

Aus dem Physiologischen Institut, Lehrstuhl für Vegetative Physiologie  
der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

Vorstand : Prof. Dr. med. U. Pohl

Endotheliale Superoxidanionen – Bildung :  
Rolle der NAD(P)H – Oxidase und  
ihre Modulation durch das Membranpotential

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Matthias Keller

aus

Ludwigshafen am Rhein - Oggersheim

Jahr

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. med. U. Pohl

Mitberichterstatter : Prof. Dr. S. Werner  
Prof. Dr. M. Aepfelbacher  
Priv. Doz. Dr. A. Sellmayer  
Prof. Dr. D. Jüngst

Mitbetreuung durch  
den promovierten Mitarbeiter : Dr. med. H - Y. Sohn

Dekan : Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung : 11.07.2002

# **Widmung**

Meinen Eltern und  
meiner gesamten Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>A. EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
SUPEROXIDANIONEN IM VASKULÄREN SYSTEM.....	7
<b>B. FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>16</b>
<b>C. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>17</b>
C.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	17
C.1.1. Isolation von humanen Umbilikalvenenendothelzellen.....	17
C.1.2. Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen.....	17
C.2. VERSCHIEDENE METHODEN ZUR MESSUNG DER O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -PRODUKTION.....	18
C.2.1. Lucigenin - verstärkte Chemilumineszenz.....	18
C.2.2. MCLA - verstärkte Chemilumineszenz.....	19
C.2.3. Cytochrom C - Methode.....	19
C.2.4. NBT - METHODE.....	20
C.3. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - MESSUNG IM ZELLFREIEN SYSTEM, IN ZELLYSATEN UND INTAKTEN ZELLEN.....	20
C.3.1. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Messung im zellfreien System.....	20
C.3.1.1. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Messung im zellfreien System mittels Chemilumineszenz.....	21
C.3.1.2. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Messung im zellfreien System mit der Cytochrom C - Methode.....	21
C.3.2. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Messung an HUVEC - Lysaten.....	21
C.3.2.1. Herstellung von Zellysaten.....	22
C.3.2.2. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Messung an HUVEC - Lysaten mittels Chemilumineszenz.....	22
C.3.2.3. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Messung an HUVEC - Lysaten mit der NBT - Methode.....	22
C.3.2.4. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Messung an HUVEC - Lysaten mittels der Cytochrom C - Methode.....	23
C.3.3. O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Messung an intakten HUVEC mit Cytochrom C.....	23
C.4. BESTIMMUNG DES MEMBRANPOTENTIALS.....	24
C.5. PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	28
C.5.1. Proteinisolation aus Endothelzellen.....	28
C.5.2. Proteinbestimmung.....	29
C.5.3. SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese.....	30
C.5.4. Western - Blotting.....	31
C.5.5. Färbung von Proteinen.....	31
C.6. IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	32
C.6.1. Immunoprint.....	32
C.6.2. Immunfluoreszenz.....	34
C.7. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	35
C.7.1. Isolierung von RNA aus Endothelzellen.....	35
C.7.2. Polymerasekettenreaktion.....	36

C.8. STATISTISCHE ANALYSEN.....	37
<b>D. ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
D.1. VERGLEICH VERSCHIEDENER METHODEN DER SUPEROXIDANIONENMESSUNG.....	38
<i>D.1.1. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Messung im zellfreien System.....</i>	38
<i>D.1.2. NADH – induzierte Lucigenin - Chemilumineszenz in HUVEC - Lysaten.....</i>	40
<i>D.1.3. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Bildung durch Lucigenin in HUVEC - Lysaten .....</i>	41
D.2. NAD(P)H - OXIDASE ALS QUELLE DER ENDOTHELIALEN O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - PRODUKTION.....	43
<i>D.2.1. NADH - / NADPH - abhängige O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Produktion von HUVEC – Lysaten.....</i>	43
<i>D.2.2. Effekt von Hemmstoffen der leukozytären NAD(P)H - Oxidase in intakten Endothelzellen .....</i>	44
<i>D.2.3. Nachweis von Untereinheiten der leukozytären NAD(P)H - Oxidase in humanen     Endothelzellen.....</i>	45
D.3. MESSUNG DES ENDOTHELIALEN MEMBRANPOTENTIALS .....	46
D.4. MEMBRANPOTENTIAL UND O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	48
D.4.1.1. Steigerung der endothelialen O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Produktion durch Depolarisation.....	48
D.4.1.2. Hemmung der endothelialen O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Produktion durch Hyperpolarisation .....	49
<i>D.4.2. NAD(P)H - Oxidase als die Quelle der Depolarisations - induzierten O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Bildung.....</i>	50
D.4.2.1. Hemmung der Depolarisations – induzierten O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Produktion.....	50
D.4.2.2. NADH - abhängige O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Produktion von HUVEC - Lysaten nach vorausgegangener Depolarisation der intakten Zellen .....	51
<i>D.4.3. Regulationsmechanismen der NAD(P)H - Oxidase.....</i>	52
D.4.3.1. Rolle von Tyrosinphosphorylierung in der Regulation der endothelialen O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Bildung.....	52
D.4.3.2. gesteigerte Tyrosinphosphorylierung nach Depolarisation .....	54
D.4.3.3. Hemmung der Depolarisations - induzierten O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Bildung durch Hemmung von Tyrosinkinasen.....	55
D.4.3.4. Rac - Translokation nach Depolarisation .....	56
D.4.3.5. Expression von gp91 <sup>phox</sup> vor und nach Depolarisation in HUVEC.....	57
<b>F. DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
F.1. VERGLEICH VON METHODEN DER O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - MESSUNG.....	58
F.2. NAD(P)H - OXIDASE ALS EINE WESENTLICHE QUELLE DER ENDOTHELIALEN O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - BILDUNG.....	61
F.3. EINFLUSS DES MEMBRANPOTENTIALS AUF DIE ENDOTHELIALE O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - BILDUNG.....	66
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>74</b>
<b>LITERATUR.....</b>	<b>77</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>103</b>
<b>PUBLIKATIONEN MATTHIAS KELLER .....</b>	<b>104</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>106</b>

## A. Einleitung

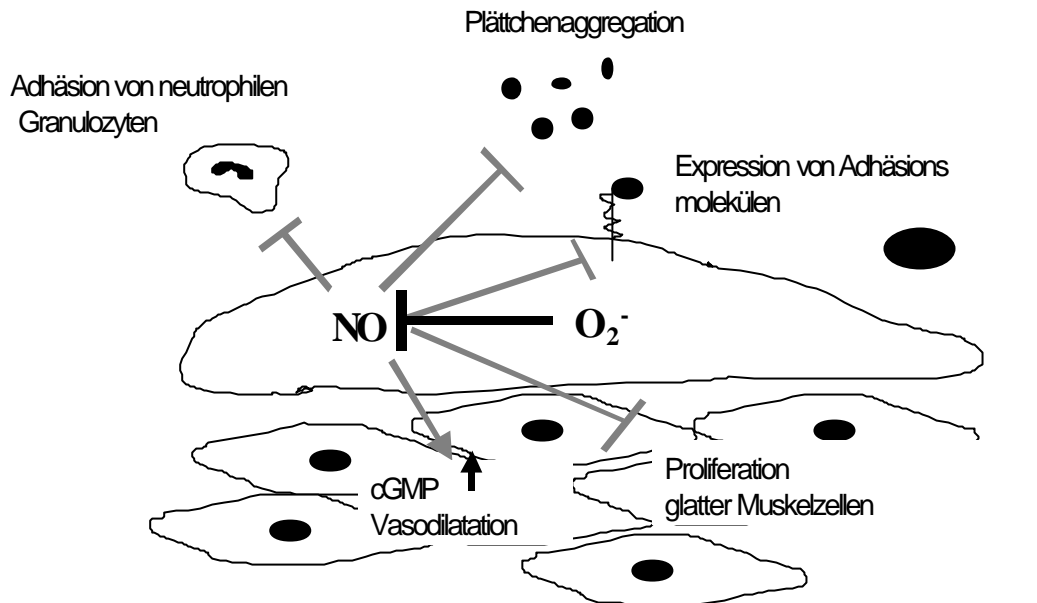
Reaktive Sauerstoff - Spezies (ROS), insbesondere Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) spielen sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen im vaskulären System eine herausragende Rolle. Das Verständnis der vaskulären  $O_2^-$  - Bildung und deren Regulationsmechanismus kann daher als eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer spezifischer Therapieansätze bei Gefäßerkrankungen angesehen werden.

Schon 1956 vermutete Denham Marman, daß im menschlichen Organismus reaktive freie Sauerstoffradikale (ROS) entstehen. Die Entdeckung des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase 1969 (120), welches  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  metabolisiert, bot dann den ersten Anhalt für die Entstehung von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) in vivo. Zunächst wurden ROS nur eine schädigende Rolle zugeschrieben. Das wohl bekannteste Beispiel ist hier die zellschädigende Rolle von ROS im Rahmen der zellulären Immunantwort, wo polymorphkernige Granulozyten pathogene Keime mit einem Gemisch von  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  und Hydrochlorid attackieren. Kommt es aufgrund eines Defektes nicht zu einer Sauerstoffradikalproduktion, wie bei der chronischen Granulomatose, führt dies zu einer geschwächten Immunabwehr (29;159;163). In den letzten Jahren machten jedoch eine Vielzahl von Untersuchungen deutlich, daß ROS nicht nur eine schädigende Wirkung besitzen, sondern auch vielfältige Funktionen in der Signaltransduktion als Signalmoleküle einnehmen können (9;44;54;64). Ein Ungleichgewicht zwischen ROS und zellulären antioxidativen Enzymen wie z.B. der Superoxiddismutase, Katalase und Gluthationperoxidase zugunsten von ROS wird als "oxidativer Streß" bezeichnet. Diesem wird in der Pathophysiologie und Progression vieler Erkrankungen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Dazu gehören so unterschiedliche Krankheiten/Zustände wie Tumorentstehung und – progression (38), neurodegenerative Erkrankungen (10), Diabetes mellitus, septischer Schock (52) und das Altern (11).

### *Superoxidanionen im vaskulären System*

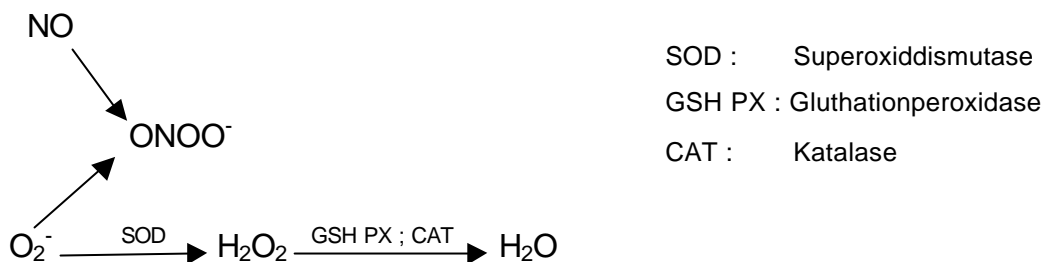
Aufmerksam auf die wichtige Rolle von Superoxidanionen im vaskulären System machten Untersuchungen, die zeigten, daß die Halbwertszeit von EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor), später als NO identifiziert, einem wichtigen endothelialen Signalmolekül mit vasodilatatorischer Wirkung durch exogene Gabe von  $O_2^-$  reduziert und durch Gabe von SOD verlängert werden kann (61,154). Damit lieferten diese Untersuchungen einen ersten Anhalt, daß ROS, insbesondere  $O_2^-$ , auf die Regulation des lokalen Blutflusses Einfluß nehmen können (172). In zahlreichen Untersuchungen wurde das NO - produzierende endotheliale Enzym, dessen Regulation und die Wirkung von NO näher charakterisiert. Dabei wurde die herausragende Rolle von NO auf die physiologische Kontrolle der Organdurchblutung deutlich (32,143,144). So zeigte sich z.B. nach Hemmung der NO Synthase eine Steigerung des systemischen Blutdruckes (149), was auf einen bedeutenden Einfluß von NO auf den Basaltonus der Widerstandsgefäße hinwies. Zusätzlich zu seiner vasomotorischen Funktion wurden für NO jedoch noch weitere wichtige anti - atherosklerotische und - proliferative Effekte gezeigt. So hemmt NO z.B. nicht nur die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und die Plättchenaggregation, sondern auch die Proliferation glatter Muskelzellen (Abbildung 1).

## Abbildung 1



**Abbildung 1 :** Die Abbildung zeigt die Wirkungen von NO. Endotheliales NO diffundiert in die glatte Muskulatur und bewirkt dort eine Vasodilatation und eine Hemmung der Proliferation. Auf der luminalen Seite hemmt NO die Adhäsion neutrophiler Granulozyten und die Plättchenaggregation. Durch redox - sensitive Mechanismen kommt die Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen durch NO zustande. Durch Interaktion von NO mit O<sub>2</sub><sup>-</sup> können diese Wirkungen verhindert werden.

Weitere Untersuchungen an Endothelzellen zeigten dann auch, daß die Menge des freigesetzten NO in der Tat abhängig von der Aktivität der intrazellulären SOD (130) ist. Es ist bekannt, daß O<sub>2</sub><sup>-</sup> mit NO zu Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) reagiert, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit mit  $6.7 \times 10^9 \text{ mol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  um das ca. dreifache schneller als die enzymatische Inaktivierung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> durch die Superoxiddismutase ist (78;92) .



Reaktion von O<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO zu Peroxynitrit, O<sub>2</sub><sup>-</sup> wird durch SOD zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt, welches durch die Enzyme Katalase und Gluthationperoxidase zu H<sub>2</sub>O metabolisiert wird.



Die Bildung von Peroxynitrit stellt somit möglicherweise einen Weg des NO - Abbaus dar. Dies bedeutet aber auch, daß NO durch die Reaktion mit  $O_2^-$  seine biologischen Funktionen nicht mehr wahrnehmen kann. Eine gesteigerte endotheliale  $O_2^-$  - Bildung resultiert damit nicht nur in einer Einschränkung der Endothel – abhängigen Vasodilatation via NO, sondern hat somit auch z.B. pro - atherogene und pro – proliferative Effekte (58;101;106). Dies wurde durch Untersuchungen gezeigt, die die Rolle von  $O_2^-$  als Signalmolekül analysierten. So konnte z.B. nach Stimulation mit dem Zytokin  $TNF_{\alpha}$  und aggregiertem IgG eine  $O_2^-$  - abhängige Expression des CSF-1 (Colony stimulating factor) und von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) nachgewiesen werden (158), welche gehäuft in atherosklerotischen Plaques gefunden wurden (177). Eine Sauerstoffradikal – abhängige MCP-1 Expression wurde inzwischen auch durch Angiotensin II und PDGF an glatten Muskelzellen gezeigt (25,111). Weitere Daten zeigen ebenfalls eine  $O_2^-$  - abhängige Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM - 1 und VCAM –1 (27;110;114).

Aufgrund all dieser Befunde wird eine gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung für die Pathogenese und Progression von Gefäßerkrankungen mitverantwortlich gemacht. So trägt eine gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung durch Störung der Endothelfunktion zum erhöhten peripheren Widerstand und zu den Gefäßkomplikationen bei der essentiellen Hypertonie bei (43). In einzelnen Studien konnte durch die intravenöse Gabe von Vitamin C (175) und weiterer Antioxidantien tatsächlich eine Reduktion des Blutdruckes bewirkt werden. Weiterhin lag in Patienten mit unbehandelter Hypertension ein erhöhter Lipidperoxid -, sowie ein erniedrigter Vitamin E - und SOD - Plasmaspiegel vor (24;53;94;155). Diese Befunde deuteten insgesamt auf einen gesteigerten Gehalt von freien ROS bei Hypertonie hin. An einem Tiermodell der essentiellen Hypertonie, der spontan hypertensiven Ratte (SHR), konnte ebenfalls eine abgeschwächte Endothel – abhängige Vasodilatation in den verschiedensten Gefäßabschnitten festgestellt werden (60;107;117). In isolierten kultivierten Endothelzellen aus Aorten von diesen SHR konnte dann in der Tat eine deutlich reduzierte NO - Aktivität im Vergleich zu normotensiven Kontrollratten gemessen werden. Die Behandlung dieser Zellen mit SOD steigerte die NO – Aktivität, was darauf

hinweist, daß die reduzierte NO – Aktivität in der Tat in der Reaktion von  $O_2^-$  mit NO begründet ist. Bei Messung der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion in diesen Zellen zeigte sich dann auch eine ca. 2 ½ - fache gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung im Vergleich zu Endothelzellen isoliert aus normotensiven Ratten (60). Der in vivo gewonnene Befund, bei dem durch Gabe eines SOD - Derivates der Blutdruck der SHR normalisiert werden konnte (161), ist ein weiterer wichtiger Hinweis, daß die vaskuläre  $O_2^-$  - Bildung im entscheidenden Maß in der Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie beteiligt ist.

Während bei der essentiellen Hypertonie der zugrunde liegende Mechanismus des Ungleichgewichtes zwischen NO und  $O_2^-$  noch weitgehend unerforscht ist, ist er bei der Pathophysiologie der renovaskulären Hypertonie weitgehend bekannt, daß Angiotensin II eine entscheidende Rolle spielt. Die renale Minderdurchblutung oder der erniedrigte Perfusionsdruck z.B. bei einer Nierenarterienstenose resultiert in einer gesteigerten Reninsekretion mit vermehrter Angiotensin II Bildung. In Ratten, bei denen experimentell eine renovaskuläre Hypertonie verursacht wurde, fand sich eine abgeschwächte Endothel – abhängige Vasodilatation bei einer gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung der Aorta (67;68). Bei Vorbehandlung dieser Ratten mit einem Hemmstoff des Angiotensin II bildenden Enzyms (angiotensin converting enzyme, ACE) war die Endothel - abhängige Vasodilatation im Vergleich zu Kontrolltieren nicht mehr eingeschränkt (67). Weitere Untersuchungen an kultivierten humanen Endothelzellen zeigten, daß Angiotensin II - vermittelt über den Rezeptor - Subtyp AT1 - die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung steigert (169). Somit sprechen diese Daten dafür, daß eine gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung, verursacht durch die erhöhte Angiotensin II Bildung, auch bei der Pathogenese der Endotheldysfunktion in der renovaskulären Hypertonie beteiligt ist.

Ein erhöhter Angiotensin II Spiegel scheint auch bei der sogenannten Nitratintoleranz eine Rolle zu spielen. Bei der anti - anginösen Therapie mit Nitraten kommt es nach längerer Behandlung, aufgrund kompensatorisch einsetzender neurohumoraler Mechanismen, zu einer Herabsetzung der vasodilatatorischen Kapazität der Nitrate, was als Nitratintoleranz bezeich-

net wird. Unter anderem kommt es hierbei auch zu einem gesteigerten Angiotensin II - Spiegel. Obwohl die Nitrattoleranz als ein multifaktorielles Ereignis anzusehen ist, sprechen neuere Befunde dafür, daß eine gesteigerte vaskuläre  $O_2^-$  - Bildung, unter anderem verursacht durch den erhöhten Angiotensin II - Spiegel, hierbei eine wichtige Rolle spielt (95;132). Gesichert ist weiterhin die Bedeutung von  $O_2^-$  bei dem Reperfusionsschaden nach Ischämie. Nach Ischämie und nachfolgender Reperfusion kommt es zu einer massiven Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die durch Oxidation von zellulären Strukturen zur Schädigung des Gewebes führen können (63;162;199).

Bei der Entstehung von ischämischen Ereignissen spielt die Atherosklerose eine wichtige Rolle, bei deren Pathogenese wiederum die Endotheldysfunktion einen wichtigen Platz einnimmt. So konnte durch Untersuchungen an Patienten mit koronarer Herzkrankheit gezeigt werden, daß die Schwere der Endotheldysfunktion z.B. auch mit dem Cholesterinspiegel, einem bekannten Risikofaktor der koronaren Herzkrankheit korrelierte (190). Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls eine Assoziation eines erhöhten Cholesterinspiegel mit einer Endotheldysfunktion. So wurde bei nicht - invasiven Studien an Kindern mit familiärer Hypercholesterinämie eine abgeschwächte Endothel - abhängige Vasodilatation beobachtet (22). An Cholesterol gefütterten Tieren konnte nicht nur ebenfalls die Endotheldysfunktion nachgewiesen, sondern auch eine Besserung der Endothelfunktion durch die Behandlung mit SOD erzielt werden (131). Die Vermutung, daß eine gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung eine Ursache dieser Endotheldysfunktion ist, wurde durch die ex vivo  $O_2^-$  - Messung an Gefäßen hypercholesterinämischer Kaninchen bestärkt (129;137). Eine gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung bei Hypercholesterinämie wurde inzwischen weiterhin auch an der Arteria mammaria interna von hypercholesterinämischen Patienten aufgezeigt (79).

Es gibt außerdem auch Hinweise, daß z.B. der Diabetes mellitus mit einer gesteigerten vaskulären  $O_2^-$  - Bildung assoziiert ist. So zeigten Untersuchungen bei diabetischen Patienten eine Reduktion des Blutdruckes nach Gabe von Antioxidantien (23;24). Weiterhin konnte eine gesteigerte  $O_2^-$  -

Bildung in Aorten bzw. Mesenterialarterien von diabetischen Ratten nachgewiesen werden (151;183).

Eine gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung, wie sie bei der Hypertonie, Diabetes mellitus, oder auch Hyperlipidämie (137) vorkommt, scheint auch bei der Pathogenese und Progression der Atherosklerose eine bedeutende Rolle zu spielen (5). So führt, wie bereits erwähnt,  $O_2^-$  durch die Interaktion mit NO nicht nur zu einer abgeschwächten Endothel - abhängigen Vasodilatation, sondern verhindert auch, daß dieses z.B. seine anti - atherosklerotische Wirkung entfalten kann. Weiterhin kann  $O_2^-$  selbst an der Oxidation von LDL zu oxLDL (80;171), einem Atherosklerose förderndem Agens (26;134;195), teilhaben. Weitere Effekte von  $O_2^-$ , wie z.B. die weiter oben beschriebene Förderung der Expression von Adhäsionsmolekülen (25;110;111;114), sowie die pro - proliferative Wirkung können nicht nur bei der Atherosklerose, sondern auch z.B. bei der Intima - Proliferation nach Ballondilatation von Bedeutung sein (55).

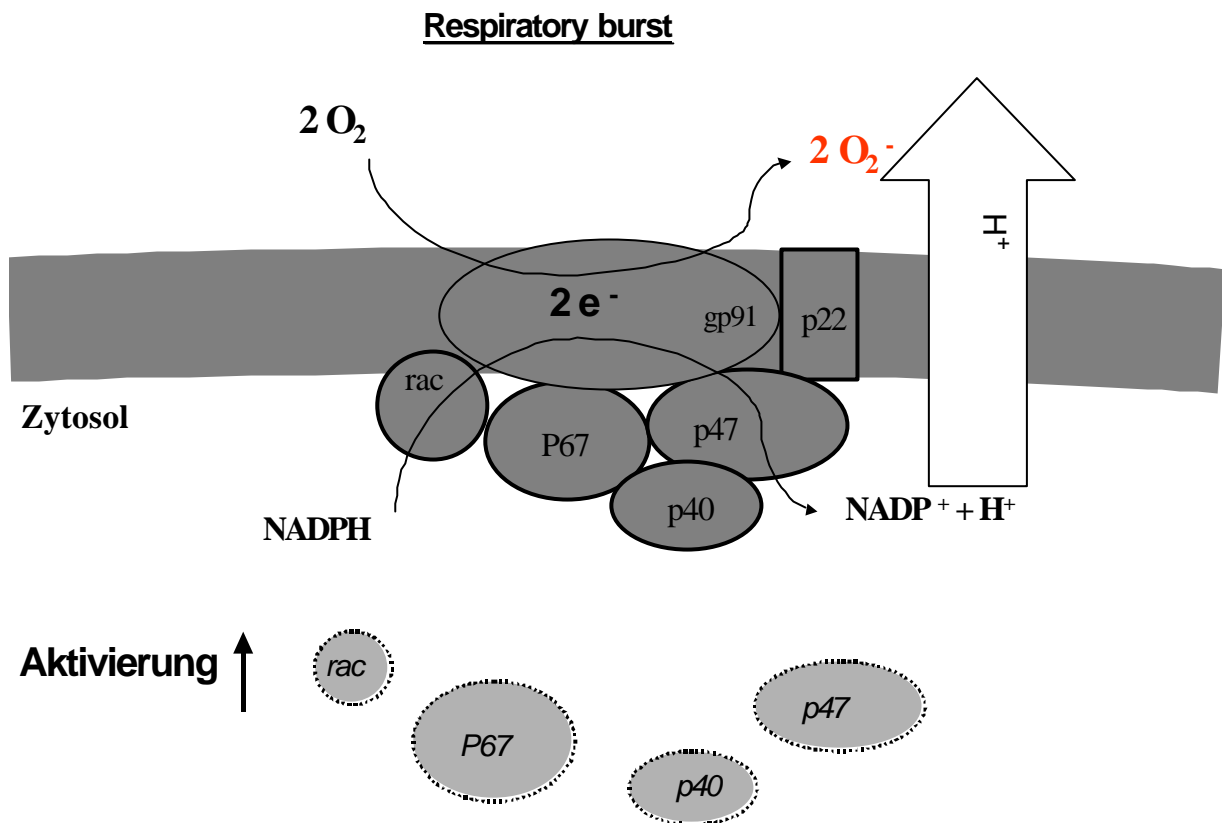
Verschiedene Stimuli führen im Endothel zu einer gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung. 1986 wurde eine gesteigerte  $O_2^-$  - Produktion durch Phorbol ester, die zur Aktivierung der Proteinkinase C führen, als auch durch das Kalzium Ionophor A 23187, welches die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht, beobachtet (116). Aber nicht nur diese pharmakologischen Stimuli hatten Effekte, sondern auch Zytokine wie Interleukin - 1 und Interferon bewirkten eine Steigerung der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung (115). Ebenso zeigten sowohl wichtige Modulatoren des Gefäßtonus, wie z.B. Angiotensin II (169) und Bradykinin (74), als auch mechanochemische Reize wie Schubspannung (76) und Hypoxie / Reoxigenierung in kultivierten Endothelzellen einen Einfluß auf die basale endotheliale  $O_2^-$  - Produktion.

In Endothelzellen existieren dabei wohl mehrere Enzyme die, unter bestimmten Bedingungen,  $O_2^-$  produzieren können. Hierzu gehören nicht nur Enzyme der Atmungskette (185), sondern auch Enzyme, die am Arachidonsäuremetabolismus beteiligt sind und zur Bildung von Prostaglandinen führen (8). Als weitere mögliche Quellen der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung werden auch NO - Synthasen diskutiert (30;145;146;173). Bei Beginn die-

ser Arbeit gab es außerdem auch erste Hinweise, daß eine, der leukozytären NAD(P)H - Oxidase ähnlichen NAD(P)H - Oxidase im Endothel exprimiert wird und wesentlich zur endothelialen  $O_2^-$  - Bildung beitragen könnte (17;84).

