

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON EXPERIMENTELLEM DIABETES AUF DIE VASKULÄRE REAKTIVITÄT

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von

Verena Schmitz

aus

Düren

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. P. Rösen

2. Referent: Prof. Dr. K. Mohr

Tag der Promotion: 19.12.2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis Oktober 2003 am
Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf,
Abteilung für Klinische Biochemie und Pathobiochemie,
in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Rösen angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. P. Rösen** für die Bereitstellung des interessanten Themas, die gute fachliche Anleitung und Betreuung in allen Phasen der Arbeit sowie für die stets vorhandene Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion.

Bei Herrn **PD Dr. G. Kojda**, Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, bedanke ich mich für die Ermöglichung der Kooperation und für die Einführung in das Thema. Insbesondere danke ich für die Möglichkeit von Kongressteilnahmen im In- und Ausland und die freundliche Unterstützung bei Fort- und Weiterbildungen.

Herrn **Prof. Dr. K. Mohr** von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn **Prof. Dr. H. Schmidt**, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie an der Justus-Liebig-Universität Giessen, danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern und die Möglichkeit, in seinem Labor zu hospitieren.

Herrn **PD Dr. W. Bloch**, Institut I für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, danke ich für die interessanten Einblicke in Morphologie und immunhistochemische Methoden.

Bei Herrn **Prof. Dr. W. Meyer**, Anatomisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, bedanke ich mich für die Unterstützung bei der morphologischen Untersuchung der Aortenpräparate.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Vaskulopathie bei Diabetes mellitus.....	2
1.2	Vasoprotektion durch endogenes Stickstoffmonoxid.....	4
1.3	Diabetische Vaskulopathie und oxidativer Stress.....	8
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	12
3	METHODEN UND MATERIALIEN.....	14
3.1	Tierexperimentelle Methoden.....	15
3.1.1	Versuchstiere.....	15
3.1.2	Genotypisierung der eNOS-K.O.-Mäuse.....	15
3.1.3	Streptozotozin-Diabetes.....	18
3.2	Funktionelle Untersuchungen an isolierten Aorten.....	20
3.2.1	Präparation isolierter Aortensegmente.....	20
3.2.2	Untersuchung der vaskulären Reaktivität isolierter Aorten.....	21
3.2.2.1	Organbadapparatur zur Durchführung funktioneller Studien.....	21
3.2.2.2	Kalibrierung und Äquilibrierung des Messsystems.....	22
3.2.2.3	Funktionelle Untersuchungen zur Vasoreaktivität isolierter thorakaler Aortensegmente.....	22
3.3	Morphologische Analyse der Media-Dicke von Aorten.....	25
3.4	Biochemische Untersuchungen.....	26
3.4.1	Präparation und Analyse von Proteinen.....	26
3.4.1.1	Isolierung von Proteinen aus Gewebe.....	26
3.4.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
3.4.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
3.4.1.4	Proteintransfer.....	29
3.4.1.5	Färbetechniken.....	29
3.4.1.6	Immundetektion.....	30
3.4.1.7	Strippen der Blotmembran.....	31
3.4.2	Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin in Gewebeschnitten.....	32
3.4.3	Bestimmung des ATP-Gehaltes.....	33
3.5	Berechnungsverfahren und Statistik.....	34
3.6	Primärantikörper.....	35
3.7	Puffer und Lösungen.....	36

4	ERGEBNISSE.....	40
4.1	Charakterisierung des STZ-Diabetes.....	41
4.1.1	Analyse des STZ-Diabetes bei C57/Bl6-Mäusen.....	41
4.1.2	Analyse des STZ-Diabetes bei eNOS K.O.-Mäusen.....	43
4.1.3	Analyse des STZ-Diabetes bei Wistar-Ratten.....	45
4.2	Einfluss von Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität.....	47
4.2.1	Vasorelaxation.....	47
4.2.2	α -adrenerge Vasokontraktion.....	52
4.3	Endotheliale Vasorelaxation und Inflammation.....	54
4.3.1	Funktionelle Charakterisierung der Gefäßreaktivität.....	55
4.3.2	Bestimmung des ATP-Gehaltes.....	57
4.3.3	Untersuchung der Expression der induzierbaren NO-Synthase.....	58
4.4	Untersuchungen zur Hyperkontraktilität durch adrenerge Stimulation im Diabetes.....	59
4.4.1	Untersuchungen zur Rezeptorspezifität der Hyperkontraktilität.....	59
4.4.2	Einfluss der Proteinkinase C auf die Vasokontraktion.....	64
4.4.3	Morphologische Untersuchung der Aorta.....	65
4.4.4	Einfluss der NO-Signaltransduktion auf die Vasokontraktion.....	66
4.4.4.1	Untersuchung der Vasokontraktion nach genetischer Deletion der endothelialen NO-Synthase	66
4.4.4.2	Untersuchung der Vasokontraktion nach enzymatischer Inhibition der eNOS durch L-NMMA.....	74
4.4.5	Untersuchung der RhoA-vermittelten Vasokontraktion.....	76
4.5	Zusammenfassung der funktionellen Daten zur Vasoreaktivität bei STZ-diabetischen Mäusen.....	79
4.6	Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die endotheliale Vasorelaxation.....	80
4.6.1	Funktionelle Studien unter Hemmung der Superoxiddismutase.....	76
4.7	Einfluss von Diabetes auf die NO-Signaltransduktion.....	83
4.7.1	Untersuchung der Expression der endothelialen NO-Synthase.....	83
4.7.2	Untersuchung der Expression der löslichen Guanylatzyklase.....	86
4.7.3	Untersuchung der Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinase I.....	87
4.7.4	Untersuchung der Expression des <i>vasodilator stimulated phosphoprotein</i> (VASP) und des phosphorylierten VASP (p-VASP).....	88
4.7.5	Zusammenfassung der Expressionsanalysen.....	93
4.8	Einfluss von Diabetes auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase.....	94
4.8.1	Untersuchung der Expression der NOX-1–Untereinheit.....	94
4.8.2	Untersuchung der Expression der NOX-4–Untereinheit.....	96
4.8.1	Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin in der Niere.....	97

5	DISKUSSION.....	99
5.1	Streptozotizin-Diabetes – ein experimentelles diabetisches Tiermodell.....	101
5.2	Einfluss von Diabetes auf die endotheliale Relaxation.....	103
5.2.1	Die Endothelfunktion im diabetischen Mausmodell.....	104
5.2.2	Die Endothelfunktion im diabetischen Rattenmodell.....	107
5.3	Modulation des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges bei Diabetes.....	109
5.4	NAD(P)H-Oxidase als Quelle von oxidativem Stress in Nieren STZ-diabetischer Ratten.....	113
5.5	Einfluss von Diabetes auf die Vasokontraktion.....	115
5.5.1	Veränderungen der adrenergen Signaltransduktion.....	115
5.5.2	Aktivierung des Diacylglycerin/Proteinkinase C-Signalweges.....	117
5.5.3	Morphologische Veränderungen der Aorta.....	118
5.5.4	Einfluss der NO/cGMP-Signaltransduktion auf die Vasokontraktion.....	119
5.5.5	Veränderungen der RhoA/Rho-Kinase-vermittelten Vasokontraktion.....	122
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	128
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	131
8	ANHANG.....	139
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	140
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	142
8.3	Tabellenverzeichnis.....	143
8.4	Publikationsverzeichnis.....	144

Danksagung

Lebenslauf

1.1 Vaskulopathie bei Diabetes mellitus

Als Diabetes mellitus bezeichnet man ein Syndrom der akuten und chronischen Hyperglykämie, verbunden mit Folgestörungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels unterschiedlicher Ätiologie und Symptomatik. Der hyperglykämische Zustand ist entweder in einer reduzierten bzw. völlig eingestellten Insulinproduktion begründet (*insulin dependent diabetes mellitus*, IDDM) oder resultiert aus einer gestörten physiologischen Insulinantwort als Konsequenz einer variablen Kombination aus peripherer Insulinresistenz und Insulinmangel (*non insulin dependent diabetes mellitus*, NIDDM) [1].

Neben den akut auftretenden Effekten des zellulären Insulinmangels bzw. der verminderten Insulinwirkung führen alle Diabetes-Formen zu einer Entwicklung charakteristischer Folgeschäden, die hauptsächlich das Gefäßsystem beeinträchtigen. Prospektive klinische Studien wie die DCCT-Studie (*diabetes control and complications trial*) und die UKPDS-Studie (*UK prospective diabetes study*) zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen hyperglykämischem Zustand und der Ausbildung diabetischer Folgeschäden in Form von Angiopathien [2, 3]. Während die Letalität der Diabetes-Erkrankung durch akute Stoffwechseldekompensationen nach Einführung der Insulintherapie zurückgegangen ist, hat mit Zunahme der Lebenserwartung die Inzidenz diabetischer Folgeschäden zugenommen [1]. Diese angiopathischen Spätkomplikationen bestimmen zunehmend Verlauf und Prognose der Diabetes-Erkrankung [1]. Die durch Diabetes induzierten Mikroangiopathien umfassen spezifische Veränderungen des mikrovaskulären Gefäßsystems, vornehmlich in der Retina, der renalen Glomeruli und des peripheren Nervensystems. Die pathologischen Konsequenzen können zu Erblindung und Nierenversagen sowie zur Denervation infolge einer Polyneuropathie führen [4]. Daneben wird durch Diabetes die Entwicklung von Makroangiopathien der Koronararterien und großen Gefäßen gefördert. Bei der Makroangiopathie handelt es sich um atherosklerotische Gefäßveränderungen makrovaskulärer Gefäße, die schon in frühem Lebensalter mit rascher Progredienz fortschreiten können [5]. Als Folge treten gehäuft Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf. Das Risiko frühzeitiger Mortalität infolge kardiovaskulärer Erkrankungen durch Myokardinfarkt und Schlaganfall ist bei Diabetikern deutlich gesteigert [6, 7].

Die pathophysiologischen Folgen im Rahmen einer diabetischen Vaskulopathie führen schon in frühen Stadien der Diabetes-Erkrankung unter anderem zu Anomalien im Blutfluss und einer erhöhten Gefäßpermeabilität sowie zu Veränderungen der Endothelfunktion. Dies zeigt sich in Veränderungen der Gefäßreaktivität auf vasoaktive Neurotransmitter und zirkulierende Hormone [6, 8].

Das Endothel ist die innerste einschichtige, zellige Auskleidung der luminalen Seite von Blutgefäßen und bildet über *tight junctions* eine physiologische Barriere zwischen dem zirkulierenden Blutstrom und den glatten Gefäßmuskelzellen. Die Beteiligung des Endothels an der Regulation der Gefäßreaktivität findet durch interzellulären Stoffaustausch und Freisetzung vasoaktiver Substanzen statt [8]. So wird der Gefäßwiderstand wesentlich durch die Aktivität des Endothels bestimmt, das durch die Produktion von Stickstoffmonoxid [9], Prostazyklin [10] und *endothelium derived hyperpolarizing factor* (EDHF) [11] die Vasorelaxation und durch die Synthese von Angiotensin II und Endothelin [8] die Vasokontraktion der Gefäße steuert. Das Endothel ist außerdem an Wachstum und Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen beteiligt und hat somit eine Bedeutung bei der Ausbildung Diabetes-bedingter Veränderungen der Gefäßstruktur („Remodeling“) [12].

Der Verlust der gefäßmodulierenden Eigenschaften des Endothels wird im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose, Hypertonie und Herzinsuffizienz sowie der Entwicklung der diabetischen Vaskulopathie diskutiert [13, 14, 15]. Die Ausprägung dieser Funktionsstörung des Endothels wird als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnet und ist unter anderem durch eine eingeschränkte, NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation charakterisiert [13]. Die endotheliale Dysfunktion stellt ein multifaktorielles Geschehen dar und wird als Ausdruck der Beeinträchtigung wichtiger Funktionen des Endothels verstanden, die über die Störung endothelvermittelter Vasorelaxation hinausgeht [16]. So äußert sich eine endotheliale Dysfunktion durch:

- Abnormale Vasorelaxation und / oder Vasokontraktion infolge einer Störung der Produktion bzw. Signaltransduktion vasoaktiver Faktoren [9, 17],
- Zunahme der prothrombotischen / prokoagulanten Aktivität [18],
- Zunahme der Durchlässigkeit des Endothels für Makromoleküle [19, 20].

1.2 Vasoprotektion durch endogenes Stickstoffmonoxid

Das lipophile Stickstoffmonoxidradikal (NO) ist ein kurzlebiger endogener Botenstoff, der wichtige physiologische Prozesse reguliert und in verschiedenen Zielzellen vasoprotektive Wirkungen vermittelt. NO diffundiert frei durch Membranen und wirkt antiaggregatorisch in Thrombozyten [21] sowie antiadhäsiv in Leukozyten [22]. Endothelial gebildetes NO reguliert nach Diffusion in Myozyten den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und ist damit essentiell für die Regulation der lokalen Durchblutung und des Blutdrucks [23]. Neben der vasorelaxierenden Wirkung verursacht NO zudem antiproliferative [24] und antioxidative Effekte [25, 26]. Der Verlust der biologischen NO-Funktion wird als eine mögliche Ursache für die Ausbildung vaskulärer Schäden diskutiert [13]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Diabetes auf die Gefäßreaktivität insbesondere im Hinblick auf pathologische Veränderungen der NO/cGMP-Signalkaskade untersucht.

Die endogene Biosynthese des NO

Die endogene Biosynthese des NO erfolgt in einer oxidoreduktiven Konversion der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin unter Freisetzung von NO durch den katalytischen Einfluss der NO-Synthase (NOS; EC 1.14.13.39) [27, 28]. Es existieren konstitutive und induzierbare NO-Synthasen (s. auch S. 5), die alle eine homodimere Struktur aufweisen. Die aktive Form der NO-Synthase ist ein Homodimer, bestehend aus einer C-terminalen Reduktase- und einer Häm-haltigen N-terminalen Oxygenase-Domäne. Zwischen den beiden Domänen befindet sich eine Bindungsstelle für Calmodulin.

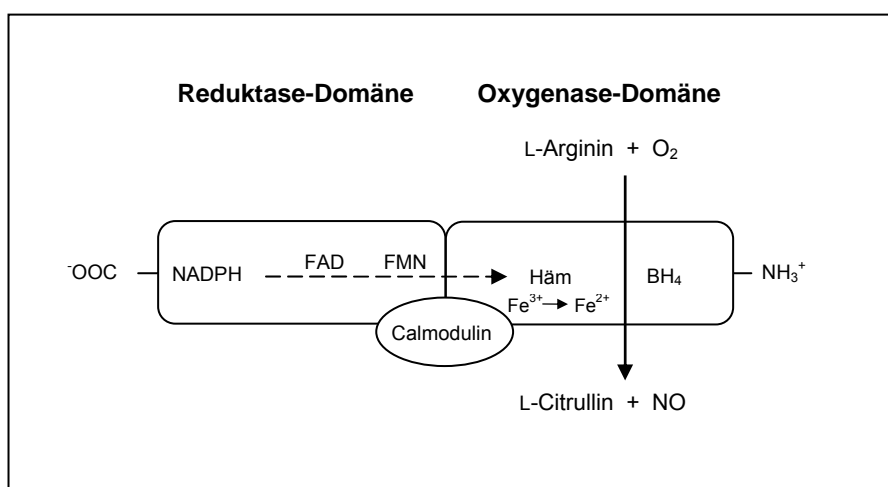


Abb. 1.01 Aufbau der NO-Synthasen und Darstellung des Elektronenflusses [29]

Das Dimer wird durch eine tetrahedrale Zinkbindung über Cysteinreste der Monomere stabilisiert [30]. Calcium aktiviert die konstitutiven NO-Synthasen durch Vermittlung der Bindung von Calmodulin, die einen Elektronentransfer von der Reduktase-Domäne zur Häm-Gruppe der Oxygenase-Domäne ermöglicht [31]. Die NOS-Katalyse ist abhängig von den Kosubstraten Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und Sauerstoff sowie den Kofaktoren Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Adenin-Mononukleotid (FMN). Der Elektronenfluss erfolgt von NADPH, das an die Reduktase-Domäne bindet, über FAD und FMN auf das Häm-Eisen der Oxygenase-Domäne, das dabei zu Fe²⁺ reduziert wird. Durch die Reduktion des Häm-Eisens wird die Anlagerung von Sauerstoff ermöglicht. BH₄ fungiert als allosterischer Faktor und ist an der Stabilisierung der NO-Synthase während der Katalyse beteiligt [29].

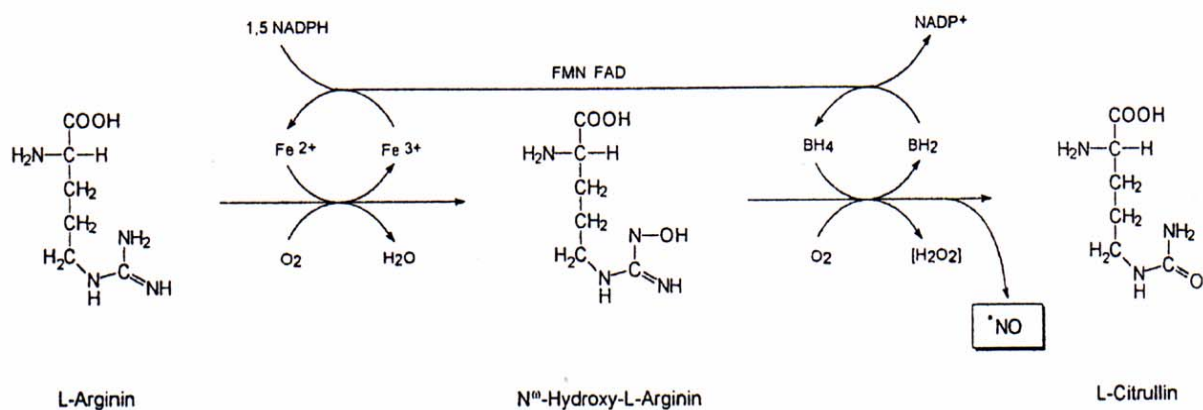


Abb. 1.02 Schematischer Ablauf der NO-Synthasereaktion [32]

Die Isoformen der NO-Synthase

Es sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt, die hinsichtlich ihrer gewebespezifischen Verteilung, ihrer Kapazität der NO-Produktion und ihrer Induktivität differieren. Man unterscheidet die induzierbare NO-Synthase (iNOS / NOSII), die hauptsächlich bei pathologischen Zuständen nach Zytokin-Stimulation von Geweben exprimiert wird, und kontinuierlich exprimierte (= konstitutive) NO-Synthasen. Die iNOS ist überwiegend zytosolisch lokalisiert, produziert NO in mikromolarer Menge und wird nicht durch Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration beeinflusst, da Calmodulin eine ständige Untereinheit des Enzyms ist [23, 33]. Das Enzym ist

hauptsächlich an inflammatorischen Reaktionen sowie an der Immunabwehr beteiligt. Die von der iNOS erzeugten hohen NO-Konzentrationen wirken zytotoxisch auf Tumorzellen und Bakterien und tragen so zur unspezifischen Immunabwehr bei. Die Beteiligung an vasopathologischen Prozessen, wie der Bildung atherosklerotischer Läsionen, konnte ebenfalls nachgewiesen werden [34]. Die unter physiologischen Bedingungen konstitutiv exprimierten NOS-Enzyme werden je nach Lokalisation in Geweben und Zellen als endotheliale NO-Synthase (eNOS / NOSIII) bzw. neuronale NO-Synthase (nNOS / NOSI) bezeichnet. Die beiden konstitutiven Enzyme weisen einen membrangebundenen Anteil auf, produzieren NO in nanomolaren Mengen und werden durch die zytosolische Calciumkonzentration in Verbindung mit Calmodulin reguliert [23]. Calcium aktiviert die konstitutiven NO-Synthasen durch Förderung der Bindung von Calmodulin an das Enzym. Die nNOS ist hauptsächlich in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems und im Skelettmuskel lokalisiert, während die eNOS überwiegend in vaskulären Endothelzellen, Kardiomyozyten und Thrombozyten exprimiert wird [29, 35, 36].

Der NO/cGMP-Signaltransduktionsweg

Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem die Funktion der endothelialen NO-Synthase von Bedeutung. Bereits 1980 wurde von *Furchgott et al.* die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation und die Existenz eines vom Endothel freigesetzten *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) als Vasodilatator beschrieben [37]. Später wurde EDRF pharmakologisch und biochemisch als NO identifiziert [38]. Die vasorelaxierende Wirkung des endothelialen NO wird nach Diffusion in glatte Muskelzellen durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) ausgelöst. Die sGC katalysiert die Umsetzung von Guanosin triphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP). Die Aktivierung der cGMP-regulierten Proteinkinase (cGKI) führt über verschiedene Phosphorylierungsprozesse zu einer Senkung der zytosolischen Calciumkonzentration:

- Die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGKI) phosphoryliert das Protein Phospholamban [39]. Die phosphorylierte Form des Phospholambans aktiviert die Calciumpumpe SERCA (sarkoplasmatische ATPase) der sarkoplasmatischen Calciumspeicher, was in einer verstärkten Rückspeicherung intrazellulären Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum resultiert [40].

- Zudem wird durch cGKI das *IP₃ receptor associated cGMP-Kinase-Substrat* (IRAG) phosphoryliert und dadurch die *IP₃*-vermittelte Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum gehemmt [117].
- Zusätzlich kann NO direkt und cGKI-vermittelt Kaliumkanäle aktivieren, so dass eine resultierende Hyperpolarisation der Zellmembran zu einer Inhibition des Einstroms von extrazellulärem Calcium über spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle führt [118, 119].

Die Abnahme der zytosolischen Calciumkonzentration resultiert in einer Verminderung des Vasotonus. Die Folge ist eine Vasorelaxation. Das *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) ist ebenfalls ein Effektorprotein der NO/cGMP-Signalkaskade. Die Aktivierung erfolgt ebenfalls durch die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) nach Phosphorylierung am Serin 239 [30]. VASP fungiert als Modulator der Mikrofilamente und reguliert die Aktin-Polymerisation und ist somit an der Regulation des vaskulären Tonus beteiligt.

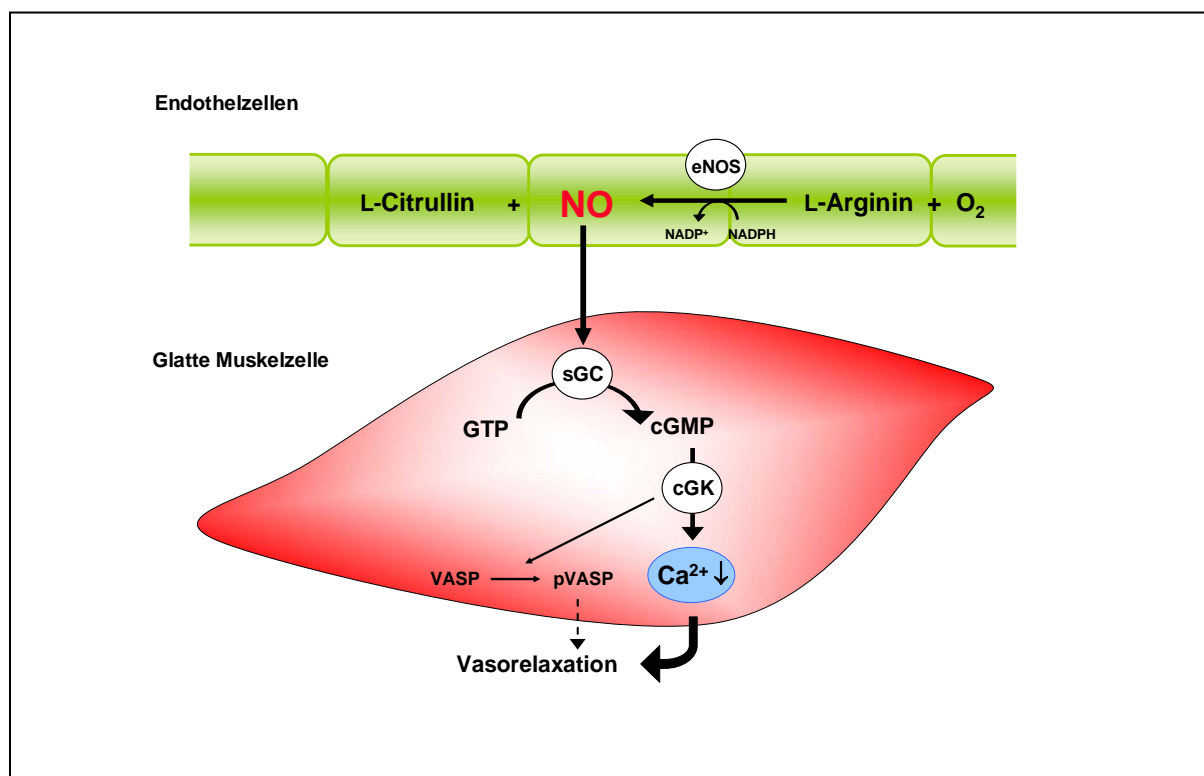


Abb. 1.03 NO/cGMP-Signaltransduktionsweg

NO (Stickstoffmonoxid-Radikal), eNOS (endotheliale NO-Synthase), sGC (lösliche Guanylatzyklase), GTP (Guanosintriphosphat), cGMP (zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat), cGK (cGMP-abhängige Proteinkinase), VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein), pVASP (phosphoryliertes VASP).

1.3 Diabetische Vaskulopathie und oxidativer Stress

„Vaskulärer oxidativer Stress“ bezeichnet eine Dysbalance zwischen der Produktion freier radikalischer Verbindungen und der physiologischen antioxidativen Kapazität, die letztlich zu Gefäßschäden und Zelltod führen kann [45, 46]. Als „freie radikalische Verbindungen“ werden hochreaktive Moleküle verschiedener Kategorien, z.B. reaktive Sauerstoff-Verbindungen (*reactive oxygen species*, ROS), reaktive Stickstoff-Verbindungen (*reactive nitrogen species*, RNS) und reaktive Chlorid-Verbindungen (*reactive chlorine species*, RCS) bezeichnet. Bei der Vaskulopathie des kardiovaskulären Systems sind reaktive Sauerstoffverbindungen wie Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH^{\bullet}) von besonderer Bedeutung. Durch antioxidativ wirksame Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase sowie Substrate mit der Fähigkeit zur reduktiven Regeneration wie Vitamin C und E sowie Glutathion wird eine pathologische Überproduktion radikalischer Verbindungen im Gewebe verhindert [46].

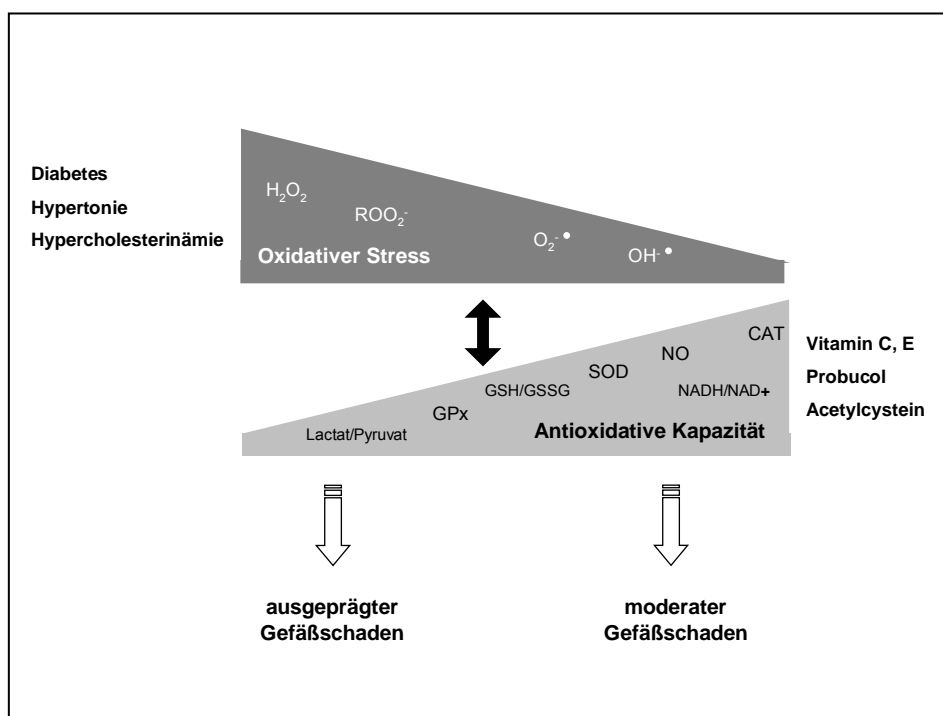


Abb. 1.04 Oxidativer Stress und antioxidative Kapazität in Gefäßen

H_2O_2 (Wasserstoffperoxid), $O_2^{\bullet-}$ (Superoxidradikal), OH^{\bullet} (Hydroxylradikal), ROO_2^- (Peroxide), GPx (Glutathionperoxidase), SOD (Superoxiddismutase), CAT (Katalase), NO (Stickstoffmonoxid-Radikal)
– modifiziert nach Lauer et al. [47] –

Die pathophysiologischen Folgen des oxidativen Stress für das Gefäßsystem sind multifaktoriell und betreffen eine Vielzahl von Signalkaskaden [48]. Im Rahmen dieser Arbeit sind vor allem Radikal-induzierte Störungen des NO/cGMP-Signalweges, die zu einer endothelialen Dysfunktion als Ausdruck eines Gefäßschadens führen, von Bedeutung [49, 50]. Außerdem induziert oxidativer Stress die Apoptose von Endothelzellen [51] und führt zu einer gesteigerten Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen [52]. Die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen wird stimuliert [53, 54] und Lipoproteine werden durch oxidative Prozesse modifiziert [55]. Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress als Konsequenz einer verstärkten Radikalbildung bei gleichzeitig verminderter antioxidativer Kapazität zur Pathologie kardiovaskulärer Erkrankungen wie Diabetes, Atherosklerose, Hypertonie und Herzinsuffizienz beiträgt [56].

Entstehung von Hyperglykämie-induziertem oxidativem Stress

Der genaue Pathomechanismus, inwiefern Hyperglykämie vaskulären oxidativen Stress im Diabetes verursacht und letztlich zur Ausprägung diabetischer Folgeschäden des Gefäßsystems beiträgt, wird vielfältig diskutiert. Neben der Autoxidation von Glukose führen die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase, die „entkoppelte“ eNOS und die mitochondriale Radikalproduktion zu einer Zunahme des oxidativen Stress im Diabetes.

Als eine der Hauptquellen der Superoxidproduktion in vaskulären Zellen und Myozyten wird die Aktivierung von Enzymen aus der Familie der NAD(P)H-Oxidasen diskutiert [56, 57]. NAD(P)H-Oxidasen sind membrangebundene Proteine, die die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidradikalen mit NADH oder NADPH als Elektronendonator katalysieren. Die vaskulären NAD(P)H-Oxidasen sind essentiell für die physiologische Funktion und Regulation vaskulärer Muskelzellen. Sie haben unter anderem eine Bedeutung bei Wachstum, Migration und Modifikation der extrazellulären Matrix [57]. Die Aktivität der vaskulären NAD(P)H-Oxidase wird über Zytokine, Hormone und mechanische Reizung stimuliert [58, 57]. Bei Hyperglykämie ist unter anderem die Glukose-induzierte Stimulation der NAD(P)H-Oxidase durch die Proteinkinase C [49] und die Aktivierung durch Angiotensin II [59, 60] von Bedeutung.

Einige Studien belegen, dass die eNOS in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies selbst Superoxidradikale generieren kann [61]. Eine Produktion von Superoxidradikalen durch die eNOS wird auch als „Entkopplung“ der eNOS bezeichnet. Die eNOS selbst wird dann unter Verlust ihrer vasoprotektiven Eigenschaften zu einer zusätzlichen Radikalquelle. Der Elektronenfluss, ausgehend vom NADPH ist „fehlgeleitet“, so dass die eNOS aus molekularem Sauerstoff kein NO, sondern Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bildet.

Die pathologisch erhöhte Glukosekonzentration im Diabetes induziert eine durch forciert ablaufende Glykolyse und Citratzyklus verstärkte Produktion von Elektronendonoren wie NADH und $FADH_2$. Dies resultiert in einem gestörten mitochondrialen Elektronenfluss, was zu einer Überproduktion von Superoxidradikalen durch die mitochondriale Atmungskette führt [62, 63, 64]. Die mitochondriale Radikalproduktion ist assoziiert mit der Aktivierung unterschiedlicher gefäßschädigender Signalwege, die unter anderem ebenfalls die Radikalproduktion induzieren und damit zu erhöhtem oxidativem Stress beitragen:

- Die Generierung von *advanced glycosylated endproducts* (AGE) modifiziert Proteine mit Verlust ihrer physiologischen Funktion. Außerdem führt die Bindung von AGE an AGE-Rezeptoren in Endothelzellen, Mesangialzellen und Makrophagen zu einer rezeptorvermittelten Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Zudem werden durch AGE Transkriptionsfaktoren wie NF κ B aktiviert, die pathologische Veränderungen in Expressionen diverser Gene verursachen [62].
- Die verstärkte Aktivierung des Polyol-Signalweges unter NADPH-Verbrauch resultiert in einer Abnahme der NADPH-abhängigen Regeneration von reduziertem Glutathion. Glutathion ist ein entscheidender Faktor der vaskulären antioxidativen Kapazität. Eine Verminderung der vasoprotektiven Glutathionkonzentration bedeutet somit eine Verstärkung von oxidativem Stress. Außerdem führen die osmotischen Effekte der Reaktionsprodukte Sorbitol und Fruktose zu vaskulären Schäden [62].

- Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) hat zahlreiche pathologische Konsequenzen. Die Expression verschiedener Enzyme wie der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der NAD(P)H-Oxidase sowie die Expression von Transkriptions- (NFκB) und Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF; *transforming growth factor β*, TGF-β) wird moduliert [45, 62]. Die PKC aktiviert zudem die NAD(P)H-Oxidase-induzierte Superoxidproduktion [49, 65].
- Die O-Glykosylierung diverser Proteine durch einen verstärkt ablaufenden Hexosamin-Signalweg führt zu Veränderungen in Genexpressionen und Proteinfunktionen. Unter anderem wird durch O-glykosylierte Proteinmodifikationen die Insulin-induzierte eNOS-Aktivität gestört [66].

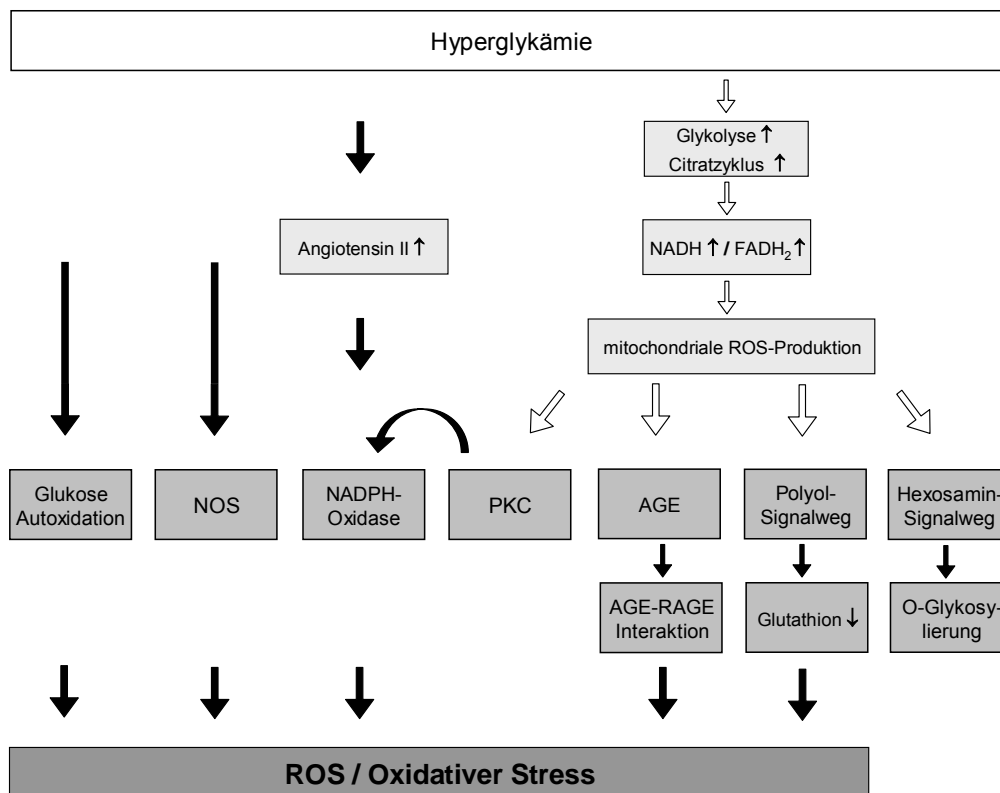


Abb. 1.05 Entstehung von Hyperglykämie-induziertem oxidativen Stress

NAD(P)H (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)), FADH₂ (Flavin-Adenin-Dinukleotid), ROS (reactive oxygen species), NO (Stickstoffmonoxid), PKC (Proteinkinase C), AGE (advanced glycosylated endproducts), RAGE (AGE receptor) – modifiziert nach Rösen et al. [45] und Brownlee et al. [62] –

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Es ist bekannt, dass die Folgen einer diabetischen Vaskulopathie schon in frühen Stadien der Diabetes-Erkrankung zu Veränderungen der Gefäßreaktivität auf vasoaktive Neurotransmitter und zirkulierende Hormone führen. Die genauen Ursachen und der Pathomechanismus ist Gegenstand der Untersuchung. Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, den Einfluss von experimentellem Diabetes im Tiermodell auf die vaskuläre Reaktivität insbesondere im Hinblick auf pathologische Veränderungen der endothelabhängigen NO/cGMP-Signalkaskade zu untersuchen. Weiterhin sollten auftretende Diabetes-bedingte Modulationen des myogenen Tonus auf Ebene der Proteinexpression genauer charakterisiert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen dem besseren Verständnis der im Rahmen einer diabetischen Vaskulopathie auftretenden Störungen der Gefäßreaktivität dienen.

- Die vaskuläre Reaktivität wird durch die Balance zwischen Vasorelaxation und Vasokontraktion charakterisiert. Daher wurden funktionelle Untersuchungen zur vasodilatatorischen und vasokontraktilen Potenz von Aorten diabetischer Tiere durchgeführt. Um die physiologische Regulation der Gefäße als Prozess einer langfristigen Adaption an die diabetische Stoffwechsellage zu ermitteln, wurden die Untersuchungen an hyperglykämischen Tieren mit einer chronischen Diabetesdauer von 16 Wochen durchgeführt.
- Oxidativer Stress wird als Grund für die Entstehung von Diabetes-bedingten Gefäßschäden und daraus resultierenden Komplikationen diskutiert. Die Auswirkung des infolge der hyperglykämischen Stoffwechsellage entstehenden oxidativen Stresses auf die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation wurde in funktionellen Studien untersucht.
- Zudem wurde der Einfluss von Diabetes auf die Expression der an der NO/cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteine im makrovaskulären Gewebe (Aorta) und in mikrovaskulären Organen (Herz, Niere) ermittelt.
- Die Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase an Diabetes-induziertem, oxidativem Stress wurde durch Expressionsanalysen in verschiedenen Organen untersucht, um Hinweise auf die Quellen von oxidativem Stress bei Diabetes zu erhalten.

3 METHODEN UND MATERIALIEN

3.1 Tierexperimentelle Methoden

Die Genehmigung für die beschriebenen Tierversuche wurde entsprechend § 8 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 vom Regierungspräsidium Düsseldorf unter den Aktenzeichen AZ 23.05.-230-3-3-00 und AZ 50.05-230-31-02 erteilt.

3.1.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden adulte männliche Mäuse aus C57/Bl6- und BalbC-Inzuchtstämmen sowie Wistar-Unilever-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln) verwendet. Die Ausgangstiere für die Zucht der transgenen eNOS „knock out“-Mauslinie (eNOS K.O.-Maus) wurden von der Firma Bayer AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt. Die eNOS K.O.-Mäuse sind von *Huang et al.* [67] generiert worden und wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) bezogen. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter veterinärmedizinischer Kontrolle im Tierbereich des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes Düsseldorf. Die Tiere wurden unter Standard-Bedingungen (Raumtemperatur 20° C, relative Luftfeuchte 55 ± 5 %, Tag-Nacht-Rhythmus 12 h durch Kunstlicht) in Edelstahlkäfigen gehalten. Trinkwasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

3.1.2 Genotypisierung der eNOS K.O.-Mäuse

Die eNOS K.O.-Mäuse weisen eine vollständige (homozygote eNOS K.O.-Maus / eNOS^{-/-} – Maus) oder partielle (heterozygote eNOS K.O.-Maus / eNOS^{+/-} – Maus) Deletion des eNOS-Gens auf. Anstelle des Exon 12 des eNOS-Gens enthalten die „knock-out“-Tiere eine Genkassette mit dem eines Neomycin-Resistenz-Gens. Bei der Kreuzung von heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen weisen die Nachkommen der F1-Generation einen der drei möglichen Genotypen (Wildtyp, eNOS^{+/-}, eNOS^{-/-}) auf. Der Nachweis des entsprechenden Genotypus erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus genomischer DNA, die zuvor aus Geweben der verwendeten Tiere isoliert wurde.

Präparation und Analyse von DNA

Isolierung von genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus

Zur Isolierung der genomischen DNA wurde den Mäusen durch eine Schwanzbiopsie ca. 1 cm der Schwanzspitze entfernt. Das gewonnene Gewebe wurde in 750 µl *Gewebe-Lysis-Puffer*¹ unter Zusatz von 0,5 mg/ml Proteinase K bei 55° C über Nacht inkubiert. Das Lysat wurde mit 250 µl gesättigter NaCl-Lösung (~ 6 M) versetzt und 5 min unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Abtrennung der ausgefallenen Proteine durch 10 min Zentrifugation bei 10.000 x g (54AR, Rotortyp: F45-30-11; Eppendorf, Hamburg). 750 µl des Überstandes wurden mit 500 µl absolutem Isopropanol versetzt und dreimal invertiert. Die ausgefallene DNA wurde durch 5minütige Zentrifugation bei 10.000 x g sedimentiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Pellet mit 1,5 ml Ethanol (70 %) gewaschen und erneut 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde nach Trocknung in einem Exsikkator bei Raumtemperatur in 100 µl *TE-Puffer* aufgenommen. Größere Ansätze an Biopsien wurden neben dem beschriebenen Standardverfahren alternativ mit dem *DNeasy Tissue Kit* der Firma Qiagen (Hilden) aufgearbeitet. Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA erfolgte durch UV-spektrophotometrische Absorptionsmessung bei 260 nm mit dem Biophotometer® (Eppendorf, Hamburg) gegen *TE-Puffer* als Referenz nach Herstellerprotokoll. Die Absorption bei 260 nm korreliert mit dem Gehalt an DNA. Ein Absorptionswert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) ist ein Indikator für die Reinheit der DNA. Bei reinen DNA-Proben beträgt der Quotient $\geq 1,8$.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist die selektive, enzymatische *in vitro*-Amplifikation eines beliebigen DNA-Abschnittes. Die PCR erfolgte in dem Mastercycler Gradient® (Eppendorf, Hamburg) in 35 Temperatur-Zyklen. Innerhalb eines Zyklus findet nach der DNA-Denaturierung und Hybridisierung der Primer mit der einzelsträngigen DNA die Synthese des neuen komplementären DNA-Stranges statt.

¹ Die *kursiv* dargestellten Lösungen und Puffer sind mit ihrer Zusammensetzung unter 3.7. erläutert.

Die modifizierten Bedingungen für die Vier-Primer-Multiplex-PCR wurde an die von *Kojda et al.* beschriebene Methode angelehnt [68]. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass jeweils DNA-Sequenzen amplifiziert wurden, die spezifisch für die Wildtyp-Maus (Exon 12 des eNOS-Gens) bzw. für die eNOS K.O.-Maus (Neomycin-Resistenz-Gen) sind. Die Primer zur Amplifikation des intakten eNOS-Gens generieren ein 256 bp großes DNA-Fragment bei der Amplifikation des Exon 12. Ein DNA-Fragment mit 542 bp wird nach der Mutation des Exon 12 des eNOS-Gens (Neomycin-Resistenz-Gen-Insert) durch die Primer zur Amplifikation des Neomycin-Resistenz-Gens erhalten. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg).

