

**Zelluläre antioxidative Effekte des
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-
Reduktase-Inhibitors Atorvastatin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Kirsten Müller
aus Ahaus

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Nickenig
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Armin Welz

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.04.2008

Aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	5
1.1	Atherosklerose und endotheliale Dysfunktion	5
1.1.1	Atherosklerose	5
1.1.2	Endotheliale Dysfunktion	7
1.2	Oxidativer Stress	8
1.2.1	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	9
1.2.2	Die NAD(P)H-Oxidase	10
1.2.3	Elimination reaktiver Sauerstoffspezies	12
1.3	Das Renin-Angiotensin-System	13
1.4	HMG-CoA-Reduktasehemmer	16
1.5	Fragestellung der Arbeit	20
2.	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Puffer und Lösungen	23
2.2	Methoden	25
2.2.1	Zellkultur	25
2.2.1.1	Isolierung	25
2.2.1.2	Immunhistochemische Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen	25
2.2.1.3	Kulturbedingungen	26
2.2.2	Tiermodell	27
2.2.2.1	Aortenring-Präparation und Organbadexperimente	27
2.2.3	Messung reaktiver Sauerstoffspezies	28
2.2.3.1	DCF-Fluoreszenzmessung	28
2.2.3.2	Lucigenin-Assay	29
2.2.4	mRNA-Expression	30
2.2.4.1	mRNA-Isolation	30
2.2.4.2	Gel-Elektrophorese der RNA	30
2.2.4.3	RNA-Transfer	30
2.2.4.4	cDNA-Sonde und Hybridisierung (Northern Blot)	31
2.2.5	Reverse Transkription und semiquantitative Polymerase Kettenreaktion	31
2.2.5.1	Reverse Transkription	31
2.2.5.2	Polymerase Kettenreaktion	32
2.2.6	Proteinbestimmung nach Lowry	36
2.2.7	Katalase Aktivitätsassay	36
2.2.8	Western Blot	36
2.2.9	Auswertung	38
2.2.9.1	Densitometrien und Fotografien	38
2.2.9.2	Statistik	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Effekt von Atorvastatin auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen	39
3.1.1	Angiotensin II und Diphenyleniodonium	39
3.1.2	Atorvastatin und L-Mevalonat	41
3.1.3	25-Hydroxycholesterin	43
3.2	Effekt von Atorvastatin auf die mRNA-Expression des AT ₁ -Rezeptors in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen	45
3.2.1	Zeitabhängiger Effekt von Atorvastatin	45
3.2.2	Konzentrationsabhängiger Effekt von Atorvastatin	47
3.2.3	Simvastatin und Lovastatin	48

3.2.4	Inhibition der Geranylgeranylierung.....	50
3.3	Effekt von Atorvastatin auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen	51
3.3.1	mRNA-Expression der p22phox-Untereinheit.....	52
3.3.2	mRNA-Expression der nox1-Untereinheit.....	52
3.3.3	Effekt von L-Mevalonat auf die Atorvastatin vermittelte Herabregulation der nox1-mRNA-Expression.....	53
3.4	Effekt von Atorvastatin auf die Expression antioxidativer Enzymsysteme in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen.....	54
3.4.1	mRNA-Expression der MnSOD, ecSOD, GPX und CuZnSOD.....	54
3.4.2	mRNA-Expression der Katalase	55
3.4.3	Effekt von L-Mevalonat auf die Atorvastatin vermittelte Heraufregulation der Katalase-mRNA-Expression	56
3.4.4	Proteinexpression der Katalase	57
3.4.5	Aktivität der Katalase.....	57
3.5	Effekt von Atorvastatin auf vaskulären oxidativen Stress, AT ₁ -Rezeptor-Expression, NAD(P)H-Oxidase-Expression, Expression antioxidativer Enzyme und vaskuläre Funktion in spontan hypertensiven Ratten (SHR).....	58
3.5.1	Vaskuläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.....	58
3.5.2	Vaskuläre AT ₁ -Rezeptor-mRNA-Expression	59
3.5.3	Vaskuläre mRNA-Expression der p22phox und nox1-Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase.....	60
3.5.4	Vaskuläre mRNA-Expression antioxidativer Enzyme.....	61
3.5.5	Vasokonstriktion und Vasodilatation.....	62
3.5.5.1	Endothelzellabhängige und -unabhängige Vasodilatation.....	63
3.5.5.2	Vasokonstriktion	64
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	65
4.	Diskussion	67
4.1	Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies	68
4.2	Der AT ₁ -Rezeptor	69
4.3	Die Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase	71
4.4	Antioxidative Enzyme.....	73
4.5	Endothelfunktion und Vasokonstriktion	75
4.6	Ausblick	77
5.	Zusammenfassung.....	79
6.	Literaturverzeichnis.....	81
7.	Danksagung.....	100
8.	Lebenslauf.....	101

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose und endotheliale Dysfunktion

1.1.1 Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Europa, Amerika und Teilen Asiens (Pasternak et al., 2004; Yusuf et al., 2001). Atherosklerose kann verschiedene Gefäße betreffen und dadurch unterschiedliche klinische Syndrome hervorrufen. Zu den wichtigsten klinischen Manifestationen der Atherosklerose zählen die koronare Herzerkrankung (KHK), der ischämische Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Prädilektionsorte für die Atherosklerose sind Aufzweigungen der Aorta oder der Herzkranzgefäße, in denen es zu Veränderungen im Blutfluss kommt. Zunehmende Lumeneinengung der Koronargefäße führt zu Koronarinsuffizienz und dadurch zu einer Sauerstoffunterversorgung des myokardialen Gewebes. Diese Myokardischämie manifestiert sich als Angina pectoris, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen.

Zahlreiche Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose sind bekannt. Als wichtigste sind Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, niedrige High-Density Lipoprotein (HDL)-Plasmakonzentrationen und Diabetes mellitus zu nennen (Libby et al., 2002; Wilson, 1999). Weitere Risikofaktoren sind unter anderem körperliche Inaktivität, männliches Geschlecht oder Adipositas (Stamler, 1991).

Die normale Arterienwand ist aufgebaut aus der Intima mit Endothelzellen, der Membrana elastica interna, der Media mit glatten Gefäßmuskelzellen, der Membrana elastica externa und der bindegewebigen Adventitia mit den Vasa vasorum (Ross, 1993; Wolinsky und Glasgow, 1969). Die Intima enthält neben den Endothelzellen einige intimale glatte Gefäßmuskelzellen und extrazelluläre Matrix. Die Gefäßwand wird durch Endothelzellen nach luminal glatt begrenzt und stellt eine wichtige Permeabilitätsbarriere dar. Endothelzellen produzieren parakrin, autokrin und endokrin wirkende Substanzen, die für Wachstumsprozesse, die Blutgerinnung und den Gefäßtonus wichtig sind. Dazu gehören unter anderem verschiedene Adhäsionsmoleküle, Angiotensin II, das Macrophage-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1), Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1, Prostaglandin I₂ (PGI₂), der Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Interleukin-1 (IL-1), der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), der Epidermal Growth Factor (EGF) und das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) (Gimbrone, 1976;

Ross, 1986). Die intakte Gefäßwand und insbesondere ein funktionsfähiges Endothel sind wichtig für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion.

Für die Pathogenese der Atherosklerose hat die „Response to Injury“-Theorie beruhend auf pathoanatomischen Beobachtungen Rudolf Virchows (Virchow, 1856) große Bedeutung gewonnen (Ross, 1993). Seitdem ist sie aufgrund neuer Erkenntnisse weiterentwickelt worden. Diese zeigen, dass die Atherosklerose keine reine Lipidspeicherkrankheit ist, sondern insbesondere inflammatorische Prozesse für die Pathogenese wichtig sind (Libby et al., 2002). Durch Einflüsse wie Lipoproteine, veränderte Scherkräfte, modifizierte Proteine oder Tabakinhaltstoffe, aber auch durch arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder einen erhöhten LDL-Cholesterinspiegel entstehen Endothelverletzungen (Ross, 1993). Die daraus resultierenden Endothelveränderungen führen zu einer erhöhten Permeabilität und begünstigen prokoagulatorische Prozesse. Vasokonstriktoren wie Endothelin, Wachstumsfaktoren und andere Botenstoffe werden verstärkt produziert (Ross und Glomset, 1973; Ross, 1993; Stary, 1983). Adhäsionsmoleküle, wie das Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) und das Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), Selectine und Integrine werden vermehrt an der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert (Cybulsky et al., 2001; Libby et al., 2002; Pueyo et al., 2000). Diese Adhäsionsmoleküle stellen Rezeptoren für Glukokonjugate und Integrine auf den Oberflächen von Monozyten und Thrombozyten dar (Libby et al., 2002). Es kommt zu einer Anlagerung und Migration dieser Zellen in die Intima und zur Akkumulation von Lipiden. Natives und oxidiertes LDL stimuliert dort die Vermehrung und Reifung von Makrophagen und T-Lymphozyten, sowie die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Fagiotto et al., 1984; Libby et al. 2002; Ross und Glomset, 1973). Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima und die Proliferation dieser Zellen innerhalb der neo-intimalen Schicht spielen für die Entstehung der atherosklerotischen Läsion eine große Rolle (Ross und Glomset, 1973). Glatte Gefäßmuskelzellen sind wichtig für physiologische und pathophysiologische Vorgänge in der Gefäßwand, weil sie durch Kontraktion und Relaxation den Gefäßtonus und damit die Gewebepfusion und den Blutdruck regulieren. Von den glatten Gefäßmuskelzellen werden Rezeptoren für Mediatoren des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), für Katecholamine, Endotheline, Insuline und Wachstumsfaktoren exprimiert (Ross, 1993). Außerdem produzieren glatte Gefäßmuskelzellen große Mengen extrazellulärer Matrix, wie Kollagene, elastische Fasern und Proteoglykane (Wissler, 1968). Glatte Gefäßmuskelzellen können ebenso multiple

Wachstumsfaktoren wie IL-1, Prostaglandin E, Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), und MCP-1 produzieren (Ross und Glomset, 1973; Ross 1993).

Die Gefäßläsion formiert sich zu Beginn als „fatty streak“, dessen Hauptbestandteil lipidhaltige Makrophagen, sogenannte Schaumzellen, sind. Kommt es zum Fortschreiten der Erkrankung, entsteht hieraus eine atherosklerotische Plaque mit lipidhaltigem Kern und fibröser Kappe. Dieser Kern ist das Resultat aus Apoptose, Nekrose, vermehrter proteolytischer Aktivität und Lipidablagerungen. Die Kappe resultiert aus der Migration glatter Gefäßmuskelzellen, stimuliert durch den PDGF, den Transforming Growth Factor β (TGF β), vermehrter T-Zell-Aktivität und vermindertem Bindegewebsabbau (Ross, 1999). Zu Beginn der atherosklerotischen Läsion wird durch vaskuläre Umbauvorgänge das Gefäßlumen noch vergrößert. Die Vergrößerung der entstehenden neo-intimalen Schicht führt jedoch konsekutiv zu einer Verengung des Gefäßlumens. Die entstandene Plaque kann lebenslang asymptomatisch bleiben oder in einen instabilen Phänotyp mit dünner fibröser Kappe und großem, makrophagenreichen Lipidkern übergehen und schließlich durch luminale Ruptur und darauffolgende prokoagulatorische Prozesse zur Thrombosierung und zum Verschluss eines Gefäßes führen und so im Falle der koronaren Atherosklerose einen Myokardinfarkt verursachen (Libby et al., 2002; Ross und Glomset, 1973; Ross, 1986).

1.1.2 Endotheliale Dysfunktion

Die erste und essentielle Phase in der Pathogenese der Atherosklerose ist die endotheliale Dysfunktion (Cai und Harrison, 2000; Nickenig und Harrison, 2002; Ross, 1999; Wassmann und Nickenig, 2003). Risikofaktoren der Atherosklerose, wie arterielle Hypertonie und Hypercholesterinämie, prädisponieren für die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion (Harrison, 1997a; Ross, 1999). Neurohumorale Faktoren wie Angiotensin II, eine verminderte Bioaktivität von NO und die vaskuläre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies begünstigen die Entstehung von endothelialer Dysfunktion (Harrison 1997b). Die Verletzung der Endothelzellschicht mit nachfolgenden inflammatorischen Reaktionen und Einwanderung von glatten Gefäßmuskelzellen wie unter 1.1.1 beschrieben, führen zu einer verminderten Funktion der schützenden Endothelzellschicht. Durch verminderte endothelzellabhängige Vasodilatation wird die Funktionalität des Gefäßes eingeschränkt (Harrison, 1997a). Proinflammatorische und prokoagulatorische Prozesse begünstigen die strukturelle Dysfunktion (Harrison, 1997a; Ross, 1999).

Die endotheliale Dysfunktion ist bereits mit einer erhöhten Rate kardiovaskulärer Ereignisse und erhöhter kardiovaskulärer Letalität assoziiert, ohne dass in diesem Stadium angiographisch Gefäßläsionen nachweisbar sind und hat damit bereits prognostische Bedeutung für den Patienten (Heitzer et al., 2001; Schächinger, et al. 2000).

1.2 Oxidativer Stress

Glatte Gefäßmuskelzellen und eine Vielzahl anderer Zellen der Gefäßwand produzieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Griendling et al., 2000b). Reaktive Sauerstoffspezies sind eine Gruppe von hochbioaktiven Molekülen, die aus der Reduktion von molekularem Sauerstoff entstehen. Deren wichtigste Vertreter sind Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) und Lipidradikale. ROS sind kurzlebige Moleküle mit einem hohen Oxidationspotential. Vaskuläres Gewebe verfügt über viele Ressourcen an reaktiven Sauerstoffspezies. Sie sind notwendig für das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen (Griendling und Harrison, 1999) und sind an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt (Hensley et al., 2000). Hierüber können sie zahlreiche Zellfunktionen beeinflussen. Durch veränderte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen führen sie beispielsweise zu einer Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und zu einer Induktion der Expression von Proto-Onkogenen (Rao und Berk, 1992). Über H_2O_2 kann beispielsweise auch das Renin-Angiotensin-System aktiviert werden (Lander et al., 1995) und die Expression antioxidativer Enzyme induziert werden (Lu et al., 1993).

Physiologisch stehen Produktion und Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies in der Gefäßwand im Gleichgewicht. Wenn dieses zugunsten einer vermehrten Produktion oder einem verminderten Abbau verschoben ist, entsteht oxidativer Stress. Nikotinkonsum, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Herzinsuffizienz begünstigen die Entstehung von vaskulärem oxidativen Stress (Cai und Harrison, 2000; Harrison, 1997b). Das kann zur oxidativen Modifikation von DNA und Proteinen, zur Lipid-Oxidation und zur Apoptose vaskulärer Zellen führen (Cai und Harrison, 2000; Hensley et al., 2000). Eine vermehrte Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ist eine der Hauptursachen für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und ist an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt (Harrison, 1997b). In diesem Zusammenhang ist insbesondere das Zusammenspiel zwischen Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid interessant. NO wirkt vasodilatierend und vasoprotektiv und ist daher wichtig für die Endothel- und Gefäßfunktion. NO wird endogen in Endothelzellen durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet. In

glatten Gefäßmuskelzellen kommt die induzierbare Isoform der NO-Synthase (iNOS) vor. Diese produziert nur nach Induktion durch Stimuli, wie beispielsweise Zytokinen, relevante Mengen NO (Park et al., 2000). Wichtige Prozesse in der Entstehung der Atherosklerose werden durch NO beeinflusst. Es hemmt die Thrombozytenaggregation (Radomski et al., 1992) und die Adhäsion von Monozyten an die Gefäßwand (Gauthier et al., 1995; Kubes et al., 1991). Außerdem hemmt NO die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Oxidierung von LDL (Ignarro, 1990). Reaktive Sauerstoffspezies, wie Superoxid, inaktivieren NO (Feigl, 1988). Außerdem entsteht bei dieser Reaktion Peroxynitrit, das die Endothelzellen schädigt (Beckman et al., 1990; Beckman, 1994). Physiologisch liegen NO und ROS in der Zellwand im Gleichgewicht vor (Harrison, 1997b). Eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies bzw. eine verminderte Produktion von NO vermindern die Bioaktivität von NO (Harrison, 1997b; Wilcox et al., 1997). Durch oxidativen Stress und die reduzierte Bioaktivität von NO wird eine Reihe pathologischer Prozesse initiiert, die entscheidend sind für die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und die Pathogenese der Atherosklerose (Harrison, 1997b). Dazu zählt die vermehrte Expression und Aktivierung redox-sensitiver Gene (Cai und Harrison, 2000; Hensley et al., 2000), zu denen Adhäsionsmoleküle, chemotaktische Faktoren und proinflammatorische Zytokine gehören (Griendling et al., 2000b). Reaktive Sauerstoffspezies induzieren unter anderem die Produktion des VCAM-1 (Pueyo et al., 2000), des ICAM-1 (William et al., 1999), des MCP-1 (Chen et al., 1998; Sato et al., 1999) und des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (Schieffer et al., 2000). Weiterhin modifizieren ROS Enzymfunktionen, wie die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die wichtig sind für Zellmigration und Modifikation der extrazellulären Matrix und die dadurch eine zentrale Rolle im vaskulären Remodelling und bei der Plaqueruptur spielen.

1.2.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Zu den wichtigsten Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies in der Gefäßwand zählen die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)-(NAD(P)H)-Oxidase, die Xanthin-Oxidase, die Myeloperoxidase sowie die mitochondriale Atmungskette (Wassmann et al., 2004). Auch die eNOS produziert in Abwesenheit des Kofaktors Tetrahydrobiopterin bzw. in Abwesenheit von L-Arginin Superoxid (Cai und Harrison, 2000; Harrison et al., 2003). Die Xanthin-Oxidase kommt in vaskulären Zellen vor und zirkuliert auch im Plasma. Sie katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin im Purin-Stoffwechsel (Cai und Harrison, 2000;

Harrison et al., 2003). Die Myeloperoxidase kommt in neutrophilen Granulozyten und Monozyten vor und katalysiert die Umwandlung von H_2O_2 in hypochlorige Säure (HOCl). HOCl und Zwischenprodukte sind beteiligt an vaskulären Entzündungsprozessen, der Lipid-Oxidation, der oxidativen Modifizierung von Proteinen sowie an der atherosklerotischen Plaquebildung (Carr et al., 2000; Winterbourne et al., 2000). Weitere Enzymsysteme, die ROS produzieren, sind die Isoenzyme des Cytochrom P450, die Lipoxygenase, die Cyclooxygenase sowie Hämoxygenasen und die Glukose-Oxidase (Cai und Harrison, 2000; Griendling et al., 2000b, Harrison et al., 2003, Lassègue und Clempus, 2003).

1.2.2 Die NAD(P)H-Oxidase

Im vaskulären System ist die NAD(P)H-Oxidase ein Hauptproduzent reaktiver Sauerstoffspezies (Griendling et al., 1994). Die NAD(P)H-Oxidase ist ein Membran assoziierter Enzymkomplex, der die Produktion von Superoxid über die Reduktion von Sauerstoff katalysiert. Diese enzymatische Aktivität charakterisiert die wichtigste Oxidase in vaskulären Zellen (Mohazzab-H et al., 1994; Rajagopalan et al., 1996), verglichen mit der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch die Xanthin-Oxidase und mitochondriale Oxidasen (Griendling et al., 2000a). Die NAD(P)H-Oxidase kommt in phagozytären und nicht-phagozytären Zellen vor. Die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase katalysiert eine langsamere, kontinuierliche Produktion reaktiver Sauerstoffspezies mit einer quantitativ geringeren Freisetzung als die phagozytäre NAD(P)H-Oxidase, die für den sogenannten "respiratory burst" verantwortlich ist (Griendling et al., 1998; Pagano et al., 1997). Je nach Zelltyp, in dem die NAD(P)H-Oxidase vorkommt, gibt es Unterschiede in der Zusammensetzung des Enzyms. Über den phagozytären Aufbau des Enzymkomplexes ist am meisten bekannt. Die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase ist aufgebaut aus einem membrangebundenen Cytochrom b_{558} -Komplex bestehend aus der 22 kDa α -Untereinheit p22phox und der glykosylierten 91 kDa β -Untereinheit gp91phox und aus den zytosolischen Untereinheiten p47phox und p67phox (phox steht für ‚phagocytic oxidase‘). Für die Aktivierung des Enzymkomplexes ist weiterhin ein kleines Guaninnukleotid-bindendes-Protein, die GTPase rac1 aus der Familie der rho-Proteine, notwendig (Babior, 1999). In glatten Gefäßmuskelzellen kommt statt der gp91phox-Untereinheit ein Homologon, die nox1-Untereinheit (nox steht für ‚nonphagocytic oxidase‘) vor. Diese Untereinheit ist nicht glykosyliert wie die gp91phox-Untereinheit, zeigt aber identische Bindungsstellen für Flavin- und Pyridin-Nukleotide (Suh et al., 1999). Über die Flavohämoproteine der beiden Untereinheiten p22phox und nox1/gp91phox läuft der

Elektronentransfer, der für die Superoxid-Produktion notwendig ist (Babior, 1999; Suh et al., 1999). Um aus dem inaktiven Zustand, in den aktiven, Superoxid produzierenden Zustand zu gelangen, ist der räumliche und funktionelle Zusammenschluss aller Untereinheiten in der Zellmembran notwendig (Babior, 1999), dargestellt in Abbildung 1. Die Funktionen der einzelnen Untereinheiten sind bisher nicht vollständig verstanden. Es ist allerdings bekannt, dass in glatten Gefäßmuskelzellen p22phox eine zentrale Untereinheit ist (Fukui et al., 1997; Ushio-Fukai et al., 1996) und dass die Interaktion von nox1 mit anderen Untereinheiten wichtig ist für die Gesamtaktivität der NAD(P)H-Oxidase (Lassègue et al., 2001; Suh et al., 1999). Weiterhin ist die Geranylgeranylierung der GTPase rac1, die eine Translokation der zytosolischen Untereinheit zur Plasmamembran bzw. eine Verankerung in der Membran ermöglicht, essentiell für die Aktivierung des Enzymkomplexes (Wassmann et al., 2001b). Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, TNF α und hämodynamische Einflüsse, wie Scherkräfte, aktivieren die vaskuläre NAD(P)H-Oxidase (Griendling et al., 2000a). Angiotensin II ist einer der wichtigsten Stimuli für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten (Griendling et al., 1994; Griendling et al., 2000a). Angiotensin II aktiviert die NAD(P)H-Oxidase über den Angiotensin II-Typ 1-(AT₁-) Rezeptor durch Stimulation intrazellulärer Signaltransduktionswege (Griendling et al., 2000b). Weiterhin bewirkt Angiotensin II eine schnelle Translokation der GTPase rac1 zur Zellmembran, was ein grundlegender Schritt in der Aktivierung des Enzymkomplexes ist (Seshiah et al., 2002).

NAD(P)H Oxidase

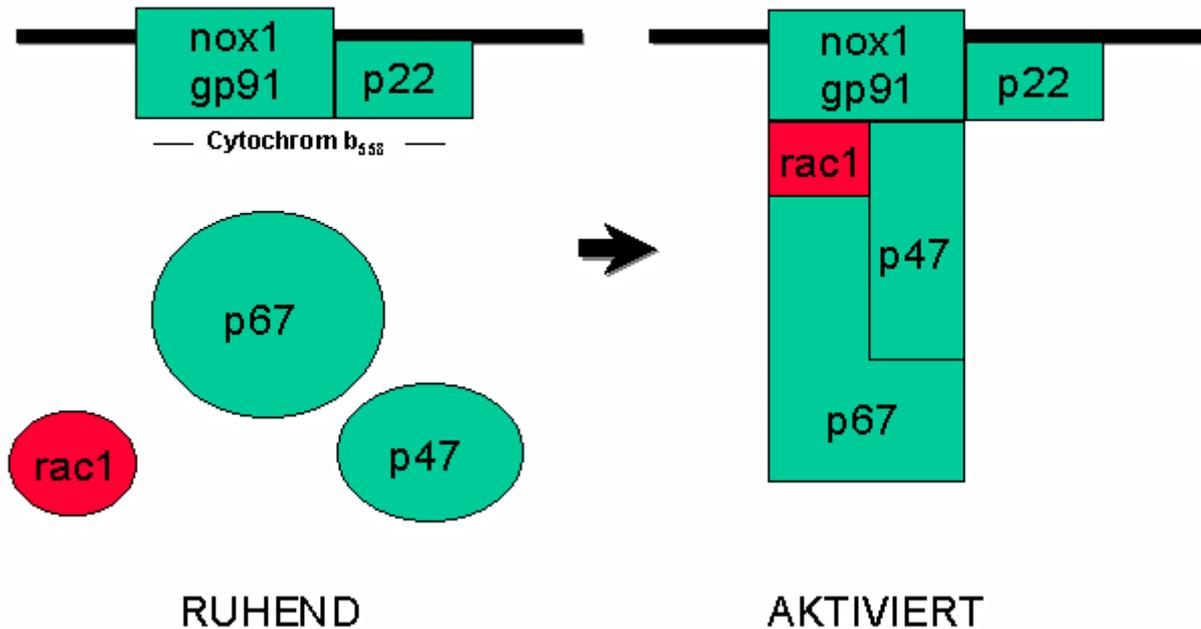


Abb. 1: Der Aufbau der vaskulären NAD(P)H-Oxidase im ruhenden und aktivierten Zustand. Der membrangebundene Cytochrom b_{558} -Komplex bestehend aus den Untereinheiten p22phox sowie gp91phox (entspricht nox1 in glatten Gefäßmuskelzellen) und die zytosolischen Anteile p67phox, p47phox und die GTPase rac1. Nach Stimulation durch beispielsweise Angiotensin II (nicht dargestellt) erfolgt der Zusammenschluss aller Untereinheiten an der Zellmembran und stellt den aktivierten Zustand der NAD(P)H-Oxidase dar (rechte Bildseite).

1.2.3 Elimination reaktiver Sauerstoffspezies

Die Elimination von ROS wird durch antioxidative Enzyme vermittelt. Dazu gehören die Superoxid-Dismutasen (SOD), die Glutathion-Peroxidase (GPX) und die Katalase. Superoxid-Dismutasen kommen in allen vaskulären Zellen vor. Diese Enzyme enthalten Metallionen im katalytischen Zentrum und wandeln Superoxid zu H_2O_2 und O_2 um. Zu den Isoenzymen der SOD zählen die zytosolische Kupfer-Zink-SOD (CuZn-SOD), die mitochondriale Mangan-SOD (MnSOD) und die extrazelluläre SOD (ecSOD) (Oury et al., 1996). In vaskulären Zellen macht die ecSOD bis zu 50% der Superoxid-Dismutasen aus. Die Expression der ecSOD wird durch Zytokine gesteigert (Fukai et al., 1998; Marklund, 1992). Die ecSOD ist in der extrazellulären Matrix zwischen Endothel und glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert, dort wo die Inaktivierung von NO durch reaktive Sauerstoffspezies vermutet wird (Stralin et al., 1995). Die Reaktion zwischen SOD und freien Sauerstoffradikalen hat einen schützenden Effekt auf die Bioaktivität von NO, da ein Anstieg

der SOD-Aktivität eine Verminderung der Halbwertszeit von $O_2^{\cdot-}$ zur Folge hat (Brawn, 1980). ROS reagieren allerdings bevorzugt mit NO. Sie reagieren beispielsweise dreimal schneller mit NO als mit der CuZn-SOD oder der Mangan-SOD. Außerdem ist die Reaktion zwischen Superoxid und NO nur diffusionslimitiert. Die Superoxid-Dismutasen tragen eine negative Ladung, so dass die Reaktion zwischen ROS und NO in Zellkompartimenten mit negativer Ladung, zum Beispiel der Zellmembran, bevorzugt abläuft (Harrison, 1997b).

Die Glutathion-Peroxidase (GPX) ist ein selenhaltiges Enzym, das H_2O_2 und Lipid-Peroxide in Wasser und Lipid-Alkohole umwandelt und Glutathion zu Glutathion-Disulfid oxidiert. Wenn keine ausreichende Aktivität der Glutathion-Peroxidase oder reduziertes Glutathion vorliegen, entstehen aus H_2O_2 und Lipid-Peroxiden Hydroxylradikale und andere reaktive Metabolite.

