
Rolle von Cytochrom P450-Metaboliten bei der EDHF-vermittelten Dilatation von Widerstandsarterien und Effekte von chronisch erhöhtem Perfusionsdruck auf glattmuskuläre und endotheliale Funktionen

Susanne Pieperhoff

München 2005

Rolle von Cytochrom P450-Metaboliten bei der EDHF-vermittelten Dilatation von Widerstandsarterien und Effekte von chronisch erhöhtem Perfusionsdruck auf glattmuskuläre und endotheliale Funktionen

Susanne Pieperhoff

Dissertation
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Susanne Pieperhoff
aus Aachen

München, den 30.11.2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Pohl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schad

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Näßauer

Priv. Doz. Dr. U. Walther

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. St.-S. Bolz

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhard

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Fragestellung	9
1.2. Ziele	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Präparation von Widerstandsarterien und Messaufbau	11
2.2. Chronische Perfusion der Widerstandsarterien	12
2.3. Transfektion mit Antisense-Oligonucleotiden	13
2.3.1. RNA-Isolierung und rtPCR	13
2.3.2. Struktur der Antisense-Oligonucleotide	15
2.3.3. Kontrollexperimente	15
2.3.4. Transfektion des Endothels von Widerstandsarterien	15
2.4. Calciummessung mit Fura-2	16
2.4.1. Funktionsprinzip	16
2.4.2. Beladung des glatten Muskels oder des Endothels mit Fura-2	18
2.5. Außendurchmesserbestimmung	19
2.6. Konfokale Mikroskopie	20
2.7. Rasterelektronenmikroskopie (REM)	22
2.7.1. Funktionsprinzip	22
2.7.2. Vorbereitung der Proben	22
2.8. Lösungen und Chemikalien	24
2.8.1. Pufferlösungen	24
2.8.2. Kulturmedium	26
2.8.3. Transfektionslösung	27
2.8.4. Inkubationslösung zur Calciummessung	27
2.8.5. Agonisten und Hemmstoffe	28
2.8.6. Lösungen für die Rasterelektronenmikroskopie	29
2.9. Versuchsprotokolle	29
2.9.1. Präparation und Zuteilung zu den Versuchsgruppen	29
2.9.2. Stimulation der Widerstandsarterien	29
2.9.3. Spontantonus	30
2.9.4. Myogene Reaktion	30
2.9.5. NA-induzierte Kontraktion und ACh-Dosiswirkungskurven	30
2.9.6. SNP- und NS1619-Dosiswirkungskurven	31
2.9.7. Untersuchung der Calciumsensitivität des Kontraktionsvorganges	31
2.9.8. Hemmstoffe	32
2.10. Statistik	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Funktioneller Vergleich frisch isolierter und chronisch perfundierter Arterien	34
3.1.1. Glattmuskuläre Funktionen	34
3.1.2. Endothelfunktionen	37

3.2. Effekte der Transfektion mit Antisense-Oligonucleotiden gegen CYP450	41
3.2.1. Expression von CYP2C in der Aorta und der A. gracilis	41
3.2.2. Lokalisation der Oligonucleotide in der Arterienwand/ Transfektions-effizienz	42
3.2.3. NA-induzierte Kontraktion	43
3.2.4. EDHF-vermittelte Dilatation	44
3.2.5. SNP-induzierte Dilatation	45
3.2.6. Endothelialer Calciumanstieg	45
3.3. Effekte von chronisch erhöhtem transmuralen Druck	46
3.3.1. Morphologische Untersuchungen	46
3.3.2. Basalwerte	47
3.3.3. NA-induzierte Kontraktion	48
3.3.4. Calciumsensitivität der Myofilamente	48
3.3.5. Endothelabhängige Dilatation	49
3.3.6. NS1619-induzierte Dilatation	50
3.3.7. SNP-induzierte Dilatation	51
3.3.8. Calciummessung im Endothel	51
4. Diskussion	52
5. Zusammenfassung	60
6. Anhang	63
6.1. Abkürzungen	63
6.2. Gerätebezeichnungen und Bezugsquellen	64
6.2.1. Technische Geräte	64
6.2.2. Chemikalien und Medikamente	66
6.2.3. Sonstiges	67
6.3. Berechnungen	67
6.3.1. Berechnung der Wandschubspannung	67
6.3.2. Berechnung der Änderung des transmuralen Druckes unter Perfusion	68
6.3.3. Berechnung der Fluoreszenzratio	68
7. Literatur	69
8. Danksagung	79
9. Lebenslauf	80

1. Einleitung

Die lokale Anpassung der Durchblutung an den Gewebsbedarf erfolgt vorwiegend durch Metabolite und lokal produzierte Autakoide. Solche Autakoide werden vorwiegend im Endothel produziert.

Es wurde 1980 durch Furchgott und Zawadzki erstmals gezeigt, dass das Endothel eine wesentliche Rolle bei der Gefäßdilatation durch Acetylcholin spielt [23].

Endothelzellen kleiden das Lumen von Arterien aus und haben vielfältige Aufgaben. Sie produzieren antithrombogene Faktoren (Adenosin, PGI₂ und NO) und verhindern durch Hemmung der Adhäsion von Thrombozyten und deren Aggregation an der Endotheloberfläche eines intakten Gefäßes den Verschluss des Lumens durch spontane intravasale Gerinnung. Zusätzlich können sie den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen in der Media durch Produktion von verschiedenen Autakoiden modulieren. Es gibt u. a. Indizien dafür, dass in der Umgebung von motorischen Endplatten von Skelettmuskelfasern bei Arbeit die ACh-Konzentration ansteigt und zur Dilatation benachbarter Arterien beiträgt, was einen schnellen Mechanismus zur Anpassung der Leitfähigkeit dieser Gefäße bei Mehrbedarf an Durchblutung darstellen dürfte. Neben ACh können auch Bradykinin, Substanz P sowie verschiedene mechanische Stimuli (z.B. erhöhte Wandschubspannung) eine endothelvermittelte Dilatation kleiner Arterien und Arteriolen durch Freisetzung verschiedener endothelialer Autakoide auslösen [44].

Zunächst war der Mechanismus, mit dem ACh eine Vasodilatation auslöst, unbekannt. Man postulierte jedoch einen Faktor, der vom Endothel synthetisiert wurde und am glatten Gefäßmuskel relaxierend wirkte. Dieser Faktor wurde daher als „endothelium-derived relaxing factor“ bezeichnet (= EDRF, engl. für: aus dem Endothel stammender relaxierender Faktor). EDRF wurde 1987 von Palmer et al. [55], sowie von Ignarro et al. [36] und von Furchgott et al. [24] als Stickstoffmonoxyd (NO) identifiziert. NO wird im Endothel durch die konstitutive NO-Synthase (ecNOS) aus L-Arginin gebildet, aktiviert im glatten Muskel die lösliche Guanylatcyclase und bewirkt so einen Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels [28, 62]. cGMP stimuliert cGMP-abhängige Proteinkinasen, die durch verschiedene Mechanismen den glattmuskulären Tonus reduzieren. Die IP₃-vermittelte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Ca²⁺-

Speichern wird verringert, da cGMP-abhängige Proteinkinasen die Aktivierbarkeit des IP₃-Rezeptors verringern und die Phospholipase C inhibieren [50]. Außerdem wird Phospholamban phosphoryliert, das an der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, daraus resultiert eine vermehrte Sequestrierung von cytoplasmatischem Ca²⁺ in die intrazellulären Calciumspeicher durch Disinhibition von Calcium-ATPasen (Serca 2) an der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums [50, 48]. Zusätzlich verringern cGMP-abhängige Proteinkinasen den Calciumeinstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle durch Aktivierung von K_{Ca}-Kanälen, wodurch der glatte Muskel hyperpolarisiert wird [50].