In Leukozyten ist diese NAD(P)H - Oxidase die Quelle des sog. Respiratory burst, einer  $O_2^-$  - Produktion, welche in der zellulären Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt. Nach Aktivierung des Enzyms kommt es durch eine Ein - Elektronenreduktion von Sauerstoff an der äußeren Zellmembran zur  $O_2^-$  - Produktion. Redoxzentrum ist hierbei Cytochrom b558. Cytochrom b558 ist ein Heterodimer, bestehend aus  $p22^{phox}$  und  $gp91^{phox}$ , welche in der äußeren Zellmembran lokalisiert sind. Bei der Aktivierung kommt es zur Membrantranslokation der zytosolischen Untereinheiten  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  und  $p67^{phox}$  (siehe Abbildung 2) (69;127). Weiterhin ist für eine vollständige Aktivierung auch die Translokation des GTP - bindenden - Proteins rac Voraussetzung (1;14;35). Die genaue Funktion bzw. die Translokationsmechanismen dieser niedermolekularen GTPase rac für die NAD(P)H - Oxidase Aktivierung sind noch nicht vollständig aufgeklärt (99). Die Rolle von  $p40^{phox}$  bei der Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase ist ebenso noch unklar (16;157).

Abbildung 2



**Abbildung 2:** Die Abbildung zeigt den sog. Respiratory burst nach Leukozytenaktivierung mit Translokation der NAD(P)H Oxidase - Untereinheiten p67, p40, p47 und rac vom Zytosol an die äußere Zellmembran und konsekutiver  $O_2^-$  - Bildung.

Obwohl es Hinweise für die Existenz einer solchen NAD(P)H – Oxidase auch im Endothel gab, war einerseits noch nicht klar, ob sie auch konstitutiv aktiv war und somit schon zur basalen endothelialen  $O_2^-$  - Bildung beitrug. Andererseits war nicht bekannt, ob sie mehr NADH - oder NADPH - abhängig war. Noch weniger untersucht waren die Regulationsmechanismen dieser endothelialen NAD(P)H – Oxidase. Einen bisher noch nicht bekannten Stimulus zur Steigerung der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung beschrieben 1996 Al-Mehdi et al.. Dort resultierte die Depolarisation von Endothelzellen aus Pulmonararterien in einer gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung (3). Dies kann insofern von Bedeutung sein, als daß es sowohl unter physiologischen, als auch pathophysiologischen Bedingungen zu Veränderungen des endothelialen Membranpotentials kommt. So rufen vasoaktive Substanzen, wie z.B. Bradykinin, Histamin, ATP und Adenosin transiente Ver-

änderungen des endothelialen Membranpotentials hervor (122). Doch auch durch mechanochemische Reize, wie Änderungen der Wandschubspannung und Hypoxie kann es über Veränderung der Ionenleitfähigkeiten zur Änderung des Membranpotentials kommen (2;4;135). Ein erhöhter transmuraler Druck scheint im Gefäß einen depolarisierenden Effekt zu haben. So wurde gezeigt, daß glatte Muskelzellen aus hypertensiven Ratten eine chronische Depolarisation aufwiesen (109). Aber auch bei akuten Steigerungen des transmuralen Druckes konnte in Zerebral (91) - und Interlobulararterien (65) eine Depolarisation von glatten Muskelzellen gezeigt werden. Durch Verbindungen zwischen Endothel und glatten Muskelzellen könnten diese akuten oder chronischen Veränderungen des glattmuskulären Membranpotentials auf das Endothel fortgeleitet werden (12;31). Andere Arbeiten zeigten weiterhin, daß ein erhöhter transmuraler Druck sowohl mit einer Reduktion der NO - medierten Dilatation in isolierten Widerstandsgefäßen (15), als auch mit einer gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung des Gefäßes einherging (33;77;184). Hierbei wurde bislang jedoch nicht untersucht, welche Rolle die Druck - induzierte Depolarisation spielen könnte.

Bisher war nicht bekannt, ob der durch Depolarisation - verursachten Steigerung der meßbaren endothelialen  $O_2^-$  - Menge eine Mehrproduktion von  $O_2^-$  oder die Reduktion von anti - oxidativen Mechanismen zu Grunde liegt. Wenn diese Steigerung tatsächlich auf einer vermehrten  $O_2^-$  - Produktion beruht, stellt sich die Frage, welches Enzym für diese Produktion verantwortlich ist und über welchen Signalprozeß diese Aktivierung vermittelt wird. In dieser Arbeit sollten sowohl diese Fragen, als auch die Frage, ob und in welcher Art und Weise sich auch Hyperpolarisation der Zellmembran auf die  $O_2^-$  - Bildung von humanen Endothelzellen auswirkt, untersucht werden.

## B. Fragestellung

Die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung spielt aufgrund der Interaktion von  $O_2^-$  mit NO und der Wirkung von  $O_2^-$  als Signalmolekül im kardiovaskulären System eine entscheidende Rolle. Bei Beginn dieser Arbeit gab es Hinweise, daß eine der leukozytären NAD(P)H – Oxidase ähnlichen Oxidase auch im Endothel existiert. In diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine NAD(P)H – Oxidase mit Ihren Untereinheiten in der Tat auch in humanen Endothelzellen vorhanden, ob sie im Gegensatz zur leukozytären Form konstitutiv aktiv ist, und welchen Beitrag sie zur basalen endothelialen  $O_2^-$  - Bildung leistet. Weiterhin sollte getestet werden, welche Signalwege in der Regulation der Enzymaktivität involviert sind. Aufgrund der wichtigen Rolle des Membranpotentials vaskulärer Zellen in der Regulation des lokalen Blutflusses und dessen Veränderung unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen sollte ferner untersucht werden, ob und wie sich sowohl De – als auch Hyperpolarisation der Zellmembran auf die  $O_2^-$  - Bildung auswirken, welches Enzym hierbei eine Rolle spielt und welche Signaltransduktionsmechanismen in dessen Regulation beteiligt sind. Zur  $O_2^-$  - Messung an vaskulären Zellen war die Lucigenin – Chemilumineszenz – Methode etabliert, so daß auch hier anfänglich mit dieser Methode gearbeitet wurde. Da jedoch dann Daten publiziert wurden, die bei dieser  $O_2^-$  - Meßmethode erhebliche Nachteile aufwiesen, mußte mit weiteren anderen Methoden der  $O_2^-$  - Messung überprüft werden, ob diese Nachteile auch unter unseren Versuchsbedingungen auftraten.



## C. Material und Methoden

### C.1. Zellbiologische Methoden

#### C.1.1. Isolation von humanen Umbilikalvenenendothelzellen

PBS <sup>-</sup>	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> : 160mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Dispase	Dispase II, Konzentration 2.4 U/ml in PBS <sup>-</sup>
HUVEC Medium	Medium 199 mit 20 % Kälberserum und 20 % endothelial cell growth medium, 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin

Humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) wurden aus frischen Umbilikalvenen mit einer Länge von ca. 10 – 15 cm unter sterilen Bedingungen isoliert. Zu diesem Zweck wurden beide Venenenden kanüliert und die Vene mit sterilem PBS<sup>-</sup> durchspült. Anschließend wurden die Venen 30 min bei 37 ° C intraluminal mit Dispase inkubiert, wobei die Kanülenenden mit einem 3 - Wege - Hahn verschlossen wurden. Die abgelösten Endothelzellen wurden durch Spülung mit 50 ml Medium 199 in ein Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (10 min mit 500 g) wurde das Pellet in 12 ml HUVEC Medium resuspendiert und auf eine 24 Loch - Zellkulturschale verteilt.

#### C.1.2. Kultivierung von humanen Umbilikalvenenendothelzellen

PBS <sup>-</sup>	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> : 160mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypsin/ EDTA Lösung	0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% EDTA

HUVEC Medium      Medium 199 mit 20 % Kälberserum und 20 % endothelial growth medium, 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin

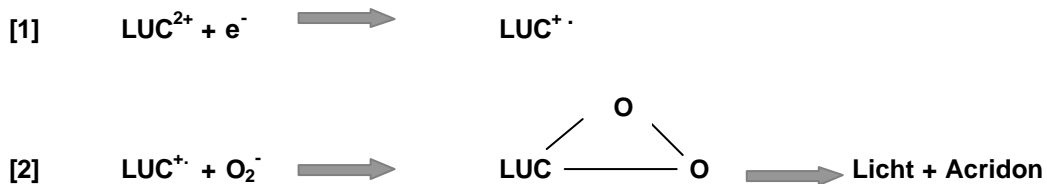
HUVEC wurden in Zellkulturschalen in HUVEC Medium bei 37° C im Inkubator bei einem Wasserdampf gesättigten Luftgemisch mit 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Nach jeweils 2 Tagen wurde das Medium gewechselt. Die Subkultivierung erfolgte nach Erreichen des Konfluenzstadiums. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, 2-4 Minuten mit Trypsin Lösung inkubiert und durch leichtes Klopfen abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann mit HUVEC Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 bis 1:5 auf weitere Zellkulturschalen verteilt. Verwendet wurden Zellen der Passagen 2 und 3.

### *C.2. Verschiedene Methoden zur Messung der O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Produktion*

Um die zunächst verwendete Lucigenin Methode auf Ihre Validität zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden der Superoxidationenmessung im zellfreien System, im Zellysat, sowie an intakten Zellen miteinander verglichen und überprüft. Verwendet wurden hierbei die Chemilumineszenzmethode mit zwei verschiedenen Substanzen, die Cytochrom C - Methode sowie die NBT - Methode.

#### *C.2.1. Lucigenin - verstärkte Chemilumineszenz*

Für die durch O<sub>2</sub><sup>-</sup> - induzierte Lucigenin - Chemilumineszenz wird folgender Entstehungsmechanismus diskutiert. Das Lucigenin Di - Kation benötigt zunächst eine Ein - Elektronenreduktion zum Lucigenin Kation Radikal [1]. Dieses Radikal reagiert mit O<sub>2</sub><sup>-</sup>, wobei ein instabiles Dioxethan gebildet wird. Dessen spontaner Zerfall resultiert in der Bildung eines angeregten Acridon, welches während des Rückfalls in den Ruhezustand Photonen emittiert [2] (105;179;189).

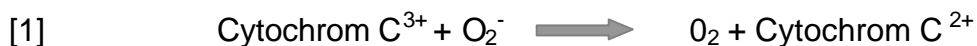


### C.2.2. MCLA - verstärkte Chemilumineszenz

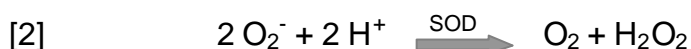
MCLA ( 2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one), ist ein methyl-Cypridina-luciferin Analogon. Dieser Chemilumineszenzfarbstoff zerfällt ähnlich wie Lucigenin durch die Anregung nach Kontakt mit  $\text{O}_2^{-}$  unter Photonenemission (112;147;186). Die Chemilumineszenzintensität sowohl der Lucigenin - als auch der MCLA – Methode wurde mittels eines Photomultipliers in einem Luminometer registriert und alle 3 Sekunden erfaßt. Die Darstellung erfolgt in relativen Licht Einheiten (RLU).

### C.2.3. Cytochrom C - Methode

Die  $\text{O}_2^{-}$  - Produktion wurde als derjenige Anteil der Cytochrom C - Reduktion bestimmt, der durch SOD inhibierbar war. Cytochrom  $\text{C}^{3+}$  liegt im Reaktionsgemisch als oxidierte Form ( 99,5 % ) vor und wird durch  $\text{O}_2^{-}$  zu Cytochrom  $\text{C}^{2+}$  reduziert [1].



Diese Reduktion bewirkt eine Absorptionzunahme, die photometrisch bei der Wellenlänge 550 nm bestimmt werden kann. Da die Reduktion von Cytochrom C auch  $\text{O}_2^{-}$  unabhängig erfolgen kann (178), wird in einem Vergleichsansatz das Enzym Superoxiddismutase (SOD) beigegeben. SOD katalysiert die Reaktion [2].



Die  $O_2^-$  - spezifische Cytochrom C Reduktion ergibt sich somit aus der Differenz der Cytochrom C Reduktion im Reaktionsansatz ohne SOD und der Cytochrom C Reduktion im Vergleichsansatz mit SOD (48). Das entstehende  $H_2O_2$  hatte dabei keinen Einfluß auf diesen SOD – hemmbaren Anteil, insofern als daß in unseren Kontrolluntersuchungen die Gabe von Katalase in den Vergleichsansatz mit SOD keinen Effekt zeigte. Die Absorptionsdifferenz zwischen Reaktions – und Vergleichsansatz wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ( $E_{550\text{ nm}} = 2.1 \times 10^4 \text{ [mol/L]}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (113;118) in  $\text{nmol } O_2^-$  umgerechnet.

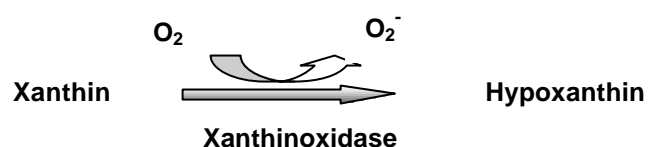
#### C.2.4. NBT - Methode

Als weitere Methode zur  $O_2^-$  - Messung wurde die NBT - Reduktion verwendet. Die Reduktion von Nitroblue Tetrazolium (NBT), einer gelblichen Lösung, führt zur Bildung von Diformazan, einem bläulich/schwarzen Präzipitat (136;174). Da die Reduktion von NBT jedoch, wie die von Cytochrom C, auch  $O_2^-$  unabhängig erfolgen kann (104), wird zur Bestimmung der  $O_2^-$  - Produktion ebenfalls der Anteil der NBT - Reduktion, der durch SOD hemmbar ist verwendet. Das präzipitierte Diformazan wurde densitometrisch ausgewertet (Software : Molecular Analyst). Die Darstellung des SOD - inhibierbaren Anteils der NBT - Reduktion erfolgte in Optische - Dichte - Einheiten (ODU).

### C.3. $O_2^-$ - Messung im zellfreien System, in Zellysaten und intakten Zellen

#### C.3.1. $O_2^-$ Messung im zellfreien System

Die enzymatische Umsetzung von Xanthin (X) durch die Xanthinoxidase (XO), die zu einer  $O_2^-$  - Produktion führt, wurde verwendet, um im zellfreien System die verschiedenen Meßmethoden zu vergleichen.



### C.3.1.1. $O_2^-$ - Messung im zellfreien System mittels Chemilumineszenz

Reaktionsansatz                      100  $\mu$ M Xanthin (X) in 400  $\mu$ l PBS<sup>-</sup>  
Xanthinoxidase (XO)

Zunächst wurden dem Reaktionsansatz Lucigenin (250  $\mu$ M) oder MCLA (10  $\mu$ M) zugefügt und im Anschluß die  $O_2^-$  - bildende Reaktion durch Zugabe des Enzyms XO in steigender Konzentration (1 - 5 mU/ml) gestartet. Die Chemilumineszenzintensität wurde mittels des Photomultipliers des Luminometers alle 3 Sekunden erfaßt.

### C.3.1.2. $O_2^-$ - Messung im zellfreien System mit der Cytochrom C - Methode

PBS<sup>-</sup>                                      Phosphat gepufferte Salzlösung ohne  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ : 160mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM  $Na_2HPO_4$ , 1,5mM  $KH_2PO_4$   
Reaktionsansatz                      100  $\mu$ M Xanthin (X), 60  $\mu$ M Cytochrom C in PBS<sup>-</sup>  
Vergleichsansatz                      100  $\mu$ M Xanthin (X), 60  $\mu$ M Cytochrom C, 200 U/ml SOD in PBS<sup>-</sup>

Sowohl zu dem Reaktionsansatz als auch dem Vergleichsansatz wurde das Enzym XO (1 – 5 mU) beigefügt und damit die  $O_2^-$  - bildende Reaktion gestartet. Die Absorption wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bei  $\lambda = 550$  nm bestimmt und wie oben beschrieben in nmol  $O_2^-$  umgerechnet.

### C.3.2. $O_2^-$ - Messung an HUVEC - Lysaten

Für die Messung einer zellulären NADH bzw. NADPH - abhängigen  $O_2^-$  - Produktion wurden Zellen lysiert und nach Zugabe von NADH oder NADPH zum Zellysat die  $O_2^-$  - Produktion gemessen.

### C.3.2.1. Herstellung von Zellysaten

PBS <sup>-</sup>	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> : 160mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypsin / EDTA Lösung,	0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% EDTA DMEM / Ham's F12 Medium.
Lysispuffer	hyposmolarer monobasischer Kaliumphosphat Puffer (20 mM K <sup>+</sup> ) mit 1 mM EDTA, 5 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin (pH 7.0)

Die HUVEC wurden nach Behandlung 2 x mit eiskaltem PBS<sup>-</sup> gewaschen und durch eine 2 - 4 minütige Inkubation mit Trypsin gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM Medium aufgenommen und bei 1200 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 x PBS<sup>-</sup> mit gewaschen (7 Minuten bei 1200 x g) und anschließend in 400 µl Lysispuffer suspendiert. Nach mindestens 4h Lagerung auf Eis wurden die Zellysate für die Experimente verwendet.

### C.3.2.2. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Messung an HUVEC - Lysaten mittels Chemilumineszenz

Für die Messung der NADH - abhängigen O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Produktion wurden 5 µg Zellysat in 400 µl Lysispuffer suspendiert und in einer Standardküvette in das Luminometer eingebracht. Nach Zugabe von Lucigenin (250 µM) oder MCLA (10 µM) wurde NADH (100 µM) zupipettiert und mit dem Aufzeichnen der Chemilumineszenzsignale begonnen.

### C.3.2.3. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Messung an HUVEC - Lysaten mit der NBT - Methode

PBS <sup>-</sup>	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> : 160mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Reaktionsansatz	2,7 mg NBT in 3 ml PBS <sup>-</sup>
Vergleichsansatz	2,7 mg NBT in 3 ml PBS <sup>-</sup> + 200 U SOD

Hierbei wurden je 5 µg Zellysat mittels Dot blot Technik auf zwei Nitrozellulose Membranen überführt. Anschließend wurde je eine Membran in den Reaktionsansatz und in den Vergleichsansatz eingetaucht und die Reaktion durch Zugabe von NADH (100 µM) gestartet. Nach 5 min wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen der Membran mit PBS<sup>-</sup> gestoppt. Die NBT - Reduktion zu Diformazan, wurde densitometrisch ausgewertet (Software : Molecular Analyst). Die Darstellung des SOD - inhibierbaren Anteils der NBT - Reduktion erfolgte in Optische - Dichte - Einheiten (ODU) / 300 sec / 5 µg Protein.

#### *C.3.2.4. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Messung an HUVEC - Lysaten mittels der Cytochrom C - Methode*

Lysispuffer	20 mM monobasischer Kaliumphosphat Puffer, 1 mM EDTA
Reaktionsansatz	40 µM Cytochrom C in Lysispuffer
Vergleichsansatz	40 µM Cytochrom C, 200 U / ml SOD in Lysispuffer

Für die Evaluierung einer NADH - oder NADPH - abhängigen O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Produktion wurden je 5 µg Zellysat in jeweils beide Ansätze pipettiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von NADH oder NADPH (je 100 µM) gestartet und die Absorptionsänderung bestimmt.

#### *C.3.3. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Messung an intakten HUVEC mit Cytochrom C*

DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium Base ohne L – Glutamin, ohne Phenolrot
Reaktionsansatz	40 µM Cytochrom C, 30 µM L – NA in DMEM Medium
Vergleichsansatz	40 µM Cytochrom C, 30 µM L – NA, 200 U / ml SOD in DMEM Medium

Sämtliche Messungen der endothelialen  $O_2^-$  Produktion wurden unter Hemmung der endothelialen NO Synthase (eNOS) durchgeführt, da NO mit  $O_2^-$  zu  $ONOO^-$  reagiert und so die Messung stören würde. Dafür wurden die HUVEC mit dem NOS Inhibitor L – NA (30  $\mu$ M) 30 min vorbehandelt. Zur  $O_2^-$  - Messung wurden sowohl dem Reaktionsansatz als auch dem Vergleichsansatz die Substanzen, deren Wirkung auf die endotheliale  $O_2^-$  - Produktion untersucht werden sollten, in gleicher Konzentration zugefügt. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Ansätzen (400  $\mu$ l / Vertiefung ( Durchmesser 1,8 cm )) für 30 Minuten überschichtet und anschließend im Überstand die Cytochrom C - Reduktion photometrisch bestimmt. Eine direkte Beeinflussung der Cytochrom C -Reduktion durch die verwendeten Substanzen wurde im zellfreien Ansatz vor Versuchsdurchführung an Zellen überprüft.

#### *C.4. Bestimmung des Membranpotentials*

Bis-[1,3-dibutylbarbituric acid] trimethineoxonol ( Bis–oxonol ) wurde als Indikator von Änderungen des transmembranären elektrischen Potentials benutzt. Der Farbstoff zeigt Veränderungen der Fluoreszenzintensität bei Änderungen des Membranpotentials (18;21;97). Die Vorstellung über den Mechanismus ist, daß die Verteilung von Bis – oxonol zwischen der Plasmamembran und dem Zytosol eine Funktion des Membranpotentials ist. Eine Membrandepolarisation führt zu einer Steigerung des zytosolischen Anteiles des Farbstoffes, was seine vermehrte Bindung an Proteine und damit eine verstärkte Fluoreszenz zur Folge hat. Entsprechend wird eine Hyperpolarisation durch eine Abnahme der Fluoreszenz angezeigt (18;21;97). In Voruntersuchungen wurde Bis – oxonol auf eine potentielle Zelltoxizität überprüft. Die Zugabe von Bis – oxonol ( $10^{-7}$  M, 24 h) führte dabei zu keiner Beeinflussung des Wachstums in kultivierten Zellen über 24 Stunden.

Bis – oxonol Lösung             $10^{-7}$  M Bis – oxonol gelöst in 2,7 mM Kalium  
HEPES – Tyrode Puffer



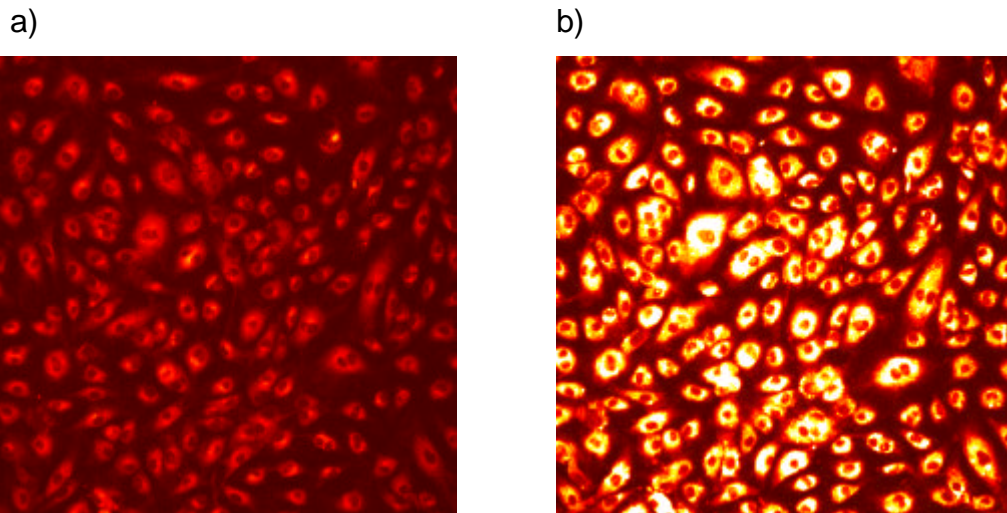
90 mM Kalium Puffer       $10^{-7}$  M Bis – oxonol gelöst in 90 mM Kalium  
HEPES – Tyrode Puffer

Vor der Messung an Zellen wurde zunächst ausgeschlossen, daß die verwendeten Substanzen bzw. Puffer direkt die Bis - oxonol Fluoreszenz beeinflussen.

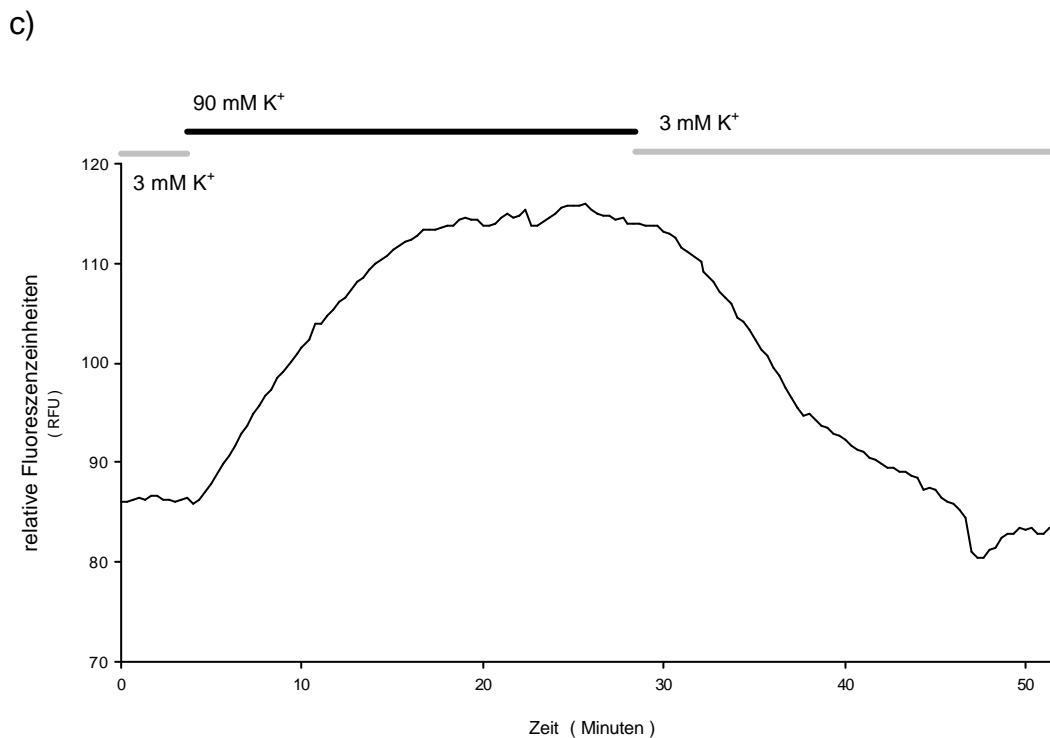
Das Membranpotential von kultivierten Zellen kann vom Konfluenzstadium beeinflusst werden (188). Daher wurden die HUVEC auf Glasscheiben bis zum Erreichen eines vollständigen Konfluenzstadiums kultiviert. Vor der Messung wurden die Zellen zunächst im Dunkeln für 30 Minuten mit der Bis – oxonol Lösung äquilibriert. Anschließend wurden die Glasscheiben in eine Durchflußkammer transferiert, in welcher die Zellen kontinuierlich mit der Bis – oxonol Lösung mit einer konstanten Flußrate von 0,5 ml/min superfundiert wurden. Dies war notwendig, um die Konzentration des Farbstoffes und die optischen Bedingungen beim Mikroskopieren konstant zu halten. Nach Erreichen von steady state Bedingungen für die Fluoreszenzintensität wurden der Superfusionslösung verschiedene Substanzen beigegeben bzw. die Kaliumkonzentration durch Pufferwechsel auf 90mM erhöht. Die Erfassung der Fluoreszenz erfolgte mittels eines konfokalen Laser - scanning Mikroskopes bei der Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm. Die Meßdaten wurden alle 20 Sekunden erfaßt und die Fluoreszenzintensität mit der LSM Software analysiert.