Die Katalase ist ein intrazelluläres Enzym, das vorwiegend in zellulären Peroxisomen und zum Teil auch im Zytosol vorkommt. Es katalysiert die Umwandlung von H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist sehr hoch und von der vorhandenen H_2O_2 -Konzentration abhängig. Sie wird nur durch die Diffusion von H_2O_2 an das katalytische Zentrum begrenzt. Außerdem besitzt die Katalase Peroxidase-Aktivität und reagiert mit organischen Peroxiden und Protonendonatoren zu Wasser und Alkoholen. Die Katalase ist besonders bei ausgeprägtem oxidativen Stress sehr effektiv. Sie schützt die Zellen vor H_2O_2 , das in der Zelle produziert wird und ist besonders wichtig bei geringem Vorkommen von Glutathion bzw. bei verminderter GPX-Aktivität. Die Katalase spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Toleranzentwicklung gegenüber oxidativem Stress (Dunford, 2001; Mates und Sanchez-Jimenez, 1999; Wassmann et al., 2003).

1.3 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) dient der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes und ist ein wichtiger Bestandteil der Blutdruckregulation (Capponi, 1996; Peach, 1977). Das Glykoprotein Angiotensinogen wird in Hepatozyten gebildet und bei Blutdruckabfall, β -Adrenozeptorenstimulation und Abfall der Serumnatriumkonzentration durch die Peptidase Renin in Angiotensin I umgewandelt. Renin wird vom juxtaglomerulären Apparat der Niere sowie von den Zielorganen selbst freigesetzt. Die Umwandlung in Angiotensin II erfolgt über das Angiotensin Converting Enzym (ACE). Angiotensin II ist der

Haupteffektor des Renin-Angiotensin-Systems. Es beeinflusst den Blutdruck, den Wasser- und Salzhushalt sowie neuronale und neurohumorale Systeme (Griendling et al., 1993; Peach, 1977; Timmermans et al., 1993). Seine Wirkung wird über die Stimulation der Angiotensin-Rezeptorsubtypen AT₁ und AT₂ vermittelt (Griendling et al., 1993).

Der Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT₁-Rezeptor) wird vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen, Herz, Lunge, Gehirn, Leber, Niere und der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde exprimiert. Es handelt sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der aus 359 Aminosäuren besteht, die in ihrer dreidimensionalen Struktur einen Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen bilden. Am extrazellulären Bereich befindet sich eine Bindungsstelle für Angiotensin II, intrazellulär schließt sich ein Kopplungssystem für G-Proteine an. Über verschiedene Wege der Signaltransduktion führt Angiotensin II zu zellulärer Kontraktion, Hypertrophie, Proliferation und Apoptose (Griendling et al., 1993; Mallat et al. 2000; Timmermans et al., 1993). Angiotensin II bewirkt außerdem eine Erhöhung der Aldosteronfreisetzung und einen damit verbundenen Anstieg der renalen Natrium- und Flüssigkeitsabsorption.

Der Angiotensin II-Typ 2- (AT₂-) Rezeptor ist ebenfalls ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen. Der AT₂-Rezeptor ist in menschlichem Gewebe wesentlich schwächer exprimiert als der AT₁-Rezeptor. AT₂-Rezeptor-mRNA findet man in adulter Nebenniere, Herz und Gehirn (Carey et al., 2000; Nio et al., 1995; Tsutsumi und Saavedra, 1991). Angiotensin II, Norepinephrin, TGF- β und Insulin-like growth factor 1 (IGF 1) senken die Expression des AT₂-Rezeptors. Im Rahmen von Herzversagen, Myokardinfarkt, Gefäßverletzungen und Natriumrestriktion hingegen findet sich eine erhöhte Expression des AT₂-Rezeptors. Angiotensin II inhibiert über den AT₂-Rezeptor Zellwachstum und -proliferation und fördert die Zelldifferenzierung vor allem in Endothelzellen, neonatalen Kardiomyozyten, Herzfibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen. Über die genaue Funktion des AT₂-Rezeptors ist insgesamt wenig bekannt, einige Studien vermuten auch die Inhibition der Atherogenese (Okamura et al., 1999). AT₂-Rezeptor Stimulation in glatten Gefäßmuskelzellen führt zu Vasodilatation (Carey et al., 2000).

In Bezug auf die Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies spielt der AT₁-Rezeptor eine wichtige Rolle (Dzau, 1998; Nickenig und Harrison, 2002; Romero und Reckelhoff, 1999). Die NAD(P)H-Oxidase wird durch Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor

aktiviert, was in glatten Gefäßmuskelzellen eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Folge hat (Griendling et al., 2000b). Angiotensin II nimmt weiterhin durch verstärkte Genexpression der Untereinheiten p22phox, nox1 und rac1 Einfluss auf die Funktion der NAD(P)H-Oxidase (Griendling et al., 1994, 2000a; Suh et al., 1999). Durch vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies entsteht oxidativer Stress. Wie unter 1.2 bereits ausführlicher dargestellt begünstigt oxidativer Stress die Entstehung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose, da reaktive Sauerstoffspezies an vielen molekularen Schritten der Atherogenese beteiligt sind und die Expression redox-sensitiver Gene, wie zum Beispiel VCAM-1, MCP-1 und MMP beeinflussen (Nickenig und Harrison, 2002).

Der AT₁-Rezeptor unterliegt einer homologen Regulation durch Angiotensin II und wird heterolog unter anderem durch einige Risikofaktoren der Atherosklerose reguliert. Beispielsweise verstärken LDL-Cholesterin und Insulin die Expression des AT₁-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen (Nickenig et al., 1997; Nickenig et al., 1998b). Der AT₁-Rezeptor spielt durch eine Vielzahl von pathophysiologisch relevanten Effekten eine wichtige Rolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose (Nickenig und Harrison, 2002). In vitro- und in vivo-Studien zeigten, dass der therapeutische Einsatz von AT₁-Rezeptor-Antagonisten die endotheliale Funktion verbessert und die atherosklerotische Plaquebildung vermindert. In hypercholesterinämischen Primaten wurde unter Therapie mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan die Oxidation von LDL-Cholesterin gemindert und die Bildung atherosklerotischer Plaques eingeschränkt (Strawn et al., 2000). AT₁-Rezeptor- und Apolipoprotein E-defiziente Doppel-knock out-Mäuse, die eine atherogene Diät erhielten, wiesen im Vergleich zu Apolipoprotein E-defizienten Mäusen mit AT₁-Rezeptor eine verbesserte endotheliale Funktion und inhibierte Bildung atherosklerotischer Läsionen auf (Wassmann et al., 2004).

Hypercholesterinämische Patienten zeigten nach sechswöchiger Therapie mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Candesartan eine signifikante Verbesserung der endothelialen Funktion, die durch Messung des Unterarmblutflusses bestimmt wurde. Placebo und Calciumantagonisten behandelte Patienten wiesen hingegen keine Veränderung auf. Candesartan verbesserte die endothelzellabhängige Vasodilatation und bewirkte eine Reduktion von vaskulären Entzündungsmarkern und oxidativem Stress, ohne den Blutdruck oder die Lipidkonzentrationen zu beeinflussen (Wassmann et al., 2002). Hypertensive Patienten, die ein Jahr lang mit Losartan behandelt wurden, zeigten eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation im Vergleich zu Patienten, die den β -Blocker Atenolol

erhielten (Schiffrin et al., 2000). Über eine Normalisierung von oxidativem Stress können AT₁-Rezeptor Antagonisten und ACE-Hemmer in die Entwicklung der Atherosklerose eingreifen (Schiffrin et al., 2000).

1.4 HMG-CoA-Reduktasehemmer

Die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase ist das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, auch Statine genannt, hemmen kompetitiv dieses Enzym, indem sie die chemische Struktur des Substrates, HMG-CoA, imitieren. Dadurch bewirken Statine eine Verminderung der zellulären und systemischen Cholesterinkonzentrationen. Durch verminderte hepatozytäre Cholesterinkonzentrationen kommt es zu einer verstärkten Expression von LDL-Rezeptoren in der Leber, so dass vermehrt LDL-Cholesterin aus dem Plasma aufgenommen wird. Therapeutisch eingesetzte Statine senken die LDL-Cholesterinspiegel um bis zu 35% (Levine et al., 1995). Neben der effektiven Senkung der LDL-Cholesterinspiegel bewirken Statine eine moderate Erhöhung der HDL-Konzentrationen und eine Senkung der Triglycerid-Konzentrationen (Bakker-Arkema et al., 1996; Stein et al., 1998).

Wie in Abbildung 2 dargestellt ist Cholesterin nur eines der Folgeprodukte von Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase (Goldstein und Brown, 1990). Mevalonat ist auch das Ausgangssubstrat für die Isoprenoide Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphat sowie für Dolichol. Diese wiederum sind wichtig für die Modifikation und Funktion zahlreicher zellulärer Faktoren (Takemoto und Liao, 2001). Die Isoprenylierung von bestimmten Proteinen ist die Voraussetzung für ihren gezielten Einbau in die Membrankompartimente der Zelle (Massy et al., 1996). Zu den posttranslational isoprenylierten Proteinen gehören zum Beispiel die G-Proteine, kleine GTP-bindende Proteine wie ras und rac sowie die eNOS (Laufs und Liao, 1998). Dolichol ist unter anderem wichtig für die Synthese von Glykoproteinen (Goldstein und Brown, 1990). HMG-CoA-Reduktasehemmer können demnach über eine verminderte Bildung von Mevalonat, unabhängig vom cholesterinsenkenden Effekt, diverse Proteinfunktionen beeinflussen.

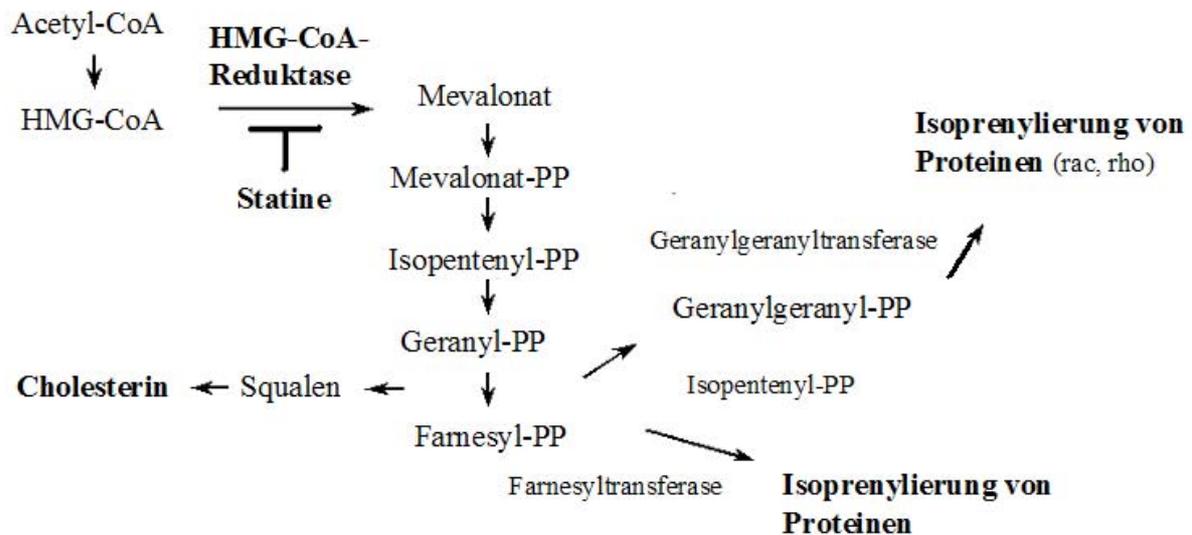


Abb. 2: Statine inhibieren das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase. Cholesterin, Mevalonat sowie weitere Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese wie Geranylgeranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat, die für Isoprenylierungen von Proteinen, wie beispielsweise den kleinen GTP bindenden Proteinen rac und rho gebraucht werden, werden vermindert gebildet. (PP=Pyrophosphat)

Die Hypercholesterinämie bzw. eine Erhöhung der LDL-Plasmakonzentration stellen wichtige Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose dar (Stamler et al., 1986). Die verstärkte Ansammlung von Fetten und inflammatorischen Zellen in atherosklerotischen Plaques führt zusammen mit der Aufweichung und Verdünnung der oberflächlichen fibrösen Kappe der Plaques zur erhöhten Rupturneigung. Durch die therapeutische Senkung des Cholesterinspiegels können sowohl die Neubildung und das Fortschreiten als auch die qualitative Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques beeinflusst werden (Koga et al., 1990). Cholesterinsenkung durch Statine reduziert die Rupturgefahr der Plaques (Vaughan et al., 1996). Durch diese Plaquestabilisierung kann ein entscheidender Prozess in der Pathogenese der KHK-Progression aufgehalten werden.

Interventionsstudien haben gezeigt, dass durch die medikamentöse Senkung des Plasmacholesterins mit Statinen eine effektive Primär- und Sekundärprophylaxe der koronaren Herzerkrankung möglich ist. Nicht nur das Auftreten atherosklerotischer Prozesse und ihrer Folgeerkrankungen, sondern auch die Mortalität wird deutlich gesenkt (Sacks et al., 1996; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (4S), 1994; Shepherd et al., 1995). Die Behandlung hypercholesterinämischer Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit dem HMG-

CoA-Reduktasehemmer Simvastatin führte zu einer Senkung der Letalität der KHK um 42% und zu einer Senkung der Gesamtmortalität um 30% (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (4S), 1994). Die Behandlung hypercholesterinämischer Patienten mit Pravastatin in der WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study)- und LIPID (Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease)-Studie bewirkte ebenfalls eine Verminderung koronarer Ereignisse, der koronaren Mortalität und der Gesamtmortalität von bis zu 30% (Shepherd et al., 1995; The LIPID Study Group, 1998). Patienten mit normalen oder leicht erhöhten Cholesterinspiegeln profitieren ebenfalls signifikant von der Behandlung mit Statinen. In der CARE (Cholesterol and Recurrent Events)-Studie sank das Risiko, an der KHK zu versterben, einen Herzinfarkt zu erleiden oder sich einer Revaskularisierungsbehandlung unterziehen zu müssen unter Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktasehemmer Pravastatin um 26% (Sacks et al., 1996). Die Behandlung mit Simvastatin führte in der Heart Protection Study (HPS) zu einer Reduktion der koronaren Mortalität um 18% (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002). Die AFCAPS/TexCAPS-Studie (Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study) zeigte, dass Statine auch in der Primärprävention eine deutliche Minderung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei normo- und hypercholesterinämischen Patienten bewirkten. (Downs et al., 1998). Post hoc-Analysen der WOSCOPS-Studie mit hypercholesterinämischen Patienten und der CARE-Studie mit gering hypercholesterinämischen Patienten zeigten eine maximale LDL-Senkung von 24% und 28% (Sacks et al., 1996; Packard, 1998). Weitere Analysen ergaben aber, dass bei gleichen Cholesterinkonzentrationen die Statin behandelten Patienten eine geringere kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität als gleichaltrige Placebo behandelte Patienten aufwiesen (Sacks et al. 1996; Shepherd et al., 1995; Packard, 1998). In angiographischen Untersuchungen konnte unter Statintherapie eine deutliche klinische Verbesserung beobachtet werden, die über die Größenveränderung der atherosklerotischen Läsionen hinausging (Brown et al., 1993).

Die Lipidsenkung ist der primäre Wirkmechanismus der Statine, der mutmaßlich aufgrund der starken Assoziation zwischen dem Serumcholesterinspiegel und kardiovaskulären Ereignissen (Klag et al., 1993) für den therapeutischen Nutzen dieser Substanzen verantwortlich ist. Der lipidsenkende Effekt der Statine ist allerdings begrenzt. Weitere Effekte unabhängig von der Cholesterinsenkung können zu den frühen und weitreichenden therapeutischen Effekten der Statine beitragen (Vaughan et al., 1996). Dazu gehört zum Beispiel die verbesserte Endothelfunktion unter cholesterinsenkender Therapie mit HMG-CoA-Reduktasehemmern

(Egashira et al., 1994; Treasure et al., 1995). Die Lipidsenkung scheint nicht der einzige Grund für die verbesserte Endothelfunktion unter Statintherapie zu sein, da diese Verbesserung eintritt, bevor es zu einer signifikanten Senkung des Cholesterinspiegels kommt (O'Driscoll et al., 1997; Treasure et al., 1995). Unter Therapie mit Atorvastatin bzw. Pravastatin kam es beispielsweise innerhalb von 24 Stunden zu einer Verbesserung der Endothelfunktion bei gesunden Probanden bzw. Patienten mit KHK (Laufs et al., 2000; Wassmann et al., 2003).

Die Mechanismen, die der cholesterinunabhängigen Wirkung von Statinen zugrunde liegen, sind vielfältig. Beispielsweise erhöhen Statine die Bioverfügbarkeit von NO und bewirken eine Aktivierung und vermehrte Expression der eNOS und führen somit zu einer vermehrten endothelialen Produktion von NO (Laufs et al., 1998; Williams et al., 1998). Statine können die Endothelin-1-Synthese vermindern (Hernandez-Perera et al., 1998) und darüber wiederum Einfluss auf die Regulation des Gefäßtonus nehmen. Der HMG-CoA-Reduktasehemmer Pravastatin senkt die Serumkonzentration von C-reaktivem Protein (CRP) (Ridker et al., 1999). HMG-CoA-Reduktasehemmer wirken auch über eine verminderte Oxidation von LDL-Cholesterin anti-inflammatorisch und vermindern die Aktivität und Migration von Makrophagen. Oxidiertes LDL führt zu einer Hochregulation der Genexpression von GM-CSF und MCP-1 und induziert die Freisetzung inflammatorischer Zytokine (Dunzendorfer et al., 1997; Kothe et al. 2000; Romano et al., 2000). Ein weiterer Effekt ist die Beeinflussung von Immunreaktionen (Kwak et al., 2000; Weitz-Schmidt et al., 2001). Statine reduzieren die Expression und Aktivität von Metalloproteinasen, die Matrix degradieren (Chase und Newby, 2000). Die Sekretion des Serum-IgE und seines löslichen Rezeptors sowie ein Anstieg des Serum-Interleukin 4 wird vermindert (Sinkiewicz et al., 2000). Weiterhin vermindern Statine die Plättchen-Aktivierung, die Expression des Gewebefaktors (Eto et al., 2002) und die fibrinolytische Aktivität in Endothelzellen (Essig et al., 1998).

Eine mögliche Erklärung für die cholesterinunabhängigen Effekte der HMG-CoA-Reduktasehemmer ist die verminderte Isoprenylierung von Proteinen. Der HMG-CoA-Reduktasehemmer Mevastatin verhindert beispielsweise die geranylgeranylabhängige Translokation der GTPase rho zur Zellmembran und führt so durch eine negative Regulation zu einer erhöhten eNOS-Expression (Laufs und Liao, 1998), was die Bioverfügbarkeit von NO und dessen Nutzen für die Endothelfunktion erhöht.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die endotheliale Dysfunktion stellt durch funktionelle und strukturelle Gefäßveränderungen den initialen Prozess in der Pathogenese der Atherosklerose dar. Zentral beteiligt an den zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgängen sind oxidativer Stress und die Aktivierung des AT₁-Rezeptors. Durch eine erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in der Gefäßwand wird die Bioaktivität von NO gemindert, und redox-sensitive Gene werden vermehrt exprimiert.

HMG-CoA-Reduktasehemmer senken das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen bei Hypercholesterinämie. Unabhängig von der Cholesterinsenkung zeigen sie zudem eine Vielzahl weiterer Effekte, die sich günstig auf die Gefäßfunktion und -struktur auswirken.

Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Frage, ob Statine direkte zelluläre antioxidative Effekte bewirken, die unabhängig von der Cholesterinsenkung sind und welche molekularen Mechanismen solchen Effekten zugrunde liegen. Am Beispiel der Substanz Atorvastatin wurde die Wirkung von HMG-CoA-Reduktasehemmern auf vaskulären oxidativen Stress, den AT₁-Rezeptor und die Endothelfunktion untersucht. Hierfür wurde in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen und am Tiermodell normocholesterinämischer spontan hypertensiver Ratten die Wirkung von Atorvastatin auf die Produktion und Elimination reaktiver Sauerstoffspezies, auf die AT₁-Rezeptor-Expression und auf die Endothelfunktion untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

- α -[³²P]-dCTP, Amersham, Braunschweig
- ϵ -Amino-n-Caproiacid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- 2',7',-Dichlorodihydrofluoresceindiazetat, Molecular Probes, Eugene, USA
- 25-Hydroxycholesterin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- 2-Propanol (Isopropanol), Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
- Acrylamid, Bio-Rad, München
- Agarose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Ammoniumperoxodisulfat (APS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Angiotensin II, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Anti Rabbit IgG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Aprotinin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Atorvastatin, Gödecke-Parke-Davis, Freiburg
- Bio-Rad DC Protein Assay, Bio-Rad, München
- Bis-N-Methylacridinium-Nitrat (Lucigenin), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Bromphenolblau, E. Merck, Darmstadt
- Calciumchloriddihydrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Carbachol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Chloroform, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Denhardt's Solution, E. Merck, Darmstadt
- Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Dimethylsulfoxide, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Dinatriumhydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt
- Diphenyliodonium (DPI), Sigma-Aldrich, Steinheim
- Dithiothreitol (DTT), Ambion, Austin, USA
- dNTP, Roche, Mannheim
- Dodecylsulfat (SDS), E. Merck, Darmstadt
- Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- Enhanced Chemiluminescence Kit, Amersham Pharmacia Biotech., Freiburg
- Essigsäure, E. Merck, Darmstadt
- Ethanol, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
- Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

- Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Farnesylpyrophosphat, Sigma-Aldrichs GmbH, Taufkirchen
- Foetal Bovine Serum, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- Formaldehyd, E. Merck, Darmstadt
- Formamid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Geranylgeranylpyrophosphat, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
- Glucose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Glycin, E. Merck, Darmstadt
- Glycerin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Hybond N-Nylonmembran, Amersham, Braunschweig
- Kaliumchlorid, E. Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt
- Kalziumchlorid, E. Merck, Darmstadt
- Leupeptin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- L-Mevalonat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Magnesiumchloridhexahydrat, E. Merck, Darmstadt
- Magnesiumsulfatheptahydrat, E. Merck, Darmstadt
- Megasript-Kit, Ambion, Austin, USA
- Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
- Methanol, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
- Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), E. Merck, Darmstadt
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Bio-Rad, München
- N,N'-Methylenbisacrylamid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Natriumacetat, E. Merck, Darmstadt
- Natriumacid, E. Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
- Natriumcitrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- NatriumHEPES, Serva, Heidelberg
- Natriumhydrogencarbonat, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
- Natriumhydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt
- Nitrocellulosemembran, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- Nitroglycerin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- NucTrap Columns, Stratagene GmbH, Heidelberg
- Oligonukleotide, MWG Biotech, Ebersberg

- Penicillin/Streptomycinlösung, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- Phenylephrin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Polyklonaler Katalase Antikörper SA-115, Biomol, Hamburg
- Polyoxyethylensorbitanmonolaurate (TWEEN), Serva, Heidelberg
- Ponceau-Rot, Serva, Heidelberg
- Prime IT II Random Primer Labeling Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg
- Pyonin Y, Serva, Heidelberg
- Random Primer, Roche, Mannheim
- Ribonukleaseinhibitor (RNAsin), Ambion, Austin, USA
- Rinderalbumin BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- RNA Clean, AGS GmbH, Heidelberg
- RNA Pure, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- RNAsin, Promega, Mannheim
- Salmon Testes DNA (10,4 mg/ml) , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen,
- Salzsäure (HCl), E. Merck, Darmstadt
- Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, Boehringer, Mannheim
- Tobramycin, Lilly Deutschland GmbH, Gießen
- Trishydroxymethylaminomethanacetat (Tris-Acetat), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid (Tris/HCl), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
- Trypsin-EDTA, Boehringer, Mannheim
- Whatman Chromatography Paper, Whatman, Rutherford, USA
- Western Blocking Reagent, Roche, Mannheim
- Wortmannin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

2.1.1 Puffer und Lösungen

- 0,1% PBS-Tween: 1 ml Tween- Lösung ad 1000 ml PBS
- 2xSDS: 100 mM Tris-Lösung pH 6,8, 200 mM DTT: 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin
- 2xSSC: 17,5g NaCl, 8,82g NaCitrat ad 1000ml aqua bidest, pH 7,0
- 20xSSC: 175g NaCl, 88,2g NaCitrat ad 1000ml aqua bidest, pH 7,0

- DEPC-Wasser: 1 ml Diethylpyrocarbonat ad 1000 ml aqua bidest, autoklavieren
- E1-Puffer: pH 7,5; Natriumchlorid 135 mmol/l, Kaliumchlorid 5,4 mmol/l, Calciumchloriddihydrat 1,8 mmol/l, Magnesiumchloridhexahydrat 1 mmol/l, Glucose 10 mmol/l
- Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris Acetat, 250 mM Glycin, 0,1% SDS
- Hybridisierungslösung: 50% Formamid, 6x SSC, 0,5% SDS, 100 µg/ml Salmon-Testes-DNA
- Kaliumphosphat-Puffer: pH 7,0; 45,4 ml K₂HPO₄, 4,6 ml KH₂PO₄, ad 1000 ml Aqua bidest, 1,26 mM DETAPAC, 1 mM PMSF, 0,0023 TIU/ml Aprotinin
- Krebs-Henseleit Puffer: pH 7,4; NaCl 99,91 mmol/l, KCL 4,69 mmol/l, CaCl₂ 1,87 mmol/l, MgSO₄ 1,2 mmol/l, NaHEPES 20 mmol/l, K₂HPO₄ 1,03 mmol/l, NaHCO₃ 25,0 mmol/l, D(+)-Glucose 11,1 mmol/l
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,5 m Kaliumdihydrogenphosphat
- Prähybridisierungslösung: 50% Formamid, 6x SSC, 0,5% SDS, 5x Denhardt's Solution, 100 µg/ml Salmon Testes-DNA
- Protein-Lysepuffer: 100 mmol/l Tris/HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,1 mmol/l PMSF, 0,023 U/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin
- RNA-Probenpuffer: 10 µl Formamid, 4,4 µl Formaldehyd, 2,5µl 10xMOPS, 2 µl loading dye, 0,1µl Ethidiumbromid
- Tyroden-Puffer: pH 7,4; NaCl 136,9 mmol/l, KCl 5,4 mmol/l, CaCl₂ 1,8 mmol/l, MgCl₂ 1,95 mmol/l, NaEDTA 0,05 mmol/l; NaH₂PO₄ 0,42 mmol/l; NaHCO₃ 22.6 mmol/l, D(+)-Glucose 5,5 mmol/l, Ascorbinsäure 0,28 mmol/l und Indomethacin 0,01 mmol/l
- Western Blot Blocking Solution 1%: 1 ml Western Blocking Reagent ad 100 ml DEPC-Wasser
- Western Blot Probenpuffer: 2,5 ml Sammelpuffer, 4,0 ml 10% SDS, 2,0 ml Glycerin; 1 ml Mercaptoethanol, 0,2 ml 0,1 w/v-% Pyonin Y
- Western Blot Sammelgel: 30% Acrylamidmix, 1,0 M Tris (pH 6,8), 10% SDS, 10% Ammoniumpersulfat, 1% TEMED
- Western Blot Trenngel: 30% Acrylamidmix, 1,5 M Tris (pH 8,8), 10% SDS, 10% Ammoniumpersulfat, 0,4% N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- Western Transferpuffer 1: 50mM Tris, 380mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol ad 1000 ml Aqua, pH 8,3
- Western Transferpuffer 2: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% Methanol ad 1000 ml Aqua, pH 8,3

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden aus 6-10 Wochen alten Sprague-Dawley-Ratten isoliert. Die thorakalen Aorten wurden enzymatisch verdaut, die Zellen in Kultur gebracht und über mehrere Zellgenerationen passagiert (Ross, 1971; Sachinidis et al., 1993). Sämtliche Experimente wurden mit Zellen der 5.-12. Passage durchgeführt.

2.2.1.1 Isolierung

Rattenaorten wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort in eisgekühlte, mit Penicillin (100 U/ml) und Tobramycin (40 µg/ml) supplementierte phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) überführt. Nach Abtragung von Bindegewebs- und Fettresten wurden die Arterien in einer Enzymlösung, bestehend aus 1,5 mg Kollagenase Typ I, 0,5 mg/ml Elastase und 0,5 mg/ml Trypsin Inhibitor in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 20% fötalem Kälberserum (FKS) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden noch verbliebene Reste der Adventitia sowie des Endothels entfernt. Die Aorten wurden in kleine Stücke zerschnitten (ca. 1 mm³) und in frische Enzymlösung überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Wasserbad unter vorsichtiger Dispersion, bis eine Einzelzellsuspension vorlag. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 40 µg/ml Tobramycin supplementiertem Medium aufgenommen, in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und bei 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ Spannung und 37°C inkubiert (Chamley et al., 1979; Jackson und Schwartz, 1992; Schwartz et al., 1986).