Abgesehen von der Senkung des intrazellulären Calciums desensitiviert cGMP den Kontraktionsvorgang für Calcium [75], indem es die Aktivität der Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) erhöht, die den Phosphorylierungsgrad der Myosinleichtketten reduziert. Das Ausmaß der Kontraktion resultiert aus der Balance zwischen der Aktivität der MLCP und der Aktivität der Myosinleichtkettenkinase (MLCK), die beide calciumabhängig reguliert werden. Da NO die Guanylatcyclase aktiviert, könnte bei der NO-vermittelten Dilatation neben der Verringerung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration die Desensitivierung des Kontraktionsvorgangs für Calcium eine Rolle spielen.

Neben NO kann der glattmuskuläre Tonus auch durch Prostaglandine moduliert werden. Dabei spielt Prostacyclin (= Prostaglandin I₂, PGI₂) eine wichtige Rolle. PG_{I2} stimuliert die Adenylatcyclase und erhöht so den cAMP-Spiegel in den glatten Muskelzellen [33]. Daraus resultiert ebenfalls sowohl eine Verringerung der Calciumsensitivität des Kontraktionsvorganges [48] als auch der intrazellulären Calciumkonzentration. Zusätzlich hyperpolarisiert PG_{I2} glatte Muskelzellen durch Aktivierung ATP-abhängiger Kaliumkanäle (K_{ATP}) [37]. Die Aktivität der spannungsabhängigen Calciumkanäle wird auf diese Weise herabgesetzt und es resultiert ebenfalls ein Calciumabfall.

Nach suffizienter Inhibition der NO- und PG_{I2}-Synthese persistiert jedoch eine Komponente der Dilatation, die in Widerstandsarterien ausgeprägter ist als in großen Leitungsarterien [25]. Grund für die Annahme, dass diese Dilatationskomponente nicht durch NO vermittelt wird, sind die von NO und PG_{I2} unterschiedlichen intrazellulären Signaltransduktionswege. In kleinen Arterien und Arteriolen, in denen diese Dilatation am ausgeprägtesten ist, wird die NO-vermittelte Dilatation zum größten Teil durch

cGMP-abhängige Desensitivierung des Kontraktionsvorgangs für Calcium vermittelt [4, 75], die unter diesen Bedingungen ohne eine Hyperpolarisation erfolgt [66]. Im Gegensatz dazu wird die Relaxation bei der oben beschriebenen NO- und PGI₂-unabhängigen Dilatation durch einen Calciumabfall in der glatten Muskulatur hervorgerufen, der aus einer Hyperpolarisation resultiert. Diese Hyperpolarisation erfolgt durch Aktivierung von Kaliumkanälen, da gezeigt werden konnte, dass diese Antworten durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie durch verschiedene Kaliumkanalblocker (s. u.) aufgehoben werden können.

Obwohl PGI₂ in einigen Präparationen ebenfalls durch Hyperpolarisation des glatten Muskels dilatierend wirkt, kann es nicht für die EDHF-vermittelten Dilatationen verantwortlich sein, da diese auch nach effektiver Inhibition der Cyclooxygenase erfolgen.

Aufgrund dieser Befunde wurde 1988 von Taylor und Weston [67] sowie von Vanhoutte [70] die Existenz eines weiteren, eigenständigen Vasodilatators, des endothelium-derived hyperpolarizing factors (engl. für: aus dem Endothel stammender hyperpolarisierender Faktor, EDHF), postuliert.

Der Anteil der verschiedenen Autakoide an der endothelvermittelten Dilatation variiert entlang des Gefäßbaumes. So wird in großen Leitungsarterien die endothelvermittelte Dilatation hauptsächlich durch NO mediert, während die EDHF-vermittelte nur eine untergeordnete Rolle spielt. Im Verlauf der Gefäße nimmt der EDHF-vermittelte Anteil der Dilatation nach distal zu, während der NO-mediierte abnimmt [63]. Daher ist EDHF in größerem Maße als NO an der Durchblutungsregulation der Widerstandsarterien beteiligt.

Durch Studien mit verschiedenen pharmakologischen Kaliumkanalblockern konnte gezeigt werden, dass in unterschiedlichen Arterientypen verschiedener Spezies unterschiedliche Kaliumkanäle bei der EDHF-vermittelten Dilatation eine Rolle spielen.

In Mesenterialarterien von Kaninchen konnte die EDHF-vermittelten Dilatationen durch Apamin blockiert werden [53], das selektiv für SK_{Ca}-Kanäle (small conductance calcium-activated K⁺-channels) ist.

In einigen anderen Studien und in vorherigen Studien in diesem Labor wurden die BK_{Ca} (large conductance calcium-activated K⁺-channels) [4, 13] mit Hilfe ihres Blockers Charybdotoxin als die Kaliumkanäle identifiziert, die für die EDHF-vermittelte

Hyperpolarisation verantwortlich sind. Andere Studien wiederum beschreiben die Beteiligung von K_{ir} (voltage dependent inward rectifier K^+ channels) [41], die durch Ba^{2+} blockiert werden können oder die mögliche Beteiligung von K_{DR} (voltage-dependent delayed rectifier K^+ channels) [22, 71], die durch 4-Aminopyridin blockiert werden können. Die Frage, ob die Kaliumkanäle im Endothel, im glatten Muskel oder in beiden Zelltypen aktiviert werden, bleibt Gegenstand der Diskussion.

Die chemische Natur des EDHF oder der EDHFs ist noch nicht eindeutig identifiziert, es gibt aber einige z. T. widersprüchliche Befunde, die verschiedene Fragen aufwerfen:

Wird die Hyperpolarisation und die Dilatation der Arterien, die weder NO- noch Prostaglandin-abhängig erfolgt, durch einen diffusiblen Faktor, der im Endothel produziert und freigesetzt wird, ausgelöst oder wird die Hyperpolarisation des Endothels elektrotonisch über myoendotheliale Gap Junctions an die glatten Muskelzellen weitergegeben?