Die Abbildungen 3 a) b) c) zeigen repräsentative Beispiele der charakteristischen Zunahme der Bis – oxonol Fluoreszenz während der Depolarisation von HUVEC durch Superfusion eines Puffers, der eine Kalium Konzentration von 90 mM aufwies.

### Abbildung 3



**Abbildung 3 a) und b)** zeigen Beispiele für die Fluoreszenz von Bis – oxonol (100 nM) beladenen Zellen vor und nach Depolarisation mit 90 mM Kalium Puffer. Es ist deutlich die Fluoreszenzzunahme nach Depolarisation zu erkennen.



**Abbildung 3 c)** : Die Abbildung zeigt die Originalregistrierung von Änderungen der Fluoreszenz, während der Superfusion der Endothelzellen mit einem 90 mM Kalium enthaltendem Puffer mit einer Superfusionsrate von 0,5 ml / min. Infolge der niedrigen Superfusionsrate erfolgte die Zufuhr bzw. das Entfernen der kaliumreichen Lösung nur langsam.

Um die Intensität der Fluoreszenz als Funktion des Membranpotentials zu kalibrieren, wurden die HUVEC jeweils mit einer Lösung, die frei von Na - Pyruvat und NaCl war, mit verschiedenen Kalium Konzentrationen superfundiert, wobei die Osmolarität durch Zugabe von N - Methylglucamin konstant gehalten wurde. Weiterhin beinhaltete die Kalibrationslösung 1  $\mu\text{M}$  des  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  Ionophors Gramicidin und 100 nM Bis - oxonol. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration wurde schrittweise so verändert, daß das errechnete Kaliumgleichgewichtspotential zwischen  $- 86,4 \text{ mV}$  und  $+ 8 \text{ mV}$  variierte. Die Berechnung des Membranpotentials erfolgte anhand der Nernst - Gleichung ( $E_{\text{Ion}} = (R \cdot T/z \cdot F) \times (\ln [ \text{Ion} ]_{\text{a}} / [ \text{Ion} ]_{\text{i}})$ ), wobei R = Gaskonstante, F = Faraday – Konstante, z = Wertigkeit des Ions,  $[ \text{Ion} ]_{\text{a/i}}$  = Ionenkonzentration außen / innen) bei Annahme einer intrazellulären Konzentration von  $\text{K}^+$  - von 130 mM (97). Die Kalibration der Bis – oxonol Fluoreszenz ergab eine lineare Beziehung zwischen dem errechnetem Membranpotential - bei definierter extrazellulärer Kaliumkonzentration - und der Fluoreszenzintensität ( $n = 5$  ,  $r^2 = 0.99$ ) (Abb.4). Somit konnten sowohl das Ruhemembranpotential, als auch Veränderungen der Fluoreszenzintensität in absolute Werte in mV umgerechnet werden. Die Steigung der Kalibrationsgeraden von 0.9 bedeutete, daß unter unseren Versuchsbedingungen eine Änderung des Membranpotentials von 1 mV zu einer Änderung der Fluoreszenz von 0.9 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) führte (Abb.4).





### C.5.3. SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese

nach Laemmli 1970, verändert

Acrylamid Lösung	40% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) Bisacrylamid
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris HCl pH 8.8
4x Sammelgelpuffer	0,5M Tris HCl pH 6.8
2x Probenpuffer (reduzierend)	0,125 M Tris HCl pH 6.8 , 4% (w/v) SDS, 20%(v/v) Glycerin, 0,02% Bromphenolblau (w/v), 200mM Mercaptoethanol
SDS	10% (w/v)
APS	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
Elektrophoresepuffer	25mM Tris HCl pH 8.5 , 192mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Die Auftrennung der Proteine erfolgte für den anti – Phosphotyrosin Western Blot in einem 7 % igem und für den anti – rac Western Blot in einem 12 % igem Polyacrylamid - Trenngel unter denaturierenden Bedingungen. Für das Trenngel wurden für das 7% Gel 4,4 ml (7,5 ml für das 12% Gel) Acrylamidlösung, 14,0 ml (10,9 ml) H<sub>2</sub>O und 6,25 ml Trenngelpuffer gut gemischt und für ca. 20 Minuten entgast. Nach Gabe von 250 µl 10% SDS, 125 µl APS und 12,5 µl TEMED, wurde die Lösung nochmals gut gemischt und zwischen zwei durch 1 mm dicke Spacer getrennte Glasplatten gegeben. Nach ca. 30 Minuten, unter Überschichtung mit H<sub>2</sub>O gesättigtem Isobutanol, war dieser Ansatz polymerisiert. Anschließend wurde der Alkohol durch gründliches Waschen entfernt und das 4 % ige Sammelgel, welches unter identischen Bedingungen wie das Trenngel hergestellt wurde, auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Gel wurde der Probenkamm gesteckt. Nach dem Auspolymerisieren wurden die Probenaschen mit H<sub>2</sub>O gründlich ausgespült und anschließend die Proben, die zuvor mit Hilfe des reduzierenden Probenpuffers (Verhältnis 1:1) und 5 Minuten Kochen bei 100°C denaturiert wurden, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Elektrophoresepuffer bei einer Stromstärke von 65 mA über 3 Stunden ausgeführt.

#### C.5.4. Western - Blotting

- a) anti – Phosphotyrosin Western Blot  
nach Sambrook et al. 1989, verändert

Transferpuffer                    39mM Glycin, 48mM Tris HCl pH 8.0, 0,037%  
(w/v) SDS, 10% (v/v) Methanol

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierzu wurden das Gel und die Membran für 10 min im Transferpuffer äquilibriert. Zwei in Transferpuffer getränkte Lagen Filterpapier wurden glatt und luftblasenfrei auf eine Graphitanode gelegt, darauf die Membran, das Polyacrylamidgel und zwei weitere Lagen des mit Transferpuffers angefeuchteten Filterpapiers. Nach Auflegen der Graphitkathode wurden bei einer Stromstärke von 0,7 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche die Proteine auf die Membran transferiert.

- b) anti - rac Western Blot

Transferpuffer                    25 mM Tris , 96 mM Glycin

Für den elektrophoretischen Transfer von unfixierten, aufgetrennten Proteinen in einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF - Membran, wurde zuerst die Membran kurz mit 100% Methanol befeuchtet. Anschließend erfolgten weitere Äquilibrationen in absteigender Methanolkonzentration (20%-0%) im Transferpuffer (je 10 min). Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte wie unter Punkt a) beschrieben.

#### C.5.5. Färbung von Proteinen

nach Sambrook et al. 1989

Ponceau S Lösung                0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure

Zur Detektion der auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine und zur Abschätzung eines gleichmäßigen Proteinauftrages wurde die Membran 5 min mit Ponceau S Lösung inkubiert. Nach Entfernung der Hintergrundfärbung durch Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde die gefärbten Proteinbanden mit Hilfe einer Kamera aufgenommen.

## C.6. Immunologische Methoden

### C.6.1. Immunoprint

nach Herstellerangaben, Boehringer Mannheim

PBS <sup>-</sup>	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> : 160mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Blocking Puffer	200mM NaCl, 50mM Tris (pH 7,5), 3% BSA, 0,05% Tween20, 10% Pferdeserum
Waschpuffer	
1 Anti Phosphotyrosin	50mM Tris, 150mM NaCl , 0,3% Tween20 (pH 7.5)
2 anti rac	50mM Tris, 150mM NaCl , 0,03% Tween20 (pH 7.5)
APP	alkalischer Phosphatase Puffer, 0,1M NaCl, 5mM MgCl <sub>2</sub> , 100mM HCl pH 9,5
BCIP	5-Bromo 4-Chloro 3-Indolylphosphat 50mg / ml in Dimethylformamid ( DMF )
NBT	Nitroblue Tetrazoliumchlorid 50mg/ml in 70% DMF
Luminollösung	100mM Tris pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM Coumaric acid in H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Lösung	100mM Tris pH 8,5, 1,5 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O

### Erstantikörper :

Anti-Phosphotyrosin (Maus) IgG : Upstate Biotechnology  
(USA)



Anti – rac (Maus) IgG :	Upstate Biotechnology
Anti – p67 <sup>phox</sup> (Kaninchen) IgG :	M.T.Quinn, Department of Immunology, Scripps Re- search Institute, La Jolla, California 92037, USA

*Zweitantikörper:*

Anti - IgG Maus Alkalische Phosphatase konjugiert :	Calbiochem (Deutschland)
Anti IgG – Maus, Peroxidase konjugiert :	Santa Cruz (USA)
Anti IgG Kaninchen, Fluorescein isothiocyanat (FITC) konjugiert :	Santa Cruz (USA)

Nach dem Proteintransfer auf die Membranen erfolgte der Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran herabzusetzen, wurden die unspezifische Bindungsstellen der Membran durch eine mind. 2 stündige Inkubation mit dem Blocking Puffer bei Raumtemperatur unter Schütteln blockiert. Danach wurde 3 x 15 min mit Waschpuffer1 (2) gewaschen und die Membran mit dem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper (Erstantikörper: Anti - Phosphotyrosin 1 µg / ml ; anti – rac 1 µg / ml in Blocking Puffer) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Bei dem anti – Phosphotyrosin Western Blot wurde dreimal mit Waschpuffer 1 gewaschen und dann mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Zweitantikörper inkubiert ( anti - Maus IgG 1: 10000 Verdünnung, 2h ), der den Erstantikörper erkennt. Es wurde erneut 3 x für 15 min mit Waschpuffer und 1 x 10 min mit APP gewaschen. Die vom Erstantikörper gebundenen Proteine auf der Membran konnten nun indirekt über den gebundenen Zweitantikörper mittels der alkalischen Phosphatasereaktion detektiert werden. Dafür wurden in 10 ml APP 66 µl NBT und 34 µl BCIP gegeben und die Membran in dieser Lösung inkubiert, bis die Banden in ausreichender Stärke erschienen. Die Intensität der Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet.

Bei dem anti – rac Western Blot wurde dreimal mit Waschpuffer2 gewaschen und dann mit Peroxidase konjugiertem Zweitantikörper inkubiert



des Zweitantikörpers ausgeschlossen wurde. Die Spezifität des Erstantikörpers für p67<sup>phox</sup> wurde im Western Blot an Lysaten von Leukozyten überprüft.

## *C.7. Molekularbiologische Methoden*

### *C.7.1. Isolierung von RNA aus Endothelzellen*

PBS <sup>+</sup>	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> , 160mM NaCl, 2,7mM KCl, 6,7mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,7mM CaCl <sub>2</sub> , 0,25mM MgCl <sub>2</sub>
Trizol Reagenz	
Chloroform	H <sub>2</sub> O gesättigt
DEPC- H <sub>2</sub> O	1ml/l Diethylpyrocarbonat ( DEPC ) für mind. 2h gerührtes, anschließend autoklaviertes H <sub>2</sub> O

Von konfluenten, mit HUVEC bewachsenen, Zellkulturschalen (Durchmesser 3,5 cm) wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und 1 ml Trizol Reagenz zugegeben. Das Zellysate wurde in Reaktionsgefäße überführt. Um die Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu vervollständigen, wurden die Proben noch für 10 min bei Raumtemperatur gehalten. Dann wurden 300 µl Chloroform hinzugegeben, die Ansätze gut durchmischt und 20 min bei 15000 x g 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die RNA beinhaltet, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und somit von der DNA und den Proteinen getrennt, die sich in der Interphase befanden. Zur Ausfällung der RNA wurden 600 µl Isopropanol zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation (15000 x g, bei 4°C) wurde das Pellet mit 70% (v/v) EtOH gewaschen, nochmals für 15 min (4°C) zentrifugiert, das Pellet getrocknet und in 20 µl DEPC H<sub>2</sub>O aufgelöst.

### C.7.2. Polymerasekettenreaktion

Die gp91<sup>phox</sup> mRNA Expression wurde mit Hilfe der Standard – kalibrierten kompetitiven reversen Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) bestimmt.

Primer gp91<sup>phox</sup> sense primer : 5`- GCT GTT CAA TGC TTG TGG CT-3`; gp91<sup>phox</sup> antisense primer : 5`-TCT CCT CAT CAT GGT GCA CA-3` (84)

DNA Sequenzierung ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit mit AmpliTaq DNA Polymerase, FS Perkin-Elmer-Co. : ABI 373 DNA Sequenzer

Ein humanes gp91<sup>phox</sup> spezifisches cDNA Fragment der Länge von 404 Basenpaaren ( Position 1107 – 1510 ) (153) wurde aus der RNA aus HUVEC mit Hilfe der rt-PCR vervielfältigt. Das gp91<sup>phox</sup> spezifische cDNA Fragment wurde anschließend in das PCR - Script Amp SK(+) Cloning Vector (Stratagene) geklont, und über DNA Sequenzierung seine Identität bestätigt.

Zur Herstellung eines Internstandards wurde dann ein cDNA Fragment von gp91<sup>phox</sup> mit einer Deletion von 100 BP und damit einer Länge von 304 BP mit linker - primer DNA konstruiert, dessen Identität ebenfalls über DNA Sequenzierung bestätigt wurde. Anschließend wurde dieses cDNA Fragment mit Hilfe einer RNA Polymerase in cRNA übersetzt.

In der kompetitiven RT-PCR wurde die gleiche Menge an total - RNA (200 ng) in separaten Reaktionen mit einer definierten Menge des gp91<sup>phox</sup> Standards cRNA für 3 Minuten bei 70° C inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription in cDNA unter Benutzung eines random hexamer primers und Superscript II Transkriptase (Life technologies) für 30 Minuten bei 42° C. Anschließend wurden 25 % jedes RT- Ansatzes in separaten Reaktion mit 20 pmol/l gp91<sup>phox</sup> sense und antisense Primer unter Benutzung des folgenden PCR Protokolls vervielfältigt.

30 sek 95° C, 15 sek. 64° C, 15 sek. 72°C, 42 Zyklen

Der PCR Reaktionsansatz wurden in einem Standard Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid markiert und die Helligkeit photographisch auf einem Polaroid Film Typ 665 festgehalten. Die optische Dichte des Standards und der spezifischen PCR Fragmente wurden mit einem Densitometer bestimmt (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Anschließend wurde die optische Dichte des Internstandards mit dem Faktor 1,329 (404 bp/304bp) korrigiert, um die Längenunterschiede auszugleichen und somit den Internstandard und die Proben quantitativ vergleichen zu können. Die Daten sind in amol/ $\mu$ g total-RNA ausgegeben.

### *C.8. Statistische Analysen*

Da innerhalb einer Versuchsreihe an einem Versuchstag die Ergebnisse normal verteilt waren, aber bei der Betrachtung aller Versuche verschiedener Versuchstage keine Normalverteilung vorlag, wurde zur statistischen Analyse der Wilcoxon Test für gepaarte Meßwerte (mit/ohne Behandlung) verwendet (Statistikprogramm : STATA<sup>?</sup>). Hierbei wurden Unterschiede bei der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0.05$  als signifikant angesehen. Obwohl der Wilcoxon Test keine Aussage über Unterschiede zwischen Mittelwerten erlaubt, wurden alle Daten zu deskriptiven Zwecken als Mittelwert +/- mittlerer Fehler des Mittelwertes dargestellt.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Sigma-Plot für Windows in Form von Balken - oder Liniendiagrammen.

## D. Ergebnisse

### *D.1. Vergleich verschiedener Methoden der Superoxidanionenmessung*

Die Untersuchungen der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion wurden zunächst mit der Lucigenin - verstärkten Chemilumineszenz - Methode durchgeführt. Während der Experimentierphase dieser Arbeit wurden jedoch Daten publiziert, die zeigten, daß Lucigenin unter bestimmten Bedingungen durch Autoxidationsprozesse selbst zur Bildung von  $O_2^-$  führen kann. Daher wurden alternative Methoden der  $O_2^-$  - Messung überprüft und dazu verwendet, zu untersuchen, ob auch unter unseren Versuchsbedingungen in HUVEC eine Lucigenin - vermittelte  $O_2^-$  - Bildung auftritt.

#### *D.1.1. $O_2^-$ - Messung im zellfreien System*

Zunächst wurden in einem zellfreien System definierte Mengen an  $O_2^-$  erzeugt, um verschiedene Methoden der  $O_2^-$  - Detektion zu überprüfen. Zur  $O_2^-$  - Produktion wurde hierbei die enzymatische Umsetzung von Xanthin (X) durch die Xanthinoxidase (XO) angewendet, wobei für alle Reaktionspartner nicht - reaktionslimitierende Konzentrationen eingesetzt wurden. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, zeigte sich in Anwesenheit von 100  $\mu$ M des Substrates Xanthin in der Chemilumineszenz - Messung sowohl mit Lucigenin (250  $\mu$ M) als auch mit MCLA (10  $\mu$ M) eine lineare Korrelation zwischen der Enzymkonzentration (1 – 5 mU/ml) und dem Chemilumineszenzsignal ( $r > 0.98$ ,  $n = 4$ ) bei jedoch insgesamt deutlich unterschiedlichen Signalintensitäten. Hierbei wurden die durch die X/XO Reaktion induzierten Signale durch die Gabe von Superoxiddismutase (SOD, 200 U/ml) bis nahezu auf das Hintergrundsignal reduziert (Tab.1). Weiterhin zeigte sich auch in der auf der Photometrie basierenden Cytochrom C - Methode diese Korrelation ( $r > 0.98$ ,  $n = 4$ ).

**Tabelle 1**

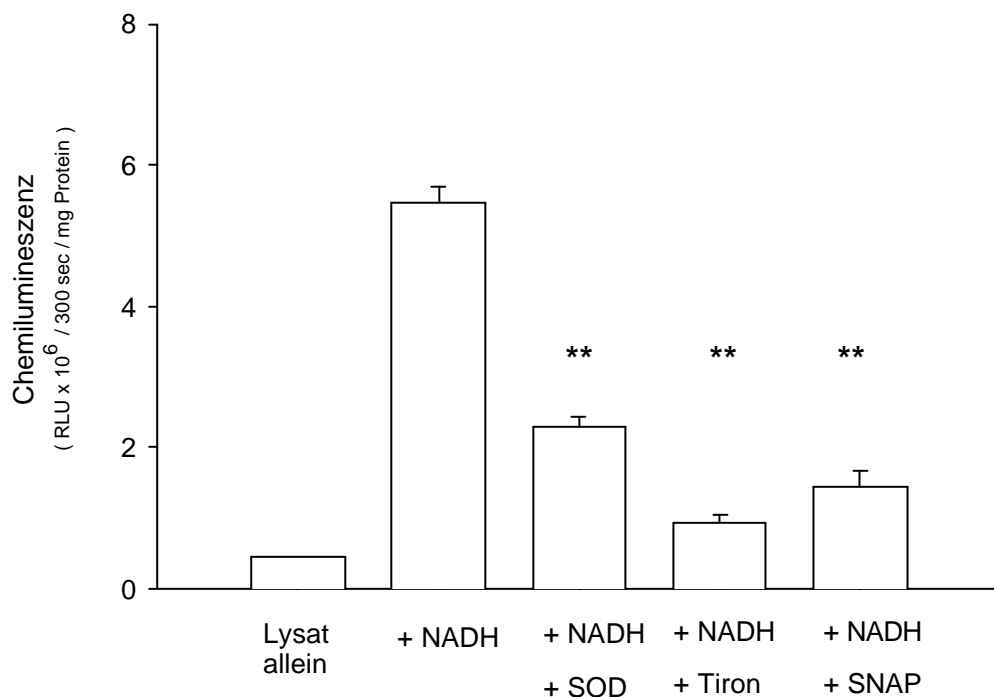
n = 4	Cytochrom C (60 $\mu\text{M}$ )  nmol $\text{O}_2^-$ /min Mittelwert $\pm$ SEM	Lucigenin (250 $\mu\text{M}$ )  RLU Mittelwert $\pm$ SEM	MCLA (10 $\mu\text{M}$ )  RLU Mittelwert $\pm$ SEM
Back - ground	-----	18,4 0,2	5860 62
1mU XO	0,128 0,01	97,6 13,1	11128 47
2mU XO	0,341 0,04	239,1 29	28963 88
5mU XO	0,686 0,04	601,6 47,2	64273 84
5mU XO + SOD	----- -----	30,4 2,0	5093 185
$r^2$	> 0,98	> 0,98	> 0,98

**Tabelle 1** :  $\text{O}_2^-$  - Messung im zellfreien System (Xanthin / Xanthinoxidase (XO) Reaktion) mit drei verschiedenen Methoden. Gezeigt sind die entstandenen Signale bei den XO Konzentration 1 - 5 mU bei einer Xanthin Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ .

### D.1.2. NADH – induzierte Lucigenin - Chemilumineszenz in HUVEC - Lysaten

Da im folgenden insbesondere die potentielle Rolle einer NADH – abhängigen Oxidase geprüft werden sollte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob in HUVEC - Lysaten durch Gabe von NADH eine erhöhte Lucigenin - Chemilumineszenz induziert wurde, und inwieweit diese durch Radikalfänger oder durch NO mittels Gabe eines NO - Donors zu hemmen war. Wie in Abbildung 5 dargestellt, fand sich nach Zugabe von NADH (100  $\mu$ M) zu HUVEC - Lysaten eine signifikante Zunahme des Chemilumineszenzsignals. Das durch NADH Gabe induzierte Chemilumineszenzsignal konnte durch SOD zwar abgeschwächt, aber auch durch Zugabe von höheren Dosen von SOD (bis 500 U/ml) nicht vollständig unterdrückt werden ( $n = 6$ ,  $p < 0.01$ ). Ebenso bewirkten der Radikalfänger Tiron (1 mM) und der NO - Donor SNAP (1  $\mu$ M) eine signifikante Hemmung der NADH - abhängigen Lucigenin - Chemilumineszenz ( $n = 6$ ,  $p < 0.01$ ), ohne diese jedoch vollständig zu unterdrücken.

**Abbildung 5**



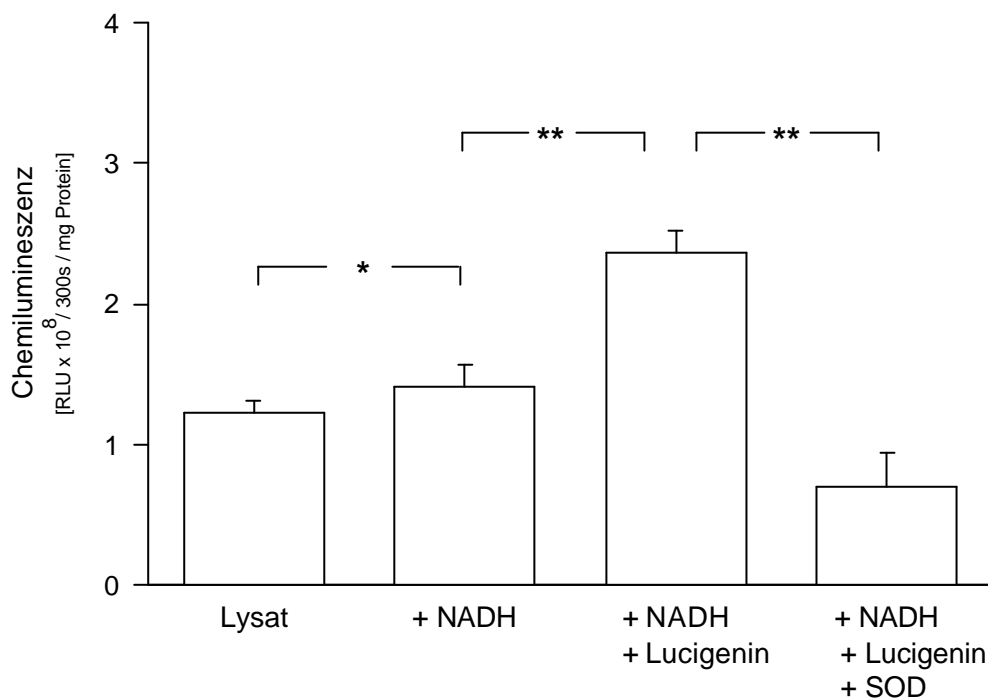
**Abbildung 5:** NADH - abhängige Lucigenin - Chemilumineszenz an HUVEC - Lysaten (Lucigenin 250  $\mu$ M, NADH 100  $\mu$ M) Hemmung der Chemilumineszenz durch SOD (500 U/ml), durch den Radikalfänger Tiron (1 mM) und durch den NO Donor SNAP (1  $\mu$ M). ( $n = 6$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. Lysat + NADH).



### D.1.3. $O_2^-$ - Bildung durch Lucigenin in HUVEC - Lysaten

Um nun zu untersuchen, inwieweit unter diesen Bedingungen eine unspezifische  $O_2^-$  - Bildung durch Lucigenin selbst erfolgte, wurde mit zwei unabhängigen Alternativmethoden an Zellysaten die NADH - abhängige  $O_2^-$  - Bildung in An- und Abwesenheit von zusätzlichem Lucigenin gemessen. Bei Messung der MCLA - Chemilumineszenz steigerte die Zugabe von NADH (100  $\mu$ M) zu HUVEC - Lysaten das Grundsignal nur geringfügig um ca. 17 % (Abb.6). Die zusätzliche Gabe von Lucigenin (250  $\mu$ M) erhöhte jedoch das Meßsignal deutlich um ca. 100 %. Dieser, durch Lucigenin - zusätzlich - induzierte Anstieg konnte durch die Gabe von SOD (200 U/ml) vollständig inhibiert werden ( $n = 11$ ,  $p < 0.01$ )(Abb.6).

**Abbildung 6**

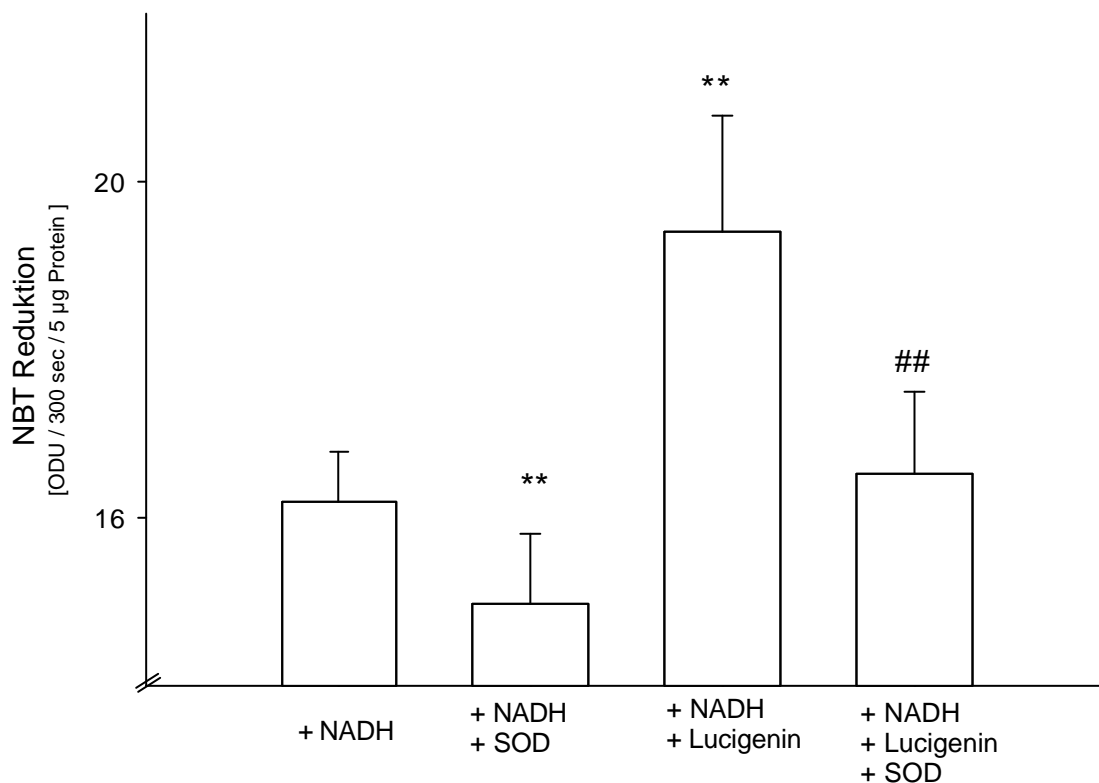


**Abbildung 6** : NADH - abhängige MCLA - Chemilumineszenz an HUVEC - Lysaten (MCLA, 10  $\mu$ M; NADH, 100  $\mu$ M). Steigerung der Chemilumineszenz durch Gabe von Lucigenin (250  $\mu$ M), welche durch Superoxiddismutase (SOD, 200 U/ml) vollständig zu hemmen war ( $n=11$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ).

