleotid-bindendes Protein
RALES	Randomized Aldosterone Evaluation Study
red	reduziert
rel.	relativ
RIPA	RadiolImmunoPrecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROO <sup>•</sup>	Peroxyradikal
ROOH	Peroxid
ROS	reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

<i>S. cerevisiae</i>	Saccharomyces cerevisiae, Backhefe
sec	Sekunde
Se	Selen
Se <sup>-</sup>	Selenolat
Se-OH	Selenylsäure
SEM	engl. standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
SDS	Natriumdodecylsulfat
-SH	Sulfhydrylgruppe
SMA	Smooth Muscle Actin, Aktin der glatten Gefäßmuskelzellen
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannt
Strep	Streptomycin
TEAM	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNB	2-Nitro-5-Thiobenzoessäure
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trx; TRx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor
VSMC	engl. vascular smooth muscle cells, Glatte Gefäßmuskelzellen
WB	Western Blot
XO	Xanthin Oxidase
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink
z. T.	zum Teil

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Redox-Homöostase	8
Abb. 2:	„Coupled versus uncoupled eNOS“	9
Abb. 3:	Struktur der neutrophilen NADPH Oxidase	10
Abb. 4:	Katalytischer Mechanismus der GPx (schematisch)	17
Abb. 5:	Strukturformel des Glutathions	18
Abb. 6:	Oxidoreduktase-Aktivität des Thioredoxin-Systems (schematisch)	19
Abb. 7:	Strukturformeln des NAD <sup>+</sup> und NADP <sup>+</sup>	21
Abb. 8:	Struktur und Synthese von Estron und 17 $\beta$ -Estradiol	24
Abb. 9:	Klassischer molekularer Mechanismus des Estrogens und seiner Rezeptoren	25
Abb. 10:	Strukturformel des Aldosterons	32
Abb. 11:	Schema des Superoxid-Dismutase Assays	60
Abb. 12:	GSH Recycling	63
Abb. 13:	Reaktionszyklus des NAD <sup>+</sup> /NADH Quantification Assays	65
Abb. 14:	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der $\alpha$ -smooth muscle Actin Färbung in PRSMC	68
Abb. 15:	Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der immunhistochemischen Färbung von PRSMC gegen ER $\alpha$ , ER $\beta$ und den MR	70
Abb. 16:	Repräsentative Bilder einer DHE-Fluoreszenzfärbung von placebo- und hormonbehandelten PRSMC	72
Abb. 17:	Quantifizierung der relativen DHE-Fluoreszenzintensität	73
Abb. 18:	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DHE-Färbung von PRSMC, die zusätzlich zu ihrer jeweiligen Hormonbehandlung mit dem ER-spezifischen Antagonisten ICI inkubiert waren	74
Abb. 19:	Quantifizierung der relativen DHE-Fluoreszenzintensität von hormonbehandelten PRSMC, die zusätzlich mit ICI inkubiert waren	75
Abb. 20:	Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der MR-Proteinexpression in hormonbehandelten PRSMC	76



---

Abb. 21: Repräsentativer Western Blot und densitometrische Analyse der ER $\alpha$ -Proteinexpression in hormonbehandelten PRSMC	77
Abb. 22: Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der ER $\beta$ -Expression von hormonbehandelten PRSMC	77
Abb. 23: Proteinexpression der NADPH Oxidase Untereinheiten rac 1, p47phox und p67phox von hormonbehandelten PRSMC	80
Abb. 24: Quantifizierung der SOD-Aktivität	82
Abb. 25: Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der MnSOD-Proteinexpression	82
Abb. 26: Analyse der Katalase-Enzymaktivität in hormonbehandelten PRSMC	83
Abb. 27: Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der Katalase-Proteinexpression	83
Abb. 28: Quantifizierung der GPx-Enzymaktivität in hormonbehandelten PRSMC	84
Abb. 29: Quantifizierung der totalen Glutathion-Konzentration in hormonbehandelten PRSMC	85
Abb. 30: Quantifizierung der intrazellulären GSH-Konzentration in hormonbehandelten PRSMC	86
Abb. 31: Quantifizierung der totalen NAD-Konzentration (NAD <sup>+</sup> +NADH) in PRSMC	87
Abb. 32: Analyse der totalen NADP-Konzentration (NADP <sup>+</sup> +NADPH) in PRSMC	88
Abb. 33: Quantifizierung der intrazellulären NADPH-Konzentration in hormonbehandelten PRSMC	89
Abb. 34: Repräsentative Bilder einer DHE-Färbung von PRSMC behandelt mit Placebo, ALDO und ALDO+100 $\mu$ M NADPH	90
Abb. 35: Quantifizierung der DHE-Fluoreszenzintensität von PRSMC behandelt mit Placebo, ALDO und ALDO+100 $\mu$ M NADPH	91
Abb. 36: Quantifizierung der G6PDH-Aktivität in hormonbehandelten PRSMC	92
Abb. 37: Repräsentativer Western Blot und densitometrische Analyse der G6PDH-Proteinexpression	93
Abb. 38: Die gegensätzlichen Effekte von ALDO und E2 auf das antioxidative System von PRSMC (schematisch)	99