Primer zur Amplifikation des eNOS-Gens (Exon 12):

Wildtyp-Sense: 5' - GCA TCA CCA GGA AGA AGA CC - 3'

Wildtyp-Antisense: 5' - GAG CCA TAC AGA TGG TTG CC - 3'

Primer zur Amplifikation des Neomycin-Resistenz-Gens:

eNOS-Mutante Sense: 5' - CTC GAC GTT GTC ACT GAA GC - 3'

eNOS-Mutante Antisense: 5' - TCA AGA AGG CGA TAG AAG GC - 3'

Die PCR wurde mit Ready-To-GoTM PCR Beads (Amersham Biosciences, Freiburg), die 2,5 Units der thermostabilen puReTAQTM-Polymerase enthalten, durchgeführt. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 400 nM eingesetzt. Die genomische DNA als Template ist dem Reaktionsansatz in einer Konzentration von 1 µg/µl zugesetzt worden. Das Volumen des PCR-Ansatzes wurde mit Millipore-Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Im folgenden sind die PCR-Temperaturbedingungen dargestellt:

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit	Reaktion
1	94° C	4 min („hot start“)	Initiale Denaturierung
35	94° C	1 min	Denaturierung
	55° C	1 min	Annealing
	72° C	2 min	Elongation

Tab. 3.01 Reaktionsschema der PCR zur Genotypisierung

Visualisierung der DNA

Die PCR-Produkte ließen sich nach Auftrennung in Agarosegelen nachweisen. Als Gelmatrix diente 1 % Agarose in *TAE-Puffer*, die durch Aufkochen in Lösung gebracht wurde und auf dem Gelträger einer Gelkammer (BioRad, München) nach Erkalten gelierte. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µl/ml zugesetzt. 8 µl der zu bestimmenden DNA-Probe wurden vor der Gelbeladung mit 2 µl *Blaumarker* versetzt. Der *Blaumarker* diente durch den Glycerolzusatz zur Beschwerung der Probe, wodurch das Befüllen der Geltaschen erleichtert wurde. Zudem ließ sich durch die Blaufärbung der Probe die Lauffront beobachten. Die Separation der DNA erfolgte bei 90 V. Eine 100 bp-Leiter (Amersham Biosciences, Freiburg) diente als Referenzkontrolle zur Größenbestimmung der DNA-Probe.

3.1.3 Streptozotozin - Diabetes

Induktion des Diabetes

Die Induktion des Diabetes erfolgte bei adulten Tieren mit Streptozotozin (N-[Methylnitrosocarbamoyl]- α -D-glucosamin, STZ), das unmittelbar vor Gebrauch in *Citrat-Phosphat-Puffer* (pH 4,5) gelöst und intraperitoneal appliziert wurde. Folgende STZ-Dosierungen wurden verwendet:

Maus: • *Multiple low dose* - Schema: 4 x 55 mg/kg KG [69]

- *Single dose* - Schema: 1 x 240 mg/kg KG [70]

STZ wurde in einer Konzentration von 30 mM eingesetzt.

Ratte: • *Single dose* - Schema: 1 x 60 mg/kg KG [71]

STZ wurde in einer Konzentration von 113 mM eingesetzt.

Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten Vehikel-Injektionen mit einer dem Injektionsvolumen der STZ-Injektionen entsprechenden Menge *Citrat-Puffer*. Bei Mäusen erfolgte die Durchführung der Versuche 8 bis 22 Wochen nach STZ-Applikation. Die Ratten wurden nach einer Diabetesdauer von 3 bzw. 16 Wochen untersucht.

Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellaage

In Abständen von 4 Wochen wurde der postprandiale Blutglukosegehalt im Vollblut und das Körpergewicht zur Verifizierung und Kontrolle der diabetischen Stoffwechsellaage bestimmt. Die Blutglukosekonzentration wurde mit Hilfe der Hexokinase-Methode an einem Auto-Analyzer ACP-Eppendorf (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Dazu wurden 20 µl Vollblut in 500 µl *Hämolyse* lysiert. Einschlusskriterium für die diabetische Stoffwechsellaage war ein postprandialer Blutglukosegehalt von > 11 mmol/l eine Woche nach STZ-Applikation. Glukosurie und Ketonurie wurden mit Ketosticks® (Boehringer Mannheim, Mannheim) erfasst.

Bei Ratten konnte durch Herzpunktion *post mortem* genügend Vollblut zur Serumgewinnung (Überstand nach Zentrifugation des Vollblutes für 10 min bei 13.000 rpm) erhalten werden. Zur weiteren Charakterisierung des diabetischen Stoffwechselstatus wurden im Serum mit Hilfe enzymatischer Farbreaktionen der Proteingehalt sowie Kreatinin- und Triglyceridwerte mit dem Hitachi 900 (Hitachi Medical Systems, Wiesbaden) photometrisch bestimmt. Die quantitative Bestimmung des Gesamtproteins im Serum erfolgte durch die Biuretreaktion. Kreatinin wurde nach enzymatischer Umwandlung zu Sarcosin in einer modifizierten Trinderreaktion nachgewiesen. Die quantitative Analyse der Triglyceride beruhte auf dem enzymatischen Nachweis des entstandenen Wasserstoffperoxids nach Hydrolyse zu Glycerin und der anschließenden Oxidation zu Dihydroacetonphosphat und Wasserstoffperoxid.

3.2 Funktionelle Untersuchungen an isolierten Aorten

Funktionelle Untersuchungen an isolierten Aortensegmenten wurden durchgeführt, um den Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf den Vasotonus zu bestimmen. Als Gefäßgewebe dienten isolierte thorakale Aortensegmente von Maus oder Ratte.

3.2.1 Präparation isolierter Aortensegmente

Die Tiere wurden zur Organentnahme mittels CO₂-Inhalation getötet. Nach Thorakotomie wurde zunächst der linke Ventrikel des Herzens punktiert und anschließend mit *Krebs-HEPES-Puffer* durchspült. Das durch Herzpunktion gewonnene Vollblut wurde zu biochemischen Analysen verwendet (s. 3.1.3.2). Es folgte die Entfernung des Herzens durch proximale Abtrennung der *Aorta ascendens* unmittelbar nach ihrem Abgang aus dem Herzen und die komplette Freilegung der Aorta. Die gesamte Aorta wurde vom Aortenbogen bis zur Bifurkation exzisiert. Das Gefäß wurde sofort in eine mit kaltem *Krebs-HEPES-Puffer* gefüllte Petrischale überführt und mit Puffer in Richtung des natürlichen Blutstroms durchspült. Es folgte die Entfernung von anhaftendem Fett- und Bindegewebe. Die thorakale Aorta wurde zur Durchführung von funktionellen Studien im Organbad nach Abtrennung des Aortenbogens in zwei 3-4 mm große Stücke geschnitten oder für biochemische Analyseverfahren zusammen mit dem *Pars abdominalis* und den entnommenen Organen (Herz und Niere) in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Aus einer der entnommenen Nieren wurde ein ca. 3 mm breiter Querschnitt präpariert und für nachfolgende immunhistochemische Nachweise in *Formalin-Puffer* fixiert (s. 3.4.2). Die im Organbadversuch getesteten Gefäßsegmente wurden nach Abschluss der funktionellen Studien in *Formaldehyd-Lösung* für weitere morphologische Untersuchungen gelagert (s. 3.3).

3.2.2 Untersuchung der vaskulären Reaktivität isolierter Aorten

3.2.2.1 Organbadapparatur zur Durchführung funktioneller Studien

Die Messapparatur (Abb. 3.01) zur Untersuchung der vaskulären Reaktivität beinhaltet vier einzelne Messeinheiten, die jeweils aus einem doppelwandigen, temperierbaren, 10 ml fassenden Glaskolben bestehen. Die Versuchsdurchführung erfolgte in einem mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) begasten physiologischen Puffermilieu (*Krebs-Henseleit-Puffer*) bei pH 7,4. Zur Unterbindung der Prostaglandinsynthese wurde dem Puffer 10 μ M Diclofenac zugesetzt. Der Puffer wurde über eine Warmwasserversorgung innerhalb der Doppelwände mittels einer Umlaufthermostat-Wasserbad-Kombination (Haake, Berlin) konstant auf 37° C gehalten. Die präparierten Aortenringe wurden vorsichtig (ohne mechanische Belastung), um das Endothel zu erhalten, zwischen zwei triangelförmigen Elementen aus Edelstahl in der Messeinheit fixiert. Dabei erfolgte die Befestigung einer Triangel an einem Dehnungsmessstreifen über einen im Puffermilieu längenbeständigen Polyesterfaden R3R 1,5 metric (Resorba, Nürnberg). Die auftretende Kraftänderung im Vasotonus wurde von einem isometrischen Kraftaufnehmer (Statham, USA) registriert und über einen Verstärker (Institutseigenbau, Pharmakologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) auf einem Flachbrettschreiber (SE 120, Asea Brown Boveri, Mannheim) aufgezeichnet.

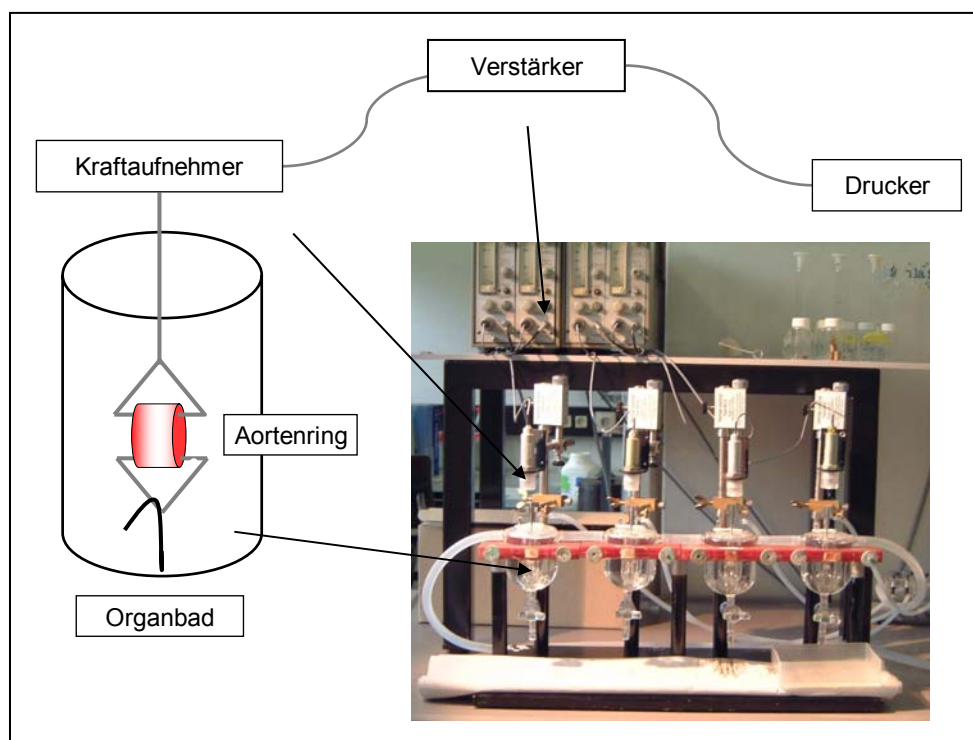


Abb. 3.01 Aufbau der Organbadapparatur [72]

3.2.2.2 Kalibrierung und Äquilibration des Messsystems

Kalibrierung

Die Kalibrierung des Messsystems erfolgte nach dem Spannungsabgleich (NullwertEinstellung) der vier Messzellen durch eine Belastung der Kraftaufnehmer mit geeichten Gewichten. Bei Versuchen mit Rattenaorten entsprach die auf den Nullwert geeichte Vorspannung 2 g. Bei Versuchen mit Mauseorten wurde eine Vorspannung von 1 g eingestellt. Die Maximalspannung der Rattenaorten lag bei 6 g und die der Mauseorten bei 3 g. Der Schreiberausschlag entsprach 3,75 cm/g bei Ratten- bzw. 7,5 cm/g bei Mauseorten bei einer eingestellten Verstärkung von 150. Die Auswertung der registrierten Kurven bezüglich der aufgetretenen Kraftentwicklung erfolgte in Newton (N).

Äquilibration

Während der Äquilibrationsphase wurden die Aortenringe ca. 1 h bis zur Stabilisierung eines konstanten Basaltonus unter der eingestellten Vorspannung belassen. In Intervallen von 10 min folgte nach Austausch des *Krebs-Henseleit-Puffers* die erneute Einstellung des Vasotonus auf den Nullwert, bis keine spontane Spannungsänderung mehr feststellbar war.

3.2.2.3 Funktionelle Untersuchungen zur Vasoreaktivität isolierter thorakaler Aortensegmente

Kontraktionstest mit Kaliumchlorid

Jedes Versuchsprotokoll sah zu Beginn eines Experimentes die Testung der vasokontraktiven Eigenschaften der Aortenringe nach einer Einzelgabe von 80 mM Kaliumchlorid vor. Durch die Zugabe von Kaliumchlorid konnte das Kontraktionsverhalten nach Membrandepolarisation und damit die Funktionalität der Gefäßabschnitte ermittelt werden. Nach 30 min wurde die Kaliumchlorid-Lösung durch mehrmaliges Wechseln der Pufferlösung ausgewaschen. Danach wurde die Stimulation mit Kaliumchlorid wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Gefäßantwort zu überprüfen. Da sich kein konstantes Maximum einstellt, wurde zur Auswertung der Kontraktionszustand 35 min nach der ersten Kaliumchlorid-Zugabe standardisiert verwendet. Nach einer erneuten Auswaschphase und der vollständigen Vasorelaxation der Aortenringe wurde der Vasotonus wieder auf den Nullwert justiert.

Endothelabhängige Vasorelaxation

Die endogene NO-Wirkung ist abhängig von der Integrität des Endothels. Die Endothelfunktion kann durch Überprüfung der endothelabhängigen Vasorelaxation getestet werden („Endotheltest“). Als Maß für ein intaktes Endothel galt die durch Acetylcholin (Sigma, Deisenhofen) oder den Calciumionophor A23187 (Sigma, Deisenhofen) ausgelöste vollständige Vasorelaxation der Aortenringe. Beide Substanzen bewirken über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase, was zu einer Vasorelaxation führt. Der Endotheltest erfolgte nach Vorkontraktion mit submaximalen Dosen des Vasokonstriktors Phenylephrin (Maus: 1 μM / Ratte: 0,2 μM) durch kumulative Gabe (1 nM - 10 μM) von Acetylcholin bzw. A23187. Vorversuche zeigten, dass die Vasorelaxation nach mechanischer Entfernung des Endothels ausblieb.

Untersuchungen zur Vasokontraktion

Nach Analyse der Vasorelaxation und einer Auswaschphase wurde in mehreren Versuchsansätzen die Untersuchung der Gefäßreaktion nach kumulativer Gabe (1 nM - 10 μM) von unterschiedlichen Vasokonstriktoren durchgeführt:

- **Phenylephrin** (Sigma, Deisenhofen)
 α_{1AC} -adrenerger Vasokonstriktor
- **Serotonin** (Sigma, Deisenhofen)
serotonerger Vasokonstriktor
- **Prostaglandin F_{2 α}** (Minprostin[®], Pharmacia & Upjohn, Erlangen)
G-Protein gekoppelter Vasokonstriktor

Zusätzlich erfolgten Inkubationen der Aortenringe mit 100 μM L-NMMA bzw. Chelerythrin zur Spezifizierung der vasokontraktiven Potenz.

- **L-NMMA** (N- ω -Monomethyl-L-Arginin) (Alexis Biochemicals, Grünberg)
unspezifischer Inhibitor der NO-Synthasen
- **Chelerythrin** (Calbiochem, Schwalbach)
selektiver, zellmembranpermeabler Inhibitor der Proteinkinase C

Untersuchungen zur Vasorelaxation

Untersuchungen zur Vasorelaxation wurden durch kumulative Applikation (1 nM - 10 μ M) der folgenden Substanzen nach einer adäquaten Vorkontraktion mit Phenylephrin durchgeführt:

- **SNAP** (S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin) (Sigma, Deisenhofen)
NO-Donor
- **Papaverin** (Sigma, Deisenhofen)
direktes Muskelrelaxans

Um den Einfluss von radikalischen Verbindungen und die Rolle der Superoxiddismutase (Sigma, Deisenhofen) auf die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation zu prüfen, wurden die Aortenringe zur Hemmung der Superoxiddismutase mit 3 mmol/l Diethyldithiocarbamat (Sigma, Deisenhofen) inkubiert, bevor die endothelabhängige Vasorelaxation getestet wurde.

3.3 Morphologische Analyse der Media-Dicke von Aorten

Die morphologische Analyse der Media-Dicke von Aorten sollte Hinweise auf Diabetesbedingte strukturelle Veränderungen der thorakalen Aorta geben. Die Versuche wurden mit Aortenringen aus funktionellen Studien durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen Morphologie und Funktionalität der Gefäße herstellen zu können.

Einbettung

Die nach der funktionellen Analyse in *Formalin-Puffer* fixierten Aortenringe wurden in wasserlöslichem Kunststoff Technovit 7100 (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) eingebettet, um eine Artefaktbildung durch Gewebeschrumpfungen zu vermeiden [73]. Danach wurden aus jedem Kunststoffblock mit dem Autocut-Mikrotom Modell 1140 (Reichert-Jung, Kiel) ca. 4 μM dicke Schnitte angefertigt, die dann in kaltem Wasser gestreckt und 1 h bei 90° C auf Objektträgern aufgebrannt wurden.

Monochromatische Übersichtsfärbung mit Toluidinblau

Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll nach *Richardson et al.* mit Toluidinblau gefärbt [74]:

- 1 min Färbung mit einer 1 %igen Toluidinblau-Lösung
- 2 x spülen mit Millipore-Wasser
- 3 x spülen mit 80 % Ethanol
- 1 x spülen mit 96 % Ethanol
- nach Trocknung Eindeckung mit DePex (Depex, Houten, Niederlande)

Die Auswertung der Media-Dicke erfolgte mikroskopisch mit dem computergestützten Bildbearbeitungssystem CUE-3 (Olympus, Version 4.5, 1993). Es wurden jeweils vier einzelne Messungen in fünf verschiedenen Geweberegionen an jedem Aortenring durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die Morphologie eines möglichst großen Gewebeareals betrachtet wurde.

3.4 Biochemische Untersuchungen

3.4.1 Präparation und Analyse von Proteinen

Zu untersuchende Proteine wurden zur Bestimmung der Expression nach der Isolation aus Zellhomogenaten und verschiedenen Tiergeweben mittels Immundetektion mit Hilfe der Western Blot-Technik analysiert. Je nach physiologischer Lokalisation des Proteins wurde eine zytosolische Fraktion bzw. eine Membranfraktion oder ein Gesamthomogenat präpariert.

3.4.1.1 Isolierung von Proteinen aus Gewebe

Herstellung eines Gewebehomogenates

Das nachfolgend beschriebene Verfahren wurde zur Immundetektion der endothelialen und der induzierbaren NO-Synthase angewendet:

Zur Herstellung des Gewebehomogenates wurde das Gewebe in Flüssigstickstoff schockgefroren und in gefrorenem Zustand mit einem Metallzerkleinerer pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde in einem adäquaten Volumen *Lysispuffer I* aufgenommen und mit einem Ultra-Turrax Omni2000 (Omni Int., USA) bei Stufe 3 homogenisiert. Beide Proteine sind membranassoziierte Enzyme, für deren Aufarbeitung keine Detergenzien im Lysispuffer notwendig sind. Durch Zentrifugation (54AR, Rotortyp: F45-30-11; Eppendorf, Hamburg) bei 100 x g (10 min, 4° C) erfolgte die Abtrennung grober Zellbestandteile. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand bei -80° C zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Proteinbestimmung erfolgte nach *Bradford et al.* [75] (s. 3.3.1.2).

Die Isolierung der an der NO/cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteine erfolgte nach folgendem Verfahren:

Das in Flüssigstickstoff tiefgefrorene Gewebepulver wurde mit 2x *Lysispuffer II* versetzt und aufgetaut. Die Lysis der Proben erfolgte in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) unter 10 min Schütteln bei Raumtemperatur. Nach der Lysis wurde entsprechend der Menge des *Lysispuffer II* das gleiche Volumen kochendes 2x Roti-Load[®] (Roth, Karlsruhe) zur weiteren vollständigen Lysis zugegeben und für 15 min bei 95° C in einem Thermomixer geschüttelt.

Folgendes Gewebe-Volumen-Verhältnis wurde eingesetzt:

Gewebemenge	Lysispuffer + Roti-Load®
0,03 - 0,05 g	250 µl
0,06 - 0,08 g	500 µl
0,09 - 0,12 g	750 µl

Tab. 3.02 Zusammensetzung des Puffers zur Gewebelysis in Abhängigkeit von der Gewebemenge

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach *Lowry et al.* [76] (s. 3.3.1.2), da das Detergenz Triton-X100® als Bestandteil des *Lysispuffers II* die Proteinbestimmung nach *Bradford et al.* [75] stört.

Membranpräparation

Die inaktive Form des Protein RhoA ist im Zytosol lokalisiert, während die GTP-gebundene, aktive Form in der Zellmembran vorkommt. Es wurde eine zytosolische Fraktion und eine Membranfraktion präpariert, um die Verteilung von RhoA in den Zellkompartimenten zu analysieren. Je nach Versuchsansatz wurde Zellmaterial bzw. in Flüssigstickstoff pulverisiertes Gewebe in *Lysispuffer III* aufgenommen. Bei der Verwendung von EA-Zellen wurde 1 ml Puffer für das Zellmaterial aus einer 75-cm²-Schale eingesetzt. Bei Gewebematerial wurde 0,03 g des Gewebepulvers mit 500 µl *Lysispuffer III* versetzt. Die Lysis erfolgte 1 h bei 4° C in einem Thermomixer. Durch Zentrifugation für 5 min bei 500 x g (54AR, Rotortyp: F45-30-11; Eppendorf, Hamburg) wurden grobe Zellbestandteile abgetrennt. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand 1,5 h bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge Optiuc TL (Rotortyp TLA 55; Beckman, München) zentrifugiert. Das Sediment entspricht der Membranfraktion und wurde in *Inkubationspuffer* aufgenommen. Der Überstand ist die zytosolische Fraktion. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte bei beiden Fraktionen nach *Bradford et al.* [75].

3.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Methode nach *Bradford et al.*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von *Bradford et al.* [75] mit dem Bio-Rad-Proteinassay (Bio-Rad, München) durchgeführt. Das hierbei zugrunde liegende Messprinzip basiert auf der Verschiebung der maximalen Extinktion des Coomassie Brilliant Blue G250-Farbstoffs von 425 nm nach 595 nm infolge der Bildung von Cu^{2+} -Protein-Komplexen.

Die Kalibrierung erfolgte mittels definierter Konzentrationen einer Proteinstandarlösung (bovines Serumalbumin in Millipore-Wasser). Sowohl die Proben als auch die Standardlösung wurden mit Millipore-Wasser adäquat verdünnt und mit 200 μl Bio-Rad-Farbstoffreagenz je Ansatz versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch (Microplate Reader Model 450, Bio-Rad, München) bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der Kalibrierung berechnet.

TCA-Micro-Lowry

Proteine bilden in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} -Ionen in der Biuret-Reaktion einen Komplex, wobei die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Die Methode nach *Lowry et al.* [76] beruht auf der Reaktion von Cu^+ -Ionen mit Folin-Ciocalteau-Reagenz zu einem blauen Farbkomplex, dessen Intensität als Maß für die Proteinkonzentration dient.

Die modifizierte Proteinbestimmung nach *Lowry et al.* [76] wurde nach Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet mit *Folin I* versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min erfolgte die Zugabe von Folin-Ciocalteau-Reagenz (Merck, Darmstadt) und die photometrische Vermessung bei 576 nm (Microplate Reader Model 450, Bio-Rad, München). Die Kalibrierung wurde mit definierten Konzentrationen von bovinem Serumalbumin in Millipore-Wasser durchgeführt.

3.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine aus den Lysaten von Geweben und Zellen erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach *Laemmli et al.* [77].

Es wurden 7,5 %ige *Trenngele* (7,5 % Acrylamid in 375 mM Tris / 0,4 % SDS, pH 8,8) für Proteine mit einem Molekulargewicht über 40 kDa und 12,5 %ige *Trenngele* (12,5 % Acrylamid in 375 mM Tris / 0,4 % SDS, pH 8,8) für Proteine mit geringerer Masse verwendet. Das *Sammelgel* (4,5 % Acrylamid in 25 mM Tris / 0,2 % SDS, pH 6,8) wurde 4,5 %ig eingesetzt.

Die Lysate wurden mit modifiziertem *2x Laemmli-Probenpuffer* im Verhältnis 1:2 oder mit mindestens 20 % des Ausgangsvolumen versetzt und 5 min bei 99° C im Thermomixer denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer Bio-Rad-Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) in *1x Elektrophoresepuffer* bei einer konstanten Spannung von 150 V und variabler Stromstärke bis minimal 19 mA für 1,5 h. Als Molekulargewichtsmarker diente der vorgefärbte Precision Protein Standard (Bio-Rad, München) und der biotinylierte BOA-Proteinmarker (Biomol, Hamburg).

3.4.1.4 Proteintransfer

Der Transfer (Western Blotting) der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham Bioscience, Freiburg) erfolgte in einer Tankblot-Apparatur (BioRad, München) mit vorgekühltem *Western Blot-Puffer*. Das Proteingel wurde auf die Membran zwischen Filterpapier fixiert und in die Blotkammer gebracht, so dass das Gel in Richtung der Anode und die Membran kathodenseitig angebracht war. Der Proteintransfer erfolgte entlang des elektrischen Feldes von 0,8 mA/cm² bei 4° C für 1 h.

3.4.1.5 Färbetechniken

Die auf die Nitrozellulose-Membran geblotteten Proteine wurden nach dem Western Blotting mit Ponceau S gefärbt, um die Effektivität des Proteintransfers zu überprüfen. Als Kontrolle erfolgte die Färbung des entsprechenden Gels mit Coomassie-Blue, um bei unvollständigem Proteintransfer im Gel verbliebene Proteine nachweisen zu können.

Ponceau S – Färbung

Die Membran wurde nach dem Proteintransfer 15 min in Ponceau-S-Färbelösung (0,1 % (w/v) Ponceau S in 3 % (v/v) Trichloressigsäure) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit Millipore-Wasser gewaschen. Da es sich um eine reversible Färbetechnik handelt, kann die Membran durch wiederholte Waschvorgänge mit *TBS-T-Puffer* wieder vollständig entfärbt werden und ist anschließend für Immundetektionen verwendbar.

Coomassie-Blue – Färbung

Die Gele wurden nach dem Proteintransfer mit Coomassie-Blue-Färbelösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit *Entfärbelösung* mehrfach unter Schütteln gewaschen, bis die gefärbten Proteinbanden vor einem klaren Hintergrund erschienen. Die nach dem Proteintransfer noch im Polyacrylamid-Gel verbliebenen Proteine werden als Banden sichtbar und dienen der Beurteilung der Effektivität des Western Blotting-Vorgangs. Die gefärbten Gele wurden fixiert und zur weiteren Aufbewahrung getrocknet.

3.4.1.6 Immundetektion

Absättigung unspezifischer Bindungen

Die Membranen wurden nach dem Proteintransfer bzw. nach dem Strippen (s. 3.3.1.7.) in Blockierlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in *TBS-T-Puffer*) für 1 h unter ständigem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Antikörperinkubation

Die Inkubation der Membranen mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte bei 4° C unter Schütteln über Nacht. Die verwendeten Primärantikörper wurden in Blockierlösung - wie unter 3.5 beschrieben - verdünnt. Nach der Primärantikörper-Inkubation wurde die Membran 4 x 5 min mit *TBS-T-Puffer* gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden sekundären, Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Antikörper in Blockierlösung für 1 h inkubiert.

Folgende Sekundärantikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen verwendet:

- anti-Maus-IgG (Sigma, Deisenhofen), VD 1:5000
- anti-Ziege-IgG (Santa Cruz, Heidelberg), VD 1:2500
- anti-Kaninchen-IgG (Calbiochem, Schwalbach), VD 1:500

Detektion mit verstärkter Chemilumineszenz

Nach wiederholten Waschvorgängen (4 x 5 min) mit *TBS-T-Puffer* wurden die Membranen zur Proteindetektion für 5 min mit ECL-Reagenz (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Die entstandene Chemilumineszenz wurde mit einem LUMI-Imager[®] (Boehringer Mannheim, Mannheim) und der zugehörigen Software LUMI-Analyst[®] oder alternativ durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm[™] ECL[™], Amersham Biosciences, Freiburg) visualisiert und ausgewertet. Die Analyse und Quantifizierung der entwickelten Röntgenfilme erfolgten mit Gel Doc 100 (Bio-Rad, München) und der entsprechenden Software Quantity One[®] (Version 4.1.1).

3.4.1.7 Strippen der Blotmembran

Die Methode des „Stripping“ der an der Membran gebundenen Antikörper ermöglicht die Wiederverwendung von bereits detektierten Membranen durch Abtrennung der Antikörperkomplexe. Die Membranen wurden in *Stripping-Puffer* bei 60° C - 70° C für 1 h inkubiert. Danach wurde der *Stripping-Puffer* verworfen und die Membranen für jeweils 4 x 15 min in *TBS-T-Puffer* gewaschen. Es erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungen mit Blockierlösung und die erneute Inkubation mit einem Primärantikörper nach dem unter 3.4.1.6 beschriebenen Verfahren.

3.4.2 Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin in Gewebeschnitten

Der Nachweis von nitrierten Tyrosinresten in Proteinen gilt als Hinweis für das Auftreten von oxidativem Stress [29]. Durch das Verfahren der Immunhistochemie wurden Nitrotyrosin-enhaltende Proteine spezifisch *in situ* in fixierten Gewebeschnitten aus Nieren diabetischer Ratten und entsprechenden Kontrolltieren angefärbt und mikroskopisch nachgewiesen. Diese Methode ermöglicht eine qualitative Aussage über das Auftreten von oxidativem Stress in der Niere durch den indirekten Nachweis des Nitrotyrosins. Zudem werden Hinweise über die genaue Lokalisation von Nitrotyrosin-enhaltenden Proteinen in der Niere erhalten.

Gewebefixierung

Aus den Nieren wurden nach der Organentnahme ca. 3 mm breite Querschnitte aus der Mitte des Organes präpariert und in *Formalin-Puffer* 6-8 h fixiert. Nach der Fixierung wurde das Nierengewebe mit *PBS-Puffer* gespült und in Paraffin eingebettet. Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde automatisiert in 10 µM breite Scheiben geschnitten und auf Objektträgern fixiert.

Immunhistochemische Färbung nach der Streptavidin-Biotin-Methode

Die Paraffinschnitte wurden 30 min in eine Lösung aus *PBS-Puffer* mit 3 % H₂O₂ und 60 % Methanol gebracht, um störende endogene Peroxidasen zu hemmen. Danach wurden die Objektträger 3 x 10 min mit *PBS-Puffer* gewaschen. Nach der Permeabilisierung der Membranen mit 0,2 % Triton-X100[®] in 0,1 M *PBS-Puffer* und einem erneuten Waschvorgang von 3 x 10 min mit *PBS-Puffer* erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungen durch eine Behandlung der Gewebeschnitte mit 5 % Normal-Ziegenserum und 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) in *PBS-Puffer* für 1 h. Die Objektträger wurden nach der Absättigung wiederholt mit *PBS-Puffer* (4 x 10 min) gewaschen. Danach erfolgte die Antikörper-Inkubation in einer PBS-gepufferten Inkubationslösung aus 0,8 % BSA und 20 mM NaN₃ für 12 h bei 4° C. Es wurde ein monoklonaler Maus-anti-Nitrotyrosin-Antikörper (Calbiochem, Schwalbach) in der Verdünnung 1:400 verwendet. Als Negativkontrollen dienten Gewebeschnitte, die mit einer entsprechend gepufferten Inkubationslösung an Stelle des Primärantikörpers behandelt wurden. Nach einer erneuten Waschphase von 4 x 10 min mit *PBS-Puffer* wurden die Gewebeschnitte mit einem biotinylierten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper

(Dako, Hamburg) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Streptavidin-Biotin-Methode nutzt die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin für die Kopplung von enzymmarkiertem Avidin an biotinylierte Sekundärantikörper. Ein 1:100 verdünnter Streptavidin-Meerrettich Peroxidase-Komplex wurde als Detektionssystem verwendet und für die Dauer von 1 h zugegeben. Die Peroxidase konnte dann durch eine Färbung mit 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) nachgewiesen werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte mit einer *DAB-Färbelösung* versetzt und die einsetzende Braunfärbung der Reaktionsprodukte lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei ausreichender Färbung wurde die Farbreaktion durch Waschen mit *PBS-Puffer* abgestoppt.

3.4.3 Bestimmung des ATP-Gehaltes

Die quantitative Bestimmung des ATP-Gehaltes erfolgte durch Messung der Luciferase-induzierten Biolumineszenz. Das Testprinzip beruht auf der lichtemittierenden Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin in Abhängigkeit vom ATP-Gehalt des Gewebes.



Das zu analysierende Gewebe wurde in Flüssigstickstoff gefroren, pulverisiert und in 100 mM Tris / 4 mM EDTA aufgenommen. Nach der mechanischen Zerkleinerung erfolgte eine Fällung der Proteine mit 10 % (m/v) Trichloressigsäure (TCA). Durch Zentrifugation bei 1000 rpm (54AR, Rotortyp: F45-30-11; Eppendorf, Hamburg) und 4° C wurde das TCA-Pellet sedimentiert und anschließend verworfen. Zur Neutralisation des sauren Überstandes wurde mehrmals mit Ether ausgeschüttelt. Die Analyse der aufgearbeiteten Proben erfolgte mit Hilfe des *ATP Biolumineszenz Assay Kit CLS II*[®] (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Proben wurden entsprechend der Angaben des Herstellers mit Luciferase versetzt und im Luminometer Berthold Biolumat CB 9500 (Lumac Systems, Basel) vermessen. Der ermittelte ATP-Gehalt wurde auf das Feuchtgewicht der eingesetzten Gewebe bezogen.

3.5 Berechnungsverfahren und Statistik

Alle biochemischen und funktionellen Messdaten sind als arithmetischer Mittelwert (\pm Standardfehler des Mittelwertes, SEM) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten ausgedrückt.

Die in funktionellen Gefäßstudien induzierten Vasorelaxationen beziehen sich auf den stabilen maximalen Vasotonus, der nach Vorkontraktion mit Phenylephrin ausgelöst wurde. Bei induzierten Vasokontraktionen wurden die Daten als absolute Werte der auftretenden Gefäßspannung in Newton (N) angegeben. Zur Beurteilung der vasoreaktiven Potenz einer Substanz wurde aus der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung die effektive Konzentration mit halbmaximaler Wirkung (EC50) ermittelt. Konzentrations-Wirkungskurven wurden mittels Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA) auf Signifikanz getestet. Die Daten biochemischer Tests wurden durch eine One-Way-ANOVA mit nachfolgendem Student-Newmans-Keuls-Test oder durch einen zweiseitigen Student-t-Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0,05$ festgelegt.

3.6 Primärantikörper

Folgende Primärantikörper wurden in der angegebenen Verdünnung (VD) verwendet:

- **anti-Aktin** (Calbiochem, Schwalbach), VD 1:10.000
- **anti- α_{1c} – AR** (Santa Cruz, Heidelberg), VD 1:500
polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen den Carboxy-Terminus des α_{1c} -adrenergen Rezeptors (AR)
- **anti-cGK** (Prof. Schmidt, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Uni Giessen), VD 1:2500
polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die cyclische Guanylatkinase (cGK)
- **anti-Nitrotyrosin** (Calbiochem, Schwalbach), VD 1:400
monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Nitrotyrosin-Rest-enthaltende Proteine
- **anti-eNOS** (BD Transduction, Heidelberg), VD 1:750
monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die endotheliale NO-Synthase (eNOS)
- **anti-iNOS** (BD Transduction, Heidelberg), VD 1:100
monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die induzierbare NO-Synthase (iNOS)
- **anti-NOX1** (Prof. Schmidt, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Uni Giessen), VD 1:5000
polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die NOX1-Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase
- **anti-NOX4** (Prof. Schmidt, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Uni Giessen), VD 1:2000
polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die NOX4-Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase
- **anti-RhoA** (Santa Cruz, Heidelberg), VD 1:200
polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die innere Domäne von RhoA
- **anti-sGC α** (Prof. Schmidt, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Uni Giessen), VD 1:2000
polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die α -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC)
- **anti-sGC β** (Prof. Schmidt, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Uni Giessen), VD 1:2000
polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die β -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC)
- **anti-VASP** (Immunoglobine, Himmelstadt), VD 1:3000
monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den Serinrest 157 des *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP)
- **anti-P-VASP** (NanoTools, Teningen), VD 1:1000
monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den phosphorylierten Serinrest 239 des *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP)

3.7 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in bester verfügbarer Qualität bzw. höchstem Reinheitsgrad von den Firmen Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Substanzen für molekularbiologische Untersuchungen und die Immundetektion wurden von den Firmen Qiagen (Hilden) oder BioRad (München) bezogen.

Blaumarker	Bromphenolblau	0,25 % (m/v)
	Glycerin	30 % (v/v)
	in TAE-Puffer	
Citrat-Phosphat-Puffer	Na-citrat	50 mM
	Na ₃ PO ₄	100 mM
	pH 4,5	
Coomassie-Blue-Färbelösung	Methanol	45,0 % (v/v)
	Essigsäure	10,0 % (v/v)
	Coomassie R-250	0,2 % (m/v)
DAB-Färbelösung (Diaminobenzidin)	Tris/HCl, pH 7,6	0,05 M
	Diaminobezidin	0,05 % (m/v)
	H ₂ O ₂	0,1 % (v/v)
Lösung erst filtrieren, dann kurz vor Inkubationsbeginn H ₂ O ₂ hinzugeben		
Elektrophoresepuffer (10x)	Tris/HCl, pH 8,6	250 mM
	Glycin	1,9 mM
	SDS	0,1 % (m/v)
Entfärbelösung	Methanol	45 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Folin I	NaOH	200 mM
	Na ₂ CO ₃	2,40 % (m/v)
	SDS	0,25 % (m/v)
	CuSO ₄	0,03 % (m/v)
	Na-K-Tartrat	0,05 % (m/v)
Formaldehyd-Lösung	Formaldehyd 90 %	10 % (v/v)
	Calciumacetat	14 mM
	pH 6,8	

Formalin-Puffer	NaCl	140 mM
	KCl	5 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	16 mM
	KH ₂ PO ₄	3 mM
	Paraformaldehyd	4 % (m/v)
Gewebe-Lysis-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	EDTA	100 mM
	NaCl	100 mM
	SDS	1 % (m/v)
	Proteinase K	0,5 mg/ml
Hämolyselösung	Digitonin	0,04 mM
	Maleinimid	1 mM
Inkubationspuffer	Tris/HCl, pH 8,0	25 mM
	EGTA	1 mM
	MgCl ₂	20 mM
	+ Protease-Inhibitor-Cocktail Complete [®] (Roche Diagnostics, Mannheim)	
Krebs-Henseleit-Puffer (modifiziert)	Ionenzusammensetzung:	
	Na ⁺	143,1 mM
	K ⁺	5,9 mM
	Ca ²⁺	1,6 mM
	Mg ²⁺	1,2 mM
	Cl ⁻	126,0 mM
	HCO ₃ ⁻	25,0 mM
	H ₂ PO ₄ ⁻	1,2 mM
	SO ₄ ²⁻	1,2 mM
	+ Diclofenac 10 µM	
Der Puffer wurde auf pH 7,1 eingestellt. Durch die Carbonbegasung während des Versuches stellte sich der physiologische pH-Wert 7,4 ein.		
Krebs-HEPES-Puffer	NaCl	99,0 mM
	KCl	4,7 mM
	CaCl ₂	1,9 mM
	MgSO ₄	1,2 mM
	NaHCO ₃	25,0 mM
	K ₂ HPO ₄	1,0 mM
	Na-HEPES	20,0 mM
	Glukose	11,1 mM
	pH 7,35	

Laemmli-Probenpuffer (2x)	Tris/HCl, pH 6,8	50 mM
	SDS	2 % (m/v)
	Glycerol	10 % (m/v)
	Bromphenolblau	0,005 % (m/v)
	β-Mercaptoethanol	12 % (v/v)
Lysispuffer I	Tris/HCl, pH 7,6	5 mM
	Dithiothreitol	5 mM
	+ Protease-Inhibitor-Cocktail Complete®	
	(Roche Diagnostics, Mannheim)	
Lysispuffer II (2x)	Tris/HCl, pH 7,4	40 mM
	NaCl	150 mM
	Na-Deoxycholat	2 % (m/v)
	Triton-X100®	2 % (v/v)
	SDS	0,1 % (m/v)
	EDTA	50 mM
	EGTA	50 mM
	Na-Pyrophosphat	50 mM
	Na-Vanadat	2 mM
	+ Protease-Inhibitor-Cocktail Complete®	
	(Roche Diagnostics, Mannheim)	
Lysispuffer III	Tris/HCl, pH 8,0	5 mM
	EDTA	1 mM
	MgCl ₂	5 mM
	+ Protease-Inhibitor-Cocktail Complete®	
	(Roche Diagnostics, Mannheim)	
PBS-Puffer (phosphate-buffered-saline)	NaCl	140 mM
	KCl	5 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	16 mM
	KH ₂ PO ₄	3 mM
Sammelgelpuffer	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,2 % (m/v)
Stripping-Puffer	Tris/HCl, pH 6,8	62,5 mM
	β-Mercaptoethanol	100 mM
	SDS	2 % (m/v)
TAE-Puffer (50x) (Tris-Acetat-EDTA)	Tris/HCl, pH 8,3	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	1 mM

TE-Puffer (Tris-EDTA)	Tris/HCl, pH 8	10 mM
	EDTA	1 mM
Trenngelpuffer	Tris/HCl, pH 6,8	1,5 M
	SDS	0,4 % (m/v)
TBS-(T) – Puffer (tris-buffer-saline-[tween])	Tris/HCl, pH 7,6	20 mM
	NaCl	150 mM
	[Tween20 [®]	0,1 % (m/v)]
Western Blot-Puffer	Tris/HCl, pH 8,5	25 mM
	Glycin	200 mM
	Methanol	20 % (v/v)

4.1 Charakterisierung des STZ-Diabetes

4.1.1 Analyse des STZ-Diabetes bei C57/Bl6-Mäusen

Streptozotocin (4 x 55 mg/kg KG) führte eine Woche nach Applikation zu einem Anstieg des Blutglukosespiegels auf Werte über 11 mmol/l. Nach 16 Wochen erreichte die Blutglukose einen Wert, der etwa 4,5fach über dem Wert der Kontrolltiere lag (Kontrolle: $8,8 \pm 0,5$ mmol/l, Diabetes: $37,1 \pm 1,1$ mmol/l). Die Mäuse entwickelten innerhalb von 16 Wochen typische Anzeichen einer diabetischen Stoffwechselstörung, die neben einer Hyperglykämie zudem durch Polyurie, Glukosurie und Polydipsie charakterisiert war. Im Krankheitsverlauf zeigte sich eine gehemmte Gewichtszunahme bis zur Ausbildung einer Kachexie. Exemplarisch sind in Abb. 4.01 die Entwicklung der Blutzuckerspiegel bzw. die Veränderungen im Körpergewicht einer Versuchsserie mit C57/Bl6-Mäusen über eine Diabetesdauer von 16 Wochen dargestellt.

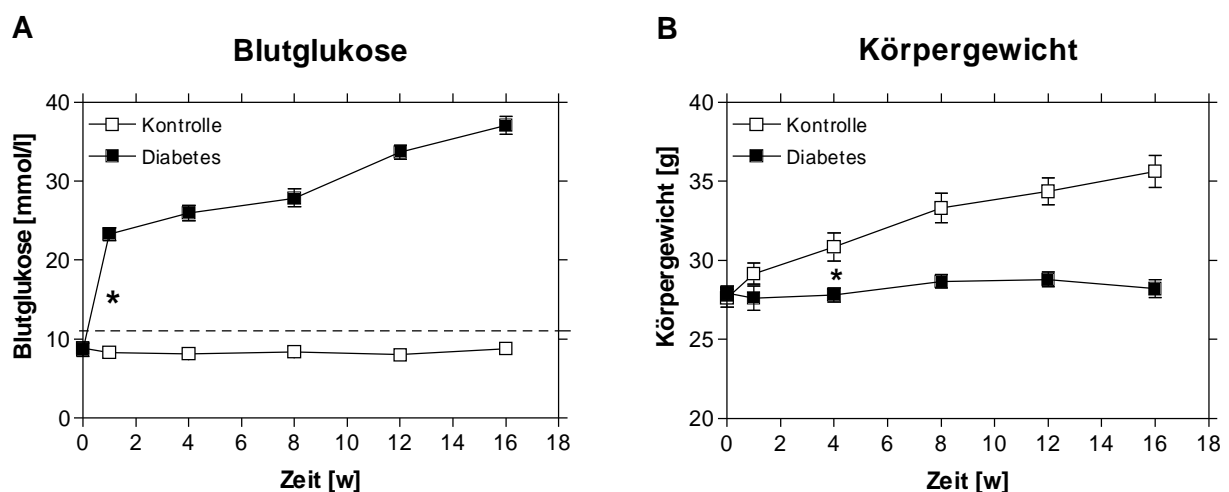


Abb. 4.01 Blutglukose und Körpergewicht bei C57/Bl6-Mäusen

Einfluss von STZ-Diabetes auf die Progredienz von Blutglukose und Körpergewicht bei C57/Bl6-Mäusen innerhalb einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Einschlusskriterium für die diabetische Stoffwechsellaage war ein postprandialer Blutglukosegehalt von > 11 mmol/l (gestrichelte Linie). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SEM) der Daten zu Körpergewicht (A) und Blutglukose (B) von unbehandelten Mäusen (\square , $n=9$) und STZ-injizierten Mäusen (\blacksquare , $n=13$), * $P < 0,05$, t-Test.