Für eine elektrotonische Weiterleitung über Gap Junctions spricht, dass die nach Blockade der NO-Synthase verbleibenden Dilatationen in der Aorta und der A. mesenterica superior von Kaninchen durch ein spezifisches Gap Junction blockierendes Peptid vollständig aufgehoben bzw. stark abgeschwächt werden konnten [7, 60]. Zusätzlich konnte in der Mikrozirkulation der Backentasche des Hamsters gezeigt werden, dass eine endotheliale Hyperpolarisation in den glatten Muskel übertragen wurde und diese nach Entkopplung der Gap Junctions vollständig erloschen war [3, 60]. Für die Hypothese, dass ein diffusibler Faktor im Endothel gebildet und freigesetzt wird und die glatte Muskulatur der Arterie hyperpolarisiert, sprechen verschiedene Befunde aus Bioassayexperimenten. In diesen konnte eine Hyperpolarisation des glatten Muskels einer Arterie, deren Endothel entfernt wurde, nur dann registriert werden, wenn sich zusätzlich eine Arterie mit intaktem Endothel im gleichen Organbad befand [8]. In weiteren Bioassayexperimenten konnte die Hyperpolarisation in kultivierten oder frisch isolierten glatten Muskelzellen nur detektiert werden, wenn sie mit dem Effluat aus einer Coronararterie, die mit Bradykinin stimuliert wurde, superfundiert wurden [56].

Als Kandidaten für einen diffusiblen Faktor gelten endogene Cannabinoidrezeptoragonisten, da z.B. Anandamid (Arachidonylethanolaminamid) isolierte Mesenterialarterien dilatieren kann [30] und diese Dilatation durch den Cannabinoid CB₁-Rezeptorantagonisten SR141716A sowie durch erhöhtes

extrazelluläres Kalium inhibiert werden konnte [58]. Daher könnte der Anandamid-induzierten Vasodilatation ebenfalls eine Hyperpolarisation zu Grunde liegen. Andererseits könnte Anandamid aber auch Arachidonsäure oder deren Metabolite freisetzen und so indirekt dilatierend wirken.

Ein weiterer Kandidat für EDHF ist Kalium, da gezeigt werden konnte, dass Cerebral- [41] und Leberarterien [18] der Ratte nach Stimulation mit moderat erhöhtem extrazellulärem Kalium (10-15 mM) Endothel-unabhängig durch Aktivierung von K_{ir} im glatten Muskel dilatierten. Zusätzlich zeigten Edwards et al. [18], dass der K_{Ca} -Kanalöffner 1-EBIO in intakten Leberarterien die EDHF-vermittelten Antworten zu imitieren vermochte und die 1-EBIO-vermittelten Hyperpolarisationen und Dilatationen ebenso wie die ACh-vermittelten nach Deendothelialisierung oder Inkubation mit Charybdotoxin aufgehoben waren. Aufgrund dieser Befunde stellten Edwards et al. [17, 18] die Hypothese auf, dass bei Stimulation von Leberarterien der Ratte mit ACh das Endothel durch Aktivierung von K_{Ca} hyperpolarisiert wird, da die EDHF-vermittelten Dilatationen durch Charybdotoxin und Apamin inhibiert wurden. Durch die Aktivierung der Kaliumkanäle am Endothel steigt die Kaliumkonzentration im Interstitium zwischen Endothel und glatten Muskelzellen, im glatten Muskel werden K_{ir} und die Na^+-K^+ -ATPase aktiviert und infolgedessen eine Hyperpolarisation und Dilatation ausgelöst.

Im Gegensatz dazu zeigten Doughty et al. [14], dass nur wenige der untersuchten Seitenäste der A. mesenterica superior (Ratte) nach Stimulation durch moderat erhöhtes Kalium dilatierten.

Schweinekoronararterien und Aa. carotides von Meerschweinchen zeigten nach einer solchen Stimulation keine Dilatation [57]. In beiden Präparationen hatte Ba^{2+} keinen Einfluss auf die ACh-vermittelte Dilatation.

Daher scheint der von Edwards et al. postulierte Mechanismus nicht auf die oben genannten Arterien übertragbar zu sein.

Pharmakologische Hemmstoffe der Cytochrom P450 (CYP450) -Epoxygenasen (Barbiturate, Ketoconazol und verwandte Fungizide sowie 17-Octadecynsäure (17-ODYA)) können in vielen Arterientypen die NO- und Prostaglandin-unabhängige Dilatation inhibieren [5, 9, 76].

Könnte EDHF in diesen Arterien ein Produkt der CYP450-Epoxygenasen sein?

Dafür spricht, dass verschiedene Produkte von CYP450-Epoxygenasen, Hydroxyeicosatriensäuren, Dihydroxyeicosatriensäuren und Epoxyeicosatriensäuren (EETs), verschiedene K^+ -Kanäle in glatten Muskelzellen aktivieren und so die hyperpolarisierende Wirkung von EDHF imitieren können [15, 52, 54, 72]. Zusätzlich konnte für 11,12-EETs gezeigt werden, dass sie Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle im glatten Muskel aktivieren, den glatten Muskel hyperpolarisieren und vorkontrahierte Cerebralarterien dilatieren können, wenn sie von außen appliziert werden [5, 46].

Diese EETs werden durch die CYP450 Isoformen 2C8, 2C9, 1A2 [59] und 2J [74] aus Arachidonsäure synthetisiert, von diesen Isoformen wird allerdings nur 2C8 im Endothel exprimiert [47]. Stellt diese Isoform möglicherweise eine „EDHF-Synthase“ dar?

Pharmakologische Inhibitoren der CYP450-Epoxygenasen blockieren zusätzlich direkt K^+ -Kanäle [16]. Daher ist unklar, ob die pharmakologische Inhibition der EDHF-vermittelten Dilatationen spezifisch ist oder aufgrund dieser Nebenwirkung verursacht wird. Zusätzlich kann auf diese Weise die verantwortliche Isoform von CYP450 nicht identifiziert werden, da diese Inhibitoren alle Isoformen von CYP450 gleichermaßen blockieren. Es sind daher spezifischere Inhibitoren notwendig, um zu untersuchen, ob CYP450-Epoxygenasen Teil der Signalkaskade des EDHF sind und welche Isoformen dabei eine Rolle spielen.

Mit Hilfe der Antisense-Oligonucleotidtransfektion ist es möglich, spezifisch die Biosynthese bestimmter Proteine zu inhibieren und durch deren physiologischen Abbau eine funktionell bedeutsame Verringerung der zellulären Konzentration des betreffenden Proteins zu erreichen. Antisense-Oligonucleotide sind kurze DNA-Stücke, die ihre Wirkung im Cytosol durch Inaktivierung einer komplementären mRNA erzielen. Die genaue Funktionsweise der Oligonucleotide ist noch nicht bekannt, es werden jedoch zwei verschiedene Wirkmechanismen diskutiert. Oligonucleotide, die komplementär zu der Sequenz der mRNA des Proteins sind, dessen Synthese blockiert werden soll (= Antisense-Oligonucleotide), bilden mit der mRNA des Proteins ein DNA-RNA-Hybrid, das von der RNase H bevorzugt abgebaut wird. Daher wird der Gehalt der Zelle an mRNA des Proteins und seine Neusynthese verringert. Als zweiter möglicher Mechanismus wird diskutiert, dass in den Ribosomen die mRNA des Proteins nur bis zu der Stelle, wo das DNA-Oligonucleotid angelagert ist, abgelesen werden kann und so nur unvollständige Proteine entstehen, die keine oder nur eine verringerte Funktion

aufweisen. Solche Antisense-Oligonucleotide können z. B. in isolierten Endothelzellen verwendet werden, die über mehrere Wochen in Kultur gehalten werden können. Sie haben jedoch den Nachteil, dass die Transfektion meist nur partiell gelingt und dass sie üblicherweise aus großen Leitungarterien (z.B. Schweine- oder Rinderaorta) gewonnen werden, bei denen der Anteil des EDHF an der Dilatation nur sehr gering ist. Zusätzlich verlieren sie innerhalb von wenigen Stunden ihren ACh-Rezeptor, so dass in Zellkulturen ACh, der Hauptstimulus für EDHF, nicht verwendet werden kann [68]. Häufig werden Untersuchungen mit Endothelzellen aus Nabelschnurvenen durchgeführt, bei denen unphysiologische Stimuli, wie z. B. β -Naphthoflavon, verwendet werden müssen, um EDHF freizusetzen [56].