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst danke ich **Prof. Dr. med. Georg Ertl** für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I anfertigen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei **PD Dr. med. Theo Pelzer**, dass er mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren - vor allem für seine hilfreiche Unterstützung und Betreuung während der gesamten Zeit, die guten Ratschläge, konstruktiven Diskussionen und das Vertrauen, eigenen Ideen nachzugehen und diese zu verwirklichen.

**Prof. Dr. rer. nat. Georg Krone** danke ich mich für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Der **Kommission für wissenschaftlichen Nachwuchs und Gleichstellung** möchte ich für die Gewährung eines Stipendiums, für die Förderung der Abschlussphase meiner Promotion über das „Qualifikationsprogramm für Wissenschaftlerinnen der Universität Würzburg“, danken.

Besonderer Dank gilt auch meinen lieben Kollegen:

**Dr. rer. nat. Paula Arias-Loza** danke ich von Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Geduld und ihre Hilfe bei allen anfallenden Fragestellungen und Problemen.

**Dr. rer. nat. Natalie Burkard** gilt ebenfalls mein besonderer Dank für all ihre Hilfestellungen und ihre stets motivierenden Worte. **Dr. rer. nat. Martin Czolbe**, **Dr. rer. nat. Tatjana Williams**, **Dr. med. Franziska Panther**, **Jörn Strasen** und allen ehemaligen Mitarbeitern - **Jenny Muck**, **Torsten Volkmar** und **Claudia Gebhardt** - danke ich für ihre Unterstützung, das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Bei **meiner Familie** und **Daniel** möchte ich mich von ganzem Herzen für die aufopfernde Unterstützung und die Geduld, die sie mir während der gesamten Zeit in jeglicher Hinsicht entgegenbrachten, für den Rückhalt und vor allem für die Gewissheit mich immer auf sie verlassen zu können, bedanken.

Danke!

---

## Publikationsliste

- \*Arias-Loza PA, \***Muehlfelder M**, Elmore SA, Maronpot R, Hu K, Blode H, Hegele-Hartung C, Fritzemeier KH, Ertl G, Pelzer T. Differential effects of 17beta-estradiol and of synthetic progestins on aldosterone-salt-induced kidney disease. *Toxicol Pathol.* 2009;37(7):969-982.  
\*These authors contributed equally to this work.
- **Muehlfelder M**, Arias-Loza PA, Fritzemeier KH, Pelzer T. Both estrogen receptor subtypes, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , prevent aldosterone-induced oxidative stress in VSMC via increased NADPH bioavailability. *Hypertension.* submitted 2011

---

## Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von PD Dr. med. Theo Pelzer im Forschungslabor Molekulare Kardiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik I (Direktor Prof. Dr. med. G. Ertl) des Universitätsklinikums Würzburg angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „*Protektive kardiovaskuläre Effekte weiblicher Sexualsteroiden - Estrogenrezeptoren reduzieren den Aldosteron-induzierten oxidativen Stress in glatten Gefäßmuskelzellen*“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel durchgeführt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Melanie Mühlfelder