Die Induktion des Diabetes führte bei den Mäusen zu einer Veränderung der absoluten Organgewichte von Niere und Herz. Nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen war das absolute Feuchtgewicht der Nieren diabetischer Mäuse (292 ± 11 mg) um 20 % im Vergleich zu den Nieren der Kontrolltiere (232 ± 8 mg) erhöht. Das absolute Herzgewicht diabetischer Mäuse (195 ± 3 mg) war dagegen im Vergleich zu den Kontrolltieren (215 ± 6 mg) um 10 % erniedrigt. Die relativen Organgewichte, bezogen auf das Körpergewicht, waren sowohl bei den Nieren als auch beim Herz im Diabetes signifikant erhöht. Dies ist Ausdruck einer Diabetes-induzierten Hypertrophie von Niere und Herz.

	Kontrolle	n	Diabetes	n
Niere [mg]	232 ± 8	9	292 ± 11 *	13
Niere / KG [%]	$0,65 \pm 0,02$	9	$1,08 \pm 0,06$ *	12
Herz [mg]	215 ± 6	9	195 ± 3 *	13
Herz / KG [%]	$0,60 \pm 0,03$	9	$0,71 \pm 0,02$ *	12

Tab. 4.01 Organgewichte

*Einfluss von STZ-Diabetes auf die Organgewichte von Niere und Herz nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Aufgeführt sind die absoluten Organgewichte für Niere und Herz als Mittelwerte (\pm SEM) und die relativen Organgewichte bezogen auf das Körpergewicht (KG) in %, * $P < 0,05$, t-Test.*

4.1.2 Analyse des STZ-Diabetes bei eNOS K.O.-Mäusen

Es wurde eine transgene Mauslinie, die eine Disruption des eNOS-Gens aufwies, mit Streptozotozin behandelt, um die Bedeutung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und des NO-Stoffwechsels bei der Pathogenese diabetischer Gefäßschäden zu untersuchen. Bei den Tieren dieser Mauslinie lag entweder eine vollständige (homozygot) oder eine partielle (heterozygot) Deletion des eNOS-Gens vor. Durch funktionelle Studien mit den Aorten diabetischer und unbehandelter eNOS K.O.-Mäuse sollten Hinweise zum Einfluss der NO/cGMP-Signalkaskade auf die Gefäßfunktionalität erhalten werden. Insbesondere konnten durch die Verwendung dieses transgenen Tiermodelles Mechanismen einer langfristigen Adaption an den Verlust der eNOS untersucht werden. Die transgenen Mäuse wurden auf den genetischen Hintergrund des C57/Bl6-Mausstammes zurückgekreuzt. Daher konnten C57/Bl6-Mäuse als genetisch unveränderte Kontrollgruppe verwendet werden. Alle Mäuse wurden im Lebensalter von 13-15 Wochen für die Versuche eingesetzt.

STZ-Diabetes in eNOS K.O.-Mäusen

Die Induktion von Diabetes in eNOS K.O.-Mäusen erfolgte nach denselben Kriterien wie bei den C57/Bl6-Wildtyp-Tieren (s. 3.1.3.1). Es wurden homo- und heterozygote eNOS K.O.-Mäuse behandelt und mit unbehandelten Tieren des entsprechenden Genotyps verglichen. Als genetisch unveränderte Kontrollgruppe wurden C57/Bl6-Mäuse eingesetzt.

eNOS K.O.-Mäuse und C57/Bl6-Mäuse wiesen keine Unterschiede hinsichtlich der Blutglukose-Werte auf. Die Induktion des Diabetes führte bei den eNOS K.O.-Tieren innerhalb einer Woche nach STZ-Injektion zu einem drastischen Anstieg der Blutglukose, der dem Ausmaß der Hyperglykämie entsprach, die in den Wildtyp-Tieren beobachtet wurde (Abb. 4.02). Die diabetischen eNOS K.O.-Mäuse entwickelten ebenso wie die diabetischen Wildtyp-Mäuse eine Polydipsie und Polyurie und waren phänotypisch im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht auffällig.

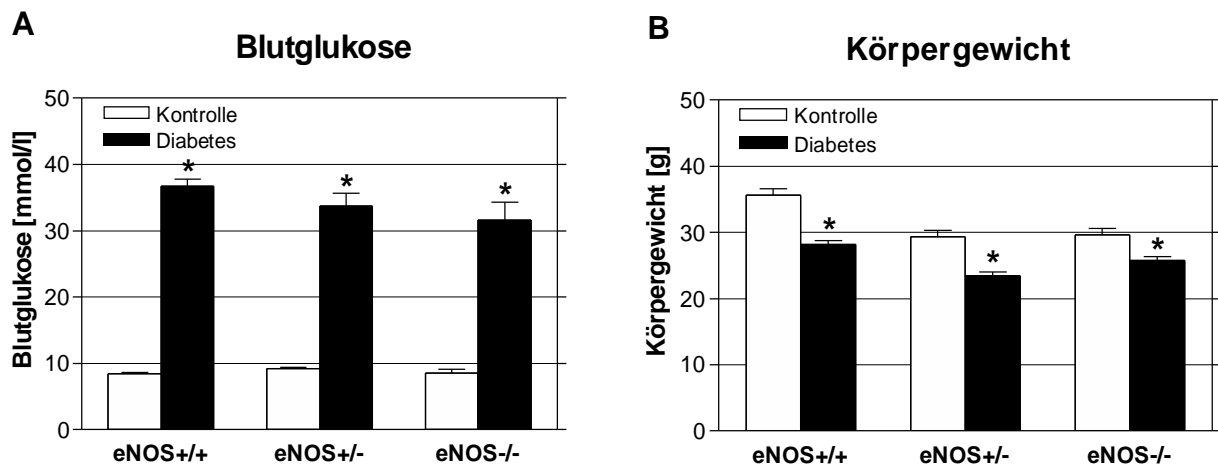


Abb. 4.02 Blutglukose und Körpergewicht bei eNOS K.O.-Mäusen

Einfluss des STZ-Diabetes auf Blutglukose und Körpergewicht bei eNOS K.O.-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) der Daten zu Körpergewicht (A) und Blutglukose (B) von unbehandelten Mäusen (\square) und STZ-injizierten Mäusen (\blacksquare). Es wurden jeweils diabetische und gesunde Wildtyp-Mäuse (eNOS+/+, je n=13), Heterozygote (eNOS+/-, je n=8) und Homozygote (eNOS-/-, je n=9) untersucht, * $P < 0,05$, t-Test.

Bei den transgenen Mäusen war die Gewichtszunahme der diabetischen Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ebenfalls vermindert. Das heißt, dass die transgenen Tiere ebenso wie die Wildtyp-Mäuse nach der Induktion des Diabetes eine Kachexie entwickelten. Bei heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen und Wildtyp-Mäusen betrug die Gewichtsdiﬀerenz der diabetischen Tiere zu den unbehandelten Kontrollen ca. 20 %. Damit wiesen die diabetischen Mäuse dieser Versuchsgruppen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen ein Körpergewicht auf, das nur ca. 80 % des Körpergewichtes der entsprechenden Kontrollgruppe betrug. In der Versuchsgruppe der homozygoten eNOS K.O.-Mäusen waren die diabetischen Tiere nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen aber nur ca. 13 % leichter als die entsprechenden Kontrolltiere (Tab. 4.02). Die Gewichtsabnahme war somit bei diabetischen homozygoten eNOS K.O.-Mäusen nicht so stark ausgeprägt wie bei den anderen diabetischen Versuchsgruppen. Damit war das Ausmaß der Kachexie, gemessen am Unterschied des Körpergewichtes zwischen Kontrollen und diabetischen Mäusen, bei homozygoten eNOS K.O.-Tieren signifikant schwächer ausgeprägt als bei Mäusen mit intaktem oder partiell intaktem eNOS-Gen.

	eNOS +/+	n	eNOS +/-	n	eNOS -/-	n
Körpergewicht [%]	79,2 ± 1,6	13	79,9 ± 2,1	8	86,9 ± 2,1 *	9

Tab. 4.02 Prozentuales Körpergewicht bei STZ-diabetischen eNOS K.O.-Mäusen

Darstellung des prozentualen Körpergewichtes von STZ-injizierten Wildtyp-Mäusen (eNOS+/+), Heterozygoten (eNOS+/-) und Homozygoten (eNOS-/-). Das absolute Körpergewicht der diabetischen Mäuse wurde auf das Körpergewicht der jeweiligen Kontrollgruppe bezogen (Kontrolle = 100 %), * $P < 0,05$, t-Test.

4.1.3 Analyse des STZ-Diabetes bei Wistar-Ratten

Die Manifestierung des durch Streptozotocin ausgelösten Diabetes führte bei Wistar-Ratten zu einem ähnlichen physiologischen und morphologischen Erscheinungsbild der diabetischen Stoffwechsellage wie bei C57/Bl6-Mäusen (s. 4.1.2). Bereits nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen zeigten die STZ-Ratten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren eine verminderte Gewichtszunahme. Bei 80 % der diabetischen Tiere wurde nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen neben dem kachektischen Grundzustand zusätzlich die Bildung von Katarakten an den Augen und Ödeme in der Niere makroskopisch festgestellt. Das absolute Feuchtgewicht der Nieren war sowohl nach 3 als auch nach 16 Wochen Diabetesdauer signifikant erhöht, während das absolute Herzgewicht erniedrigt war. Die auf das Körpergewicht bezogenen relativen Organgewichte zeigten ein signifikanter Anstieg, wobei die Zunahme des relativen Herzgewichts erst nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen eine Signifikanz erreichte.

Der Stoffwechselstatus der Ratten wurde durch eine Analyse des Serums weitergehend charakterisiert. Die nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen signifikant erniedrigten Kreatininwerte wiesen auf eine Abnahme der Muskelmasse hin. Die Abnahme der Muskelmasse lässt sich anhand der Serumkreatininwerte verfolgen, da die Menge des ins Blut abgegebenen Kreatinins der Muskelmasse des Körpers proportional ist. Zudem führte die Induktion des Diabetes sowohl nach 3 als auch nach 16 Wochen zu einer Abnahme der Serumprotein-Konzentration. Der Triglyceridgehalt war ebenfalls sowohl nach 3 als auch nach 16 Wochen bei den diabetischen Tieren tendenziell erhöht. Diese Werte wiesen eine Heterogenität ($P=0,079$) auf, so dass das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde.

	3 Wochen		16 Wochen	
	Kontrolle	Diabetes	Kontrolle	Diabetes
Blutglukose [mmol/l]	6,2 ± 0,2	30,3 ± 1,8*	6,0 ± 0,1	37,5 ± 1,3*
Körpergewicht [g]	368 ± 14	272 ± 7*	513 ± 16	262 ± 7*
Niere [g]	1,44 ± 0,08	1,83 ± 0,06*	1,56 ± 0,07	2,25 ± 0,06*
Niere / KG [%]	0,39 ± 0,01	0,67 ± 0,02*	0,30 ± 0,02	0,86 ± 0,03*
Herz [g]	1,56 ± 0,07	1,18 ± 0,05*	1,38 ± 0,03	1,06 ± 0,05*
Herz / KG [%]	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,45 ± 0,02*
Triglyceride [mg/dl]	51,9 ± 26,0	91,0 ± 29,7	62,2 ± 22,2	189,9 ± 52,1
Kreatinin [mg/dl]	0,30 ± 0,00	0,26 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,20 ± 0,00*
Protein [g/dl]	6,87 ± 0,15	5,32 ± 0,32*	7,08 ± 0,05	5,85 ± 0,13*

Tab. 4.03 Morphologische und biochemische Parameter des STZ-Diabetes bei Wistar-Ratten

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte (\pm SEM) für $n=5-7$. Es wurden jeweils STZ-injizierte Wistar-Ratten und entsprechend alte Kontrollratten nach einer Diabetesdauer von 3 und 16 Wochen untersucht, * $P < 0,05$, t-Test für Kontrolle vs. Diabetes, (KG = Körpergewicht).

4.2 Einfluss von Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktivität von Aorten diabetischer C57/Bl6-Mäuse im Vergleich zu Aorten unbehandelter Mäuse analysiert, um Veränderungen der Gefäßreaktivität als Hinweis auf eine diabetische Vaskulopathie zu bestimmen. Die Gefäßreaktivität wurde durch Ermittlung der vasorelaxierenden und vasokontraktiven Eigenschaften von Aorten aus diabetischen Mäusen im Vergleich zu Aorten aus Kontrollen in funktionellen Studien untersucht.

4.2.1 Vasorelaxation

Endothelabhängige Vasorelaxation (endogenes NO)

Die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation ist ein wichtiger Parameter zur Überprüfung der physiologischen Endothelfunktion. Eine eingeschränkte Vasorelaxation ist ein Hinweis auf eine „endotheliale Dysfunktion“ und somit Ausdruck einer bestehenden Gefäßschädigung [12]. Der Einfluss des Diabetes auf die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation wurde durch die Applikation kumulativer Dosen (1 nM - 10 µM) von Acetylcholin bzw. des Calcium-Ionophor A23187 nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin ermittelt. Von beiden Substanzen ist bekannt, dass sie zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und infolge dessen über die Aktivierung der NO/cGMP-Signalkaskade zu einer Vasorelaxation führen [78]. Die funktionellen Untersuchungen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen zeigten, dass kein Unterschied in der NO-vermittelten endothelabhängigen Vasorelaxation zwischen Aorten von Kontrolltieren und diabetischen Tieren bestand. Wie in Abb. 4.03 dargestellt, war die Fähigkeit der Aorten diabetischer Tiere zur Vasorelaxation nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen unabhängig vom auslösenden Agens vollständig erhalten.

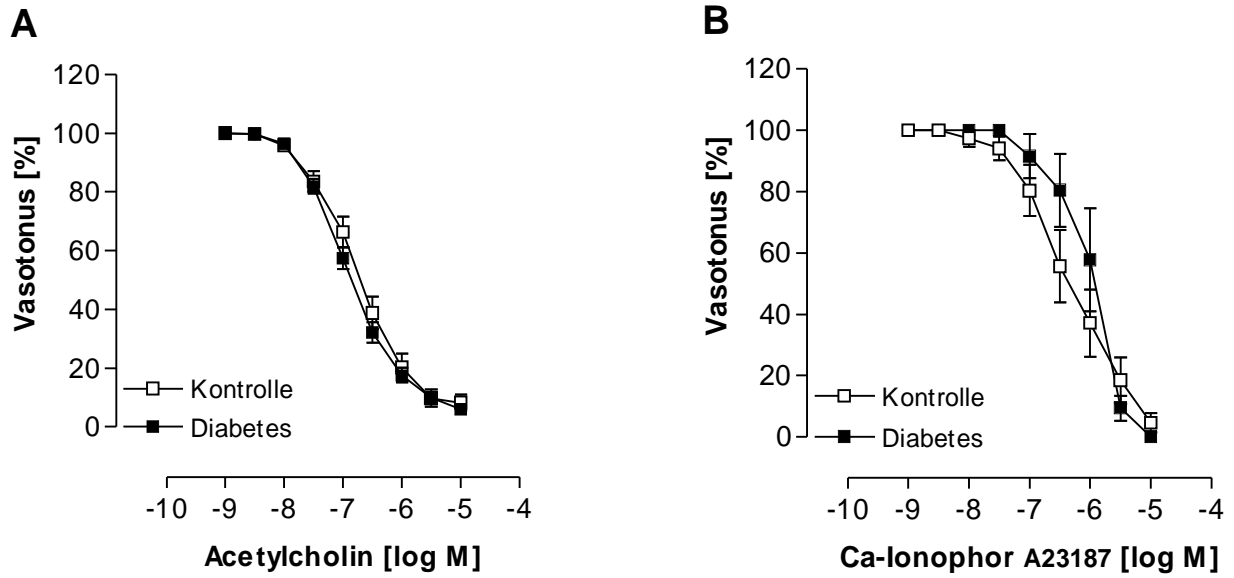


Abb. 4.03 Endothelabhängige Vasorelaxation

Endothelabhängige Vasorelaxation isolierter thorakaler Aortenringe aus Kontrollen (□) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (■) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Vasorelaxation nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin nach Applikation von Acetylcholin (A, Kontrolle n=30, Diabetes n=17) und Ca-Ionophor A23187 (B, Kontrolle n=5, Diabetes n=5). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM).

In weiteren funktionellen Untersuchungen wurde zusätzlich die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation von Mauseorten nach einer Diabetesdauer von 11 und 22 Wochen untersucht, um zu klären, ob die nach 16 Wochen beobachtete intakte Relaxationsfähigkeit der Aorten von diabetischen Mäusen (Abb. 4.03 A) bestätigt werden konnte. Abb. 4.04 zeigt das maximale Relaxationsvermögen von Aorten diabetischer Tiere im Vergleich zu entsprechenden Kontrollaorten in Abhängigkeit von der Diabetesdauer bei einer applizierten Höchstdosis von Acetylcholin ($10 \mu\text{M}$) nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin. Die maximale Vasorelaxation der untersuchten Gefäße betrug unabhängig vom Stoffwechselstatus bei allen untersuchten Gefäßen ca. 80 %. Nach 11 Wochen Diabetesdauer war eine geringfügige, aber signifikante Verschlechterung der maximalen Vasorelaxation im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren zu beobachten. Diese leicht eingeschränkte Endothelfunktion war allerdings nur transient, denn nach 16 bzw. 22 Wochen Diabetesdauer war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer verminderten Reaktivität auf Acetylcholin bzw. den Calcium-Ionophor A23187 war somit unter den gewählten Versuchsbedingungen in Aorten aus diabetischen Mäusen nicht nachweisbar.

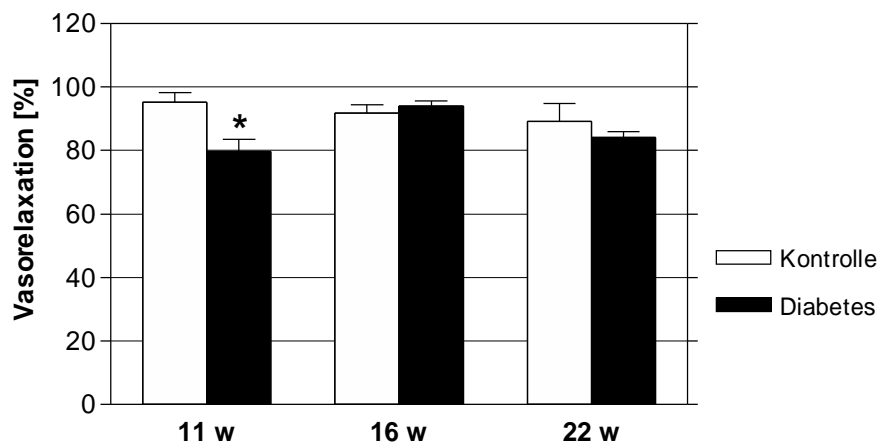


Abb. 4.04 Endothelabhängige Vasorelaxation in Abhängigkeit von der Diabetesdauer

Einfluss von Diabetes auf die maximale Vasorelaxation nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ Acetylcholin bei einer Diabetesdauer von 11 Wochen (Kontrolle $n=6$, Diabetes $n=10$), 16 Wochen (Kontrolle $n=17$, Diabetes $n=30$) und 22 Wochen (Kontrolle $n=4$, Diabetes $n=5$). Prozentuale Darstellung der endothelabhängigen Vasorelaxation isolierter thorakaler Aortenringe aus Kontrollen (\square) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare) als Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,05$, t -Test für Kontrolle vs. Diabetes.

Vasorelaxation durch NO-Donor SNAP (exogenes NO)

Die Relaxationsfähigkeit diabetischer Aorten auf exogen zugeführtes NO wurde durch kumulativen Zusatz (0,1 nM - 10 μ M) des NO-Donors S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen ermittelt. Es sollte geprüft werden, ob die NO-Sensitivität der GefäÙe durch die diabetische Stoffwechsellage verändert wird.

Die Aorten aus diabetischen Mäusen und Kontrollmäusen zeigten nach Zugabe von SNAP eine vollständige Relaxation ohne Unterschied. Dieser Befund machte deutlich, dass die NO-Sensitivität der Aorten durch STZ-Diabetes nicht beeinflusst wird. Das heißt, die Enzymkaskade der NO/cGMP-Signaltransduktion wies *downstream* der NO-Synthese keine Störung auf, die sich auf die GefäÙfunktion auswirkte.

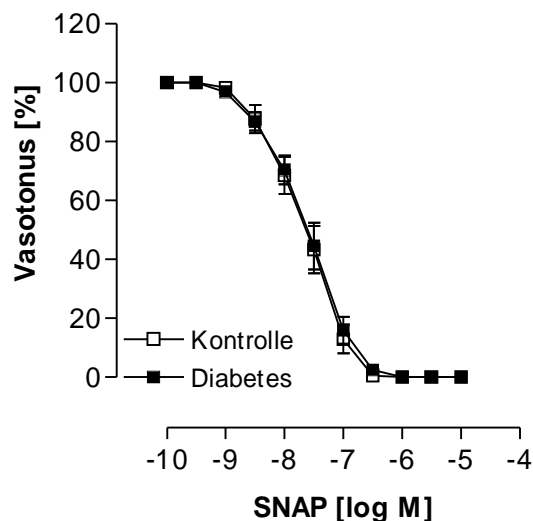


Abb. 4.05 Vasorelaxation durch den NO-Donor SNAP

Wirkung von SNAP auf Phenylephrin-vortonisierte thorakale Aortenringe aus Kontrollen (\square , $n=6$) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare , $n=10$) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM).

Vasorelaxation nach muskulotroper Stimulation

Zur Ermittlung der direkten Stimulierbarkeit von glatten Muskelzellen wurden die isolierten Aorten nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen mit kumulativen Dosen (1 nM - 10 μ M) Papaverin behandelt. Papaverin wirkt direkt als muskulotropes Spasmolytikum unabhängig von der vegetativen Innervation auf die glatte Muskelzelle[79].

Der Vergleich der durch kumulative Dosen von Papaverin erzeugten Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zeigte keinen Unterschied zwischen Aorten von diabetischen und unbehandelten Mäusen. Dies bedeutet, dass die direkte Ansprechbarkeit der glatten Muskelzellen im Diabetes nicht gestört war.

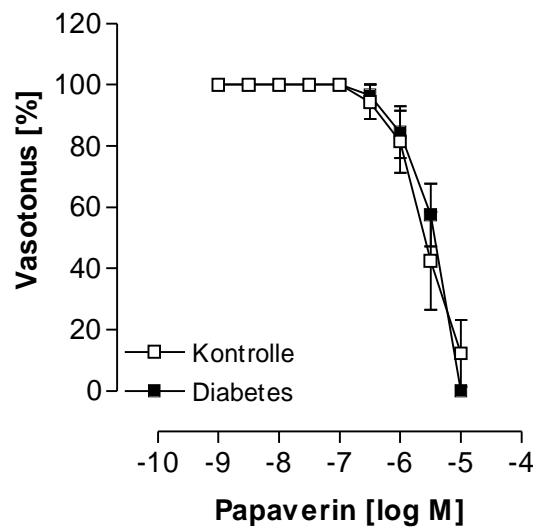


Abb. 4.06 Vasorelaxation durch Papaverin

Wirkung von Papaverin auf Phenylephrin-vortonisierte thorakale Aortenringe von Kontrollen (\square , $n=6$) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare , $n=10$) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM).

4.2.2 a-adrenerge Vasokontraktion

Der Gefäßtonus wird durch die Balance zwischen vaskulärer Relaxation und Kontraktion charakterisiert. Daher ist die Vasokontraktion ein weiterer Parameter zur Erfassung der vaskulären Funktion. Um den Einfluss von Diabetes auf die Integrität der Signaltransduktion rezeptorstimulierter Vasokontraktion zu untersuchen, wurde die vasokontraktile Potenz der Aorten nach kumulativer Applikation (1 nM - 10 μ M) von Phenylephrin bei einer Diabetesdauer von 16 Wochen bestimmt. Phenylephrin verursacht über eine Stimulation des G-Protein-gekoppelten $\alpha_{1A/C}$ -adrenergen Rezeptors eine Vasokontraktion.

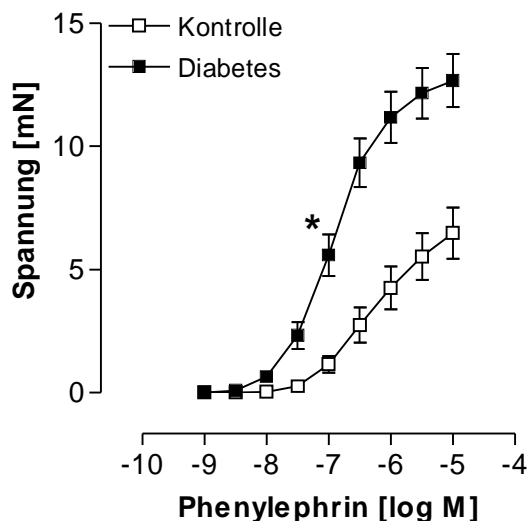


Abb. 4.07 Vasokontraktion durch Phenylephrin
Vasokontraktion isolierter thorakaler Aortenringe aus Kontrollen (\square , $n=16$) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare , $n=24$) nach Applikation von Phenylephrin bei einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,0001$, Two-way-ANOVA.

	Kontrolle	Diabetes
Max. Vasokontraktion [mN]	6,49 \pm 1,04	12,68 \pm 1,07*
pD ₂ -Wert [- log M]	6,27 \pm 0,05	6,92 \pm 0,02*

Tab. 4.04 Vasokontraktion durch Phenylephrin

Einfluss von Diabetes auf die maximale Vasokontraktion und den pD₂-Wert nach Applikation von 10 μ M Phenylephrin bei Kontrolltieren und diabetischen C57/Bl6-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,05$, t-Test.

Die Ergebnisse zur vasokontraktiven Fähigkeit der Aorten zeigten, dass die Aorten von diabetischen Mäusen im Vergleich zu Kontrollaorten eine Hyperkontraktilität nach Phenylephrin-Gabe bei einer Diabetesdauer von 16 Wochen aufwiesen. Sowohl die Maximalantwort als Reaktion auf die applizierte Höchstdosis von Phenylephrin (10 μ M) als auch der pD_2 -Wert als Ausdruck einer Gefäß-Hypersensitivität waren signifikant erhöht (Tab. 4.04).

In weiteren funktionellen Studien wurden Aorten aus Mäusen mit STZ-Diabetes nach 11 und 22 Wochen Diabetesdauer untersucht, um den Einfluss der Diabetesdauer auf die Phenylephrin-induzierte Hyperreaktivität zu analysieren. In Abb. 4.08 ist die vasokontraktile Potenz von Aorten aus diabetischen Mäusen und Kontrolltieren in Abhängigkeit von der Diabetesdauer dargestellt. Diabetische Gefäße wiesen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Hyperreaktivität unabhängig von der Diabetesdauer auf. Bei allen nachfolgenden Untersuchungen zur Vasokontraktion wurden Aorten aus Tieren mit einer induzierten Diabetesdauer von 16 Wochen verwendet.

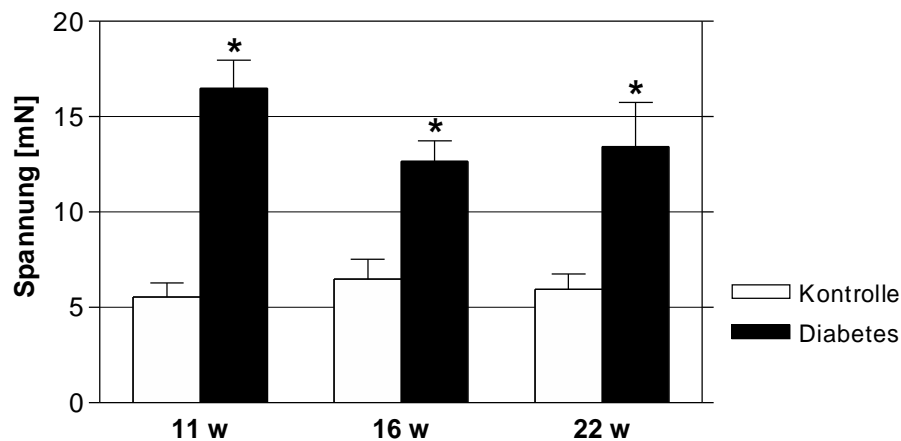


Abb. 4.08 Vasokontraktion durch Phenylephrin in Abhängigkeit von der Diabetesdauer

Einfluss von Diabetes auf die maximale Vasokontraktion nach Applikation von 10 μ M Phenylephrin nach einer Diabetesdauer von 11 Wochen (Kontrolle $n=6$, Diabetes $n=10$), 16 Wochen (Kontrolle $n=16$, Diabetes $n=24$) und 22 Wochen (Kontrolle $n=4$, Diabetes $n=5$). Darstellung der Vasokontraktion isolierter thorakaler Aortenringe aus Kontrolltieren (\square) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,05$, t -Test für Kontrolle vs. Diabetes.

4.3 Endotheliale Vasorelaxation und Inflammation

In Kapitel 4.2.1 wurde gezeigt, dass eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer verminderten NO-vermittelten endothelabhängigen Vasorelaxation unter den gewählten Versuchsbedingungen in Aorten von C57/Bl6-Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte. Im Widerspruch zu den hier erhobenen Befunden wurde von *Soriano et al.* publiziert, dass der Mausstamm BalbC nach Induktion eines STZ-Diabetes eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion entwickelt [70]. Da die Versuchsbedingungen nicht nur hinsichtlich des Mausstammes, sondern auch in weiteren Details (Tab. 4.05) differierten, wurde eine vergleichende Untersuchung unter Anwendung der publizierten Bedingungen durchgeführt.

	<i>Soriano et al.</i>	eigene Versuchsparameter
Mausstamm	BalbC	C57/Bl6
STZ-Injektion	<i>single dose</i>	<i>multiple dose</i>
	1 x 240 mg/kg KG	4 x 55 mg/kg KG
Diabetesdauer	8 w	11 w, 16 w, 22 w

Tab. 4.05 Vergleich der Versuchsparameter von *Soriano et al.* [70] und den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Versuchsbedingungen

4.3.1 Funktionelle Charakterisierung der Gefäßreaktivität

Die unter Anwendung der publizierten Bedingungen erhobenen Daten sind in Tab. 4.06 und Abb. 4.09 dargestellt. Die STZ-behandelten BalbC-Mäuse entwickelten innerhalb von 8 Wochen eine massive Hyperglykämie sowie eine verzögerte Gewichtszunahme. Das pathologische Erscheinungsbild des STZ-Diabetes in BalbC-Mäusen entsprach den von *Soriano et al.* veröffentlichten Daten. Die Daten zu Blutglukose und Körpergewicht korrelierten mit den in der Studie von *Soriano et al.* beschriebenen Daten.

	<i>Soriano et al.</i>		eigene Daten	
	Kontrolle	Diabetes	Kontrolle	Diabetes
Blutglukose [mmol/l]	5,6 ± 1,1 [#]	29,4 ± 3,9 [#]	7,9 ± 0,5	28,8 ± 1,6

Tab. 4.06 Blutglukose

Vergleich der Blutglukosewerte zwischen den publizierten Daten von *Soriano et al.* und den im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter denselben Bedingungen ermittelten Daten ([#] aus Diagramm in Veröffentlichung abgelesen).

Soriano et al. wiesen in physiologischen Studien mit isolierten Aortenringen von BalbC-Mäusen eine endotheliale Dysfunktion bei gleichzeitig eingeschränkter Vasokontraktion nach. Dagegen zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten unter Verwendung der von *Soriano et al.* publizierten Bedingungen zur vaskulären Reaktivität von BalbC-Mäusen keine endotheliale Dysfunktion. Die Aorten diabetischer und unbehauelter BalbC-Mäuse reagierten ohne Unterschied mit einer vollständigen Vasorelaxation. Die Konzentrations-Wirkungskurven nach Applikation kumulativer Dosen von Acetylcholin (1 nM - 10 µM) waren nahezu deckungsgleich (Abb. 4.09 A). Entsprechend der Daten zur Gefäßreaktivität mit diabetischen C57/Bl6-Mäusen (s. 4.2.2) war auch bei dem BalbC-Mäusen die Vasokontraktilität der Aorten nach Applikation von kumulativen Dosen (1 nM - 10 µM) Phenylephrin deutlich erhöht (Abb. 4.09 B).

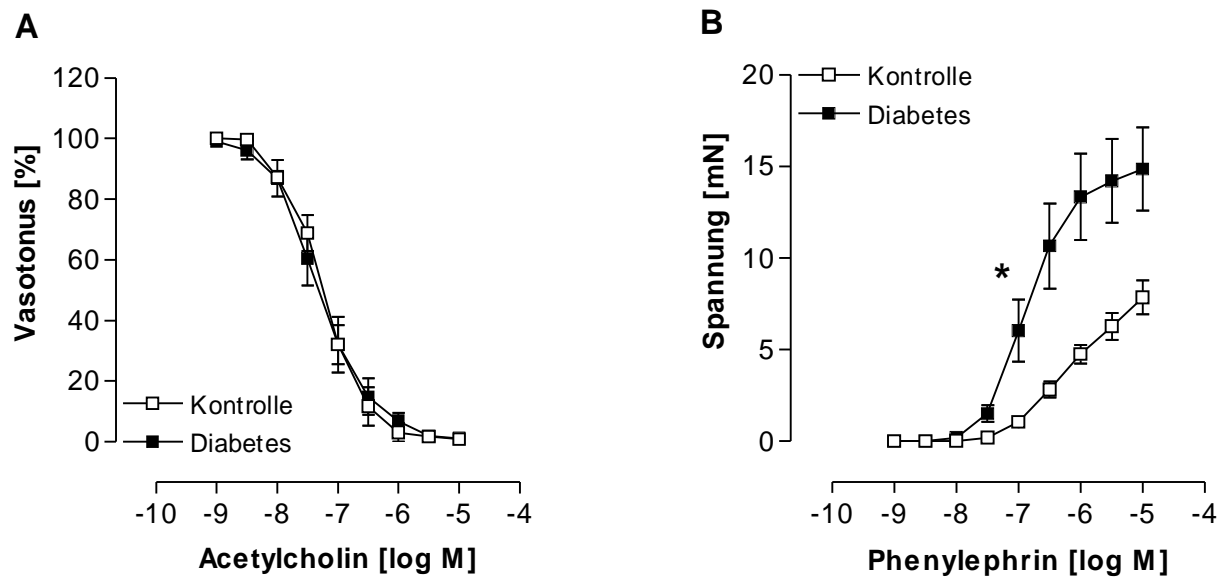


Abb. 4.09 Vasoreaktivität von BalbC-Mäusen

Einfluss von Diabetes auf die Vasoreaktivität isolierter thorakaler Aortenringe aus Kontrollen (\square , $n=3$) und diabetischen BalbC-Mäusen (\blacksquare , $n=7$). Vasorelaxation nach submaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin nach Applikation von Acetylcholin (A) sowie Vasokontraktion nach Applikation von Phenylephrin (B) bei einer Diabetesdauer von 8 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,0001$, Two-way-ANOVA.

Die vergleichende Analyse zur Gefäßreaktivität mit dem BalbC-Mausstamm zeigte, dass die erhobenen Daten zur Vasorelaxation und Vasokontraktion unabhängig von dem verwendeten Mausstamm reproduziert werden konnten. Die von Soriano *et al.* publizierten Ergebnisse widersprechen jedoch den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten. Deshalb sollten weitere biochemische Untersuchungen Hinweise auf die Ursache für diese Differenzen geben und somit zum besseren Verständnis der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion beitragen.

Als mögliche Ursache der beobachteten endothelialen Dysfunktion im STZ-Diabetes diskutierten Soriano *et al.* einen massiven ATP-Verlust sowie die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Im Unterschied zur endothelialen NO-Synthase (eNOS) werden durch die Aktivität der iNOS 10-100fache und dadurch toxische Konzentrationen von NO freigesetzt. Dies wird als Ausdruck eines inflammatorischen Geschehens interpretiert. Zur vergleichenden Analyse wurden deshalb der ATP-Gehalt sowie die Expression der iNOS in Aorten von STZ-Mäusen und Kontrolltieren bestimmt.

4.3.2 Bestimmung des ATP-Gehaltes

Soriano et al. postulierten die von ihnen beobachtete endotheliale Dysfunktion als Folge einer Verarmung der Zellen an energiereichen Phosphaten wie ATP und NADPH. Dieser Mangelzustand ergibt sich durch die Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), die durch Radikal-induzierte DNA-Strangbrüche aktiviert wird und hohe Konzentrationen an ATP zur DNA-Reparatur verbraucht. Die Messung des ATP-Gehaltes sollte Auskunft über den Energiestatus der untersuchten Gewebe geben [70]. Während der ATP-Konzentration in Herzen von diabetischen und unbehandelten Mäusen keinen signifikanten Unterschied aufwies, war der ATP-Gehalt in den Kontrollaorten von $0,28 \pm 0,06 \mu\text{M}$ nach STZ-Induktion auf $0,10 \pm 0,02 \mu\text{M}$ signifikant erniedrigt. Der Gehalt an ATP betrug in Aorten diabetischer Mäuse nur ca. 1/3 des Gehaltes in Kontrollen und wies somit auf ein erhebliches gefäßspezifisches Energiedefizit hin.

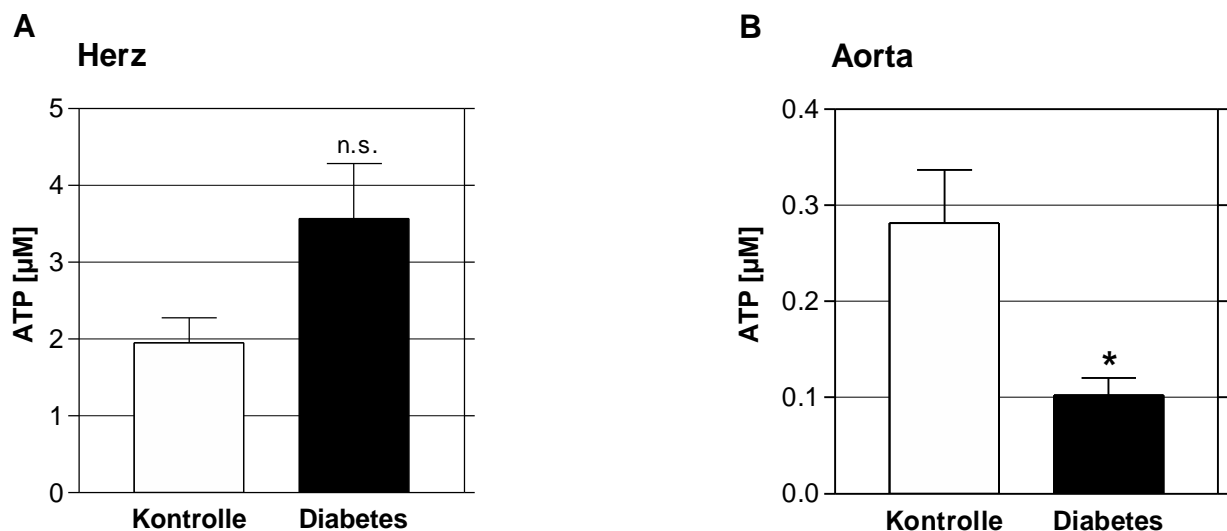


Abb. 4.10 ATP-Gehalt

Einfluss von Diabetes auf den ATP-Gehalt im Herz (A) und in der Aorta (B). Quantitative Darstellung der ATP-Konzentration in Kontrollgewebe (\square) und in Geweben aus diabetischen BalbC-Mäusen (\blacksquare). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) von $n=3-4$ einzelnen Experimenten. Der ATP-Gehalt wurde luminometrisch bestimmt und auf 100 mg Feuchtgewebe bezogen, * $P=0,02$, t -Test.

4.3.3 Untersuchung der Expression der induzierbaren NO-Synthase

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird bei pathologischen Zustände oder nach einer Zytokin-induzierten Stimulation exprimiert, um unter anderem Entzündungs- bzw. Immunreaktionen zu vermitteln [80]. Die iNOS-Expression wurde in Aortengeweben mittels Immundetektion bestimmt. Wie in Abb. 4.11 dargestellt, konnte in Aorten diabetischer Mäuse keine iNOS-Expression nachgewiesen werden. In Aortengeweben normoglykämischer Tiere war die iNOS - wie zu erwarten - ebenfalls nicht exprimiert. Dieser Befund steht im Widerspruch zu der Diskussion von *Soriano et al.* und deutet daraufhin, dass der Unterschied zwischen beiden Versuchsansätzen möglicherweise im inflammatorischen Status der Tiere begründet ist.

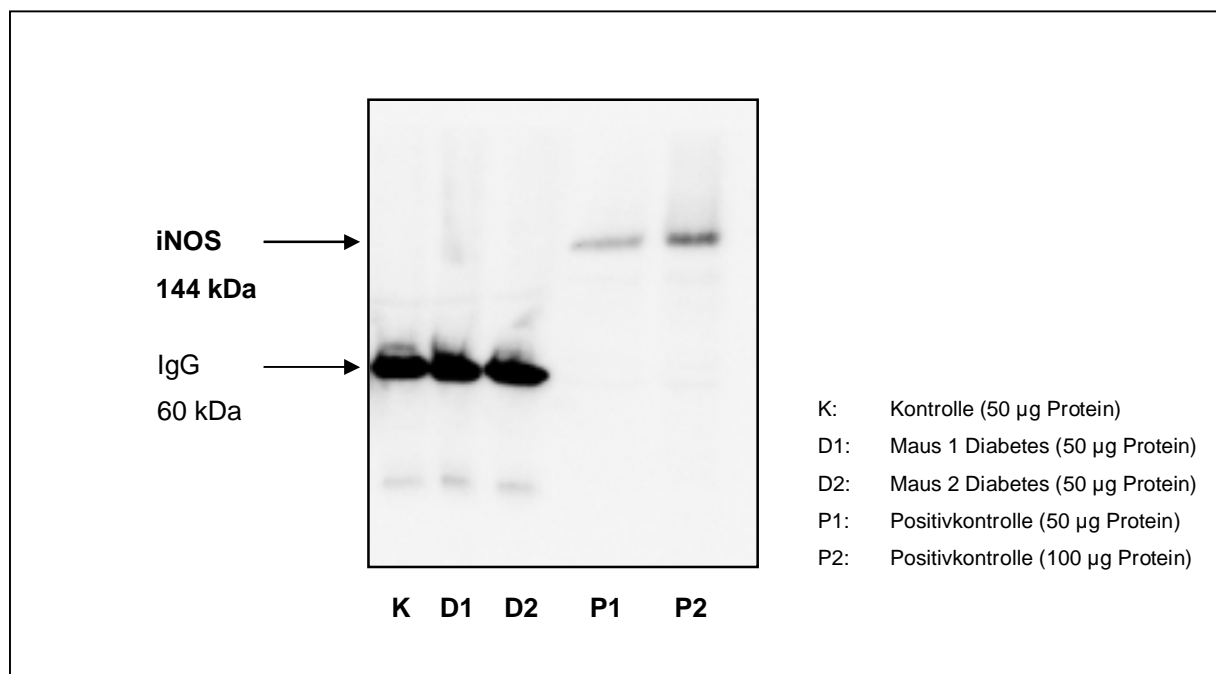


Abb. 4.11 Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Repräsentativer Western Blot zur Analyse der iNOS-Expression in Gesamtlisaten aus Aortengeweben von unbehandelten (K) und diabetischen BalbC-Mäusen (D). Als Positivkontrolle (P) wurde ein Maus-Makrophagen-Lysat verwendet, das mit Interferon- γ / Lipopolysaccharid stimuliert worden war. Immunglobulin G (IgG) wurde in den Gewebelysaten durch den sekundären anti-Maus-IgG-Antikörper ebenfalls detektiert.

4.4 Untersuchungen zur Hyperkontraktilität nach adrenerger Stimulation im Diabetes

In Kapitel 4.2.2 wurde beschrieben, dass isolierte Aortenringe von diabetischen Mäusen nach Applikation des adrenergen Vasokonstriktors Phenylephrin eine Hyperkontraktilität mit erhöhter Gefäßsensitivität aufwiesen. Weitere Untersuchungen mit STZ-behandelten C57/Bl6-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen sollten Hinweise auf die Ursache für diese Beobachtung geben.

4.4.1 Untersuchungen zur Rezeptorspezifität der Hyperkontraktilität

Zunächst wurde untersucht, ob eine Diabetes-bedingte Beeinflussung der adrenergen Signalkaskade auf Rezeptorebene für die Hyperkontraktilität nach Applikation von Phenylephrin verantwortlich ist. Die Expression des durch Phenylephrin-stimulierten $\alpha_{1A/C}$ -Rezeptors wurde untersucht, um zu ermitteln, ob eine Diabetes-induzierte Veränderung der Rezeptordichte ursächlich an der Hyperkontraktilität beteiligt ist. Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Hyperkontraktilität spezifisch für das adrenerge Rezeptorsystem ist. Dazu wurden funktionelle Studien mit vasoaktiven Substanzen durchgeführt, die unabhängig vom adrenergen Rezeptor über die Innervation anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren eine Vasokontraktion auslösen. Zusätzlich wurde geprüft, ob die rezeptorunabhängige Vasokontraktion ebenfalls durch die diabetische Stoffwechsellage verändert wird.

Expression des α_{1AC} -Rezeptors

Die Rezeptordichte des α_{1AC} -Rezeptors in Aortengeweben wurde mittels Immundetektion bestimmt, um den Effekt einer Hyperglykämie auf die Expression des durch Phenylephrin stimulierten adrenergen Rezeptors (α_{1AC} -Rezeptor) zu untersuchen. Die Ergebnisse der Immundetektion zeigten, dass die Rezeptormenge in den Aorten von diabetischen Mäusen nicht verändert war. Eine Hoch-Regulation des α_{1AC} -Rezeptors als Ursache für die verstärkte Vasokontraktion der Aortenringe von diabetischen Mäusen konnte somit ausgeschlossen werden.