2.2.1.2 Immunhistochemische Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen

Zur Charakterisierung der Zellen als glatte Gefäßmuskelzellen und zum Ausschluß einer zellulären Kontamination mit Fibroblasten oder Endothelzellen ist die immunhistochemische Darstellung des für die glatten Gefäßmuskelzellen spezifischen Aktins die Methode der Wahl (Ross, 1971). Auf Glasobjektträgern konfluent gewachsene Monolayer wurden in Ethanol/Aceton (1:1) fünf Minuten bei 4°C fixiert, in 1% Rinderserumalbumin geblockt und 60 Minuten entweder mit PBS mit auf 1:200 verdünntem primären monoklonalen Antikörper gegen Aktin oder in PBS alleine (Negativkontrolle) inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde

Biotin-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG (1:500, 60 min) verwendet. Anschließend wurden die Präparate 45 Minuten mit verdünntem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (1:500) in PBS inkubiert. Durch diese Methode wird mehr Marker-Enzym an das Antigen gebunden und dadurch die Sensitivität erhöht. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe des Peroxidase-Substrates 0,32 mmol/l Aminoethylcarbazol, 0,0002% (V/V) H₂O₂ in 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7,3). Das Produkt dieser Reaktion ist ein wasserunlöslicher roter Farbstoff. Nach Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Präparate in Glyceringelatine eingebettet und lichtmikroskopisch ausgewertet. Neben der indirekten immunhistochemischen Färbung wurde die Immunfluoreszenzdarstellung des Aktins und des von-Willebrand-Faktors (Faktor VIII) durchgeführt.

Auf Glasobjektträger gewachsene Monolayer glatter Gefäßmuskelzellen wurden in Ethanol/Aceton (1:1) fünf Minuten bei 4°C fixiert, in PBS mit 1% BSA geblockt und 30 Minuten mit 1:100 verdünntem primären Antikörper gegen Aktin bzw. gegen Faktor VIII inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde mit dem Fluorochrom FITC konjugiertes Anti-Maus-IgG (1:100, 30 min Inkubation) verwendet. Die Präparate wurden phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Der von Endothelzellen gebildete Faktor VIII war weder in der Biotin-Streptavidin-Technik noch in der Fluoreszenzfärbung nachweisbar, so dass eine zelluläre Kontamination mit Endothelzellen ausgeschlossen werden konnte.

2.2.1.3 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einer 5% CO₂ Atmosphäre bei 37°C in Kulturschalen (10 cm Durchmesser) in Kultur gebracht. Das Medium, Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), wurde mit 10% fötalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt und unter sterilen Bedingungen alle zwei Tage gewechselt. Die Zelllinien wuchsen bis sie einen konfluenten Zellrasen bildeten und wurden dann durch Trypsinierung (0,25% Trypsin in PBS) subkultiviert. Zum Ausschluß unerwünschter Effekte des fötalen Serums und um einen Wachstumsstop der Zellen zu erreichen, damit alle Zellen sich zu Beginn des Versuchs in der gleichen Zellzyklusphase befinden, wurden die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf serumfreies Medium überführt.

2.2.2 Tiermodell

Es wurden männliche, spontan hypertensive Ratten (SHR, Aventis Pharma, Frankfurt/Main) untersucht, die Standard-Nagerfutter erhielten (Altromin Diät 1320; Altromin, Lage). Ab der 18. Lebenswoche bekamen die Tiere für 30 Tage Atorvastatin über das Futter oder normales Futter. Der täglichen Futterraufnahme entsprechend erhielten die Tiere Atorvastatin in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Diese Dosen erzeugen bei Ratten Plasmakonzentrationen, die vergleichbar sind mit den bei Menschen erzeugten Plasmakonzentrationen nach üblicher Atorvastatin-Behandlung (Cilla et al., 1996; Dostal et al., 2001). Die Ratten wurden durch Genickbruch getötet, die Gewebeproben und Blut sofort entnommen. Alle Tierexperimente wurden erst nach Genehmigung der entsprechenden Landesbehörde durchgeführt.

2.2.2.1 Aortenring-Präparation und Organbadexperimente

Die Rattenaorten wurden exzidiert und vollständig von Bindegewebe befreit. Fünf Millimeter große Ringe wurden zur isometrischen Spannungsmessung mit Haken in Organbädern befestigt, die mit Tyrode-Puffer (37°C) gefüllt waren und kontinuierlich mit 95% O₂ und 5% CO₂ insuffliert wurden. Mittels Druckabnehmer wurde die isometrische Spannung der Präparate gemessen und mit einem Polygraphen aufgezeichnet. Nach einer mechanischen Vorspannung der Ringe mit 10 mN und einer Äquilibrationszeit von 60 Minuten wurden verschiedene Substanzen in ansteigender Konzentration in das Organbad hinzugefügt, um Vasokonstriktion und Vasodilatation in kumulativen Konzentrations-Wirkungskurven zu untersuchen: KCl 20 und 60 mmol/l, Angiotensin II 0,01 nmol/l – 1 µmol/l, Phenylephrin 0,1 nmol/l – 10 µmol/l, Carbachol 0,1 nmol/l – 100 µmol/l und Nitroglycerin 1 nmol/l – 10 µmol/l. Die Erhöhung der Substanzkonzentrationen erfolgte stets erst nach Beendigung von Vasokonstriktion bzw. -relaxation (durchschnittlich nach 3-6 Minuten). Vor Zugabe einer neuen Substanz wurde das Medium komplett gewechselt.

2.2.3 Messung reaktiver Sauerstoffspezies

2.2.3.1 DCF-Fluoreszenzmessung

Mittels Dichlorofluorescein (DCF)-Fluoreszenzmessung können intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies nachgewiesen werden. Die lipophile Verbindung, 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiazetat ($H_2DCF-DA$) kann frei durch die Zellmembran diffundieren. Im Zytosol findet durch zelluläre Esterasen die Hydrolyse zu 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) statt. Diese polare Verbindung reichert sich intrazellulär an. Bei gleichzeitigem Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffspezies wird H_2DCF oxidiert und es entsteht das stark fluoreszierende Dichlorofluorescein (DCF) (Frenkel und Gleichauf, 1991). Dabei bestimmt die intrazelluläre Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies die Stärke der Fluoreszenz. Das Prinzip der DCF-Fluoreszenzmessung ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde zur Visualisierung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in glatten Gefäßmuskelzellen angewandt. Hierfür wurde ein Zeiss Axiovert 135 invertiertes Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit einem 25x Öl-Immersionsobjektiv (Plan-Neofluar, Carl Zeiss, Jena) und Zeiss LSM 410 konfokaler Ausstattung benutzt. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm, die Emissionswellenlänge 515-540 nm. Die Bilder wurden mit einzelnen, schnellen Scans erstellt, bei einer Auflösung von 512x512 Pixel. Einstellungsparameter wie Helligkeit und Kontrast waren für alle Aufnahmen identisch.

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 6-well-Platten auf autoklavierten Deckgläschen zu einem subkonfluenten Monolayer kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 12 Stunden in serumfreies Medium überführt, um einen Wachstumsstopp zu erreichen, bevor die Stimulation mit verschiedenen Substanzen erfolgte. Direkt vor der Messung wurden die Zellen für 30 Minuten im dunklen Zellkulturbrutschrank mit 10 $\mu\text{mol/l}$ $H_2DCF-DA$ in E1-Puffer inkubiert.

Für die Mikroskopie wurde das mit Zellen bewachsene Deckglas in E1-Puffer gewaschen und dann mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger gelegt. Es erfolgte dann die Messung der ROS-Produktion mit dem konfokalen Lasermikroskop. Pro Bild wurde die Signalintensität an einer Gruppe von 25 zufällig ausgewählten Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der LSM Software (LSM, Version 3.92 Beta, Carl Zeiss Microscope Systems, Jena).

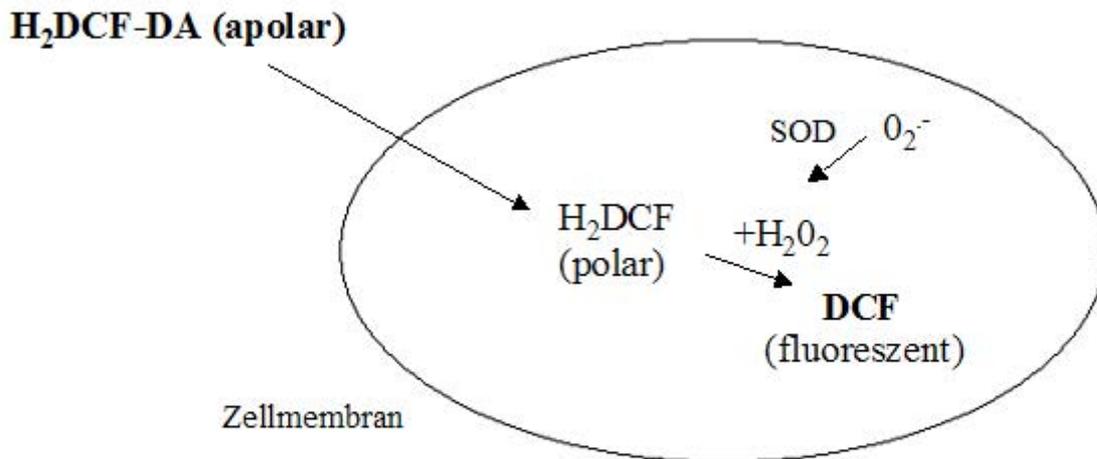


Abb. 3: Das Prinzip der DCF-Fluoreszenz: 2',7'-Dichlorodihydrofluoreszeindiacetat (H₂DCF-DA), 2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein (H₂DCF), 2',7'-Dichlorofluoreszein (DCF), Superoxid-Dismutase (SOD). H₂DCF-DA diffundiert durch die Zellmembran und wird im Zytosol zu H₂DCF hydrolysiert und durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert. Es entsteht das stark fluoreszierende DCF.

2.2.3.2 Lucigenin-Assay

Zum Nachweis der Superoxid-Freisetzung aus Geweben wurde das Lucigenin-Chemilumineszenz-Assay angewendet. Lucigenin reagiert mit Superoxid unter Erzeugung von Chemilumineszenz. Aus SHR wurden Aorten mit intaktem Endothel entnommen und für 30 min bei 37°C in einem glukosehaltigen modifizierten Krebs-Henseleit Puffer unter Carbogenbegasung äquilibriert. Danach wurden die Proben vorsichtig in ein Szintillationsgefäß mit 2 ml 5 µmol/l Lucigenin/Krebs-Henseleit-Pufferlösung überführt. Über einen Zeitraum von 15 min wurde in einem Berthold Lumat (LB 9501, Berthold Technologies GmbH & Co KG, Bad Wildbad) die Chemilumineszenz in einminütigen Intervallen gemessen. Hintergrundsignale, die mit Lucigenin/Krebs-Henseleit-Pufferlösung ohne Probe parallel gemessen wurden, wurden jeweils von den Meßwerten subtrahiert. Die Lucigenin/Krebs-Henseleit-Pufferlösung wurde vor dem Versuch dunkeladaptiert. Anschließend wurden die Gewebeproben getrocknet und gewogen, um die Chemilumineszenz pro mg Aortengewebe zu bestimmen.

2.2.4 mRNA-Expression

2.2.4.1 mRNA-Isolation

Zur Messung der mRNA-Expression bestimmter Gene wurde die Gesamt-RNA aus Zellen und aortalem Gewebe isoliert. Gewebefragmente wurden mit einem Glaspotter zerkleinert und homogenisiert, kultivierte Zellen von den Kulturschalen abgeschabt. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe von RNA Pure, einer kommerziell erhältlichen RNA-Isolutionslösung entsprechend dem Protokoll des Herstellers (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) isoliert. Hierbei wurden Proteine durch Chloroformzugabe abgetrennt und anschließend die RNA mittels Isopropanol präzipitiert. Die Quantifizierung der RNA-Konzentrationen erfolgte in einem Beckman DU 640-Spectrophotometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) mittels UV-Licht, bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Der Quotient 260/280 nm ergab den Reinheitsgrad der isolierten RNA. Dieser sollte bei 1,8-2,0 liegen, da die 260 nm Wellenlänge den RNA- oder DNA-Gehalt misst, während die 280 nm Wellenlänge besonders von kontaminierenden Proteinen absorbiert wird.

2.2.4.2 Gel-Elektrophorese der RNA

10 µg der zu untersuchenden Gesamt-RNA wurden auf ein 1,2% Agarose/0,67 % Formaldehyd-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel war mit Ethidiumbromid versetzt, so dass anschließend unter UV-Licht die Quantität und Qualität der RNA überprüft werden konnte. Es wurden nur Gele weiterverarbeitet, die sich durch eine gleichmäßige Beladung intakter RNA auszeichneten.

2.2.4.3 RNA-Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mittels Kapillarblot mit Whatman-Papier (Whatman, Rutherford, USA) auf eine Hybond N Nylon-Membran (Amersham, Braunschweig, Deutschland) überführt. Im Anschluss daran wurde die RNA im Stratagene Crosslinker (Stratagene GmbH, Heidelberg) durch UV-Bestrahlung mit der Membran quervernetzt. Es folgte die Überprüfung des gleichmäßigen RNA-Transfers unter UV-Licht.

2.2.4.4 cDNA-Sonde und Hybridisierung (Northern Blot)

Zur Untersuchung verschiedener Genexpressionen wurden die RNA-beladenen Nylonmembranen mit spezifischen, radioaktiv markierten cDNA-Sonden inkubiert, welche dann an die gesuchte komplementäre mRNA hybridisierten. Die cDNA-Sonden wurden durch Polymerasekettenreaktion erstellt (siehe Tabelle 1).

Die Sonde wurde mit Hilfe des Prime It II Random Primer Labeling Kits (Stratagene GmbH, Heidelberg) und α - ^{32}P -dCTP radioaktiv markiert. Überschüssige Nukleotide wurden über die NucTrap-Säule (Stratagene GmbH, Heidelberg) entfernt.

Nach zweistündiger Prähybridisierung der Membran bei 42°C im Hybridisierungsofen wurde die Prähybridisierungslösung durch die Hybridisierungslösung ersetzt, in der die radioaktiv markierte cDNA-Sonde enthalten war. Nicht oder unspezifisch gebundene Nukleotide wurden nach Hybridisieren der Membran bei 42°C durch zweimaliges Waschen der Membran mit 2xSSC und einmaligem Waschen mit 2xSSC+0,1% SDS für 20 Minuten bei 50°C entfernt. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und bei -80°C durch Auflegen eines Films autoradiographiert (Hyperfilm ECL, Amersham, Braunschweig).

2.2.5 Reverse Transkription und semiquantitative Polymerase Kettenreaktion

2.2.5.1 Reverse Transkription

Mittels der reversen Transkription wird aus RNA spezifische, komplementäre cDNA hergestellt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA der glatten Gefäßmuskelzellen mit Random Primer versetzt und der Ansatz mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser aufgefüllt. Die RNA wurde bei 95°C über fünf Minuten denaturiert. Durch Zugabe von Nukleotiden, Puffer, RNase-Inhibitor, dem Enzym MMLV-Reverse Transkriptase und Erhitzen auf 42°C für eine Stunde wurde komplementäre DNA hergestellt. Durch zehnminütiges Erhitzen auf 75°C wurde die Reaktion beendet und das Produkt anschließend bei -20°C gelagert. Das Herstellen der cDNA mittels reverser Transkription war für alle behandelten Zellen identisch.

2.2.5.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezieller DNA-Fragmente. Hierzu wurden jeweils 2 µl der aus der reversen Transkription gewonnenen cDNA mit Aqua bidest, 10x PCR Reaction Buffer, dNTP sowie den jeweiligen 5' und 3'-Primern in einer Konzentration von 50 pmol/l versetzt. In jeden Ansatz wurde Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl) hinzugefügt. Die Probenansätze wurden in der PCR-Maschine unter Verwendung genspezifischer Protokolle zyklisch erhitzt. Die Sequenzen der Primer, PCR-Bedingungen (Denaturierungszeit und -temperatur, Annealingzeit und -temperatur, Extensionszeit/Polymerase-Aktivitätszeit und -temperatur), Zyklenzahl und die Länge der amplifizierten Fragmente sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die gleichen cDNA-Proben wurden für die GAPDH (housekeeping-Gen)-cDNA-Amplifikation benutzt, um sicher zu stellen, dass gleiche Mengen RNA revers transkribiert bzw. gleiche Mengen cDNA in die PCR eingesetzt wurden. Zum Nachweis der Reinheit der verwendeten Substanzen wurde steriles Wasser als Leerwert verwendet, dessen ausbleibende Genamplifikation als Voraussetzung für die Auswertbarkeit des Versuches Bedingung war.

Eine fünfminütige Erhitzung auf 95°C vor Beginn und eine abschließende Erhitzung auf 72°C für zehn Minuten nach Abschluss der Zyklenzahl war bei allen PCR-Versuchen gleich. Durch Pilotexperimente mit wechselnder Zykluszahl und unterschiedlichen cDNA-Mengen wurden die exponentiellen Phasen der PCR bestimmt (Zyklenabhängigkeit). Nach Amplifikation wurden gleiche Mengen der RT-PCR-Reaktionen auf einem Ethidiumbromid gefärbtem 1,5% DNA-Agarose-Gel aufgetrennt. Als Größenmarker der amplifizierten DNA-Fragmente (in Basenpaaren) diente ein Kb plus DNA-Marker. Die Menge der einzelnen Ethidiumbromid markierten Fragmente wurde mittels Laserdensitometrie semiquantitativ bestimmt. Die Standardisierung erfolgte mittels Ziel-Gen/GAPDH Quotient.

Bei der Durchführung der AT₁-Rezeptor-PCR wurde zusätzlich als interner Standard eine Deletionsmutation benutzt. Der interne Standard ist ein Teil des interessierenden Gens, welches gleichzeitig während der PCR des Ziel-Gens amplifiziert wird. Damit der interne Standard vom Wildtyp zu unterscheiden ist, wurde eine Deletionsmutation eingesetzt, die dazu führt, dass das resultierende PCR-Fragment des internen Standards kürzer ist als das des Wildtyps. Hierzu wurde die vollständige AT₁-Rezeptor-cDNA, die sich im Bluescript KS⁺-Plasmid befand, mit der Restriktionsendonuklease MSC I geschnitten und anschließend mit DNA-Ligase religiert. Hieraus resultiert eine AT₁-Rezeptor-cDNA, der die Basen 446-734

fehlen. Das deletionsmutierte Plasmid wurde mit SacI-Verdau linearisiert und anschließend mit Hilfe einer RNA-Polymerase in vitro transkribiert (Megascript-Kit, Ambion, Austin, USA). Das entstandene RNA-Molekül stellte die Matrize des internen Standards für die PCR dar. 1 µg Gesamt-RNA und 10 pg AT₁-Rezeptor-Mutanten-RNA wurden zusammen in die reverse Transkriptionsreaktionen eingesetzt. Die daraus resultierende cDNA wurde dann in die AT₁-Rezeptor-PCR eingesetzt.

Gen	PCR/ Northern Blot	Sense- Primer	Antisense- Primer	Bedin- gungen	Basen paare	Northern Blot cDNA
p22phox	PCR/ Northern Blot	5'-GAC- GCT- TCA- CGC- AGT- GGT- ACT-3'	5'-CAC- GAC- CTC- ATC- TGT- CAC- TGG-3'	60s 94°C; 60s 65°C; 90s 72°C; 30 Zyklen	485	identisch
nox1	PCR	5'-CCC- GCA- ACT- GTT- CAT- ACT-C- 3'	5'-CAT- TGT- CCC- ACA- TTG- GTC-TC- 3'	60s 94°C; 60s 56°C; 90s 72°C; 40 Zyklen	819	kein Northern Blot
ManganSOD (MnSOD)	PCR/ Northern Blot	5'-TGA- CCT- GCC- TTA- CGA- CTA- TG-3'	5'-GCT- GCA- ATG- CTC- TAC- ACT-AC - 3'	60s 94°C; 60s 57°C; 90s 72°C; 25 Zyklen	649	identisch
Kupfer-Zink- SOD (CuZn SOD)	PCR/ Northern Blot	5'-TGG- GGA- CAA-	5'-TAG- CAG- GAC-	60s 94°C; 60s	359	identisch

		TAC- ACA- AGG-3'	AGC- AGA- TGA-G - 3'	53°C; 90s 72°C; 35 Zyklen		
Extrazelluläre SOD (ecSOD)	PCR/ Northern Blot	5'-GGG- AGA- GCT- TGT- CAG- GTG- TGG-3'	5'-GCC- GCT- TCT- TGC- GCT- CCT- TTG-3'	60s 94°C; 60s 60°C; 90s 72°C; 24 Zyklen	736	identisch
Glutathion- Peroxidase (GPX)	PCR/ Northern Blot	5'-AGG- AGA- ATG- GCA- AGA- ATG- AAG-3'	5'-ATC- GGG- AAT- GGA- CGA- GAA-C-3'	45s 94°C; 45s 57°C; 90s 72°C; 33 Zyklen	505	identisch
Katalase	PCR/ Northern Blot	5'-TAC- TAC- CCC- AAC- AGC- TT-3'	5'-GCT- AAG- CCC- TAA- TCT-TTA- A-3'	45s 94°C; 45s 57°C; 90s 72°C; 34 Zyklen	589	identisch
AT ₁ -Rezeptor	Northern Blot	5'-GTC- ATG- ATC- CCT- ACC- CTC- TAC- AGC-3'	5'-CCG- TAG- AAC- AGA- GGG- TTC- AGG- CAG-3'	60s 94°C, 60s 55°C, 60s 72°C, 35 Zyklen	824	

AT ₁ -Rezeptor	PCR	5'-ACC- CTC- TAC- AGC- ATC- ATC- TTT- GTG- GTG- GGG-3'	5'-GGG- AGC- GTC- GAA- TTC- CGA- GAC- TCA- TAA- TGA-3'	30s 94°C,45s 55°C, 45s 72°C, 28 Zyklen	479	andere Primer; s.o.
AT ₁ -Rezeptor- Mutante	PCR	5'-ACC- CTC- TAC- AGC- ATC- ATC- TTT- GTG- GTG- GGG-3'	5'-GGG- AGC- GTC- GAA- TTC- CGA- GAC- TCA- TAA- TGA-3'	30s 94°, 45s 55°, 45s 72°, 28 Zyklen	191	kein Northern Blot
GAPDH	PCR/ Northern Blot	5'-ACC- ACA- GTC- CAT- GCC- ATC- AC-3'	5'-TCC- ACC- ACC- CTG- TTG- CTG-TA- 3'	30s 94°C; 45s 55°C; 45s 72°C; 23 Zyklen	452	identisch

Tabelle 1: Primersequenzen der amplifizierten cDNA-Proben für PCR und Northern Blot; PCR-Bedingungen; Anzahl der Basenpaare nach Amplifikation.; s=Sekunde

2.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Quantifizierung von Proteinen aus glatten Gefäßmuskelzellen erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951), eine der Biuret-Methode verwandte kolorimetrische Methode. Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex reduziert dann ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration blau färbt. Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100-1000 mg/ml.

2.2.7 Katalase Aktivitätsassay

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in eiskaltem 50 mmol/l Kalium-Phosphatpuffer homogenisiert. Durch Zentrifugation wurden zelluläre Reste entfernt. Es folgte die Quantifizierung der Proteinmenge nach Lowry (siehe 2.2.6). Anschließend wurden 200 µg Proteinaliquots in Küvetten überführt, die Kalium-Phosphatpuffer und 5 mmol/l Wasserstoffperoxid enthielten. Die enzymatischen Reaktion der Katalase, die H_2O_2 in H_2O und O_2 umsetzt, wurde bei 240 nm drei Minuten lang mit einem Spektrophotometer (DU 640, Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA) gemessen. Es wurde die abnehmende Menge H_2O_2 gemessen. Eine Einheit Katalase-Aktivität entsprach der Proteinmenge, die 1 µmol H_2O_2 bei 24°C pro Minute enzymatisch umsetzte. Der Extinktionskoeffizient betrug 43,6/mol/cm. Alle Proben wurden vierfach gemessen.

2.2.8 Western Blot

Spezifische Proteine in komplexen Proteingemischen können mit Hilfe des Western Blot identifiziert und quantifiziert werden. Nach größenabhängiger elektrophoretischer Auftrennung der Proteine werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Der Nachweis des Proteins auf der Membran erfolgt mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten enzymgekoppelten Antikörper detektiert.

Zur Proteinisolation wurden glatte Gefäßmuskelzellen in Kultur mit kaltem PBS gewaschen und dann in kaltem Western Blot-Lysepuffer aufgenommen. Die Suspension wurde vermischt, dann für 4 Minuten auf 95°C erhitzt. 1 µl der Probe wurde eingesetzt, um die Proteinmenge der Proben in einem Spectrophotometer (DU 640, Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA) bei 540 nm photometrisch nach Lowry zu quantifizieren. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein jeder Probe verwendet. Sie wurden jeweils mit der gleichen Menge Western Blot Ladepuffer mit 5% 2-Mercaptoethanol vermischt. Um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei Gelsystemen, einem Trenn- und einem Sammelgel, mit unterschiedlicher Porosität und unterschiedlichem pH-Wert des Puffers bestand. Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde der BioRad Prestained SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Standard Low Range Marker mit einer Molekulargewichtsspanne von 21300-112000 Dalton parallel zu den zu untersuchenden Proteinen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Puffer gefüllten Kammer bei konstanter Stromspannung von 150 V - 200 V. Danach wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran (Nitrocellulose, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) übertragen. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleiben, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch identifiziert werden.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte in einer mit Transferpuffer 1 und 2 gefüllten Kammer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) über 1,5 Stunden bei 130 mA. Die Membran wurde dann zum Nachweis der zu untersuchenden Proteine verwendet. Dazu wurde sie über Nacht mit 1%iger Blocking Solution (Western Blocking Reagent, Roche, Mannheim) inkubiert, um unspezifische Bindungsmöglichkeiten der Antikörper auf der Membran abzubinden. Anschließend wurde die Membran mit dem 1:500 verdünnten, primären polyklonalen Katalase Antikörper (SA-115, Biomol, Hamburg) inkubiert. Durch anschließende Waschschrte mit PBS-TWEEN wurde überschüssiger Primärantikörper entfernt. Der an die entsprechenden Proteine gekoppelte Primärantikörper wurde über gegen dessen Isotyp gerichtete Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper (Anti Rabbit IgG, whole molecule, Sigma Aldrich, Steinheim) durch Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur detektiert und nach weiteren Waschschrten mit PBS-TWEEN durch eine anschließende Peroxidase katalysierte Lichtreaktion nachgewiesen. Die Enhanced Chemiluminescence

(ECL) Methode (ECL, Amersham, Braunschweig) ist eine nicht-radioaktive, sensitive Nachweismethode, bei der die Detektion der Proteine auf einer Enzym katalysierten Lichtreaktion beruht. Durch den Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper kommt es zu einer Lichtemission bei 428 nm, wenn H_2O_2 reduziert und Luminol oxidiert wird. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran für eine Minute mit dem entsprechenden Volumen ECL-Detektionsreagenz inkubiert und die Lichtemission durch Auflegen eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham, Braunschweig) detektiert. Der Film wurde anschließend entwickelt und fixiert.

2.2.9 Auswertung

2.2.9.1. Densitometrien und Fotografien

Die Fotografien dieser Arbeit wurden mit Hilfe des UVP ImageStore 7500-Systems (Sony) erstellt. Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele wurden über UV-Licht, Autoradiogramme über weißem Durchlicht (UVP White / UV Transluminator) mit der Videokamera des Systems fotografiert und digital gespeichert. Alle Autoradiogramme wurden mit dem Molecular Dynamics Personal Densitometer 68-272 ausgewertet. Die Signalstärken der jeweiligen Banden wurden gegenüber dem Hintergrund korrigiert. Die Ethidiumbromid gefärbten Gele wurden mit Hilfe der LabWorks-Software (UVP, Inc., Upland, CA, USA) ausgewertet.

2.2.9.2 Statistik

Die aufgeführten Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der Mittelwert ergab sich aus mindestens drei separat durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels des ANOVA-Testes bestimmt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0.05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt von Atorvastatin auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen

Mit der DCF-Fluoreszenz-Lasermikroskopie wurde die Quantität reaktiver Sauerstoffspezies nach Stimulation mit Angiotensin II, Diphenyliodonium, Atorvastatin, L-Mevalonat und 25-Hydroxycholesterin in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen gemessen.