Als weitere zusätzliche Meßmethode zur Untersuchung einer potentiellen Lucigenin - vermittelten  $O_2^-$  - Bildung wurde das NBT - Verfahren verwendet.

Hier induzierte die Gabe von NADH (100  $\mu$ M) zu HUVEC - Lysaten eine NBT - Reduktion, die durch SOD (200 U/ml) zum Teil hemmbar war. In Abbildung 7 ist zu erkennen, daß die zusätzliche Gabe von Lucigenin (250  $\mu$ M), wie auch mit der MCLA - Methode beobachtet, zu einem ausgeprägten Anstieg des NADH abhängigen, durch SOD (200 U/ml) hemmbaren Signalanteils führte (n = 12, p < 0.01). Der  $O_2^-$  - unabhängige Anteil der NBT - Reduktion wurde durch die Gabe von Lucigenin dabei nicht beeinflusst (nicht dargestellt).

**Abbildung 7**



**Abbildung 7** : Durch Gabe von NADH (100  $\mu$ M) erfolgte eine zum Teil durch Superoxiddismutase (SOD, 200 mU/ml) hemmbare NBT - Reduktion an HUVEC - Lysaten. Diese wurde durch zusätzliches Lucigenin (250  $\mu$ M) gesteigert (n=12, \*\*p<0.01 vs. Lysat + NADH, ##p<0.01 vs. Lysat + NADH + Lucigenin).

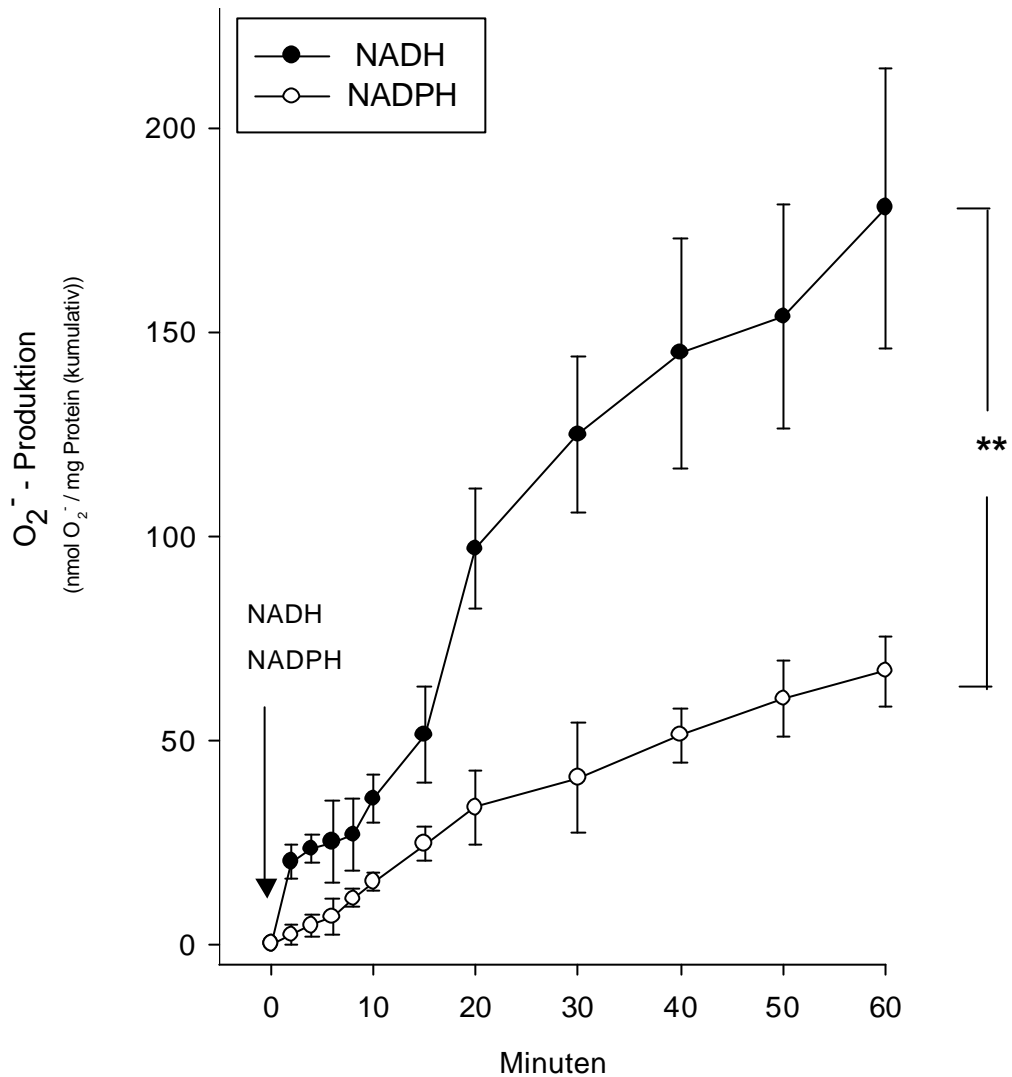
## *D.2. NAD(P)H - Oxidase als Quelle der endothelialen $O_2^-$ - Produktion*

Aufgrund der gewonnenen Daten bezüglich einer Lucigenin – induzierten  $O_2^-$  - Produktion, wurde bei weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion ausschließlich die Cytochrom C - Methode verwendet.

### *D.2.1. NADH - / NADPH - abhängige $O_2^-$ - Produktion von HUVEC – Lysaten*

Unter diesen Meßbedingungen war nach Gabe von NADH (100  $\mu$ M) ebenfalls eine erhöhte  $O_2^-$  - Produktion in HUVEC - Lysaten nachzuweisen. Abbildung 8 zeigt die Kinetik dieser  $O_2^-$  - Bildung. Wie zu erkennen ist, wurde auch durch NADPH (100  $\mu$ M) eine  $O_2^-$  - Produktion induziert, wobei jedoch NADH eine wesentlich stärkere  $O_2^-$  - Produktion verursachte. So lag die NADH - abhängige  $O_2^-$  - Bildung im Mittel um das ca. 2.7 fache höher als die durch NADPH - induzierte  $O_2^-$  - Produktion.

Abbildung 8



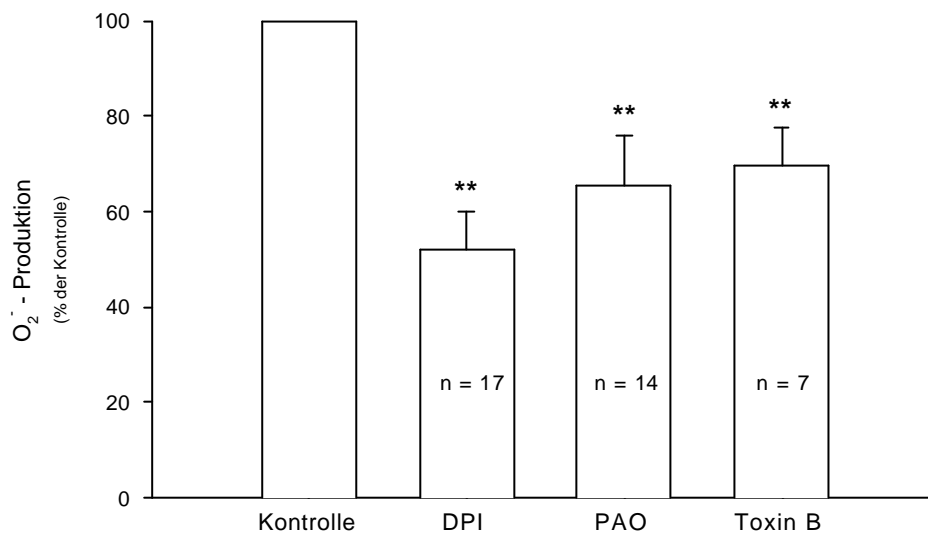
**Abbildung 8** : Kinetik der  $O_2^-$  - Bildung von HUVEC - Lysaten, induziert durch Zugabe von NADH oder NADPH zum Zeitpunkt 0 Minuten (je  $100 \mu M$ ) ( $n = 3$ ,  $**p < 0.01$ ).

#### D.2.2. Effekt von Hemmstoffen der leukozytären NAD(P)H - Oxidase in intakten Endothelzellen

Intakte HUVEC zeigten eine, mit der Cytochrom C - Methode nachweisbare, basale  $O_2^-$  - Produktion von  $0,17 \pm 0,02$  nmol  $O_2^-$ /min/mg Protein. Diese konnte durch den Flavoenzyminhibitor Diphenyleniodonium (DPI,  $10 \mu M$ ) um  $48,1 \pm 10,5$  % ( $n = 17$ ,  $p < 0,01$ ) (Abb. 9) reduziert werden. Die Inkubation der Zellen mit Phenylarsenoxid (PAO,  $1 \mu M$ ), einem direktem Inhibitor der leukozytären NAD(P)H - Oxidase, hemmte die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung ebenfalls signifikant um  $34,5 \pm 8$  % ( $n = 14$ ,  $p < 0,01$ ). Die

Inaktivierung des GTP - bindenden - Proteins rac, welchem in Leukozyten eine bedeutende Rolle in der Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase zugesprochen wird, mit Clostridium difficile Toxin B 1641 (0,5 ng/ml ) reduzierte ebenfalls die basale endotheliale  $O_2^-$  - Produktion um  $30.1 \pm 7.9 \%$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.01$ )(Abb.9).

**Abbildung 9**



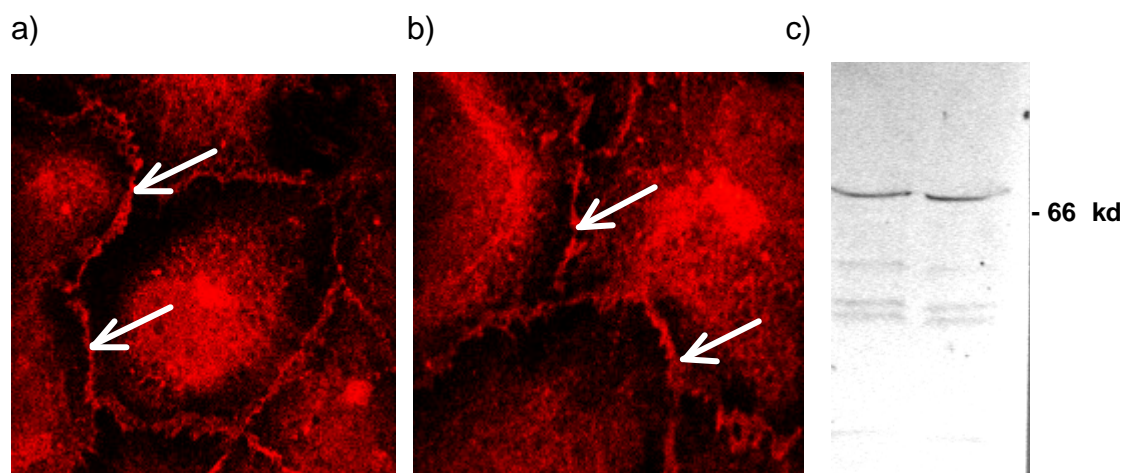
**Abbildung 9 :** Hemmung der basalen endothelialen  $O_2^-$  - Produktion mit bekannten Inhibitoren der leukozytären NAD(P)H - Oxidase. Intakte HUVEC wurden vor der  $O_2^-$  - Messung mit Diphenyliodonium (DPI,  $10 \mu M$ ), Phenylarsenoxid (PAO,  $1 \mu M$ ) oder dem Clostridium difficile Toxin B ( $0,5 \text{ ng/ml}$ ) 20 Minuten vorinkubiert (\*\*  $p < 0.01$  gegen unbehandelte Kontrolle).

### D.2.3. Nachweis von Untereinheiten der leukozytären NAD(P)H - Oxidase in humanen Endothelzellen

Die leukozytäre NADP(H) - Oxidase ist aus mehreren Untereinheiten aufgebaut. Wir untersuchten mit Hilfe der Immunfluoreszenz, sowie der PCR - Technik, ob bestimmte Untereinheiten ebenfalls in Endothelzellen vorhanden sind. Nachdem wir in Western Blot Analysen die Spezifität eines

Antikörpers gegen die Untereinheit  $p67^{\text{phox}}$  in Leukozyten überprüft hatten, konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz eine Bindung des Antikörpers gegen  $p67^{\text{phox}}$  auch in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenz läßt dabei im wesentlichen eine membranäre Lokalisation von  $p67^{\text{phox}}$  erkennen (Abb.10). Mit Hilfe der rtPCR konnte weiterhin die Expression der leukozytären NAD(P)H - Oxidase - Untereinheit  $gp91^{\text{phox}}$  in HUVEC nachgewiesen werden (Abb.20).

### Abbildung 10



**Abbildung 10:** Die Abbildungen 10 a) und b) zeigen Immunfluoreszenzbilder der Lokalisation des Antikörpers gegen  $p67^{\text{phox}}$  in humanen Umbilikalvenenendothelzellen. c) Der Immunoblot zeigt die Färbung der Proteine bei Verwendung des Antikörpers gegen  $p67^{\text{phox}}$  in Leukozyten

### D.3. Messung des endothelialen Membranpotentials

Da in weiteren Experimenten die Effekte von Membranpotentialänderungen auf die endotheliale  $O_2^-$  - Produktion untersucht werden sollten, wurden zunächst die Auswirkungen der dazu verwendeten Substanzen auf das endotheliale Membranpotential mit dem Potential – sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Bis - oxonol untersucht. Unter Verwendung dieser Methode zeigten die Endothelzellen unter Kontrollbedingungen Membranpotentiale in einem Bereich von -18 mV bis -48 mV, im Mittel -32 +/- 2 mV

(n = 20), ein Wert, wie er auch mit elektrophysiologischen Methoden an HUVEC gemessen wurde (20;188).

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, führte die Behandlung der Zellen mit 90 mM K<sup>+</sup> zu einer Zelldepolarisation um 11.0 +/- 4 mV. Eine unspezifische Hemmung von Kaliumkanälen durch TBA (1 mM) bewirkte eine vergleichbare Zelldepolarisation. Die Inkubation der Zellen mit dem Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup> Ionophor Gramicidin (1 µM) hatte ebenfalls eine deutliche Zelldepolarisation zur Folge. Die Vorbehandlung der Zellen mit Genistein oder Toxin B hatte dabei keinen Einfluß auf die durch Gramicidin erzielte Depolarisation (nicht dargestellt).

Die Öffnung von ATP - abhängigen Kaliumkanälen durch HOE 234 (1 µM) resultierte in einer Hyperpolarisation der Endothelzellen. Eine Erhöhung des Membranpotentials wurde des weiteren auch durch Applikation des K<sup>+</sup> Ionophors Valinomycin (100 nM) erzielt.

**Tabelle 2**

**Veränderungen des Membranpotentials gegenüber Kontrolle in mV**

		<b>Mittelwert</b>		<b>SEM</b>	<b>n</b>
Kalium	90 mM	+11.0	±	4.3	6
TBA	1 mM	+11.7	±	3.5	4
Gramicidin	1 µM	+14.3	±	2.1	3
HOE 234	1 µM	-13.5	±	3.7	4
Valinomycin	100 nM	-20.9	±	9.4	3

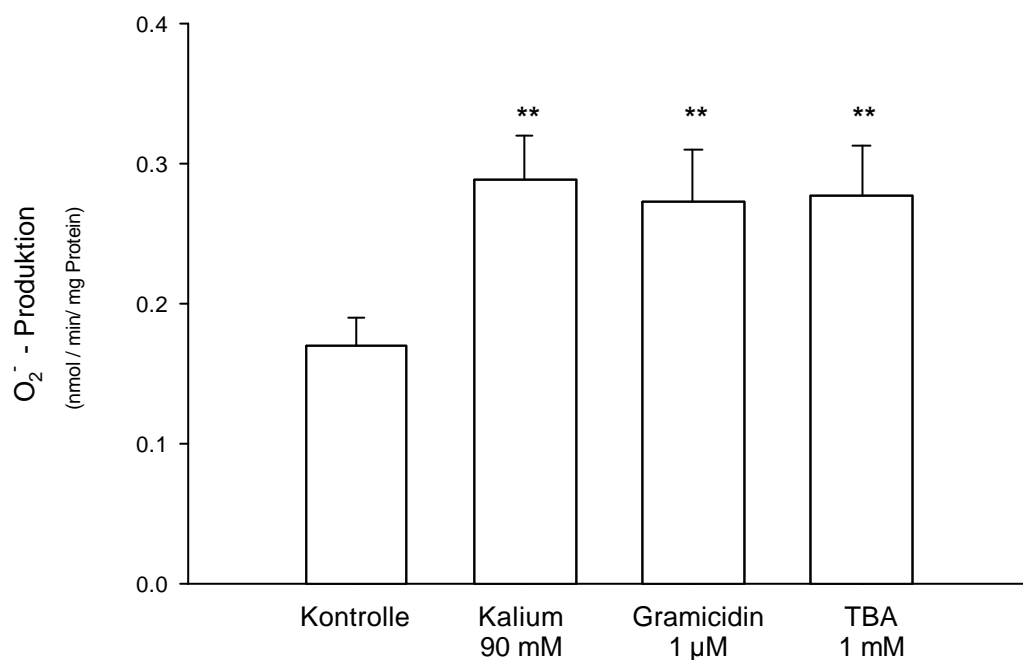
**Tabelle 2 :** Änderungen des endothelialen Membranpotentials gemessen mit Hilfe der Bis – oxonol (100 nM) Fluoreszenz – Methode. Nach Erreichen von steady state Bedingungen für die Fluoreszenzintensität wurden der Superfusionslösung verschiedene Substanzen beigegeben bzw. die Kaliumkonzentration durch Pufferwechsel auf 90mM erhöht.

#### D.4. Membranpotential und $O_2^-$

##### D.4.1.1. Steigerung der endothelialen $O_2^-$ - Produktion durch Depolarisation

Abbildung 11 zeigt die Wirkung der Depolarisation von intakten Endothelzellen um 11 - 14 mV durch Substanzen mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum auf die basale  $O_2^-$  - Produktion. Dabei kam es jeweils zu einer ca. 60 % igen Steigerung der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung ( $n = 23$ ,  $p < 0.01$  gegen Kontrolle).

**Abbildung 11**



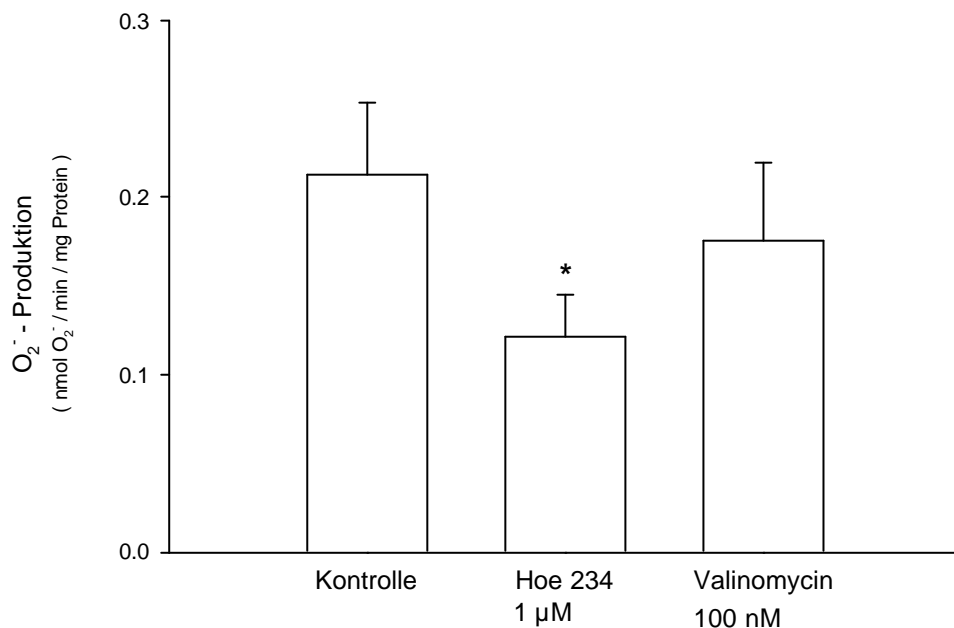
**Abbildung 11** : Steigerung der  $O_2^-$  - Produktion intakter humaner Endothelzellen durch Depolarisation gemessen mit Hilfe der Cytochrom C - Methode. Die Depolarisation wurde verursacht durch Behandlung der Zellen mit 90 mM Kalium Puffer, dem  $Na^+$ ,  $K^+$  Ionophor Gramicidin (1  $\mu$ M) und dem unspezifischen Kaliumkanalblocker Tetrabutylammoniumchlorid (TBA, 1 mM) ( $n = 23$ ,  $**p < 0.01$  gegen Kontrolle).



#### D.4.1.2. Hemmung der endothelialen $O_2^-$ - Produktion durch Hyperpolarisation

Die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung wurde nicht nur durch Depolarisation beeinflusst, auch eine Hyperpolarisation intakter endothelialer Zellen zeigte teilweise Effekte auf deren  $O_2^-$  - Produktion (Abb.12). Durch die Öffnung ATP - abhängiger Kaliumkanäle durch HOE 234 (1  $\mu$ M) wurde die basale  $O_2^-$  - Bildung signifikant um ca. 36 % gehemmt (n = 14, p<0.05 ). Das ebenfalls zur Hyperpolarisation führende  $K^+$  Ionophor Valinomycin (100 nM) hatte dagegen keine signifikanten Effekte auf die endotheliale  $O_2^-$  - Produktion (n=14, p > 0.1).

**Abbildung 12**



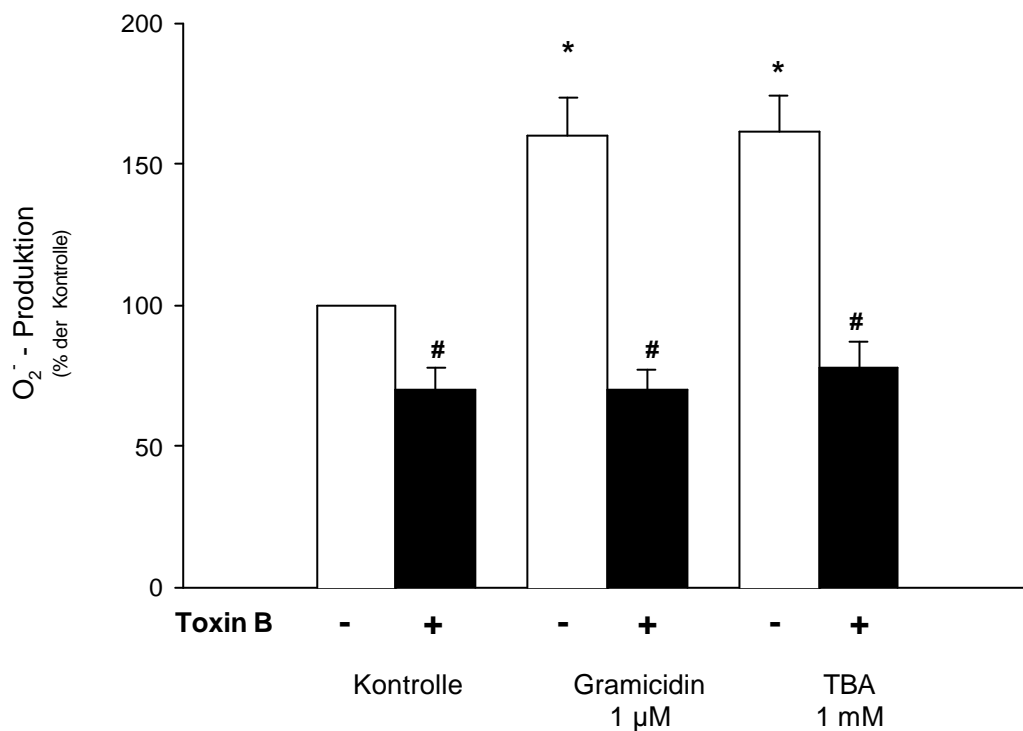
**Abbildung 12** : Hemmung der  $O_2^-$  - Produktion intakter humaner Endothelzellen durch Hyperpolarisation gemessen mit Hilfe der Cytochrom C - Methode. Die Hyperpolarisation wurde durch Öffnung ATP abhängiger Kaliumkanäle durch HOE 234 (1  $\mu$ M) und durch Behandlung der Zellen mit dem  $K^+$  Ionophor Valinomycin (100 nM) verursacht (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 14, \*p < 0.05 gegen Kontrolle).

#### D.4.2. NADP(H) - Oxidase als die Quelle der Depolarisations - induzierten $O_2^-$ - Bildung

##### D.4.2.1. Hemmung der Depolarisations – induzierten $O_2^-$ - Produktion

Die durch Depolarisation gesteigerte basale  $O_2^-$  - Produktion intakter HUVEC wurde durch Vorbehandlung der Zellen mit Diphenyleniodonium (DPI, 10  $\mu$ M) signifikant um ca. 76 % gehemmt (n=10, p<0.05, nicht dargestellt). Abbildung 13 zeigt die ebenfalls signifikante Hemmung der Gramacidin - (1  $\mu$ M) und TBA (1 mM) - induzierten  $O_2^-$  - Produktion durch das Clostridium difficile Toxin B (0.5 ng/ml) (n = 7, p < 0.05).