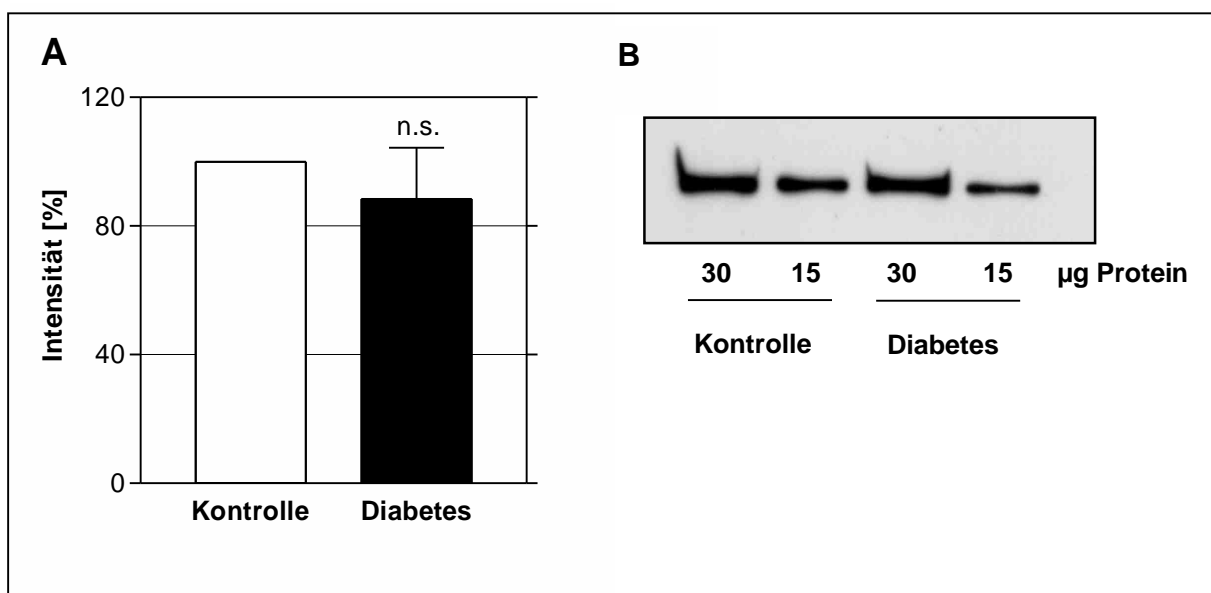


Abb. 4.12 Expression des α_{1AC} -Rezeptors

Einfluss von Diabetes auf die Proteinexpression des α_{1AC} -Rezeptors in Aortengeweben von Kontrollen (\square) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. **A.** Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwert (\pm SEM) von $n=6$ einzelnen Experimenten. Die Kontrollwerte wurden auf 100 % normiert. **B.** Repräsentativer Western Blot.

Vaskuläre Reaktivität nach Rezeptorabhängiger Stimulation

Ergänzend zu den Untersuchungen der Expression des α_{1AC} -Rezeptors wurden funktionelle Studien im Organbad vorgenommen, um zu prüfen, ob die Hyperkontraktilität der Aortenringe von diabetischen Mäusen spezifisch für die adrenerge Stimulation durch Phenylephrin ist. Deshalb wurde die vasokonstriktile Potenz von Serotonin und Prostaglandin F_{2a} untersucht. Beide Substanzen führen rezeptorabhängig und G-Proteinvermittelt zu einer Vasokontraktion, die aber unabhängig von dem durch Phenylephrin innervierten adrenergen α_{1AC} -Rezeptor ist.

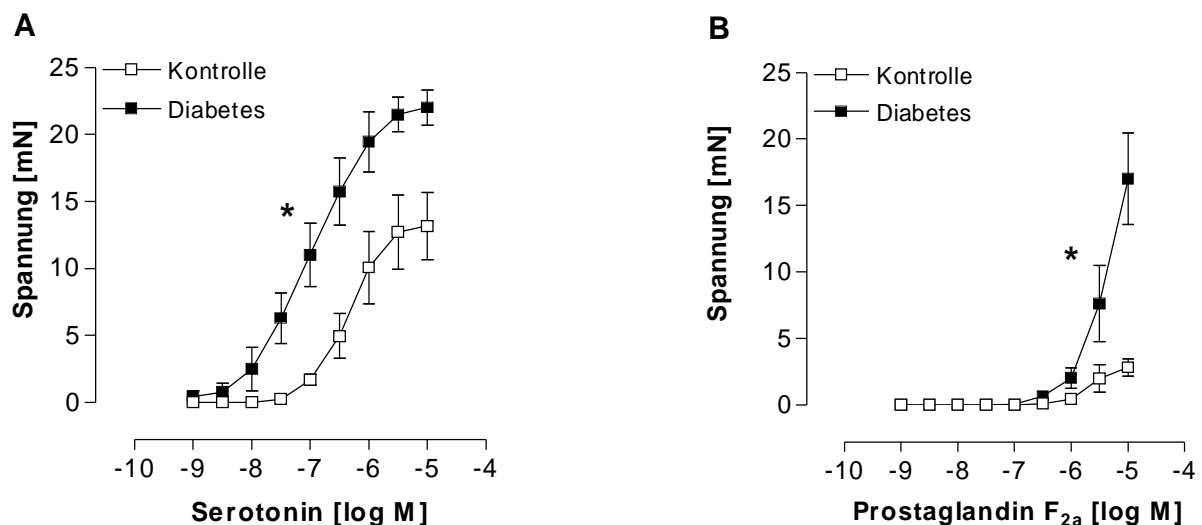


Abb. 4.13 Rezeptorabhängige Vasokontraktion

Rezeptorabhängige Vasokontraktion isolierter thorakaler Aortenringe aus Kontrolltieren (\square) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare) nach Applikation von Serotonin (**A**) und Prostaglandin F_{2a} . (**B**) bei einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) für $n=5$ einzelne Experimente, (**A**) * $P=0,007$, Two-way-ANOVA, (**B**) * $P<0,0001$, Two-way-ANOVA.

A		
Serotonin	Kontrolle	Diabetes
Max. Vasokontraktion [mN]	13,18 ± 2,51	22,03 ± 1,33*
pD ₂ -Wert [- log M]	6,34 ± 0,16	6,98 ± 0,16*

B		
Prostaglandin F_{2a}	Kontrolle	Diabetes
Max. Vasokontraktion [mN]	2,83 ± 0,64	17,01 ± 3,44*
pD ₂ -Wert [- log M]	—	—

Tab. 4.07 Einfluss von Diabetes auf die rezeptorabhängige Vasokontraktion

Einfluss von Diabetes auf die maximale Vasokontraktion und den pD₂-Wert nach Applikation von 10 µM Serotonin (A) und Prostaglandin F_{2a} (B) bei Kontrollen und diabetischen C57/Bl6-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. (Der pD₂-Wert-Wert für die unter B dargestellte Kurve ist aufgrund des Kurvenverlaufs nicht bestimmbar.) Dargestellt sind die Mittelwerte (± SEM), * P<0,05, t-Test.

Die Konzentrations-Wirkungskurven für Serotonin und für Prostaglandin F_{2a} zeigten eine verstärkte Vasoreaktivität bei den Aorten diabetischer Tiere. Diese Ergebnisse wiesen daraufhin, dass die im Diabetes beobachtete Hyperkontraktibilität nicht auf eine adrenerge Stimulation beschränkt war, sondern auch nach Aktivierung anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auslösbar war. In Ergänzung zu den Daten der Expressionsuntersuchung des adrenergen Rezeptors (Abb. 4.12) waren auch diese Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass ein Defekt der Signalkaskade, der ursächlich für die Hyperkontraktibilität im Diabetes ist, nur *downstream* der Rezeptorebene lokalisiert sein kann.

Vaskuläre Reaktivität nach Rezeptorunabhängiger Stimulation

Es wurden Aorten diabetischer Tiere mit Kaliumchlorid stimuliert, um zu untersuchen, ob die verstärkte Vasokontraktion im Diabetes auf rezeptorunabhängigen Mechanismen beruht. Kaliumchlorid führt rezeptorunabhängig zu einer Dauerdepolarisation der Membran glatter Muskelzellen. Die Folge ist ein erhöhter Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Muskelzelle aufgrund der Öffnung von L-Typ-Calciumkanälen, was in einer Muskelkontraktion resultiert. Kaliumchlorid wurde in einer finalen Konzentrationen von 80 mmol/l eingesetzt. Diese Konzentration erzeugte eine Dauerdepolarisation der Membran, die einen maximalen Einstrom von extrazellulärem Calcium in die glatten Muskelzellen gewährleistete.

Die durch Kaliumchlorid bedingte Vasokontraktion war im Diabetes ($12,7 \pm 0,5$ mN) verglichen mit Kontrollen ($10,6 \pm 0,61$ mN) signifikant erhöht ($P=0,02$, t-Test). Die Ergebnisse zeigten, dass die vaskuläre Hyperkontraktibilität in diabetischen Mäusen zumindest teilweise durch rezeptorunabhängige Mechanismen verursacht wurde.

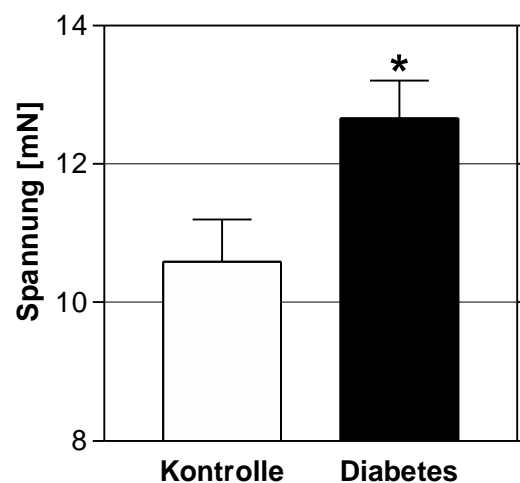


Abb. 4.14 Vasokontraktion durch Kaliumchlorid

Vasokontraktile Effekt thorakaler Aortenringe von Kontrollen (\square , $n=19$) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare , $n=30$) nach Applikation einer einmaligen Dosis von 80 mmol/l KCl nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P=0,02$, t-Test.

4.4.2 Einfluss der Proteinkinase C auf die Vasokontraktion

Die Proteinkinase C (PKC) ist an der Regulation des myogenen Tonus beteiligt. Die durch dieses Enzym vermittelten Protein-Phosphorylierungen führen zu einer Steigerung des vaskulären Tonus [81]. Es wird diskutiert, dass die diabetische Stoffwechsellaage zu einer gesteigerten PKC-Aktivität führt [82]. Es wurde daher geprüft, ob die Hyperkontraktibilität Ursache einer Diabetes-bedingten Modulation der PKC-Funktion ist. Chelerythrin ist ein selektiver, zellmembranpermeabler Inhibitor der PKC. Um den Einfluss der PKC auf die vasokontraktile Aktivität zu untersuchen, wurden Aortenringe von diabetischen bzw. unbehandelten Mäusen mit 100 μM Chelerythrin inkubiert, bevor eine Konzentrations-Wirkungskurve mit Phenylephrin aufgezeichnet wurde.

Wie aus Abb. 4.15 folgt, hatte Chelerythrin keinen Einfluss auf die Phenylephrin-induzierte Vasokontraktion. Die Hyperkontraktibilität der Aorten aus diabetischen Mäusen, verglichen mit Kontrollen, wurde durch die Inhibition der PKC nicht beeinflusst. Das heißt, dass die PKC nicht ursächlich an der Diabetes-induzierten Hyperkontraktibilität beteiligt war.

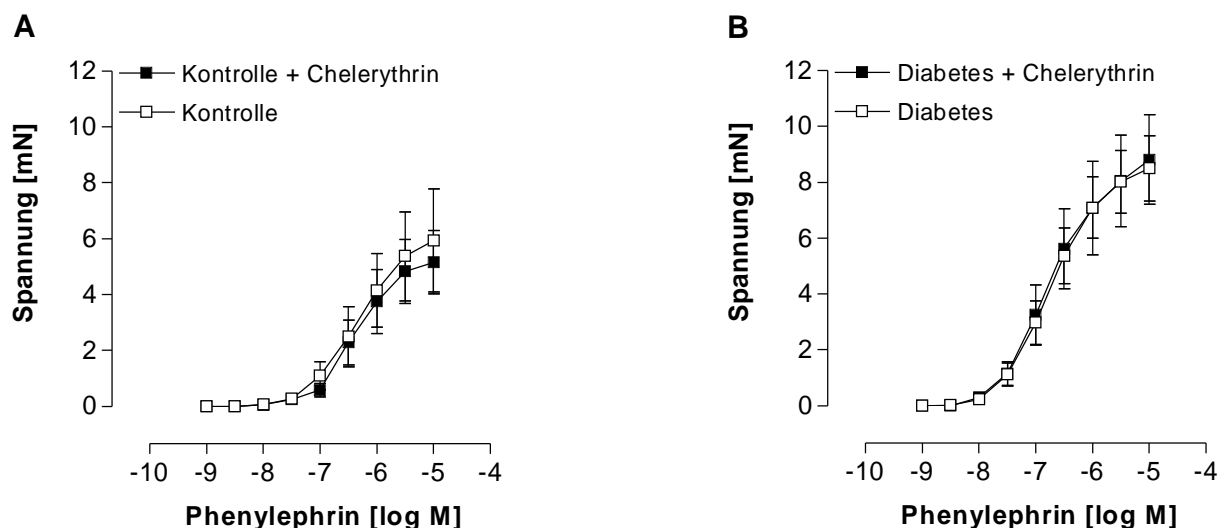
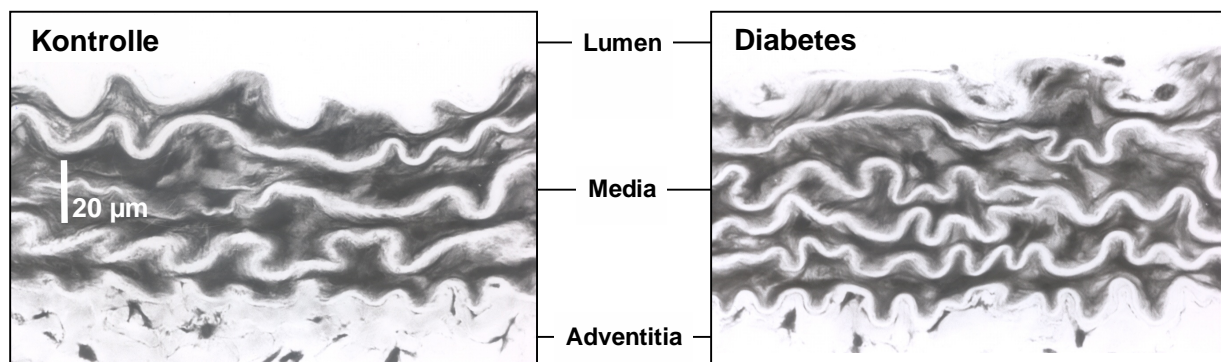


Abb. 4.15 *Vasokontraktion durch Phenylephrin unter Hemmung der Proteinkinase C (PKC)*
Einfluss der PKC-Hemmung mit Chelerythrin auf die Phenylephrin-induzierte Vasokontraktion durch von Aorten aus (A) Kontrollen (n=4-7) und (B) diabetischen C57/Bl6-Mäusen (n=7-15) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Die Aortenringe wurden entweder mit 100 μM Chelerythrin (■) oder Puffer-Vehikel (□) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM).

4.4.3 Morphologische Untersuchung der Aorta

Die morphologische Analyse der Media-Dicke sollte Hinweise darauf geben, ob die Gefäße im Diabetes strukturelle Veränderungen aufweisen, die zu einer Hyperkontraktilität beitragen können. Dazu wurde die Media-Dicke von Aorten bestimmt, die zuvor in funktionellen Studien analysiert worden waren. Wie in Abb. 4.16 dargestellt, ergab sich eine Zunahme der Media-Dicke von $46,1 \pm 1,2 \mu\text{m}$ bei Aorten von Kontrolltieren auf $52,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$ bei Aorten von diabetischen Mäusen. Das entsprach einer Zunahme der Media-Dicke im Diabetes um 12 %.

A



B

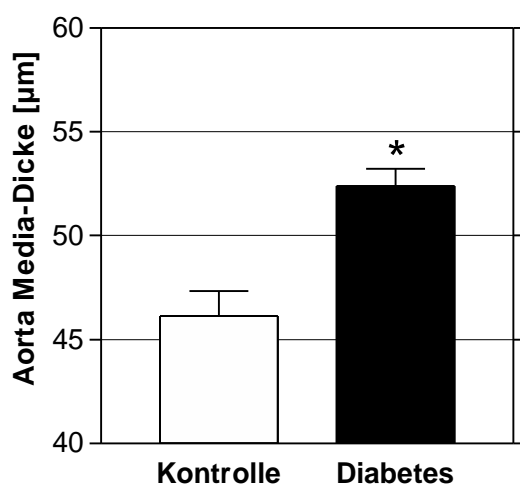


Abb. 4.16 Bestimmung der Media-Dicke

Ergebnis der morphologischen Untersuchung der Media-Dicke von Aorten aus Kontrollen (\square) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen (\blacksquare) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. **A.** Repräsentative Fotoausschnitte von Aortensegmenten einer Kontrolle und einer diabetischen Maus. **B.** Es wurden jeweils vier einzelne Messungen an 5 verschiedenen Bereichen eines Aortenringes durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) für $n=5-6$ Aorten, * $P<0,02$, t-Test.

4.4.4 Einfluss der NO-Signaltransduktion auf die Vasokontraktion

Der Vasotonus wird durch eine Balance zwischen Vasokontraktion und Vasorelaxation aufrechterhalten. Die beobachtete verstärkte Vasokontraktion im Diabetes könnte Ursache für eine Diskrepanz zwischen vasokontraktiler und vasorelaxierender Potenz sein. Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass die Entfernung des Endothels [83] bzw. die Inhibition der endothelialen NO-Synthase (eNOS) die vasokontraktile Potenz verstärken [84]. Ziel dieser Untersuchung war es daher, den Einfluss von Diabetes auf die NO/cGMP-Signalkaskade und deren Bedeutung für die im Diabetes erhöhte Vasokontraktion zu untersuchen. Um die Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade zu analysieren, wurden funktionelle Studien unter Inhibition des Schlüsselenzyms eNOS durchgeführt. Dazu wurden sowohl Versuche an Aorten aus Mäusen mit genetischer Deletion der eNOS als auch Versuche an Wildtyp-Mäusen nach enzymatischer Inhibition der eNOS durchgeführt.

4.4.4.1 Untersuchung der Vasokontraktion nach genetischer Deletion der endothelialen NO-Synthase

Bei homo- und heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen wurde STZ-Diabetes induziert, um den Einfluss der endogenen NO-Produktion auf die Vasokontraktion bei diabetischer Stoffwechsellage zu untersuchen. Die Mäuse entstammten einer Zucht von heterozygoten Ausgangspaaren und wurden daher vor der STZ-Injektion bezüglich ihres Genotyps charakterisiert. Der Genotyp wurde durch folgende Untersuchungen bestätigt:

- PCR-gestützte Analyse der mutierten DNA
- Untersuchung der eNOS-Proteinexpression durch Immundetektion
- Funktionelle Untersuchung der endothelabhängigen Vasorelaxation

Die Analyse der vasokontraktilen Gefäßreaktivität erfolgte bei den eNOS K.O.-Mäusen durch Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungskurve nach Stimulation mit dem adrenergen Vasokonstriktor Phenylephrin (vgl. 4.2.2).

Nachweis des Genotyps durch PCR-gestützte Analyse des mutierten DNA-Inserts

Die Mäuse wurden zunächst hinsichtlich ihres Genotyps mit Hilfe einer PCR-gestützten DNA-Analyse, wie unter 3.1.2 beschrieben, untersucht. Die „*knock out*“-Tiere enthielten anstelle des Exon 12 des eNOS-Gens ein Insert, bestehend aus einem Neomycin-Resistenz-Gen. Das intakte eNOS-Gen wurde durch ein 256 bp großes Fragment repräsentiert, während das Neomycin-Resistenz-Gen als ein 542 bp Fragment amplifiziert wurde (Abb. 4.17). Alle in der Versuchsreihe untersuchten Tiere wurden mittels PCR-Analyse genotypisiert. Die Genotypisierung wurde exemplarisch durch Bestimmung der eNOS-Expression mittels Immundetektion verifiziert (Abb. 4.18).

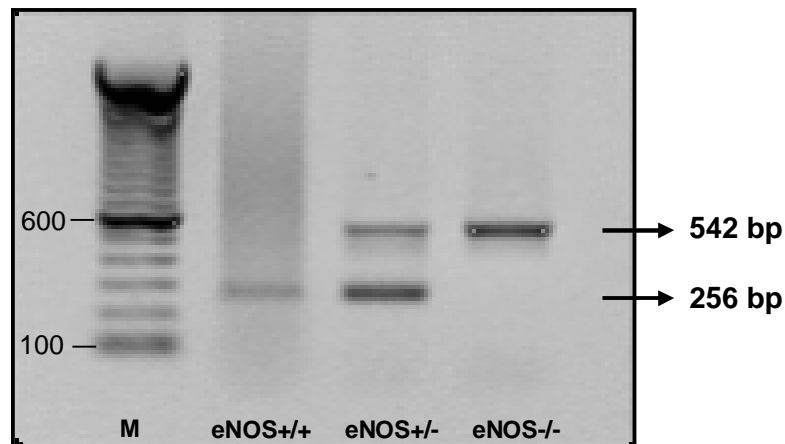


Abb. 4.17 Genotypisierung der eNOS K.O.-Mäuse

Beispiel einer Genotypisierung transgener Mäuse. Inverse Darstellung eines 0,7 %igen, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels zur Auftrennung der PCR-Produkte aus genomischer DNA einer Wildtyp-Maus (**eNOS+/+**), einer heterozygoten eNOS K.O.-Maus (**eNOS+/-**) und einer homozygoten eNOS K.O.-Maus (**eNOS-/-**). 100 bp-Leiter als Größenstandard (**M**).

Untersuchung der eNOS-Proteinexpression durch Immundetektion

Die DNA der eNOS K.O.-Mäuse wurde entsprechend der Beschreibung unter 3.1.2 genotypisiert. Die Genotypisierung wurde exemplarisch auf Proteinebene durch Bestimmung der eNOS-Expression in Aortenhomogenaten mittels Immundetektion verifiziert. Bei homozygoten eNOS K.O.-Mäusen liess sich unter den gegebenen Bedingungen für das eNOS-Protein kein Signal detektieren. Heterozygote Tiere zeigten eine eNOS-Expression, die aber nicht weiter quantifiziert wurde.

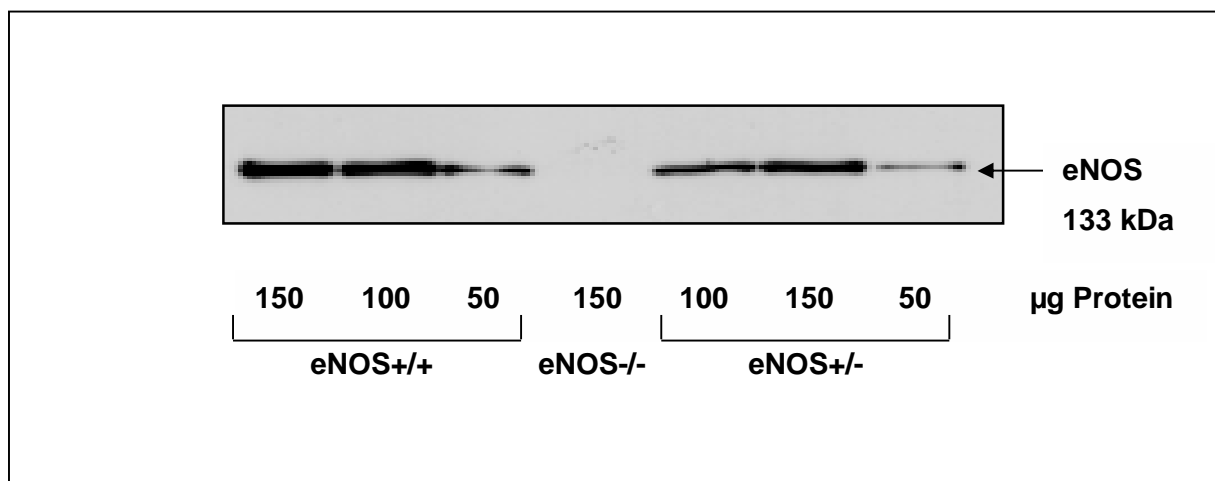


Abb. 4.18 Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in eNOS K.O.-Mäusen

Repräsentativer Western Blot zur Analyse der eNOS-Expression in Totallysaten aus Aortenhomogenaten von Wildtyp-Mäusen (**eNOS+/+**), homozygoten eNOS K.O.-Mäusen (**eNOS-/-**) und heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen (**eNOS+/-**). Es wurden jeweils 50, 100 und 150 µg des Totallysates aufgetragen.

Untersuchung der endothelabhängigen Vasorelaxation bei hetero- und homozygoten eNOS K.O.-Mäusen

Die funktionelle Untersuchung der NO-vermittelten endothelabhängigen Vasorelaxation erfolgte durch Messung der Vasorelaxation nach kumulativer Gabe von Acetylcholin und diente als Kontrolle der Funktionsfähigkeit der eNOS in den transgenen Mäusen. Wie in Abb. 4.19 dargestellt, zeigten heterozygote Aorten eine vollständige Vasorelaxation, die mit der vasorelaxierenden Potenz der Aortenringen von Wildtyp-Tieren vergleichbar war. Aortenringe von homozygoten eNOS K.O.-Mäusen wiesen dagegen eine deutlich eingeschränkte Vasorelaxation auf. Dieses Ergebnis bestätigte die Untersuchung der eNOS-Expression und machte deutlich, dass die Acetylcholin-abhängige Vasorelaxation ein Funktionsparameter für die Präsenz und Aktivität der eNOS darstellte. Nach Induktion des Diabetes blieben bei heterozygoten eNOS K.O.- und Wildtyp-Mäusen die vasorelaxierenden Eigenschaften des Endothels unverändert erhalten. Die geringfügige Reaktivität der Aortenringe homozygoter eNOS K.O.-Mäuse unter Kontrollbedingungen war im Diabetes nicht mehr vorhanden.

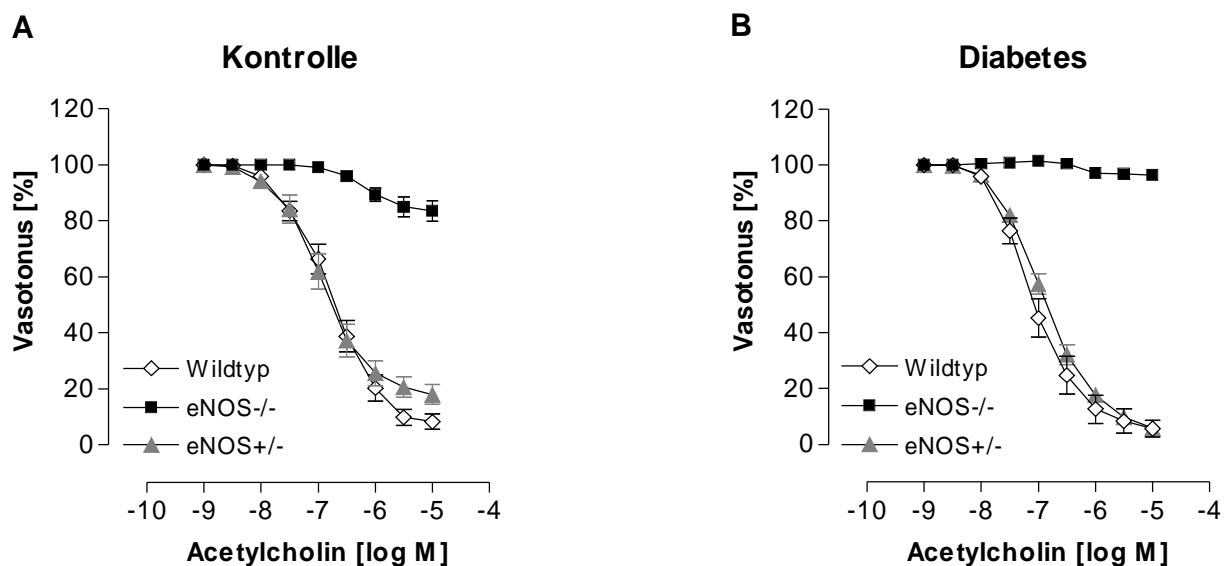


Abb. 4.19 Endothelabhängige Vasorelaxation von eNOS K.O.-Mäusen

Einfluss des Diabetes auf die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation von Wildtyp-Mäusen (\diamond , $n=17-30$), heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen (\blacktriangle , $n=9$) und homozygoten eNOS K.O.-Mäusen (\blacksquare , $n=9$). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) in der angegebenen Anzahl von Versuchen bei Kontrollen (A) und diabetischen Mäusen (B) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen.

Untersuchung der Vasokontraktion bei heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen

Die Untersuchung der Vasokontraktion wurde nach Applikation kumulativer Dosen Phenylephrin durchgeführt. Phenylephrin verursachte bei Aortenringen diabetischer heterozygoter eNOS K.O.-Mäuse eine verstärkte Maximalantwort. Außerdem war eine erhöhte Gefäßsensitivität zu beobachten. Diese ergab sich aus einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve im Vergleich zu der Kurve der entsprechenden normoglykämischen Kontrollen (Abb. 4.20). Der pD_2 -Wert war von $6,56 \pm 0,08$ in Kontrollaorten auf $7,18 \pm 0,12$ in Aorten von diabetischen Mäusen signifikant erhöht. Dieser Effekt war vergleichbar mit der durch Phenylephrin ausgelösten Hyperkontraktilität in diabetischen Wildtyp-Tieren (s. 4.2.2).

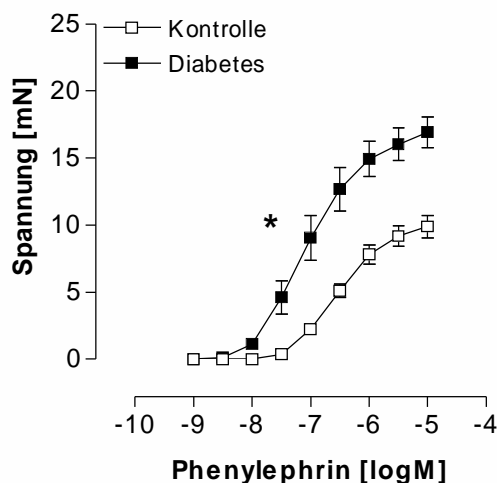


Abb. 4.20 Vasokontraktion von eNOS+/- -Mäusen
Wirkung von Phenylephrin auf die vaskuläre Reaktivität von heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen. Vasokontraktion isolierter thorakaler Aortenringe von Kontrollen (\square , $n=9$) und diabetischen Mäusen (\blacksquare , $n=8$) nach Applikation von Phenylephrin bei einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,0001$, Two-way-ANOVA.

	Kontrolle	Diabetes
Max. Vasokontraktion [mN]	$9,89 \pm 0,85$	$16,92 \pm 1,15^*$
pD_2 -Wert [- log M]	$6,56 \pm 0,08$	$7,18 \pm 0,14^*$

Tab. 4.08 Einfluss von Diabetes auf die Vasokontraktion bei eNOS+/- -Mäusen

Einfluss von Diabetes auf die maximale Vasokontraktion und den pD_2 -Wert nach Applikation von $10 \mu M$ Phenylephrin bei Kontrollen und diabetischen eNOS+/- - Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,05$, t-Test.

Die rezeptorunabhängige Vasokontraktion nach einer einmaligen Dosis von 80 mmol/l Kaliumchlorid war bei heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen im Diabetes signifikant verstärkt. Aorten aus heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen wiesen sowohl nach adrenerger Stimulation als auch nach Applikation von Kaliumchlorid eine Gefäßreaktivität auf, die der beobachteten Reaktivität bei Aorten aus Wildtyp-Mäusen (Abb. 4.07 und Abb. 4.14) entsprach. Das heißt, dass die partielle Disruption des eNOS-Gens keinen Einfluss auf die vasokontraktile Potenz von Aorten aus diabetischen eNOS K.O.-Mäusen hatte.

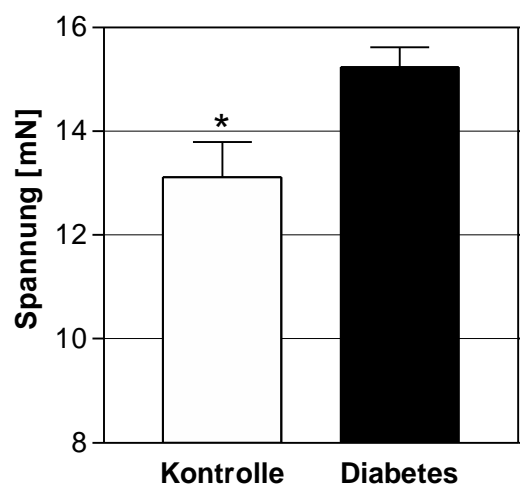


Abb. 4.21 Vasokontraktion durch Kaliumchlorid bei eNOS+/- -Mäusen

Vasokontraktile Effekt thorakaler Aortenringe von Kontrollen (□, n=9) und diabetischen eNOS+/- -Mäusen (■, n=8) nach Applikation einer einmaligen Dosis von 80 mmol/l Kaliumchlorid nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,02$, t-Test.

Untersuchung der Vasokontraktion bei homozygoten eNOS K.O.-Mäusen

Die Vasokontraktion nach Applikation von Phenylephrin war in homozygoten eNOS K.O.-Mäusen sowohl hinsichtlich der Maximalantwort als auch in Bezug auf die Sensitivität im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erhöht. Im Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen und den heterozygoten eNOS K.O.-Tieren konnte aber bei den homozygoten eNOS K.O.-Mäusen keine Verstärkung der Maximalantwort auf Phenylephrin im Diabetes beobachtet werden. Es wurde lediglich eine erhöhte Sensitivität nachgewiesen, denn der pD_2 -Wert war in Aorten von diabetischen Mäusen im Vergleich zu Aorten von homozygoten Kontrolltieren signifikant erhöht.

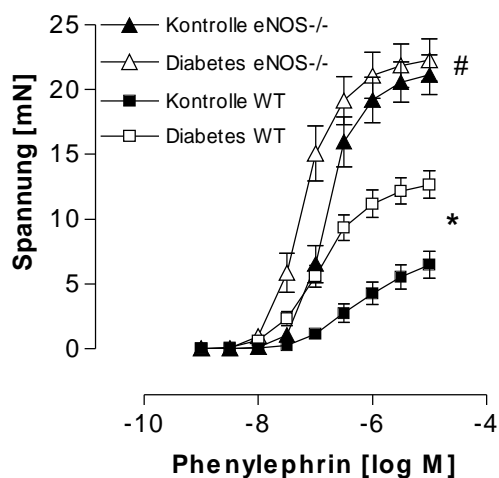


Abb. 4.22 Vasokontraktion von eNOS^{-/-}-Mäusen
Wirkung von Phenylephrin auf die vaskuläre Reaktivität von Wildtyp (WT)-Mäusen ($n=16-24$) und eNOS^{-/-}-Mäusen ($n=8-9$). Vasokontraktion isolierter thorakaler Aortenringe aus Kontrollen (weisse Symbole) und diabetischen Mäusen (schwarze Symbole) nach Applikation von Phenylephrin bei einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P<0,0001$, # $P=0,04$, Two-way-ANOVA.

	eNOS +/+		eNOS ^{-/-}	
	Kontrolle	Diabetes	Kontrolle	Diabetes
Max Vasokontrakt. [mN]	6,49 \pm 1,04	12,68 \pm 1,07*	21,16 \pm 1,51	22,29 \pm 1,62
pD_2 -Wert [- log M]	6,27 \pm 0,05	6,92 \pm 0,02*	6,78 \pm 0,06	7,22 \pm 0,08*

Tab. 4.09 Einfluss von Diabetes auf die Vasokontraktion bei eNOS^{-/-}-Mäusen

Einfluss von Diabetes auf die maximale Vasokontraktion und den pD_2 -Wert nach Applikation von 10 μ M Phenylephrin bei Wildtyp-Mäusen und eNOS^{-/-}-Mäusen. Darstellung der Mittelwerte (\pm SEM) bei Kontrollen und diabetischen eNOS^{-/-}-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen, * $P<0,05$, t-Test für Kontrolle vs. Diabetes.

Die rezeptorunabhängige Vasokontraktion nach einer einmaligen Dosis von 80 mmol/l Kaliumchlorid war bei homozygoten eNOS K.O.-Mäusen im Diabetes nicht signifikant verändert. Bei Wildtyp-Tieren dagegen war die Vasokontraktion durch Kaliumchlorid im Diabetes verstärkt (Abb. 4.14).

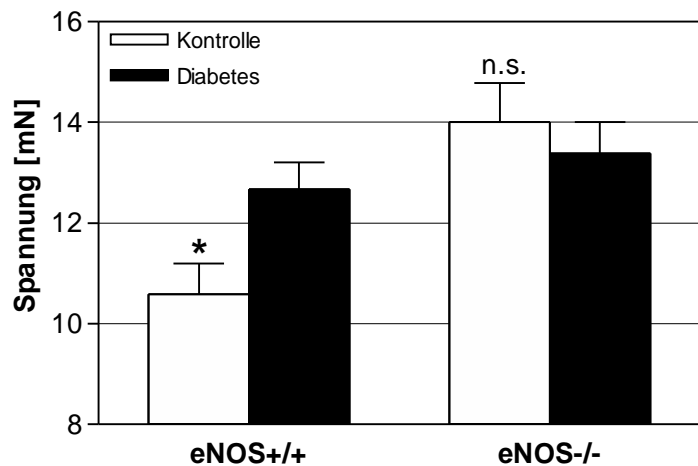


Abb. 4.23 Vasokontraktion durch Kaliumchlorid bei eNOS^{-/-} – Mäusen

Vasokontraktile Effekt thorakaler Aortenringe von Kontrollen ($n=10$) und diabetischen eNOS^{-/-} – Mäusen ($n=9$) nach Applikation einer einmaligen Dosis von 80 mmol/l KCl im Vergleich zu normoglykämischen Wildtyp-Kontrollen ($n=19$) und diabetischen Wildtyp-Kontrollen ($n=30$) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Darstellung der Mittelwerte (\pm SEM) in der angegebenen Anzahl von Versuchen bei diabetischen Mäusen (■) und Kontrollen (□), * $P < 0,02$, t -Test für Kontrolle vs. Diabetes.

Die Analyse der Gefäßreaktivität diabetischer Mäuse mit partieller oder vollständiger Deletion des eNOS-Gens zeigte, dass heterozygote eNOS K.O.-Mäuse eine den Wildtyp-Mäusen vergleichbare Gefäßreaktivität aufwiesen. Die Gefäßreaktivität homozygoter eNOS K.O.-Mäuse unterschied sich davon sowohl hinsichtlich der Vasorelaxation als auch der Vasokontraktion. Auffallend ist dabei, dass der Verlust der eNOS zu einer verstärkten Vasokontraktion führte, die unabhängig vom vasokontraktilem Stimulus im Diabetes nicht mehr potenziert wurde.

4.4.4.2 Untersuchung der Vasokontraktion nach enzymatischer Inhibition der endothelialen NO-Synthase durch L-NMMA

Es sollte überprüft werden, welche Auswirkungen eine kurzfristige reversible Hemmung der eNOS *in vitro* auf die Vasokontraktion hat. Dazu wurde die NO-Synthase in Aortenringen von Wildtyp-Tieren mit dem enzymatischen Inhibitor N- ω -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) blockiert. Vor Aufzeichnung der Konzentrations-Wirkungskurve mit Phenylephrin wurden die Aortenringe im Organbad mit 100 μ M L-NMMA inkubiert. Die Inkubation mit L-NMMA führte bei Aorten aus Kontrolltieren zu einer Verstärkung der Vasokontraktion. Zudem war der pD_2 -Wert als Ausdruck einer gesteigerten Gefäßsensitivität nach Inkubation mit L-NMMA signifikant erhöht (Abb. 4.24 A). Die Konzentrations-Wirkungskurve, die bei Kontrollaorten unter NOS-Inhibition erhoben wurde, war nahezu deckungsgleich mit dem Kurvenverlauf der Vasokontraktion bei Aorten von diabetischen Mäusen ohne NOS-Inhibition. Die maximale Vasokontraktion blieb unverändert. Sie betrug bei L-NMMA-inkubierten Kontrollaorten $11,55 \pm 1,14$ mN und bei Aorten von diabetischen Mäusen mit Vehikel-Inkubation $10,08 \pm 1,19$ mN.

Die NOS-Inhibition führte bei Aorten von diabetischen Mäusen ebenfalls zu einer signifikanten Verstärkung der Vasokontraktion (Abb. 4.24 B). Die Blockade der NO-Synthase hatte jedoch keinen Einfluss auf die pD_2 -Werte der Konzentrations-Wirkungskurve. Das heißt, zusätzlich zu der beim Diabetes auftretenden Hyperkontraktilität war nur eine geringfügige additive Verstärkung der Vasokontraktion durch Hemmung der NOS möglich. Dies wurde durch die AUC-Werte (*area under the curve*) verdeutlicht. Während bei Kontrollen die Fläche unter der Konzentrations-Wirkungskurve durch die Inkubation mit L-NMMA nahezu verdreifacht wurde, betrug die Flächenzunahme bei Aorten von diabetischen Mäusen nach L-NMMA-Inkubation nur ca. 50 %.

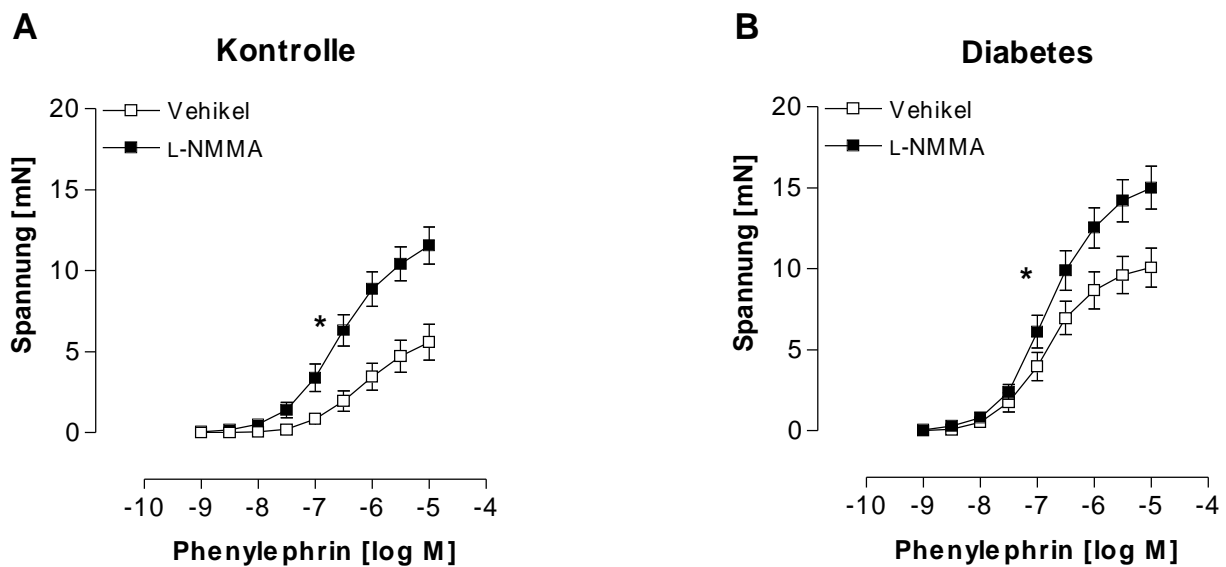


Abb. 4.24 Vasokontraktion durch Phenylephrin unter Hemmung der NO-Synthase (NOS)

Einfluss der NOS-Hemmung mit L-NMMA auf die Vasokontraktion durch Phenylephrin von Aorten aus Kontrollen ($n=12$) (A) und diabetischen C57/Bl6-Mäusen ($n=16-22$) (B) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Die Aortenringe wurden entweder mit $100 \mu\text{M}$ L-NMMA (■) oder mit Puffer-Vehikel (□) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM), * $P < 0,001$, Two-way-ANOVA.

	Kontrolle		Diabetes	
	Vehikel	L-NMMA	Vehikel	L-NMMA
Max Vasokontrakt. [mN]	$5,59 \pm 1,13$	$11,55 \pm 1,14^*$	$10,08 \pm 1,19$	$15,01 \pm 1,32^*$
pD_2 -Wert [- log M]	$6,13 \pm 0,04$	$6,55 \pm 0,02^*$	$6,83 \pm 0,02$	$6,80 \pm 0,02$
AUC	7,0 (100 %)	18,5 (264%)	18,3 (100%)	26,9 (147%)

Tab. 4.10 Einfluss der NOS-Hemmung auf die Vasokontraktion

Auswirkung der NOS-Hemmung durch L-NMMA auf die Vasokontraktion durch Phenylephrin bei Kontrollen und diabetischen C57/Bl6-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Darstellung der maximalen Vasokontraktion durch die applizierte Höchstdosis von $10 \mu\text{M}$ Phenylephrin, des pD_2 -Wertes und der AUC (area under the curve) als Mittelwerte (\pm SEM). Die prozentualen AUC-Angaben beziehen sich auf die normierten Werte (100 %) für die entsprechende Vehikel-Inkubation, * $P < 0,05$, t -Test für Vehikel- vs. L-NMMA-Inkubation.