3.1.1 Angiotensin II und Diphenyliodonium

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit Angiotensin II (Ang II, 1 $\mu\text{mol/l}$, 3 Stunden), Diphenyliodonium (DPI, 10 $\mu\text{mol/l}$, 1 Stunde), einem Inhibitor von Flavoproteinen, bzw. mit Ang II plus DPI inkubiert. Nicht behandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrolle (Kon). Nach Inkubation mit Ang II stieg die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies auf $239 \pm 11\%$ im Vergleich zur Kontrolle an ($p < 0.05$ vs. Kon, Mittelwert \pm S.E.M.). Nach alleiniger Inkubation mit DPI wurde eine Produktion von $89 \pm 4\%$ im Vergleich zur Kontrolle gemessen (n.s. vs. Kon, Mittelwert \pm S.E.M.). Nach Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen für drei Stunden mit Ang II und gleichzeitiger Inkubation mit DPI für eine Stunde wurde eine Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies von $105 \pm 4\%$ im Vergleich zur Kontrolle gemessen ($p < 0.05$ vs. Ang II, Mittelwert \pm S.E.M.). Die Ang II induzierte ROS-Freisetzung wurde damit durch DPI aufgehoben. Es wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Abbildung 4 zeigt einen exemplarischen mikroskopischen Scan dieser Messungen. Abbildung 5 zeigt die densitometrische Auswertung aller Versuche.

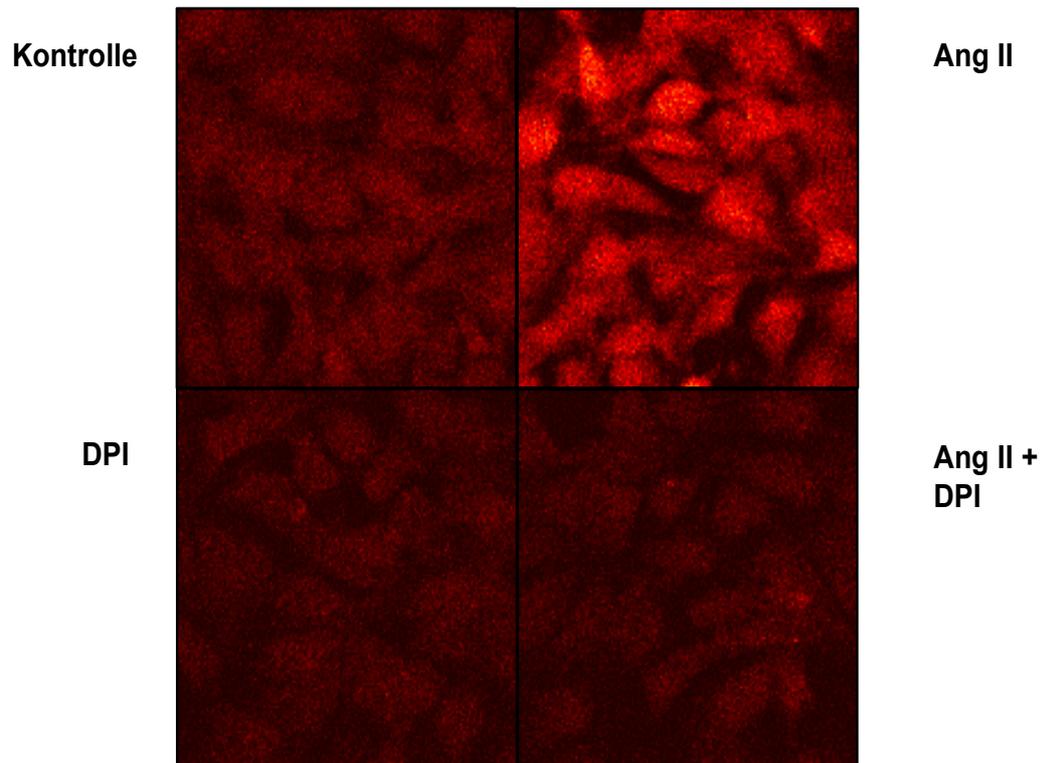


Abb. 4: Angiotensin II verstärkt die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen. Bei Koinkubation mit DPI wird die Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt. Glatte Gefäßmuskelzellen, Angiotensin II (Ang II, 1 $\mu\text{mol/l}$, 3h), Diphenyliodonium (DPI, 10 $\mu\text{mol/l}$, 1h) und Ang II plus DPI; unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen=Kontrolle (Kon). DCF-Fluoreszenz-Lasermikroskopie; repräsentatives lasermikroskopisches Bild.

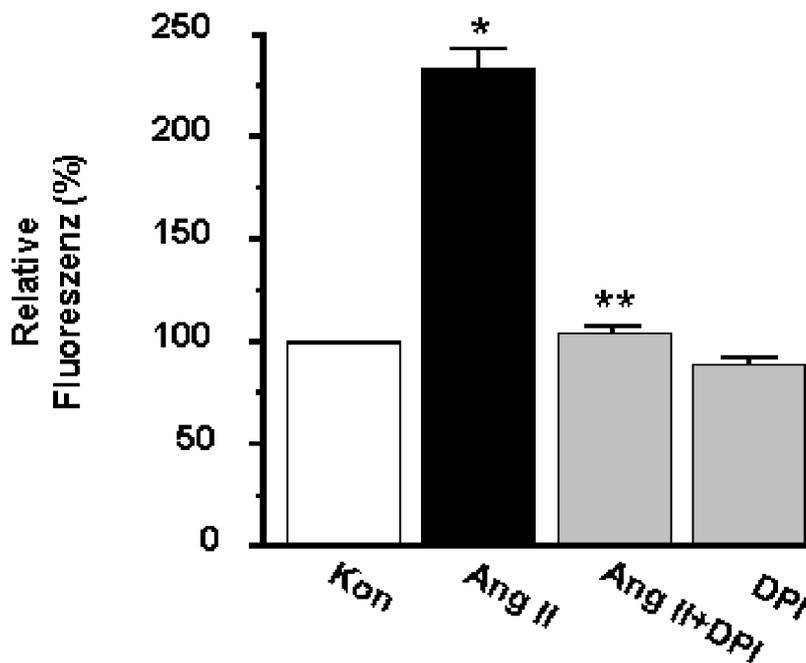


Abb. 5: Die Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wird durch Diphenyliodonium gehemmt. Quantifizierung der DCF-Lasermikroskopie. Glatte Gefäßmuskelzellen, Angiotensin II (Ang II, 1 $\mu\text{mol/l}$, 3h), Diphenyliodonium (DPI, 10 $\mu\text{mol/l}$, 1h) und Ang II plus DPI; unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen=Kontrolle (Kon). Je drei separate Experimente ausgedrückt als relative Fluoreszenz in Prozent (Mittelwert \pm S.E.M). * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0.05$ vs. Ang II

3.1.2 Atorvastatin und L-Mevalonat

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Atorvastatin (Ator, 10 $\mu\text{mol/l}$), Angiotensin II (Ang II, 1 $\mu\text{mol/l}$) und/oder L-Mevalonat (Meva, 200 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrolle (Kon). Dreistündige Inkubation der Zellen mit Ang II bewirkte eine gesteigerte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies auf $201 \pm 7\%$ der Kontrolle ($p < 0.05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.). Nach alleiniger Inkubation mit Atorvastatin für zwölf Stunden wurde eine Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von $108 \pm 9\%$ gemessen (n.s. vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.). Nach zwölfstündiger Vorinkubation mit Atorvastatin wurde die Ang II induzierte Produktion (drei Stunden Inkubation) reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt. Gemessen wurden $92 \pm 13\%$ der Kontrolle ($p < 0.05$ vs. Ang II, Mittelwert \pm S.E.M.).

Nach gleichzeitiger Inkubation mit L-Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase, wurde die Wirkung von Atorvastatin auf die Ang II induzierte ROS-Produktion aufgehoben. Nach zwölfstündiger Inkubation mit L-Mevalonat plus Atorvastatin gefolgt von einer dreistündigen Stimulation der Zellen mit Angiotensin II wurde eine Produktion reaktiver

Sauerstoffspezies von $197 \pm 35\%$ der Kontrolle gemessen ($p < 0.05$ vs. Kon, Mittelwert \pm S.E.M.). Die Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen mit L-Mevalonat alleine für zwölf Stunden führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ($106 \pm 17\%$ der Kontrolle; n.s. vs. Kon, Mittelwert \pm S.E.M.). Abbildung 6 zeigt repräsentative lasermikroskopische Bilder. Die Quantifizierung erfolgte aus drei separaten Versuchsreihen (Abbildung 7).

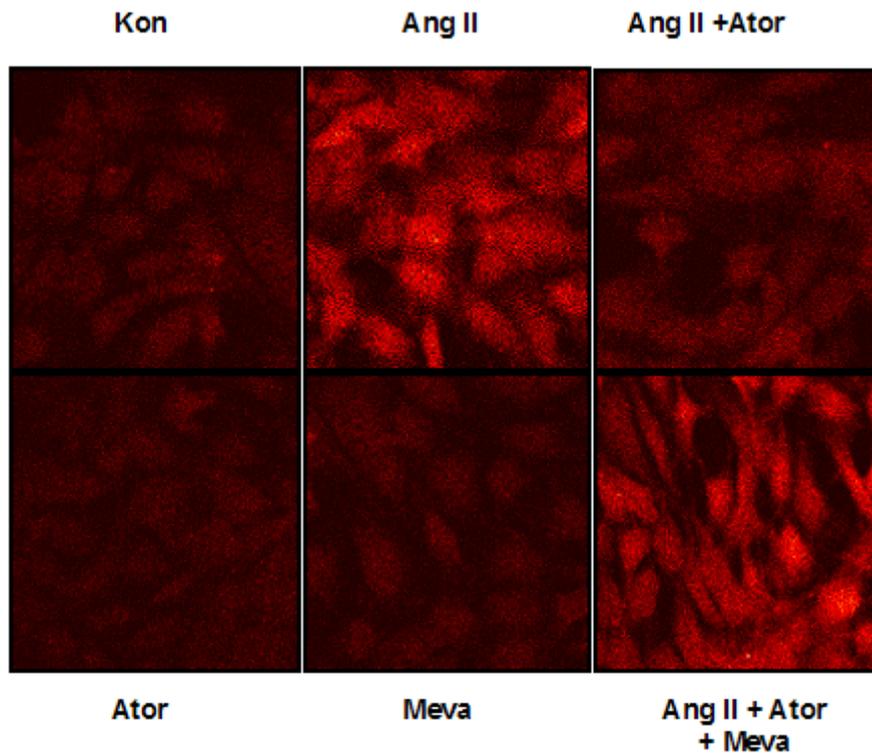


Abb. 6: Atorvastatin bewirkt eine Reduktion der Angiotensin II induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen. Mevalonat hebt diesen Atorvastatin-Effekt auf. Glatte Gefäßmuskelzellen, Atorvastatin (Ator, $10 \mu\text{mol/l}$, 12h), L-Mevalonat (Meva, $200 \mu\text{mol/l}$, 12h), Angiotensin II (Ang II, $1 \mu\text{mol/l}$, 3h) und Ang II plus Ator bzw. Ang II plus Ator plus Meva; unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen=Kontrolle (Kon). DCF-Fluoreszenz-Lasermikroskopie; repräsentatives lasermikroskopisches Bild.

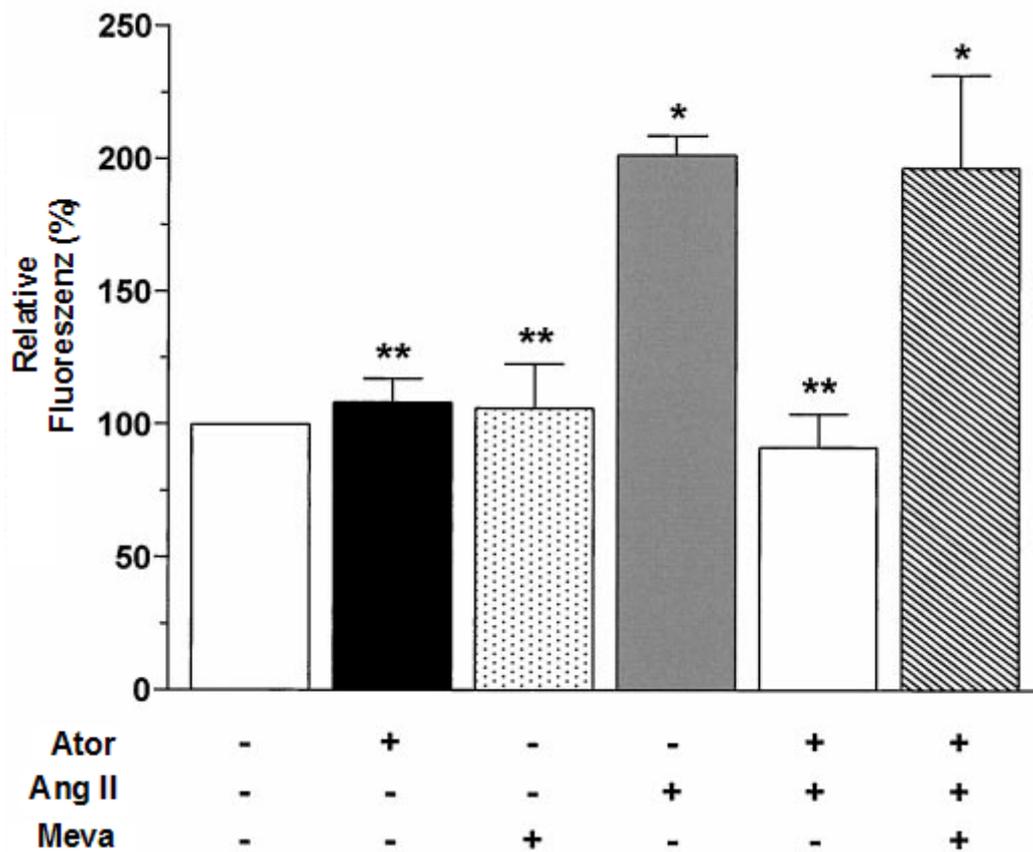


Abb. 7: Atorvastatin bewirkt eine Reduktion der Angiotensin II induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen. Mevalonat hebt diesen Atorvastatin-Effekt auf. Quantifizierung der mittels DCF-Fluoreszenz-Lasermikroskopie gemessenen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Atorvastatin (Ator, 10 $\mu\text{mol/l}$, 12h), L-Mevalonat (Meva, 200 $\mu\text{mol/l}$, 12h), Angiotensin II (Ang II, 1 $\mu\text{mol/l}$, 3h). Je drei separate Experimente ausgedrückt als relative Fluoreszenz in Prozent. (Mittelwert \pm S.E.M.). * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0.05$ vs. Ang II

3.1.3 25-Hydroxycholesterin

Zur Untersuchung der Frage, ob der Effekt des Statins auf die ROS-Produktion durch eine Cholesterindepletion bewirkt wird, wurde der Effekt von 25-Hydroxycholesterin auf die Atorvastatin bedingte Hemmung der Ang II induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies untersucht. Es wurden glatte Gefäßmuskelzellen mit Angiotensin II (1 $\mu\text{mol/l}$), Atorvastatin (10 $\mu\text{mol/l}$), 25-Hydroxycholesterin (5 $\mu\text{g/ml}$) und/oder L-Mevalonat (200 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrollzellen. Die Quantifizierung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte ebenfalls mit der DCF-Fluoreszenz-Lasermikroskopie (vier separate Versuchsreihen). Nach dreistündiger Inkubation mit Ang II wurde eine Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von $240 \pm 21\%$ der Kontrolle gemessen ($p < 0.05\%$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.). Eine zwölfstündige

Präinkubation mit Atorvastatin bewirkte eine Abnahme der Angiotensin II induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies auf $110 \pm 10\%$ der Kontrolle ($p < 0.05$ vs. Ang II, Mittelwert \pm S.E.M.). Nach Präinkubation über zwölf Stunden mit Atorvastatin plus 25-Hydroxycholesterin wurde eine Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von $114 \pm 9\%$ der Kontrolle gemessen ($p < 0.05$ vs. Ang II, Mittelwert \pm S.E.M.). Die zwölfstündige Präinkubation mit L-Mevalonat plus Atorvastatin führte hingegen zu einer Angiotensin II induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies von $246 \pm 17\%$ der Kontrolle ($p < 0.05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.). Der Effekt von Atorvastatin auf die Ang II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde durch den Zusatz von L-Mevalonat aufgehoben, durch 25-Hydroxycholesterin hingegen nicht. Die Quantifizierung der gemessenen Sauerstoffradikalfreisetzung ist in Abbildung 8 dargestellt. Alleinige Inkubation mit Atorvastatin, L-Mevalonat oder 25-Hydroxycholesterin in den angegebenen Konzentrationen über jeweils 12 Stunden zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 9).

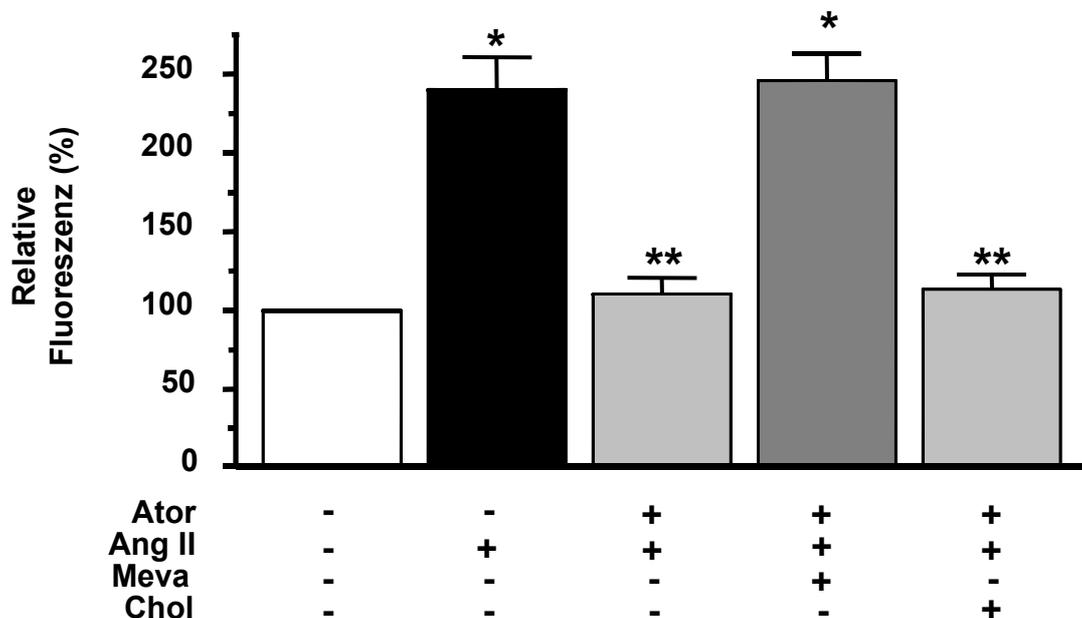


Abb. 8: Hydroxycholesterin hebt die Atorvastatin bedingte Hemmung der Angiotensin II induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in glatten Gefäßmuskelzellen nicht auf. Quantifizierung der mittels DCF-Fluoreszenz-Lasermikroskopie gemessenen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Atorvastatin (Ator, $10 \mu\text{mol/l}$, 12 h), L-Mevalonat (Meva, $200 \mu\text{mol/l}$, 12 h), 25-Hydroxycholesterin (Chol, $5 \mu\text{g/ml}$, 12 h), Angiotensin II (Ang II, $1 \mu\text{mol/l}$, 3 h). Je vier separate Experimente ausgedrückt als relative Fluoreszenz in Prozent. (Mittelwert \pm S.E.M.). * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0.05$ vs. Ang II

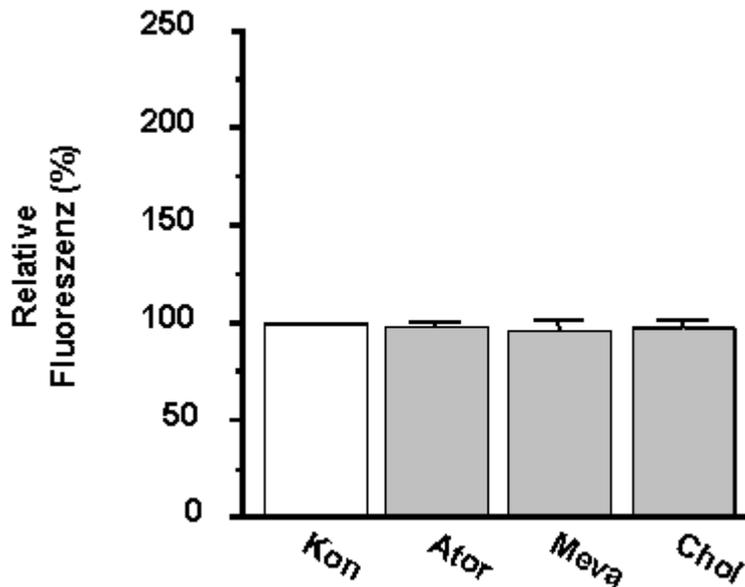


Abb. 9: Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit Atorvastatin oder Mevalonat oder Hydroxycholesterin alleine hat keinen signifikanten Effekt auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Quantifizierung der mittels DCF-Fluoreszenz-Lasermikroskopie gemessenen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Atorvastatin (Ator, 10 $\mu\text{mol/l}$, 12 h), L-Mevalonat (Meva, 200 $\mu\text{mol/l}$, 12 h), 25-Hydroxycholesterin (Chol, 5 $\mu\text{g/ml}$, 12 h). Je vier separate Experimente ausgedrückt als relative Fluoreszenz in Prozent. Mittelwert \pm S.E.M..

3.2 Effekt von Atorvastatin auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen

Um zu untersuchen, ob die Atorvastatin vermittelte Hemmung der Angiotensin II induzierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies über eine Regulation der AT₁-Rezeptor-Expression vermittelt wird, wurde der Effekt von Atorvastatin sowie der HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin und Lovastatin auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors anhand von Northern Blot-Experimenten untersucht.

Weiterhin wurde untersucht, welche Wirkung die spezifische Inhibition der Geranylgeranylierung auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors hat.

3.2.1 Zeitabhängiger Effekt von Atorvastatin

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin für 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden stimuliert. Die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression wurde mittels Northern Blot in 10 μg Gesamt-RNA untersucht. Abbildung 10 zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm. In

Abbildung 11 ist die densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Es ergab sich eine zeitabhängige Reduktion der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression durch Stimulation mit Atorvastatin. Der Effekt von Atorvastatin erreicht nach vier Stunden ein Wirkmaximum mit einer AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression von 55±5% der Kontrolle (p<0.05% vs. Kontrolle, Mittelwert±S.E.M.). Als Kontrolle diente der Null-Stunden-Wert, also Zellen, die nicht mit Atorvastatin stimuliert wurden. Als Kontrolle der Gesamt-RNA-Beladung diente die 18S-rRNA-Bande des entsprechenden Agarosegels. Hier wurde eine gleichmäßige Beladung und die Integrität der Gesamt-RNA verifiziert.

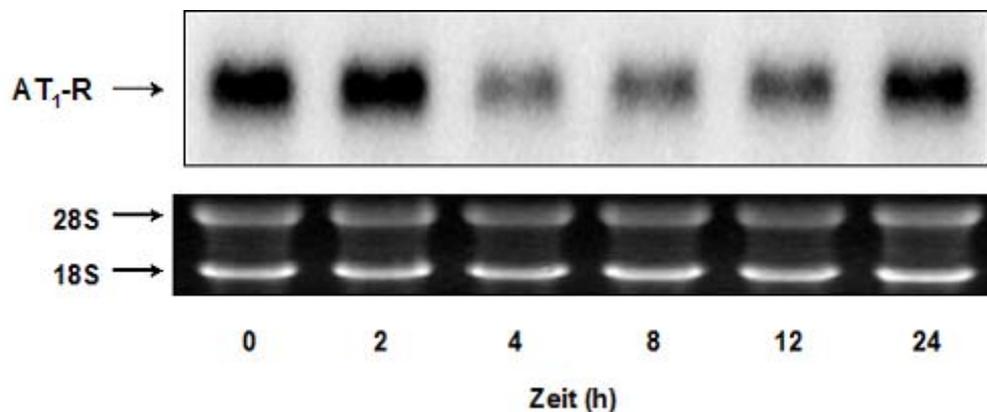


Abb. 10: Zeitabhängiger Effekt von Atorvastatin auf die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression. Die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression nahm unter Stimulation mit 10 µmol/l Atorvastatin mit einem Wirkmaximum nach vier Stunden ab. 10 µg Gesamt-RNA, der mit Atorvastatin (10 µmol/l, 0-24 h) inkubierten glatten Gefäßmuskelzellen. Oben: Autoradiogramm eines repräsentativen Northern Blots. Unten: Zugehörige ribosomale RNA in gleichmäßiger Beladung (Ethidiumbromid gefärbt). AT₁-R: AT₁-Rezeptor; 18S/28S: 18S/28S ribosomale RNA

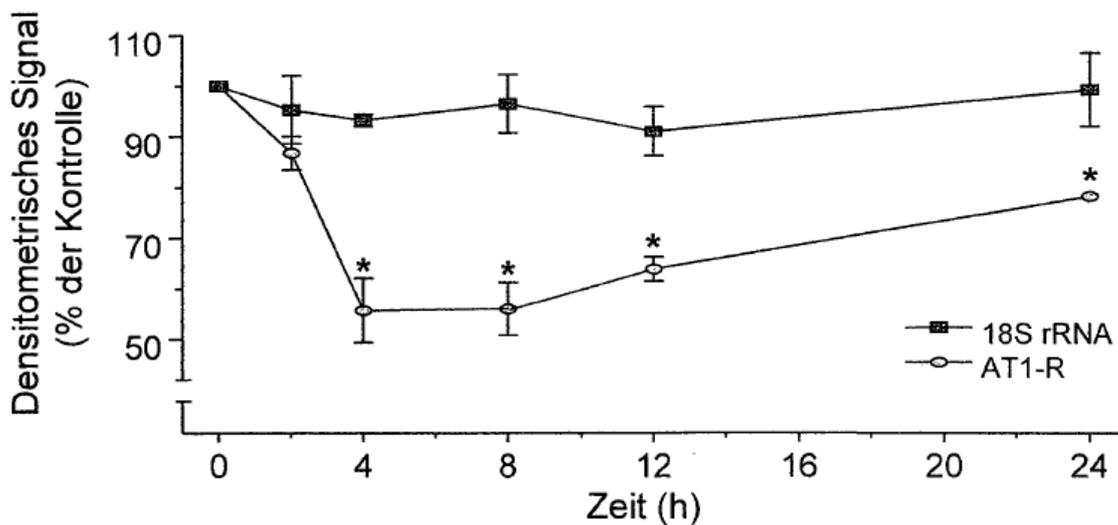


Abb. 11: Densitometrische Auswertung des zeitabhängigen Effektes von Atorvastatin auf die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression (Northern Blot). Der Mittelwert entspricht dem auf den Kontrollwert (Null-Stunden-Wert) bezogenen Hybridisierungssignal von vier verschiedenen Experimenten. Mittelwert±S.E.M.; n=4; (*p<0.05 vs. Kontrolle). AT1-R: AT₁-Rezeptor-mRNA; 18S: 18S rRNA

3.2.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von Atorvastatin

Um zu überprüfen, ob die Konzentration des eingesetzten Atorvastatins Einfluss auf die Regulation des AT₁-Rezeptors hat und welche minimale Atorvastatin-Menge eingesetzt werden muss, um einen signifikanten Effekt zu erzielen, wurden glatte Gefäßmuskelzellen mit aufsteigenden Konzentrationen von Atorvastatin (0,1 nmol/l bis 100 µmol/l) für vier Stunden stimuliert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrollzellen. Die konzentrationsabhängige Veränderung der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression wurde mittels Northern Blot untersucht. Abbildung 12 zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm. In Abbildung 13 ist die densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Stimulation mit 100 µmol/l Atorvastatin bewirkte eine maximale Reduktion der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression auf 15±4% (p<0.05 vs. Kontrolle, Mittelwert±S.E.M.) im Vergleich zur nicht Atorvastatin stimulierten Kontrolle. Bei einer Konzentration von 1 µmol/l Atorvastatin ergab sich noch eine signifikante Reduktion der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression (69±2%; p<0.05 vs. Kontrolle, Mittelwert±S.E.M.). Niedrigere Konzentrationen hatten keinen signifikanten Effekt mehr auf die AT₁-Rezeptor-Regulation.