**Abbildung 13**

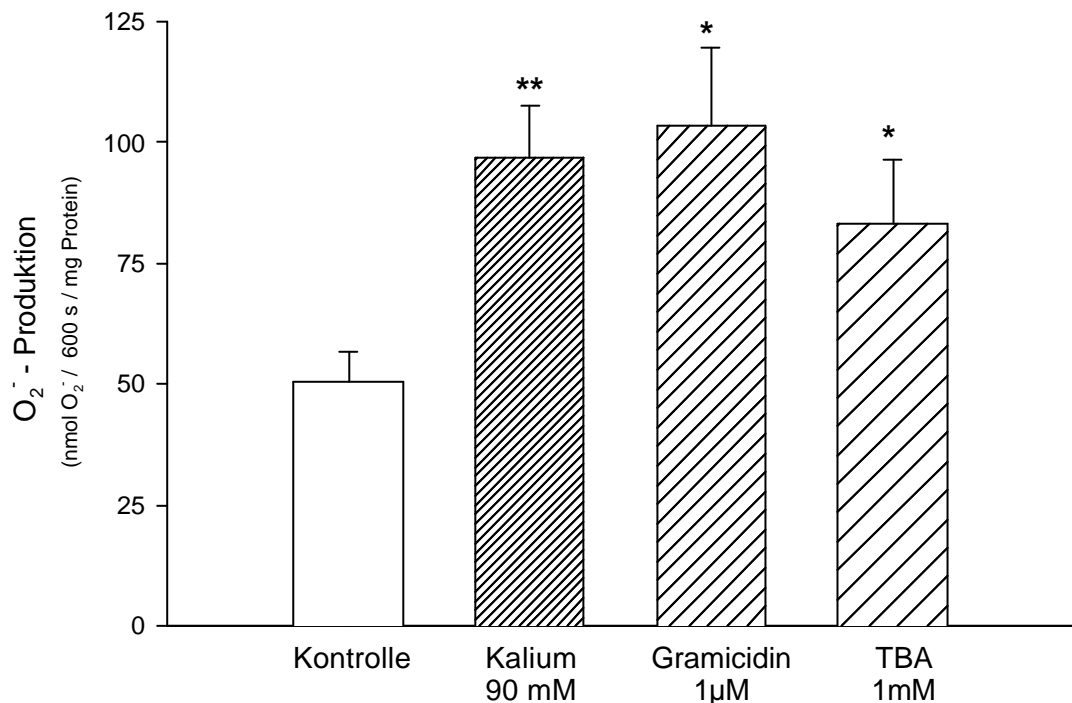


**Abbildung 13:** Hemmung der durch Gramacidin und TBA induzierten Steigerung der basalen endothelialen  $O_2^-$  - Produktion intakter Zellen durch Toxin B. Die Zellen wurden mit oder ohne Vorbehandlung mit Toxin B (0.5 ng/ml, 20 Minuten) mit TBA (1 mM) und Gramacidin (1  $\mu$ M) depolarisiert und die  $O_2^-$  - Bildung mit der Cytochrom C - Methode gemessen (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 7, \*p < 0.05 vs. Kontrolle (Kalium 2,7mM), #p < 0.05 vs. nicht mit Toxin B behandelte Zellen).

#### D.4.2.2. NADH - abhängige $O_2^-$ - Produktion von HUVEC - Lysaten nach vorausgegangener Depolarisation der intakten Zellen

In Abbildung 14 sind die Effekte der vorausgegangenen Depolarisation auf die NADH - abhängige  $O_2^-$  - Bildung von HUVEC - Lysaten dargestellt. Nach Zugabe von NADH (100  $\mu$ M) zeigten die zuvor sowohl mit 90 mM Kalium als auch mit Gramicidin (1  $\mu$ M) und TBA (1 mM) depolarisierten Zellen eine ca. zweifache Steigerung der NADH – abhängigen  $O_2^-$ - Produktion gegenüber den Kontrollzellen (n=18, p<0.01), obwohl durch die Zellyse das Membranpotential aufgehoben war.

**Abbildung 14**



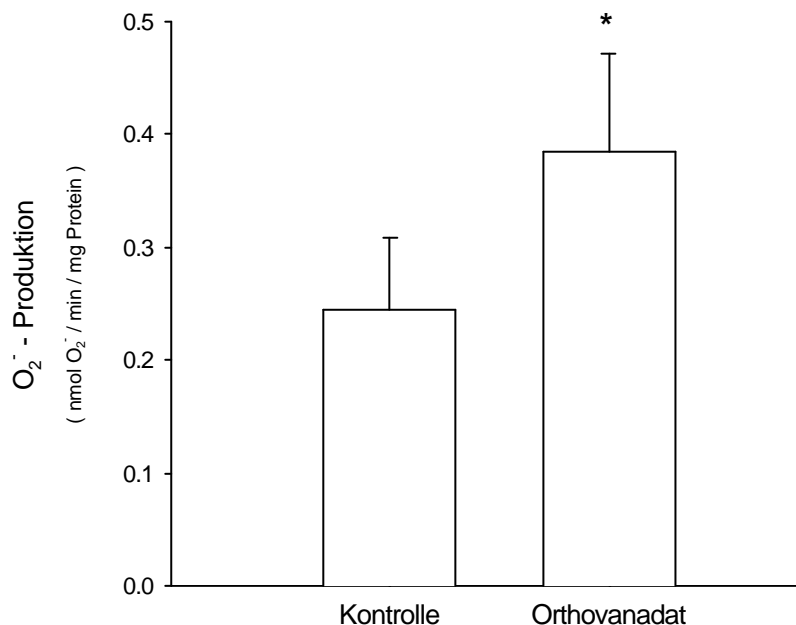
**Abbildung 14** : NADH - abhängige  $O_2^-$  - Produktion von HUVEC - Lysaten. Das Lysat von zuvor im intakten Zustand depolarisierten Endothelzellen zeigte eine signifikante Steigerung der  $O_2^-$  - Bildung nach Gabe von NADH (100  $\mu$ M) (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 18, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. Kontrolle ).

### D.4.3. Regulationsmechanismen der NAD(P)H - Oxidase

#### D.4.3.1. Rolle von Tyrosinphosphorylierung in der Regulation der endothelialen $O_2^-$ - Bildung

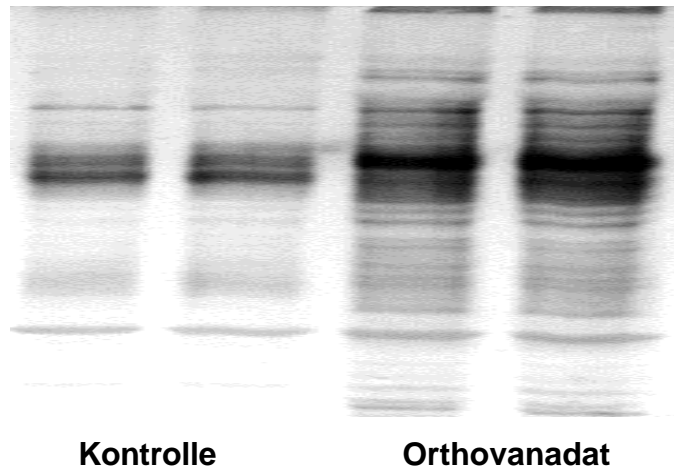
In Leukozyten spielen Tyrosinphosphorylierungs – abhängige Signalwege eine wichtige Rolle in der Regulation der NAD(P)H - Oxidase - Aktivität. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob und wie sich Änderungen des Tyrosinphosphorylierungsstatus auch auf die endotheliale  $O_2^-$  - Produktion auswirken. Darüber hinaus wurde geprüft, inwieweit Tyrosinphosphorylierungs - abhängige Signalwege in der Depolarisations – induzierten  $O_2^-$  - Produktion involviert sind. Zunächst zeigte sich bei der Hemmung von Tyrosinphosphatasen durch Orthovanadat (100  $\mu$ M) eine signifikante Steigerung der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung (n = 5, p < 0.05) (Abb.15), mit parallel einhergehender verstärkter Tyrosinphosphorylierung in Western Blot Analysen (Abb. 16).

**Abbildung 15**



**Abbildung 15** : Wirkung des Tyrosinphosphataseninhibitors Orthovanadat (100  $\mu$ M) auf die basale  $O_2^-$  - Produktion intakter endothelialer Zellen (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 5, p < 0.05 vs. Kontrolle).

## Abbildung 16

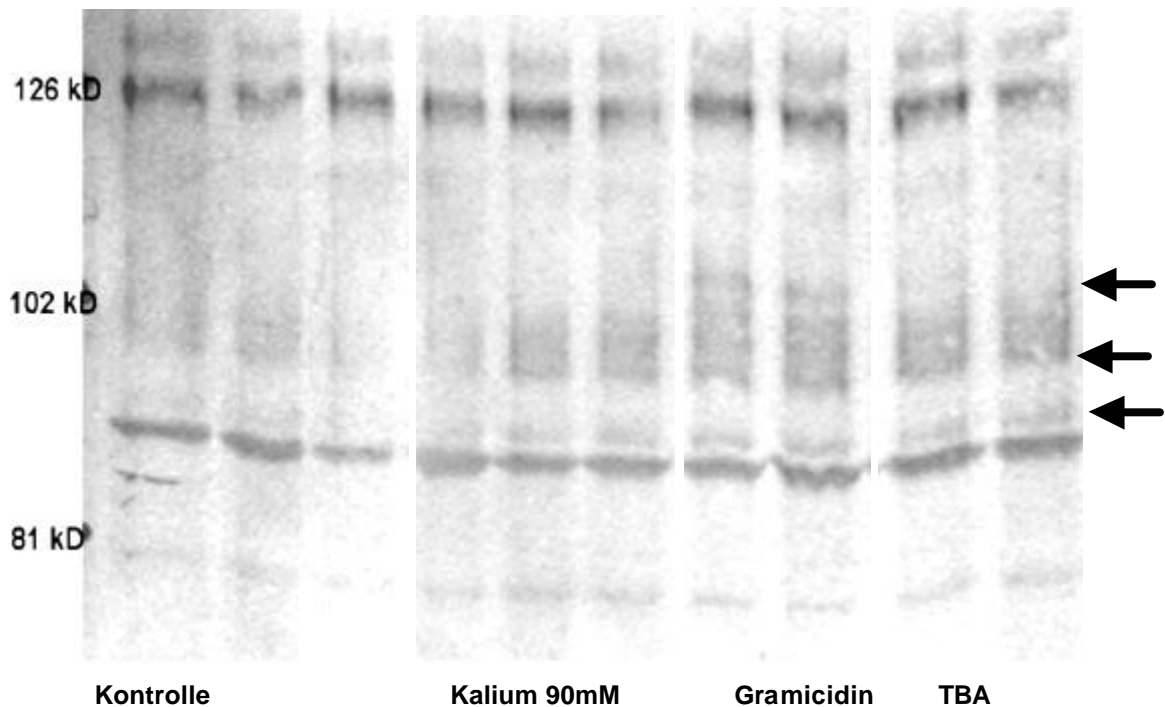


**Abbildung 16 :** Die Abbildung zeigt die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen nach Behandlung von intakten endothelialen Zellen mit Orthovanadat (100  $\mu$ M, 15 Minuten ) Anschließend wurden sie lysiert, im SDS Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden dann mit einem spezifischen Antikörper gegen Phosphotyrosin behandelt.

#### D.4.3.2. gesteigerte Tyrosinphosphorylierung nach Depolarisation

Die Analysen des Tyrosinphosphorylierungsstatus mittels Immunoblot zeigten in zuvor depolarisierten Zellen eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung von Proteinen der Größe 90 – 110 kD (Abb. 17). Diese verstärkte Tyrosinphosphorylierung war sowohl in den mit 90 mM Kalium Puffer, TBA (1 mM), als auch in den mit Gramacidin (1  $\mu$ M) depolarisierten Zellen nachweisbar (Abb.17).

**Abbildung 17**

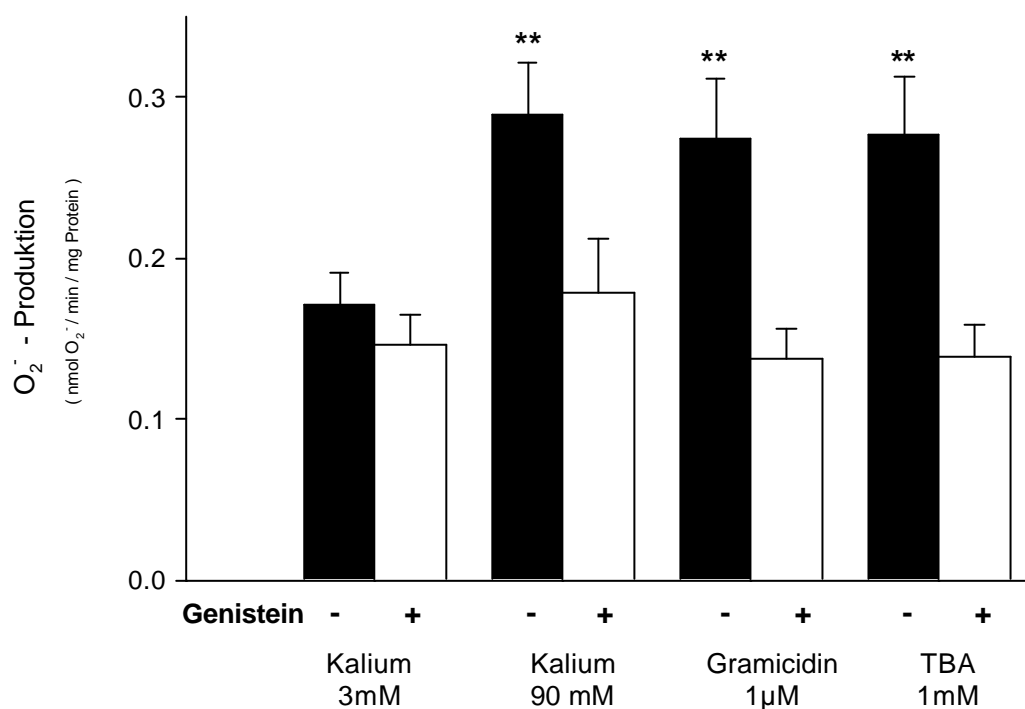


**Abbildung 17** : Umbilikalvenenendothelzellen wurden mit 90 mM Kalium Puffer, Gramacidin (1  $\mu$ M) und TBA (1 mM) (je 30 Minuten) depolarisiert. Anschließend wurden sie lysiert, im SDS Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden dann mit einem Antikörper spezifisch gegen Phosphotyrosin behandelt (n=3).

#### D.4.3.3. Hemmung der Depolarisations - induzierten $O_2^-$ - Bildung durch Hemmung von Tyrosinkinasen

Die Hemmung von Tyrosinkinasen durch Genistein (30  $\mu$ M) zeigte eine geringfügige, aber nicht signifikante Hemmung der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion unter Kontrollbedingungen. Die durch TBA (1 mM) und Gramimidin (1  $\mu$ M) gesteigerte  $O_2^-$  - Produktion wurde jedoch durch die Hemmung der Tyrosinkinasen signifikant beeinflusst. Abbildung 18 zeigt die vollständige Hemmung der TBA - (1 mM) und Gramimidin - (1  $\mu$ M) induzierten  $O_2^-$  - Bildung. Nach Hemmung der Tyrosinkinasen war zudem die signifikante Steigerung der  $O_2^-$  - Bildung durch den 90 mM Kalium Puffer nicht mehr zu beobachten (n = 15, p < 0.05).

**Abbildung 18**



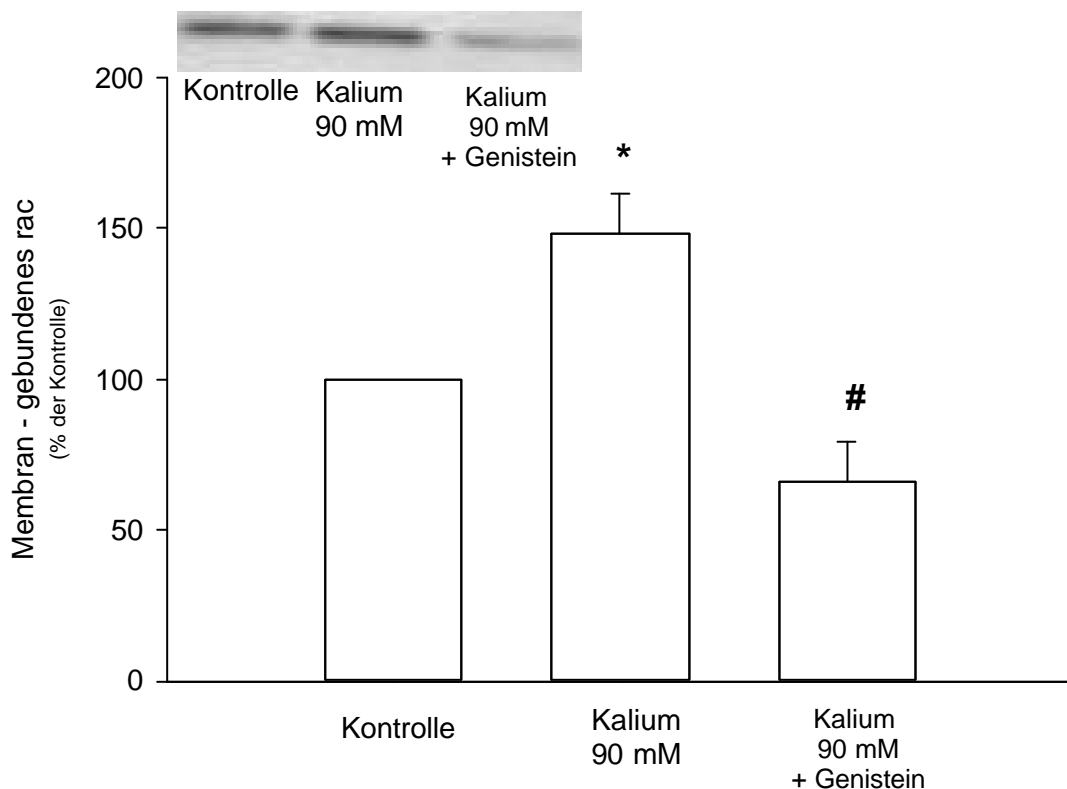
**Abbildung 18** : Effekte der Hemmung von Tyrosinkinasen durch Genistein auf die Depolarisations – induzierte  $O_2^-$  - Bildung von intakten HUVEC. Die Zellen wurden entweder nach Vorbehandlung mit Genistein (30  $\mu$ M, 20 Minuten) oder ohne eine Vorbehandlung mit einem 90 mM Kalium Puffer, Gramimidin (1  $\mu$ M) und TBA (1 mM) depolarisiert und die  $O_2^-$  - Bildung gemessen (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n =23 sine Genistein, \*p < 0.05 vs. Kontrolle ; n = 15 cum Genistein ,n.s. vs. Kontrolle).

#### D.4.3.4. Rac - Translokation nach Depolarisation

In Immunoblotanalysen mit dem Erstantikörper gegen die kleine GTPase rac, welche in der Regulation der leukozytären NAD(P)H - Oxidase eine wichtige Rolle spielt, zeigte sich in der partikulären Fraktion der zuvor depolarisierten HUVEC eine Steigerung der Menge des rac Proteins um 48 % im Vergleich zur Kontrolle. Diese Steigerung wurde durch Hemmung von Tyrosinkinase mit Genistein (30  $\mu$ M) vollständig inhibiert (n = 9, p < 0.05) (Abb17). Unter Kontrollbedingungen reduzierte Genistein den rac - Anteil in der partikulären Fraktion nicht (n=3, nicht dargestellt).

**Abbildung 19**

#### Membran - gebundenes rac



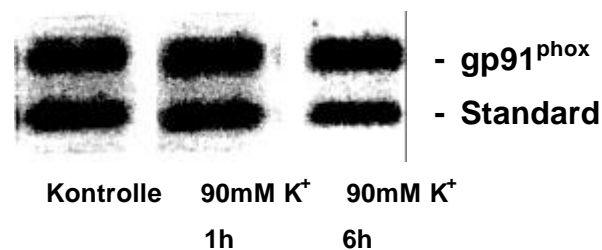
**Abbildung 19** : Wirkung der Depolarisation auf den Anteil des GTP- bindenden - Proteins rac in der partikulären Fraktion von HUVEC – Lysaten. Die Zellen wurden entweder nach Vorbehandlung mit Genistein (30  $\mu$ M, 20 Minuten) oder ohne Vorbehandlung mit 90 mM Kalium Puffer (15 Minuten) depolarisiert und anschließend in zytosolische und partikuläre Fraktion aufgetrennt. Abgebildet ist ein repräsentativer Immunoblot der partikulären Fraktion mit dem Antikörper anti - rac. Die Grafik zeigt die densitometrische Auswertung von 9 Experimenten in % der jeweiligen Kontrolle dargestellt (n=9, \*p<0.05 vs Kontrolle, #p<0.05 vs. 90 mM Kalium ).



#### D.4.3.5. Expression von gp91<sup>phox</sup> vor und nach Depolarisation in HUVEC

Um zu untersuchen, ob die gesteigerte O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Bildung von HUVEC Lysaten bei länger dauernder Depolarisation auch eine verstärkte Expression der NAD(P)H - Oxidase auslöst, wurde die Expression der Untereinheit gp91 nach 1 bzw. 6 stündiger Depolarisation untersucht. Dabei zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied des gp91<sup>phox</sup> RNA Gehaltes im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle 1.49 +/- 0.01 vs. Depolarisation 1h 1.31 +/- 0.09 , 6 h 1.26 +/- 0.17 amol/ $\mu$ g total - RNA (n=3)) (Abb.20).

**Abbildung 20**



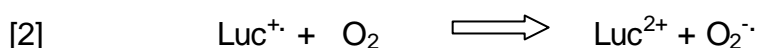
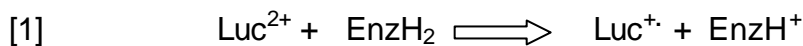
**Abbildung 20** : Expression der NAD(P)H – Oxidase Untereinheit gp91<sup>phox</sup> in humanen Endothelzellen. Die Zellen wurde mit einem 90mM K<sup>+</sup> enthaltendem Puffer für 1 und 6 Stunden depolarisiert. Die Expression der Untereinheit wurde mit Hilfe der RT - PCR analysiert. Der PCR Reaktionsansatz wurden in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid markiert und die Helligkeit photographisch festgehalten.

## F. Diskussion

### F.1. Vergleich von Methoden der $O_2^-$ -Messung

Aufgrund der im Vergleich zu Leukozyten viel geringeren  $O_2^-$ -Produktion bedarf die Messung von  $O_2^-$  an Endothelzellen einer ebenso sensitiven, wie spezifischen Methode.  $O_2^-$  weist als Radikal einerseits eine hohe Reaktivität auf und wird andererseits in der Zelle rasch durch Superoxid-dismutase zu  $H_2O_2$  metabolisiert. Daher ist die Halbwertszeit sehr gering (19), was die Meßmöglichkeiten zusätzlich einschränkt. In der Literatur sind viele Methoden zur Detektion von  $O_2^-$  beschrieben. In den letzten Jahren wurde vor allem die Lucigenin – verstärkte Chemilumineszenz zur  $O_2^-$ -Messung in kardiovaskulären Zellen angewendet (57;125;133).

Zu Beginn unserer Untersuchungen der endothelialen  $O_2^-$ -Produktion wurde daher auch zunächst diese "etablierte" Methode verwendet. Während der Experimente zeigten jedoch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, daß die Lucigenin - Methode einen schwerwiegenden Nachteil aufweist. Enzymsysteme, welche per se kein oder nur wenig  $O_2^-$  bilden, können mit Lucigenin als Substrat eine erhebliche Menge von  $O_2^-$  bilden (105;189). Als Mechanismus dieser Lucigenin - mediierten  $O_2^-$ -Produktion wird vermutet, daß verschiedene Oxidoreduktasen wie z.B. Xanthinoxidase, Glucoseoxidase, Aldehydoxidase und ebenfalls auch die NO Synthase in der Lage sind, direkt das Lucigenin di – Kation zu reduzieren [1]. Das entstandene Lucigenin Mono - kation Radikal kann mit Sauerstoff reagieren und so selbst zur Bildung von  $O_2^-$  führen [2].



Dies bedeutet, daß durch die Meßsubstanz selbst  $O_2^-$  erzeugt werden kann. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob auch unter unseren Versuchsbedingungen und vor allem ob auch in intakten Zellen mit unbekanntem Enzymaktivitäten diese unerwünschten Effekte von Luci-

genin auftreten. Dies wurde mit Hilfe anderer unabhängiger  $O_2^-$  - Meßmethoden analysiert.

Die durch die Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO) Reaktion erfolgende  $O_2^-$  - Bildung ist ein Standardverfahren, um in einem zellfreien System  $O_2^-$  zu generieren. In unseren Untersuchungen fand sich bei Verwendung der Lucigenin - Methode eine sehr gute lineare Korrelation zwischen der Menge des produzierten  $O_2^-$  und dem Meßsignal, wie es auch von Brandes et al. beschrieben wurde (17). Diese enge Korrelation war auch bei allen anderen Methoden nachzuweisen. Weiterhin konnte bei allen verwendeten Meßmethoden das X/XO - abhängige Meßsignal durch SOD reduziert werden, das heißt, dieser Teil des Meßsignals war jeweils spezifisch für  $O_2^-$  .

Bei Anwendung der Lucigenin – verstärkten Chemilumineszenz fand sich jedoch in unseren Untersuchungen nach Gabe von NADH zu HUVEC - Lysaten ein wesentlich höherer relativer Signal – Anstieg als dies in der MCLA – verstärkten Chemilumineszenz der Fall war (Abb.1,2). Um zu untersuchen, inwieweit dieser Unterschied durch eine Lucigenin - medierte  $O_2^-$  - Bildung verursacht war, wurde mit zwei unabhängigen Meßmethoden untersucht, inwieweit Lucigenin in Anwesenheit von NADH zu einer vermehrten  $O_2^-$  - Bildung führt.

Sowohl in der MCLA - als auch der NBT - Methode führte der Zusatz von Lucigenin zu einem Reaktionsansatz aus Zellysat und NADH zu einem signifikanten Anstieg des SOD - hemmbaren Signalanteils. Der Anstieg des Chemilumineszenzsignals in der MCLA - Methode ist hierbei nicht durch die zusätzlich auftretende Lucigenin - Chemilumineszenz per se erklärbar, da diese um ca. den Faktor hundert niedrigerer ist als die durch MCLA verursachte (Vergleich Abbildung 1/2 ).

NBT kann auch  $O_2^-$  unabhängig reduziert werden (75)(104). Daher wurde in unserer Studie nur der SOD - hemmbare Anteil der NBT - Reduktion zur Quantifizierung von  $O_2^-$  verwendet. In der Tat steigerte auch hier die Zugabe von Lucigenin nur den SOD - hemmbaren Anteil, während die  $O_2^-$  - unabhängige NBT - Reduktion nicht beeinflusst wurde.

Die Daten zeigen, daß eine Lucigenin - medierte  $O_2^-$  - Produktion an Zellsaten aus Endothel zunächst in Anwesenheit von NADH auftritt. Weitere Untersuchungen in unserem Labor (167) und kürzlich publizierte Arbeiten zeigten darüber hinaus eine Lucigenin - medierte  $O_2^-$  - Bildung an intakten Zellen. Funktionell ließ sich dies durch eine Verschlechterung der Endothel - abhängigen Vasodilatation nach Gabe von Lucigenin zeigen, die durch Gabe von SOD verbessert wurde, mithin also vermutlich auf einer NO - Inaktivierung durch  $O_2^-$  basierte (7;179).