Diese Methode war jedoch bisher in isolierten Widerstandsarterien nicht durchführbar, da diese Arterien nur über wenige Stunden funktionell intakt gehalten werden konnten und eine Wirkung aufgrund der Halbwertzeit der Cytochrom P450-Epoxigenasen erst nach einiger Zeit zu erwarten ist.

Eine längere funktionelle Lebenszeit isolierter Arterien wäre auch notwendig, um die Auswirkungen des Risikofaktors Bluthochdruck auf glattmuskuläre und endotheliale Funktionen zu erfassen. Viele Studien wurden bisher mit hypertensiven Tiermodellen durchgeführt, um einzelne Schritte des pathophysiologischen Geschehens der Entstehung von Arteriosklerose besser verstehen zu können. Dabei konnte gezeigt werden, dass die endothelialen Rezeptoren und die NO- und EDHF-vermittelten Dilatationen der Arterien von hypertensiven Tieren im Vergleich zu denen der normotensiven abhängig von den verschiedenen Tiermodellen in unterschiedlichem Ausmaß beeinträchtigt waren.

Die Substanz-P-induzierten Dilatationen waren z. B. in Arterien, die hypertensiven Dahl Ratten [26] oder spontan hypertensiven Ratten (SHR) [34] entnommen wurden, deutlich verringert, während die ACh-induzierten Dilatationen unbeeinflusst blieben. Im Gegensatz dazu zeigten Sunano et al. [65] in SHR eine verringerte ACh-induzierte Dilatation und Hyperpolarisation, dabei waren sowohl die NO- als auch die EDHF-vermittelten Dilatationen eingeschränkt. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der ACh-induzierte Abfall des Perfusionsdruckes in isoliert perfundierten Nieren von SHR, Deoxycorticosteronacetat-induzierten salzabhängigen (DOCA-Salz) und hypertensiven Dahl-Ratten verglichen mit deren Kontrolltieren deutlich verringert war

[31]. Bei DOCA-Salz- und Dahl-Ratten war der NO-vermittelte Anteil deutlich verringert, während dieser bei den SHR unverändert und stattdessen der EDHF-vermittelte Anteil völlig erloschen war.

Zusätzlich zu den Veränderungen der endothelialen Funktionen konnte in einigen Modellen gezeigt werden, dass die Calciumsensitivität des Kontraktionsvorgangs in hypertensiven Tieren im Vergleich zu den normotensiven Kontrolltieren erhöht war, wobei in verschiedenen Tiermodellen unterschiedliche Mechanismen (Proteinkinase-C-Aktivierung [61] und Rho-Kinase-Aktivierung [69]) dafür verantwortlich gemacht wurden. Es bleibt jedoch unklar, ob die beobachteten Effekte in hypertensiven Tieren durch den erhöhten Blutdruck oder durch Nebeneffekte wie z. B. begleitende endokrine Veränderungen in dem Modell ausgelöst werden. In genetischen Modellen könnte überdies eine verminderte Endothelfunktion die Ursache und nicht die Folge der Hypertonie sein, da der Pathomechanismus ihrer Entstehung nicht genau bekannt ist. In isolierten Arterien konnte der Einfluss von erhöhtem transmuralen Druck unabhängig von systemischen Einflüssen bisher nur über einen kurzen Beobachtungszeitraum untersucht werden. Huang et al. [35] konnten zeigen, dass ein isolierter Druckanstieg auf 140 mmHg (30 min) in Skelettmuskelarterien die NO-medierte flussabhängige Dilatation durch einen Anstieg in der O₂⁻-Produktion verringert. Ob dieses ein Mechanismus ist, der auch nach längerfristiger Druckerhöhung eine Rolle spielt, bleibt unklar. Nicht untersucht wurde in dieser Studie der Einfluss von chronisch erhöhtem Druck auf die EDHF-medierte Dilatation.

Um eine Antisense-Oligonucleotid-Behandlung in isolierten Widerstandarterien durchführen und Auswirkungen von chronisch erhöhtem transmuralen Druck untersuchen zu können, war es erforderlich, die Arterien einige Zeit *in vitro* funktionell intakt zu erhalten.

In bisherigen Versuchen, in denen die Arteriensegmente in Kulturschalen liegend kultiviert wurden, zeigten sich einige durch die Organkultur hervorgerufene funktionelle und strukturelle Veränderungen der Arterien. Glatte Muskelzellen von menschlichen Aa. mammariae internae entdifferenzierten z. B. vom kontraktilen in den synthetischen Phänotyp [32] und deendothelialisierte Nierenarterien der Ratte zeigten eine deutliche Verringerung der durch hohe K⁺-Konzentrationen ausgelösten Kontraktionen und einen Verlust der durch moderat erhöhte K⁺-Konzentrationen ausgelösten Dilatationen sowie

einen vermehrten Spontantonus [10]. Eine weitere Arbeitsgruppe [40] zeigte, dass Mesenterialarterien des Kaninchens nach der Kultur unter statischen Bedingungen eine deutliche Verringerung der Noradrenalin- und Histamin-induzierten Kontraktion aufwiesen, während die Kalium-induzierte Kontraktion in diesem Modell ebenso wie die Nitroprussidnatrium-induzierte Dilatation nach der Kulturzeit erhalten blieb. Die endothelabhängige, ACh-induzierte Dilatation war jedoch nach der Kulturperiode vollständig erloschen.

In einer Studie von N. Bardy et al. [1] konnte gezeigt werden, dass Gefäße, die über den Kulturzeitraum von 3 Tagen mit Kulturmedium unter physiologischen transmuralen Drucken perfundiert wurden, eine höhere DNA-Neusynthese und Protein-Neusynthese aufwiesen als Gefäße, die unter statischen Bedingungen kultiviert wurden. Ob diese physiologischeren Kulturbedingungen zu einem Erhalt der glattmuskulären und endothelialen Funktionen führten, wurde in dieser Studie leider nicht untersucht.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welcher Natur EDHF in kleinen Widerstandsarterien des Hamsters ist und inwiefern ein erhöhter Druck *per se* dessen Wirkung oder Freisetzung beeinflusst. Im Einzelnen ergaben sich daraus konkret folgende Fragen:

1.1. Fragestellung

1. Ist EDHF in Widerstandsarterien des Hamsters ein CYP450-Epoxygenase-Produkt und welche Isoform ist an dessen Synthese beteiligt?
2. Welchen Einfluss hat ein erhöhter Druck auf EDHF- und NO-vermittelte Dilatationen sowie glattmuskuläre Funktionen (Spontantonus, myogener Tonus und Kontraktionseigenschaften) in Widerstandsgefäßen?