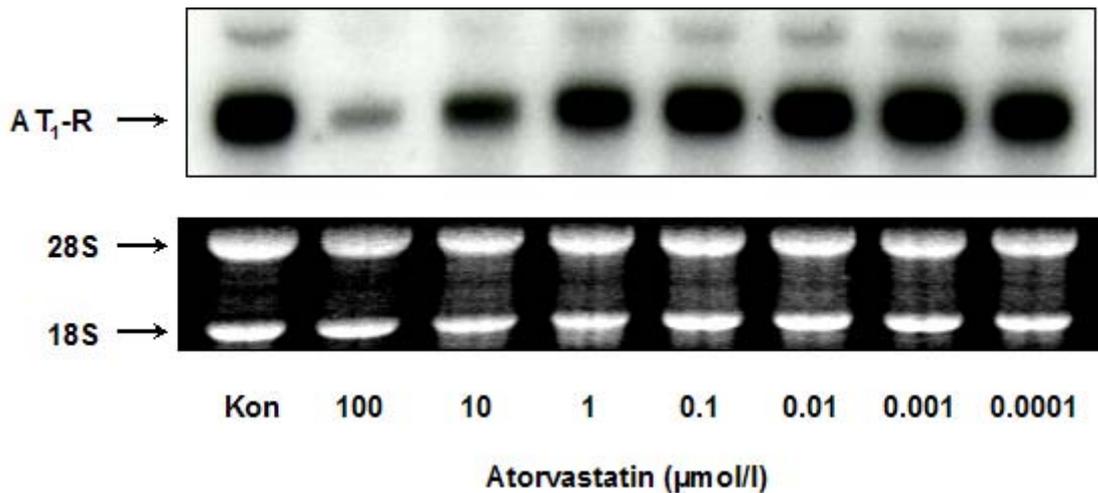


Abb. 12: Konzentrationsabhängiger Effekt von Atorvastatin auf die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression. Maximale Reduktion der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression unter Stimulation mit 100 μmol/l Atorvastatin. 10 μg Gesamt-RNA, der mit Atorvastatin (0,1 nmol/l – 100 μmol/l, 4 h) inkubierten glatten Gefäßmuskelzellen. Oben: Autoradiogramm eines repräsentativen Northern Blots. Unten: Zugehörige ribosomale RNA in gleichmäßiger Beladung (Ethidiumbromid gefärbt). AT₁-R: AT₁-Rezeptor; 18S/28S: 18S/28S rRNA

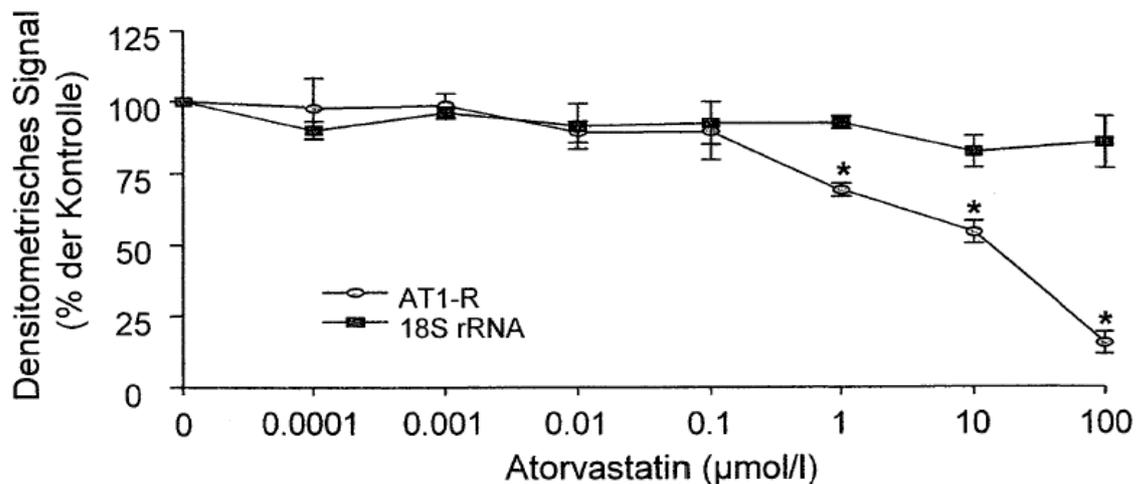


Abb. 13: Densitometrische Auswertung des konzentrationsabhängigen Effektes von Atorvastatin auf die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression (Northern Blot). Atorvastatin 0,0001 μmol/l – 100 μmol/l. Der Mittelwert entspricht dem Hybridisierungssignal von vier verschiedenen Experimenten bezogen auf den Kontrollwert (Null-Stunden-Wert). Mittelwert±S.E.M; *=p<0.05 vs. Kontrolle; n=4.

3.2.3 Simvastatin und Lovastatin

Um zu untersuchen, ob andere HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren den gleichen Effekt wie Atorvastatin auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors haben, wurden Northern Blot Experimente mit Simvastatin und Lovastatin durchgeführt. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden

vier Stunden lang mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin, 1, 10 oder 50 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin oder 1, 10 oder 50 $\mu\text{mol/l}$ Lovastatin inkubiert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrollzellen. Die mRNA-Expression des AT_1 -Rezeptors ging unter Lovastatin (50 $\mu\text{mol/l}$) auf $67\pm 11\%$ gegenüber der Kontrolle ($p < 0.05\%$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.) zurück. Inkubation mit 50 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin führte zu einer Reduktion der mRNA-Expression des AT_1 -Rezeptors auf $56\pm 3\%$ gegenüber der Kontrolle ($p < 0.05\%$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.). Atorvastatin bewirkte im Vergleich eine Reduktion der AT_1 -Rezeptor-mRNA-Expression auf $54\pm 4\%$ der Kontrolle ($p < 0.05\%$ der Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.). Die 18S-rRNA-Expression blieb unverändert. Die densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 14 dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich um einen Klasseneffekt der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren handelt.

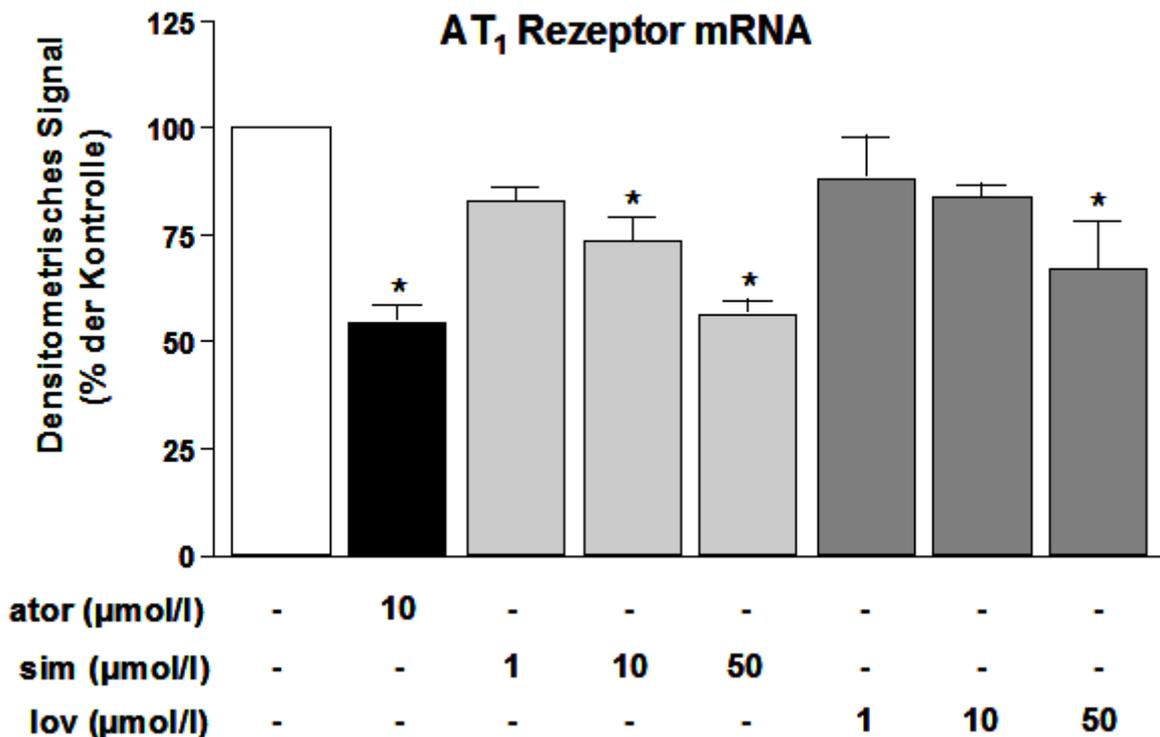


Abb. 14: Die HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin, Lovastatin und Simvastatin bewirken eine Reduktion der AT_1 -Rezeptor-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen. Densitometrische Auswertung des Effektes nach vierstündiger Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit Atorvastatin (ator, 10 $\mu\text{mol/l}$), Simvastatin (sim, 1,10, 50 $\mu\text{mol/l}$) oder Lovastatin (lov, 1,10,50 $\mu\text{mol/l}$) auf die AT_1 -Rezeptor-mRNA-Expression. Der Mittelwert entspricht dem Hybridisierungssignal von vier verschiedenen Experimenten bezogen auf den Kontrollwert (Zellen ohne Stimulation). Mittelwert \pm S.E.M.; *= $p < 0.05$ vs. Kontrolle; n=4

3.2.4 Inhibition der Geranylgeranylierung

Statine vermindern nicht nur die Cholesterinproduktion, sondern inhibieren auch die Bildung spezifischer Isoprenoide, die für die Regulation spezifischer Zellfunktionen eine Bedeutung haben. Zur Untersuchung der Frage, über welchen Mechanismus Statine Einfluss auf die AT₁-Rezeptor-Regulation nehmen, wurde daher in Northern Blot-Experimenten die Wirkung der spezifischen Inhibition der Geranylgeranylierung auf die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression untersucht. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für vier Stunden mit Atorvastatin (10 µmol/l), Atorvastatin (10 µmol/l) plus L-Mevalonat (200 µmol/l), Atorvastatin (10 µmol/l) plus 25-Hydroxycholesterin (5 µg/ml), Geranylgeranyl-Transferase-Inhibitor GGTI-286 (50 µmol/l) bzw. Farnesyl-Transferase-Inhibitor FTI (10 nmol/l) inkubiert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrollzellen. Atorvastatin führte zu einer signifikanten Herabregulation der mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors (54±3% der Kontrolle, Mittelwert±S.E.M., p<0.05 vs Kontrolle). L-Mevalonat bewirkte eine Aufhebung des Atorvastatin induzierten Effektes (95±5%, Mittelwert±S.E.M., p<0.05 vs. Atorvastatin). 25-Hydroxycholesterin hingegen konnte die Wirkung des Atorvastatins auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors nicht aufheben (53±10%, Mittelwert±S.E.M., p<0.05 vs. Kontrolle).

Inkubation mit GGTI reduzierte die Expression der mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors auf 53±6% der Kontrolle (Mittelwert±S.E.M., p<0.05 vs. Kontrolle). Nach Inkubation mit FTI hingegen wurde eine mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors von 101±4% (Mittelwert±S.E.M., p<0.05 vs. Atorvastatin) gemessen. Die 18S-rRNA-Expression blieb unverändert. Abbildung 15 zeigt die densitometrische Auswertung der Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die HMG-CoA-Reduktase-Inhibition spezifisch für den Atorvastatin vermittelten Effekt auf die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression ist und dass der Effekt unabhängig von der Cholesterinsenkung in der Zelle ist. Desweiteren zeigt sich, dass die Inhibition der Geranylgeranylierung eine wesentliche Rolle spielt, nicht aber die Hemmung der Farnesylierung. Beide Prozesse treten durch die verminderte Isoprenoidbildung unter HMG-CoA-Reduktase-Inhibition durch Statine auf.

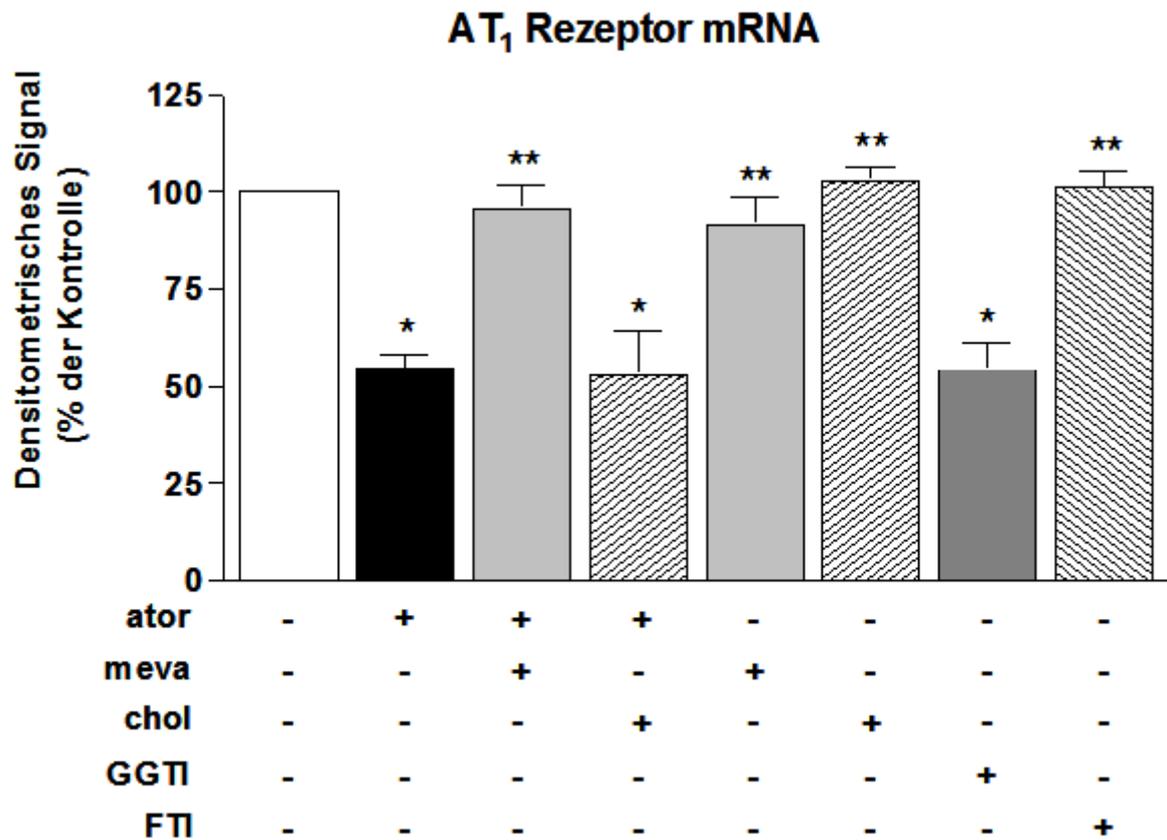


Abb. 15: Inhibition der Geranylgeranylierung vermindert die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen. Diese wurden vier Stunden lang mit Atorvastatin (ator, 10 µmol/l), L-Mevalonat (meva, 200 µmol/l), 25-Hydroxycholesterin (chol, 5 µg/ml), ator plus meva, ator plus chol, bzw. mit Geranylgeranyltransferase-Inhibitor (GGTI, 50 µmol/l) oder Farnesyltransferase-Inhibitor (FTI, 10 nmol/l) inkubiert. Dargestellt ist das relative Hybridisierungssignal drei separater Northern Blot-Experimente bezogen auf den Kontrollwert (Zellen ohne Stimulation). Mittelwert ±S.E.M; *=p<0.05 vs. Kontrolle, **=p<0.05 vs. Atorvastatin; n=3

3.3 Effekt von Atorvastatin auf die Expression der NAD(P)H-Oxidase in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen

Die NAD(P)H-Oxidase ist eines der wichtigsten ROS produzierenden Enzymsysteme in der Gefäßwand. Der Enzymkomplex wird durch Angiotensin II über Stimulation des AT₁-Rezeptors aktiviert. Die Wirkung von Atorvastatin auf die mRNA-Expression der wichtigen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22phox und nox1 wurde durch reverse Transkription und nachfolgende semiquantitative PCR bzw. mit Hilfe von Northern Blot-Experimenten untersucht. Aus der selben Gesamt-RNA wurden GAPDH-PCR bzw. Northern Blot-Versuche angefertigt.

3.3.1 mRNA-Expression der p22phox-Untereinheit

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden mit 10 µmol/l Atorvastatin inkubiert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrollzellen (Null-Stunden-Wert). Mit der gewonnenen Gesamt-RNA wurden Northern Blot-Versuche durchgeführt. Die mRNA-Expression der p22phox-Untereinheit zeigte nach Atorvastatin-Stimulation im Vergleich zur GAPDH-mRNA-Expression keine signifikante Veränderung in der densitometrischen Auswertung dreier unabhängiger Versuche (nicht dargestellt). Abbildung 16 zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm dieser Versuchsreihe.

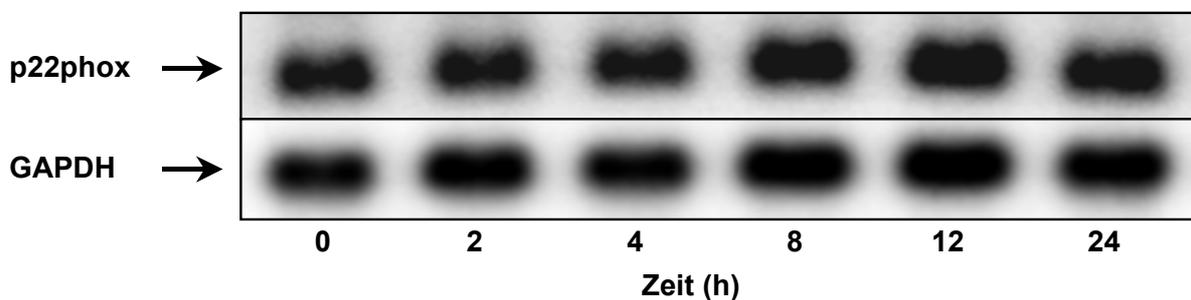


Abb. 16: Atorvastatin hat keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression der p22phox-Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase und zugehöriger GAPDH in glatten Gefäßmuskelzellen. Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit 10 µmol/l Atorvastatin für 0,2,4,8,12,24 Stunden. Kontrolle=0 Stunden. Repräsentatives Autoradiogramm eines Northern Blot-Experimentes.

3.3.2 mRNA-Expression der nox1-Untereinheit

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden mit 10 µmol/l Atorvastatin inkubiert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrollzellen (Null-Stunden-Wert). Die Gesamt-RNA wurde gewonnen und mittels reverser Transkription in komplementäre DNA überführt. Anschließend wurde eine AT₁-Rezeptor-PCR durchgeführt. Aus derselben cDNA wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt. Die densitometrische Auswertung von vier unabhängigen Experimenten zeigte eine Reduktion der mRNA-Expression der nox1-Untereinheit auf maximal 26±5% der Kontrolle ($p < 0.05$ vs. Kontrolle, Mittelwert±S.E.M.) nach achtstündiger Inkubation mit Atorvastatin (nicht dargestellt). Abbildung 17 zeigt ein repräsentatives Agarosegel dieser Versuchsreihe.

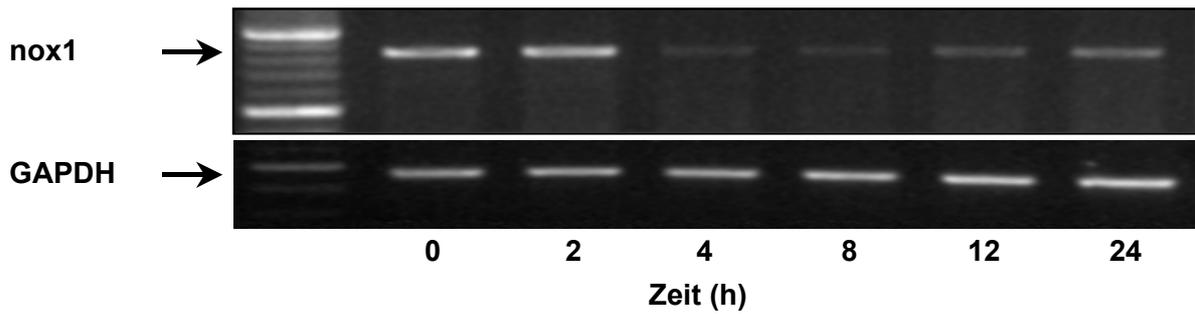


Abb. 17: Atorvastatin bewirkt eine verminderte nox1-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 0,2,4,8,12,24 Stunden mit 10 µmol/l Atorvastatin behandelt. Kontrolle=0 Stunden. Repräsentatives Agarosegel der amplifizierten nox1 und GAPDH-DNA-Fragmente nach RT-PCR.

3.3.3 Effekt von L-Mevalonat auf die Atorvastatin vermittelte Herabregulation der nox1-mRNA-Expression

Um zu untersuchen, ob die Atorvastatin bedingte Reduktion der nox1-mRNA-Expression spezifisch durch die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase hervorgerufen wird, wurden RT-PCR-Versuche mit RNA aus glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführt, die acht Stunden mit Atorvastatin (10 µmol/l) plus L-Mevalonat (200 µmol/l), Atorvastatin (10 µmol/l) plus 25-Hydroxycholesterin (5 µg/ml), L-Mevalonat (200 µmol/l), Atorvastatin (10 µmol/l) oder 25-Hydroxycholesterin (5 µg/ml) inkubiert wurden. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrollzellen. Der Effekt des Atorvastatins auf die mRNA-Expression der nox1-Untereinheit wurde durch L-Mevalonat aufgehoben, nicht aber durch 25-Hydroxycholesterin. L-Mevalonat oder 25-Hydroxycholesterin alleine hatten keinen Effekt auf die Expression der nox1. In Abbildung 18 ist ein repräsentatives Bild eines Agarosegels dargestellt, das die amplifizierten nox1- und GAPDH-PCR-Fragmente nach RT-PCR zeigt.

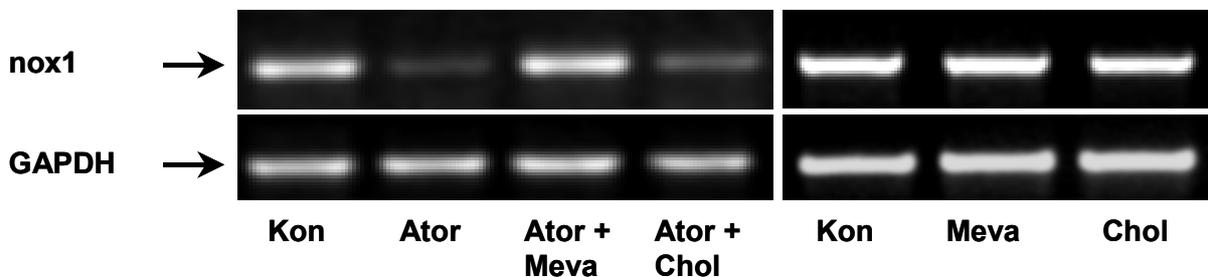


Abb. 18: L-Mevalonat hebt die Atorvastatin induzierte Reduktion der nox1-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen auf. Unbehandelte Kontrollzellen (Kon), Atorvastatin (Ator; 10 µmol/l, 8 h), L-Mevalonat (Meva; 200 µmol/l, 8h), 5-Hydroxycholesterin (Chol; 5 µg/ml, 8 h). Repräsentatives Agarosegel der amplifizierten nox1 und GAPDH-DNA-Fragmente nach RT-PCR.

3.4 Effekt von Atorvastatin auf die Expression antioxidativer Enzymsysteme in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen

Im Gefäßsystem werden verschiedene Enzyme exprimiert, die reaktive Sauerstoffspezies eliminieren. Diese antioxidativen Enzyme sind wichtig für die Erhaltung des Gleichgewichtes aus Generierung und Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies. Der Einfluss von Atorvastatin auf die mRNA-Expression verschiedener antioxidativer Enzyme wurde in Northern-Blot-Experimenten untersucht. Es wurden die Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD), extrazelluläre SOD (ecSOD), Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD), Glutathion-Peroxidase (GPX) und Katalase untersucht.

3.4.1 mRNA-Expression der MnSOD, ecSOD, GPX und CuZnSOD

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden mit 10 µmol/l Atorvastatin stimuliert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrolle. Die Gesamt-RNA wurde gewonnen. Zur Hybridisierung im Northern Blot wurde die entsprechende cDNA des antioxidativen Enzyms bzw. der GAPDH eingesetzt. Abbildung 19 zeigt je ein repräsentatives Ergebnis des betreffenden Northern Blots. Die mRNA-Expression der MnSOD, ecSOD, GPX und CuZnSOD zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen und zur GAPDH-Expression eine signifikante Veränderung in der densitometrischen Auswertung dreier unabhängiger Experimente (nicht dargestellt).

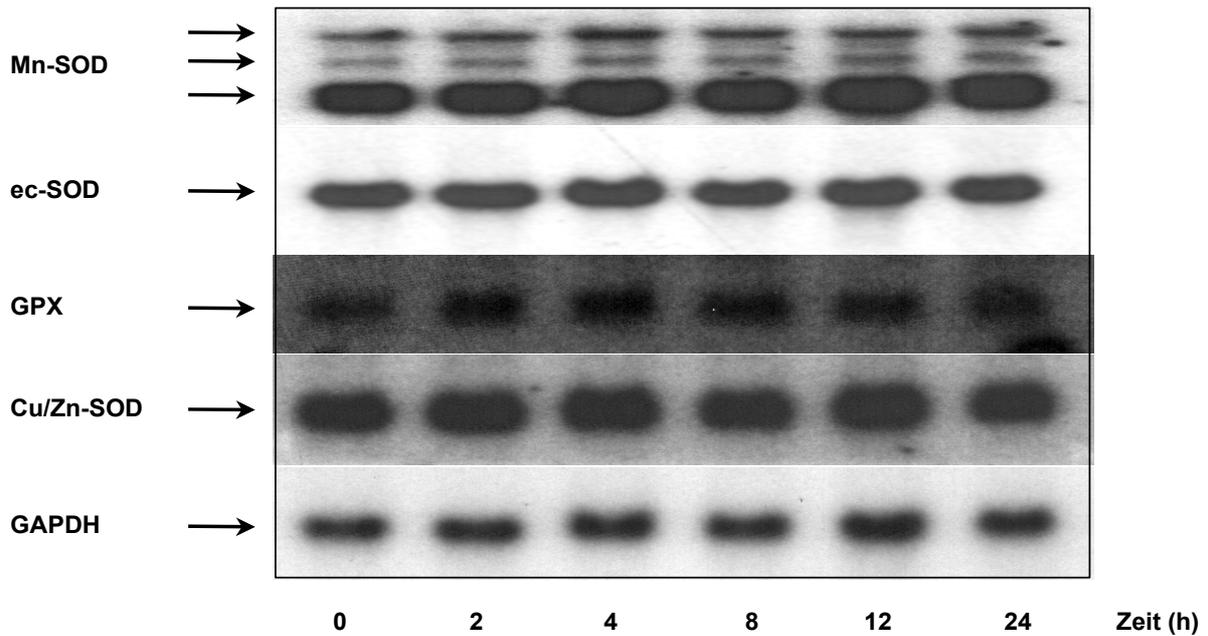


Abb. 19: Atorvastatin hat keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression der MnSOD, ecSOD, GPX und CuZnSOD im Vergleich zur GAPDH-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen. Atorvastatin (10 µmol/l, 0,2,4,8,12,24 h). Repräsentatives Autoradiogramm der betreffenden Northern Blot-Experimente.

3.4.2 mRNA-Expression der Katalase

Die mRNA-Expression der Katalase wurde ebenfalls mittels Northern-Blot untersucht. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden mit 10 µmol/l Atorvastatin stimuliert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrolle. Die Gesamt-RNA wurde gewonnen. Mit Katalase-cDNA erfolgte die Northern Blot-Hybridisierung. Nach zwölf Stunden Inkubation mit 10 µmol/l Atorvastatin zeigte sich eine maximale Heraufregulation der Katalase mRNA-Expression auf $227 \pm 6\%$ der Kontrolle in drei unabhängigen Experimenten ($p < 0.05$ vs. Kontrolle; Mittelwert \pm S.E.M.; nicht dargestellt). Die Expression der GAPDH blieb unverändert. Abbildung 20 zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm dieser Versuchsreihe.