4.4.5 Untersuchung der RhoA-vermittelten Vasokontraktion

Der RhoA/Rho-Kinase-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Agonist-induzierten Ca^{2+} -Sensitivierung und Hyperkontraktilität glatter Muskelzellen [85, 86]. Es sollte untersucht werden, ob STZ-Diabetes eine Veränderung der RhoA/Rho-Kinase-Signaltransduktion induziert, die letztlich zu einer Phenylephrin-induzierten Hyperkontraktilität von Aorten diabetischer Mäuse führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Einfluss des STZ-Diabetes auf die Translokation von RhoA ermittelt.

Darstellung der Zytosol/Membran-Verteilung von RhoA

Das GDP-besetzte, inaktive RhoA ist im Zytosol lokalisiert, während die GTP-besetzte, aktive Form in der Zellmembran vorkommt. Um zu prüfen, wie sich die Zytosol/Membran-Verteilung von RhoA unter basalen Bedingungen darstellt, wurde als Kontrollexperiment die Expression von RhoA in aufgearbeiteten zytosolischen bzw. Membranfraktionen aus EA-Zellen untersucht.

In Abb. 4.25 ist erkennbar, dass in unstimulierten EA-Zellen der Hauptanteil von RhoA als GDP-besetzte, inaktive Form im Zytosol lokalisiert war. Dagegen wurde in der Membranfraktion eine quantitativ deutlich geringere Menge an RhoA detektiert.

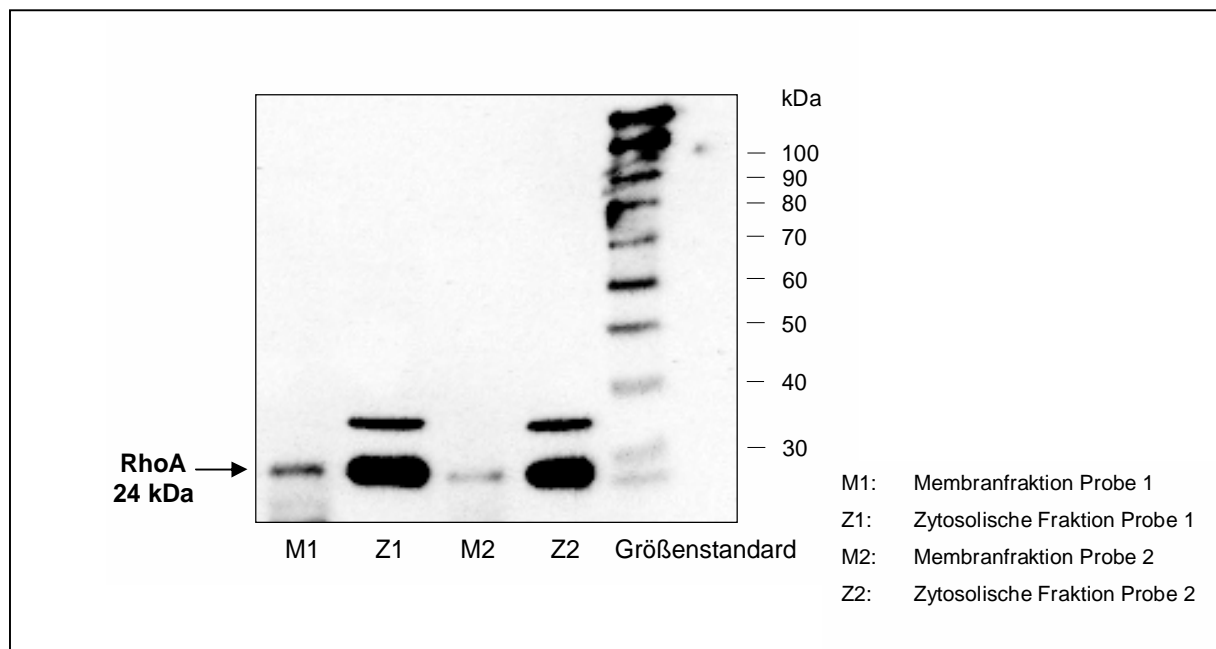


Abb. 4.25 Zytosol/Membran-Verteilung von RhoA

Repräsentativer Western Blot zur Analyse der Expression von RhoA in der zytosolischen Fraktionen (Z) und in der Membranfraktion (M) aus EA-Zellen.

Einfluss von Diabetes auf die Expression von RhoA in der Aorta

Die Expression von RhoA im Zytosol sollte in Aorten von diabetischen Mäusen im Vergleich zu Kontrollgeweben untersucht werden, um zu prüfen, ob die diabetische Stoffwechsellage die GDP-besetzte, inaktive RhoA-Form verändert. Die zytosolische RhoA-Expression war in Aorten STZ-diabetischer Mäuse im Vergleich zu Aorten von Kontrolltieren signifikant verringert (Abb. 4.26). In Aortengeweben von diabetischen Mäusen lag signifikant weniger RhoA in der GDP-besetzten, inaktiven Form als in vergleichbaren Kontrollen vor.

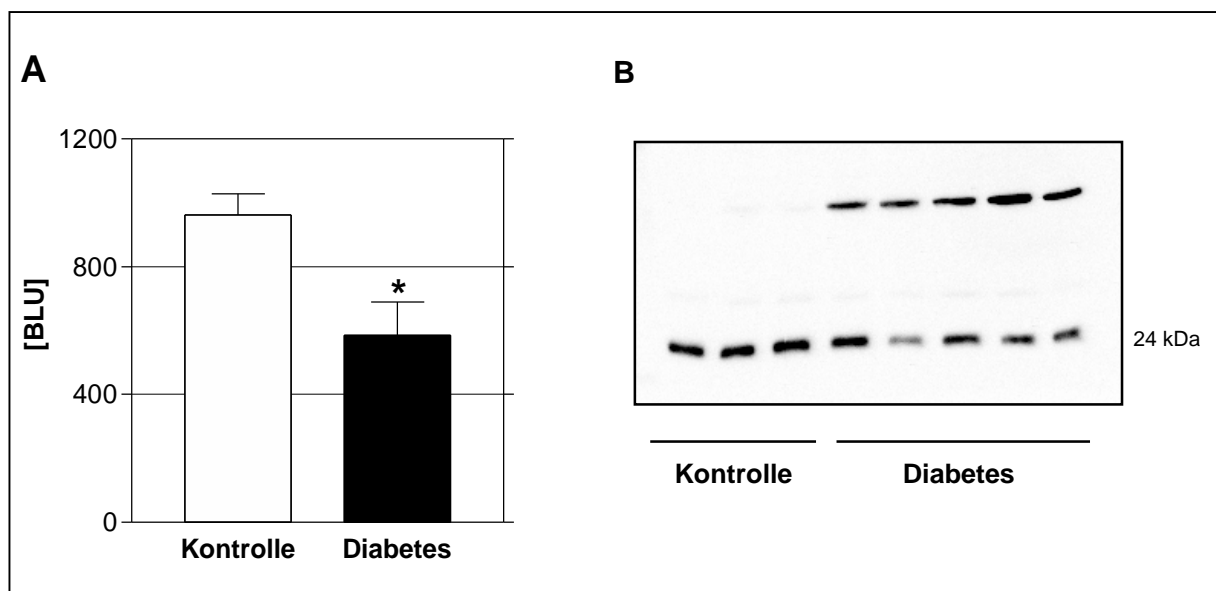


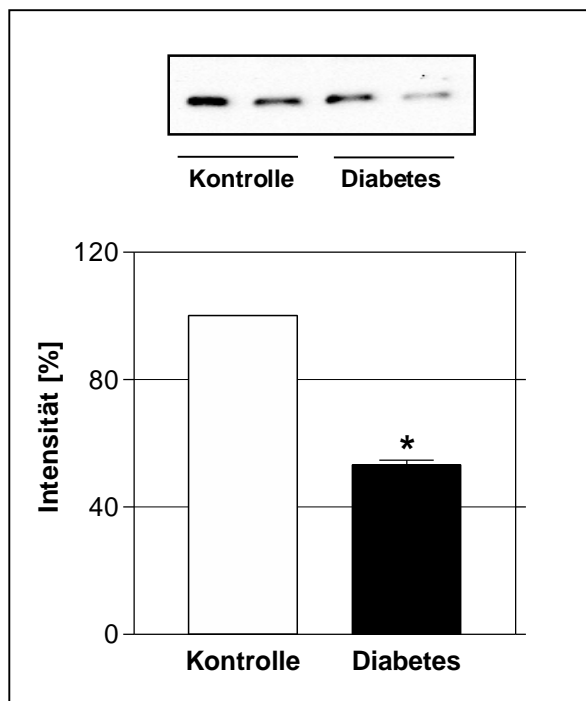
Abb. 4.26 Expression von RhoA in Aortengeweben

Expression von RhoA in der zytosolischen Fraktion von Aortenlysaten aus Kontrollen (□) und diabetischen Mäusen (■) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. **A.** Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwert (\pm SEM) von $n=3-5$ einzelnen Experimenten. Die Kontrollwerte wurden auf 100 % normiert. **B.** Repräsentativer Western Blot.

Einfluss von Diabetes auf die Expression von RhoA in der Aorta

Durch Western Blot-Analysen der zytosolischen Fraktion und der Membranfraktion von Herzgeweben von STZ-diabetischen Mäusen und entsprechenden Kontrollen sollte festgestellt werden, ob die Kompartimentverteilung und damit der Aktivitätsstatus von RhoA im Diabetes verändert ist. Die zytosolische RhoA-Expression war sowohl in Aorten als auch in Herzen diabetischer Mäuse im Vergleich zu Kontrollen signifikant verringert. Entsprechend konnte eine Zunahme der RhoA-Expression in der Herz-Membranfraktion diabetischer Tiere festgestellt werden. Die RhoA-Expression im Zytosol war im Diabetes auf 53 ± 2 % erniedrigt, während die RhoA-Expression in der Membranfraktion auf 230 ± 27 % erhöht war.

A Zytosol-Fraktion



B Membran-Fraktion

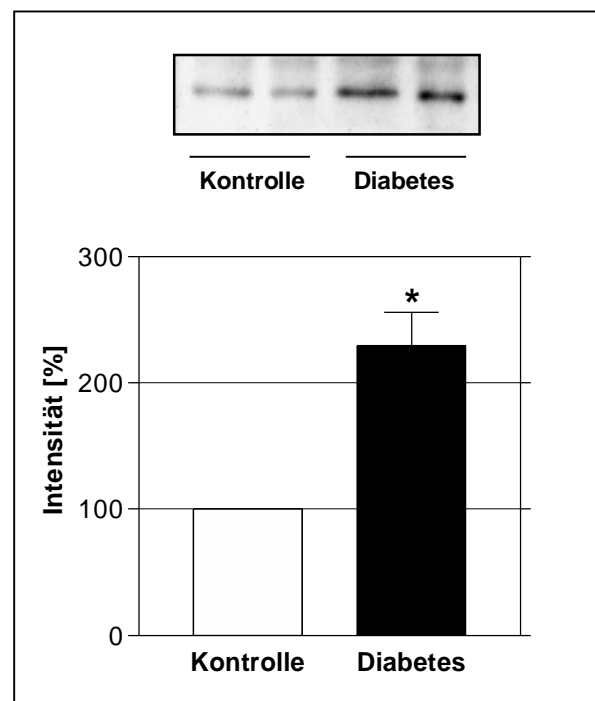


Abb. 4.27 Kompartimentverteilung von RhoA

Verteilung von RhoA in fraktionierten Herzhomogenaten aus Kontrollen (□) und diabetischen Mäusen (■) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Densitometrische Auswertung der Western Blots von zytosolischer Fraktion (A) und Membranfraktion (B) als Mittelwerte (\pm SEM) der absoluten Werte von $n=3-5$ Experimenten. Die Kontrollwerte wurden auf 100 % normiert, * $P < 0,05$, t -Test.

4.5 Zusammenfassung der funktionellen Daten zur Vasoreaktivität bei STZ-diabetischen Mäusen

In Tab. 4.11 sind die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen zur Vasoreaktivität im Diabetes zusammengefasst. Da sich der Gefäßtonus aus einer Balance zwischen Vasorelaxation und Vasokontraktion ergibt, wurden beide Parameter untersucht. Als wesentliches Resultat aus der Untersuchung der Relaxationsfähigkeit ergab sich, dass bei beiden untersuchten Wildtyp-Mausstämmen (C57/Bl6 und BalbC) im Diabetes keine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer verminderten NO-vermittelten endothelabhängigen Vasorelaxation unter den gewählten Versuchsbedingungen nachweisbar war. Die Vasokontraktion war im Diabetes bei Wildtyp-Tieren rezeptorabhängig und -unabhängig verstärkt.

Der Einfluss des NO/cGMP-Signalweges auf die Vasokontraktion wurde mit eNOS K.O.-Mäusen untersucht. Diabetische heterozygote eNOS K.O.-Mäuse zeigten eine den Wildtyp-Mäusen vergleichbare Vasoreaktivität. Homozygote eNOS K.O.-Mäuse wiesen im Diabetes dagegen keine erhöhte Vasoreaktivität nach Applikation von Phenylephrin und Kaliumchlorid auf.

	Wildtyp	eNOS +/-	eNOS -/-
Vasorelaxation			
Acetylcholin	—	—	—
Calciumionophor A23187	—		
SNAP	—		
Papaverin	—		
Vasokontraktion			
Phenylephrin	↑	↑	—
Serotonin	↑		
Prostaglandin F _{2a}	↑		
Kaliumchlorid	↑	↑	—
Phenylephrin + PKC-Inhibitor	—		
Phenylephrin + NOS-Inhibitor	(↑)		

Tab. 4.11 Zusammenfassung der funktionellen Daten zur Vasoreaktivität im Diabetes

Die Symbole stellen die Vasoreaktivität im Diabetes bezogen auf die entsprechenden Kontrollen dar [(—), keine Veränderungen im Diabetes; (↑), verstärkte Vasoreaktivität im Diabetes im Vergleich zur Kontrolle].

4.6 Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die endotheliale Vasorelaxation

Vorausgehende Untersuchungen von *Ballhausen et al.* hatten dargelegt, dass im Diabetes vermehrt oxidativer Stress in Form reaktiver Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS) entsteht, der für die Regulation der Koronardurchblutung entscheidend ist [87]. So wurde die im Diabetes eingeschränkte endothelabhängige Regulation der Koronardurchblutung durch Zusatz von Superoxiddismutase (SOD) weitgehend normalisiert. Diese Untersuchungen ließen vermuten, dass biologisch aktives NO durch gleichzeitig entstehende reaktive Sauerstoffverbindungen inaktiviert wird. Das Enzym SOD hat antiradikalische Eigenschaften, da es durch die Generierung von Wasserstoffperoxid reaktive Sauerstoffverbindungen in Form von Superoxidradikalen inhibiert. Eine Inaktivierung dieser Superoxidradikale durch die SOD erhöht somit die biologische Verfügbarkeit von NO. Umgekehrt würde eine Hemmung der SOD die Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen blockieren und zur Instabilität von NO beitragen, da eine rasche Umsetzung von NO mit Superoxidradikalen erfolgt.

4.6.1 Funktionelle Studien unter Hemmung der Superoxiddismutase

Vor der Testung des Relaxationsvermögens wurde die SOD mit 3 mmol/l Diethyldithiocarbamat (DETC) gehemmt, um zu untersuchen, ob in den verwendeten Tiermodellen die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen relevant ist. Durch die Hemmung der gefäßprotektiven, antiradikalisch wirksamen SOD wurde indirekt ein Nachweis für das Auftreten von oxidativem Stress in Form reaktiver Sauerstoffverbindungen möglich. Der Einfluss reaktiver Sauerstoffverbindungen auf die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation wurde in funktionellen Untersuchungen nach Hemmung der SOD getestet. Für diese funktionellen Studien und die folgenden Western Blot-Analysen wurden STZ-Ratten und entsprechende Kontrollen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen verwendet.

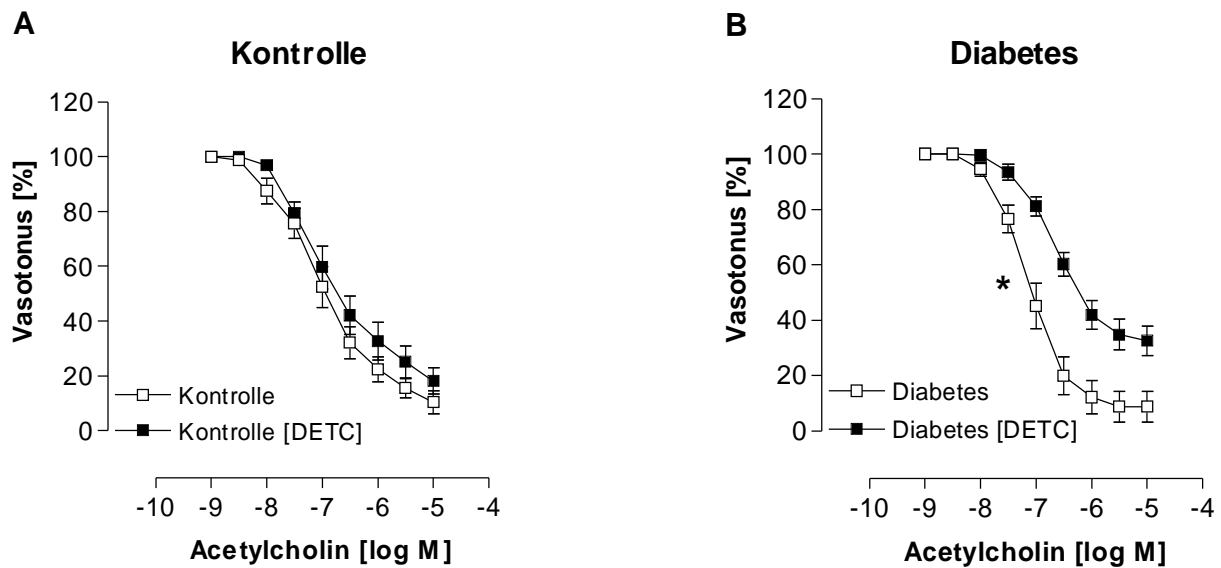


Abb. 4.28 Endothelabhängige Vasorelaxation nach Hemmung der SOD

Wirkung der SOD-Hemmung mit DETC auf die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation von Aorten aus Kontrollen ($n=6$) (A) und diabetischen Wistar-Ratten ($n=7$) (B) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Die Aortenringe wurden entweder mit $100 \mu\text{M}$ DETC (■) oder mit Puffer-Vehikel (□) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) * $P=0,002$, Two-way-ANOVA.

	Kontrolle		Diabetes	
	Vehikel	DETC	Vehikel	DETC
Max. Vasorelaxation [%]	$10,37 \pm 4,30$	$18,14 \pm 4,72$	$8,70 \pm 5,60$	$32,66 \pm 5,33^*$
pD_2 -Wert [- log M]	$7,08 \pm 0,11$	$7,00 \pm 0,12$	$7,15 \pm 0,07$	$6,64 \pm 0,08^*$

Tab. 4.12 Einfluss der SOD-Hemmung auf die endothelabhängige Vasorelaxation

Auswirkung der SOD-Hemmung durch DETC auf die NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation bei Kontrollen und diabetischen Wistar-Ratten nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Darstellung der maximalen Vasorelaxation und des pD_2 -Wertes nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ Acetylcholin als Mittelwerte (\pm SEM), * $P<0,05$, t -Test für Vehikel- vs. DETC-Inkubation.

Die Auswertung der funktionellen Untersuchungen zur NO-vermittelten endothelabhängigen Vasorelaxation ergab keinen Unterschied der vasorelaxierenden Eigenschaften von Aorten diabetischer Ratten im Vergleich zu Kontrollaorten. Eine endotheliale Dysfunktion war somit unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar. Die Hemmung der SOD durch Zugabe von DETC hatte keinen Einfluss auf die endotheliale Vasorelaxation in Aorten gesunder Kontrollratten (Abb. 4.28 A). Dagegen führte die SOD-Hemmung im Diabetes zu einer deutlichen Einschränkung der NO-vermittelten endothelabhängigen Vasorelaxation (Abb. 4.28 B). Sowohl die Maximalantwort nach Applikation der Höchstdosis Acetylcholin (10 μ M) als auch die Sensitivität, erkennbar an einer signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve, waren unter Hemmung der SOD bei den STZ-Ratten signifikant vermindert. Die DETC-induzierte Hemmung führte bei Aorten aus diabetischen Ratten zu einer um 26,2 % verminderten Vasorelaxation (Tab. 4.13). Damit war die Inhibition der Endothelfunktion im Vergleich zu den Kontrollen im Diabetes um ca. 20 % stärker ausgeprägt.

Daraus lässt sich folgern, dass die Hemmung der SOD als Folge der Inaktivierung von NO durch reaktive Sauerstoffverbindungen zu einer eingeschränkten Relaxationsfähigkeit führte, die im Diabetes stärker als bei gesunden Tieren ausgeprägt war. Die Hemmung der SOD demaskierte somit eine im STZ-Diabetes eingeschränkte Endothelfunktion. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurde der Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf die NO/cGMP-Signalkaskade auf Proteinebene mittels Immunblotting ermittelt.

	Kontrolle	Diabetes
Hemmung durch DETC [%]	8,6 \pm 5,2	26,2 \pm 5,8 *

Tab. 4.13 Hemmwirkung von DETC

Prozentuale Darstellung der Hemmwirkung durch DETC. Die vollständige Relaxation nach Acetylcholin-Applikation ohne DETC wurde auf 100 % normiert. Dargestellt ist die Differenz in % (Mittelwert \pm SEM) zwischen vollständiger Relaxation nach Acetylcholin-Applikation und der Relaxation nach Inkubation mit DETC.

4.7 Einfluss von Diabetes auf die NO-Signaltransduktion

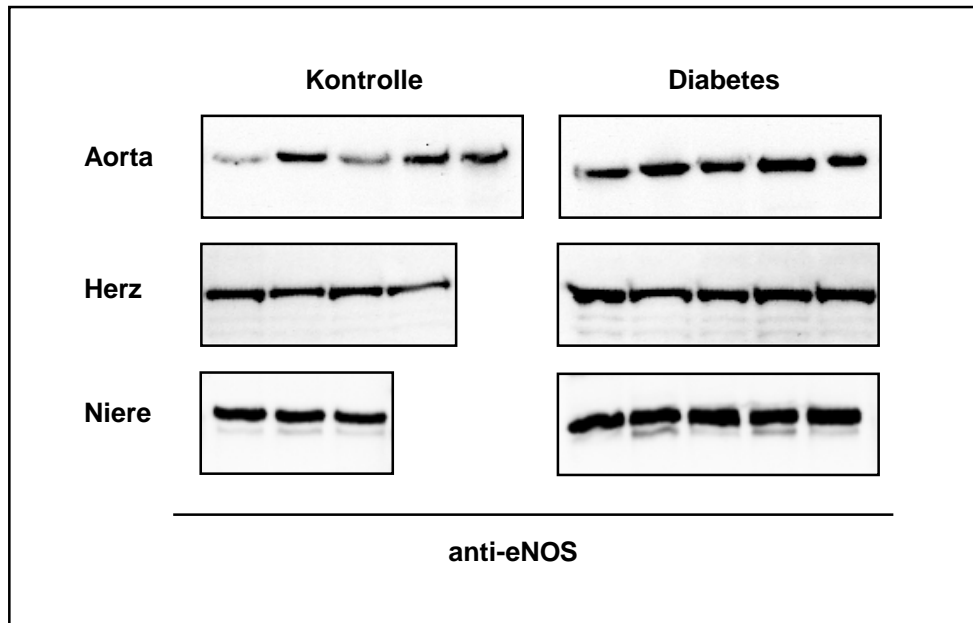
Die endothelabhängige Vasorelaxation glatter Gefäßmuskelzellen wird durch das NO-Radikal über die NO/cGMP-Signaltransduktion ausgelöst. Diese vasorelaxierende Wirkung beruht auf der cGMP-vermittelten Abnahme der intrazellulären Calciumionenkonzentration, verbunden mit einer Erniedrigung des Gefäßtonus. Um die in Kapitel 4.6 beschriebene Modulation der Endothelfunktion im Diabetes genauer zu charakterisieren, wurden die an der NO/cGMP-Signalkaskade beteiligten Signalproteine mittels Western Blot-Analysen untersucht. Neben makrovaskulären Gefäßen (Aorta) wurden auch Organe des mikrovaskulären Systems (Herz, Niere) analysiert. Um zu untersuchen, ob die Veränderungen in der Expression der an der NO/cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteine Ergebnis einer längerfristigen Adaption an den diabetischen Status waren, wurden zusätzliche Immundetektionen von Aortengeweben STZ-diabetischer Ratten nach einer Diabetesdauer von drei Wochen durchgeführt.

4.7.1 Untersuchung der Expression der endothelialen NO-Synthase

In vaskulären Endothelzellen erfolgt eine permanente NO-Produktion durch die membranassoziierte konstitutiv exprimierte, endotheliale NO-Synthase (eNOS). Dieses Enzym katalysiert im Endothel die endogene NO-Synthese durch Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin. NO diffundiert dann aus dem Endothel in glatte Muskelzellen und aktiviert dort die lösliche Guanylatzyklase (sGC).

Die eNOS-Expression war sowohl in makrovaskulären Gefäßen (Aorta) als auch in mikrovaskulären Organen (Herz, Niere) im Diabetes nach einer Krankheitsdauer von 16 Wochen signifikant erhöht (Abb. 4.29). In Aorten und Herzen war die Expression im Diabetes auf nahezu das Doppelte gesteigert. In Nierengeweben war eine Expressionserhöhung von 106 ± 9 in Kontrollen auf 173 ± 10 im Diabetes nachweisbar, was einer Expressionssteigerung um ca. 70% entspricht.

A



B

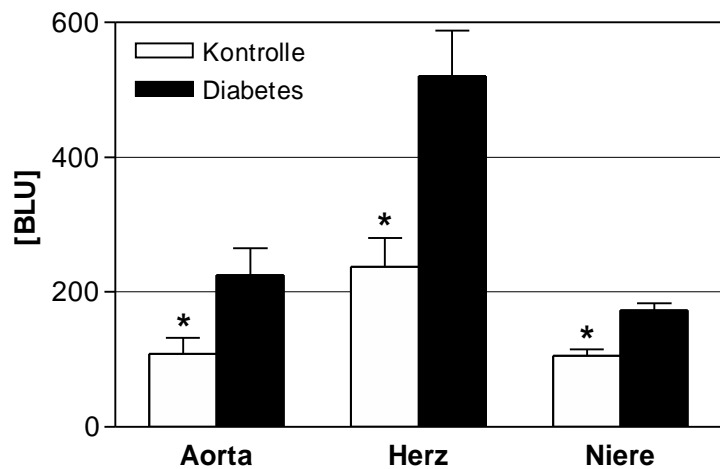


Abb. 4.29 Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS)

*Einfluss von Diabetes auf die Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase in Aorta, Herz und Niere von Kontrollen (□) und diabetischen Wistar-Ratten (■) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. A. Repräsentative Western Blots. B. Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) der absoluten Werte von $n=3-5$ Experimenten, * $P<0,05$, t-Test für Kontrolle vs. Diabetes.*

Auswirkung der Diabetesdauer auf die eNOS-Expression in Aortengewebe

Exemplarisch wurde in makrovaskulären Gefäßen (Aorta) die eNOS-Expression nach einer kurzen Diabetesdauer von 3 Wochen untersucht, um zu prüfen, ob die beobachtete Expressionssteigerung der eNOS nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen das Ergebnis einer Adaption an eine relativ langfristige Krankheitsdauer war.

Nach 3 Wochen Diabetesdauer war die eNOS-Expression in Aortengeweben aus diabetischen Mäusen tendenziell, aber nicht signifikant im Vergleich zu Kontrollaorten erhöht. Erst nach einem längeren Krankheitsverlauf von 16 Wochen war eine signifikante Expressionssteigerung im Diabetes nachweisbar. Das bedeutet, dass die Expressionszunahme der eNOS als regulativer Prozess einer längerfristigen Adaption an die diabetische Stoffwechsellage erfolgte.

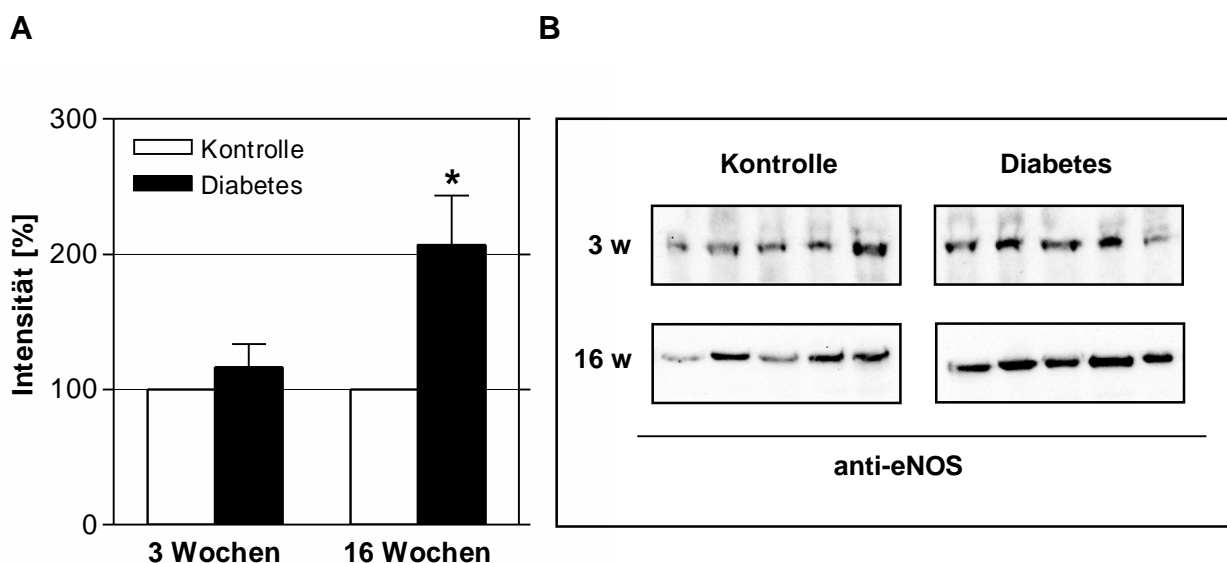


Abb. 4.30 eNOS-Expression in Aortengeweben nach 3 und 16 Wochen Diabetesdauer

Auswirkung der Diabetesdauer von 3 Wochen (3 w) und 16 Wochen (16 w) auf die eNOS-Expression in Aortengeweben von Kontrollen (□) und diabetischen Wistar-Ratten (■). **A.** Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) von $n=5$ Experimenten. Die Werte für die Kontrollen wurden auf 100 % normiert. * $P<0,05$, t -Test Kontrolle vs. Diabetes. **B.** Repräsentative Western Blots für Aortengewebe nach 3 Wochen und 16 Wochen Diabetesdauer.

4.7.2 Untersuchung der Expression der löslichen Guanylatzyklase

Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) katalysiert die Umsetzung von Guanosintriphosphat zu zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP). cGMP ist ein sekundärer Botenstoff und reguliert die Phosphorylierung verschiedener Proteinkinasen. Die lösliche Guanylatzyklase ist ein heterodimeres Protein, dass aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut ist [88]. Obwohl beide Untereinheiten ein katalytisches Zentrum tragen, ist die Koexpression beider Monomere für die vollständige katalytische Aktivität der sGC unerlässlich. Daher wurde die Expression beider Untereinheiten untersucht.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der beiden sGC-Untereinheiten in Aorta, Herz und Niere zwischen Rattengewebe von diabetischen und unbehandelten Ratten festgestellt werden.

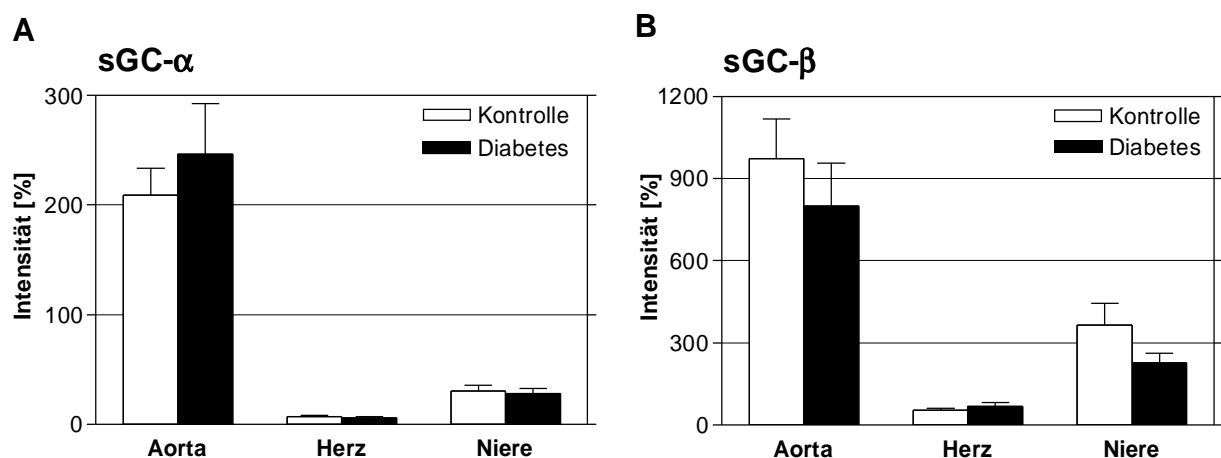


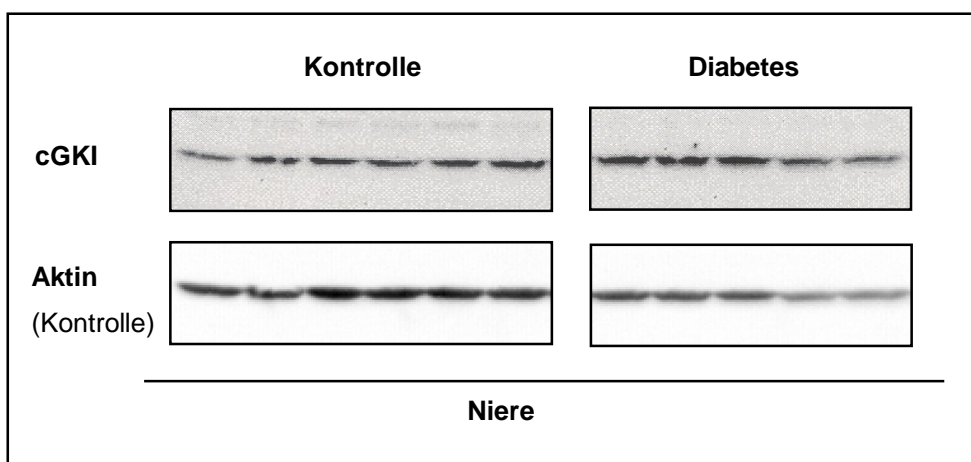
Abb. 4.31 Expression der löslichen Guanylatzyklase (sGC)

Einfluss von Diabetes auf die Proteinexpression der α - und β -Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase in Aorta, Herz und Niere von Kontrollen (\square) und diabetischen Wistar-Ratten (\blacksquare) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) bezogen auf Aktin von $n=4-6$ Experimenten.

4.7.3 Untersuchung der Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinase

Die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) katalysiert die NO/cGMP-vermittelte Vasorelaxation durch Phosphorylierungsreaktionen, die die Aktivität der leichten Myosin-Ketten und die Calcium-Sensitivität des kontraktiven Apparates modulieren. Die Ergebnisse in Abb. 4.32 zeigten, dass die cGKI-Expression in Herzen und Aorten durch die diabetische Stoffwechsellage nicht beeinflusst wurde, während in Nieren eine Expressionserhöhung von 224 ± 41 % in Kontrollen auf 393 ± 48 % im Diabetes beobachtet werden konnte. Dies entsprach einer Expressionssteigerung von 57 %.

A



B

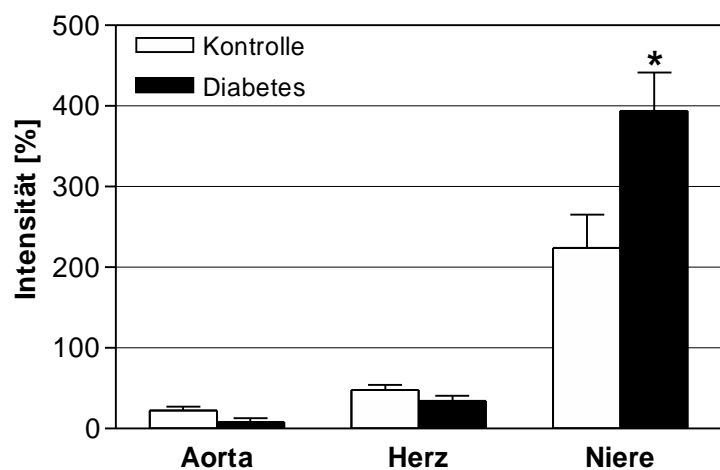


Abb. 4.32 Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI)

*Einfluss von Diabetes auf die Proteinexpression der cGMP-abhängigen Proteinkinase I in Aorta, Herz und Niere von Kontrollen (□) und diabetischen Wistar-Ratten (■) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. A. Repräsentative Western Blots. B. Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) bezogen auf Aktin von $n=3-5$ Experimenten, * $P<0,02$, t-Test.*

4.7.4 Untersuchung der Expression des *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) und des phosphorylierten VASP

Das *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) ist eines der Effektorproteine der NO/cGMP-Signalkaskade. Das Phosphoprotein ist an der Regulation des Vasotonus beteiligt, indem es die Mikrofilamente moduliert und die Aktin-Polymerisation reguliert. Die Aktivierung erfolgt durch die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) über eine Phosphorylierung am Serin 239. P-VASP wird als biochemischer Marker für die Überprüfung des NO-stimulierten sGC/cGKI-Signalweges und der Integrität des Endothels verwendet [44]. Eine durch die diabetische Stoffwechsellage induzierte Störung der NO/cGMP-Signalkaskade bzw. der Endothelfunktion hätte Veränderungen der Aktivierung von VASP zur Folge.

Die Ergebnisse der Immundetektion nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen zeigten im Gewebe aus diabetischen Ratten eine deutliche Steigerung der VASP-Expression. Die Expressionszunahme des VASP betrug in der Aorta ca. 240 % (Kontrolle: 69 ± 23 % vs. Diabetes: 236 ± 55 %, $P < 0,05$, t-Test). In Herzen und Nieren war die Expression sogar auf das 9fache gesteigert (Abb. 4.33). Es wurde zusätzlich die Expression des p-VASP nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen ermittelt, um zu untersuchen, ob die Expressionszunahme des VASP auch zu einer gesteigerten Aktivierung des Proteins führte. Der für die Immundetektion verwendete Antikörper ist spezifisch für das am Serin 239 phosphorylierte VASP und differenziert somit bei zwischen VASP und p-VASP [89]. Aus Abb. 4.34 geht hervor, dass die diabetische Stoffwechsellage auch eine signifikante Steigerung der Expression von p-VASP in den untersuchten Geweben induziert. Das bedeutet, dass in Geweben aus diabetischen Ratten die Expression der Effektorproteine der NO/cGMP-Signalkaskade gesteigert war.

Das Ausmaß der Expressionssteigerung im Diabetes war bei VASP und p-VASP für die untersuchten Gewebe nicht signifikant verschieden (Abb. 4.35). Das heißt, dass das Verhältnis der Expressionen von VASP zu p-VASP in Geweben von diabetischen Ratten dem Verhältnis der Expressionen in Geweben von Kontrollratten entsprach. Die Zunahme der Aktivierung durch Phosphorylierung korrelierte dabei mit der Expressionszunahme. Eine zusätzlich verstärkte Aktivierung im Diabetes konnte somit ausgeschlossen werden.

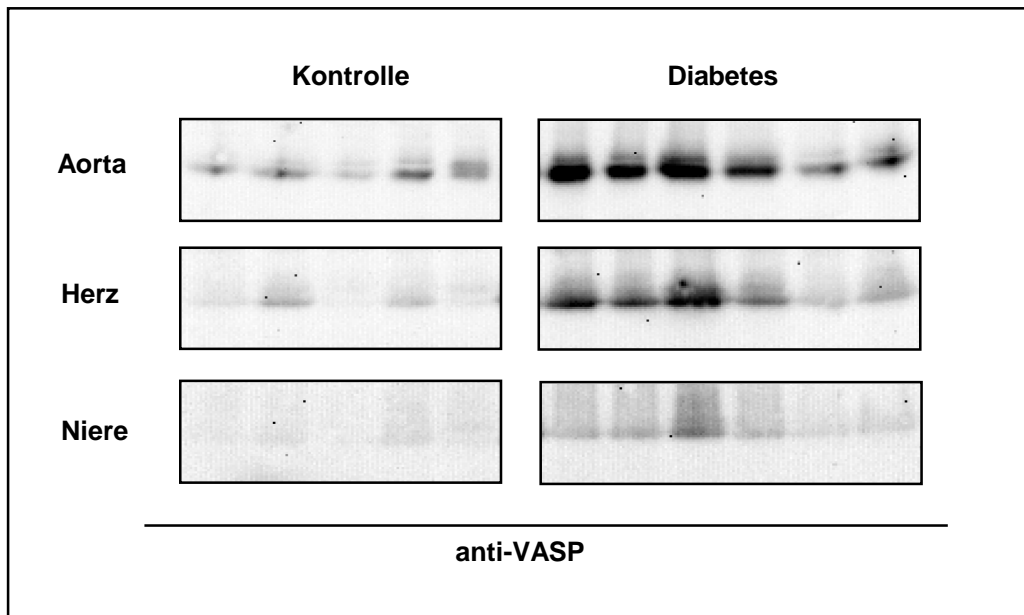
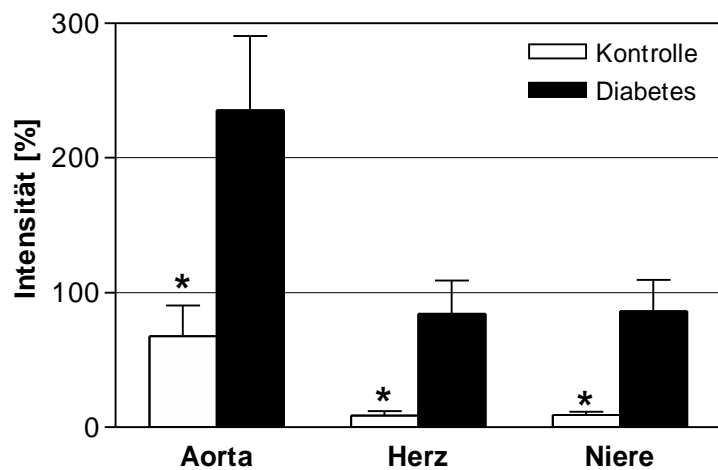
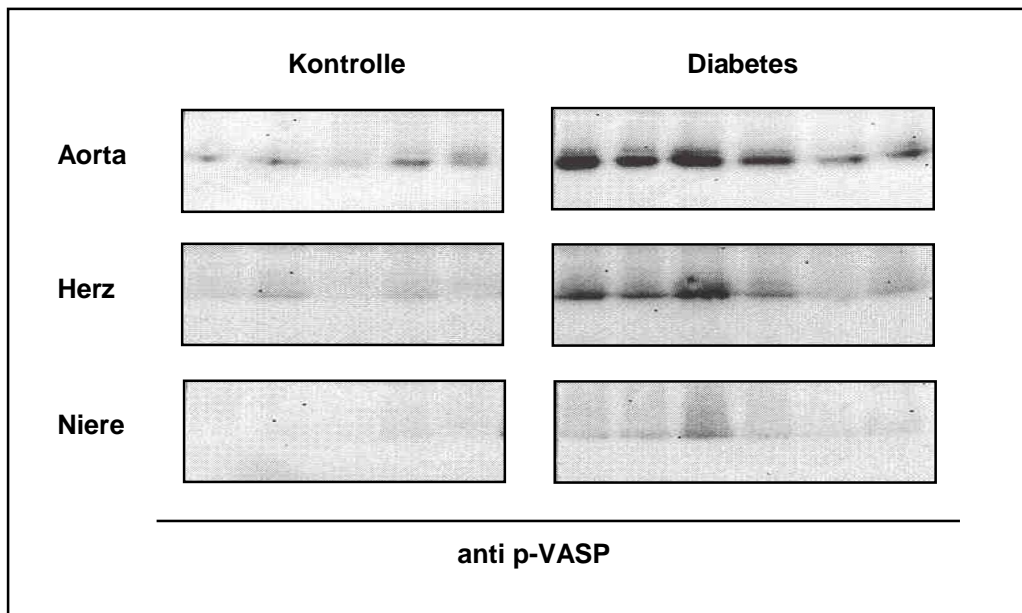
A**B**

Abb. 4.33 Expression des vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP)

Einfluss von Diabetes auf die Proteinexpression des vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) in Aorta, Herz und Niere von Kontrollen (□) und diabetischen Wistar-Ratten (■) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. **A.** Repräsentative Western Blots. **B.** Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) bezogen auf Aktin von $n=3-5$ Experimenten, * $P<0,05$, t-Test für Kontrolle vs. Diabetes.