1.2. Ziele

Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher,

1. zunächst eine stabile Organkulturmethode für Widerstandsarterien zu entwickeln, mit der EDHF- und NO-vermittelte Dilatationen sowie glattmuskuläre Funktionen über einige Tage intakt erhalten werden konnten.
2. die chemische Natur des EDHF in diesen kultivierten Widerstandsarterien mit Hilfe der Antisensetechnik zu untersuchen.
3. die Auswirkungen von chronisch erhöhtem transmuralen Druck auf EDHF-mediierte Prozesse in Widerstandsarterien zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation von Widerstandsarterien und Messaufbau

Weibliche Goldhamster (s. 6.2.3) wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Pentobarbital (50 mg/kg, Bezugsquelle s. 6.2.2) narkotisiert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurden die Tiere mit einer intracardialen Injektion von Pentobarbital getötet. Das mikrochirurgische Präparationsbesteck (s. 6.2.3) ebenso wie die im Weiteren verwendeten Organkammern, Siliconschläuche und Glaswaren wurden durch Autoklavieren (121°C; 1,5 bar; 20 min) sterilisiert.

Die Beine des Tieres wurden rasiert, um Infektionen der Arterien durch die keimhaltigen Tierhaare vorzubeugen. Anschließend wurde der Präparationstisch mit Virkon® Flächendesinfizenz (s. 6.2.2) und die Haut des Hamsters mit 70% Isopropanol (s. 6.2.2) desinfiziert. Der Hamster wurde auf dem Rücken liegend gelagert, wobei beide Beine abduziert fixiert wurden. Die Haut am medialen Oberschenkel wurde entfernt und das darunter befindliche Fettgewebe nach lateral abpräpariert. Um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern, wurde das Präparationsgebiet mit sterilem Standard-MOPS-Puffer (s. 2.8.1) superfundiert. Mit Hilfe eines Präparationsmikroskops (s. 6.2.1) wurde am medialen proximalen Oberschenkel die Ansatzsehne des Musculus gracilis durchtrennt und der Muskel vorsichtig nach distal mobilisiert, ohne den darunter liegenden Gefäßbaum mechanisch zu schädigen. Für die Experimente wurden die den M. gracilis und die darunter liegenden Adduktoren versorgende Äste der A. femoralis (3. Generation) verwendet. Sie wiesen in unkontrahiertem Zustand einen maximalen Außendurchmesser von $239,8 \pm 5,9 \mu\text{m}$ ($n = 37$) auf. Die zu den Arterien parallel verlaufenden Venen wurden entfernt und die Arterien mit einer feinen Pinzette und einer feinen Schere von dem sie umgebenden Bindegewebe befreit.

Aus dem so frei präparierten Gefäßbaum wurden mehrere ca. 1 mm lange Segmente entnommen, wobei immer benachbarte Segmente verschiedenen Behandlungsgruppen zugeführt wurden. Diese Segmente wurden in einem Messaufbau (s. Abb. 1) an beiden Enden mit Glasmikropipetten (s. 6.2.1) kanüliert und mit mikrochirurgischen Fäden (s. 6.2.3) festgeknotet. Die Glasmikropipetten waren auf Mikromanipulatoren montiert, um die durch ihre Eigenelastizität verkürzte Widerstandsarterie auf ihre *in-situ*-Länge vorzuspannen und deren Lage im Organbad sehr fein einstellen zu können.

Der transmurale Druck der Arterien wurde mit Hilfe einer Wassersäule, die mit den Glasmikropipetten verbunden war, auf 45 mmHg eingestellt.

Mit Hilfe der oben beschriebenen Messapparatur konnten die kanülierten Arterien vom Präparationsarbeitsplatz in den Organkulturraum und zu verschiedenen Messplätzen (z.B. Calciummessplatz, konfokales Mikroskop) transportiert werden.

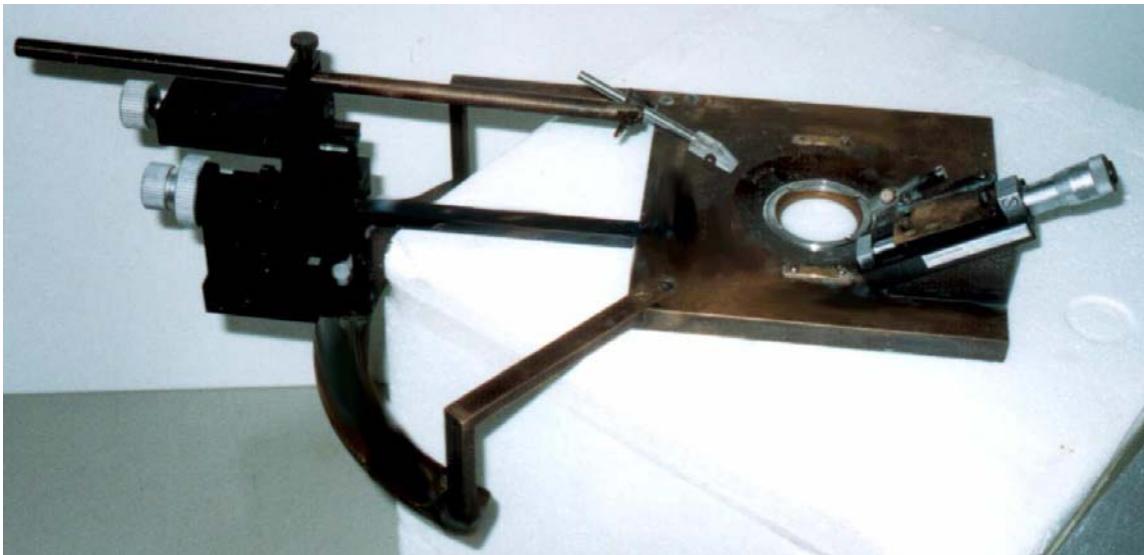


Abb. 1: Messaufbau: An einer soliden Messingplatte wurden zwei Mikromanipulatoren befestigt, wobei einer direkt auf die Platte montiert und der andere an einem Ausläufer befestigt wurde.

2.2. Chronische Perfusion der Widerstandsarterien

Bevor die Messapparaturen mit den Arterien in den Organkulturraum transferiert wurden, wurde dieser jeweils mit Virkon®- Flächendesinfizienz (s. 6.2.2) gründlich gereinigt und die Keimzahl durch UV-Licht (Einwirkzeit: mindestens 12 h) weiter reduziert.

Während der Kulturzeit von 24- 48 h wurde das Kulturmedium (s. 2.8.2) mit einem Perfusionssystem (s. 6.2.1) über eine Glaspipette durch die Widerstandsarterie gegen eine Wassersäule gepumpt (Flussrate: 1 ml/h), die mit der anderen Pipette verbunden war und mit dem transmurale Druck hydrostatisch auf 45 mmHg gehalten wurde (s. Abb. 2). Unter Perfusion entsteht in der proximalen Pipette bzw. in der Widerstandsarterie nur ein sehr geringer longitudinaler Druckabfall (von $2,1 \cdot 10^{-4}$ mmHg; s. 6.3.2), so dass der hydrostatische Druck, der durch die Wassersäule erzeugt wird, dem transmuralen Druck unter Perfusion in der Widerstandsarterie ohne wesentlichen Fehler gleich gesetzt

werden kann (s. 6.3.2). Die Höhe der Flussrate wurde so gewählt, dass am Endothel eine Wandschubspannung von 104 mPa herrschte (Formel s. 6.3.1).