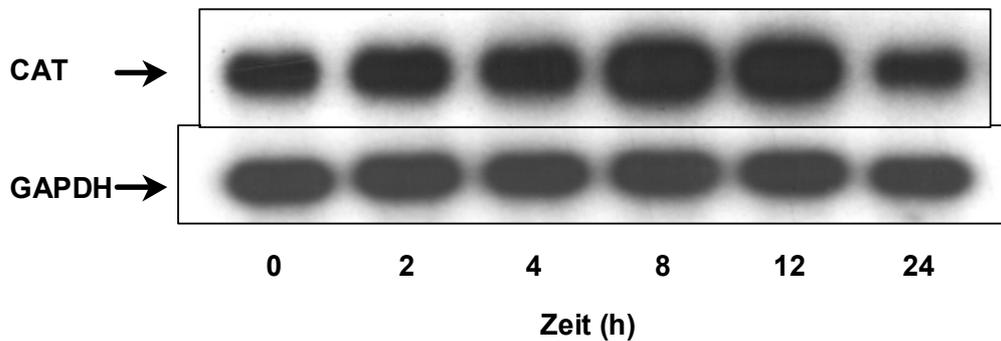


Abb. 20: Atorvastatin bewirkt eine Heraufregulation der mRNA-Expression der Katalase in glatten Gefäßmuskelzellen. Glatte Gefäßmuskelzellen, Atorvastatin (10 $\mu\text{mol/l}$, 0,2,4,8,12,24 h). Katalase (CAT) und zugehörige GAPDH. Repräsentatives Autoradiogramm der Northern Blot-Experimente.

3.4.3 Effekt von L-Mevalonat auf die Atorvastatin vermittelte Heraufregulation der Katalase-mRNA-Expression

Zur Untersuchung der Frage, ob der Atorvastatin-Effekt auf die mRNA-Expression der Katalase spezifisch durch die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase hervorgerufen wird, wurden glatte Gefäßmuskelzellen mit Atorvastatin, L-Mevalonat und 25-Hydroxycholesterin inkubiert. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für acht Stunden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin, 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin plus L-Mevalonat (200 $\mu\text{mol/l}$), 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin plus 25-Hydroxycholesterin (5 $\mu\text{g/ml}$), L-Mevalonat (200 $\mu\text{mol/l}$) oder 25-Hydroxycholesterin (5 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrolle. Mit der gewonnenen Gesamt-RNA wurden Northern Blot-Experimente durchgeführt. Abbildung 21 zeigt ein repräsentatives Bild eines Autoradiogrammes dieser Versuche. Der Atorvastatin-Effekt auf die mRNA-Expression der Katalase wurde durch L-Mevalonat aufgehoben, nicht aber durch 25-Hydroxycholesterin.

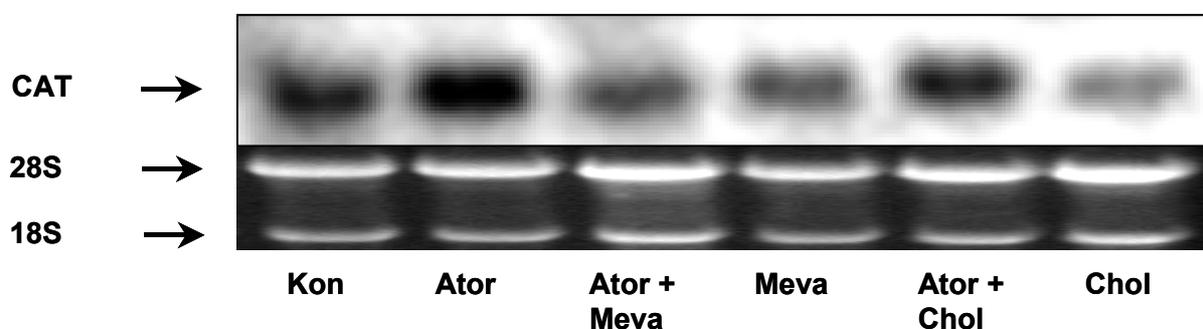


Abb. 21: L-Mevalonat hebt die Atorvastatin induzierte Heraufregulation der mRNA-Expression der Katalase auf. Katalase (CAT)-mRNA-Expression im Vergleich zur ribosomalen RNA-Expression. Glatte Gefäßmuskelzellen, Atorvastatin (Ator, 10 $\mu\text{mol/l}$, 8h), L-Mevalonat (Meva, 200 $\mu\text{mol/l}$, 8h), 25-Hydroxycholesterin (Chol, 5 $\mu\text{g/ml}$, 8h). Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienten als Kontrolle (Kon). Repräsentatives Autoradiogramm der Northern Blot-Experimente.

3.4.4 Proteinexpression der Katalase

Northern Blot-Experimente zeigten, dass Atorvastatin eine verstärkte mRNA-Expression der Katalase in glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt. Zur Untersuchung der Atorvastatin-Wirkung auf die Proteinexpression der Katalase wurden Western Blot-Versuche durchgeführt. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin für 24 Stunden inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Atorvastatin bewirkte in drei unabhängigen Versuchen eine Heraufregulation der Proteinexpression der Katalase. Abbildung 22 zeigt einen repräsentativen Western Blot.

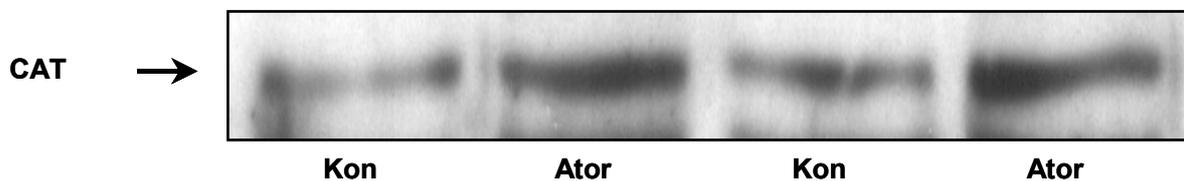


Abb. 22: Atorvastatin bewirkt eine Heraufregulation der Proteinexpression der Katalase (CAT) in glatten Gefäßmuskelzellen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Kon). Atorvastatin (Ator, 10 $\mu\text{mol/l}$, 24 h). Repräsentativer Immunoblot.

3.4.5 Aktivität der Katalase

Der Effekt von Atorvastatin auf die Enzymaktivität der Katalase wurde mittels spektrophotometrischer Quantifizierung der Konversion von H_2O_2 in H_2O und O_2 in einer Suspension mit Proteinen glatter Gefäßmuskelzellen untersucht. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden über 24 Stunden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Atorvastatin inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollzellen. Nach Gewinnung und Quantifizierung der Proteine erfolgte die Messung der Katalase-Aktivität mittels Spektrophotometer. Die Messung unbehandelter Kontrollzellen ergab eine Aktivität von $4,1 \pm 1,0$ U/mg Protein. Unter Atorvastatin-Stimulation stieg die Aktivität der Katalase auf $6,7 \pm 0,6$ U/mg Protein ($p < 0,05$ vs. Kontrolle; Mittelwert \pm S.E.M.). Der Auswertung liegen vier unabhängige Experimente zugrunde. Abbildung 23 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse.

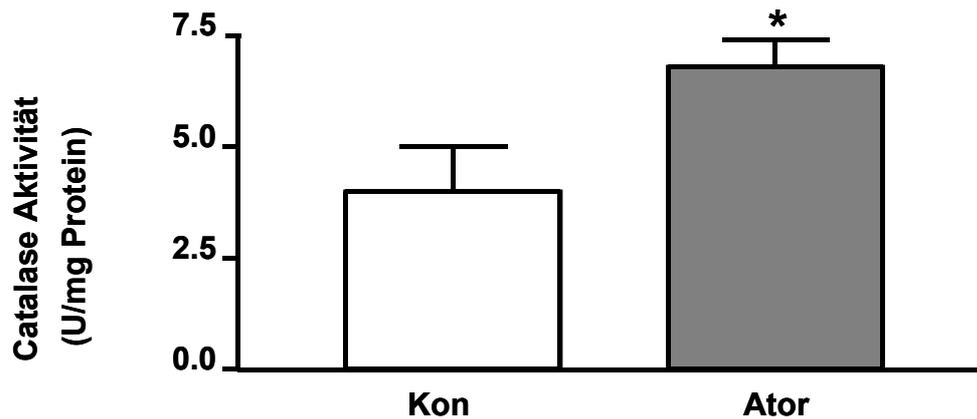


Abb. 23: Atorvastatin bewirkt eine verstärkte Enzymaktivität der Katalase in glatten Gefäßmuskelzellen. Spektrophotometrische Quantifizierung der Katalase-Enzymaktivität. Gemessen wurde die H_2O_2 -Konversion in H_2O und O_2 . Unbehandelte glatte Gefäßmuskelzellen dienen als Kontrolle (Kon). Atorvastatin ($10 \mu\text{mol/l}$, 24 h). * $p < 0.05$ vs. Kontrolle (Mittelwert \pm S.E.M.), $n=4$.

3.5 Effekt von Atorvastatin auf vaskulären oxidativen Stress, AT_1 -Rezeptor-Expression, NAD(P)H-Oxidase-Expression, Expression antioxidativer Enzyme und vaskuläre Funktion in spontan hypertensiven Ratten (SHR)

Am Tiermodell der normocholesterinämischen spontan hypertensiven Ratte (SHR) wurden antioxidative Effekte von Atorvastatin untersucht und die bisher gewonnenen in vitro-Ergebnisse in vivo überprüft.

Bei SHR liegt eine endotheliale Dysfunktion vor, die durch eine arterielle Hypertonie entsteht. Eine Fettstoffwechselstörung besteht nicht. Dieses Tiermodell bietet daher die Möglichkeit, auch funktionelle Effekte auf die Endothelfunktion durch die Statin-Behandlung zu untersuchen. SHR wurden 30 Tage lang oral mit Atorvastatin (50mg/kg Körpergewicht pro Tag) behandelt. SHR mit Standard-Nagerfutter dienten als Kontrollgruppe.

3.5.1 Vaskuläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

Mit Hilfe des Lucigenin-Chemilumineszenz-Assays wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in isolierten Aortenpräparaten spontan hypertensiver Ratten untersucht. In Aortenringen von SHR, die mit Atorvastatin behandelt wurden, wurde eine ROS-Produktion

von $62 \pm 12\%$ (Mittelwert \pm S.E.M.; $p < 0.05$ vs. Kontrolle, Abb. 24) im Vergleich zu Aortenringen der Kontrollgruppe gemessen. Es wurden sechs Messungen durchgeführt.

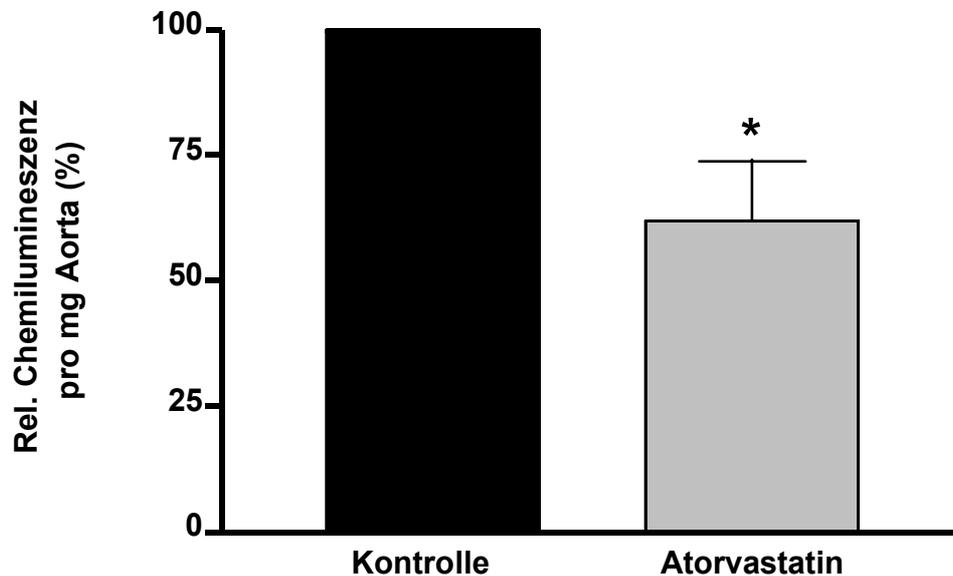


Abb. 24: Atorvastatin vermindert die vaskuläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in SHR, gemessen in isolierten Aortenpräparaten. Lucigenin-Chemilumineszenz-Assay. Relative Chemilumineszenz pro Milligramm aortalem Gewebe in Prozent der Kontrolle (Aortenringe aus SHR, die nicht mit Atorvastatin behandelt wurden). Mittelwert \pm S.E.M.; $n=6$; $*p < 0.05$ vs. Kontrolle.

3.5.2 Vaskuläre AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression

In vitro führte Atorvastatin zu einer verminderten AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen. Zur Überprüfung dieser Wirkung in vivo wurde in Aortengewebe von SHR RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Es wurden Gewebeproben von fünf Tieren der Atorvastatin behandelten Gruppe sowie der Kontrollgruppe untersucht. Die densitometrische Analyse der AT₁-Rezeptor-PCR zeigte, dass die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression unter Atorvastatin-Behandlung auf $44 \pm 12\%$ ($p < 0.05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.) im Vergleich zur Kontrollgruppe zurückging. Abbildung 25 zeigt ein repräsentatives Agarosegel der AT₁-Rezeptor-PCR. In Abbildung 26 ist das Ergebnis der densitometrischen Auswertung dargestellt.

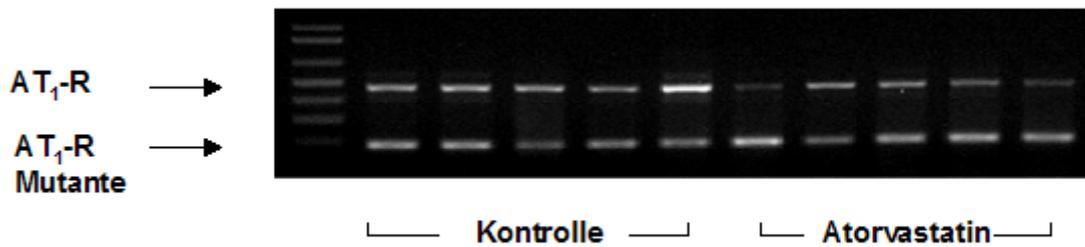


Abb. 25: Reduzierte vaskuläre AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression in Aorten Atorvastatin behandelter SHR im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe. Repräsentatives Agarosegel mit amplifizierten DNA-Fragmenten des Wildtyp AT₁-Rezeptors (AT₁-R) und der Deletionsmutante (AT₁-R Mutante).

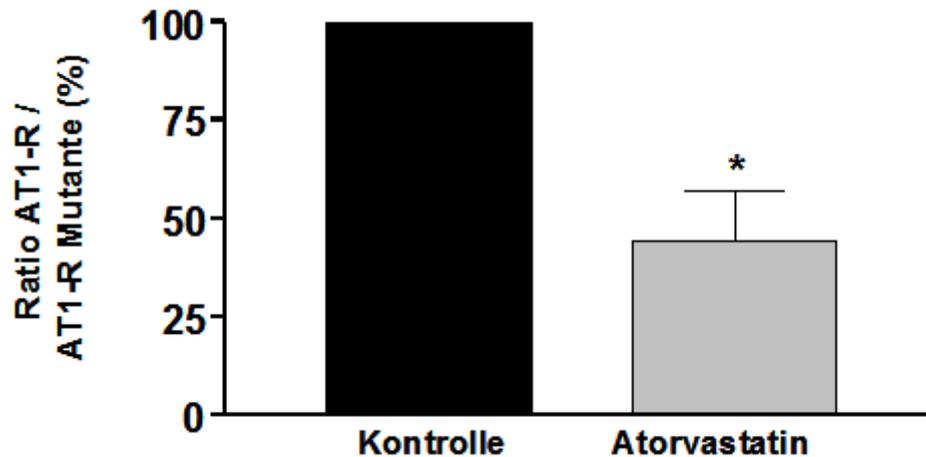


Abb. 26: Reduzierte vaskuläre AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression in Aorten Atorvastatin behandelter SHR im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe. Densitometrische Auswertung des PCR-Signals des Wildtyp AT₁-Rezeptors (AT₁-R) und der AT₁-Rezeptor-Mutante (AT₁-R-Mutante). Ratio Wildtyp AT₁-Rezeptor zu AT₁-Rezeptor-Mutante in Prozent der Kontrolle. Mittelwert±S.E.M., n=5 pro Gruppe, *p<0.05 vs. Kontrolle.

3.5.3 Vaskuläre mRNA-Expression der p22phox und nox1-Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase

Zur Untersuchung der Wirkung von Atorvastatin auf die vaskuläre mRNA-Expression der Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase p22phox und nox1 wurde aus Aortengewebe von Atorvastatin behandelten SHR und SHR der Kontrollgruppe RNA gewonnen und RT-PCR-Experimente durchgeführt. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression der GAPDH untersucht. Es wurden Untersuchungen an drei Tieren pro Gruppe durchgeführt. Die densitometrische Auswertung dieser RT-PCR-Versuche zeigte eine Reduktion der p22phox-mRNA-Expression

in der Atorvastatin-Gruppe auf $57\pm 9\%$ ($p < 0.05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mRNA-Expression der nox1-Untereinheit ging in der Gruppe der Atorvastatin behandelten Tiere auf $53\pm 14\%$ im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.05$ vs. Kontrolle, Mittelwert \pm S.E.M.) zurück. Die GAPDH-mRNA-Expression blieb unverändert. In Abbildung 27 ist die densitometrische Auswertung dargestellt.

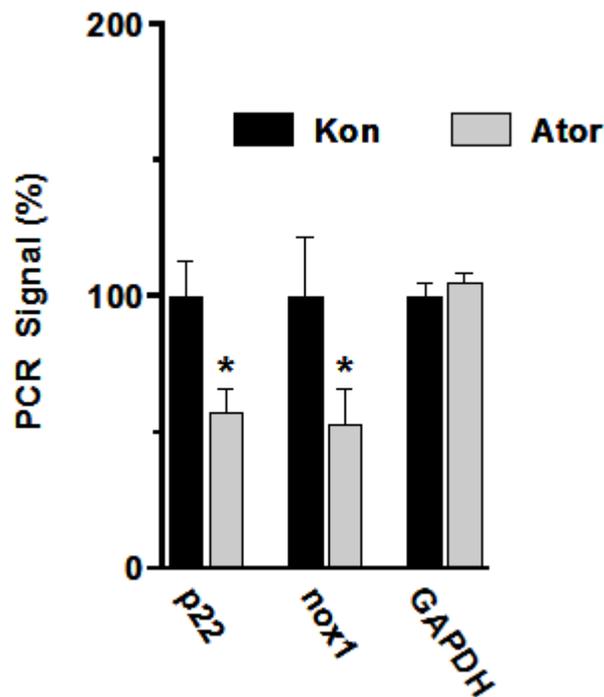


Abb. 27: Atorvastatin bewirkt eine verminderte Expression der NAD(P)H-Oxidase Untereinheiten p22phox und nox1 in Aortengewebe von SHR (Ator). Tiere der Kontrollgruppe (Kon). Die zugehörige GAPDH-Expression blieb unverändert. Densitometrische Auswertung drei unabhängiger RT-PCR-Experimente; Mittelwert \pm S.E.M.; n=3; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

3.5.4 Vaskuläre mRNA-Expression antioxidativer Enzyme

Die mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme MnSOD, ecSOD, GPX, CuZnSOD und Katalase wurde in Aortengewebe von Atorvastatin behandelten SHR sowie SHR der Kontrollgruppe mittels RT-PCR untersucht. Im Vergleich wurde die GAPDH-mRNA-Expression untersucht. Die vaskuläre Expression der mRNA der Enzyme MnSOD, ecSOD, GPX und CuZnSOD wurde durch Behandlung mit Atorvastatin nicht signifikant verändert. Die mRNA-Expression der Katalase hingegen war in den Atorvastatin behandelten SHR auf $157\pm 15\%$ gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0.05\%$, Mittelwert \pm S.E.M.). Abbildung 28 zeigt die densitometrische Auswertung von Untersuchungen an drei Tieren pro Gruppe.

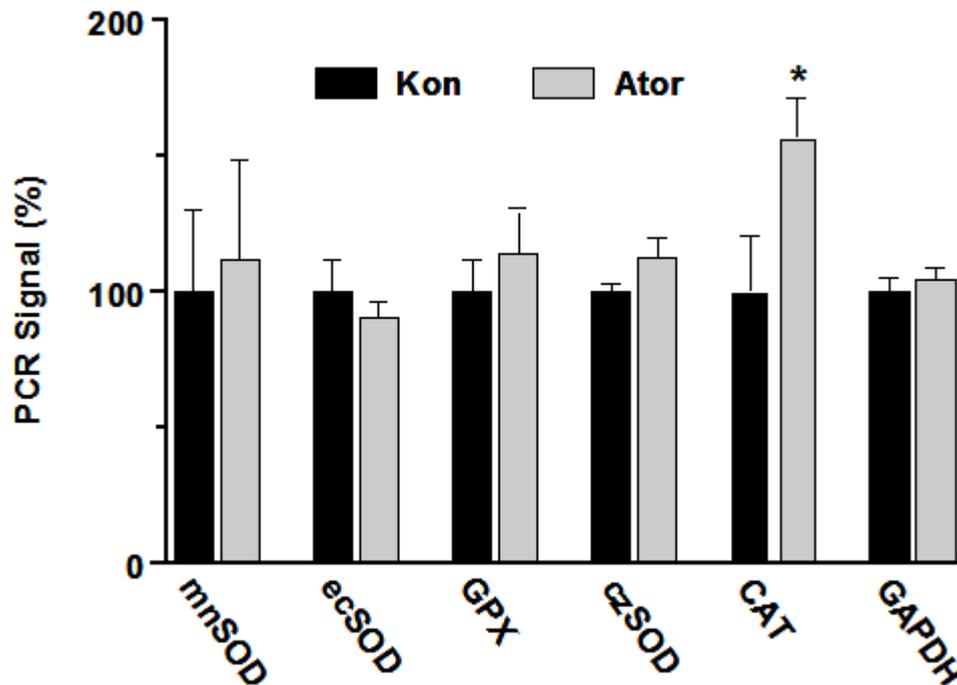


Abb. 28: Atorvastatin bewirkt keine signifikante Änderung der vaskulären mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme Mangan-SOD (mnSOD), extrazelluläre SOD (ecSOD), Glutathion-Peroxidase (GPX), Kupfer-Zink-SOD (czSOD). Die vaskuläre mRNA-Expression der Katalase (CAT) hingegen ist durch Atorvastatin verstärkt. Die zugehörige GAPDH-mRNA-Expression blieb unverändert. RT-PCR in Aortengewebe aus SHR, die mit Atorvastatin (Ator) behandelt wurden und SHR der Kontrollgruppe (Kon). Densitometrische Auswertung; Mittelwert \pm S.E.M.; n=3; *p<0.05 vs. Kontrolle.

3.5.5 Vasokonstriktion und Vasodilatation

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wird in der Gefäßwand zu einem großen Teil über den AT₁-Rezeptor vermittelt und trägt zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion bei. Atorvastatin vermindert die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und bewirkt eine verminderte Expression des AT₁-Rezeptors *in vivo*. Bei SHR liegt eine endotheliale Dysfunktion aufgrund einer arteriellen Hypertonie vor, ohne dass eine Hypercholesterinämie besteht. Es wurde untersucht, ob die Behandlung mit Atorvastatin funktionell zu einer verbesserten endothelzellabhängigen Vasorelaxation bzw. zu einer verminderten Vasokonstriktion und damit zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion führt.

3.5.5.1 Endothelzellabhängige und -unabhängige Vasodilatation

Aortenringe aus Atorvastatin behandelten SHR und SHR der Kontrollgruppe wurden isoliert. In Organbadexperimenten wurde die Vasorelaxation ex vivo untersucht. Aus jeweils sechs Tieren wurden insgesamt 18 Aortenringe pro Gruppe untersucht. Die endothelzellabhängige Vasodilatation wurde mit ansteigenden Konzentrationen von Carbachol untersucht. Die endothelzellunabhängige Vasorelaxation wurde mit ansteigenden Konzentrationen von Nitroglycerin untersucht. In Abbildung 29 ist die endothelzellunabhängige Vasorelaxation dargestellt. Sie wurde durch Behandlung mit Atorvastatin nicht beeinflusst. Atorvastatin bewirkte hingegen eine signifikante Verbesserung der endothelzellabhängigen Vasodilatation. Die maximale Relaxation lag bei $86 \pm 2\%$ bei $100 \mu\text{mol/l}$ Carbachol in der Gruppe der Atorvastatin behandelten SHR gegenüber $68 \pm 3\%$ in der Kontrollgruppe ($p < 0.05\%$, Mittelwert \pm S.E.M.) (Abbildung 30).

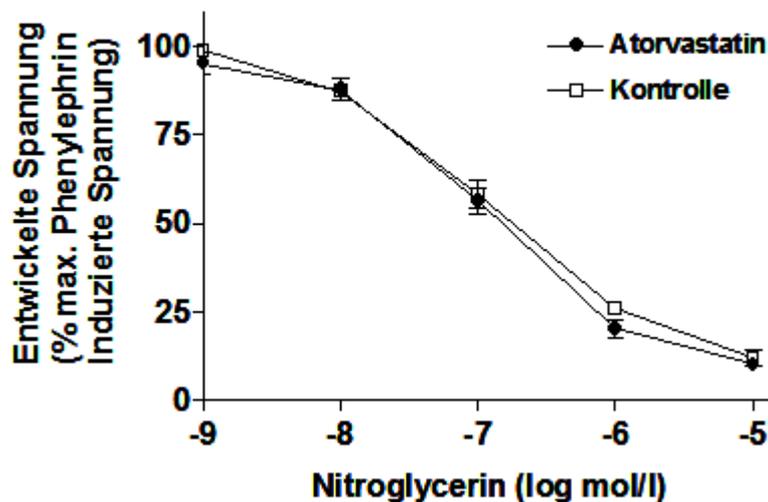


Abb. 29: Endothelzellunabhängige Vasodilatation induziert durch Nitroglycerin in Aortenringen von Atorvastatin behandelten SHR (□) und SHR der Kontrollgruppe (●). Entwickelte Spannung angegeben in Prozent der maximalen Phenylephrin induzierten Spannung. Mittelwert \pm S.E.M.; $n=6$ mit 18 Aortenringen pro Gruppe.

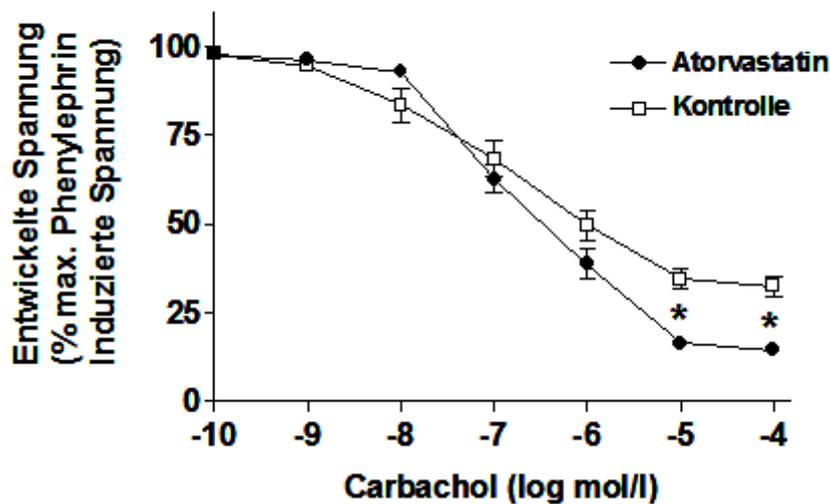


Abb. 30: Endothelzellabhängige Vasodilatation induziert durch Carbachol in Aortenringen von Atorvastatin behandelten SHR (□) und SHR der Kontrollgruppe (●). Entwickelte Spannung angegeben in Prozent der maximalen Phenylephrin induzierten Spannung. Mittelwert±S.E.M.; n=6 mit 18 Aortenringen pro Gruppe; *p<0.05 vs. Kontrolle.