Aufgrund dieser Lucigenin – medierten  $O_2^-$  - Bildung wurden alle bis dahin durchgeführten Experimente mit der Cytochrom C - Methode wiederholt und nachfolgende Experimente ausschließlich mit dieser Methode durchgeführt. Zwar kann Cytochrom C mit anderen Radikalen z.B. NO interferieren (87) und direkt von der NO Synthase reduziert werden (90), es kommt jedoch zu keiner artifiziellen  $O_2^-$  - Bildung. Die unspezifische Reduktion von Cytochrom C stört die  $O_2^-$  - Messung insofern nicht, als zur Berechnung der  $O_2^-$  - Produktion nur der SOD - hemmbare Anteil der Cytochrom C Reduktion herangezogen wird, und davon ausgegangen werden kann, daß damit die Spezifität für  $O_2^-$  gewährleistet ist (7;119). Die hohe Spezifität geht bei dieser Methode jedoch einher mit einer - im Vergleich zu Lucigenin – niedrigen Sensitivität. Weiterhin ist die Zellmembran für Cytochrom C nicht durchlässig, so daß nur extrazelluläres  $O_2^-$  erfaßt werden und somit nicht zwischen gesteigerter  $O_2^-$  - Bildung und/oder gesteigerter  $O_2^-$  - Freisetzung unterschieden werden kann (7;108;152), jedoch sind bisher keine intrazellulären  $O_2^-$  - Speicher bekannt.

## *F.2. NAD(P)H - Oxidase als eine wesentliche Quelle der endothelialen $O_2^-$ - Bildung*

Unsere Untersuchungen bezüglich der Quelle der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung unterstützen die Vorstellung, daß eine NAD(P)H - Oxidase die wesentliche Quelle der basalen  $O_2^-$  - Produktion in Endothelzellen darstellt. So zeigten bekannte Inhibitoren der leukozytären NAD(P)H - Oxidase ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die basale endotheliale  $O_2^-$  - Bildung. Weiterhin konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz und rtPCR nachgewiesen werden, daß zumindest einige der Leukozyten – NAD(P)H - Oxidase – Untereinheiten, nämlich p67<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> , sowie p22<sup>phox</sup> (168) auch in HUVEC vorhanden sind. Im Gegensatz zur leukozytären Oxidase zeichnete sich in unseren Untersuchungen die endotheliale Oxidase jedoch durch eine konstitutive, - in Lysaten bevorzugt NADH – abhängige,  $O_2^-$  - Bildung aus.

Durch Verwendung des Hemmstoffes der leukozytären NAD(P)H - Oxidase DPI (37;70) wurde die endotheliale  $O_2^-$  - Produktion in unseren Untersuchungen signifikant gehemmt. Wie inzwischen bekannt, ist DPI jedoch nicht nur ein Inhibitor der leukozytären NAD(P)H - Oxidase, sondern auch von weiteren Flavoenzymen, so auch von NO Synthasen, Xanthinoxidoreduktasen (156;191) und Enzymen der mitochondrialen Atmungskette (102). Aufgrund dieser weitgehend unspezifischen Wirkung von DPI, untersuchten wir zusätzlich die Effekte anderer Inhibitoren der leukozytären NAD(P)H - Oxidase auf die endotheliale  $O_2^-$  - Produktion, die ganz unterschiedliche Wirkmechanismen haben.

PAO ist ein trivalentes Arsenderivat, welches einen stabilen Ringkomplex mit Vicinal - und Thiolgruppen eingeht. Der Mechanismus der Hemmung der NAD(P)H - Oxidase beruht vermutlich auf einer Interaktion von PAO mit einer ? - Untereinheit des Flavocytochroms b558. Dabei verändert PAO nicht oder nur gering die  $O_2^-$  - Produktion der bereits aktivierten NAD(P)H - Oxidase. Dagegen resultiert die Inkubation vor Aktivierung in einer nahezu vollständigen Hemmung der Enzymaktivierung (36;98). Wir

konnten diese Ergebnisse bestätigen und beobachteten eine PAO - medierte Hemmung ebenfalls nur, wenn die endothelialen Zellen vor Stimulation mit PAO behandelt wurden. PAO wurde in verschiedenen Zelltypen auch als Tyrosinphosphataseninhibitor beschrieben (187). Dieser Effekt spielt jedoch für die Hemmung der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion vermutlich keine Rolle, da die beschriebenen Effekte auf die Tyrosinphosphorylierung erst bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M PAO erreicht werden. Die von uns verwendete Konzentration von 1  $\mu$ M PAO zeigte in unseren Untersuchungen - übereinstimmend mit anderen Publikationen - keinen Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung (45;98). Darüber hinaus führte die Hemmung der Phosphatasen mit Orthovanadat zur einer signifikanten Steigerung der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion.

Das Clostridium difficile Toxin B besitzt eine Glycosyltransferase Aktivität und modifiziert die niedermolekulare GTPase rac. Mit UDP - Glucose als Ko - Substrat kommt es zu einer Glycosylierung an Threonin 35 in der Effektorregion (Aminosäuren 24 - 45), die zur Inaktivierung des GTP - bindenden Proteins führt (85;86). Die Glycosylierung von rac durch Toxin B resultierte in einer Aktivitätshemmung der leukozytären NAD(P)H - Oxidase (164). In unseren Experimenten an Endothelzellen führte die Vorbehandlung mit Toxin B ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung der  $O_2^-$  - Produktion.

Eine vollständige Hemmung der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion wurde weder mit PAO noch Toxin B erzielt. Dies ist jedoch durch die Wirkmechanismen beider Substanzen erklärbar, die nicht in der Lage sind, das bereits aktivierte Enzym zu hemmen. Damit ist die Hemmung durch PAO und Toxin B abhängig von dem zellulären Enzymumsatz und der Inkubationszeit der Substanzen. Zudem wurden die Konzentrationen der Substanzen so gewählt, daß Wirkungen von PAO als Tyrosinphosphataseninhibitor bzw. von Toxin B als Toxin weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Dies resultierte jedoch möglicherweise ebenfalls in einer unvollständigen Hemmung des Enzyms.

Direkte Effekte von NADH auf die  $O_2^-$  - Bildung mußten an Zellysaten untersucht werden, da es keine Hinweise auf eine Membrangängigkeit von NADH gibt. Die stimulierende Wirkung von NADH spricht ebenfalls für eine entscheidende Rolle der NAD(P)H - Oxidase bei der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion. Eine NADH - abhängige  $O_2^-$  - Produktion wurde jedoch zumindest im zellfreien System auch für die Xanthinoxidase (156) beschrieben. Die Rolle der Xanthinoxidase als Quelle der endothelialen  $O_2^-$  - Produktion ist weitgehend noch unklar. In unseren Untersuchungen hatte die Hemmung der Xanthinoxidase mit Oxypurinol keinen Einfluß auf die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung. Dies ist im Einklang mit anderen Befunden, wo an HUVEC gebundene Xanthinoxidase erst nach in vitro Inkubation mit dieser nachgewiesen werden konnte (156). Weiterhin wurde der Xanthinoxidase in erster Linie eine Rolle in mikrovaskulären und pulmonalen Endothelzellen zuschreiben, nicht jedoch in Endothelzellen aus makrovaskulären Gefäßen (81;82;139;140;180), wie sie hier verwendet wurden. Außerdem wurde der Xanthinoxidase vor allem bei der Ischämie / Reperfusion induzierten Bildung von reaktiven - Sauerstoff – Spezies (ROS) eine wichtige Rolle zugeschrieben (124;199). Endothelzellen, die mit rac dominant negativen Mutanten transfiziert waren, wiesen nach Hypoxie / Reoxygenierung keine signifikante ROS - Bildung mehr auf, was auf die NAD(P)H - Oxidase als endotheliale Quelle hinweist (88).

Während des Metabolismus von Arachidonsäure, durch z.B. Cyclooxygenase (COX), Lipooxygenase und Cytochrom P450 - Oxidasen, kann es ebenfalls zur  $O_2^-$  - Bildung kommen (51;93;100). In kultivierten Endothelzellen wurde nach Rezeptorstimulation mit Bradykinin eine Cyclooxygenase - abhängige  $O_2^-$  - Produktion beobachtet (74). Somit ist auch dieses Enzym eine potentielle  $O_2^-$  - Quelle im Endothel. Die Hemmung der COX mit Indomethacin hatte jedoch in unseren Experimenten keinen Effekt auf die basale und Depolarisations – induzierte  $O_2^-$  - Produktion.

Für die Atmungskette der Mitochondrien wurde ebenfalls die Möglichkeit einer zellulären endothelialen  $O_2^-$  - Produktion gezeigt (185). Die Messung des genauen Anteils der Atmungskette an der gesamten zellulären  $O_2^-$  - Produktion stößt jedoch auf methodische Schwierigkeiten. Hemmstoffe der Atmungskette beeinflussen auch die zytosolische NADH Konzentra-

tion, die sich auf die Aktivität der NADH - abhängigen Oxidase auswirken kann (126). Bisher wird der  $O_2^-$  - Produktion durch die Atmungskette eher eine untergeordnete Rolle im Endothel zugeschrieben (193). So hatte auch die Hemmung von Teilschritten der Atmungskette, wie z.B. durch Rotenon keinen Effekte auf die vaskuläre  $O_2^-$  - Produktion (133).

Auch sämtliche Isoformen der NO Synthase scheinen in der Lage zu sein unter bestimmten Bedingungen  $O_2^-$  zu produzieren (30;145;146;173). Diese  $O_2^-$  - Produktion tritt aber offensichtlich vor allem bei Substratmangel von z.B. L- Arginin und Tetrahydrobiopterin auf. Die Daten sind hierbei jedoch uneinheitlich. So zeigte z.B. in einer Untersuchung der Mangel von L- Arginin und Tetrahydrobiopterin kaum Einfluß auf die von der endothelialen NOS produzierte  $O_2^-$  - Menge (173). In unseren Experimenten steigerte die Hemmung der eNOS die gemessene  $O_2^-$  - Menge. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß sich durch Wegfall des Reaktionspartners NO die freie, zur Messung zur Verfügung stehende,  $O_2^-$  - Menge erhöht. Da aber auch ein hemmender Einfluß von NO auf die NAD(P)H - Oxidase gezeigt wurde (28;47;150), ist nicht sicher auszuschließen, daß die NOS - Hemmung auch über den Wegfall dieses Mechanismus zu der gesteigerten  $O_2^-$  - Messung führte.

Die Vielzahl der möglichen endothelialen  $O_2^-$  - Quellen legt nahe, daß nicht ein einzelnes Enzym für die gesamte endotheliale  $O_2^-$  - Produktion verantwortlich ist. Jedoch weisen nicht nur unsere Resultate, sondern auch andere Publikationen auf eine maßgebliche Rolle der NAD(P)H - Oxidase in der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung hin. Die Befunde an Endothelzellen mit dem dominant negativem rac - Gen - Produkt, bei denen durch Schubspannung und nach Hypoxie / Reoxigenierung keine signifikante ROS - Bildung mehr (88;194) nachzuweisen war, unterstützen das Konzept, daß die NAD(P)H - Oxidase eine wesentliche Quelle der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung darstellt.

Es gibt darüber hinaus eine Reihe von Hinweisen, daß eine vaskuläre NAD(P)H - Oxidase in der Pathophysiologie von Gefäß – bzw. Kreislaufkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Sie wird für die gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung im Rahmen der Nitrattoleranz (133), der renovaskulären Hyperto-



nie (68;148) und nach Ballondilatation (170) verantwortlich gemacht. Ebenso scheint die gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung in atherosklerotischen Plaques auf eine gesteigerte Expression und  $O_2^-$  - Produktion der NAD(P)H - Oxidase zurückzuführen zu sein (196). Ergebnisse an spontan hypertensiven Ratten, die eine gesteigerte Expression der Untereinheit  $p22^{phox}$ , assoziiert mit einer erhöhten NAD(P)H abhängigen  $O_2^-$  - Bildung zeigen, unterstreichen die wichtige Rolle der NAD(P)H - Oxidase in der Pathophysiologie der Hypertonie (197).

### *F.3. Einfluß des Membranpotentials auf die endotheliale $O_2^-$ - Bildung*

Unsere Ergebnisse zeigen, daß Änderungen des Membranpotentials einen signifikanten Einfluß auf die endotheliale  $O_2^-$  - Produktion haben. Membrandepolarisation steigert dabei die zelluläre  $O_2^-$  - Bildung.

Zur Depolarisation wurden drei strukturell unterschiedliche Substanzen verwendet, deren Wirkmechanismen sich grundlegend unterscheiden. So beruht die depolarisierende Wirkung des Puffers mit der erhöhten Kaliumkonzentration auf der Reduzierung des transmembranären Kaliumgradienten, während der unspezifische Kaliumkanalblocker TBA den  $K^+$  - Ausstrom aus der Zelle, welcher zur Einstellung des Ruhemembranpotentials wesentlich beiträgt, hemmt. Gramacidin dagegen bewirkt als Ionophor aufgrund des Konzentrationsgradienten einen verstärkten Influx von  $Na^+$  in die Zelle. Alle drei Substanzen zeigten dabei eine vergleichbare depolarisierende Wirkung auf das Membranpotential. Deshalb ist anzunehmen, daß der jeweils etwa gleichermaßen gesteigerten  $O_2^-$  - Produktion tatsächlich die Depolarisation als gemeinsame Ursache zu Grunde liegt.

Die Hyperpolarisation durch Öffnung von  $K^+_{ATP}$  Kanälen durch HOE 234 senkte die basale  $O_2^-$  - Produktion signifikant. Dabei konnte weiterhin gezeigt werden, daß in Anwesenheit von Glibenclamid, einem Hemmstoff von  $K^+_{ATP}$  Kanälen, HOE 234 keinen Effekt mehr auf die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung ausübte (168).

Obgleich der  $K^+$  Ionophor Valinomycin einen noch stärkeren hyperpolarisierenden Effekt ausübte als HOE 234 (Tabelle 2), wurde die  $O_2^-$  - Produktion nicht signifikant gehemmt. Dies könnte jedoch durch zusätzliche Effekte von Valinomycin bedingt sein. Beispielsweise ist für Valinomycin eine Steigerung der Membranpermeabilität für  $NH_4^+$  beschrieben (73). Dies könnte zu einem gesteigerten Efflux von  $H^+$  Ionen und damit zu einer Aktivitätssteigerung der NAD(P)H - Oxidase führen kann, da diese durch zelluläre Alkalisierung in ihrer Aktivität gesteigert werden kann (71;72) .

Die durch sowohl Depolarisation als auch Hyperpolarisation hervorgerufenen Änderungen der meßbaren  $O_2^-$  - Menge scheinen dabei in der Tat

durch eine veränderte  $O_2^-$  - Produktion bedingt zu sein. Da  $O_2^-$  die Membran durch Anionenkanäle passieren kann (108) und Cytochrom C aufgrund einer mangelnden Membrangängigkeit nur extrazelluläres  $O_2^-$  erfaßt, wäre zwar denkbar, daß die gemessenen Änderungen primär Folge einer Beeinflussung des  $O_2^-$  - Flusses über die Zellmembran sind. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da aufgrund des elektrischen Gradienten eine Depolarisation einen verminderten bzw. eine Hyperpolarisation einen gesteigerten  $O_2^-$  - Efflux zur Folge haben müßte. Da die Hyperpolarisation der Endothelzelle zu einem gesteigertem  $Ca^{2+}$  Einstrom und durch Aktivierung der NO Synthase zu einer Zunahme der NO - Produktion (46;103) führt, wäre weiterhin denkbar, daß das vermehrte NO durch die Reaktion mit  $O_2^-$  eine Reduktion der meßbaren  $O_2^-$  - Menge bewirkt. Wir führten jedoch jedes Experiment unter Hemmung der NO Synthase mit L-NA durch, so daß dieser Mechanismus unter unseren Versuchsbedingungen mit großer Wahrscheinlichkeit keine Rolle spielt. Außerdem wurde gezeigt, daß Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$  eher eine Steigerung der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung bewirkt (116).

Die endotheliale NAD(P)H - Oxidase scheint die Quelle der Depolarisations – induzierten  $O_2^-$  - Bildung zu sein. Dafür spricht insbesondere, daß HUVEC, die zuvor im intakten Zustand depolarisiert wurden, lysiert eine signifikant gesteigerte NADH - abhängige  $O_2^-$  - Bildung gegenüber Lysaten von Zellen, die zuvor nicht depolarisiert wurden, zeigten. Außerdem wurde die Depolarisations - induzierte  $O_2^-$  - Mehrproduktion durch den Hemmstoff der leukozytären NAD(P)H – Oxidase DPI und durch Inaktivierung des G – Proteins rac mit Toxin B gehemmt. Die gesteigerte NADH - abhängige  $O_2^-$  - Bildung der zuvor depolarisierten Zellen nach Verlust der Zellintegrität ist dabei vermutlich auf ein stabiles Zusammenlagern und / oder der Translokation einer oder einzelner Untereinheiten der NADH - Oxidase, wie es in Leukozyten bekannt ist, zurückzuführen. Da ein Membranpotential abhängiger L – Arginin Transporter  $\gamma$  (13;96), bei dem es durch Depolarisation zu einer Verringerung des L- Arginin Transportes in die Zelle kommt, existiert, könnte es durch den Substratmangel zu einer  $O_2^-$  - Produktion der eNOS gekommen sein mit der Folge einer NOS – abhängigen  $O_2^-$  - Bil-

dung. Allerdings ist ein solcher Substratmangel der eNOS sehr unwahrscheinlich, da intrazelluläre L - Arginin Konzentrationen zwischen 100 und 1000  $\mu\text{M}$  in der Literatur beschrieben wurden (6;13;165), während der  $K_m$  Wert der NO Synthase für L - Arginin bei ca. 5  $\mu\text{M}$  liegt (6). Weiterhin wurde die Depolarisations – induzierte  $\text{O}_2^-$  - Produktion akut innerhalb von 30 Minuten gemessen, was einen Substratmangel der eNOS unwahrscheinlich macht.

Es stellt sich die Frage, über welche Signalwege diese Depolarisations – induzierten Steigerung der  $\text{O}_2^-$  - Produktion der NAD(P)H – Oxidase vermittelt wird. In Leukozyten wurden die Signalwege, die zur Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase führen, intensiv untersucht. Über eine durch Depolarisation gesteigerte  $\text{O}_2^-$  - Bildung ist in Leukozyten jedoch nichts bekannt. Dort geht zwar die Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase mit einer Depolarisation einher (83). Diese ist jedoch als Konsequenz der Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase anzusehen, bei der es zu einem transmembranärem elektrogenem Elektronentransport (70) (siehe Abbildung 2) kommt. So konnte bei Leukozyten nach Hemmung der NAD(P)H - Oxidase mit DPI oder bei Leukozyten von Patienten mit Chronischer Granulomatose, die wegen Defekt von Untereinheiten der NADP(H) – Oxidase keine bzw. verringerte  $\text{O}_2^-$  - Bildung nach Stimulation zeigen, ebenfalls keine Depolarisation der Leukozyten nachgewiesen werden (70;192). Eine exogen herbeigeführte Depolarisation führte in Leukozyten nicht zu einer verstärkten  $\text{O}_2^-$  - Produktion (166). Lediglich an Makrophagen wurde nach PMA - induzierter Aktivierung der Protein Kinase C eine Steigerung der  $\text{O}_2^-$  - Bildung durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration, aber nicht durch Gramacidin beobachtet (89), der Mechanismus blieb hierbei ungeklärt. Nichts desto weniger gaben uns Untersuchungen von Signalwegen zur Aktivierung der leukozytären NAD(P)H - Oxidase wichtige Hinweise. In Leukozyten sind neben Kalziumerhöhung bzw. Proteinkinase C - Aktivierung, auch Tyrosinphosphorylierungs – abhängige Signalwege in die Aktivierung der Oxidase involviert (40;41). In Endothelzellen ist über Tyrosinphosphorylierungs - abhängige Signalwege zur Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase noch wenig bekannt. Jedoch deutete die Steigerung der

NAD(P)H - Oxidase Aktivität durch Agonisten, deren Rezeptoren an Tyrosinphosphorylierungs - abhängige Signalwege gekoppelt sind, wie z.B. Angiotensin (169), Wachstumsfaktoren und die Steigerung der  $O_2^-$  - Bildung bei Hemmung von Tyrosinphosphatasen mit Orthovanadat in unseren Versuchen auf eine wichtige Rolle dieses Signalweges auch in Endothelzellen hin. In Fibroblasten scheint weiterhin über eine Tyrosinphosphorylierung von Proteinen der Größe von 103 und 115 kD die Wasserstoffsuperoxyd - Produktion durch eine membrangebundene NAD(P)H - Oxidase kontrolliert zu werden (181). In unseren Experimenten wurde die Depolarisations - induzierte  $O_2^-$  - Produktion durch Hemmung von Tyrosinkinasen mit Genistein inhibiert. Dabei schlossen wir nicht in Bezug zur Tyrosinphosphorylierung stehende Genisteineffekte auf die  $O_2^-$  - Bildung bereits früher durch Verwendung des funktionellen inaktiven Analogons Daidzein in unserem Labor aus (169). Die Depolarisation und die damit verbundene Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase waren in unseren Untersuchungen weiterhin mit einer gesteigerten Tyrosinphosphorylierung verschiedener, noch nicht weiter charakterisierter Proteine im Bereich 90 - 110 kd assoziiert, deren Bedeutung noch erforscht werden muß.

Die Steigerung der NADH - abhängigen  $O_2^-$  - Bildung von zuvor depolarisierten Zellen, auch nach Verlust der Zellintegrität, ist in der Tat vermutlich auf ein Zusammenlagern und / oder der Translokation einer oder einzelner Untereinheiten zurückzuführen. Eine alternativ mögliche, verstärkte Neubildung des Enzyms ist unwahrscheinlich, da unsere Analysen keine gesteigerte mRNA der Untereinheiten gp91<sup>phox</sup> und p22<sup>phox</sup> (168) nach ein - bzw. sechsständiger Depolarisation zeigten. Daß eine akute Aktivierung und nicht eine langfristige transkriptionelle Regulation bei der Depolarisations - induzierten  $O_2^-$  - Bildung die wesentliche Rolle spielt wird durch die Hemmung der Depolarisations - induzierten  $O_2^-$  - Bildung durch Inaktivierung der GTPase rac mittels Toxin B gestützt. Weiterhin konnten wir als Folge der Depolarisation in unseren Immunoblotanalysen die Zunahme von der kleinen GTPase rac in der partikulären Fraktion, welche die Zellmembran enthält, feststellen. Diese Umverteilung von rac aus der zytosolischen in die partikuläre Fraktion war abhängig von einer Tyrosinkinasen-

aktivität, da nach Hemmung der Tyrosinkinase mit Genistein diese Umverteilung nicht mehr nachzuweisen war.

Unsere Daten zeigen also, daß die Depolarisation initial zur einer verstärkten, Tyrosinphosphorylierungs – abhängigen Membrantranslokation der GTPase rac führt. Die Tyrosinphosphorylierung geht dabei in der Signalkaskade voraus und scheint die Bedingung für die rac – Translokation zu sein. In Leukozyten ist die essentielle Rolle von rac für die Aktivierung der leukozytären NAD(P)H – Oxidase bereits gut untersucht (40;41). So konnte auch in vitro durch Aktivierung von rac per se die Zusammenlagerung der Untereinheiten der leukozytären NAD(P)H - Oxidase induziert werden (56). Die rac – Translokation konnte in Leukozyten durch verschiedene Stimuli, wie Protein Kinase C Aktivierung oder N-formyl-methionyl-leucylphenylalanin induziert werden (34;40). Dusi et al. beschrieb in Leukozyten jedoch auch eine rac – Translokation nach Behandlung der Zellen mit TNF $\alpha$ , die durch Genistein, aber nicht nur Hemmung der Protein Kinase C gehemmt wurde (40). Bisher konnte jedoch weder die Phosphorylierungsstelle noch die verantwortliche Tyrosinkinase näher identifiziert werden. Parallel zu unseren Versuchen wurden Daten einer gesteigerten O $_2^-$  - Bildung einhergehend mit einer rac - Translokation nach Stimulation mit Thrombin von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert. Obwohl deren Untersuchungen nicht an Endothelzellen, sondern an vaskulären glatten Muskelzellen durchgeführt wurden, bieten deren und unsere Daten erstmals den Anhalt für einen neuen, rac – Translokations - abhängigen Signalweg zur Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase in vaskulären Zellen (141).

Bisher finden sich in der Literatur kaum Hinweise auf Membranpotential - kontrollierte Funktionen von Endothelzellen. Allerdings moduliert das Membranpotential deren Freisetzung vasoaktiver Substanzen. Verantwortlich hierbei sind jedoch meist die durch Änderungen des Membranpotentials verursachten Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration, die sich auf die Produktion der Autakoide NO und PGI $_2$  auswirkt. Änderungen der Kalziumkonzentration scheinen jedoch bei der Beeinflus-

sung der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung durch Änderungen des Membranpotentials in unseren Untersuchungen keine Rolle zu spielen. Zwar zeigten verschiedene Arbeitsgruppen auch eine gesteigerte endotheliale  $O_2^-$  - Bildung durch Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$  durch Gabe des  $Ca^{2+}$  Ionophors A 23187 und Aktivierung der Protein Kinase C (116), jedoch kommt es bei Depolarisation im Unterschied zu glatten Muskelzellen in Endothelzellen zu einer Senkung und bei Hyperpolarisation zu einer Steigerung des intrazellulären Kalziums (66;123;160). In unseren Untersuchungen konnte die  $O_2^-$  - Bildung jedoch gerade durch eine Depolarisation gesteigert werden. Obwohl an Leukozyten keine durch Depolarisation gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung bekannt ist, wurde das umgekehrte, nämlich eine Hemmung der leukozytären  $O_2^-$  - Produktion durch Hyperpolarisation in der Tat beschrieben (142).

Für einen potentialabhängigen Signaltransduktionsmechanismus müssen auch Spannungs - abhängige Ionenkanäle in der Membran diskutiert werden. Bisher wurden jedoch Spannungs - abhängigen Ionenkanälen im Endothel allenfalls eine untergeordnete Rolle zugeschrieben (135), so z.B. auch den Spannungs - und cAMP - abhängig regulierten Chloridkanälen, die am Endothel beschrieben wurden (59;138;182). Interessant ist jedoch, daß im respiratorischen Epithel durch Veränderung der Chloridkonzentration membrangebundene Kinasen aktiviert wurden (128). Somit scheinen spannungsabhängige Chloridkanäle, die die intrazelluläre Chloridkonzentration verändern, in der Lage zu sein, Kinasenaktivität zu modulieren. Ein entsprechender Mechanismus ist in Endothelzellen bisher nicht bekannt, muß aber weiter untersucht werden. Interessant sind weiterhin Daten, die bei einigen spannungsabhängigen Kaliumkanälen, insbesondere bei sog. Shaker Kanälen beschreiben, daß deren beta Untereinheit einerseits die  $K^+$  Leitfähigkeit der Kanäle modifiziert und gleichzeitig eine Funktion als Oxidoreduktase mit dem Co - Faktor Nicotinamid mit großen Sequenzhomologien zur NAD(P)H - Oxidase im aktiven Zentrum wahrnimmt. Dadurch könnte sich eine direkte Verbindung von Membranpotentialänderungen zu einer intrazellulären Enzymaktivität herleiten (62;121). Bisher wurde nie gezeigt, ob dies insofern eine funktionell Rolle spielt, als daß eine Radi-

kalproduktion durch diese Kanäle stattfindet (39). Unseren Ergebnissen nach, scheinen diese Kanäle bei Membranpotentialänderungs - abhängigen  $O_2^-$  - Bildung in Endothelzellen wahrscheinlich keine Rolle zu spielen. So gibt es in HUVEC bisher, im Gegensatz zu Endothelzellen von Koronararterien (42) und bovinen Aorten (176), keine Hinweise auf Spannungs - abhängige Kaliumkanäle. Weiterhin sprechen unsere Befunde, die einer Tyrosinphosphorylierungs - und rac - Translokation involvierende Signaltransduktion bei der Depolarisations - induzierten endothelialen  $O_2^-$  - Bildung gegen eine direkte Potential - sensitive  $O_2^-$  - Produktion der NAD(P)H - Oxidase.