Mit einem zweiten Perfusionssystem wurde Kulturmedium über eine Kanüle auf den Boden der Organkammer gepumpt und gleichzeitig mit einer peristaltischen Pumpe (s. 6.2.1) auf der gegenüberliegenden Seite abgepumpt, so dass der Spiegel im Organbad konstant gehalten wurde. Dabei wurde das Kulturmedium durch Konvektion vollständig und kontinuierlich ausgetauscht.

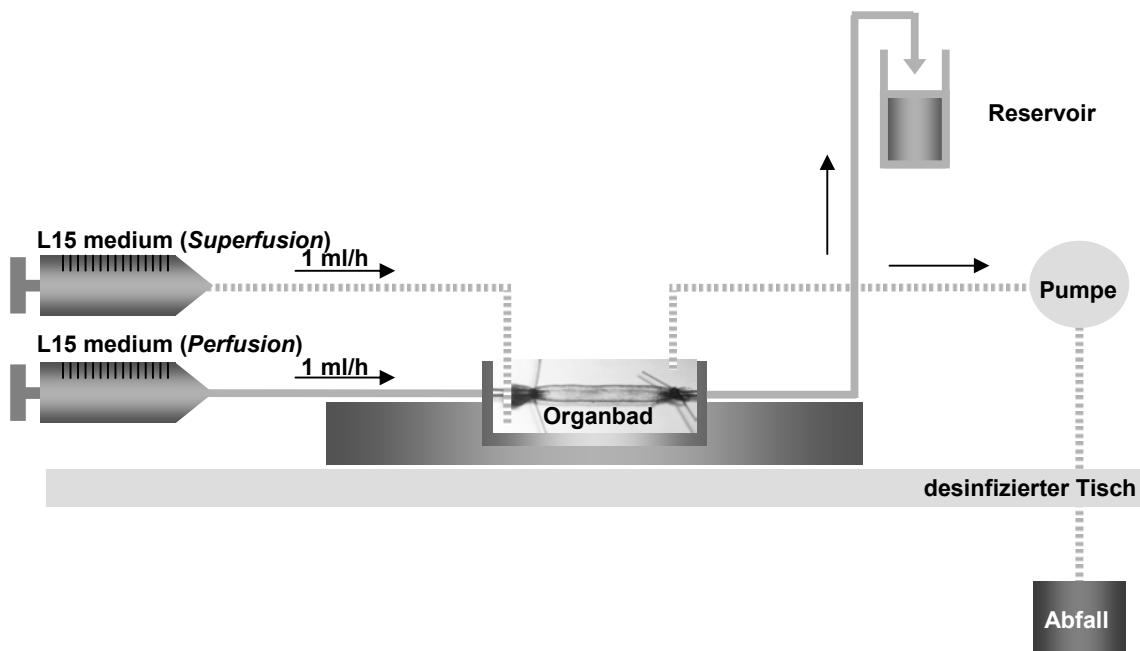


Abb. 2: Schematische Zeichnung der Versuchsanordnung während der Organkultur.

2.3. Transfektion mit Antisense-Oligonucleotiden

2.3.1. RNA-Isolierung und rtPCR

Um zeigen zu können, dass Cytochrome P450 2C8 auch in Hamsterarterien exprimiert wird, wurde mittels rtPCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction = Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) versucht, deren mRNA nachzuweisen.

Mit Hilfe einer rtPCR hat man die Möglichkeit, auch geringe Mengen von RNA spezifisch nachzuweisen. Dazu wurden Skelettmuskelarterien, Aorten, Leber- und Herzgewebe

von Goldhamstern in flüssigem Stickstoff eingefroren und die RNA mittels einer Mischung aus Guanidinithiocyanat und Phenol (Trizol, s. 6.2.2) extrahiert.

Anschließend wurde die RNA unter Verwendung von reverser Transkriptase und Hexanucleotiden beliebiger Sequenz, die als Primer fungierten, in cDNA umgeschrieben.

Die so entstandenen DNA-RNA-Hybride wurden durch Hitze denaturiert (Trennung der Doppelstränge). Die cDNA-Einzelstränge wurden mit hitzebeständiger DNA-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) und zwei Primern inkubiert, die die Synthese von komplementären Strängen einleiteten. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sie dem 5'- bzw. dem 3'-terminalen Ende des zu amplifizierenden Segmentes entsprechen.

Für den Nachweis von CYP2C8 in den Hamsterskelettmuskelarterien wurden Oligonucleotide als Primer verwendet, die aus einer menschlichen CYP2C8-Sequenz stammten (Genbank Nr.: Y00498, upstream primer: GATAGATGTTAAGGACATCT, downstream primer: CTCCCTTAATGTAACCTCGTG). Diese Sequenz zeigte eine große Homologie zur Hamster-2C25-Sequenz, dem Analogon des menschlichen 2C8 beim Hamster (Genbank Nr.: D11435).

In jedem Zyklus wurden die DNA-Doppelstränge zuerst durch Hitzedenaturierung getrennt, anschließend legten sich die Primer an die Einzelstrang-DNA, die die komplementäre Sequenz aufwiesen, und leiteten die Synthese der komplementären Stränge ein. Durch Verwendung hitzebeständiger DNA-Polymerase erübrigte es sich, nach jedem Denaturierungsschritt frisches Enzym hinzuzugeben. So konnte jeder Schritt lediglich durch Variation der Inkubationstemperatur kontrolliert werden.

Durch multiple Zyklen dieses Prozesses, wobei jedes Mal eine Verdopplung der vorhandenen DNA-Menge des spezifischen Segmentes stattfand, wurden die DNA-Segmente exponentiell amplifiziert.

Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente auf einem 1,5 %-TAE-Agarosegel aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Um die Identität des amplifizierten DNA-Fragmentes zu verifizieren, wurden die PCR-Fragmente auf Nylonmembranen transferiert und mit ³²P-markierten DNA-Fragmenten, die für 2C8 codieren, hybridisiert.

2.3.2. Struktur der Antisense-Oligonucleotide

Um die spezifische Inhibition von CYP450-2C8 zu erzielen, wurde ein Teil der Sequenz der cDNA der CYP450-2C8 und -2C9 (5'GAGGAGTGGGCCAGGAGGGAG 3') (Bezugsquelle s. 6.2.2) als Antisense-Oligonucleotid synthetisiert, das 50 Basenpaare stromabwärts der Initiationssequenz innerhalb der kodierenden Region liegt.

Vergleiche dieser cDNA-Sequenz mit der Gendatenbank zeigten ausschließlich eine Homologie innerhalb der Cytochrom-P450-2C-Familie, Homologien mit anderen DNA-Sequenzen ließen sich nicht nachweisen.

Um die Lokalisierung der Oligonucleotide innerhalb der Wand der Arterie zu ermöglichen, wurde das 5' Ende der Oligonucleotide mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert, der sich mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (s. 2.6) detektieren ließ.