3.5.5.2 Vasokonstriktion

In den Organbadexperimenten wurde auch die Vasokonstriktion von Aortenringen aus Atorvastatin behandelten SHR und SHR der Kontrollgruppe mit ansteigenden Konzentrationen von entweder Phenylephrin, Angiotensin II oder Kaliumchlorid untersucht. In den Atorvastatin behandelten SHR war die α -Adrenorezeptor vermittelte Vasokonstriktion, induziert durch Phenylephrin im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert (nicht abgebildet). Ebenso war die KCl induzierte Vasokonstriktion identisch in beiden Gruppen (nicht abgebildet).

Im Gegensatz dazu war die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion in Aortenringen der Atorvastatin behandelten SHR signifikant reduziert. Die Kontraktionskraft lag bei $4,4 \pm 0,5\%$ der KCl induzierten Vasokonstriktion in der Atorvastatin-Gruppe versus $8,2 \pm 0,9\%$ in der Kontrollgruppe (Angiotensin II $0,1 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$, Mittelwert±S.E.M., Abbildung 31).

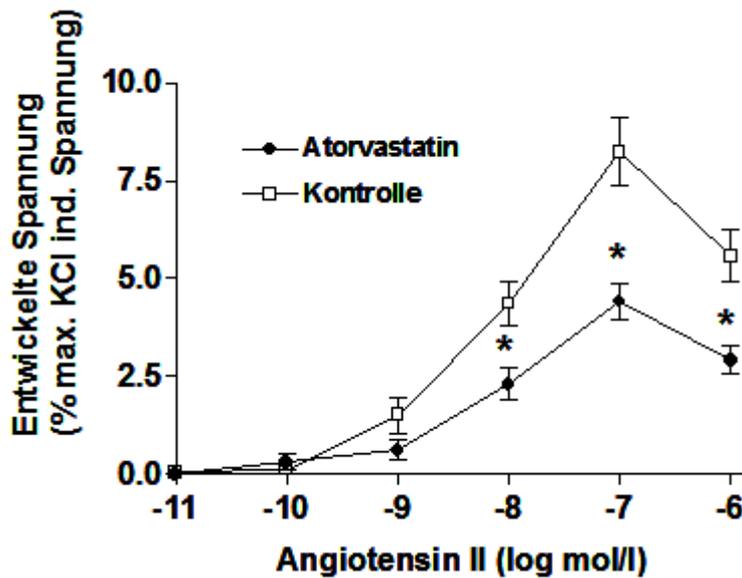


Abb. 31: Vasokonstriktion induziert durch Angiotensin II in Aortenringen von Atorvastatin behandelten SHR (□) und SHR der Kontrollgruppe (●). Entwickelte Spannung angegeben in Prozent der maximalen Kaliumchlorid induzierten Spannung. Mittelwert±S.E.M.; n=6 mit 18 Aortenringen pro Gruppe; *p<0.05 vs. Kontrolle.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen wurde die Angiotensin II induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch Atorvastatin-Behandlung signifikant vermindert. Durch L-Mevalonat wurde dieser Effekt aufgehoben, nicht aber durch 25-Hydroxycholesterin. Atorvastatin, L-Mevalonat und 25-Hydroxycholesterin allein zeigten keinen Effekt auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. In Northern Blot-Versuchen wurde nachgewiesen, dass die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression durch Atorvastatin zeit- und konzentrationsabhängig reduziert wird. Dieser Effekt wurde durch Zugabe von L-Mevalonat aufgehoben, nicht aber durch 25-Hydroxycholesterin. Die HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin und Lovastatin bewirkten ebenfalls eine reduzierte AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression. Spezifische Inhibition der Geranylgeranylierung, nicht aber der Farnesylierung, führte ebenfalls zu einer Reduktion der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression.

In vitro hatte Atorvastatin keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit p22phox. Die mRNA-Expression der nox1-Untereinheit wurde durch Atorvastatin hingegen herabreguliert. Dieser Effekt konnte durch L-Mevalonat aufgehoben werden, nicht aber durch 25-Hydroxycholesterin.

Atorvastatin zeigte keine signifikante Wirkung auf die mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme MnSOD, CuZnSOD, ecSOD und GPX, bewirkte aber eine verstärkte mRNA-

Expression, Proteinexpression und Aktivität der Katalase. L-Mevalonat hob diesen Effekt auf, 25-Hydroxycholesterin hingegen nicht.

Am Tiermodell der spontan hypertensiven Ratte führte eine 30-tägige Behandlung mit Atorvastatin, wie *in vitro*, zu einer reduzierten vaskulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. In RT-PCR-Versuchen ergab sich eine verminderte vaskuläre mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors und der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22phox und nox1 nach Atorvastatin-Behandlung. Die vaskuläre mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme MnSOD, CuZnSOD, ecSOD und GPX war in RT-PCR-Untersuchungen in Atorvastatin behandelten SHR nicht signifikant verändert. Hingegen war die vaskuläre mRNA-Expression der Katalase in Atorvastatin behandelten SHR verstärkt.

Die endothelzellabhängige Vasodilatation war in SHR eingeschränkt und nach Atorvastatin-Behandlung signifikant verbessert. Die endothelzellunabhängige Vasorelaxation war nach Atorvastatin-Behandlung unbeeinflusst. Die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion war in Atorvastatin behandelten SHR reduziert. Hingegen zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf die KCL und Phenylephrin induzierte Vasokonstriktion in beiden Tiergruppen.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der zellulären antioxidativen Wirkung des HMG-CoA-Reduktasehemmers Atorvastatin. In kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen und am Tiermodell normocholesterinämischer spontan hypertensiver Ratten wurde untersucht, ob und welche Effekte Atorvastatin auf die Bildung und Elimination reaktiver Sauerstoffspezies in vaskulären Zellen hat und über welchen Mechanismus diese Effekte vermittelt werden.

HMG-CoA-Reduktasehemmer werden erfolgreich bei hypercholesterinämischen Patienten zur Cholesterinsenkung eingesetzt und senken die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität (Sacks et al., 1996; Shepherd et al., 1995; 4S, 1994). Neben der Cholesterinsenkung bewirken Statine Effekte, die sich günstig auf die endotheliale Funktion auswirken und das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen senken (Lefer et al., 2001; Vaughan et al., 1996).

Durch Inhibition des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese durch HMG-CoA-Reduktasehemmer wird nicht nur die Cholesterinkonzentration vermindert, sondern es entstehen auch weniger Isoprenoide, die für die Modifikation von Proteinen wichtig sind (Goldstein und Brown, 1990). Über diesen Weg könnten somit Effekte vermittelt werden, die unabhängig von der Cholesterinsenkung sind und die damit einen anderen Wirkmechanismus und weitere therapeutische Möglichkeiten von Statinen darstellen.

Wichtige Risikofaktoren der Atherosklerose, wie arterielle Hypertonie und Hypercholesterinämie, begünstigen die Entstehung von oxidativem Stress in der Gefäßwand (Cai und Harrison, 2000). Oxidativer Stress führt zu zellulären Protein- und DNA-Schäden, vermindert die Bioaktivität von NO (Hensley et al., 2000; Patel et al., 2000) und aktiviert redox-sensitive Gene (Chen et al., 1998; Pueyo et al., 2000; Sato et al., 1999; William et al., 1999). Dadurch wird die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und die Progression der Atherosklerose begünstigt. Die Aktivierung des AT₁-Rezeptors ist zentral an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der Gefäßwand beteiligt und wichtig für die Gefäßfunktion und -regulation.

Aus diesen Gründen stand der Einfluss von Atorvastatin auf den AT₁-Rezeptor, die NAD(P)H-Oxidase sowie antioxidative Enzyme und die Endothelfunktion im Mittelpunkt der Untersuchungen.

4.1 Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

Die DCF-Fluoreszenzmessungen zeigten, dass Angiotensin II in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen eine signifikante Erhöhung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies bewirkt. Durch DPI, einem Inhibitor von Flavoproteinen, wurde die Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vollständig aufgehoben.

Die NAD(P)H-Oxidase ist ein flavoproteinhaltiger Enzymkomplex und eines der wichtigsten ROS produzierenden Enzyme in der Gefäßwand (Griendling et al., 2000). Griendling et al. (1994) und Rajagopalan et al. (1996) beschreiben, dass Angiotensin II über Stimulation des AT₁-Rezeptors eine Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase vermittelt, was zu einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt. Ebenso ist beschrieben, dass dieser Effekt durch DPI verhindert wird. Es konnte also gezeigt werden, dass eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies über den AT₁-Rezeptor und die NAD(P)H-Oxidase vermittelt wird.

Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose (Cai und Harrison, 2000; Harrison 1997b; Warnholtz et al., 1999). Sie vermindern die Bioaktivität von NO und induzieren beispielsweise Wachstum und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, die endotheliale Apoptose und die Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen (Cai und Harrison et al., 2000; Darley-Usmar et al., 1997; Harrison, 1997b). Letzteres wird unter anderem durch eine Aktivierung redoxsensitiver Gene wie den Adhäsionsmolekülen VCAM-1 und ICAM-1 vermittelt (Cai und Harrison, 2000; Hensley et al., 2000).

HMG-CoA-Reduktasehemmer wirken lipidsenkend (Bakker-Arkema et al., 1996; Levine et al., 1995; Stein et al., 1998) und setzen damit therapeutisch an einem wichtigen Risikofaktor der Atherosklerose, der Hypercholesterinämie, an.

Die DCF-Fluoreszenz- und Lucigenin-Chemilumineszenz-Ergebnisse in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen und in Aortenringen normocholesterinämischer spontan hypertensiver Ratten zeigten, dass Atorvastatin die (Angiotensin II induzierte) Bildung reaktiver Sauerstoffspezies supprimiert. Dass die Wirkung von Atorvastatin spezifisch über die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase vermittelt wird und nicht abhängig ist von der zellulären Cholesterinsenkung, zeigten die DCF-Fluoreszenzmessungen in glatten Gefäßmuskelzellen. Der Effekt des HMG-CoA-Reduktaseinhibitors auf die Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde durch Zugabe von Mevalonat aufgehoben. Mevalonat wird aus Acetyl-CoA durch die HMG-CoA-Reduktase gebildet und ist das Ausgangssubstrat für weitere Isoprenoide in der Reaktionskette der Cholesterinbiosynthese. Durch die Zugabe von

Hydroxycholesterin konnte der Atorvastatin-Effekt auf die Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies hingegen nicht aufgehoben werden. Dies zeigt, dass die verminderte Isoprenoid-Bildung, nicht aber die inhibierte Cholesterinproduktion für den Effekt verantwortlich ist.

Zahlreiche cholesterinunabhängige Effekte von Statinen in vaskulären Zellen sind bereits beschrieben worden, die Einfluss auf die Entstehung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose haben. Laufs et al. (1998) beschreiben eine vermehrte Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase, Hernandez-Perera et al. (1998) beschreiben eine verminderte Endothelin 1-Expression, worüber die endotheliale Funktion verbessert werden kann. Inflammatorische Prozesse werden durch eine reduzierte MCP 1-Synthese (Romano et al., 2000) und eine verminderte Migration von Monozyten (Dunzendorfer et al., 1997) sowie eine modifizierte inflammatorische Reaktion von Endothelzellen (Kothe et al., 2000) beeinflusst. Statine supprimieren die ICAM 1-Expression, was wichtig für die Monozytenadhäsion ist, und vermindern die Zellproliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Negre-Aminou et al., 1997). Weiterhin ist die Inhibition der Stimulation von Leukozyten durch Bindung an das leukozytenspezifische Integrin (LFA-1) beschrieben (Kwak et al., 2000). Ex vivo-Untersuchungen zeigen, dass HMG CoA-Reduktasehemmer die vaskuläre Superoxid-Produktion vermindern (Rikitake et al., 2001; Wagner et al., 2000). Wagner et al. (2000) beschreiben, dass dieser Effekt durch die verhinderte Isoprenylierung des GTP bindenden Proteins rac, das für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase wichtig ist, vermittelt wird.

Die Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit Atorvastatin, Mevalonat und Hydroxycholesterin alleine bewirkte keine signifikante Veränderung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Das zeigt zum einen, dass Atorvastatin nicht die basale, sondern die Angiotensin II induzierte, AT₁-Rezeptor vermittelte Bildung von ROS beeinflusst. Zum anderen scheint die basale zelluläre Isoprenoid-Konzentration für die Isoprenylierungsvorgänge der Zellen ausreichend zu sein und kann nicht durch eine zusätzliche Gabe von Mevalonat gesteigert werden.

4.2 Der AT₁-Rezeptor

Ein Mechanismus, über den Atorvastatin die Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies reduzieren kann, ist die Regulation der Expression des AT₁-Rezeptors. Der

AT₁-Rezeptor hat eine wichtige Bedeutung für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und die Pathogenese der Atherosklerose. Das wird unterstrichen durch viele Studien, die den Effekt der AT₁-Rezeptor-Aktivierung bzw. -Blockade an verschiedenen zellulären und vaskulären Parametern untersucht haben (Chen et al., 1998; Griendling et al., 1993; Nickenig und Harrison, 2002; Pueyo et al., 2000; Schieffer et al., 2000; Schiffrin et al., 2000; Timmermans et al., 1993; Warnholtz et al., 1999). Aus der Stimulation des AT₁-Rezeptors resultieren beispielsweise zelluläre Kontraktion, Hypertrophie, Proliferation und Apoptose (Griendling et al., 1993; Dzau, 1998; Nickenig und Harrison, 2002; Romero und Reckelhoff, 1999; Timmermans et al., 1993). Außerdem ist der AT₁-Rezeptor wichtig für die Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in vaskulären Zellen (Dzau, 1998; Nickenig und Harrison, 2002; Romero und Reckelhoff, 1999).

Wie die Northern Blot-Experimente zeigten, wurde die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors durch die HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin, Simvastatin und Lovastatin signifikant reduziert. Es handelt sich um einen zeit- und dosisabhängigen Effekt und um einen Klasseneffekt der Statine. RT-PCR-Experimente zeigten, dass auch in Aorten von Atorvastatin behandelten SHR der AT₁-Rezeptor vermindert exprimiert wurde. Der in vitro gefundene Effekt ließ sich also auf das Tiermodell übertragen und wurde somit in vivo bestätigt.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Mevalonat die verminderte mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors nach Statinbehandlung aufhebt. Hydroxycholesterin bewirkte diesen Effekt nicht. Folglich wird die verminderte Expression des AT₁-Rezeptors spezifisch über die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase vermittelt, ist aber nicht durch die zelluläre Cholesterindepletion bedingt.

Neben der Cholesterinsenkung wird durch die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase die Synthese von Mevalonat reduziert und darüber der Isoprenoid-Metabolismus beeinflusst (Goldstein und Brown, 1990). Aus Mevalonat entstehen zum Beispiel die Isoprenoide Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP) und Farnesyl-Pyrophosphat (FPP), die in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen, wie zum Beispiel GTP-bindenden Proteinen, wichtig sind (Laufs et al., 1998). In Northern Blot-Versuchen bewirkte eine alleinige Inkubation kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen mit Mevalonat keinen signifikanten Effekt auf die mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors. Die basalen zellulären Konzentrationen an Isoprenoiden, wie zum Beispiel Geranylgeranyl-Pyrophosphat, scheinen somit für die diesbezüglich notwendigen Isoprenylierungsvorgänge der Zelle auszureichen. Durch die

Hemmung der HMG-CoA-Reduktase wird die Konzentration an Isoprenoiden jedoch reduziert, was zu Veränderungen in der Regulation der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt. Diese Atorvastatin vermittelten Effekte werden durch Zugabe von Mevalonat aufgehoben, wodurch das Substrat für die Bildung von Isoprenoiden wieder vorhanden ist. Dies legt nahe, dass die Regulation der Isoprenoid-Konzentrationen für die Atorvastatin-Effekte verantwortlich ist. Diesbezüglich sind die Isoprenoide GGPP und FPP von Interesse, da bekannt ist, dass diese Isoprenoide an regulatorischen Prozessen beteiligt sind (Laufs und Liao, 1998). Daher wurde die Bedeutung der Geranylgeranylierung bzw. Farnesylierung für die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression untersucht.

Northern Blot-Experimente zeigten eine signifikant verminderte Expression der AT₁-Rezeptor-mRNA nach Inkubation kultivierter glatter Gefäßmuskelzellen mit dem spezifischen Geranylgeranyltransferase-Inhibitor GGTI-286. Im Gegensatz dazu war die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression nach Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit dem spezifischen Farnesyltransferase-Inhibitor FTI nicht verändert. Dies zeigt eine Bedeutung der Geranylgeranylierung, nicht aber der Farnesylierung für die Regulation der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression.

Der Hauptmechanismus für die Regulation der AT₁-Rezeptor-Genexpression ist die posttranskriptionelle Modulation (Nickenig und Murphy, 1994, 1996; Nickenig et al., 1998a, 1998b). Bisher ist nicht bekannt, ob in der Regulation der AT₁-Rezeptor-Expression auch die Geranylgeranylierung eine Rolle spielt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Transkriptionsrate der AT₁-Rezeptor-mRNA unter Statin-Inkubation unverändert bleibt (Wassmann et al., 2001b). Da jetzt gezeigt werden konnte, dass die Inhibition der Geranylgeranylierung die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression reduziert, ist anzunehmen, dass Atorvastatin auf diese Weise posttranskriptionell über eine Veränderung der mRNA-Stabilität die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression beeinflusst.

4.3 Die Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase

Die NAD(P)H-Oxidase ist ein Enzymkomplex, der aus mehreren Untereinheiten besteht und der in vaskulären Zellen eines der wichtigsten pro-oxidativen Proteine darstellt. Die NAD(P)H-Oxidase wird durch Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor aktiviert (Griendling et al., 1994; Fukui et al., 1997; Rajagopalan et al., 1996; Ushio-Fukai et al., 1996). Für die

Aktivierung des Enzymkomplexes ist der Zusammenschluss aller Untereinheiten in der Zellmembran notwendig (Babior, 1999; Griendling et al., 2000). In glatten Gefäßmuskelzellen sind hierfür insbesondere die Interaktion der nox1-Untereinheit mit anderen Untereinheiten (Lassègue et al., 2001; Suh et al., 1999), die Expression der p22phox-Untereinheit (Fukui et al., 1997; Ushio-Fukai et al., 1996) und die Translokation der GTPase rac1 vom Zytosol zur Zellmembran wichtig (Dusi et al., 1995; Rinckel et al., 1999).

RT-PCR-Versuche zeigten, dass Atorvastatin die mRNA-Expression der nox1-Untereinheit in glatten Gefäßmuskelzellen signifikant reduziert. In Northern Blot-Experimenten konnte hingegen keine signifikante Veränderung der p22phox-mRNA-Expression durch Atorvastatin nachgewiesen werden. In Atorvastatin behandelten SHR zeigte sich eine verminderte vaskuläre Expression der nox1 und p22phox-Untereinheiten. Warum Atorvastatin in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen keine verminderte Expression der p22phox-Untereinheit bewirkt, in Aortenhomogenaten jedoch schon, ist nicht völlig klar. Zum einen könnten in vivo noch andere Kofaktoren vorliegen, die wichtig für die Regulation der Expression der p22phox sind. Zum anderen könnten Statine die Expression der p22phox-Untereinheit in anderen vaskulären Zellen wie zum Beispiel Endothelzellen herabregulieren, so dass sich in Gefäßhomogenaten, die alle vaskulären Zellen umfassen, eine insgesamt reduzierte p22phox-Expression zeigt.

Wagner et al. (2000) beschreiben keinen Effekt von HMG-CoA-Reduktasehemmern auf die vaskuläre Expression der gp91phox-Untereinheit. Hong et al. (2006) hingegen zeigten, dass Atorvastatin die vaskuläre Expression der gp91phox vermindert, die Translokation der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit p47phox vom Zytoplasma zur Zellmembran verhindert und die NADPH-Oxidase-Aktivierung inhibiert. Li et al. (2004) beschreiben eine verminderte Expression von p22phox und p47phox in AT₁/Apolipoprotein E-defizienten Doppel-knock out-Mäusen. Mitani et al. (2003) demonstrieren eine vermehrte Expression der p22phox und gp91phox-Untereinheiten in einem hypercholesterinämischen Tiermodell. In einer Gruppe, die mit dem HMG-CoA-Reduktasehemmer Fluvastatin behandelt worden war, wurde diese Expression verhindert. Maack et al. (2003) beschreiben, dass Statine zu einer verminderten myokardialen rac1-GTPase-Aktivität und zu einer verminderten Angiotensin II induzierten NAD(P)H-Oxidase-Aktivität führen. Auch Yu et al. (2005) zeigen, dass Statine in humanen mesangialen Zellen die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität vermindern. HMG-CoA-Reduktasehemmer nehmen also Einfluss auf die Expression der Untereinheiten und die

Aktivität der NAD(P)H-Oxidase in verschiedenen vaskulären und nicht vaskulären Zellen, was im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist. Der Mechanismus, der zur NAD(P)H-Oxidase-Regulation führt, ist allerdings noch nicht genau verstanden. In dieser Arbeit wurden lediglich die beiden membrangebundenen Untereinheiten des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes untersucht, die aber eine zentrale Bedeutung für die Aktivität des Enzyms haben (Fukui et al., 1997; Lassègue et al., 2001; Suh et al., 1999; Ushio-Fukai et al., 1996).

Die Statin-Wirkung auf die NAD(P)H-Oxidase könnte möglicherweise durch eine verhinderte Isoprenylierung von Untereinheiten erklärt werden. Dass die Wirkung auf die Expression der untersuchten Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase nicht durch eine Cholesterindepletion bedingt ist, zeigten die Northern-Blot-Versuche in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen. Mevalonat hob die Atorvastatin bedingte verminderte Expression der nox1 auf, Hydroxycholesterin hingegen nicht. Die reduzierte Expression der nox1 wird demnach durch spezifische Inhibition der HMG-CoA-Reduktase vermittelt, nicht aber durch eine Cholesterindepletion. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die verminderte Synthese von Isoprenoiden eine wichtige Rolle spielt.

In vitro und in vivo konnte bereits gezeigt werden, dass Atorvastatin die Geranylgeranylierung der GTPase rac1 verhindert und somit die für die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase notwendige Translokation von rac1 vom Zytosol zur Zellmembran und die Verankerung in der Zellwand nicht möglich ist (Wassmann et al., 2001b). Es ist somit anzunehmen, dass Atorvastatin über verschiedene Mechanismen die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase vermindert und so die ROS-Produktion durch dieses Enzym reduziert.

4.4 Antioxidative Enzyme

Unter physiologischen Bedingungen liegen in der Gefäßwand die Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid im Gleichgewicht vor (Harrison, 1997b). Oxidativer Stress entsteht durch übermäßige Produktion und/oder zu geringem Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (Andreoli, 2000; Gutteridge und Halliwell, 2000). Die Konzentrationen von ROS werden über verschiedene pro- und antioxidative Enzyme reguliert. Zu den vaskulären antioxidativen Enzymen zählen die Glutathion-Peroxidase (GPX), die Katalase und verschiedene Isoformen der Superoxid-Dismutase (MnSOD, CuZnSOD, ecSOD), die in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorkommen.

Northern Blot- und RT-PCR-Versuche *in vitro* und *in vivo* zeigten, dass Atorvastatin die vaskuläre Expression der GPX, MnSOD, CuZnSOD und ecSOD nicht signifikant beeinflusste. Hingegen bewirkte Atorvastatin eine verstärkte vaskuläre Expression und Aktivität der Katalase *in vitro* und *in vivo*. Weitere Northern Blot-Experimente in glatten Gefäßmuskelzellen zeigten, dass Mevalonat die Wirkung von Atorvastatin auf die Katalase-Expression aufhebt, Hydroxycholesterin hingegen nicht. Auch diese Wirkung wird also über eine spezifische Inhibition der HMG-CoA-Reduktase, nicht aber über eine Cholesterindepletion vermittelt und könnte somit über eine verminderte Isoprenylierung bewirkt werden. Atorvastatin reduziert durch eine verstärkte Expression und Aktivität der Katalase oxidativen Stress, da dadurch vermehrt H₂O₂ eliminiert wird.

Warum kein Effekt von Atorvastatin auf die H₂O₂ generierenden SOD und auf GPX zu beobachten ist, ist unklar. *In vitro* ist beschrieben, dass unter Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktasehemmer Lovastatin die SOD-Aktivität erhalten bleibt (Chen et al., 1997). Wagner et al. (2000) beschreiben, dass in Aortenhomogenaten aus Atorvastatin behandelten Ratten die mRNA-Expression der Cu/Zn-SOD und MnSOD unverändert ist. An einem Tiermodell mit induziertem Diabetes wurde eine erhöhte Aktivität der Katalase und GPX nach Behandlung mit Simvastatin beschrieben (Ceylan et al., 2003), hingegen eine erhöhte Aktivität der GPX, aber unveränderte Aktivität der MnSOD und Katalase nach Behandlung mit Fluvastatin (Kurusu et al., 2000). Es ergibt sich somit kein einheitliches Bild des Einflusses von HMG-CoA-Reduktasehemmern auf die Expression bzw. Aktivität antioxidativer Enzyme. Physiologischerweise kommt es zu einer Hochregulation der Katalase, wenn erhöhte Konzentrationen an H₂O₂ vorliegen, was aber bei reduzierter NAD(P)H-Oxidase-Aktivität mit verminderter Superoxid-Produktion und unveränderter SOD-Aktivität nicht der Fall ist.

Bei der Entstehung von oxidativem Stress ist die Interaktion von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere Superoxid, mit Stickstoffmonoxid wichtig. Die Reaktion zwischen NO und Superoxid, bei der Peroxynitrit entsteht, läuft im Vergleich zu der Reaktion zwischen Superoxid und den Superoxid-Dismutasen bevorzugt ab, da die Reaktion zwischen Superoxid und NO schneller verläuft und nur diffusionslimitiert ist (Harrison, 1997b). Weiterhin ist NO auch für die Elimination reaktiver Sauerstoffspezies und somit für die Reduktion von oxidativem Stress von Bedeutung. Eine verstärkte Produktion von NO könnte also auch für das verminderte Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies unter dem Einfluss von Atorvastatin verantwortlich sein. Statine führen zu einer erhöhten eNOS-Expression und -Aktivität in

Endothelzellen (Laufs et al., 1998). In glatten Gefäßmuskelzellen wird die eNOS jedoch nicht exprimiert, sondern lediglich die induzierbare Isoform der NO-Synthase (iNOS). Die iNOS produziert lediglich relevante Mengen NO nach Induktion durch beispielsweise Zytokine oder Lipopolysaccharide. Einem solchen Stimulus unterlagen die in dieser Arbeit untersuchten kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen jedoch nicht. Außerdem wird die Induktion und Expression der iNOS durch Statine gehemmt (Vaughan und Delanty, 1999; Park et al., 2000). Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Inkubation glatter Gefäßmuskelzellen mit Atorvastatin zu einer vermehrten NO-Konzentration führt, die die Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies erklären könnte.

4.5 Endothelfunktion und Vasokonstriktion

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Atorvastatin zu einer verminderten vaskulären Expression des AT₁-Rezeptors und wichtiger NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten sowie zu einer verstärkten Expression und Aktivität der Katalase führt. Die Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wird durch Atorvastatin reduziert. Auch in vivo wird der vaskuläre oxidative Stress durch Atorvastatin-Behandlung vermindert. Über diese Mechanismen könnten Statine zu einer verbesserten endothelialen Funktion führen, da durch eine verminderte ROS-Produktion und vermehrte NO-Produktion (Laufs et al., 1998) eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit vorliegt.

Am Tiermodell der spontan hypertensiven Ratte (SHR) wurde der Einfluss von Atorvastatin auf Vasorelaxation und Vasokonstriktion von Aortenringen untersucht. Die Organbadexperimente zeigten, dass die Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion in Atorvastatin behandelten SHR reduziert war. Eine Aktivierung des AT₁-Rezeptors durch Angiotensin II führt unter anderem zur Vasokonstriktion und nimmt somit Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks. Die durch das Atorvastatin bedingte verminderte Expression des AT₁-Rezeptors in der Gefäßwand hat somit eine funktionelle Auswirkung in vivo. In weiteren Organbadexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Carbachol induzierte, endothelzellabhängige Vasodilatation in SHR der Kontrollgruppe eingeschränkt war und somit eine endotheliale Dysfunktion vorlag. Die endothelzellabhängige Vasodilatation war hingegen in Atorvastatin behandelten SHR deutlich gebessert. Die endothelzellunabhängige, Nitroglycerin vermittelte Vasodilatation war in Atorvastatin behandelten SHR nicht

verändert. Die Behandlung mit Atorvastatin führte also *in vivo* zu einer Verbesserung der Endothelfunktion in SHR. Die Reduktion der AT₁-Rezeptor-Expression in Atorvastatin behandelten SHR korrelierte mit der gesenkten vaskulären Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und mit der Verbesserung der endothelzellabhängigen Vasodilatation.