Die Beschreibung und Aufklärung der Depolarisations - induzierten  $O_2^-$  - Produktion ist von großem Interesse, da bei vielen pathophysiologischen Bedingungen mit Membranpotentialänderungen der glatten Muskel - und Endothelzellen auch eine veränderte  $O_2^-$  - Bildung beobachtet wurde. So beschrieb z.B. Al Medhi et al. eine Depolarisation von Endothelzellen als Folge von Ischämie in Rattenlungen (4). Auch beim Diabetes mellitus, bei dem ebenfalls eine gesteigerte endotheliale  $O_2^-$  - Bildung nachgewiesen wurde (151), existieren Daten, die auf pathologische Membranpotentialveränderungen hinweisen. So fand sich in Mesenterialarterien diabetischer Ratten eine reduzierte Azetylcholin - induzierte Hyperpolarisation (50). Außerdem wurde in Zerebralarterien diabetischer Ratten eine verstärkte Depolarisation auf Druck und gleichzeitig eine geringere Ansprechbarkeit auf  $K^+_{ATP}$  Kanal Öffner beobachtet (198).

Die durch Depolarisation gesteigerte endotheliale  $O_2^-$  - Bildung durch eine NADP(H) - Oxidase, die in dieser Arbeit aufgezeigt wurde, kann weiterhin bei der Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie von Bedeutung sein. So wurde einerseits gezeigt, daß erhöhter Druck eine Depolarisation von glatten Muskelzellen (65;91) zur Folge hat. Andererseits führte eine akute Druckerhöhung in Koronararterien des Hundes zu einer Steigerung der Serotonin - induzierten Vasokonstriktion, die durch vorherige Gabe von SOD verhindert werden konnte (33). Weiterhin zeigte sich auch in Arterien des Muskel Gracilis von Ratten bei hohem Druck eine Abschwächung der NO - mediierten Vasodilatation, wobei diese Reduktion der Di-



latation in Anwesenheit des  $O_2^-$  - metabolisierenden Enzyms SOD nicht nachgewiesen werden konnte (77). Auch in dem Modell der essentiellen Hypertonie der spontan hypertensiven Ratten (SHR), wurde sowohl eine veränderte Reagibilität des Membranpotentials auf Azetylcholin (49), als auch eine NADH - abhängige gesteigerte  $O_2^-$  - Bildung gezeigt. Inwiefern diese geschilderten Änderungen der  $O_2^-$  - Bildung auf gleichzeitige Änderungen des endothelialen Membranpotentials zurückzuführen sind, ist bisher noch nicht untersucht und bedarf sicherlich noch weiterer Studien. Dennoch stellt die von uns gezeigte Depolarisations – induzierte Aktivierung der NAD(P)H - Oxidase in Endothelzellen einen neuen Erklärungsansatz für den Mechanismus der gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung in Gefäßen, welche erhöhten Druck ausgesetzt sind, dar.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die NAD(P)H - Oxidase im humanen Endothelzellen vorhanden ist und dort auch einen wesentlichen Beitrag zur basalen  $O_2^-$  - Bildung leistet. Membranpotentialänderungen beeinflussen die Aktivität dieser NAD(P)H - Oxidase, wobei durch Depolarisation die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung erhöht und durch Hyperpolarisation mittels Öffnung von  $K^+_{ATP}$  Kanälen gesenkt wird. Tyrosinphosphorylierungs - abhängige Signalschritte, sowie die Aktivierung und Translokation der niedermolekularen GTPase rac stellen dabei einen entscheidenden Schritt in der Signaltransduktion dar und können damit ein neues interessantes Ziel für die therapeutische Kontrolle der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung sein. Da  $O_2^-$  in der Physiologie und Pathophysiologie des vaskulären Systems durch die Interaktion mit NO und seine Wirkung als Signalmolekül einen wichtigen Platz einnimmt, können diese Ergebnisse weiterhin dazu dienen, die Mechanismen von pathophysiologischen Veränderungen von  $O_2^-$  bei Gefäßerkrankungen weiter aufzuklären.

## Zusammenfassung

Reaktive – Sauerstoff - Spezies (ROS) spielen in der Physiologie und Pathophysiologie des vaskulären Systems eine wichtige Rolle. So kommt es z.B. bei Hypertonie, Atherosklerose, Ischämie / Reperfusion und weiteren Krankheiten und Stoffwechselstörungen, wie z.B. Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffradikalbildung und anti - oxidativen Mechanismen. Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) spielen insofern eine besondere Rolle, als sie durch direkte Interaktion endotheliales NO inaktivieren, so daß es seine vasodilatatorische, anti – proliferative und plättchenaggregationshemmende Funktion nicht mehr voll erfüllen kann. Damit ist  $O_2^-$  maßgeblich an der Induktion der Endotheldysfunktion beteiligt. Bei Beginn dieser Arbeit gab es erste Hinweise, daß eine der leukozytären NAD(P)H - Oxidase ähnlichen Oxidase auch im Endothel existiert und wesentlich zur endothelialen  $O_2^-$  - Bildung beiträgt. Wenig erforscht waren jedoch die Regulationsmechanismen dieser Oxidase. Ein bisher noch nicht bekannter Stimulus zur Steigerung der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung wurde 1996 beschrieben. In Endothelzellen aus bovinen Pulmonararterien führte eine Depolarisation zu einer gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung. Dies kann insofern von Bedeutung sein, als es sowohl unter physiologischen, als auch pathophysiologischen Bedingungen zu akuten oder chronischen Veränderungen des endothelialen Membranpotentials kommt. In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob eine NAD(P)H – Oxidase in der Tat auch in humanen Endothelzellen vorhanden ist, ob sie im Gegensatz zur leukozytären Form konstitutiv aktiv ist, und welchen Beitrag sie zur basalen endothelialen  $O_2^-$  - Bildung leistet. Weitere Untersuchungen in HUVEC sollten zeigen, ob und wie sich sowohl De – als auch Hyperpolarisation der Zellmembran auf die  $O_2^-$  - Bildung auswirken, welches Enzym hierbei eine Rolle spielt und welche Signaltransduktionsmechanismen beteiligt sind. Zur  $O_2^-$  - Messung an vaskulären Zellen war die Verwendung der Lucigenin – Chemilumineszenz – Methode etabliert, so daß auch hier anfänglich mit dieser Methode gearbeitet wurde. Da jedoch dann Befunde veröffentlicht wurden, die zeigten, daß Lucigenin in Enzymsyste-

men, die sonst kein oder nur wenig  $O_2^-$  produzieren, zu einer erheblichen  $O_2^-$  - Bildung führte, mußte mit weiteren Methoden der  $O_2^-$  - Messung überprüft werden, ob diese Nachteile auch unter unseren Versuchsbedingungen auftraten. Verwendet wurden hierzu die MCLA – verstärkte Chemilumineszenz, die NBT – und Cytochrom C – Methode. Mit diesen verschiedenen, voneinander unabhängigen Methoden zeigte sich, daß in Anwesenheit von NADH Lucigenin selbst zu einer wesentlich gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung in Lysaten von humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) führt. Daher wurde zur Untersuchung der endothelialen  $O_2^-$  - Bildung in dieser Arbeit schließlich nur die Cytochrom C Methode verwendet. Zur Überprüfung der Auswirkungen der verwendeten Substanzen auf das Membranpotential wurde die Membranpotentialmeßmethode mittels dem Potential – sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Bis - oxonol aufgebaut und verwendet. Intakte HUVEC zeigten eine basale  $O_2^-$  - Produktion, die durch bekannte Inhibitoren der leukozytären NAD(P)H – Oxidase, mit unterschiedlichen Wirkmechanismen signifikant gehemmt wurde (Diphenyleniodonium ca. 48%, Phenylarsenoxid ca. 34% ). Ebenso resultierte die Inaktivierung des GTP - bindenden - Proteins rac mit Clostridium difficile Toxin B in einer signifikanten Reduktion der basalen endothelialen  $O_2^-$  - Produktion um ca. 30%. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß nach Aufhebung der zellulären Integrität durch das Lysieren der HUVEC die Gabe von NADH eine um ca. 2.7 fach erhöhte  $O_2^-$  - Produktion im Vergleich zu NADPH bewirkte. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz bzw. rtPCR konnten außerdem zumindest ein Teil der leukozytären NAD(P)H – Oxidase Untereinheiten, p67<sup>phox</sup> und gp91<sup>phox</sup> auch in HUVEC nachgewiesen werden. Zur gezielten Depolarisation des Membranpotentials wurden ein Puffer mit erhöhter Kaliumkonzentration (90 mM), der nicht selektive Kalium – Kanal - Blocker Tetrabutylammonium Chlorid (1 mM) und das Kation – Ionophor Gramicidin (1  $\mu$ M) verwendet. Die basale endotheliale  $O_2^-$  - Produktion wurde durch diese Substanzen in ähnlichem Ausmaß (~ 60% ) signifikant gesteigert (n=23, p<0.01). Dagegen senkte die Hyperpolarisation durch Öffnung von  $K_{ATP}$  Kanälen mittels Hoe 234 (1 mM) signifikant die  $O_2^-$  - Bildung. Nach Auflösung der zellulären Integrität zeigten zuvor depolarisierte Zellen (1h bzw. 6h ) eine gesteigerte NADH - abhängige  $O_2^-$  - Bildung, die

jedoch nicht mit einem erhöhten mRNA Gehalt von Untereinheiten der NAD(P)H - Oxidase assoziiert war. Die Depolarisation induzierte sowohl eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung von verschiedenen, bisher noch nicht näher charakterisierten Proteinen (90 - 110 kD), als auch eine signifikante Steigerung der Membranassoziation des G - Proteins rac. Die Inaktivierung von rac unterdrückte dabei den steigernden Effekt der Depolarisation auf die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung. Weiterhin bewirkte die Hemmung von Tyrosinkinase mit Genistein (30  $\mu$ M, n=15) sowohl eine Aufhebung der durch Depolarisation gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung als auch der damit assoziierten rac - Translokation. Zusammenfassend kann aus diesen Daten geschlossen werden, daß eine der leukozytären Form ähnliche NAD(P)H - Oxidase in humanen Endothelzellen vorhanden ist, bei deren Regulation das kleine G -Protein rac eine wichtige Rolle spielt. Im Gegensatz zu Leukozyten zeigte sich im Endothel jedoch eine konstitutive, bevorzugt NADH - abhängige,  $O_2^-$  - Bildung. Membranpotentialänderungen beeinflussten die Aktivität dieser NAD(P)H - Oxidase, wobei durch Depolarisation die endotheliale  $O_2^-$  - Bildung erhöht und durch Hyperpolarisation mittels Öffnung von  $K^+_{ATP}$  Kanälen gesenkt wird. Tyrosinphosphorylierungs - abhängige Signalschritte, sowie die Aktivierung und Translokation der GTPase rac stellen einen entscheidenden Schritt in der Signaltransduktion der durch Depolarisation - gesteigerten  $O_2^-$  - Bildung dar.

## Literatur

1. **Abo,A., E.Pick, A.Hall, N.Totty, C.G.Teahan, and A.W.Segal.** Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353: 668-670, 1991.
2. **Adams,D.J., J.Barakeh, R.Laskey, and C.van-Breemen.** Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 3: 2389-2400, 1989.
3. **Al-Mehdi,A.B., H.Ischiropoulos, and A.B.Fisher.** Endothelial cell oxidant generation during K(+)-induced membrane depolarization. *J.Cell Physiol.* 166: 274-280, 1996.
4. **Al-Mehdi,A.B., G.Zhao, and A.B.Fisher.** ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygen-ventilated isolated rat lung. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 18: 653-661, 1998.
5. **Alexander,R.W.** Atherosclerosis as disease of redox-sensitive genes. *Trans.Am.Clin.Climatol.Assoc.* 109: 129-145, 1998.
6. **Arnal,J.F., T.Munzel, R.C.Venema, N.L.James, C.L.Bai, W.E.Mitch, and D.G.Harrison.** Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J.Clin.Invest.* 95: 2565-2572, 1995.
7. **Barbacanne,M., J.Souchard, B.Darblade, J.Iliou, F.Nepveu, B.Pipy, F.Bayard, and J.Arnal.** Detection of superoxide anion released extracellularly by endothelial cells using cytochrome c reduction, ESR, fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques. *Free Radic.Biol.Med.*2000.Sep.1.;29.(5.):388.-96. 29: 388-396, 2000.
8. **Baud,L. and R.Ardailou.** Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am.J.Physiol* 251: F765-F7761986.

9. **Bauer,G.** Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anti-cancer Res.* 20: 4115-4139, 2000.
10. **Beal,M.F.** Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann.Neurol.* 38: 357-366, 1995.
11. **Beckman,K.B. and B.N.Ames.** The free radical theory of aging matures. *Physiol.Rev.* 78: 547-581, 1998.
12. **Beny,J.L. and C.Pacicca.** Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *Am.J.Physiol.* 266: H1465-H1472, 1994.
13. **Bogle,R.G., A.R.Baydoun, J.D.Pearson, and G.E.Mann.** Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells. *J.Physiol.Lond.* 490: 229-241, 1996.
14. **Bokoch,G.M.** Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6: 212-218, 1994.
15. **Bolz,S., S.Pieperhoff, C.De Wit, and U.Pohl.** Chronic increases in transmural pressure reduce NO-mediated dilations in isolated resistance arteries of the hamster. *Acta Physiol.Scand.* 168: 113-117, 2000.
16. **Bouin,A.P., N.Grandvaux, P.V.Vignais, and A.Fuchs.** p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. *J.Biol.Chem.* 273: 30097-30103, 1998.
17. **Brandes,R.P., M.Barton, K.M.Philippens, G.Schweitzer, and A.Mugge.** Endothelial-derived superoxide anions in pig coronary arteries:

evidence from lucigenin chemiluminescence and histochemical techniques. *J.Physiol.Lond.* 500: 331-342, 1997.

18. **Brauner,T., D.F.Hulser, and R.J.Strasser.** Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *Biochim.Biophys.Acta* 771: 208-216, 1984.
19. **Brawn,K. and I.Fridovich.** Superoxide radical and superoxide dismutase threat and defense. *Acta Physiol.Scand.Suppl.* 492: 9-18, 1980.
20. **Bregestovski,P., A.Bakhramov, S.Danilov, A.Moldobaeva, and K.Takeda.** Histamine-induced inward currents in cultured endothelial cells from human umbilical vein. *Br.J.Pharmacol.* 95: 429-436, 1988.
21. **Bronner,C. and Y.Landry.** The use of the potential-sensitive fluorescent probe bisoxonol in mast cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1070: 321-331, 1991.
22. **Celermajer,D.S., K.E.Sorensen, V.M.Gooch, D.J.Spiegelhalter, O.I.Miller, I.D.Sullivan, J.K.Lloyd, and J.E.Deanfield.** Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340: 1111-1115, 1992.
23. **Ceriello,A., D.Giugliano, A.Quatraro, R.P.Dello, and P.J.Lefebvre.** Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabet.Med.* 8: 540-542, 1991.
24. **Ceriello,A., D.Giugliano, A.Quatraro, and P.J.Lefebvre.** Antioxidants show an antihypertensive effect in diabetic and hypertensive subjects. *Clin.Sci.Colch.* 81: 739-742, 1991.
25. **Chen,X.L., P.E.Tummala, M.T.Olbrych, R.W.Alexander, and R.M.Medford.** Angiotensin II induces monocyte chemoattractant

protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83: 952-959, 1998.

26. **Chisolm,G.M. and D.Steinberg.** The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic.Biol.Med.* 28: 1815-1826, 2000.
27. **Chiu,J.J., B.S.Wung, J.Y.Shyy, H.J.Hsieh, and D.L.Wang.** Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17: 3570-3577, 1997.
28. **Clancy,R.M., P.J.Leszczynska, and S.B.Abramson.** Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J.Clin.Invest.* 90: 1116-1121, 1992.
29. **Cornejo,D.L., J.A.Lopez, S.Navarro, D.Garcia, and P.J.Patino.** [Clinical and molecular characterization of autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by p47-phox deficiency]. *Rev.Med.Chil.2000.May.;128.(5.):491.-8.* 128: 491-498,
30. **Cosentino,F. and Z.S.Katusic.** Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation* 91: 139-144, 1995.
31. **Daut,J., N.B.Standen, and M.T.Nelson.** The role of the membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 5: 154-181, 1994.
32. **De-Wit,C., B.Jahrbeck, C.Schafer, S.S.Bolz, and U.Pohl.** Nitric oxide opposes myogenic pressure responses predominantly in large arterioles in vivo. *Hypertension* 31: 787-794, 1998.



33. **DeB., V, D.W.Nuno, B.M.Cappelli, W.P.Dole, and K.G.Lamping.** Effect of acute hypertension in the coronary circulation: role of mechanical factors and oxygen radicals. *J.Hypertens.* 12: 163-172, 1994.
34. **Diekmann,D., A.Abo, C.Johnston, A.W.Segal, and A.Hall.** Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265: 531-533, 1994.
35. **Dorseuil,O., M.T.Quinn, and G.M.Bokoch.** Dissociation of Rac translocation from p47phox/p67phox movements in human neutrophils by tyrosine kinase inhibitors. *J.Leukoc.Biol.* 58: 108-113, 1995.
36. **Doussiere,J., A.Poinas, C.Blais, and P.V.Vignais.** Phenylarsine oxide as an inhibitor of the activation of the neutrophil NADPH oxidase-- identification of the beta subunit of the flavocytochrome b component of the NADPH oxidase as a target site for phenylarsine oxide by photoaffinity labeling and photoinactivation. *Eur.J.Biochem.* 251: 649-658, 1998.
37. **Doussiere,J. and P.V.Vignais.** Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils. Factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation. *Eur.J.Biochem.* 208: 61-71, 1992.
38. **Dreher,D. and A.F.Junod.** Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur.J.Cancer* 32A: 30-38, 1996.
39. **Duprat,F., E.Guillemare, G.Romey, M.Fink, F.Lesage, M.Lazdunski, and E.Honore.** Susceptibility of cloned K<sup>+</sup> channels to reactive oxygen species. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92: 11796-11800, 1995.
40. **Dusi,S., B.Della, V, M.Donini, K.A.Nadalini, and F.Rossi.** Mechanisms of stimulation of the respiratory burst by TNF in nonadherent

neutrophils: its independence of lipidic transmembrane signaling and dependence on protein tyrosine phosphorylation and cytoskeleton. *J.Immunol.* 157: 4615-4623, 1996.

41. **Dusi,S., M.Donini, and F.Rossi.** Tyrosine phosphorylation and activation of NADPH oxidase in human neutrophils: a possible role for MAP kinases and for a 75 kDa protein [see comments]. *Biochem.J.* 304: 243-250, 1994.
42. **Fan,J. and K.B.Walsh.** Mechanical stimulation regulates voltage-gated potassium currents in cardiac microvascular endothelial cells. *Circ.Res.* 84: 451-457, 1999.
43. **Ferro,C.J. and D.J.Webb.** Endothelial dysfunction and hypertension. *Drugs* 53 Suppl 1: 30-41, 1997.
44. **Finkel,T.** Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476: 52-54, 2000.
45. **Fleming,I., A.T.Bara, and R.Busse.** Calcium signalling and autacoid production in endothelial cells are modulated by changes in tyrosine kinase and phosphatase activity. *J.Vasc.Res.* 33: 225-234, 1996.
46. **Fleming,I. and R.Busse.** Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc.Res.* 43: 532-541, 1999.
47. **Forslund,T. and T.Sundqvist.** Nitric oxide reduces hydrogen peroxide production from human polymorphonuclear neutrophils. *Eur.J.Clin.Invest.* 25: 9-14, 1995.
48. **Fridovich,I.** *Cytochrom c, Handbook of Methods for oxygen radical Research 1985.* 1985,
49. **Fujii,K., M.Tominaga, S.Ohmori, K.Kobayashi, T.Koga, Y.Takata, and M.Fujishima.** Decreased endothelium-dependent hyperpolarization

to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ.Res.* 70: 660-669, 1992.

50. **Fukao,M., Y.Hattori, M.Kanno, I.Sakuma, and A.Kitabatake.** Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br.J.Pharmacol.* 121: 1383-1391, 1997.
51. **Fulton,D., J.C.McGiff, M.S.Wolin, P.Kaminski, and J.Quilley.** Evidence against a cytochrome P450-derived reactive oxygen species as the mediator of the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the perfused heart of the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 280: 702-709, 1997.
52. **Galley,H.F., P.D.Howdle, B.E.Walker, and N.R.Webster.** The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radic.Biol.Med.* 23: 768-774, 1997.
53. **Galley,H.F., J.Thornton, P.D.Howdle, B.E.Walker, and N.R.Webster.** Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clin.Sci.Colch.* 92: 361-365, 1997.
54. **Goldschmidt-Clermont,P.J. and L.Moldovan.** Stress, superoxide, and signal transduction. *Gene Expr.* 7: 255-260, 1999.
55. **Gong,K.W., G.Y.Zhu, L.H.Wang, and C.S.Tang.** Effect of active oxygen species on intimal proliferation in rat aorta after arterial injury. *J.Vasc.Res.* 33: 42-46, 1996.
56. **Gorzalczany,Y., N.Sigal, M.Itan, O.Lotan, and E.Pick.** Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *J.Biol.Chem.*2000.Sep.27
57. **Griendling,K.K., C.A.Minieri, J.D.Ollerenshaw, and R.W.Alexander.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in

cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 74: 1141-1148, 1994.

58. **Griendling,K.K. and F.M.Ushio.** Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J.Lab.Clin.Med.* 132: 9-15, 1998.
59. **Groschner,K. and W.R.Kukovetz.** Voltage-sensitive chloride channels of large conductance in the membrane of pig aortic endothelial cells [published erratum appears in *Pflugers Arch* 1992 Sep;421(6):613]. *Pflugers Arch.* 421: 209-217, 1992.
60. **Grunfeld,S., C.A.Hamilton, S.Mesaros, S.W.McClain, A.F.Dominiczak, D.F.Bohr, and T.Malinski.** Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 26: 854-857, 1995.
61. **Gryglewski,R.J., R.M.Palmer, and S.Moncada.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-456, 1986.
62. **Gulbis,J.M., S.Mann, and R.MacKinnon.** Structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel beta subunit. *Cell* 97: 943-952, 1999.
63. **Haklar,G., D.C.Ulukaya, M.Yuksel, T.Dagli, and A.S.Yalcin.** Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischaemia-reperfusion: modulation by L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 25: 908-912, 1998.
64. **Hancock,J.T.** Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules: their production and role in disease. *Br.J.Biomed.Sci.* 54: 38-46, 1997.
65. **Harder,D.R., R.Gilbert, and J.H.Lombard.** Vascular muscle cell depolarization and activation in renal arteries on elevation of transmural pressure. *Am.J.Physiol.* 253: F778-F781, 1987.

66. **He,P. and F.E.Curry.** Depolarization modulates endothelial cell calcium influx and microvessel permeability. *Am.J.Physiol.* 261: H1246-H12541991.
67. **Hegde,L.G., P.Srivastava, R.Kumari, and M.Dikshit.** Alterations in the vasoreactivity of hypertensive rat aortic rings: role of nitric oxide and superoxide radicals. *Clin.Exp.Hypertens.* 20: 885-901, 1998.
68. **Heitzer,T., U.Wenzel, U.Hink, D.Krollner, M.Skatchkov, R.A.Stahl, R.MacHarzina, J.H.Brasen, T.Meinertz, and T.Münzel.** Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int.* 55: 252-260, 1999.
69. **Henderson,L.M. and J.B.Chappel.** NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim.Biophys.Acta* 1273: 87-107, 1996.
70. **Henderson,L.M., J.B.Chappell, and O.T.Jones.** The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an H<sup>+</sup> channel. *Biochem.J.* 246: 325-329, 1987.
71. **Henderson,L.M., J.B.Chappell, and O.T.Jones.** Internal pH changes associated with the activity of NADPH oxidase of human neutrophils. Further evidence for the presence of an H<sup>+</sup> conducting channel. *Biochem.J.* 251: 563-567, 1988.
72. **Henderson,L.M., J.B.Chappell, and O.T.Jones.** Superoxide generation by the electrogenic NADPH oxidase of human neutrophils is limited by the movement of a compensating charge. *Biochem.J.* 255: 285-290, 1988.
73. **Henderson,P.J., J.D.McGivan, and J.B.Chappell.** The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phospholipid

membranes. The role of induced proton permeability. *Biochem.J.* 111: 521-535, 1969.

74. **Holland, J.A., K.A.Pritchard, M.A.Pappolla, M.S.Wolin, N.J.Rogers, and M.B.Sterman.** Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J.Cell Physiol.* 143: 21-25, 1990.
75. **Hope, B.T., G.J.Michael, K.M.Knigge, and S.R.Vincent.** Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88: 2811-2814, 1991.
76. **Howard, A.B., R.W.Alexander, R.M.Nerem, K.K.Griendling, and W.R.Taylor.** Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 272: C421-C427, 1997.
77. **Huang, A., D.Sun, G.Kaley, and A.Koller.** Superoxide released to high intra-arteriolar pressure reduces nitric oxide-mediated shear stress- and agonist-induced dilations. *Circ.Res.* 83: 960-965, 1998.
78. **Huie, R.E. and S.Padmaja.** The reaction of NO with superoxide. *Free Radic.Res.Commun.* 18: 195-199, 1993.
79. **Huraux, C., T.Makita, S.Kurz, K.Yamaguchi, F.Szlam, M.M.Tarpey, J.N.Wilcox, D.G.Harrison, and J.H.Levy.** Superoxide production, risk factors and endothelium dependent relaxations in human internal mammary arteries. *Circulation* 99: 53-59, 1999.
80. **Inoue, N., S.Kawashima, K.I.Hirata, Y.Rikitake, S.Takeshita, W.Yamochi, H.Akita, and M.Yokoyama.** Stretch force on vascular smooth muscle cells enhances oxidation of LDL via superoxide production. *Am.J.Physiol.* 274: H1928-H1932, 1998.
81. **Jarasch, E.D., G.Bruder, and H.W.Heid.** Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol.Scand.Suppl.* 548: 39-46, 1986.