2.3.3. Kontrollexperimente

Um einen Effekt der Transfektion *per se* auf die Funktionen der Arterie zu untersuchen, wurden zwei strukturell verschiedene Kontroll-Oligonucleotide synthetisiert. Mit Hilfe von Sense-Oligonucleotiden, die homologe Struktur zur mRNA des Proteins aufwiesen, wurde eine unspezifische Wirkung des Transfektionsreagenz auf die Funktionen der Arterie untersucht.

Um toxische Effekte durch erhöhte Anzahl einer Base im Antisense-Oligonucleotid, z.B. hier durch guaninreiche Sequenzen, auszuschließen, wurden Scrambled-Oligonucleotide als zweite Kontrolle verwendet. Diese zeigten im Vergleich zu den Antisense-Oligonucleotiden die gleiche Anzahl der verschiedenen Nucleotide, die aber in beliebiger Reihenfolge angeordnet waren.

2.3.4. Transfektion des Endothels von Widerstandsarterien

Nach einer etwa einstündigen Äquilibrierungsphase, in der die Arterien mit Kulturmedium perfundiert wurden, wurde 3 ml Transfektionslösung (s. 2.9.3.) in dem Schlauch des Perfusors vorgelegt, der das Kulturmedium durch das Lumen der Widerstandsarterie pumpte. Bei einer Perfusionsrate von 1 ml/h resultierte so eine 3-stündige Kontaktzeit der Transfektionslösung am Endothel. Anschließend wurde die Arterie für die

verbleibende Kulturzeit (24 - 48 h) mit Kulturmedium weiter perfundiert. Durch den physiologischen Abbau des Proteins während dieser Kulturzeit konnten im Anschluss daran die Auswirkungen der verringerten Synthese seiner Metabolite auf die endothelialen und glattmuskulären Funktionen untersucht werden.

2.4. Calciummessung mit Fura-2

2.4.1. Funktionsprinzip

Das intrazelluläre freie Calcium ($[Ca^{2+}]_i$) im glatten Muskel und im Endothel wurde mit Hilfe des calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 nach der von Grynkiewicz et. al. beschriebenen Methode [29] gemessen.

Fura-2 besitzt vier Bindungsstellen für Calcium, wobei durch die Anzahl der gebundenen Calciumionen die Anregungswellenlänge verändert wird, welche eine maximale Intensität der Emission bei $\lambda = 510$ nm bewirkt. Diese wird mit steigender Calciumkonzentration von 380 nach 340 nm verschoben. (s. Abb. 3). Für die Calciummessung wurden alternierende Anregungswellenlängen von 350 und 380 nm verwendet, die von zwei Monochromatoren selektiert wurden (s. 6.2.1) und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 510 nm mit Hilfe eines Photomultipliers, dem ein Bandpass Filter (510 nm, s. 6.2.1) vorgeschaltet war, erfasst. Die Fluoreszenzintensitäten wurden 6-mal pro Sekunde gemessen, den jeweiligen Anregungswellenlängen zugeordnet und auf einem PC gespeichert.

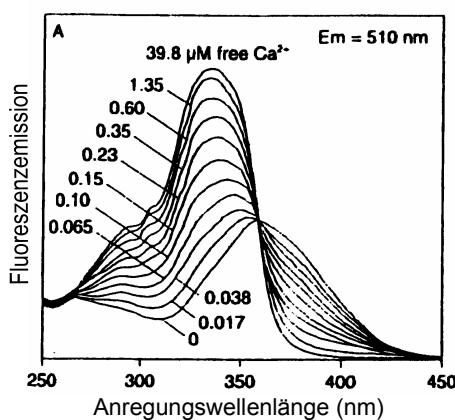


Abb. 3: Emissionsspektrum von Fura-2 für 0-39,8 μM freies Calcium (entnommen aus dem Produktinformationsblatt von Fura-2 der Fa. Molecular Probes)

Bei Änderungen der Calciumkonzentration verhalten sich die Intensitäten der Emission bei den verschiedenen Anregungswellenlängen gegensinnig. Artefakte, die durch Bewegungen der Arterie oder durch Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes entstehen, sind in der Regel gleichsinnig und können so vernachlässigt werden, da die Intensitätswerte (Ratio) dividiert werden.

In einer kleinen Gruppe von Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Autofluoreszenz von Skelettmuskelarterien stark variierte. Daher wurde die Eigenfluoreszenz der Arterien bestimmt, indem die Fluoreszenz von Fura-2 durch $MnCl_2$ (8 mM) aufgehoben und die verbleibende Fluoreszenz gemessen wurde. Anschließend wurde die so bestimmte Autofluoreszenz von den zuvor gemessenen Fluoreszenzintensitäten subtrahiert und erst dann die Ratio berechnet (Formel s. 6.3.3). Die so ermittelte Ratio kann in zellfreien Systemen durch Erstellung von Kalibrationskurven in absolute Calciumkonzentrationen umgerechnet werden (benötigte Formeln s. [29]). Dabei verhält sich die Ratio im physiologisch relevanten Calciumkonzentrationsbereich direkt proportional zur Calciumkonzentration, so dass Prozentangaben für Ratioänderungen auch Prozentänderungen der Calciumkonzentration entsprechen.

Die Kalibrierung in intakten Widerstandsarterien ist jedoch bedeutend ungenauer, da man für die Berechnung der Calciumkonzentration die Ratio unter calciumfreien Bedingungen, und unter maximaler Sättigung von Fura-2 mit Calcium benötigt (Formeln für die Berechnung s. [51]). Meininger et al. [51] haben daher die Ratio nach Inkubation der Arterien mit calciumfreier Lösung, der zusätzlich der Calciumchelator Ethylenglycoltetraessigsäure zugesetzt wurde und nach Stimulation der Arterien mit dem Calciumionophor A23187 gemessen. Während die Ratiomessungen unter calciumfreien Bedingungen gut reproduzierbar waren, zeigten die Werte unter Stimulation mit dem Ionophor große Abweichungen. Zusätzlich konnten Konishi et al. [42] zeigen, dass die für die Umrechnung aus der Ratio erforderliche Dissoziationskonstante für Ca^{2+} von Fura-2 *in vitro* und *in vivo* unterschiedlich waren.

Da in unserer Studie Calciumänderungen und nicht Calciumabsolutwerte von Interesse waren, werden Ratioänderungen als Maß für Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration angegeben.

Um auszuschließen, dass Fura-2 in der geringen Konzentration, die in dieser Studie verwendet wurde, relevante Calcium-puffernde Effekte aufwies, wurde in einer kleinen Gruppe von Versuchen Kontraktionen von mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Arterien mit unbeladenen Gefäßen verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber Noradrenalin, Angiotensin und Anstiegen im transmuralen Druck (myogene Reaktion) nachgewiesen werden.

2.4.2. Beladung des glatten Muskels oder des Endothels mit Fura-2

Die Arterien wurden mit dem oben beschriebenen Messaufbau auf den geheizten Mikroskopisch eines inversen Mikroskops (s. 6.2.1) transferiert und die Temperatur im Organbad langsam auf 37°C erhöht. Alle folgenden Untersuchungen wurden bei einer Temperatur von 37°C im Organbad und einem transmuralen Druck von 45 mmHg in Anwesenheit von Indomethacin (30 µM) durchgeführt.