A



B

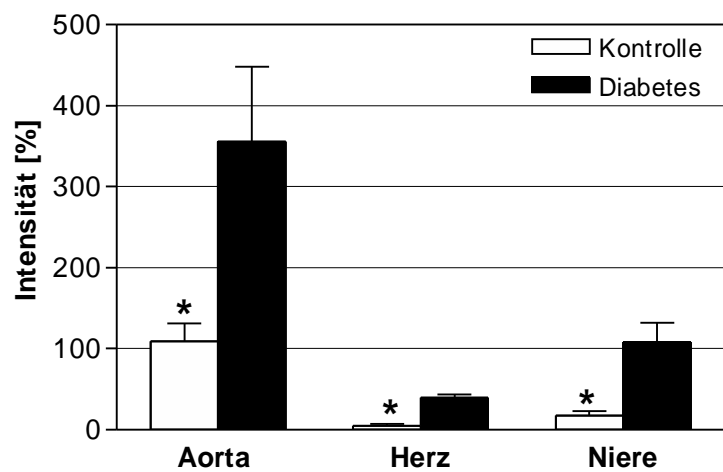


Abb. 4.34 Expression des phosphorylierten VASP

Einfluss von Diabetes auf die Proteinexpression des phosphorylierten VASP (p-VASP) in Aorta, Herz und Niere von Kontrollen (□) und diabetischen Wistar-Ratten (■) nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. **A.** Repräsentative Western Blots. **B.** Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) bezogen auf Aktin von $n=3-5$ Experimenten, * $P<0,05$, t-Test für Kontrolle vs. Diabetes.

Untersuchung des Phosphorylierungsgrades von VASP

Die Expression von VASP und p-VASP war - wie aus den Abb. 4.33 und Abb. 4.34 hervorgeht - in Aorta, Herz und Niere von diabetischen Ratten deutlich gesteigert. Aus der Darstellung des Verhältnisses VASP / p-VASP lässt sich der Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage auf den Phosphorylierungsgrad des VASP bestimmen.

Die Expressionen von VASP und p-VASP waren im Diabetes gleichermaßen gesteigert. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Relation von VASP zu p-VASP in diabetischen Ratten im Vergleich zu entsprechende Kontrollen (s. Erläuterungen zu 4.7.4).

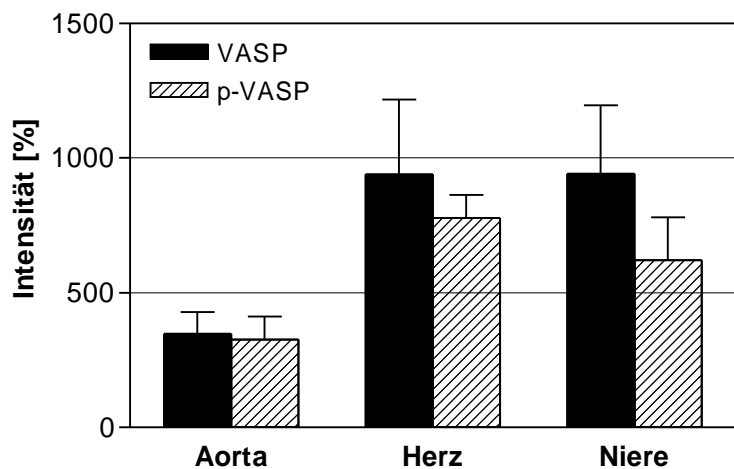


Abb. 4.35 Phosphorylierungsgrad von VASP

Expressionssteigerung von VASP und p-VASP in Aorta, Herz und Niere von diabetischen Wistar-Ratten nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Die Daten für 5-6 Experimente wurden auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

Auswirkung der Diabetesdauer auf die VASP / p-VASP-Expression

Exemplarisch wurde in makrovaskulärem Gewebe (Aorta) die Expression nach einer kurzen Diabetesdauer von 3 Wochen untersucht, um zu prüfen, ob die Diabetesdauer einen Einfluss auf die VASP bzw. p-VASP-Expression hat.

Die Zunahme der VASP- und p-VASP-Expression war unabhängig von der Diabetesdauer. Schon nach einer kurzfristigen Krankheitsdauer war die Expression gesteigert. Eine weitere Steigerung der Expression fand nach 16 Wochen nicht mehr statt. Das heißt, die Expression der Effektorproteine wurde schon im frühen Diabetesstadium moduliert.

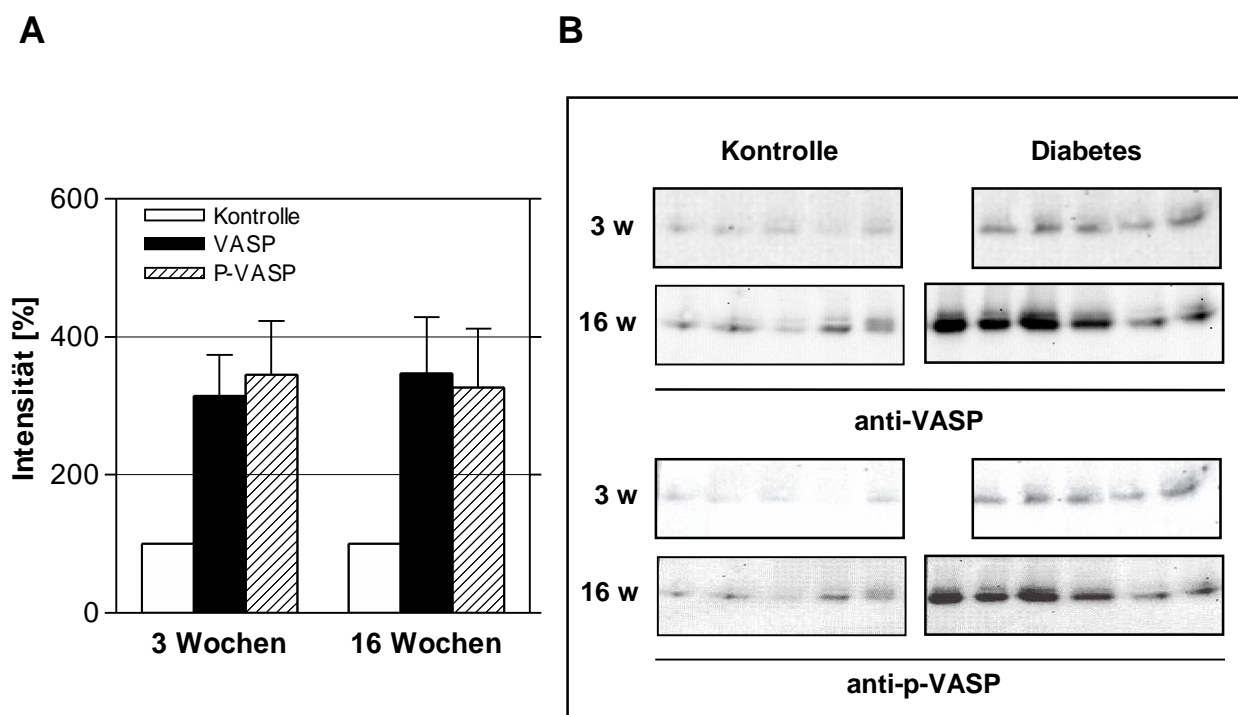


Abb. 4.36 VASP und p-VASP-Expression nach 3 und 16 Wochen Diabetesdauer

Auswirkung einer Diabetesdauer von 3 Wochen (3 w) und 16 Wochen (16 w) auf die VASP / p-VASP-Expression in Aortengewebe von Kontrollen und diabetischen Wistar-Ratten. **A.** Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) bezogen auf Aktin von $n=5-6$ Experimenten nach 3 Wochen und 16 Wochen Diabetesdauer. Die Werte für die Kontrollen wurden auf 100 % normiert. **B.** Repräsentative Western Blots.

4.7.5 Zusammenfassung der Expressionsanalysen

In Tab. 4.14 sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen der an der NO/cGMP-Signalkaskade beteiligten Proteine zusammenfassend dargestellt.

	Aorta		Herz	Niere
	3 Wochen	16 Wochen	16 Wochen	16 Wochen
eNOS	—	↑	↑	↑
α-sGC	—	—	—	—
β-sGC	—	—	—	—
cGKI	—	—	—	↑
VASP	↑	↑	↑	↑
p-VASP	↑	↑	↑	↑

Tab. 4.14 Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen

Die Symbole stellen die Proteinexpression im Diabetes bezogen auf die entsprechenden Kontrollen dar. [—], keine Veränderungen im Diabetes; (↑), verstärkte Expression im Diabetes im Vergleich zur Kontrolle]. eNOS (endotheliale NO-Synthase), α -/ β -sGC (lösliche Guanylatzyklase, α -/ β -Untereinheit), cGKI (cGMP-abhängige Proteinkinase I), VASP (vasodilatator stimulated phosphoprotein), p-VASP (phosphoryliertes VASP).

Die diabetische Stoffwechsellage verursachte Modulationen der NO/cGMP-Signalkaskade. Sowohl in makro- als auch in mikrovaskulären Geweben war die Expression der eNOS und der Effektorproteine VASP und p-VASP nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen erhöht. Die Expressionssteigerung von VASP war unabhängig von der Diabetesdauer. Dagegen erfolgte die eNOS-Expressionszunahme als regulativer Prozess einer längerfristigen Adaption an die diabetische Stoffwechsellage, denn erst nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen war die Steigerung der eNOS-Expression signifikant ausgeprägt.

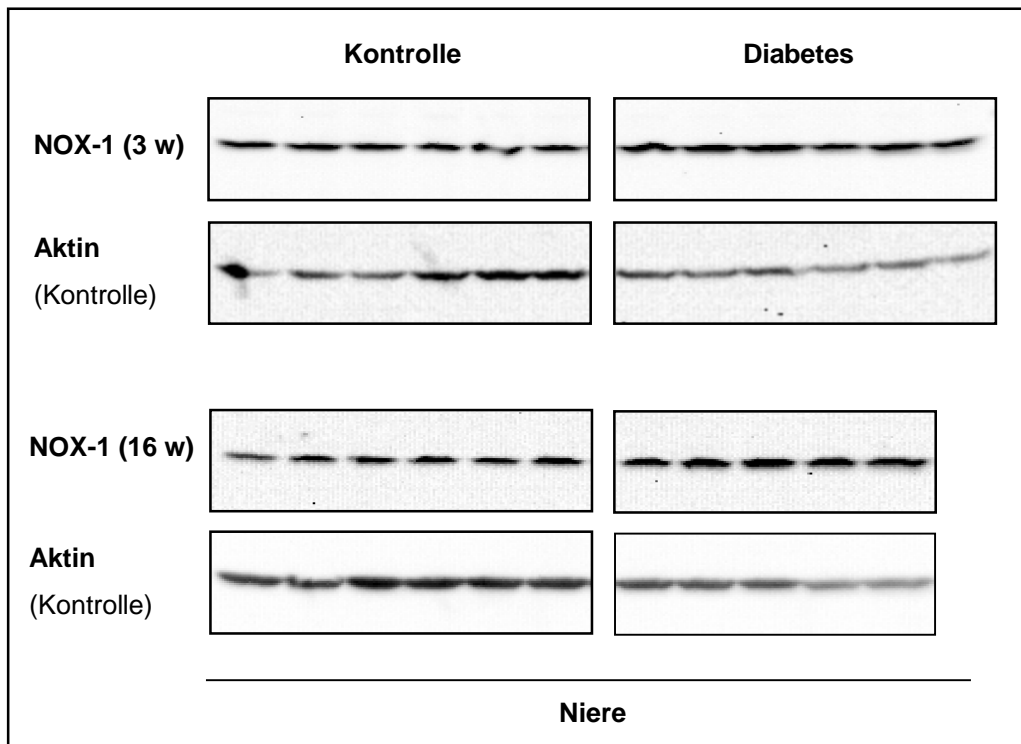
4.8 Einfluss von Diabetes auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase

In funktionellen Studien konnte durch Hemmung der Superoxiddismutase gezeigt werden, dass die Endothelfunktion im Diabetes durch reaktive Sauerstoffverbindungen moduliert wurde (Abb. 4.28). Als eine mögliche Quelle für das Auftreten von oxidativem Stress wird die Generierung von Sauerstoffradikalen durch die Enzymfamilie der NAD(P)H-Oxidasen (NOX) diskutiert [58]. Die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase existiert in mehreren Isoformen, die durch differierende katalytische Untereinheiten charakterisiert sind (NOX-1, NOX-4) [90]. Um zu prüfen, ob die NAD(P)H-Oxidase ein Faktor für das Auftreten von oxidativem Stress bei dem hier verwendeten Diabetesmodell darstellte, wurde die Expression der katalytischen Untereinheiten - NOX-1 und NOX-4 - mittels Immundetektion in Gewebelysaten von Aorta, Herz und Niere von diabetischen Wistar-Ratten nach einer Diabetesdauer von 3 und 16 Wochen untersucht.

4.8.1 Untersuchung der Expression der NOX-1 – Untereinheit

In Aorten- und Herzgeweben war kein Unterschied in der Expression von NOX-1 zwischen Kontrollen und diabetischen Ratten nachweisbar. Dagegen zeigte sich in Nierengeweben von diabetischen Ratten sowohl nach einer Diabetesdauer von 3 Wochen als auch nach 16 Wochen eine verstärkte Expression der NOX-1 im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Nach 3 Wochen war die Expression von NOX-1 auf das Doppelte und nach 16 Wochen auf das 2,5fache erhöht. Das heißt, dass die Expression von NOX-1 in der Niere abhängig von der Diabetesdauer war, denn mit zunehmender Diabetesdauer konnte auch eine weitere Expressionssteigerung nachgewiesen werden ($P=0,031$, t-Test, NOX-1-Expression nach 3 Wochen Diabetesdauer vs. NOX-1-Expression nach 16 Wochen Diabetesdauer).

A



B

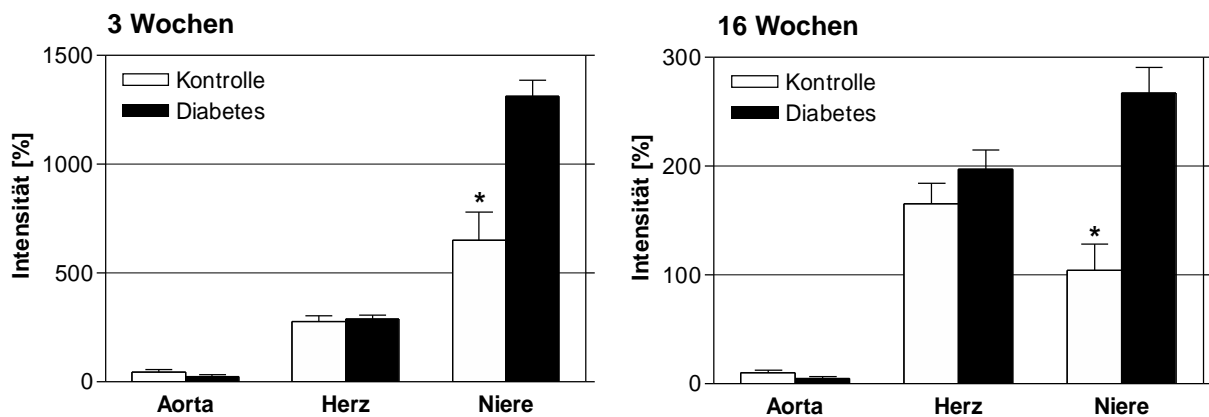


Abb. 4.37 Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit NOX-1

Auswirkung einer Diabetesdauer von 3 Wochen und 16 Wochen auf die NOX-1-Proteinexpression in Aorta, Herz und Nieren von Kontrollen und diabetischen Wistar-Ratten. **A.** Repräsentative Western Blots. **B.** Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) bezogen auf Aktin von $n=5-6$ Experimenten nach 3 Wochen und 16 Wochen Diabetesdauer, * $P<0,05$, t -Test Kontrolle vs. Diabetes.

4.8.2 Untersuchung der Expression der NOX-4 – Untereinheit

Sowohl nach 3 Wochen als auch nach 16 Wochen Diabetesdauer zeigten die Ergebnisse der Western Blot-Analyse für NOX-4 keine Unterschiede in der Proteinexpression bei Aorta, Herz und Niere. In der Niere wurde ein tendenzieller aber nicht signifikanter Anstieg der Expression der NOX-4-Untereinheit der NADPH-Oxidase beobachtet.

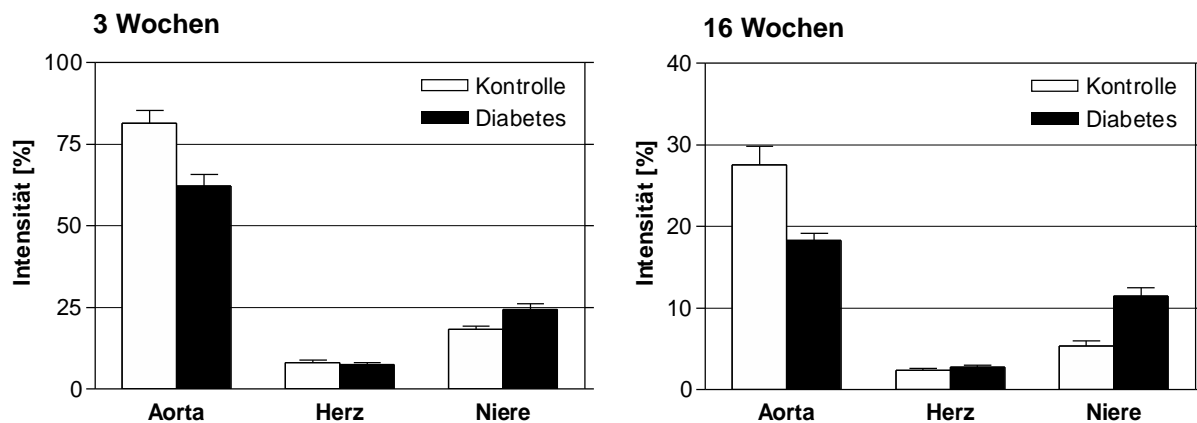


Abb. 4.38 Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit NOX-4

Auswirkung einer Diabetesdauer von 3 Wochen und 16 Wochen auf die NOX-4-Proteinexpression in Aorta, Herz und Niere aus Kontrollen und diabetischen Wistar-Ratten. **A.** Repräsentative Western Blots. **B.** Darstellung der densitometrischen Auswertung der Western Blots als Mittelwerte (\pm SEM) bezogen auf Aktin von $n=5-6$ Experimenten nach 3 Wochen und 16 Wochen Diabetesdauer.

4.8.3 Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin in der Niere

Die Daten zur Untersuchung der Expression der NAD(P)H-Oxidase (Abb. 4.36) ließen vermuten, dass in der Niere möglicherweise die Expressionssteigerung der NOX-1-Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase entscheidend für die Entstehung von oxidativem Stress im Rahmen einer diabetischen Nephropathie sind. In weiteren Untersuchungen sollten qualitative Hinweise für das Auftreten von Diabetes-induziertem, oxidativem Stress über den indirekten immunhistochemischen Nachweis von Nitrotyrosin in der Niere erhalten werden.

Erhöhte Nitrotyrosin-Konzentrationen gelten als Nachweis für das Auftreten von oxidativem Stress, da Nitrotyrosin über die Reaktion von NO-Verbindungen mit reaktiven Sauerstoffverbindungen generiert wird [91]. Es konnte gezeigt werden, dass die Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen zu Anomalien in der biologischen Funktion diverser Biomoleküle führt. Dies kann auch ursächlich für die durch oxidativen Stress induzierte Pathogenese von Gefäßkrankheiten sein. Freies bzw. in Proteinen enthaltenes Tyrosin wird *in vivo* hauptsächlich durch Peroxynitrit, das Produkt der Reaktion von NO mit Superoxid, nitriert [29]. Dabei führt die Reaktion von NO mit Tyrosyl-Radikalen in Anwesenheit zusätzlicher Oxidantien zur Entstehung von C-Nitroso- und/oder O-Nitrosotyrosin-Produkten. Diese werden durch eine 2-Elektronen-Oxidation in 3-Nitrotyrosin konvertiert. Somit ist der Nachweis von Nitrotyrosin im Gewebe zusätzlich auch ein indirekter Hinweis auf die Formation von Peroxynitrit und die Inaktivierung von NO im Gewebe [92].

Der immunhistochemische Nachweis von Nitrotyrosin im Nierenmark aus Kontrollratten wies eine schwache Formation von Nitrotyrosin im Bereich der Sammelrohre auf. In den Nieren diabetischer Ratten war die Färbung von Nitrotyrosin deutlich stärker ausgeprägt. Das bedeutet, in den Nieren diabetischer Ratten trat vor allem im Bereich des Sammelrohrsystems vermehrt oxidativer Stress auf.

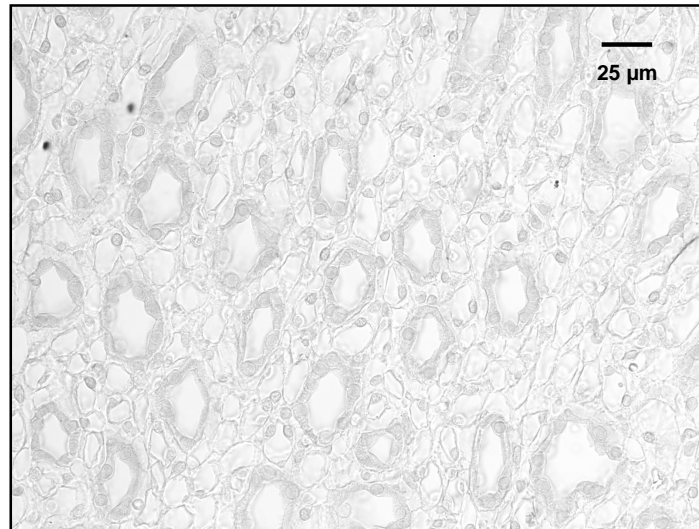
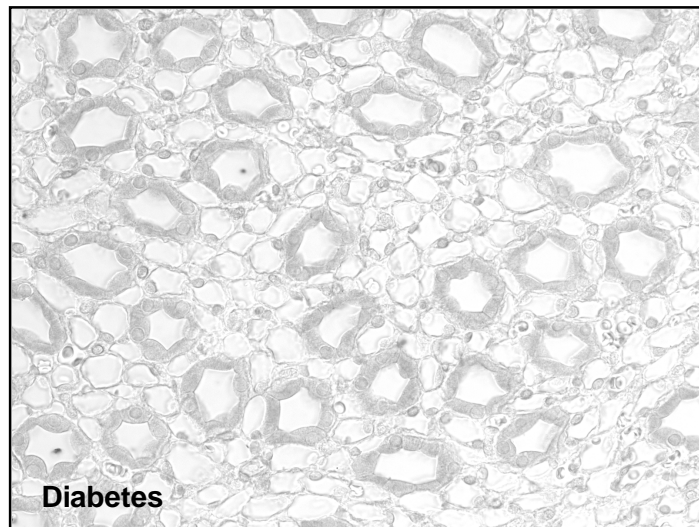
A**B**

Abb. 4.39 Immunohistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin

Querschnitt der inneren Zone der Medulla renalis (Nierenmark) der Niere einer Kontrollratte (**A**) und einer diabetischen Ratte (**B**) nach einer Diabetesdauer von 8 Wochen. Dargestellt sind Immunfärbungen von Nitrotyrosin mit Diaminobenzidin.

5 DISKUSSION

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Untersuchung des Einflusses von Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität, insbesondere im Hinblick auf pathologische Veränderungen der endothelabhängigen NO/cGMP-Signalkaskade. Die vaskuläre Reaktivität wird durch die Balance zwischen Vasorelaxation und Vasokontraktion charakterisiert. Es wurden daher funktionelle Untersuchungen am STZ-Tiermodell mit experimentell induziertem Diabetes zur vasorelaxierenden und vasokontraktiven Potenz der Gefäße im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen durchgeführt. Die Experimente wurden nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen durchgeführt, um die pathophysiologische Regulation der Gefäße als Prozess einer langfristigen Adaption an die diabetische Stoffwechsellage zu ermitteln. Folgende wesentliche Ergebnisse zum Einfluss von Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität wurden im Rahmen dieser Arbeit erzielt:

- Eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer eingeschränkten NO-vermittelten endothelabhängigen Vasorelaxation, die ausschließlich durch die hyperglykämische Stoffwechsellage verursacht ist, konnte in keinem der untersuchten STZ-diabetischen Tiermodellen nachgewiesen werden.
- Die NO/cGMP-Signalkaskade wurde im STZ-Rattenmodell auf Proteinebene moduliert. Die Inhibition des antioxidativ wirkenden Enzyms Superoxid-dismutase demaskierte eine Beeinträchtigung des NO/cGMP-Signalweges im Diabetes. Dies wurde durch eine eingeschränkte Vasorelaxation infolge der durch reaktive Sauerstoffverbindungen bedingten Inaktivierung des NO deutlich.
- Im Nierengewebe von STZ-diabetischen Ratten konnte durch den immunhistochemischen Nachweis von Nitrotyrosin das Auftreten von oxidativem Stress in Form reaktiver Sauerstoffverbindungen nachgewiesen werden.
- In funktionellen Studien mit Aortenringen aus STZ-diabetischen Mäusen wurde gezeigt, dass die diabetische Stoffwechsellage unabhängig von dem auslösenden vasoaktiven Agens zu einer vasokontraktiven Hyperreaktivität führt.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Vasoreaktivität im Hinblick auf die Vasokontraktion durch Diabetes beeinflusst wurde. Eine Veränderung der endothelabhängigen Vasorelaxation durch die diabetische Stoffwechsellage konnte im STZ-Rattenmodell auf Proteinebene, nicht aber in funktionellen Studien nachgewiesen werden.

5.1 Streptozotozin-Diabetes – ein experimentelles diabetisches Tiermodell

Streptozotozin (STZ) ist ein von *Streptomyces achromogenes* produziertes Antibiotikum [93]. Es ist ein Glukosederivat mit einer Methylnitrosoharnstoff-Gruppe, die an die C2-Position der 2-Desoxy-D-glukose gebunden ist. Aufgrund dieser Struktur wirkt STZ als Glukoseanalogon organotrop auf die insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas, wo es selektiv von dem Glukosetransporter GLUT2 aufgenommen wird. Diese strukturelle Organspezifität, verbunden mit den alkylierenden Eigenschaften der Nitrosoharnstoff-Gruppe, bewirkt eine selektive β -Zell-Zytotoxizität aufgrund von spezifischen Schädigungen von DNA und Proteinen. Entstandene DNA-Strangbrüche induzieren die Aktivierung der nukleären Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, die zu einer Abnahme der Konzentration von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) in den Inselzellen führt. Die Folge dieser Beeinflussung des NAD-Stoffwechsels sind Veränderungen der Inselzell-Funktionen, unter anderem der Proinsulin-Synthese [94, 95]. Außerdem induzieren alkylierte Membranproteine eine Immunreaktion, die ebenfalls zu einer Zerstörung der β -Zellen führt [96]. Die bereits wenige Tage nach STZ-Injektion einsetzende Degeneration der β -Zellen resultiert aufgrund einer reduzierten Insulinproduktion in einer persistenten Hyperglykämie. Eine Regeneration der β -Zellen ist auch nach einer längeren Versuchsdauer auszuschließen [97]. Die diabetogenen Effekte von STZ sind dosisabhängig [98]. Es wurden in allen verwendeten Tiermodellen mittlere STZ-Dosen verwendet, die eine Langzeit-Betrachtung der diabetischen Gefäßkomplikationen ermöglichen, ohne dass ein ketoazidotischer Zustand auftritt und eine Insulin-Supplementierung notwendig wurde [99]. Der experimentelle STZ-Diabetes ist neben Insulinmangel und Hyperglykämie durch eine Glucosurie (bedingt durch osmotische Diurese als Folge der Akkumulation von Glukose im Blut) sowie durch Polydipsie und Polyurie gekennzeichnet. Diese katabole Stoffwechsellage führt zur Kachexie bei gleichzeitig auftretender Hypertrophie einzelner Organe (Organomegalie) wie Herz und Niere.

Die in dieser Arbeit beschriebenen physiologischen und biochemischen Parameter nach einer STZ-Applikation bei Mäusen und Ratten entsprachen weitgehend den in der Literatur beschriebenen Daten [99 - 103]. So wurden sowohl bei C57/Bl6- und BalbC-Mäusen als auch bei Unilever-Wistar-Ratten ein massiver Anstieg der Blutglukose und eine Abnahme des Körpergewichtes in Abhängigkeit von der Diabetesdauer beobachtet.

Die Abnahme des Körpergewichtes resultiert aus einem Verlust an Muskelmasse, der durch den katabolen Abbau von körpereigenen Proteinen und Fetten zur Energiegewinnung begründet ist. Dies wurde sowohl durch die in diabetischen Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren erniedrigten Proteinwerte als auch durch die verringerten Kreatininwerte, die der Muskelmasse proportional sind, gezeigt. Außerdem konnte ein tendenzieller Anstieg der Plasmatriglyceride bei STZ-behandelten Ratten beobachtet werden. Diese Symptome sind ein Anzeichen für Insulinmangel bei gleichzeitig bestehendem Glucagonüberschuss. Die vorhandene Hypertriglyceridämie weist außerdem auf ein bestehendes proatherogenes Potential hin.

Die im Serum signifikant erniedrigten Proteinwerte deuten zudem auf eine durch intraglomeruläre Permeabilitätsänderungen charakterisierte Funktionsstörung der Niere. Die diabetische Stoffwechsellage bedingt eine Hyperperfusion und -filtration der Glomeruli. Dies führt zu einem verstärkten Übertritt hochmolekularer Substanzen (z.B. Proteine), die in den Tubuli nicht mehr rückresorbiert werden können. Dabei entwickeln sich pathologische Veränderungen, die zu einer makroskopisch sichtbaren Hypertrophie der Nieren führen [99, 104]. Eine Organomegalie wurde für Niere und Herz bei allen untersuchten diabetischen Tiermodellen beobachtet. Die relativen Organgewichte waren nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten signifikant erhöht. Neben der Nephrohypertrophie als Ausdruck einer Gefäßschädigung der Niere wurde bei Ratten nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen zusätzlich eine Gefäßschädigung der Augen durch Kataraktbildung makroskopisch sichtbar.

Die beobachteten physiologischen und biochemischen Veränderungen nach einer STZ-Injektion entsprechen weitgehend den beim humanen Diabetes mellitus auftretenden pathologischen Erscheinungsbild. Das STZ-Modell des experimentellen Diabetes ist somit geeignet, chronische Prozesse der Vaskulopathie als Folge einer diabetischen Stoffwechsellage zu untersuchen.

5.2 Einfluss von Diabetes auf die endotheliale Relaxation

Der Verlust der modulierenden Eigenschaften des Endothels wird im Zusammenhang mit der Entwicklung einer diabetischen Vaskulopathie diskutiert [13, 14, 15]. Die Ausprägung dieser Funktionsstörung des Endothels wird als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnet und unter anderem durch eine eingeschränkte, NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation charakterisiert [13]. Die endotheliale Dysfunktion stellt ein multifaktorielles Geschehen dar und wird als Ausdruck der Beeinträchtigung wichtiger Funktionen des Endothels verstanden, die weit über die endothelvermittelte Vasorelaxation hinausgehen [16]. Die im Rahmen dieser Arbeit mit Acetylcholin erhobenen Daten zum Einfluss von Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität zeigten speziesunabhängig sowohl beim diabetischen Maus- als auch beim Rattenmodell keine eingeschränkte NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation. Eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer eingeschränkten Vasorelaxation auf Acetylcholin konnte somit in keinem der verwendeten Tiermodelle beobachtet werden, obwohl alle untersuchten Tiere unabhängig vom verwendeten Tiermodell nach 16 Wochen Diabetesdauer deutliche Anzeichen einer ausgeprägten diabetischen Stoffwechsellage aufwiesen.

Es existieren nur wenige Studien zur Endothelfunktion der thorakalen Aorta im Diabetes bei Mäusen. *Shen B. et al.* beobachteten eine verstärkte Vasorelaxation bei C57/Bl6-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 4 Wochen [102]. Dagegen zeigten *Soriano et al.* eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion 4 und 8 Wochen nach STZ-Injektion in einem anderen Mausstamm (BalbC) [105]. Die Literaturdaten zur endothelialen Dysfunktion im Sinne einer verminderten Reaktivität auf Acetylcholin bei STZ-Ratten sind ebenfalls heterogen. So wurde von *Murray et al.* und *Chang et al.* eine vollständig erhaltene Endothelfunktion von Rattenaorten nach einer Diabetesdauer von 12-15 Wochen beschrieben [106, 107]. Andere Untersuchungen zeigten eine eingeschränkte Relaxation nach einer Diabetesdauer von 2 [49], 12 [108] und 52 Wochen [107].

Funktionelle Studien nach einer vergleichsweise kurzen Diabetesdauer wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da in frühen Stadien der Diabetes-Erkrankung ein verstärkter Blutfluss als Kompensation einer reduzierten Sauerstoffversorgung des Gewebes zu einer hypoxischen Vasorelaxation führt. Als weitere Hypothese wird ein verstärkter Blutfluss als direkte physiologische Reaktion auf eine akute Hyperglykämie angenommen [14]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine längere Diabetesdauer (16

Wochen) gewählt, um die Vasoreaktivität im Hinblick auf die Steuerung durch den NO-Stoffwechsel zu untersuchen.

Eine endothelabhängige Vasorelaxation kann neben NO auch durch Prostaglandine und *endothelium derived hyperpolarizing factors* (EDHF) ausgelöst werden. Die Aktivität der Cyclooxygenase und damit die Synthese von vasorelaxierend aktiven Prostaglandinen wurde in allen funktionellen Studien durch den Zusatz von Diclofenac im Puffermilieu unterbunden. Obwohl die endothelabhängige Vasorelaxation hauptsächlich nach Stimulation durch NO ausgelöst wird, sind EDHF ebenfalls entscheidende Mediatoren der Regulation des vaskulären Tonus. Mit EDHF wird eine Gruppe strukturell weitgehend noch unbestimmter Verbindungen bezeichnet, die NO-unabhängig zu einer endothelialen Vasorelaxation führen [13, 109]. Die Heterogenität der Daten vorausgegangener Studien zur endothelabhängigen Relaxation im Diabetes wird unter anderem auf den Einfluss der EDHF zurückgeführt. Es wäre möglich, dass durch die Aktivität von EDHF eine endotheliale Dysfunktion bzw. eine defekte NO-Synthese maskiert wird [14].

Zu bedenken bleibt außerdem, dass es sich bei dieser Art der Untersuchung zur endothelabhängigen Vasorelaxation mit Acetylcholin um eine rezeptorvermittelte Aktivierung der NO/cGMP-Signalkaskade handelt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass eine endotheliale Dysfunktion durch Diabetes-induzierte Defekte der Membranrezeptoren oder der nachgeschalteten Signaltransduktion maskiert wird [16].

5.2.1 Die Endothelfunktion im diabetischen Mausmodell

Der Einfluss der Diabetesdauer und des *status diabeticus* wurde in den durchgeführten Studien einbezogen. Eine intakte endothelabhängige Vasorelaxation bei STZ-diabetischen C57/Bl6-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen konnte in Untersuchungen nach einer Diabetesdauer von 11 und 22 Wochen bestätigt werden. Weitere Experimente mit dem Calciumionophor A23187 in Mausearten bestätigten den bereits mit Acetylcholin erhobenen Befund einer vollständig erhaltenen Vasorelaxation in Aorten aus diabetischen Mäusen nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen. Das heißt, unabhängig von dem auslösenden Stimulus konnte eine vollständige Vasorelaxation erzielt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die NO/cGMP-Signalkaskade *downstream* der NO-Synthese keine Störung der funktionellen Physiologie im Diabetes aufweist.

Zusammenfassend zeigen die erhobenen funktionellen Daten zur endothelabhängigen Vasorelaxation im STZ-Diabetes bei Mäusen, dass eine hyperglykämische Stoffwechsellage allein nicht zu einer endothelialen Dysfunktion führt. Vermutlich sind weitere Faktoren an dem komplexen pathologischen Geschehen der gestörten Endothelfunktion im Diabetes beteiligt.

Endotheliale Dysfunktion und Inflammation

Um zu untersuchen, welche Faktoren neben dem hyperglykämischen Stoffwechselstatus für eine pathologische Endothelfunktion im Diabetes entscheidend sein könnten, wurde eine Vergleichsanalyse zu den von *Soriano et al.* publizierten Daten durchgeführt [70, 105]. *Soriano et al.* haben im Widerspruch zu den in 5.2 erläuterten Daten gezeigt, dass in STZ-behandelten BalbC-Mäusen nach einer Diabetesdauer von 4 [105] bzw. 8 Wochen [70] eine endotheliale Dysfunktion bei gleichzeitig eingeschränkter Vasokontraktion nach Phenylephrin-Applikation nachweisbar war. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der von *Soriano et al.* publizierten Bedingungen erhobenen Daten zur vaskulären Reaktivität zeigten keine endotheliale Dysfunktion bei BalbC-Mäusen. Das vollständig erhaltene Relaxationsvermögen stand einer verstärkten Vasokontraktion nach Applikation von Phenylephrin gegenüber. Dabei war der Stoffwechselstatus hinsichtlich des experimentellen Diabetes weitgehend mit den publizierten Daten identisch. Die Hypothese, dass neben der Hyperglykämie andere Faktoren die Vasoreaktivität im Diabetes beeinflussen, wird dadurch bestätigt.

Soriano et al. [70] postulieren die von ihnen beobachtete endotheliale Dysfunktion als Folge einer Verarmung der Zelle an energiereichen Phosphaten wie ATP und NADPH (Abb. 5.01). Dieser Mangelzustand soll sich durch eine Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ergeben. Hyperglykämie führt zu einem vermehrten Auftreten von reaktiven Sauerstoffverbindungen unterschiedlicher Genese als Ausdruck von oxidativem Stress. PARP wird durch Radikal-induzierte DNA-Strangbrüche aktiviert und wendet hohe Konzentrationen an ATP und NAD^+ zur DNA-Reparatur auf. Dadurch wird der intrazelluläre Gehalt an reduziertem NAD^+ vermindert, was zu Veränderungen im Energiestoffwechsel und letztlich zum Zelltod führt. Die Folge dieses Energiedefizits ist zudem eine Störung der Endothelfunktion unter anderem durch die Abnahme der NADPH-abhängigen eNOS-Aktivität [110].

Die aktive Form der PARP induziert außerdem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und eine Expressionssteigerung von proinflammatorischen Mediatoren wie ICAM-1, iNOS und MAP-Kinasen [70, 50]. Entsprechend wurde von Szabo *et al.* eine Reduktion der iNOS-Expression in PARP K.O.-Mäusen beobachtet [111].

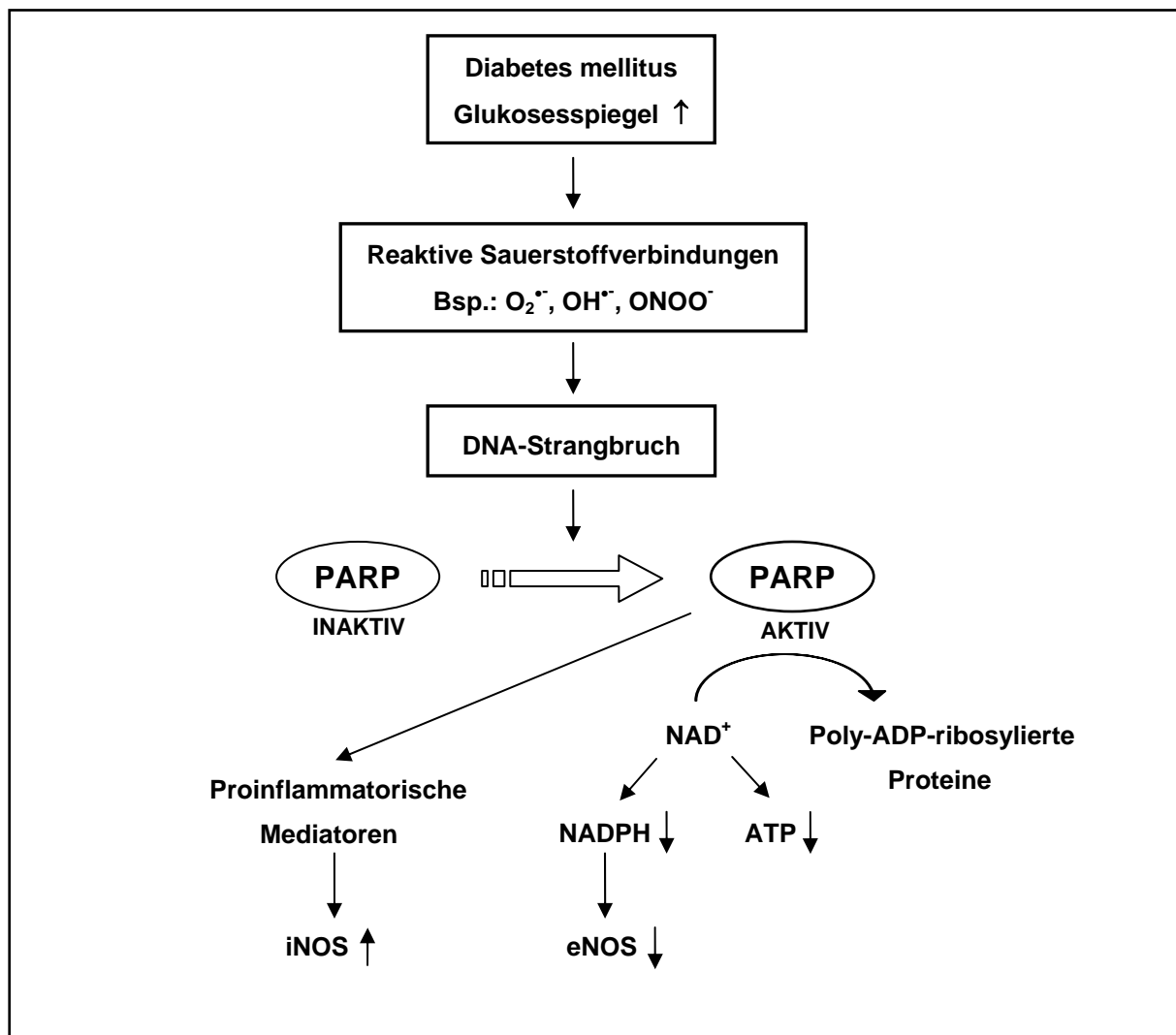


Abb. 5.01 Signalweg der PARP-abhängigen diabetischen Vaskulopathie

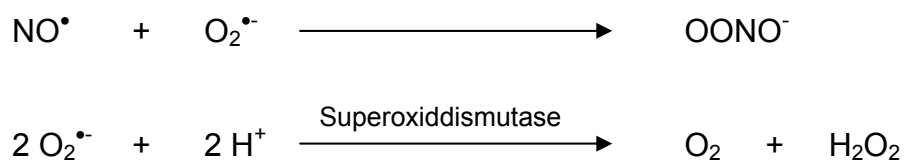
$O_2^{\bullet-}$ (Superoxidradikal), OH^{\bullet} (Hydroxylradikal), $ONOO^-$ (Peroxynitrit), PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase), NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat), ATP (Adenosintri-phosphat), eNOS (endotheliale NO-Synthase), iNOS (induzierbare NO-Synthase) – modifiziert nach Soriano *et al.* [68, 103] –

In dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten diabetischen Mausmodell war eine Abnahme der ATP-Konzentration in Gefäßen vorhanden. Der Unterschied des Einfluss von Diabetes auf den ATP-Gehalt in Herz und Aorta ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ca. 90 % der Herzmasse aus Myozyten besteht und damit der ATP-Gehalt im Herzen stärker durch Myozyten als durch Gefäße bestimmt wird. Es konnte aber keine Inflammation auf der Ebene der iNOS-Expression nachgewiesen werden. Nach diesen Ergebnissen ist eine endotheliale Dysfunktion allein durch eine hyperglykämische Stoffwechsellage nicht induzierbar. Möglicherweise ist die Ausbildung einer Inflammation ein weiterer Faktor, der neben dem hyperglykämischen Zustand die Ausprägung einer endothelialen Dysfunktion initiiert.

5.2.2 Die Endothelfunktion im diabetischen Rattenmodell

Wie bereits unter 5.2. erwähnt, wiesen diabetische Ratten ebenso wie STZ-Mäuse nach einer Diabetesdauer von 16 Wochen eine vollständige NO-vermittelte endothelabhängige Vasorelaxation auf. Erst nach Hemmung der Cu/Zn-Superoxiddismutase durch Diethyldithiocarbamat war die endothelabhängige Vasorelaxation im Diabetes deutlich eingeschränkt. Bei Aorten aus normoglykämischen Ratten hatte die Hemmung der Superoxiddismutase dagegen keinen Einfluss auf die Vasorelaxation.