82. **Jarasch,E.D., G.Bruder, and H.W.Heid.** Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol.Scand.Suppl.* 548: 39-46, 1986.
83. **Jones,G.S., K.VanDyke, and V.Castranova.** Transmembrane potential changes associated with superoxide release from human granulocytes. *J.Cell Physiol.* 106: 75-83, 1981.
84. **Jones,S.A., V.B.O'Donnell, J.D.Wood, J.P.Broughton, E.J.Hughes, and O.T.Jones.** Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 271: H1626-H1634, 1996.
85. **Just,I., J.Selzer, F.Hofmann, G.A.Green, and K.Aktories.** Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin-catalyzed glucosylation. *J.Biol.Chem.* 271: 10149-10153, 1996.
86. **Just,I., J.Selzer, M.Wilm, C.von-Eichel-Streiber, M.Mann, and K.Aktories.** Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375: 500-503, 1995.
87. **Kanner,J., S.Harel, and R.Granit.** Nitric oxide as an antioxidant. *Arch.Biochem.Biophys.* 289: 130-136, 1991.
88. **Kim,K.S., K.Takeda, R.Sethi, J.B.Pracyk, K.Tanaka, Y.F.Zhou, Z.X.Yu, V.J.Ferrans, J.T.Bruder, I.Kovesdi, K.Irani, C.P.Goldschmidt, and T.Finkel.** Protection from reoxygenation injury by inhibition of rac1. *J.Clin.Invest.* 101: 1821-1826, 1998.
89. **Kitagawa,S. and J.Johnston-RB.** Relationship between membrane potential changes and superoxide-releasing capacity in resident and activated mouse peritoneal macrophages. *J.Immunol.* 135: 3417-3423, 1985.

90. **Klatt,P., K.Schmidt, G.Uray, and B.Mayer.** Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. *J.Biol.Chem.* 268: 14781-14787, 1993.
91. **Knot,H.J. and M.T.Nelson.** Regulation of arterial diameter and wall [Ca<sup>2+</sup>] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J.Physiol.Lond.* 508: 199-209, 1998.
92. **Koppenol,W.H., J.J.Moreno, W.A.Pryor, H.Ischiropoulos, and J.S.Beckman.** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem.Res.Toxicol.* 5: 834-842, 1992.
93. **Kukreja,R.C., H.A.Kontos, M.L.Hess, and E.F.Ellis.** PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ.Res.* 59: 612-619, 1986.
94. **Kumar,K.V. and U.N.Das.** Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic.Res.Commun.* 19: 59-66, 1993.
95. **Kurz,S., U.Hink, G.Nickenig, A.B.Borthayre, D.G.Harrison, and T.Münzel.** Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in nitrate tolerance. *Circulation* 99: 3181-3187, 1999.
96. **Lakos,Z., B.Somogyi, M.Balazs, J.Matko, and S.Damjanovich.** The effect of transmembrane potential on the dynamic behavior of cell membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 1023: 41-46, 1990.
97. **Langheinrich,U. and J.Daut.** Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea-pig heart induced by K<sup>+</sup> channel openers and glucose deprivation. *J.Physiol.Lond.* 502: 397-408, 1997.
98. **Le,C., V and P.Maridonneau, I.** Complete and reversible inhibition of NADPH oxidase in human neutrophils by phenylarsine oxide at a



step distal to membrane translocation of the enzyme subunits.  
*J.Biol.Chem.* 270: 2067-2073, 1995.

99. **Le,C., V, H.Mohn, G.Gacon, and P.Maridonneau, I.** The small GTP-binding protein rac is not recruited to the plasma membrane upon NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 198: 1216-1224, 1994.
100. **Li,C.G. and M.J.Rand.** Inhibition of NO-medicate responses by 7-ethoxyresorufin, a substrate and competitive inhibitor of cytochrome P450. *Br.J.Pharmacol.* 118: 57-62, 1996.
101. **Li,P.F., R.Dietz, and R.von-Harsdorf.** Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 96: 3602-3609, 1997.
102. **Li,Y. and M.A.Trush.** Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 253: 295-299, 1998.
103. **Lin,S., K.A.Fagan, K.X.Li, P.W.Shaul, D.M.Cooper, and D.M.Rodman.** Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative  $Ca^{2+}$  entry. *J.Biol.Chem.* 2000.Jun. 16.;275.(24.):17979.-85. 275: 17979-17985,
104. **Liochev,S.I. and I.Fridovich.** Superoxide from glucose oxidase or from nitroblue tetrazolium? *Arch.Biochem.Biophys.* 318: 408-410, 1995.
105. **Liochev,S.I. and I.Fridovich.** Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch.Biochem.Biophys.* 337: 115-120, 1997.

106. **Lu,G., E.L.Greene, T.Nagai, and B.M.Egan.** Reactive oxygen species are critical in the oleic acid-mediated mitogenic signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 32: 1003-1010, 1998.
107. **Lüscher,T.F., D.Diederich, E.Weber, P.M.Vanhoutte, and F.R.Buhler.** Endothelium dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 11: 573-578, 1988.
108. **Lynch,R.E. and I.Fridovich.** Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J.Biol.Chem.* 253: 4697-4699, 1978.
109. **Martens,J.R. and C.H.Gelband.** Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K<sup>+</sup> channels in genetic and nongenetic hypertension. *Circ.Res.* 79: 295-301, 1996.
110. **Marui,N., M.K.Offermann, R.Swerlick, C.Kunsch, C.A.Rosen, M.Ahmad, R.W.Alexander, and R.M.Medford.** Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 92: 1866-1874, 1993.
111. **Marumo,T., K.Schini, V, B.Fisslthaler, and R.Busse.** Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 96: 2361-2367, 1997.
112. **Mashiko,S., N.Suzuki, S.Koga, M.Nakano, T.Goto, T.Ashino, I.Mizumoto, and H.Inaba.** Measurement of rate constants for quenching singlet oxygen with a Cypridina luciferin analog (2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo [1,2-a]pyrazin-3-one) and sodium azide. *J.Biolumin.Chemilumin.* 6: 69-72, 1991.

113. **Massey V.** The microestimation of succinate and extinction coefficient of cytochrome C . *Biochim Biophys Acta* **34**: 255-256, 1959.
114. **Mataki,H., T.Inagaki, M.Yokoyama, and S.Maeda.** ICAM-1 expression and cellular injury in cultured endothelial cells under hypoxia/reoxygenation. *Kobe.J.Med.Sci.* 40: 49-63, 1994.
115. **Matsubara,T. and M.Ziff.** Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J.Immunol.* 137: 3295-3298, 1986.
116. **Matsubara,T. and M.Ziff.** Superoxide anion release by human endothelial cells: synergism between a phorbol ester and a calcium ionophore. *J.Cell Physiol.* 127: 207-210, 1986.
117. **Mayhan,W.G.** Impairment of endothelium-dependent dilatation of basilar artery during chronic hypertension. *Am.J.Physiol.* 259: H1455-H1462, 1990.
118. **McCord,J.M. and I.Fridovich.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J.Biol.Chem.* 244: 6049-6055, 1969.
119. **McCord,J.M. and I.Fridovich.** The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J.Biol.Chem.* 245: 1374-1377, 1970.
120. **McCord,J.M. and I.Fridovich.** Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic.Biol.Med.* 5: 363-369, 1988.
121. **McCormack,T. and K.McCormack.** Shaker K<sup>+</sup> channel beta subunits belong to an NAD(P)H-dependent oxidoreductase superfamily. *Cell* 79: 1133-1135, 1994.

122. **Mehrke,G., U.Pohl, and J.Daut.** Effects of vasoactive agonists on the membrane potential of cultured bovine aortic and guinea-pig coronary endothelium. *J.Physiol.Lond.* 439: 277-299, 1991.
123. **Mehrke,G., U.Pohl, and J.Daut.** Effects of vasoactive agonists on the membrane potential of cultured bovine aortic and guinea-pig coronary endothelium. *J.Physiol.Lond.* 439: 277-299, 1991.
124. **Michiels,C., T.Arnould, A.Houbion, and J.Remacle.** Human umbilical vein endothelial cells submitted to hypoxia-reoxygenation in vitro: implication of free radicals, xanthine oxidase, and energy deficiency. *J.Cell Physiol.* 153: 53-61, 1992.
125. **Minkenbergl,I. and E.Ferber.** Lucigenin-dependent chemiluminescence as a new assay for NAD(P)H-oxidase activity in particulate fractions of human polymorphonuclear leukocytes. *J.Immunol.Methods* 71: 61-67, 1984.
126. **Mohazzab,H.K., P.M.Kaminski, and M.S.Wolin.** Lactate and PO<sub>2</sub> modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase. *Circulation* 96: 614-620, 1997.
127. **Morel,F., J.Doussiere, and P.V.Vignais.** The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur.J.Biochem.* 201: 523-546, 1991.
128. **Muimo,R., S.J.Banner, L.J.Marshall, and A.Mehta.** Nucleoside diphosphate kinase and Cl(-)-sensitive protein phosphorylation in apical membranes from ovine airway epithelium. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 18: 270-278, 1998.
129. **Mügge,A., R.P.Brandes, R.H.Boger, A.Dwenger, B.S.Bode, S.Kienke, J.C.Frolich, and P.R.Lichtlen.** Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 24: 994-998, 1994.

130. **Mügge,A., J.H.Elwell, T.E.Peterson, and D.G.Harrison.** Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am.J.Physiol.* 260: C219-C225, 1991.
131. **Mügge,A., J.H.Elwell, T.E.Peterson, T.G.Hofmeyer, D.D.Heistad, and D.G.Harrison.** Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ.Res.* 69: 1293-1300, 1991.
132. **Münzel,T. and D.G.Harrison.** Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J.Mol.Med.* 75: 891-900, 1997.
133. **Münzel,T., H.Sayegh, B.A.Freeman, M.M.Tarpey, and D.G.Harrison.** Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J.Clin.Invest.* 95: 187-194, 1995.
134. **Nielsen,L.B.** Atherogenicity of lipoprotein(a) and oxidized low density lipoprotein: insight from in vivo studies of arterial wall influx, degradation and efflux. *Atherosclerosis* 143: 229-243, 1999.
135. **Nilius,B., F.Viana, and G.Droogmans.** Ion channels in vascular endothelium. *Annu.Rev.Physiol.* 59: 145-170, 1997.
136. **Nineham.** The chemistry of formazans and tetrazolium salts peroxynitrite. In: Anonymous 1954,
137. **Ohara,Y., T.E.Peterson, and D.G.Harrison.** Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J.Clin.Invest.* 91: 2546-2551, 1993.

138. **Olesen,S.P. and M.Bundgaard.** Chloride-selective channels of large conductance in bovine aortic endothelial cells. *Acta Physiol.Scand.* 144: 191-198, 1992.
139. **Paler,M.A., P.C.Panus, P.H.Chumley, U.Ryan, M.M.Hardy, and B.A.Freeman.** Endogenous xanthine oxidase does not significantly contribute to vascular endothelial production of reactive oxygen species. *Arch.Biochem.Biophys.* 311: 79-85, 1994.
140. **Partridge,C.A., F.A.Blumenstock, and A.B.Malik.** Pulmonary microvascular endothelial cells constitutively release xanthine oxidase. *Arch.Biochem.Biophys.* 294: 184-187, 1992.
141. **Patterson,C., J.Ruef, N.R.Madamanchi, L.P.Barry, Z.Hu, C.Horaist, C.A.Ballinger, A.R.Brasier, C.Bode, and M.S.Runge.** Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 274: 19814-19822, 1999.
142. **Pieper,G.M. and G.J.Gross.** EMD 52692 (bimakalim), a new potassium channel opener, attenuates luminol-enhanced chemiluminescence and superoxide anion radical formation by zymosan-activated polymorphonuclear leukocytes. *Immunopharmacology* 23: 191-197, 1992.
143. **Pohl,U., C.De-Wit, and T.Gloe.** Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. *Acta Physiol.Scand.* 168: 505-510, 2000.
144. **Pohl,U. and D.Lamontagne.** Impaired tissue perfusion after inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Basic.Res.Cardiol.* 86 Suppl 2: 97-105, 1991.

145. **Pou,S., W.S.Pou, D.S.Bredt, S.H.Snyder, and G.M.Rosen.** Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem.* 267: 24173-24176, 1992.
146. **Pritchard-KA,J., L.Groszek, D.M.Smalley, W.C.Sessa, M.Wu, P.Villalon, M.S.Wolin, and M.B.Stemerman.** Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 77: 510-518, 1995.
147. **Pronai,L., H.Nakazawa, K.Ichimori, Y.Saigusa, T.Ohkubo, K.Hiramatsu, S.Arimori, and J.Feher.** Time course of superoxide generation by leukocytes--the MCLA chemiluminescence system. *Inflammation* 16: 437-450, 1992.
148. **Rajagopalan,S., S.Kurz, T.Munzel, M.Tarpey, B.A.Freeman, K.K.Griendling, and D.G.Harrison.** 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.* 97: 1916-1923, 1996.
149. **Rees,D.D., R.M.Palmer, and S.Moncada.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86: 3375-3378, 1989.
150. **Rodenas,J., M.T.Mitjavila, and T.Carbonell.** Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. *Am.J.Physiol.* 274: C827-C8301998.
151. **Rodriguez,M.L., J.Angulo, C.Peiro, J.L.Llergo, F.A.Sanchez, D.P.Lopez, and F.C.Sanchez.** Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br.J.Pharmacol.* 123: 1495-1502, 1998.
152. **Rosen,G.M. and B.A.Freeman.** Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81: 7269-7273, 1984.

153. **Royer,P.B., L.M.Kunkel, A.P.Monaco, S.C.Goff, P.E.Newburger, R.L.Baehner, F.S.Cole, J.T.Curnutte, and S.H.Orkin.** Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322: 32-38, 1986.
154. **Rubanyi,G.M. and P.M.Vanhoutte.** Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am.J.Physiol.* 250: H822-H827,1986.
155. **Russo,C., O.Olivieri, D.Girelli, G.Faccini, M.L.Zenari, S.Lombardi, and R.Corrocher.** Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J.Hypertens.* 16: 1267-1271, 1998.
156. **Sanders,S.A., R.Eisenthal, and R.Harrison.** NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *Eur.J.Biochem.* 245: 541-548, 1997.
157. **Sathyamoorthy,M., M.de, I, A.G.Adams, and T.L.Leto.** p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J.Biol.Chem.* 272: 9141-9146, 1997.
158. **Satriano,J.A., M.Shuldiner, K.Hora, Y.Xing, Z.Shan, and D.Schlondorff.** Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J.Clin.Invest.* 92: 1564-1571, 1993.
159. **Saulnier,S.O., D.Steinhoff, M.C.Dinauer, R.Zufferey, D.Trono, R.A.Seger, and J.P.Hossle.** Lentivirus-mediated gene transfer of gp91phox corrects chronic granulomatous disease (CGD)



phenotype in human X-CGD cells [In Process Citation]. *J.Gene Med.*2000.Sep.-Oct.;2.(5.):317-25. 2: 317-325,

160. **Schilling,W.P., L.Rajan, and J.E.Strobl.** Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. Saturability, selectivity, and kinetics. *J.Biol.Chem.* 264: 12838-12848, 1989.
161. **Schnackenberg,C.G., W.J.Welch, and C.S.Wilcox.** Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 32: 59-64, 1998.
162. **Schoenberg,M.H. and H.G.Beger.** Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit.Care Med.* 21: 1376-1386, 1993.
163. **Segal,B.H., T.L.Leto, J.I.Gallin, H.L.Malech, and S.M.Holland.** Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore.)* 2000.May.;79.(3.):170-200. 79: 170-200,
164. **Sehr,P., G.Joseph, H.Genth, I.Just, E.Pick, and K.Aktories.** Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* 37: 5296-5304, 1998.
165. **Sessa,W.C., M.Hecker, J.A.Mitchell, and J.R.Vane.** The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: L-glutamine inhibits the generation of L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 8607-8611, 1990.
166. **Simchowitz,L., I.Spilberg, and J.P.Atkinson.** Superoxide generation and granule enzyme release induced by ionophore A23187. Studies on

the early events of neutrophil activation. *J.Lab.Clin.Med.* 96: 408-424, 1980.

167. **Sohn,H.Y., M.Keller, T.Gloe, P.Crause, and U.Pohl.** Pitfalls of using lucigenin in endothelial cells: implications for NAD(P)H dependent superoxide formation. *Free Radic.Res.2000.Mar.;32.(3.):265-72.* 32: 265-272,
168. **Sohn,H.Y., M.Keller, T.Gloe, H.Morawietz, U.Rueckschloss, and U.Pohl.** The small G-Protein Rac mediates depolarization induced superoxide formation in human endothelial Cells. *J.Biol.Chem.2000.Apr.;275,25:18745-18750:*
169. **Sohn,H.Y., U.Raff, A.Hoffmann, T.Gloe, K.Heermeier, J.Galle, and U.Pohl.** Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br.J.Pharmacol. 2000. Oct.; 131.(4.) :667.-72.* 131: 667-672,
170. **Souza,H.P., L.C.Souza, V.M.Anastacio, A.C.Pereira, M.L.Junqueira, J.E.Krieger, P.L.da Luz, O.Augusto, and F.R.Laurindo.** Vascular oxidant stress early after balloon injury: evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic.Biol.Med.2000.Apr.15.;28.(8.):1232.-42.* 28: 1232-1242, 200.
171. **Steinbrecher,U.P.** Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 959: 20-30, 1988.
172. **Stewart,D.J., U.Pohl, and E.Bassenge.** Free radicals inhibit endothelium-dependent dilation in the coronary resistance bed. *Am.J.Physiol.* 255: H765-H769,1988.
173. **Stroes,E., M.Hijmering, M.van-Zandvoort, R.Weaver, T.J.Rabelink, and E.E.van-Faassen.** Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 438: 161-164, 1998.

174. **Sutherland,M.W. and B.A.Learmonth.** The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radic.Res.* 27: 283-289, 1997.
175. **Taddei,S., A.Virdis, L.Ghiadoni, A.Magagna, and A.Salvetti.** Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 97: 2222-2229, 1998.
176. **Takeda,K., V.Schini, and H.Stoeckel.** Voltage-activated potassium, but not calcium currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch.* 410: 385-393, 1987.
177. **Takeya,M., T.Yoshimura, E.J.Leonard, and K.Takahashi.** Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum.Pathol.* 24: 534-539, 1993.
178. **Tarpey,M.M. and I.Fridovich.** Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ.Res.* 89: 224-236, 2001.
179. **Tarpey,M.M., C.R.White, E.Suarez, G.Richardson, R.Radi, and B.A.Freeman.** Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ.Res.* 84: 1203-1211, 1999.
180. **Terada,L.S., D.M.Guidot, J.A.Leff, I.R.Willingham, M.E.Hanley, D.Piermattei, and J.E.Repine.** Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3362-3366, 1992.
181. **Thannickal,V.J., K.D.Aldweib, and B.L.Fanburg.** Tyrosine phosphorylation regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in lung fibroblasts

stimulated by transforming growth factor beta1. *J.Biol.Chem.* 273: 23611-23615, 1998.

182. **Tousson,A., B.A.Van-Tine, A.P.Naren, G.M.Shaw, and L.M.Schwiebert.** Characterization of CFTR expression and chloride channel activity in human endothelia. *Am.J.Physiol.* 275: C1555-C1564 1998.
183. **Tsao,P.S., J.Niebauer, R.Buitrago, P.S.Lin, B.Y.Wang, J.P.Cooke, Y.D.Chen, and G.M.Reaven.** Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. *Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol.* 18: 947-953, 1998.
184. **Tschudi,M.R., S.Mesaros, T.F.Luscher, and T.Malinski.** Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 27: 32-35, 1996.
185. **Turrens,J.F. and A.Boveris.** Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem.J.* 191: 421-427, 1980.
186. **Uehara,K., N.Maruyama, C.K.Huang, and M.Nakano.** The first application of a chemiluminescence probe, 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one (MCLA), for detecting O<sub>2</sub>- production, in vitro, from Kupffer cells stimulated by phorbol myristate acetate. *FEBS Lett.* 335: 167-170, 1993.
187. **van-Iwaarden,P.R., A.J.Driessen, and W.N.Konings.** What we can learn from the effects of thiol reagents on transport proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1113: 161-170, 1992.
188. **Vargas,F.F., P.F.Caviedes, and D.S.Grant.** Electrophysiological characteristics of cultured human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc.Res.* 47: 153-165, 1994.

189. **Vasquez,V.J., N.Hogg, J.Pritchard-KA, P.Martasek, and B.Kalyanaraman.** Superoxide anion formation from lucigenin: an electron spin resonance spin-trapping study. *FEBS Lett.* 403: 127-130, 1997.
190. **Vita,J.A., C.B.Treasure, E.G.Nabel, J.M.McLenachan, R.D.Fish, A.C.Yeung, V.I.Vekshtein, A.P.Selwyn, and P.Ganz.** Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 81: 491-497, 1990.
191. **Wever,R.M.F., T.van-Dam, H.J.van-Rijn, F.de-Groot, and T.J.Rabelink.** Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 237: 340-344, 1997.
192. **Whitin,J.C., C.E.Chapman, E.R.Simons, M.E.Chovaniec, and H.J.Cohen.** Correlation between membrane potential changes and superoxide production in human granulocytes stimulated by phorbol myristate acetate. Evidence for defective activation in chronic granulomatous disease. *J.Biol.Chem.* 255: 1874-1878, 1980.
193. **Wolin,M.S.** Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation.* 3: 1-17, 1996.
194. **Yeh,L.H., Y.J.Park, R.J.Hansalia, I.S.Ahmed, S.S.Deshpande, C.P.Goldschmidt, K.Irani, and B.R.Alevriadou.** Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS. *Am.J.Physiol.* 276: C838-C847, 1999.
195. **Yla-Herttuala,S.** Oxidized LDL and atherogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 874: 134-137, 1999.
196. **Yokoyama,M., N.Inoue, and S.Kawashima.** Role of the vascular NADH / NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2000.May.;902.:241.-7.; 902:241-7; 241-247, 2000.

197. **Zalba,G., F.J.Beaumont, G.San Jose, A.Fortuno, M.A.Fortuno, J.C.Etayo, and J.Diez.** Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000.May.;35.(5.):1055.-61. 35: 1055-1061,
198. **Zimmermann,P.A., H.J.Knot, A.S.Stevenson, and M.T.Nelson.** Increased myogenic tone and diminished responsiveness to ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers in cerebral arteries from diabetic rats. *Circ.Res.* 81: 996-1004, 1997.
199. **Zweier,J.L., P.Kuppusamy, and G.A.Lutty.** Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85: 4046-4050, 1988.

## Lebenslauf

Matthias Keller Heißstrasse 44, 80798 München

**Geburtstag** 30. März 1974

**Geburtsort** Ludwigshafen am Rhein

**Eltern :**

Gerhard Keller leitender Angestellter

Christel Keller Hausfrau und Mutter

**Ehestand** verheiratet

**Ausbildung** 1980 – 1984 Grundschule Mutterstadt  
1984 – 1993 Humanistisches Theodor – Heuss  
Gymnasium, Ludwigshafen  
1993 Abitur

**Zivildienst** 01/09/1993 - 30/11/93 Station für Brandverletzte der  
Berufsgenossenschaftlichen  
Unfallklinik, Ludwigshafen

**Studium** 01/04/1994 - 30/10/1998 Studium der Humanmedizin an  
Johannes – Gutenberg  
Universität Mainz  
01/11/1998 Wechsel an die Ludwig –  
Maximilians - Universität München

März 1997 Ärztliche Vorprüfung  
März 1998 Erstes Staatsexamen  
September 2000 Zweites Staatsexamen  
November 2001 Drittes Staatsexamen

**Promotion** April 1997 Beginn der experimentellen Phase  
der Promotionsarbeit am Institut für  
Physiologie und  
Pathophysiologie der Johannes -  
Gutenberg Universität Mainz, unter  
Leitung von Prof. Dr. med. U. Pohl  
November 1999 Wechsel an das Institut für  
Physiologie, Lehrstuhl für Vegetative  
Physiologie Prof. Dr. med. U. Pohl  
der Ludwig - Maximilians -  
Universität

## Publikationen Matthias Keller

Teile dieser Promotion wurden in folgenden Zeitschriften publiziert :

Sohn HY, Keller M, Gloe T, Morawietz H, Rueckschloss U and Pohl U.  
The small G-Protein Rac mediates depolarization induced superoxide formation in human endothelial cells  
*J. Biol. Chem.* 2000 Apr 10,275(25):18745-18750

Sohn HY, Keller M, Gloe T, Crause P, Pohl U  
Pitfalls of using lucigenin in endothelial cells: implications for NAD(P)H dependent superoxide formation  
*Free Radic Res.*2000 Mar,32(3):265-72

Sohn HY , Gloe T, Keller M, Schoenafinger K, Pohl U  
Sensitive superoxide detection in vascular cells by the new chemiluminescence-dye L-012  
*J Vasc. Res* 36: 456-64, 1999

### Poster und Vorträge :

Sohn HY, Keller M, Gloe T, Pohl U.  
Changes of membrane potential modulate endothelial superoxide production.  
*FASEB-Journal.* [print] March 15, 2000; 14 (4): A410.  
Annual Meeting of Professional Research Scientists: Experimental Biology 2000, San Diego, California, USA, April 15-18, 2000

Sohn HY, Keller M, Gloe T Crause P, Pohl  
Lucigenin steigert unspezifisch die NAD(P) – abhängige Superoxidanionen Produktion in Lysaten von humanen Endothelzellen.  
*Z. Kardiol.* 88 ( Suppl.1 ) : 21 V298 (1999 )



Sohn HY, Keller M, Gloe T, Pohl U.

Der Tyrosinphosphatase Inhibitor Vanadat potenziert die Protein Kinase C induzierte Superoxidanionenproduktion in humanen Endothelzellen

*Z. Kardiol. 88 ( Suppl.1 ) : 21 V299 (1999 )*

Sohn HY, Keller M, Gloe T, Pohl U.

Kalium induzierte Membrandepolarisation steigert die Superoxidanionenproduktion in humanen Endothelzellen

*Z. Kardiol. 87 ( Suppl.1 ) : 105 V485 (1998 )*

Sohn HY, Keller M, Gloe T, Pohl U.

The tyrosine phosphatase inhibitor vanadate potentiates protein kinase C induced superoxide formation in human endothelial cells

*Eur. J. Physiol. 437 (Suppl. 5 ) R 163 P 31 – 6 (1999)*

Sohn HY, Keller M, Gloe T, Crause P, Pohl U.

Lucigenin causes artificial superoxide formation in endothelial cells

*Eur. J. Physiol. 437 (Suppl. 5 ) R 160 P 30 – 6 (1999)*

Sohn HY, Keller-M, Gloe , Pohl U.

The tyrosine phosphatase inhibitor vanadate potentiates protein kinase C induced superoxide formation in human endothelial cells.

*Eur. J. Physiol. 437 (Suppl. 5 ) R 163 P 31 – 6 (1999)*

## Danksagung

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. med. U. Pohl für die Überlassung des Themas, aber vor allem für die hervorragende fachliche Anleitung und überaus wertvollen Diskussionen. So wurde meine Ausbildung sowohl durch seine fachliche Beratung, als auch persönliche Betreuung in entscheidender Weise geprägt.

Ein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Dr. med. Hae - Young Sohn, der durch sein Engagement und ausgezeichnete persönliche und fachliche Betreuung maßgeblich an dem Entstehen dieser Arbeit beteiligt ist.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich auch bei den anderen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts, Lehrstuhl für Vegetative Physiologie der Ludwig - Maximilians - Universität zu München, die ich im Laufe der Zeit sowohl fachlich als auch menschlich zu schätzen gelernt habe, für ihre stete Hilfsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben und mich darüber hinaus auch in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert haben.

Meiner Frau, die gerade in der letzten Phase dieser Arbeit mit viel Verständnis ein unendlich große Stütze und Rückhalt für mich war und somit auch einen wesentlichen Anteil an dem Entstehen dieser Arbeit hat, gilt ein ebenfalls besonderer Dank.