Mitani et al. (2003) beschreiben in einem hypercholesterinämischen Tiermodell die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und die vermehrte Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22phox und gp91phox. Unter Behandlung mit dem HMG-CoA-Reduktasehemmer Fluvastatin wird die Endothelfunktion verbessert, und es kommt nicht zu einer vermehrten Expression der genannten Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase. Rikitake et al. (2001) zeigen, dass unter Therapie mit Fluvastatin in einer nicht cholesterinsenkenden Dosierung eine Verbesserung der Endothelfunktion sowie eine reduzierte Superoxid-Produktion und eine verminderte Oxidierung von LDL erreicht wird. Diese Untersuchungen mit Fluvastatin sind im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der die Substanz Atorvastatin eingesetzt wurde. Auch dies unterstreicht, dass es sich um einen Klasseneffekt der Statine handelt.

Die Ratten des untersuchten Tiermodells sind normocholesterinämisch und entwickeln eine endotheliale Dysfunktion aufgrund der arteriellen Hypertonie und nicht aufgrund einer Fettstoffwechselstörung. Obwohl die Atorvastatin-Therapie zu einer Lipidsenkung in den SHR führte, ist es unwahrscheinlich, dass diese ursächlich verantwortlich für die dargestellten Effekte auf die vaskuläre Funktion ist. Die LDL-Cholesterin-Plasmakonzentration in diesen Tieren war vor Beginn der Behandlung niedrig und wurde lediglich um 13 mg/dl durch die Statintherapie gesenkt (Wassmann et al., 2001a). Außerdem konnte gezeigt werden, dass viele der Effekte, die Atorvastatin in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt, unabhängig von der Cholesterinsenkung sind. Das lässt ebenfalls vermuten, dass die Cholesterinsenkung *in vivo* nicht ausschließlich für die Verbesserung der endothelialen Funktion unter Atorvastatin-Therapie verantwortlich ist.

Hypercholesterinämie führt im Menschen zu endothelialer Dysfunktion (Cai und Harrison, 2000). Es ist beschrieben, dass eine cholesterinsenkende Therapie die Endothelfunktion verbessert (Anderson et al., 1995; Egashira et al., 1994; Treasure et al., 1995; Leung et al., 1993). Es ist ebenso beschrieben, dass im hypercholesterinämischen Patienten unter Statintherapie die Endothelfunktion verbessert wird, noch bevor es zu signifikanten Veränderungen der Cholesterinspiegel kommen konnte (Anderson et al., 1995; O'Driscoll et

al., 1997; Treasure et al., 1995). John et al. (2001) und Marchesi et al. (2000) demonstrieren eine verbesserte Endothelfunktion nach zweiwöchiger Statintherapie bei hypercholesterinämischen Patienten, Tsunekawa et al. (2002) innerhalb von drei Tagen Statintherapie bei hypercholesterinämischen Diabetes mellitus-Patienten. Laufs et al. (2000) und Wassmann et al. (2003) beschreiben, dass unter hochdosierter Atorvastatin-Therapie bzw. Pravastatin-Therapie die Endothelfunktion gesunder Probanden mit niedrigen LDL-Cholesterinspiegeln bzw. Patienten mit KHK innerhalb von 24 Stunden verbessert werden konnte, ohne dass die Cholesterinkonzentrationen verändert waren. Dass eine Verbesserung der Endothelfunktion unter Statintherapie innerhalb eines kurzen Zeitraums beobachtet werden konnte, bevor es zu einer signifikanten Cholesterinsenkung kam, spricht dafür, dass die verbesserte Endothelfunktion nicht alleine über den cholesterinsenkenden Effekt der Statine vermittelt wurde, sondern auch cholesterinunabhängige Effekte dieser Substanzklasse eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Landmesser et al. (2005) demonstrieren eine verbesserte Endothelfunktion bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz unter Behandlung mit Simvastatin, nicht aber unter Behandlung mit Ezetimib, einem Inhibitor der Cholesterin-Absorption, bei gleicher Senkung der LDL-Cholesterinspiegel in beiden Gruppen. Diese Studie zeigt im direkten Vergleich zweier cholesterinsenkender Substanzen, dass die endotheliale Funktion nur durch Statine verbessert werden konnte, was bei gleichem Effekt auf die Cholesterinkonzentration besonders gut die Wertigkeit der cholesterinunabhängigen Statineffekte für die Verbesserung der Endothelfunktion unterstreicht.

Diese Studien zeigen im Einklang mit den Ergebnissen in SHR, dass eine Statintherapie die Gefäßfunktion verbessert und dass dafür sehr wahrscheinlich Wirkungen der Statine, die unabhängig von der Cholesterinsenkung sind, eine wichtige und wesentliche Rolle spielen.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer über eine Vielzahl von Mechanismen zu einer Reduktion von vaskulärem oxidativen Stress führen und dadurch die endotheliale Funktion verbessern können. Es konnte diesbezüglich die wichtige Bedeutung des AT₁-Rezeptors sowie der NAD(P)H-Oxidase nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zeigen zudem, dass die dargestellten Statin-Effekte nicht von der Cholesterinsenkung abhängig sind. Ein möglicher Weg, über den die Statin-Effekte vermittelt

werden könnten, ist eine verminderte Isoprenylierung von Zielproteinen, da aufgrund der Inhibition des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese auch Intermediärprodukte des Isoprenoidstoffwechsels weniger zur Verfügung stehen und somit vermindert Isoprenylierungsvorgänge von z.B. regulatorischen Proteinen ablaufen können.

Der erfolgreiche Einsatz von HMG-CoA-Reduktasehemmern in der Therapie der Hypercholesterinämie mit Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität hypercholesterinämischer Patienten kann möglicherweise auf normocholesterinämische Patienten erweitert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Statine durch eine Verbesserung der Endothelfunktion bei Normocholesterinämie und die cholesterinunabhängige Beeinflussung wichtiger Faktoren in der Pathogenese der Atherosklerose zu einer günstigen Beeinflussung der Atherogenese unabhängig von Fettstoffwechselstörungen beitragen können. Diese These wird unterstützt durch klinische Beobachtungen in Studien, die zeigen, dass Statine das kardiovaskuläre Risiko auch bei normocholesterinämischen Patienten senken (Colhoun et al., 2004; Downs et al., 1998; Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Sacks et al., 1996) und die Endothelfunktion unabhängig von der Cholesterinsenkung verbessern können (Landmesser et al., 2005; Laufs et al., 2000; Tsunekawa et al., 2001, Wassmann et al., 2003). Da oxidativer Stress wichtig für die Pathogenese der Atherosklerose ist (Cai und Harrison 2000; Darley-Usmar et al., 1997; Harrison, 1997b), könnte die gezeigte zelluläre antioxidative Wirkung von Statinen mit konsekutiver Verbesserung der Endothelfunktion zur atheroprotektiven Wirkung von HMG-CoA-Reduktasehemmern beitragen.

5. Zusammenfassung

HMG-CoA-Reduktasehemmer reduzieren die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität hypercholesterinämischer Patienten. Neben der Cholesterinsenkung weisen sie eine Vielzahl von cholesterinunabhängigen Wirkungen auf, die einen direkten Einfluss auf die Gefäßfunktion haben. Oxidativer Stress führt zu Zellschäden, schränkt die Funktionalität der Blutgefäße ein und begünstigt somit die Entstehung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose.

In der vorliegenden Arbeit wurde in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte und am Tiermodell normocholesterinämischer spontan hypertensiver Ratten (SHR) untersucht, ob der HMG-CoA-Reduktasehemmer Atorvastatin direkte, cholesterinunabhängige Effekte auf vaskulären oxidativen Stress und die Endothelfunktion hat und welche molekularen Mechanismen diesen Effekten zugrunde liegen. Kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit Atorvastatin stimuliert. DCF-Fluoreszenzmessungen zeigten, dass die Angiotensin II induzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Atorvastatin reduziert wird. Die Angiotensin II induzierte ROS-Bildung wird über den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT₁-Rezeptor) vermittelt. In Northern Blot-Versuchen konnte eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion der AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression durch Atorvastatin nachgewiesen werden. Da auch die HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin und Lovastatin zu einer verminderten Expression der AT₁-Rezeptor-mRNA führten, ist von einem Klasseneffekt der Statine auszugehen.

Der in vitro-Effekt von Atorvastatin auf die Angiotensin II induzierte ROS-Produktion und auf die AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression konnte durch Mevalonat aufgehoben werden, nicht aber durch Hydroxycholesterin. Durch die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase, dem zentralen Enzym der Cholesterinbiosynthese, wird nicht nur die Cholesterinbildung, sondern auch die Bildung von Zwischenprodukten wie Mevalonat und anderen Isoprenoiden wie Geranylgeranylpyrophosphat gehemmt. Diese stehen somit für wichtige zelluläre Isoprenylierungsvorgänge nicht mehr zur Verfügung. Dies stellt einen möglichen Mechanismus für die Effekte von Statinen dar, die über die Cholesterinsenkung hinausgehen. Northern Blot-Versuche zeigten, dass die spezifische Inhibition der Geranylgeranylierung ebenfalls eine verminderte AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression bewirkt.

ROS werden in der Gefäßwand vorwiegend durch die NAD(P)H-Oxidase produziert. Das Enzym kann durch Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor aktiviert werden. In vitro war die mRNA-Expression der nox1-Untereinheit in glatten Gefäßmuskelzellen ebenfalls vermindert,

was durch Zugabe von Mevalonat aufgehoben werden konnte, nicht aber durch Hydroxycholesterin. Die mRNA-Expression der p22phox-Untereinheit zeigte sich in vitro unter Atorvastatin-Stimulation nicht verändert.

In Northern Blot-Versuchen wurde nachgewiesen, dass in vitro nach Atorvastatin die Expression der ROS-eliminierenden Enzyme Mangan-Superoxid-Dismutase (SOD), Kupfer-Zink-SOD, extrazelluläre SOD und Glutathion-Peroxidase (GPX) nicht signifikant verändert war. Hingegen bewirkte Atorvastatin in vitro eine verstärkte Expression und Aktivität der Katalase.

Um die Atorvastatin-Effekte in vivo zu untersuchen, wurden SHR 30 Tage lang oral mit Atorvastatin behandelt. Im Lucigenin-Chemilumineszenz-Assay war die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Aortenringen Atorvastatin behandelter SHR gegenüber Tieren der Kontrollgruppe, die kein Atorvastatin erhielten, reduziert. RT-PCR-Experimente an Aortenhomogenaten konnten nachweisen, dass auch in vivo die vaskuläre AT₁-Rezeptor-Expression nach Behandlung mit Atorvastatin vermindert war.

Weitere RT-PCR-Experimente zeigten, dass die NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten p22phox und nox1 in vivo nach Atorvastatin-Behandlung in der Gefäßwand vermindert exprimiert wurden.

Die SOD-Isoenzyme und GPX waren nach Atorvastatin-Behandlung nicht verändert, hingegen zeigte sich auch in vivo eine verstärkte Expression der Katalase.

In Organbadexperimenten wurde die Endothelfunktion isolierter Aortenringe untersucht. Diese SHR wiesen eine endotheliale Dysfunktion auf. In Atorvastatin behandelten SHR war die endothelabhängige Vasodilatation im Vergleich zu unbehandelten SHR gebessert und die Angiotensin II bedingte Vasokonstriktion vermindert. Die in vitro-Ergebnisse konnten somit in vivo bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Atorvastatin über die verminderte Expression des AT₁-Rezeptors und wichtiger NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten sowie über die erhöhte Expression und Aktivität der Katalase direkte zelluläre antioxidative Effekte bewirkt, die nicht auf die cholesterinsenkende Wirkung von HMG-CoA-Reduktasehemmern zurückzuführen sind. Diese antioxidativen Eigenschaften der Statine mit konsekutiver Verbesserung der Endothelfunktion könnten zur atheroprotektiven Wirkung dieser Substanzklasse beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995; 332: 488-493
2. Andreoli TE. Free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108: 650-651
3. Babior B. NAD(P)H oxidase: An update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476
4. Bakker-Arkema RG, Davidson MH, Goldstein RJ, Davignon J, Isaacsohn JL, Weiss SR, Keislon LM, Brown WV, Miller VT, Shurzinske LJ, Black DM. Efficacy and safety of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia. *JAMA* 1996; 275: 128-133
5. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624
6. Beckmann JS. Peroxynitrite versus hydroxyl radical: The role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann NY Acad Sci* 1994; 738: 69-75
7. Brawn, Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand* 1980; 492: 9-18
8. Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression: New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation* 1993; 87: 1781-1791
9. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844
10. Capponi AM. Distribution and signal transduction of angiotensin II AT₁ and AT₂ receptors. *Blood Press* 1996; 2: 41-46

11. Carey RM, Wang Z, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000; 35: 155-163
12. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: Reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1716-1723
13. Ceylan A, Karasu C, Aktan F, Güven C, Can B, Ozansoy G. Effects of Simvastatin Treatment on Oxidant/Antioxidant State and Ultrastructure of Diabetic Rat Myocardium. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22: 535-547
14. Chamley JH, Cambell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979; 39: 1-61
15. Chase AJ, Newby AC. Cerivastatin inhibits metalloproteinase production by human vascular smooth muscle cells in response to inflammatory stimuli, a possible mechanism for plaque stabilisation. *Eur Heart J* 2000; 21: 152
16. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Meford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 83: 952-959
17. Cilla DD Jr, Whitfield LR, Gibson DM, Sedman AJ, Posvar EL. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60: 687-695
18. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HAW, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JF, on behalf of the CARDS investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS). *Lancet* 2004; 364: 685-696

19. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1 in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1255-1262
20. Darley-Usmar VM, McAndrew J, Patel R, Moellering D, Lincoln TM, Jo H, Cornwell T, Digerness S, White CR. Nitric oxide, free radicals and cell signaling in cardiovascular disease. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 925-929
21. Dostal LA, Juneau P, Rothwell CE. Repeated analysis of semen parameters in beagle dogs during a 2-year study with the HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin. *Toxicol Sci* 2001; 61: 128-134
22. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr.. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS: Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279: 1615-1622
23. Dunford HB. How do enzymes work? Effect of electron circuits on transition state acid dissociation constants. *J Biol Inorg Chem* 2001; 6: 819-822
24. Dunzendorfer S, Rothbucher D, Schratzberger P, Reinisch N, Kähler CM, Wiedermann CJ. Mevalonate-dependent inhibition of transendothelial migration and chemotaxis of human peripheral blood neutrophils by pravastatin. *Circ Res* 1997; 81: 963-969
25. Dusi S, Domini M, Rossi F. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of rac1 but not rac2 from cytosol to the membranes. *Biochem J* 1995; 308: 991-994
26. Dzau VJ. Mechanism of protective effects of ACE inhibition on coronary artery disease. *Eur Heart J* 1998; 19: J2-J6

27. Egashira K, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Inou T, Takeshita A. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation* 1994; 89: 2519-2524
28. Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Sraer JD, Feidlander G. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells: Role of geranylgeranylation and rho proteins. *Circ Res* 1998; 83: 683-690
29. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Lüscher TF. Statins prevent tissue factor expression in human endothelial cells: Role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002; 105: 1756-1759
30. Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. Changes that lead to fatty streaks formation. *Arteriosclerosis* 1984; 4: 323-340
31. Feigl EO. EDRF: A Protective Factor?. *Nature* 1988; 331: 490-491
32. Frenkel K, Gleichauf C. Hydrogen peroxide formation by cells treated with a tumor promotor. *Free Radic Res Commun* 1991; 12-13 : 783-794
33. Fukui T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998; 101: 2101-2111
34. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q IV, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997; 80: 45-71

35. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefler AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1652-1659
36. Gimbrone MA Jr. Culture of vascular endothelium. *Prog Hemost Thromb* 1976; 3: 1-28
37. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-430
38. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the Renin-Angiotensin System. *Circulation* 1993; 87: 1816-1828
39. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-1148
40. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. Redox-control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med* 1998; 132: 9-15
41. Griendling KK, Harrison DG. Dual Role of Reactive Oxygen Species in Vascular Growth. *Circ Res* 1999; 85: 562-563
42. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000a; 86: 494-501
43. Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000b; 20: 2175-2183
44. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 136-147

45. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997a; 100: 2153-2157
46. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997b; 20: II-11-II-17
47. Harrison DG, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91: 7A-11A
48. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 7–22
49. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678
50. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1456-1462
51. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 2711-2719
52. Hong H, Zeng JS, Kreulen D, Kaufman DI, Chen AF. Atorvastatin protects against cerebral infarction via inhibition of NADPH oxidase-derived superoxide in ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2210-H2215
53. Ignarro LF. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 535-560

54. Jackson CL, Schwartz SM. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension* 1992; 20: 713-736
55. John S, Delles C, Jacobi J, Schlaich MP, Schneider M, Schmitz G, Schmieder RE. Rapid improvement of nitric oxide bioavailability after lipid-lowering therapy with cerivastatin within two weeks. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1351-1358
56. Klag MJ, Ford DE, Mead LA, He J, Whelton PK, Liang KY, Levine DM. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1993; 328: 313-318
57. Koga T, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Hasegawa K, Yamazaki M. Tissue selective inhibition of cholesterol synthesis in vivo by pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1045: 115-120
58. Kothe H, Dalhoff K, Rupp J, Muller A, Kreuzer J, Maass M, Katus HA. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors modify the inflammatory response of human macrophages and endothelial cells infected with chlamydia pneumoniae. *Circulation* 2000; 101: 1760-1763
59. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655
60. Kurusu A, Shou I, Nakamura S, Fukui M, Shirato I, Tomino Y. Effects of the new hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin on antioxidant enzyme activities and renal function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 767-770
61. Kwak B, Muhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000; 6: 1399-1402

62. Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A. p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 1995; 270: 21195-21198
63. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, Manes C, Fischer D, de Groot K, Fliser D, Fauler G, Marz W, Drexler H. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 2005; 111: 2356-2363
64. Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001; 88: 888-894
65. Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases, specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol* 2003; 285: R277-R297
66. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-1135
67. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase mRNA stability by rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 24266-24271
68. Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaldo N, Böhm M, Nickenig G. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *Am J Cardiol* 2000; 88: 1306-1307
69. Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ. Vascular effects of HMG CoA reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 281-287
70. Leung WH, Lau CP, Wong CK. Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolemic patients. *Cardiovasc Res* 1993; 34: 1496-1500

71. Levine GN, Keaney JF, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 512-521
72. Li Z, Iwai M, Wu L, Liu HW, Chen R, Jinno T, Suzuki J, Tsuda M, Gao XY, Okumura M, Cui TX, Horiuchi M. Fluvastatin Enhances the Inhibitory Effects of a Selective AT₁ Receptor Blocker, Valsartan on Atherosclerosis. *Hypertension* 2004; 44: 758-763
73. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143
74. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
75. Lu D, Maulik N, Moraru II, Kreuzer DL, Das DK. Molecular adaption of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am J Physiol* 1993; 264: C715-C722
76. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 2003; 108: 1567-1574
77. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: Mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 947-962
78. Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D, Schillaci G, Vaudo G, Roscini AR, Sinziger H, Mannarino E. Short-term atorvastatin treatment improves endothelial function in hypercholesterolemic women. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 617-621
79. Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem* 1992; 267: 6696-6701

80. Massy ZA, Keane BL, Kasiske BL. Inhibition of the mevalonate pathway. Benefits beyond cholesterol reduction?. *Lancet* 1996; 347: 102-103
81. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* 1999; 4: D339-D345
82. Mitani H, Egashira K, Ohashi N, Yoshikawa M, Niwa S, Nonomura K, Nakashima A, Kimura M. Preservation of endothelial function by the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin through its lipid-lowering independent antioxidant properties in atherosclerotic rabbits. *Pharmacology* 2003; 68: 121-130
83. Mohazzab-H KM, Wolin MS. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 1994; 267: L815-L822
84. Negre-Aminou P, van Vliet AK, van Erck M, van Thiel GCF, van Leeuwen REW, Cohen LH. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors: comparison with other human cell types. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1345: 259-268
85. Nickenig G, Murphy TJ. Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 653-659
86. Nickenig G, Murphy TJ. Enhanced AT₁ receptor mRNA degradation and induction of polyribosomal mRNA binding proteins by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 743-751
87. Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Böhm M, Seewald S, Vetter H. Up-regulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997; 95:473-478
88. Nickenig G, Bäumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits JFM, Daemen MJAP, Vetter H, Böhm M. Estrogen modulates AT₁ receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 1998a; 97: 2197-2201

89. Nickenig G, Röling J, Strehlow K, Schnabel P, Böhm M. Insulin induces up-regulation of vascular AT₁-receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 1998b; 98: 2453-2460
90. Nickenig G, Harrison DG. The AT₁-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis. Part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002; 105: 393-396
91. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaski M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 1995; 95: 46-54
92. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within one month. *Circulation* 1997; 95: 1126-1131
93. Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fennessy PA, Higaki J, Ogihara T. Up-regulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens* 1999; 17: 537-545
94. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996; 75: 617-636
95. Packard CJ. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 97: 1440-1445
96. Park JK, Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Schmidt F, Bieringer M, Schafer O, Lindschau C, Schneider W, Ganten D, Luft F, Haller H. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects. *Kidney Int* 2000; 58: 1420-1430

97. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14438-14488
98. Pasternak RC, Criqui MH, Benjamin EJ, Fowkes FGR, Isselbacher EM, McCullough PA, Wolf PA, Zheng ZJ. Atherosclerotic Vascular Disease Conference Writing Group I: Epidemiology. *Circulation* 2004; 109: 2605-2612
99. Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 20: 645-651
100. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol Rev* 1977; 57: 313-370
101. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michael JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 645-651
102. Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 745-749
103. Rajagopalan S, Kurz S, Muenzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97: 1916-1923
104. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992; 70: 593-599
105. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999; 100: 230-235

106. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 154: 87-96
107. Rinckel LA, Faris SL, Hitt ND, Kleinberg ME. Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding: a novel role for rac in NADPH oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 118-122
108. Romano M, Diomedede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, Guglielmotti A, Albani D, Bruno A, Fruscella P, Salmona M, Vecchi A, Pinza M, Mantovani A. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000; 80: 1095-1100
109. Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-art lecture: role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 943-949
110. Ross R. The smooth muscle cells. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 1971; 50: 172-186
111. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180: 1332-1339
112. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500
113. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809
114. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126

115. Sachinidis A, Ko Y, Schulte KB, Appenheimer M, Seul C, Meyer zu Brickwedde MK, Nickenig G, Vetter H. Effects of lipoproteins on the expression of the early growth response gene-1 and on DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1993; 11: 116-117
116. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JMO, Wun CC, Davis BR, Braunwald E, The Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med* 1996; 335: 1001-1009
117. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on MCP-1-induced monocyte chemotactic activity in vitro. *Am J Physiol* 1999; 277: L534-L549
118. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-1389
119. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906
120. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000; 101: 1372-1378
121. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 2000; 101: 1653-1659
122. Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* 1986; 58: 427-444

123. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H-oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002; 91: 406-413
124. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, McFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia: West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1301-1307
125. Sinkiewicz W, Hoffman A, Bazejewski J, Bujak R, Budzynski J, Zbikowska M, Palgan K. The serum immunoglobulin IgE, interleukin-4 and soluble form receptor CD23 dynamic changes in patients with hypercholesterolemia II B treated with pravastatin. *Eur Heart J* 2000; 21: 155
126. Stamler J, 1991. Epidemiology established major risk factors, and the primary prevention of coronary heart disease. In Chattjee K, Cheitlin M.P, Karlins J. et al. (eds.). *Cardiology 1991; An Illustrated Text/Reference. Vol.2, p.1 Philadelphia, J.B. Lippincott*
127. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) *JAMA* 1986; 256: 2823-2828
128. Sary HC. Evolution of atherosclerotic plaques in the coronary arteries of young adults. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 471a
129. Stein EA, Lane M, Laskarzewski P. Comparison of statins in hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol* 1998; 81: 66b-69b
130. Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 2032-2036

131. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivglighn S, Ferrario CM. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 2000; 101: 1586-1593
132. Suh YA, Arnold RS, Lassègue B, Shi J, Xu X, Soresu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase mox1. *Nature* 1999; 401: 79-82
133. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arteriosler Throm Vasc Biol* 2001; 21: 1712-1719
134. The Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Eng J Med* 1998; 339: 1349-1357
135. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Smith RD. New perspectives in angiotensin system control. *J Hum Hypertens* 1993; 7: 19-31
136. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *New Engl J Med* 1995; 332: 481-487
137. Tsunekawa T, Hayashi T, Kano H, Sumi D, Matsui-Hirai H, Thakur NK, Egashira K, Iguchi A. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation* 2001; 104: 376-379
138. Tsutsumi K, Saavedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *Am J Physiol* 1991; 261: R209-R216

139. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 23317-23321
140. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996; 348: 1079-1082
141. Vaughan CJ, Delanty N. Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1999; 30: 1969-1973
142. Virchow R. Phlebose und Thrombose im Gefäßsystem. In Virchow, R. (ed.). *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin*. Berlin, Meidinger Sohn und Co. 1856; p458
143. Wagner AH, Köhler T, Rückschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of Nitric Oxide-Dependent Vasodilatation by HMG-CoA Reductase Inhibitors Through Attenuation of Endothelial Superoxide Anion Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 61-69
144. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin-system. *Circulation* 1999; 99: 2027-2033
145. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rösen R, Böhm M, Nickenig G. HMG-CoA Reductase Inhibitors Improve Endothelial Dysfunction in Normocholesterolemic Hypertension via Reduced Production of Reactive Oxygen Species. *Hypertension* 2001a; 37: 1450-1457
146. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of Geranylgeranylation Reduces Angiotensin II-Mediated Free

Radical Production in Vascular Smooth Muscle Cells: Involvement of Angiotensin AT₁ Receptor Expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001b; 59: 646-654

147. Wassmann S, Hilgers S, Laufs U, Böhm M, Nickenig G. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1208-1212
148. Wassmann S, Faul A, Hennen B, Scheller B, Böhm M, Nickenig G. Rapid effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function. *Circ Res* 2003; 93: 98-103
149. Wassmann S, Nickenig G. Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction - modulation by statins. *Endothelium* 2003; 10: 23-33
150. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension* 2004; 44: 381-386
151. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001; 7: 687-692
152. William C, Schindler R, Frei U, Eckardt KU. Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276: H2044-H2052
153. Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 684-691
154. Winterbourne CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 53-58

155. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2479-2488
156. Wilson PW. Metabolic risk factors for coronary heart disease: current and future prospects. *Curr Opin Cardiol* 1999; 14: 176-185
157. Wissler RW. The arterial medial cell, smooth muscle, or multifunctional mesenchyme? *J Atheroscler Res* 1968;8: 201
158. Wolinsky H, Glasgow S. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern, *Circ Res* 1969; 25: 677-686
159. Yu HY, Inoguchi T, Nakayama M, Tsubouchi H, Sato N, Sonoda N, Sasaki S, Kobayashi K, Nawata H. Statin attenuates high glucose-induced and angiotensin II-induced MAP kinase activity through inhibition of NAD(P)H oxidase activity in cultured mesangial cells. *Med Chem* 2005; 1: 461-466
160. Yusuf S, Reddy S, Ôunpuu S, Anand S. Global Burden of Cardiovascular Disease: Part II: Variations in Cardiovascular Disease by Specific Ethnic Groups and Geographic Regions and Prevention Strategies. *Circulation* 2001; 104: 2855-2864

Publikationen

Originalarbeiten:

1. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells. Involvement of angiotensin AT1 receptor expression and rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 646-654
2. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Bäumer AT, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rösen R, Böhm M, Nickenig G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 2001; 37: 1450-1457
3. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 300-305

Kongressbeiträge

1. Wassmann S, Nickenig G, Bäumer AT, Müller K, Böhm M. HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren vermindern die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in glatten Gefäßmuskelzellen durch Herabregulation der AT₁-Rezeptor-Genexpression. *Z Kardiol* 2000; 89: 26
2. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Ahlbory K, Linz W, Böhm M, Nickenig G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension by reduced free radical production. *Circulation* 2000; 102: II-95
3. Wassmann S, Müller K, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Dtsch Med Wochenschr* 2000; 125: S65
4. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Zelluläre antioxidative Effekte von Statinen in vitro and in vivo. *Z Kardiol* 2001; 90: II-286
5. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of statins in vitro and in vivo. *Circulation* 2001; 104: II-214