Diabetes wird im Zusammenhang mit dem Auftreten von oxidativem Stress diskutiert [64, 56, 112]. Dieser oxidativer Stress ist assoziiert mit einer vermehrten Produktion von hochreaktiven Sauerstoffverbindungen, die durch die Reaktion mit NO zu Peroxynitrit (OONO^-) die Bioverfügbarkeit von NO verringern [56]. Das antiradikalisch wirkende Enzym Superoxiddismutase katalysiert als Oxidoreduktase die Umwandlung von Superoxidradikalen zu molekularem Sauerstoff und zu weniger reaktivem H_2O_2 [113].



Eine Inaktivierung von Superoxidradikalen durch die Superoxiddismutase erhöht somit die biologische Verfügbarkeit von NO. Umgekehrt blockiert die Hemmung der vasoprotektiven Superoxiddismutase die Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und trägt zur Instabilität von NO bei, da eine rasche Umsetzung von NO mit Superoxidradikalen erfolgt. Eine Zunahme der Superoxidradikalkonzentration nach Inhibition der Superoxiddismutase konnte durch *Oelze et al.* gezeigt werden [44].

Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchung zur Vasorelaxation unter Hemmung der Superoxiddismutase deuten auf eine Hoch-Regulation der Superoxiddismutase im Diabetes. Diese Hemmung der Superoxiddismutase führt bei Aorten aus diabetischen Tieren als Folge der Inaktivierung von NO durch reaktive Sauerstoffverbindungen zu einer eingeschränkten Relaxationsfähigkeit. Eine im STZ-Diabetes gestörte physiologische Endothelfunktion wird somit durch die Hemmung der Superoxiddismutase demaskiert. Möglicherweise wird die pathologisch erhöhte Bildung von Superoxidradikalen im Diabetes durch eine erhöhte Aktivität der Superoxiddismutase kompensiert, denn erst durch die enzymatische Blockade der Superoxiddismutase wird eine eingeschränkte Endothelfunktion sichtbar.

Dass die Verschiebung der Balance zwischen Superoxidradikalkonzentration und antioxidativer Kapazität durch Hemmung der Superoxiddismutase zu einer endothelialen Dysfunktion führt, wurde an Arterien [114] und bei einem Modell zur experimentellen Atherosklerose [48] bereits gezeigt. Vorausgehende Untersuchungen von *Ballhausen et al.* [87] hatten zudem dargelegt, dass im Diabetes vermehrt oxidativer Stress in Form reaktiver Sauerstoffverbindungen entsteht, der für die Regulation der Koronardurchblutung entscheidend ist. Die im Diabetes eingeschränkte, endothelabhängige Regulation der Koronardurchblutung wurde durch Zusatz von Superoxiddismutase weitgehend normalisiert. Die Protektion vor der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion durch die Superoxiddismutase-Aktivität im Diabetes wurde ebenfalls von *Zanetti et al.* durch Gen-Transfer von Isoformen der Superoxiddismutase an dysfunktionierten Aorten gezeigt [115].

5.3 Modulation des NO/cGMP-Signaltransduktionsweges bei Diabetes

In 5.2 wurden Veränderungen der Endothelfunktion am Modell der STZ-diabetischen Ratte beschrieben. Da die Endothelfunktion unter anderem durch die Aktivität der NO/cGMP-Signalkaskade charakterisiert wird, wurde in weiteren Untersuchungen der Einfluss des Diabetes auf die Proteinexpression der an dieser Signalkaskade beteiligten Proteine untersucht. Sowohl in makro- (Aorta) als auch in mikrovaskulären Geweben (Herz und Niere) war die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) wie auch die der Effektorproteine VASP (*vasodilator stimulated phosphoprotein*) und p-VASP (phosphoryliertes VASP) erhöht. Die übrigen untersuchten Proteine wie die lösliche Guanylatzyklase (sGC) sowie die Guanylatzyklase-abhängige Kinase I (cGKI) zeigten keine Veränderungen bezüglich ihrer Proteinexpression. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass im Krankheitsverlauf des Diabetes einzelne Proteine der NO/cGMP-Signalkaskade upreguliert werden, um pathologische Veränderungen auszugleichen, damit die physiologische Funktionen erhalten bleiben.

Einfluss von Diabetes auf die Expression der endothelialen NO-Synthase

Eine erhöhte eNOS-Expression in der Aorta bei gleichzeitig auftretender endothelialer Dysfunktion unter Superoxiddismutase-Inhibition lässt auf eine verminderte eNOS-Aktivität bzw. eine gestörte Bioverfügbarkeit des NO im Diabetes schließen. Ein kompensatorischer Anstieg der eNOS-Expression würde die Ansprechbarkeit der NO/cGMP-Signalkaskade erhalten. *Cosentino et al.* konnten ebenfalls eine verstärkte eNOS-Expression und eine Zunahme der eNOS-Aktivität in Endothelzellen, die mit hohen Glukose-Konzentrationen behandelt wurden, zeigen [116]. Andere Untersuchungen bestätigen eine Steigerung der eNOS-Aktivität in Herzen von STZ-diabetischen Ratten [87]. Eine hochregulierte eNOS-Expression in Aorten von STZ-diabetischen Ratten wurde ebenfalls von *Hink et al.* nach einer Diabetesdauer von zwei Wochen gefunden [49].

Da die endotheliale Dysfunktion im Diabetes erst unter Superoxiddismutase-Inhibition nachweisbar war, ist ein pathologischer Einfluss von oxidativem Stress in Form von reaktiven Sauerstoffverbindungen, vor allem Superoxidradikalen ($O_2^{\bullet-}$) auf die NO-Bioverfügbarkeit wahrscheinlich. In Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies reagiert NO als sehr reaktive radikalische Verbindung in einer bimolekularen Reaktion

mit Superoxid $O_2^{\bullet-}$ zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) [29]. Peroxynitrit ist ein potentes Oxidans, das mit einer Reihe von Biomolekülen reagieren kann. Es führt u.a. zur Nitrierung von aromatischen Aminosäuren (z.B. Tyrosin) in Proteinen, die infolge dessen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden und somit zu pathologischen Symptomen führen können. Aufgrund der oxidativen Eigenschaften kann Peroxynitrit auch DNA-Strangbrüche induzieren, die die PARP aktivieren (siehe 5.2). Weitere pathologische Eigenschaften von Peroxynitrit sind die Fähigkeit zur Lipidperoxidation und zur Oxidation von Hämproteinen und Sulfhydryl-Gruppen [117].

Einige Studien belegen, dass die eNOS in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies selbst Superoxidradikale generieren kann [116, 61]. Eine Produktion von Superoxidradikalen durch die eNOS wird auch als „Entkopplung“ der eNOS bezeichnet. Die eNOS selbst wird dann unter Verlust ihrer vasoprotektiven Eigenschaften zu einer zusätzlichen Radikalquelle. Damit kommt es zu einer Verstärkung des pathologischen oxidativen Stress. Im Stadium der „entkoppelten“ eNOS resultiert der Elektronenfluss von der eNOS-Reduktase-Domäne zur Oxidase-Domäne in einer Reduktion von molekularem Sauerstoff an der prosthetischen Häm-Gruppe und nicht in der Bildung von NO aus L-Arginin. Damit ist der Elektronenfluss ausgehend vom NADPH „fehlgeleitet“, so dass die eNOS aus molekularem Sauerstoff kein NO, sondern Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid bildet [61]. Eine eNOS-katalysierte Freisetzung von Superoxidradikalen sowie die Bildung von Peroxynitrit wurde von *Cosentino et al.* an kultivierten Endothelzellen nach Exposition mit hohen Glukose-Konzentrationen beobachtet [116].

Eine entscheidende Rolle in diesen Vorgängen wird Tetrahydrobiopterin (BH_4) als Cofaktor der eNOS zugeschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Reaktion von L-Arginin zu NO und L-Citrullin nur in Anwesenheit ausreichender Konzentrationen an BH_4 verläuft. Bei BH_4 -Mangel ist die eNOS-Funktion „entkoppelt“ und es kommt zur Generierung von Superoxidradikalen. Die Substitution von BH_4 rekonstituiert die „entkoppelte“ eNOS und es erfolgt wieder die Bildung von NO und L-Citrullin [116, 119]. Von *Shinozaki et al.* wurde gezeigt, dass die orale Gabe von BH_4 die endotheliale Dysfunktion und den vaskulären oxidativen Stress in Aorten von Insulin-resistenten Ratten verhindert [120].

Der genaue Mechanismus der eNOS-Entkopplung ist noch ungeklärt. Einige Untersuchungen prüften eine verminderte Bioverfügbarkeit von BH_4 infolge von oxidativem Stress. Bei Bluthochdruck, einer Erkrankung, die ebenfalls mit dem Auftreten von oxidativem Stress assoziiert ist, wurde die Oxidation von BH_4 zu Dihydrobiopterin durch Peroxynitrit als Ursache einer „entkoppelten“ eNOS diskutiert [121]. Die Untersuchungen von *Zou et al.* zeigten dagegen eine Modulation der eNOS-Funktion infolge einer Peroxynitrit-bedingten Oxidation des Zink-Thiolat-Komplexes in diabetischen LDL-Rezeptor K.O.-Mäusen. Die für die katalytische Aktivität entscheidende Dimerisierung der eNOS, die durch das Zink-Ion, das tetrahedral zu symmetrisch paarweise angeordneten Cysteinresten koordiniert ist, wird unterbunden [122]. Diese Zink-Thiolat-Konformation (ZnS_4) fördert die Bindung des für die eNOS-Aktivität entscheidenden Cofaktors BH_4 [123].

Der Vorgang der eNOS-„Entkopplung“ könnte auch eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, vollständig erhaltenen vasorelaxierenden Eigenschaften der Aorten aus diabetischen Tieren sein. Diese Untersuchungen zur vaskulären Relaxation stützen die Hypothese, dass im Diabetes die „entkoppelte“ eNOS neben Superoxidradikalen auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) produziert. *Cosentino et al.* demonstrierten bereits, dass die Inhibition der BH_4 -Synthese zu einer H_2O_2 -vermittelten Vasorelaxation führen kann [124, 125]. Ebenso wurde von *Landmesser et al.* eine endotheliale Relaxation in hypertensiven Mäusen beobachtet, obwohl die Mäuse einen BH_4 -Mangel und damit eine verminderte eNOS-Aktivität aufwiesen [121]. Somit ist die Relaxation bei pathologischen Zuständen, die mit oxidativem Stress assoziiert sind, nicht ausschließlich durch die eNOS-Aktivität, sondern auch durch vasoaktives H_2O_2 verursacht. H_2O_2 maskiert als ein EDHF (s. auch 5.2) eine mögliche endotheliale Dysfunktion. Die Superoxiddismutase generiert ebenfalls H_2O_2 . Das würde bedeuten, dass im Diabetes sich die Konzentration an H_2O_2 durch die eNOS-„Entkopplung“ und die Aktivität der Superoxiddismutase summieren. Eine mögliche Folge wäre eine H_2O_2 -induzierte Vasorelaxation. Nach Inhibition der Superoxiddismutase wird die Produktion von H_2O_2 verringert und infolge dessen die Vasorelaxation eingeschränkt.

Es gibt zwei bekannte Mechanismen, die die H_2O_2 -vermittelte Vasorelaxation erklären. Bei dem enzymatischen Abbau von H_2O_2 durch die Katalase entsteht ein Enzymkomplex, der durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase die Bildung von zyklischem

Guanosin-3',5'-monophosphat auslöst [126]. Zweitens ist H₂O₂ ein endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor [127].

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine erhöhte eNOS-Expression im Diabetes möglicherweise Ausdruck einer kompensatorischen Gegenregulation zu einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit ist. Eine Ursache für diese verringerte Bioverfügbarkeit ist die Reaktion von NO mit reaktiven Sauerstoffspezies.

Einfluss von Diabetes auf die Expression von VASP und p-VASP

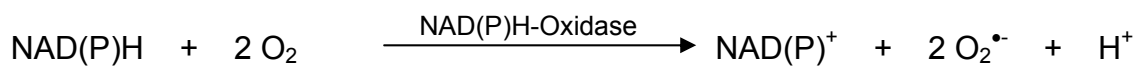
Das *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) ist eines der Effektorproteine der NO/cGMP-Signalkaskade. Es ist ein Modulator der Mikrofilamente und reguliert die Aktin-Polymerisation. Die Aktivierung erfolgt durch die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) über eine Phosphorylierung am Serin 239 [44].

Die Expression von VASP und auch von p-VASP sind im Diabetes erhöht. Die Zunahme der VASP- und p-VASP-Expression ist dabei unabhängig von der Diabetesdauer, da die Expression bereits nach kurzfristiger Diabetesdauer gesteigert ist und eine weitere Expressionszunahme im Verlauf einer Diabetesdauer von 16 Wochen nicht mehr stattfindet. Das heißt, die Expression dieser Effektorproteine der NO/cGMP-Kaskade wird schon im frühen Diabetesstadium alteriert. Die Zunahme der Aktivierung durch Phosphorylierung korrelierte dabei mit der Expressionszunahme. Eine zusätzlich verstärkte Aktivierung im Diabetes konnte somit ausgeschlossen werden. Die Phosphorylierung von VASP gibt Auskunft über die Aktivität der cGKI [128]. Die Beobachtung, dass die Expression von VASP zwar erhöht, der Phosphorylierungsgrad aber unverändert ist, deutet daraufhin, dass die Funktion der cGKI im Diabetes erhalten ist. *Ibarra-Alvarado et al.* demonstrierten bereits, dass p-VASP hauptsächlich über den NO/cGMP-Signalweg reguliert wird und ein Marker für den Aktivitätsstatus dieses Signalweges und der Endothelfunktion darstellt [128]. Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die NO/cGMP-Signalkaskade zwar beeinträchtigt, insgesamt aber noch funktionsfähig ist. *Oelze et al.* beschrieben eine verringerte p-VASP-Konzentration infolge einer durch oxidativen Stress verursachten endothelialen Dysfunktion in Aorten hyperlipidämischer Kaninchen [44]. Die Beobachtungen in dieser Arbeit lassen dagegen vermuten, dass die im Diabetes beobachteten Modulationen der NO/cGMP-Signalkaskade pathologische Veränderungen kompensieren, um die Endothelfunktion aufrecht zu erhalten.

5.4 NAD(P)H-Oxidase als Quelle von oxidativem Stress in Nieren STZ-diabetischer Ratten

In funktionellen Studien konnte durch die Hemmung der Superoxiddismutase bereits gezeigt werden, dass die Endothelfunktion im Diabetes durch oxidativen Stress in Form reaktiver Sauerstoffverbindungen moduliert wird (s. Abb. 4.28). Reaktive Sauerstoffverbindungen werden im Diabetes infolge der hyperglykämischen Bedingungen bzw. nach Stimulation durch glykosylierte Proteine (AGE-Proteine) gebildet [129, 130]. Neben der Autoxidation von Glukose werden mehrere Mechanismen diskutiert, die zu einer vermehrten Radikalproduktion im Diabetes führen (s. Abb. 1.04). In diesem Zusammenhang ist eine „entkoppelte“ eNOS und die mitochondriale Radikalproduktion bedeutsam [45, 58].

Als eine der Hauptquellen der Superoxidproduktion in vaskulären Zellen und Myozyten wird die Aktivierung von Enzymen aus der Familie der NAD(P)H-Oxidasen diskutiert [56, 57]. NAD(P)H-Oxidasen sind membrangebundene Proteine, die die Reduktion von molekularem Sauerstoff mit NADH oder NADPH als Elektronendonator katalysieren.



Es existiert eine spezifische vaskuläre NAD(P)H-Oxidase, die in glatten Gefäßmuskelzellen auftritt und strukturelle Ähnlichkeiten mit der neutrophilen, phagozytären NAD(P)H-Oxidase aufweist [90, 131]. Die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase liegt in mehreren Isoformen vor, die durch differierende katalytische Untereinheiten charakterisiert sind (NOX-1 und NOX-4) [132]. Um zu prüfen, ob die NAD(P)H-Oxidase ein Faktor für das Auftreten von oxidativem Stress in dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Diabetesmodell darstellte, wurde die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in Aorta, Herz und Niere untersucht. In Geweben aus Aorta und Herz war die Expression von NOX-1 in Kontrollen und diabetischen Ratten nicht unterschiedlich. In Nierengeweben war jedoch eine verstärkte Expression der NOX-1 bei STZ-Ratten in Abhängigkeit von der Diabetesdauer nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass in der Niere die erhöhte Expression der NOX-1-Isoform der NAD(P)H-Oxidase möglicherweise zu oxidativem Stress beiträgt. Das Auftreten reaktiver

Sauerstoffverbindungen als mögliche Konsequenz einer verstärkten NAD(P)H-Oxidase-Expression konnte zudem indirekt über den immunhistochemischen Nachweis von Nitrotyrosin im Bereich des Sammelrohrsystems im Nierenmark von Nieren diabetischer Ratten nachgewiesen werden.

Die Bedeutung der NAD(P)H-Oxidase als Quelle oxidativen Stresses im Rahmen einer Diabetes-Erkrankung konnte ebenfalls von *Guzik et al.* bei Patienten mit NIDDM nachwiesen werden. Dabei wurde eine erhöhte Produktion der NAD(P)H-Oxidase in Arterien und Venen diabetischer Patienten mit arterieller Koronarkrankheit beschrieben [133]. Die Ursache einer verstärkten Produktion der NAD(P)H-Oxidase im Diabetes können vielfältig diskutiert werden. *Guzik et al.* und *Hink et al.* diskutierten im Diabetes eine verstärkte Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase durch die Proteinkinase C. Eine andere Möglichkeit ist die Angiotensin II-induzierte Expressionssteigerung der NAD(P)H-Oxidase. Es gibt mehrere Hinweise einer im Diabetes veränderten Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die in einer erhöhten Plasmakonzentration an Angiotensin II resultiert [60, 133]. In einigen Untersuchungen wurde in experimentellen Ansätzen die therapeutische Intervention mit AT₁-Rezeptor-Blockern und ACE-Hemmern zur Behandlung einer endothelialen Dysfunktion im Allgemeinen [131] und speziell bei der diabetischen Nephropathie [135] befürwortet.

5.5 Einfluss von Diabetes auf die Vasokontraktion

Die diabetische Vaskulopathie umfasst eine Dysfunktion des vaskulären Tonus, der durch die Balance zwischen Vasorelaxation und Vasokontraktion charakterisiert wird. Während die funktionelle Physiologie der Vasorelaxation bei STZ-diabetischen Mäusen erhalten blieb, konnten deutliche Unterschiede bei der vasokontraktiven Potenz im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden. Aorten aus diabetischen C57/Bl6-Mäusen wiesen eine Hyperreaktivität gegenüber einer Phenylephrin-induzierten adrenergen Stimulation auf, die unabhängig von der Diabetesdauer nach 11, 16 bzw. 22 Wochen beobachtet werden konnte. *Murray et al.* beschrieben in einem anderen diabetischen Tiermodell ebenfalls eine verstärkte Vasokontraktion bei unverändertem NO-vermitteltem endothelabhängigem Relaxationsvermögen [106]. Um die Ursache für die Hyperreaktivität von Aorten aus STZ-diabetischen Mäusen zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Hypothesen näher untersucht.

- Veränderungen der adrenergen Signaltransduktion
- Aktivierung des Diacylglycerin/Proteinkinase C-Signalweges
- Morphologische Veränderungen der Aorta
- Einfluss der NO/cGMP-Signaltransduktion auf die Vasokontraktion
- Veränderungen der RhoA/Rho-Kinase vermittelten Vasokontraktion

5.5.1 Veränderungen der adrenergen Signaltransduktion

Phenylephrin ist ein adrenerger Vasokonstriktor, dessen Aktivität über den G-Protein-gekoppelten $\alpha_{1A/C}$ -Rezeptor in glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt wird [136]. Eine Aktivierung des Adrenozeptors resultiert in einer Stimulierung der Phospholipase C in der Zytoplasmamembran. Dieses Enzym katalysiert innerhalb des Inositol-Lipid-Zyklus die Bildung des sekundären Botenstoffs Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und von 1,2-Diacylglycerol aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. IP_3 initiiert die Freisetzung von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum [137]. Freie Calciumionen können nach Bindung an Calmodulin über eine weitere enzymatische Reaktionskette eine glattmuskuläre Kontraktion auslösen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten nicht auf eine Diabetes-induzierte Veränderung der adrenergen Signaltransduktion. Es konnte bei Geweben aus diabetischen Tieren keine Expressionsänderung des $\alpha_{1A/C}$ -Rezeptors im Western Blot nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Untersuchungen mit anderen vasoaktiven Substanzen (Serotonin, Prostaglandin $F_{2\alpha}$), dass die im Diabetes beobachtete Hyperkontraktilität nicht auf eine adrenerge Stimulation beschränkt war, sondern auch nach Aktivierung anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auslösbar war. Sowohl Serotonin als auch Prostaglandin $F_{2\alpha}$ führten rezeptorabhängig, vermittelt über G-Proteine, zu einer Vasokontraktion, die unabhängig von dem durch Phenylephrin innervierten adrenergen $\alpha_{1A/C}$ -Rezeptor war. Das bedeutet, dass Diabetes-bedingte Veränderungen der Signaltransduktion *downstream* der Rezeptorebene lokalisiert sein müssen. *Weber et al.* bestätigten durch Radioligandbindungsstudien an Aortengeweben aus diabetischen Ratten den Befund, dass eine Hyperglykämie zu keiner Veränderung der Zahl adrenerger Rezeptoren führt. In dieser Studie wurde außerdem eine gestörte G-Protein-Adrenozeptor-Bindung im Sinne einer verminderten Rezeptorkopplung in diabetischen Rattenaorten beschrieben. Eine verringerte Rezeptorkopplung im Diabetes widerspricht jedoch einer physiologisch verstärkten Vasokontraktion [138] und kann daher keine Erklärung für die im Diabetes beobachtete vaskuläre Hyperreaktivität sein.

Weitere Untersuchungen mit dem rezeptorunabhängigen Vasokonstriktor Kaliumchlorid zeigten, dass infolge der diabetischen Stoffwechsellage auch die vasokontraktile Antwort auf rezeptorunabhängige Stimulation verstärkt ist. Kaliumchlorid induziert eine Dauerdepolarisation der Membran glatter Muskelzellen. Diese resultiert über die Öffnung von L-Typ-Calciumkanälen in einer Erhöhung des Calciumionen-Einstroms in die Zelle. Dadurch erfolgt eine Muskelkontraktion [139, 140]. Der durch Kaliumchlorid ausgelöste Influx von extrazellulären Calciumionen wird nicht additiv von einer intrazellulären Calciumionen-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum begleitet [141]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zur rezeptorunabhängigen Vasokontraktion nach Stimulation mit Kaliumchlorid lassen vermuten, dass die Ursache einer Diabetes-induzierten vaskulären Hyperreaktivität in einem Mechanismus unabhängig von der rezeptorabhängigen, G-Protein-vermittelten Signaltransduktion begründet ist.

5.5.2 Aktivierung des Diacylglycerin/Proteinkinase C - Signalweges

Proteinkinasen C (PKC) umfassen eine Familie von multifunktionalen Isoenzymen, die eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion von Hormonen und Cytokinen durch Phosphorylierungsreaktionen an Serin/Threonin-Resten spielt. Die Proteinkinase C existiert in 11 Isoformen. Die in diesem Zusammenhang entscheidende Gruppe A, die der sogenannten „klassischen“ PKC-Isoformen (cPKC α , β _I, β _{II}, γ), ist calcium- und phospholipidabhängig und wird hauptsächlich durch Diacylglycerin (DAG) aktiviert [142]. Durch Proteinkinase C vermittelte Phosphorylierungen führen unter anderem zu einer Calcium-Sensitivierung kontraktile Proteine, was in einem Anstieg des intrazellulären Calciumgehaltes und in einer Aktivierung der leichten Myosinketten [81, 143] resultiert.

Einer Hypothese von *Koya et al.* folgend, ist eine durch Hyperglykämie induzierte Aktivierung der Proteinkinase C mit kardiovaskulären, renalen und retinalen Komplikationen assoziiert [81]. Hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen führen zu einer vermehrten Expression des Glukose-Transporter GLUT1, was zu einem verstärkten Glukose-Einstrom und zu einer erhöhten Glykolyserate führt. DAG wird unter anderem durch die *de novo*-Synthese aus Intermediärprodukten der Glykolyse wie Glycerol-3-phosphat gebildet. Diese Reaktion ist unabhängig von der Phospholipase C-vermittelten DAG-Synthese. Unter hyperglykämischen Bedingungen nimmt der intrazelluläre Gehalt an DAG durch eine verstärkt ablaufende *de novo*-Synthese zu. Damit steigt auch die Aktivierung der Proteinkinase C [142].

Ungvari et al. zeigten an Skelettmuskelarteriolen diabetischer Ratten, dass eine gesteigerte Proteinkinase C-Aktivität ursächlich an einem im Diabetes erhöhten myogenen Tonus beteiligt ist [82]. Eine Untersuchung von *MacLeod et al.*, die den Einfluss von Proteinkinase C auf die Vasokontraktion von Mesenterialarterien und Aorten diabetischer Ratten analysierte, beweist ebenfalls eine Abhängigkeit des erhöhten vaskulären Tonus von der Proteinkinase C-Aktivität [144]. In dieser Arbeit konnte durch Inhibition der Proteinkinase C mit Chelerythrin kein Unterschied in der Phenylephrin-induzierten Vasokontraktion beobachtet werden. Chelerythrin ist ein selektiver, zellmembranpermeabler Inhibitor der Proteinkinase C und hemmt die Translokation der Proteinkinase C aus dem Zytosol in die Plasmamembran.

Der im Diabetes beobachtete, pathologisch verstärkte vasokontraktile Effekt von Phenylephrin war sowohl nach Inhibition der Proteinkinase C als auch bei Vehikelinkubierten Gefäßen auslösbar. Das bedeutet, dass die Hyperkontraktilität der Aorten von diabetischen Mäusen nicht mit einer gesteigerten Aktivität der Proteinkinase C erklärt werden kann.

5.5.3 Morphologische Veränderungen der Aorta

Die morphologische Analyse der Media-Dicke sollte Hinweise darauf geben, ob die Gefäße im Diabetes morphologische Veränderungen aufweisen, die zu einer Hyperkontraktilität beitragen könnten. Dabei zeigte sich, dass Aorten aus diabetischen Mäusen eine Hypertrophie der Media aufwiesen, die durch eine Zunahme der Media-Dicke um 12 % im Vergleich zu Kontrollaorten charakterisiert war. Das Auftreten einer vaskulären Hypertrophie wird sowohl im experimentellen diabetischen Rattenmodell [145 - 147] als auch im Krankheitsverlauf von Typ I-Diabetikern beschrieben [148]. Eine vaskuläre Hypertrophie wurde neben der Aorta auch in der Carotis und in Mesenterialarterien nachgewiesen. Eine kürzlich publizierte Untersuchung im Rahmen der EDIC-Studie (*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*) beschreibt z. B. eine über einen Zeitraum von 6 Jahren beobachtete Zunahme der Media-Dicke der Carotis bei Typ I-Diabetikern [149].

Die vaskuläre Hypertrophie ist assoziiert mit der Progredienz von makro- und mikrovaskulären diabetischen Komplikationen [150]. *Giannattasio et al.* konnten zeigen, dass Typ I-Diabetes durch eine Zunahme der arteriellen Gefäßwanddicke von Carotis und Aorta charakterisiert ist. Das Ausmaß dieser vaskulären Anomalie weist eine Relation zur Schwere des Krankheitsverlaufes, der Krankheitsdauer und dem Blutdruck auf [5, 148]. In klinischen Studien wurden die morphologischen Veränderungen der Gefäßwand bereits bei jungen Typ I-Diabetikern ohne Bluthochdruck und vaskuläre Komplikationen beobachtet. Somit kann die vaskuläre Hypertrophie als ein früher Nachweis eines diabetischen Gefäßschadens angesehen werden [148].

Die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Vasokontraktion im Diabetes, resultierend aus einer arteriellen Hypertrophie, wäre somit Ausdruck eines fortschreitenden Gefäßschadens und trägt vermutlich zur Ausprägung einer diabetischen Angiopathie bei. Zu bedenken bleibt allerdings, dass die Zunahme der Media-Dicke nur ca. 12 % betrug. Die rezeptorunabhängige Vasokontraktion, ausgelöst durch Kaliumchlorid, war im Diabetes um ca. 20% erhöht und korreliert mit der Zunahme der Media-Dicke. Daher wäre die beobachtete vaskuläre Hypertrophie im Diabetes eine Erklärung für die verstärkte vasokontraktile Potenz auf rezeptorunabhängige Agentien. Die Phenylephrin-induzierte Vasokontraktion war aber im Vergleich zur Vasokontraktion in Kontrollen - gemessen an der Maximalantwort - im Diabetes auf das Doppelte gesteigert. Das heißt, die beobachtete vaskuläre Hypertrophie im Diabetes ist nur eine unzureichende Erklärung für die durch adrenerge Stimulation ausgelöste Hyperreaktivität. Es bleibt daher zu vermuten, dass neben der Zunahme der Media-Dicke noch andere Faktoren zur arteriellen Hyperreaktivität im Diabetes beitragen.

5.5.4 Einfluss der NO/cGMP-Signaltransduktion auf die Vasokontraktion

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass die Entfernung des Endothels [83] bzw. die Inhibition der endothelialen NO-Synthase (eNOS) die vasokontraktile Potenz verstärken [84]. Diese Untersuchungen deuten auf die Rolle der NO-Synthese und der NO/cGMP-Signalkaskade bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus hin. Ziel dieser Untersuchung war es daher, den Einfluss von Diabetes auf die NO/cGMP-Signalkaskade und deren Bedeutung für die im Diabetes erhöhte Vasokontraktion zu untersuchen. Um die Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade zu analysieren, wurden funktionelle Studien unter Inhibition des Schlüsselenzyms der NO/cGMP-Signalkaskade, der eNOS, durchgeführt. Dazu wurden sowohl Versuche an Aorten aus Mäusen mit genetischer Deletion der eNOS (eNOS K.O.-Mäuse) als auch Versuche an Wildtyp-Mäusen nach enzymatischer Inhibition der eNOS untersucht.

Vasokontraktion nach genetischer Deletion der eNOS

Der Verlust der enzymatischen Aktivität der eNOS führte zu einer gesteigerten Vasokontraktibilität. Dieser Effekt war sowohl nach genetischer Deletion der eNOS als auch nach Applikation eines Enzyminhibitors nachweisbar. Die Vasokontraktion nach Applikation von Phenylephrin ist in normoglykämischen, homozygoten eNOS K.O.-Mäusen (eNOS^{-/-}-Mäuse) sowohl hinsichtlich der Maximalantwort als auch in Bezug auf die Sensitivität im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erhöht. Ein ähnliches Ergebnis wurde in funktionellen Studien zur Vasokontraktion von Aorten aus Wildtyp-Mäusen nach enzymatischer Inhibition der eNOS erhalten. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von *Kojda et al.*, wo eine Hypersensitivität von eNOS K.O.-Mäusen gegenüber dem vasokontraktilen Effekt von Phenylephrin und Serotonin beschrieben ist. Es konnte von *Kojda et al.* außerdem gezeigt werden, dass diese Hyperkontraktibilität nicht auf einer längerfristigen Adaption der Gefäßreaktivität nach Disruption des eNOS-Gens basiert, sondern ebenso nach enzymatischer Inhibition der eNOS durch Inkubation isolierter Aorten von Wildtyp-Mäusen mit L-Nitroarginin ausgelöst werden kann [78].

Ähnlich wie in den Versuchsmodellen mit Verlust der enzymatischen eNOS-Aktivität zeigte sich im Diabetes eine verstärkte Vasokontraktion. Da die vasokontraktilen Effekte im Diabetes und nach Verlust der enzymatischen eNOS-Aktivität vergleichbar sind, lässt sich vermuten, dass auch im Diabetes eine gestörte NO-Regulation vorliegen kann, die eine Hyperreaktivität auf vasokontraktile Agentien verursacht.

Im Unterschied zu diabetischen Wildtyp- und heterozygoten eNOS K.O.-Mäusen konnte bei homozygoten eNOS K.O.-Mäusen keine Verstärkung der Maximalantwort auf Phenylephrin im Diabetes beobachtet werden. Bei Aortenringen aus diabetischen eNOS^{-/-} – Mäuse wurde lediglich eine erhöhte Sensitivität auf Phenylephrin nachgewiesen. Ebenso war bei diabetischen eNOS^{-/-}-Mäusen im Gegensatz zu diabetischen Wildtyp-Mäusen keine erhöhte vasokontraktile Reaktivität der Aorta auf den rezeptorunabhängig wirkenden Vasokonstriktor Kaliumchlorid festzustellen. Das würde bedeuten, dass in diesem Modell die NO-abhängigen Ressourcen durch die Deletion des eNOS-Gens bereits völlig erschöpft sind und durch die diabetische Stoffwechsellage nicht weiter beeinträchtigt wird.

Vasokontraktion nach enzymatischer Inhibition der NO-Synthase mit L-NMMA

Um die Hypothese einer Beteiligung des NO/cGMP-Signalweges an dem Effekt der Hyperkontraktilität zu prüfen, wurde zusätzlich *in vitro* die Auswirkung einer reversiblen kurzfristigen Hemmung der NO-Synthase auf die Vasokontraktion untersucht. Dazu wurde die NO-Synthase mit N- ω -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) in Aortenringen von Wildtyp-Mäusen vor der Durchführung der funktionellen Studien blockiert. L-NMMA ist als ein Strukturanalogon von L-Arginin ein selektiver Inhibitor der NO-Synthase. Die enzymatische NO-Blockade mit Arginin-Analoga diskriminiert allerdings nicht zwischen den Isoformen der NO-Synthase (eNOS, iNOS und nNOS) [84, 151].

Die L-NMMA-Inkubation führte bei Aorten aus diabetischen Mäusen wie auch bei normoglykämischen Kontrollen zu einer signifikanten Verstärkung der Vasokontraktion. Es war bei Aorten aus diabetischen Wildtyp-Mäusen zusätzlich zu der Diabetes-induzierten Hyperkontraktilität aber nur eine geringfügige additive Verstärkung der Vasokontraktion durch Hemmung der NO-Synthase zu beobachten. Dies wurde durch die AUC-Werte (*area under the curve*) deutlich. Während bei Kontrollmäusen die Fläche unter der Dosis-Wirkungskurve durch die Inkubation mit L-NMMA nahezu verdreifacht war, betrug die Flächenzunahme durch L-NMMA-Inkubation bei diabetischen Aorten nur ca. 50 %.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die diabetische Stoffwechsellage nicht zu einer vollständigen Funktionsbeeinträchtigung der NO-Synthase führte. Erstens war die NO-Synthase mit L-NMMA inhibierbar, sichtbar an einer Zunahme der Vasokontraktion unter L-NMMA-Inkubation, und zweitens ist eine vollständige NO-verminderte endothelabhängige Vasorelaxation auf Acetylcholin nachweisbar. Möglich ist aber auch eine partielle Beeinträchtigung der NO/cGMP-Signalkaskade im Diabetes. Die diabetische Stoffwechsellage führt demnach ähnlich bei wie Aorten von eNOS^{-/-} – Mäusen bzw. bei Aorten von normoglykämischen Mäusen nach enzymatischer Hemmung der NO-Synthase zu einer Hyperreaktivität infolge einer Phenylephrin-Applikation. Eine partielle Beeinträchtigung des NO/cGMP-Signalweges würde bedeuten, dass in diesem Diabetesmodell noch eine „Restaktivität“ der NO-Synthase erhalten bleibt. Erst durch Zugabe des NO-Synthase-Inhibitors L-NMMA würden auch die übrigen NO-vermittelten Reaktionen gehemmt.

Ausgehend von dieser Hypothese wäre dann eine Versuchsanordnung, in der die eNOS-Aktivität im Diabetes gehemmt würde, vergleichbar mit der Situation in homozygoten eNOS K.O.-Mäusen, bei denen eine vollständige eNOS-Deletion vorliegt. In dieser Arbeit wurde aber gezeigt, dass die Vasokontraktion auf Phenylephrin in eNOS^{-/-} – Mäusen deutlich stärker ausgeprägt ist als in diabetischen Mäusen nach Hemmung mit L-NMMA. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass sowohl die Deletion der eNOS in eNOS^{-/-} – Mäusen als auch die enzymatische Hemmung der NO-Synthase und die Diabetes-assoziierte Hyperkontraktilität vergleichbare physiologische Konsequenzen auf die Gefäßfunktion auslösen, aber differierende Ursachen haben. Demzufolge resultiert die Diabetes-induzierte Hyperreaktivität nicht unbedingt aus einer Störung des NO/cGMP-Signalweges, obwohl die funktionellen Konsequenzen einer Hemmung der NO-Synthase vergleichbar sind.

5.5.5 Veränderungen der RhoA/Rho-Kinase vermittelten Vasokontraktion

Vasokontraktion und Vasorelaxation glatter Muskelzellen werden hauptsächlich durch (De-) Phosphorylierungsreaktionen an den Positionen Threonin 18 und Serin 19 der 20 kDa-Untereinheit der leichten Ketten des Myosins (MLC₂₀) reguliert [152, 153]. Der Phosphorylierungsstatus von MLC₂₀ wird sowohl durch die Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK) als auch durch eine Myosin-gebundene, Serin/Threonin-spezifische Protein-Phosphatase (MBP) bestimmt [153, 154]. Die intrazelluläre Konzentration an Calciumionen reguliert die Aktivierung von MLCK bzw. MBP und das Ausmaß der entstehenden kontraktile Kraft. Die MLCK ist nur dann enzymatisch aktiv, wenn sie mit einem Calcium/Calmodulin-Komplex assoziiert ist [155]. Dieser Komplex wird nur in Anwesenheit freier Calciumionen im Zytosol gebildet. Einige Studien konnten nachweisen, dass eine Kontraktion glatter Muskelzellen aber auch calciumunabhängig in Abwesenheit von freien Calciumionen ausgelöst werden kann [156, 157]. Ein solcher calciumunabhängiger Mechanismus verläuft über die Inhibition der MBP und beinhaltet die Regulation durch das GTP-besetzte Protein RhoA (s. Abb. 5.02).

Der calciumabhängige Signalweg, durch den vasokontraktive Agonisten eine MLC₂₀-Aktivierung induzieren, wird durch Rezeptorkopplungen von Proteinen vermittelt, die Guanosintriphosphat (GTP) binden (G-Protein). Die Bindung des Agonisten an den membranären, heptahelikalen Rezeptor aktiviert ein heterotrimeres G-Protein der G_q-Familie. Heterotrimere G-Proteine enthalten eine α -Untereinheit, die nach der Bindung eines Agonisten an den Rezeptor von der inaktiven, GDP-besetzten Form in eine aktive, GTP-besetzte Form überführt wird. Dies führt über die Aktivierung der β -Isoform der Phospholipase C und Formation von Inositol-1,4,5-triphosphat zu einem Anstieg der freien zytosolischen Calciumionen-Konzentration. Freie Calciumionen können nach Bindung an Calmodulin über eine weitere enzymatische Reaktionskette eine glattmuskuläre Kontraktion auslösen.

Der calciumunabhängige Signalweg führt über die Stimulierung einer RhoA-assoziierten Kinase (Rho-Kinase) zu einer Inhibition von MBP, was in einer Phosphorylierung von MLC₂₀ resultiert. Dieser RhoA/Rho-Kinase-Signalweg ist entscheidend für die calciumunabhängige Regulation der Kontraktion glatter Muskelzellen und trägt zur Calcium-Sensitivierung der Muskelzellen bei [158]. Die Familie der Rho-Proteine sind kleine G-Proteine, die unter anderem die drei Isoformen RhoA, B und C umfasst. RhoA ist diejenige Rho-Isoform, die hauptsächlich exprimiert wird und ubiquitär lokalisiert ist [159, 160]. Kleine G-Proteine besitzen ebenso wie heterotrimere G-Proteine eine GTPase-Funktion, werden aber nicht durch eine Interaktion mit Agonist-gebundenen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aktiviert. Der GDP/GTP-Austausch wird bei kleinen G-Proteinen durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEF) vermittelt [161]. RhoA verfügt sowohl über die Fähigkeit, GTP zu binden, als auch über eine enzymatische Aktivität, dieses gebundene GTP zu GDP zu hydrolysieren [162]. Unter Basalbedingungen ist die GDP-besetzte Form von RhoA im Zytosol lokalisiert, wo sie an regulatorische Proteine wie *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDI) assoziiert ist, die den Nukleotidaustausch von GTP zu GDP verhindern. Diese inhibitorischen Proteine binden an den C-Terminus von RhoA, wodurch eine Extraktion aus der Zellmembran und die Hemmung des GTPase-Zyklus durch die Stabilisierung der inaktiven, GDP-gebundenen Form im Zytosol erreicht wird. Im Rahmen der RhoA-Aktivierung erfolgt eine Translokation des GTP-besetzten RhoA aus dem Zytosol in die Zellmembran [161]. Die Rho-Kinase, das Target des aktivierten RhoA-Proteins, phosphoryliert MBP.

Das MBP-Holoenzym besteht aus drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 20, 38 und 110/130 kDa. Die 38 kDa-Untereinheit ist eine Isoform der katalytischen Untereinheit der Protein-Phosphatase. Die beiden anderen Untereinheiten besitzen Domänen, die an Myosin binden und die katalytische Aktivität der Phosphatase regulieren. Die Phosphorylierung der 130 kDa-Untereinheit durch die Rho-Kinase führt zu einer Inhibition der Phosphatase-Aktivität, was zu einem Anstieg der MLC-Phosphorylierung und somit zur Vasokontraktion führt [154]. Die Rho-Kinase ist zudem an Vorgängen wie Zelladhäsion, Zellmigration und Aktin-Zytoskelett-Rearrangement beteiligt [161].

Veränderungen des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges im Diabetes

Der RhoA/Rho-Kinase-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Agonist-induzierten Ca^{2+} -Sensitivierung und Hyperkontraktibilität glatter Muskelzellen [85, 86]. Eine pathologische Vasokontraktibilität wird als einer der Gründe für das Auftreten von vaskulären Schäden im Verlauf von Bluthochdruck-Erkrankung diskutiert. In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Rho-Kinase-vermittelte Ca^{2+} -Sensitivierung zur vaskulären Pathophysiologie des Bluthochdruckes beiträgt [164]. So zeigten *Mukai et al.*, dass sowohl Expression als auch Aktivität der Rho-Kinase in hypertensiven Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht war. Zudem konnte in physiologischen Studien eine Beteiligung der Rho-Kinase an der vaskulären Hyperreaktivität der Gefäße bei Bluthochdruck im Rattenmodell bewiesen werden [165].

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Diabetes ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der RhoA/Rho-Kinase-Signaltransduktion führt, die bei der Phenylephrin-induzierten Hyperkontraktibilität von Aorten diabetischer Mäuse beteiligt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Einfluss von Diabetes auf die Translokation von RhoA ermittelt. Das inaktive, GDP-besetzte RhoA ist im Zytosol lokalisiert, während die aktive, GTP-besetzte Form in der Zellmembran vorkommt. Durch Western Blot-Analysen der zytosolischen Fraktion und der Membranfraktion aus Gewebe von diabetischen Mäusen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen sollte festgestellt werden, ob der Aktivitätsstatus von RhoA im Diabetes verändert ist. Der zytosolische RhoA-Gehalt war sowohl in Aorten als auch in Herzen diabetischer Mäuse im Vergleich zu Kontrollen signifikant verringert. Entsprechend konnte eine Zunahme der RhoA-Expression in der Herz-Membranfraktion diabetischer Tiere festgestellt werden. Das bedeutet, dass im Diabetes eine verstärkte RhoA-Aktivierung stattfindet.

Es ist bereits bekannt, dass Insulin die Kontraktion glatter Muskelzellen inhibiert und eine Vasorelaxation induziert [166]. Es gibt ebenso Hinweise, dass die calciumunabhängige RhoA/Rho-Kinase-vermittelte Signaltransduktion durch Insulin moduliert wird [163]. In glatten Rattenmuskelzellen konnte von *Sandu et al.* und *Begum et al.* bereits gezeigt werden, dass Insulin über zwei verschiedene Interaktionspunkte innerhalb des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges eine MBP-Aktivierung auslösen kann, entweder durch Inaktivierung der Rho-Kinase oder durch Stimulation des NO/cGMP-Signalweges [134, 163]. Durch eine Inaktivierung der Rho-Kinase wird die Phosphorylierung von MBP verhindert. Die Folge ist eine MBP-Aktivierung, die in einer Vasorelaxation der glatten Muskelzellen resultiert. Insulin führt außerdem über einen Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphat-Kinase-vermittelten Prozess zu einer Stimulierung des NO/cGMP-Signalweges. NO und cGMP interagieren mit MBP sowie der Rho-Kinase und verursachen durch eine MBP-Aktivierung ebenfalls eine Vasorelaxation.

Sandu et al. beschrieben eine Aufhebung der Insulin-induzierten negativen Regulation des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges in einem hyperglykämischen Tiermodell mit Insulinresistenz. Der relative Insulinmangel bei Diabetes verringert die Insulin-induzierte Aktivierung von MBP. Durch eine ungehemmte Rho-Kinase-Aktivität wird MBP durch eine Phosphorylierung inaktiviert, die in einer verstärkten MLC₂₀-Aktivierung resultiert. Die Insulin-vermittelte Vasorelaxation wird damit gehemmt [163]. Eine Myosin-Phosphorylierung infolge des bei Diabetes auftretenden Insulinmangels könnte auch die Erklärung für die in dieser Arbeit bei Aorten aus STZ-diabetischen Mäusen beobachtete Hyperreaktivität sein. Die Reaktivität vasoaktiver Agonisten (z.B. Phenylephrin) würde verstärkt, da die erhöhte Aktivität des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges zu einer Ca²⁺-Sensitivierung der glatten Muskelzellen führt.

Somit resultiert die im Rahmen dieser Arbeit im Diabetes beobachtete vasokontraktile Hyperreaktivität möglicherweise aus einer erhöhten Aktivität des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges aufgrund des bestehenden Insulinmangels. Die Folge ist eine Calcium-Sensitivierung der glatten Muskelzellen, die die Reaktivität vasokontraktiler Agonisten additiv verstärkt.

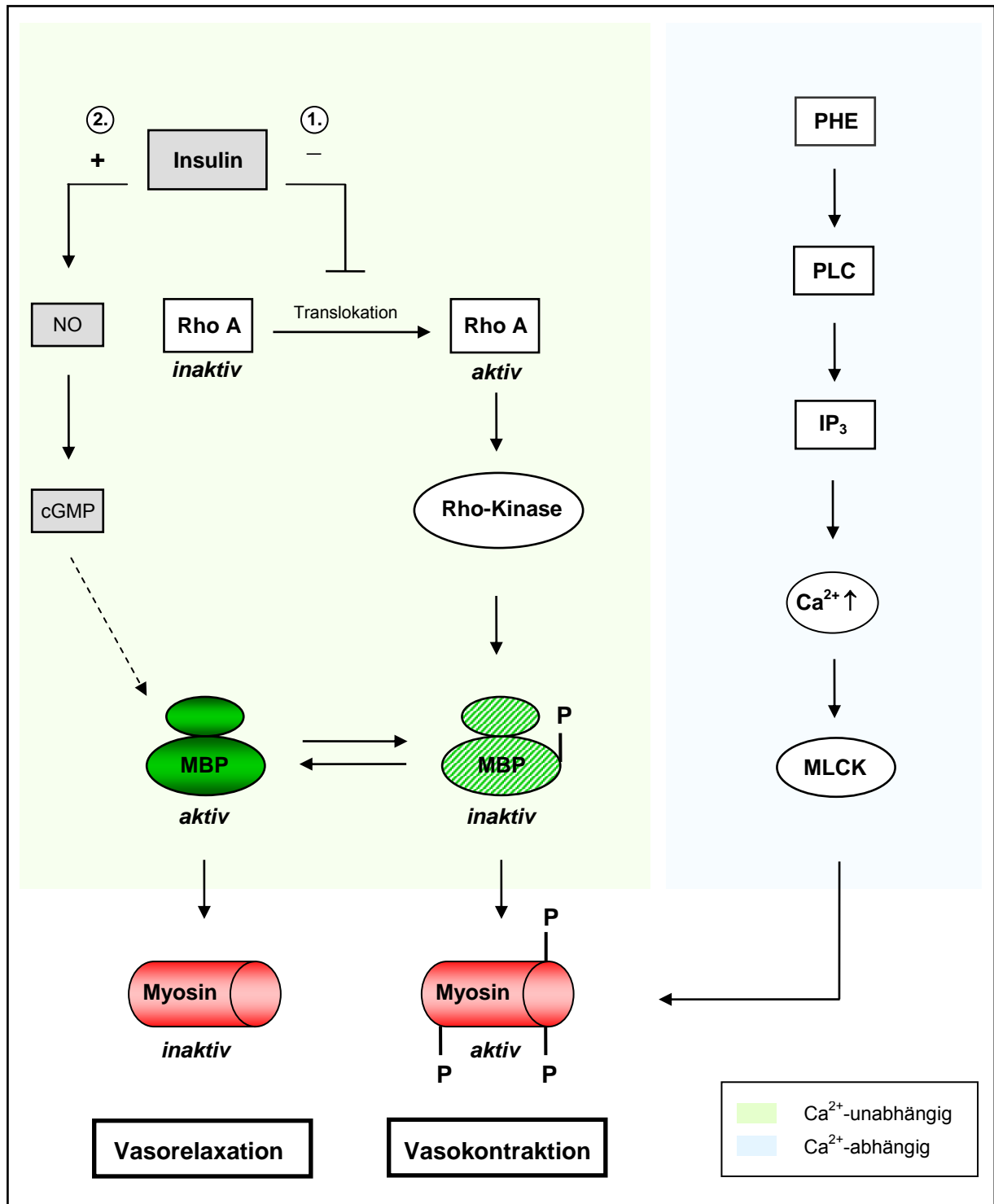


Abb. 5.02 Schematische Darstellung der Regulation des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges
 Insulin induziert über zwei Interaktionspunkte innerhalb des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges eine MBP-Aktivierung und damit eine Vasorelaxation: 1.) Inaktivierung der Rho-Kinase durch Hemmung der RhoA-Translokation; 2.) Stimulation des NO/cGMP-Signalweges. Der Insulinmangel bei Diabetes verringert die Insulin-induzierte Aktivierung des MBP. Die Folge ist eine Calcium-Sensitivierung der glatten Muskelzellen, die die Reaktivität vasokontraktiver Agonisten (z.B. Phenylephrin) additiv verstärkt. NO (Stickstoffmonoxid), cGMP (zyklisches Guanosin-3,5-monophosphat), MBP (myosin bound protein phosphatase), PHE (Phenylephrin), PLC (Phospholipase C), MLCK (myosin light chain kinase) – modifiziert nach Sandu et al. [163] –

6 ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass bei einer diabetischen Vaskulopathie schon in frühen Stadien der Diabetes-Erkrankung Veränderungen der Gefäßreaktivität auftreten, die durch eine endotheliale Dysfunktion charakterisiert sind. Die genauen Ursachen und der Pathomechanismus sind Gegenstand der Untersuchung. Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, den Einfluss von experimentellem STZ-Diabetes im Tiermodell auf die vaskuläre Reaktivität insbesondere im Hinblick auf pathologische Veränderungen der endothelabhängigen NO/cGMP-Signalkaskade zu untersuchen.

Die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung der vasokontraktilen und vasorelaxierenden Funktion im Diabetes zeigten deutliche Unterschiede in der vasokontraktilen Potenz im Vergleich zu Kontrolltieren, während die funktionelle Physiologie der Vasorelaxation bei STZ-diabetischen Mäusen erhalten blieb. Die Induktion des Diabetes führte bei Mäusen unabhängig vom auslösenden vasoaktiven Agens zu einer vasokontraktilen Hyperreaktivität. Die Ursachen für diese verstärkte Vasokontraktion sind komplexer Natur. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine gesteigerte Aktivierung des RhoA/Rho-Kinase-Signalweges in Aortengewebe nachgewiesen. Außerdem konnte durch eine morphologische Analyse der Aorten eine Media-Hypertrophie bei diabetischen Mäusen beobachtet werden. Beide Befunde sind möglicherweise ursächlich für die im Diabetes beobachtete vasokontraktile Hyperreaktivität. Eine endotheliale Dysfunktion im Sinne einer eingeschränkten NO-vermittelten endothelabhängigen Vasorelaxation, die ausschließlich durch die hyperglykämische Stoffwechsellage verursacht war, konnte in keinem der untersuchten STZ-diabetischen Tiermodelle nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion im Diabetes ein multifaktorielles Geschehen darstellt und neben der Hyperglykämie zusätzlich andere Faktoren beteiligt sein müssen.

Eine durch die diabetische Stoffwechsellage ausgelöste Beeinträchtigung des NO/cGMP-Signalweges wurde in diabetischen STZ-Ratten erst nach Hemmung des Enzyms Superoxiddismutase durch eine eingeschränkte Vasorelaxation nachgewiesen. Dies kann als Hinweis für das Auftreten von oxidativem Stress in Form von Sauerstoffradikalen im Diabetes gedeutet werden, da nach der Inhibition des antioxidativ wirksamen Enzyms Superoxiddismutase eine durch reaktive Sauerstoffverbindungen bedingte Inaktivierung des NO-Radikals demaskiert wurde.

Im Nierengewebe von STZ-diabetischen Ratten konnte durch den immunhistochemischen Nachweis von Nitrotyrosin ebenfalls das Auftreten von oxidativem Stress in Form reaktiver Sauerstoffverbindungen gezeigt werden. Diese Beobachtung stand im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression der katalytischen Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase (NOX-1). Als eine mögliche Quelle von Diabetes-assoziiertem, oxidativem Stress in der Niere wurde daher die erhöhte Expression der katalytischen Untereinheit der vaskulären der NAD(P)H-Oxidase angenommen.

Diabetes-bedingte Modulationen der NO/cGMP-Signalkaskade zeigten sich im STZ-Rattenmodell in makro- (Aorta) und in mikrovaskulären Geweben (Herz und Niere) auf Proteinebene. In allen untersuchten Geweben ließ sich eine erhöhte Expression der eNOS und der Effektorproteine VASP und p-VASP nachweisen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass im Krankheitsverlauf des Diabetes einzelne Proteine der NO/cGMP-Signalkaskade hochreguliert werden, um pathologische Veränderungen als Folge von Diabetes-bedingtem, oxidativem Stress auszugleichen, damit physiologische Funktionen erhalten bleiben.

7 LITERATUR

- [1] **Mehnert H.**, Standl E., Usadel K.-H. Diabetologie in Klinik und Praxis. *Thieme Verlag, Stuttgart*, 4. Aufl., 1998
- [2] The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive treatment on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 14: 977-986, 1993
- [3] UK prospektive diabetes study (UKPDS) group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet*, 352: 837-853, 1998
- [4] **Nathan D.M.** Long-term complications of Diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 328: 1676-1685, 1993
- [5] **Giannattasio C.**, Failla M., Grappiolo A., Gamba P., Paleari F., Mancina G. Early impairment of large artery structure and function in Type I diabetes mellitus. *Diabetologia*, 42: 987-994, 1999
- [6] **Weidmann P.**, Beretta-Picoli C., Keusch G., Gluck Z., Mujagic M., Grimm M., Meier A., Zeigler W.H. Sodium-volume factor, cardiovascular reactivity and hypertensive mechanism of diuretic therapy in mild hypertension associated with diabetes mellitus. *Am. J. Med.*, 67: 779-784, 1979
- [7] **Sowers J.R.**, Epstein M., Frohlich E.D. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease, an update. *Hypertension*, 37: 1053-1059, 2001
- [8] **Calles-Escandon J.**, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocrine Reviews*, 22 (1): 36-52, 2001
- [9] **Arnal J.-F.**, Dinh-Xuan A.-T., Pueyo M., Darblade B., Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55: 1078-1087, 1999
- [10] **Town M.H.**, Schillinger E., Speckenbach A., Prior G. Identification and characterisation of a prostacyclin-linke receptor in bovine coronary arteries using a specific and stable prostacyclin analog, ciloprost, as a radioactive ligand. *Prostaglandins*, 24: 61-72, 1982
- [11] **Vapaatalo H.**, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med. Sci. Mon.*, 7 (5): 1075-1085, 2001
- [12] **Cowan D.B.**, Langille B.L. Cellular and molecular remodeling. *Curr. Opin. Lipidol.*, 7: 94-100, 1996
- [13] **Vriese de A.S.**, Verbeuren T.J., Voorde de J., Lameire N.H., Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.*, 130: 963-974, 2000
- [14] **Pieper G.M.** Review of Alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes. *Hypertension*, 31: 1047-1060, 1998
- [15] **Cohen R.A.** Dysfunction of vascular endothelium in diabetes. *Circulation*, 87 (V): V67-V76, 1993
- [16] **Harrison D.G.** Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* 100 (9): 2153-2157, 1997
- [17] **Cohen R.A.** The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 38: 05-128, 1995
- [18] **Kario K.**, Matsuo T., Kobayashi H., Matsuro M., Sakata T., Miyata T. Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15: 1114-1120, 1995
- [19] **Antonetti D.A.**, Barber A.J., Khin S., Lieth E., Tarbel J.M., Gardner T.W. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial growth factor decreases occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. *Diabetes*, 47: 1953-1959, 1998
- [20] **Campanini M.**, Airoidi G., Cusinato S., Ballare M., Monteverde A. Arterial blood pressure as a factor in endothelial permeability. *J. Hypertens.*, Suppl., 9: S200-S201, 1991
- [21] **Rao G.H.**, Krishnamurthi S., Raj L., White J.G. Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 43: 271-275, 1990

- [22] **Kubes P.**, Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4651-4655, 1991
- [23] **Nathan C.**, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78: 915-918, 1994
- [24] **Scott-Burden T.**, Vanhoutte P.M. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*, 87 Suppl. 5: V51-V55, 1993
- [25] **Balla G et al.** Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem.*, 267: 18148-18153, 1992
- [26] **Recacati S.**, Taramelli D., Conte D., Cairo G. Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophages by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 downregulation. *Blood*, 91: 1059-1066, 1998
- [27] **Palmer R.M.J.**, Ashton D.S., Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-666, 1988
- [28] **Bredt D.S.**, Snyder S.H. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 682-685, 1990
- [29] **Pfeiffer S.**, Mayer B., Hemmens B. Nitric oxide: chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38: 1714-1731, 1999
- [30] **Raman C.S.**, Li H., Martasek P., Kral V., Masters S., Poulos T.L. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*, 95: 939-950, 1998
- [31] **Matsubara M.**, Titani K., Taniguchi H. Interaction of calmodulin-binding domain peptides of nitric oxide synthase with membrane phospholipids: regulation by phosphorylation and Ca²⁺ calmodulin. *Biochemistry*, 35: 14651-14658, 1998
- [32] **Hacker A.** Endothelprotektive Eigenschaften von NO-Donatoren bei experimentell ausgelöster Atherosklerose, *Dissertationsschrift*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1999
- [33] **Cho H.J.**, Xie Q.W., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Nathan. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.*, 176: 599-604, 1992
- [34] **Butterfly L.D.**, Springall D.R., Chester A.H., Evans T.J., Standfield E.N., Parums M.H., Yacoub M.H., Polak J.M. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab. Invest.*, 75: 77-85, 1996
- [35] **Wei C.**, Jiang S., Lust J.A., Daly R.C., McGregor C.G. Genetic expression of endothelial nitric oxide synthase in human atrial myocardium. *Mayo Clin. Proc.*, 71: 346-350, 1996
- [36] **Wu K.K.** Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. *J. Formos. Med. Assoc.*, 95: 661-666, 1996
- [37] **Furchgott R.F.**, Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980
- [38] **Ignarro L.J.**, Buga G.M., Wood K.S., Chaudhuri G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9265-9269, 1987
- [39] **Simmerman H.**, Jones L. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol. Rev.*, 78: 921-947, 1998
- [40] **Cohen A.R.**, Weisbrod R.M., Gericke M., Yaghoubi M., Bierl C., Bolotina V.M. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation. *Circ. Res.*, 84: 210-219, 1999
- [41] **Schlossmann J. et al.** Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I-β. *Nature*, 404: 197-201, 2000
- [42] **Robertson B.E.**, Schubert R., Hescheler J., Nelson M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 265: C299-C303, 1993
- [43] **Bolotina V.M.**, Najibi S., Palacino J.J., Pagano P.J., Cohen R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368: 850-853, 1994

- [44] **Oelze M.**, Mollnau H., Hoffmann N., Warnholtz A., Bodenschatz M., Smolenski A., Walter U., Skatchkov M., Meinertz T., Münzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ. Res.*, 87: 999-1005, 2000
- [45] **Rösen P.**, Nawroth P.P., King G., Möller W., Tritschler H.-J., Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a congress series sponsored by UNESCO-MCBN, the american diabetes association and the german diabetes society. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 17: 189-212, 2001
- [46] **West I.C.** Radicals and oxidative stress. *Diabet. Med.*, 17: 171-180, 2000
- [47] **Lauer N.**, Harrison D.G., Kojda G. *Med. Monatsschr. Pharm.*, 22: 382-387, 1999
- [48] **Paravicini T.M.**, Gulluyan L.M., Dusting G.J., Drummond G.R. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ. Res.*, 91: 54-61, 2002
- [49] **Hink U. et al.** Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.*, 88: e14-e22, 2001
- [50] **Soriano F.G.**, Virag L., Szabo C. Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose)polymerase activation. *J. Mol. Med.*, 79: 437-448, 2001
- [51] **Dimmeler S.**, Hermann C., Zeiher A.M. Apoptosis of endothelial cells: contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur. Cytokine Netw.*, 9: 697-698, 1998
- [52] **Lo S.K.**, Jynakidevi K., Lai L., Malik A.B. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am. J. Physiol.*, 264: L406-L412, 1993
- [53] **Griendling K.K.**, Ushio-Fukai M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J. Lab. Clin. Med.*, 132: 9-15, 1998
- [54] **Lee H.S.**, Son S.M., Kim Y.K., Kim C.D. NAD(P)H-Oxidase participates in the signaling events in high glucose-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Life Sci.*, 72 (24): 2719-2730, 2003
- [55] **Lynch S.M.**, Frei B. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, 34: 1745-1753, 1993
- [56] **Kojda G.**, Harrison D.G. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.*, 43: 562-571, 1999
- [57] **Griendling K.K.**, Sorescu D., Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.*, 86: 494-501, 2000
- [58] **Cai H.**, Harrison D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.*, 87: 840-844, 2000
- [59] **Kamoi K.**, Ishibashi M., Yamaji T. Thirst and plasma levels of vasopressin, Angiotensin II and atrial natriuretic peptide in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diab. Res. Clin. Pract.*, 11: 195-202, 1991
- [60] **Ferris J.B.**, O'Hare J.A., Kelleher C.C.M., Sullivan P.A., Cole M., Ross H.F., O'Sullivan D.J. Diabetic control and the renin-angiotensin-system, catecholamines and blood pressure. *Hypertension*, 7 (2), II-58 – II-63, 1998
- [61] **Stuehr D.**, Pou S., Rosen G.M. Oxygen reduction by nitric oxidase synthases. *J. Biol. Chem.*, 276: 14533-14536, 2001
- [62] **Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-820, 2001
- [63] **Nishikawa T. et al.** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404: 787-790, 2000
- [64] **Yorek MA.** The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. *Free Radic. Res.*, 37(5): 471-480, 2003

- [65] **Inoguchi T.**, Li P., Umedo F., Yu H., Kakimoto M., Imamura M. et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H Oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 48: 1939-1945, 2000
- [66] **Federici M. et al.** Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation*, 106: 466-472: 2002
- [67] **Huang P.L.**, Huang Z., Mashimo H., Bloch K.D., Moskowitz M.A., Bevan J.A., Fishman M.C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 377: 239-242, 1995
- [68] **Kojda G.**, Cheng Y.C., Burchfield J., Harrison D.G. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation*, 103: 2839-2844, 2001
- [69] **Carlsson P.**, Flodstrom M., Sandler S. Islet blood flow in multiple low dose streptozotocin-treated wild-type and inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Endocrinology*, 141: 2752-2757, 2000
- [70] **Soriano F.G.**, Virag L., Jagtap P., Szabo E., Mabley J., Liaudet L., Marton A., Hoyt D.G., Murthy K.G.K., Salzman A.L., Southan G.J., Szabo C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose)polymerase activation. *Nature Medicine*, 7:108-113, 2001
- [71] **Rösen P.**, Rösen R., Hohl C., Reinauer H., Klaus W. Reduced transcortical exchange and prostaglandin synthesis in diabetic rat heart. *Am. J. Physiol.*, 247: 563-560, 1984
- [72] **Lauer N.** Untersuchungen zur vaskulären Wirkung von Wasserstoffperoxid in vivo, *Dissertationsschrift*, H.H.-Universität Düsseldorf, *Cuvillier Verlag, Göttingen*, 1. Aufl., 2003
- [73] **Hanstede J.G.**, Gerrits P.O. The effects of embedding in water soluble plastics on the final dimensions of liver sections. *J. Microsc.*, 131, 79-86
- [74] **Richardson K.S.**, Jarett L., Finke E.H., Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain. Technol.*, 35, 313-323, 1960
- [75] **Bradford M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976
- [76] **Lowry O.H.**, Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951
- [77] **Laemmli U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (259), 680-685, 1970
- [78] **Kojda G.**, Laursen J., Ramasamy S., Kent J., Kurz S., Burchfield J., Shesley E., Harrison D.G. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc. Res.*, 42: 206-213, 1999
- [79] **Mutschler E.**, Arzneimittelwirkungen. *Wiss. Verl.-Gesell., Stuttgart*, 7. Aufl., 1996
- [80] **Bardell A.**, MacLeod K. Evidence for inducible Nitric-Oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 296 (2): 252-259, 2001
- [81] **Koya D.**, King G. Protein kinase C Activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47: 859-866, 1998
- [82] **Ungvari Z.**, Pacher P., Keckemeti V., Papp G., Szollar L., Koller A. Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle Ca²⁺ channels and protein kinase C. *Cardiovasc. Res.*, 43: 1018-1028, 1999
- [83] **Martin W.**, Furchgott R.F., Villani G.M., Jothianandan D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237: 529-538, 1986
- [84] **Rees D.D.**, Palmer R.M.J., Schulz R., Hodson H.F., Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 101: 746-752, 1990
- [85] **Mukai Y. et al.** Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease – a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB Journal*, 2001

- [86] **Somlyo A.P.**, Somlyo A.V. Signal transduction by G-proteins, Rho-Kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non muscle myosin II. *J. Physiol.*, 522: 177-185, 2000
- [87] **Rösen P.**, Ballhausen T., Stocklauser K. Impairment of endothelium dependent relaxation in the diabetic rat heart: mechanisms and implications. *Diab. Res. Clin. Pract.*, 31 Suppl., 143-155, 1996
- [88] **Kimberly L.**, Pitari G., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K., Waldman S. Guanylyl Cyclases and Signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.*, 52: 375-413, 2000
- [89] **Smolenski A.**, Bachmann C., Reinhard K., Höning-Liedl P., Jarchau T., Hoschuetzky H., Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation *in vitro* and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.*, 273: 20029-20035, 1995
- [90] **Wingler K.**, Wunsch S., Kreutz R., Rothermund L., Paul M., Schmidt H.H.H. Upregulation of the vascular NAD(P)H-Oxidase isoforms NOX-1 and NOX-4 by the renin-angiotensin system *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol.*, 31:1456-1464, 2001
- [91] **Fisarkova B.** 3-Nitrotyrosine - an indicator of changes in the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Cesk. Fysiol.*, 51 (4): 159-168, 2002
- [92] **Ceriello A.** Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *Int. J. Clin. Pract.*, Suppl., 129: 51-58, 2002
- [93] **Wiggans R.G.**, Wooley P.V., MacDonald J.S., Smythe T., Ueno W., Schein P.S. Phase II trial of Streptozotocin, mitomycin-c, and 5-fluorouracil (SMF) in treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer*, 41: 387-391, 1958
- [94] **Hiroshi Y.**, Uchigata Y., Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 294: 284-286, 1981
- [95] **Wilson G.L.**, Hartig P.C., Patton N.J., LeDoux S.P. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthase and cellular distribution. *Diabetes*, 37: 213-216, 1988
- [96] **Wilson G.L.**, Leiter E.H. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 156: 27-54, 1990
- [97] **Steiner H.**, Oelz O., Zalmd G., Froesch E.R. Studies on islet cell regulation and intramuscular cellular interactions in long lasting streptozotocin diabetes in rats. *Diabetologia*, 6: 558-564, 1970
- [98] **Junod A.**, Lambert A.E., Stauffacher W., Renold A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.*, 48: 2129-2139, 1969
- [99] **Tomlinson K.C.**, Gardiner S.M., Hebden R.A., Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the Cardiovascular system. *Pharmacological Reviews*, 44: 103-150, 1992
- [100] **Tam E.S.L.**, Ferguson D.G., Bielefeld D.R., Lorenz J.N., Cohen R.M., Pun R. Norepinehrine-mediated calcium signaling is altered in vascular smooth muscle of diabetic rat. *Cell. Calcium*, 21 (2): 143-150, 1997
- [101] **Diederich D.**, Skopec J., Diederich A., Dai F-X. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am. J. Physiol.*, 266: H1153-H1161, 1994
- [102] **Shen B.**, Ye C., Ye K., Liu J., Sun P., Jiang J. Mechanism underlying enhanced endothelium-dependent vasodilation in thoracic aorta of early stage streptozotocin-induced diabetic mice. *Acta Pharmacol. Sin.*, 24 (5): 422-428, 2003
- [103] **Maksimovic-Ivanic D.**, Trajkovic V., Milikovic D.J., Stojkovic M., Stosic-Grujicic S. Down-regulation of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes by mycophenolate mofetil. *Clin. Exp. Immuno.*, 129: 214-223, 2002
- [104] **Hellige G.**, Spiekermann P.G. Herz-Kreislauf Transparent: Informationen zum Theme Niere. *H. Hoffmann Verlag*, ISSN 1433-5824, 1997
- [105] **Soriano F.G.**, Pacher P., Mabley J., Liaudet L., Szabo C. Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. *Circ. Res.*, 89: 684-691, 2001

- [106] **Murray P.**, Pitt B., Webb R.C. Ramipril prevents hypersensitivity to phenylephrine in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 37: 664-670, 1994
- [107] **Chang K.S.K.**, Stevens W.C. Endothelium-dependent increase in vascular sensitivity to phenylephrine in long-term streptozotocin diabetic rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 983-990, 1992
- [108] **Cameron NE.**, Cotter MA. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia*, 35 (11):1011-1019, 1992
- [109] **van Hinsbergh V.** NO or H₂O₂ for endothelium-dependent vasorelaxation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 719-721, 2001
- [110] **Pacher P.**, Liaudet L., Soriano F.G., Mabley J., Szabo E., Szabo C. The role of poly(ADP-ribose)polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes*, 51: 514-521, 2003
- [111] **Szabo C. et al.** Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose)synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3867-3872, 1998
- [112] **Baynes J.W.**, Thorpe S.R. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes*, 48: 1-9, 1999
- [113] **Matés J.**, Pérez-Gómez C., Núñez de Castro I. Antioxidant Enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, 32 (8): 595-603, 1999
- [114] **Wambi-Kiéssé C.O.**, Katusic Z.S. Inhibition of copper/zinc superoxide dismutase impairs NO-mediated endothelium-dependent relaxations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 276: H1043-H1048, 1999
- [115] **Zanetti M.**, Sato J., Katusic Z., O'Brian T. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 280: H2516-H2523, 2001
- [116] **Cosentino F.**, Hishikawa K., Katusic Z.S., Lüscher T.F. High glucose increases nitric oxide synthase gene expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 96: 25-28, 1997
- [117] **Honing M.**, Morrison P., Banga J., Stroes E., Rabelink T. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.*, 14: 241-249, 1998
- [118] **Vásquez-Vivar J.**, Kalyanaraman B., Martásek P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., Tordo P., Pritchard K.A. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9220-9225, 1998
- [119] **Xia Y.**, Tsai A.L., Berka V., Zweier J.L. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase – A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J. Biol. Chem.*, 273: 25804-25808, 1998
- [120] **Shinozaki K.**, Nishio Y., Okamura T., Yoshida Y., Margawa H., Masada M., Toda M., Kikkawa R., Kashiwaga A. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in aortas of insulin-resistant rats. *Circ. Res.*, 87: 566-573, 2000
- [121] **Landmesser U.**, Dikalov S., Price S., McCann L., Fukai T., Holland S.M., Mitch W.E., Harrison D.G. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.*, 111: 1201-1209, 2003
- [122] **Zou M.**, Shi C., Cohen R.A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.*, 109: 817-826, 2002
- [123] **Raman C.S.**, Li H., Martasek P., Kral V., Masters B.S., Poulos T.L. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*, 95: 939-950, 1998
- [124] **Cosentino F.**, Katusic Z.S. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation*, 91: 139-144, 1995
- [125] **Cosentino F. et al.** Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 496-502, 2001
- [126] **Burke T.M.**, Wolin M.S. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am. J. Physiol.*, 252: H721-H732, 1987

- [127] **Matoba T. et al.** Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J. Clin. Invest.*, 106: 1521-1530, 2000
- [128] **Ibarra-Alvarado C.**, Galle J., Melichar V.O., Mameghani A., Schmidt H.H.H. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol. Pharmacol.*, 61: 312-319, 2002
- [129] **Sakurai T.**, Tsuchiya S. Superoxide production from non-enzymatically glycated protein. *FEBS Lett.*, 236: 404-410, 1998
- [130] **Schmidt A-M.**, Hori O., Brett J., Yan S.D., Wautier J.L., Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler. Throm.*, 14: 1521-1528, 1994
- [131] **Münzel T.**, Hink U., Heitzer T., Meinertz T. Role for NAD(P)H/NADH Oxidase in the modulation of vascular tone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 874: 386-400, 1999
- [132] **Lambeth J.D.**, Cheng G., Arnold R.S., Edens W.A. Novel homologs of gp91 $phox$. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 459-461, 2001
- [133] **Guzik T.**, Shafi M., Gastaldi D., Sadowski J., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K.M. Mechanisms of increased vascular superoxid production in human diabetes mellitus. Role of NAD(P)H-Oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 105: 1656-1662, 2002
- [134] **Begum N.**, Sandu O.A., Duddy N. Negative regulation of rho signaling by insulin and its impact on actin cytoskeleton organization in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*, 51: 2256-2263, 2002
- [135] **Onozato M.L.**, Tojo A., Goto A., Fuliata T., Wilcox C.S. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int.*, 61 (1): 186-194, 2002
- [136] **Ratz P.H.** Regulation of ERK phosphorylation in differentiated arterial muscle of rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 281 (1): H1 14-23, 2001
- [137] **Graham R.M.**, Perez D.M., Hwa J., Piascik M.T. α_1 -Adrenergic receptor subtypes: molecular structure, function and signaling. *Circ. Res.*, 78: 737-749, 1996
- [138] **Weber L.P.**, MacLeod K.M. Influence of streptozotocin diabetes on the alpha-1 adrenoceptor and associated G proteins in rat arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283: 1469-1478, 1997
- [139] **Bolton T.B.** Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 59: 606-718, 1979
- [140] **Neild T.O.**, Kotecha N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and potassium. *Circ. Res.*, 60: 791-795, 1987
- [141] **Daniel E.E.** Cellular calcium mobilization. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6 Suppl 4: S622-S629, 1984
- [142] **Idris I.**, Gray S., Donnelly R. Protein kinase C activation: isoenzyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*, 44: 659-673, 2001
- [143] **Karibe A.**, Watanabe J., Horiguchi S., Takeuchi M., Suzuki S., Funakoshi M., Katho H., Keithoku M., Satoh S., Shirato K. Role of cytosolic Ca^{2+} and protein kinase C in developing myogenic contraction in isolated rat small arteries. *Am. J. Physiol.*, 273, H1 165-172, 1997
- [144] **Abebe W.**, MacLeod K.M. Protein kinase C-mediated contractile responses of arteries from diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, 101, 465-471, 1990
- [145] **Rumble J.R.**, Cooper M.E., Soulis T., Cox A., Wu L., Youssef S., Jasik M., Jerums G., Gilbert R.E. Vascular Hypertrophy in Experimental Diabetes: Role of advanced glycation end products. *J. Clin. Invest.*, 99: 1016-1027, 1997
- [146] **Gilbert R.E.**, Rumble J.R., Cao Z., Cox A., van Eden P., Allen T.J., Kelly D.J., Cooper M.E. Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ. Res.*, 86: 158-165, 2000

- [147] **Jandeleit-Dahm K.**, Hannan K.M., Farrelly C.A., Allen T.J., Rumble J.R., Gilbert R.E., Cooper M.E., Little P.J. Diabetes-induced vascular hypertrophy is accompanied by activation of $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange and prevented by $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange inhibition. *Circ. Res.*, 87: 1133-1140, 2000
- [148] **Ciannattasio C.**, Failla M., Grappiolo A., Gamba P.L., Paleari F., Mancina G. Progression of large artery structural and functional alterations in Type I diabetes. *Diabetologia*, 44: 203-208, 2000
- [149] The diabetes control and complications trial / epidemiology of diabetes interventions and complications research group. Intensive therapie and carotid intima-media thickness in type I diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 348: 2294-2303, 2003
- [150] **Clark C.M.**, Lee A.D. Prevention and treatment of the complication of diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 332: 1210-1217, 1995
- [151] **Joly G.A.**, Ayres M., Chelly F., Kilbourn R. Effects of N-methy-L-arginine, N-nitro-L-arginine and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 199: 147-154, 1994
- [152] **Somlyo A.P.**, Somlyo A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372: 231-235, 1994
- [153] **Gohla A.**, Schultz G., Offermanns S. Role for G12/G13 in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ. Res.*, 87: 221-227, 2000
- [154] **Begum N.**, Duddy N., Sandu O., Reinzie J., Ragolia L. Regulation of myosin-bound phosphatase by insulin in vascular smooth muscle cells: evaluation of the role of rho kinase and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signaling pathways. *Mol. Endocrin.*, 14: 1365-1376, 2000
- [155] **Stryer L.**, Biochemie, *Spektrum-Verlag*, Heidelberg, 4. Auflg., 1995
- [156] **Himpens B.**, Kitazawa T., Somlyo A.P. Agonist-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. *Pflugers Arch.*, 417: 21-28, 1990
- [157] **Rembold C.M.** Modulation of the Ca^{2+} sensitivity of myosin phosphorylation in intact swine arterial smooth muscle. *J. Physiol.*, 429: 77-94, 1990
- [158] **Fukata Y.**, Amano M., Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22: 32-39, 2001
- [159] **Miao L.**, Calvert J.W., Tang J., Zhang J.H. Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. *Life Sciences*, 71: 1175-1185, 2002
- [160] **Narumiya S.** The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J. Biochem. (Tokyo)*, 120 (2): 215-228, 1996
- [161] **Seasholtz T.M.**, Majumdar M., Brown J.H. Rho as a mediator of G-Protein-coupled receptor signaling. *Mol. Pharmacol.*, 55 (6): 949-956, 1999
- [162] **Kimura et al.** Regulation of myosin phosphatase by rho and rho-associated kinase (Rho-Kinase). *Science*, 273: 245-248, 1993
- [163] **Sandu O.A.**, Ragolia L., Begum N. Diabetes in the Goto-Kakizaki rat is accompanied by impaired insulin-mediated myosin-bound-phosphatase activation and vascular smooth muscle cell relaxation. *Diabetes*, 49: 2178-2189, 2000
- [164] **Seko T. et al.** Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, 92: 411-418, 2003
- [165] **Uethata M.** et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 389: 990-994, 1997
- [166] **Hsueh W.A.**, Law R.E. Insulin signaling in the arterial wall. *Am. J. Cardiol.*, 84 (1A): 21J-24J, 1999

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A23187	Calciumionophor / Calcimycin
ACH	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
ACE	Angiotensin Conversions Enzym
AGE	<i>advanced glycosylated endproducts</i>
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BH ₂	Dihydrobiopterin
BLU	<i>Boehringer light units</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CAT	Katalase
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
DAB	3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
DTT	Dithiothreitol
EDHF	<i>endothelium derived hyperpolarization factor</i>
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminomethylether)-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eNOS K.O.-Maus	endotheliale NO-Synthase „ <i>knock out</i> “-Maus
eNOS ^{+/+} -Maus	Wildtyp-Maus
eNOS ^{+/-} -Maus	heterozygote eNOS K.O.-Maus
eNOS ^{-/-} -Maus	homozygote eNOS K.O.-Maus
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GPx	Glutathionperoxidase
ICAM	<i>intercellular adhaesion molecule</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGMP (G)-Kinase-Substrat
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
K.O.	„ <i>knock out</i> “
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
L-NMMA	N-ω-Monomethyl-L-arginin
L-NOARG	N-ω-Nitro-L-arginin
MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein</i> -Kinase
MBP	<i>myosin bound protein phosphatase</i>

MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n	Anzahl der Messwerte
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	saliner Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGF 2 α	Prostaglandin F 2 alpha
PHE	Phenylephrin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
SOD	Superoxiddismutase
STZ	Streptozotzin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
VASP	<i>vasodilator stimulated phosphoprotein</i>
pVASP	phosphoryliertes VASP
vs.	versus
WT	Wildtyp

Größen und Einheiten

bp	Basenpaare
° C	Celsius
h	Stunde
kDa	Kilo-Dalton
M	Molarität
min	Minute
N	Newton
V	Volt
s	Sekunde
T	Temperatur
w	Woche
v/v	Konzentrationsangabe: Volumen/Volumen
m/v	Konzentrationsangabe: Masse/Volumen

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.01	Aufbau der NO-Synthasen und Darstellung des Elektronenflusses.....	4
Abb. 1.02	Schematischer Ablauf der NO-Synthasereaktion.....	5
Abb. 1.03	NO/cGMP-Signaltransduktionsweg.....	7
Abb. 1.04	Oxidativer Stress und antioxidative Kapazität in Gefäßen.....	8
Abb. 1.05	Entstehung von Hyperglykämie-induziertem oxidativen Stress.....	11
Abb. 3.01	Aufbau der Organbadapparatur.....	21
Abb. 4.01	Blutglukose und Körpergewicht bei C57/Bl6-Mäusen.....	41
Abb. 4.02	Blutglukose und Körpergewicht bei eNOS K.O.-Mäusen.....	44
Abb. 4.03	Endothelabhängige Vasorelaxation.....	48
Abb. 4.04	Endothelabhängige Vasorelaxation in Abhängigkeit von der Diabetesdauer.....	49
Abb. 4.05	Vasorelaxation durch den NO-Donor SNAP.....	50
Abb. 4.06	Vasorelaxation durch Papaverin.....	51
Abb. 4.07	Vasokontraktion durch Phenylephrin.....	52
Abb. 4.08	Vasokontraktion durch Phenylephrin in Abhängigkeit von der Diabetesdauer.....	53
Abb. 4.09	Vasoreaktivität von BalbC-Mäusen.....	56
Abb. 4.10	ATP-Gehalt.....	57
Abb. 4.11	Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).....	58
Abb. 4.12	Expression des α_{1AC} -Rezeptors.....	60
Abb. 4.13	Rezeptorabhängige Vasokontraktion.....	61
Abb. 4.14	Vasokontraktion durch Kaliumchlorid.....	63
Abb. 4.15	Vasokontraktion durch Phenylephrin unter Hemmung der Proteinkinase C (PKC).....	64
Abb. 4.16	Bestimmung der Media-Dicke.....	65
Abb. 4.17	Genotypisierung der eNOS-K.O.-Mäuse.....	67
Abb. 4.18	Expression der endothelialen NO-Synthase in eNOS K.O.-Mäusen.....	68
Abb. 4.19	Endothelabhängige Vasorelaxation von eNOS K.O.-Mäusen.....	69
Abb. 4.20	Vasokontraktion von eNOS+/- – Mäusen.....	70
Abb. 4.21	Vasokontraktion durch Kaliumchlorid bei eNOS+/- – Mäusen.....	71
Abb. 4.22	Vasokontraktion von eNOS-/- – Mäusen.....	72
Abb. 4.23	Vasokontraktion durch Kaliumchlorid bei eNOS-/- – Mäusen.....	73
Abb. 4.24	Vasokontraktion auf Phenylephrin unter Hemmung der NOS.....	75
Abb. 4.25	Zytosol/Membran-Verteilung von RhoA.....	76
Abb. 4.26	Expression von RhoA in Aortengeweben.....	77
Abb. 4.27	Kompartimentverteilung von RhoA.....	78
Abb. 4.28	Endothelabhängige Relaxation nach Hemmung der SOD.....	81
Abb. 4.29	Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS).....	84
Abb. 4.30	eNOS-Expression in Aortengeweben nach 3 und 16 Wochen Diabetesdauer.....	85
Abb. 4.31	Expression der löslichen Guanylatzyklase (sGC).....	86
Abb. 4.32	Expression der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI).....	87
Abb. 4.33	Expression des <i>vasodilator stimulated phosphoprotein</i> (VASP).....	89
Abb. 4.34	Expression des phosphorylierten VASP.....	90
Abb. 4.35	Phosphorylierungsgrad von VASP.....	91
Abb. 4.36	VASP und p-VASP-Expression nach 3 und 16 Wochen Diabetesdauer.....	92
Abb. 4.37	Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit NOX-1.....	95
Abb. 4.38	Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit NOX-4.....	96
Abb. 4.39	Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin.....	98
Abb. 5.01	Signalweg der PARP-abhängigen diabetischen Vaskulopathie.....	106
Abb. 5.02	Schematische Darstellung der negativen Regulation des RhoA/Rho-Kinase Signalweges.....	126

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.01	Reaktionsschema der PCR zur Genotypisierung.....	17
Tab. 3.02	Zusammensetzung des Puffers zur Gewebelysis in Abhängigkeit von der Gewebemenge.....	27
Tab. 4.01	Organgewichte.....	42
Tab. 4.02	Prozentuales Körpergewicht bei STZ-diabetischen eNOS K.O.-Mäusen.....	45
Tab. 4.03	Morphologische und biochemische Parameter des STZ-Diabetes bei Wistar-Ratten.....	46
Tab. 4.04	Vasokontraktion durch Phenylephrin.....	52
Tab. 4.05	Vergleich der Versuchsparameter von <i>Soriano et al.</i> [20] und den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Versuchsbedingungen.....	54
Tab. 4.06	Blutglukose.....	55
Tab. 4.07	Einfluss von Diabetes auf die rezeptorabhängige Vasokontraktion.....	62
Tab. 4.08	Einfluss von Diabetes auf die Vasokontraktion bei eNOS+/- -Mäusen.....	70
Tab. 4.09	Einfluss von Diabetes auf die Vasokontraktion bei eNOS-/- -Mäusen.....	72
Tab. 4.10	Einfluss der NOS-Hemmung auf die Vasokotraktion.....	75
Tab. 4.11	Zusammenfassung der funktionellen Daten zur Vasoreaktivität im Diabetes.....	79
Tab. 4.12	Einfluss der SOD-Hemmung auf die endothelabhängige Vasorelaxation.....	81
Tab. 4.13	Hemmwirkung von DETC.....	82
Tab. 4.14	Zusammenfassung der Ergebnisse der expressionsuntersuchungen.....	93

8.4 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Schmidt K., Andrew P., Schrammel A., Groschner K., **Schmitz V.**, Kojda G., Mayer B. Comparison of neuronal and endothelial isoforms of nitric oxide synthase in stably transfected HEK 293 cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 281: H2053-H2061, 2001

Laber U., Kober T., **Schmitz V.**, Schrammel A., Meyer W., Mayer B., Weber M., Kojda G. Effect of hypercholesterolemia on expression and function of vascular soluble guanylyl cyclase. *Circulation*, 105: 855-860, 2002

Übersichtsartikel

Schmitz V. Insuline – Goldstandard in der Therapie des Diabetes mellitus. *Apotheken Magazin*, Jahrg. 20: 8-16, Juli/August 2002

Abstrakta (chronologisch)

Schmitz V., Kojda G., Rösen P. The effect of diabetes on vascular reactivity in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 363 Suppl. (4): R50 (185), 2001

Schmitz V., Kojda G., Rösen P. Diabetes induces a derangement of vascular responses to adrenergic stimulation in mice. *Circulation*, 104 (17) Suppl. (II): II-740 (3493), 2001

Schmitz V., Kojda G., Rösen P. Changes of vascular reactivity to adrenergic stimulation in diabetes. VII. NO-Forum, Magdeburg, 2001

Fräßdorf J., Müllenheim J., **Schmitz V.**, Kojda G., Schlack W. Morphine causes activation of NF- κ B in rats: a possible mechanism of opioid induced cardioprotection. *Eur. J. Anaest.*, 19 Suppl. (24): A-195 (50), 2002

Schmitz V., Rösen P., Kojda G. Increased vasoconstrictile response to adrenergic stimulation in diabetic mice. Role of eNOS. Annual spring meeting of the working group on cardiac rehabilitation and exercise physiology of the european society of cardiology, (MP-12), Leipzig, 2002

Müller S., **Schmitz V.**, Kojda G. Protection of endothelial function in atherosclerosis by the NO-Donor ISMN. Annual spring meeting of the working group on cardiac rehabilitation and exercise physiology of the european society of cardiology, (P-12), Leipzig, 2002

Schmitz V., Kojda G., Rösen P. Long-term hyperglycemia potentiates alpha-adrenergic vasoconstriction in mice. Workshop Gefäßbiologie und vaskuläre Medizin, Reisenburg, 2002

Schmitz V., Kojda G., Rösen P. Potentiation of alpha-adrenergic vasoconstriction by hyperglycemia in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 367 Suppl. (I): R28 (97), 2003

Schmitz V., Bellin C., Kojda G., Schmidt H., Rösen P. Einfluss von Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität in Ratten. DPHG-Doktorandentagung P33, Düsseldorf, 2003

Bellin C., **Schmitz V.**, Rösen P. Expression und Regulation der extrazellulären Superoxiddismutase in Diabetes mellitus, DPHG-Doktorandentagung P32, Düsseldorf, 2003

Schmitz V., Bellin C., Schmidt H., Rösen P. Diabetes induziert eine Up-Regulation der VASP-Proteine im Streptozotocin-Diabetes. *Diabetes und Stoffwechsel*, 12 Suppl. (1): 7 (V17), 2003

Bellin C., **Schmitz V.**, Rösen P. Die Expression der extrazellulären Superoxiddismutase in Herz und Niere von STZ-diabetischen Ratten. *Diabetes und Stoffwechsel*, 12 Suppl. (1): 8 (V19), 2003