Um vergleichbare Bedingungen bei frisch isolierten und chronisch perfundierten Arterien zu schaffen, wurde das Kulturmedium durch Perfusion mit MOPS-Puffer aus dem Lumen gespült.

Nach einer 20-minütigen Äquilibrierungsphase wurden die glatten Muskelzellen der Arterie mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladen, indem die Pufferlösung im Organbad durch die Inkubationslösung (s. 2.8.4), die Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) enthielt, ausgetauscht wurde. Die Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde nach 2 h durch wiederholtes vorsichtiges Spülen des Organbads mit MOPS-Puffer beendet und nach einer 5-minütigen Äquilibrierungsperiode mit den funktionellen Tests begonnen.

Fura-2-AM ist eine unpolare Substanz, die gut durch Zellmembranen diffundiert. Im Cytosol spalten unspezifische Esterasen von Fura-2-AM hydrolytisch den Acetoxyethylrest ab, die entstehende Säure Fura-2 ist vierfach negativ geladen und diffundiert daher deutlich schlechter durch Zellmembranen als Fura-2-AM. Auf diese Weise erfolgt die Anreicherung von Fura-2 im Cytosol.

Eine selektive Beladung des Endothels wurde durch Perfusion (1 ml/h) der Arterie mit der Inkubationslösung erreicht. Nach einer Stunde wurde die Beladung des Endothels durch Perfusion mit MOPS-Puffer beendet.

Beach et al. [2] konnten für di-8-ANEPPS, einen Membranpotential-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff, zeigen, dass der Farbstoff, wenn er von luminal appliziert wurde, über 1 h lang nur in Endothelzellen nachweisbar war, wobei vermutlich die Basalmembran als Barriere wirkte. Zusätzlich wurde in einigen Vorversuchen Fura-red-AM, ein Fluoreszenzfarbstoff, der bezüglich Molekülgröße und Struktur Fura-2-AM sehr ähnlich ist, in Widerstandsarterien von luminal appliziert und mit dem konfokalen Mikroskop (s. 2.6) detektiert. Fura-2 konnte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops nicht detektiert werden, da dieses nicht über einen UV-Laser verfügte. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass Fura-red etwa 2 h nur in der Endothellschicht nachweisbar ist, dann aber zunehmend in die glatte Muskulatur diffundiert. Alle Messungen von endothelialen Calciumänderungen wurden deshalb innerhalb der ersten 45 min nach Ende der Inkubationsperiode durchgeführt.

2.5. Außendurchmesserbestimmung

Simultan zur Calciummessung wurde der Außendurchmesser aufgezeichnet. Dabei wurden mit Hilfe einer Restlichtkamera (s. 6.2.1) die Außendurchmesseränderungen der Arterie während der Experimente auf Video aufgezeichnet. Für die Außendurchmesserbestimmung wurde Licht mit einer Wellenlänge über 610 nm verwendet, das mit der fluoreszenzmikroskopischen Calciummessung nicht interferierte. Mit Hilfe eines computergestützten Meßsystems (s. 6.2.1) wurden entweder während des Versuchs simultan zur Calciummessung oder danach mit Hilfe des Videobandes in einem Ausschnitt die Graustufen der Bildpunkte zeilenweise senkrecht zur Arterie gemessen. Die Grenzen der Arterie bestimmte dieses System dadurch, dass entlang der vermessenen Strecke beim Übergang von dem umgebenden Puffer im Organbad zur Arterienwand ein deutlicher Helligkeitsunterschied auftritt. Der Abstand zwischen den beiden so ermittelten Arteriengrenzen wurde während der Messung 4- bis 5-mal pro Sekunde aufgezeichnet und ein Mittelwert pro Sekunde errechnet. Die so erhobenen Messwerte ließen sich mit einer Genauigkeit von $\pm 1,5 \mu\text{m}$ reproduzieren.

2.6. Konfokale Mikroskopie

Mit der unter 2.4.1 beschriebenen photometrischen Messapparatur kann nur die Gesamtfluoreszenz eines Objektes gemessen werden, weil sowohl das Excitationslicht als auch das Emissionslicht einer großen Streuung unterliegen. Daher ist es mit einem solchen photometrischen Setup nicht möglich, die FITC-markierten Oligonucleotide innerhalb der Arterienwand zu lokalisieren.

Im Gegensatz dazu können mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (s. 6.2.1) optische Schnitte mit einer Dicke bis zu 0,4 µm angefertigt werden, da mit Hilfe von Irisblenden Fluoreszenzlicht aus anderen Ebenen ausgeblendet und somit die Lokalisation der FITC-markierten Oligonucleotide in der Arterienwand möglich wird.

Bei dieser Methode dient Laserlicht zur Excitation, das von einem externen Argonlaser erzeugt (488 bzw. 514 nm) und mit Hilfe eines Linienselektionsfilters die gewünschte Excitationswellenlänge herausgefiltert wird (Strahlengang: s. Abb. 4).

Dieses Laserlicht wird über das Strahl-Scan-System durch die Tubuslinse des Objektivs auf einen Objektpunkt im Präparat fokussiert. Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene sowie aus darunter und darüber liegenden Ebenen gelangt über den Scanner zu einem dichroitischen Strahlteilersystem, wo die Fluoreszenzemissionen aufgetrennt werden und auf die Photomultiplier treffen. Computergesteuerte variable Irisblenden lassen nur solches Licht passieren, das direkt aus der Fokusebene stammt, während Licht aus anderen Ebenen wirksam unterdrückt wird. Zusätzlich kann mit Hilfe von Emissionsfiltern die gewünschte Wellenlänge herausgefiltert werden. Mit einem Scanner wird der gewählte Objektausschnitt innerhalb der Fokusebene nacheinander mit Laserlicht angeregt und simultan dazu die Emission mit den Photomultipliern gemessen. Die so gewonnenen Informationen über die Bildpunkte des Objektes werden anschließend auf einem Computerbildschirm zu einem Bild der fokussierten Ebene zusammengesetzt, wobei die Intensitäten der Emission durch Helligkeitsunterschiede oder durch Falschfarben kodiert dargestellt werden können. Da das Rauschen aus den nicht fokussierten Schichten des Objektes verhindert wird und so nur die Bildpunkte des Objektes in der fokussierten Schicht aufgezeichnet werden, repräsentiert das so gewonnene Bild ein optisches Schnittbild durch das Objekt in der Fokusebene, das digitalisiert auf der Festplatte des Computers gespeichert werden kann.

Mit Hilfe des Durchlichtdetektors kann ein Transmissionsbild aus der gleichen Fokusebene, in der die Fluoreszenzbilder aufgenommen wurden, aufgezeichnet und mit Hilfe der Software verschiedene Fluoreszenzbilder und ein Durchlichtbild falschfarbencodiert übereinander projiziert dargestellt werden.

Zusätzlich können dreidimensionale Strukturen räumlich sichtbar gemacht werden, indem optische Schnitte in definierten Abständen angefertigt, in Serie aufgezeichnet und anschließend mit Hilfe der Computersoftware zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden.

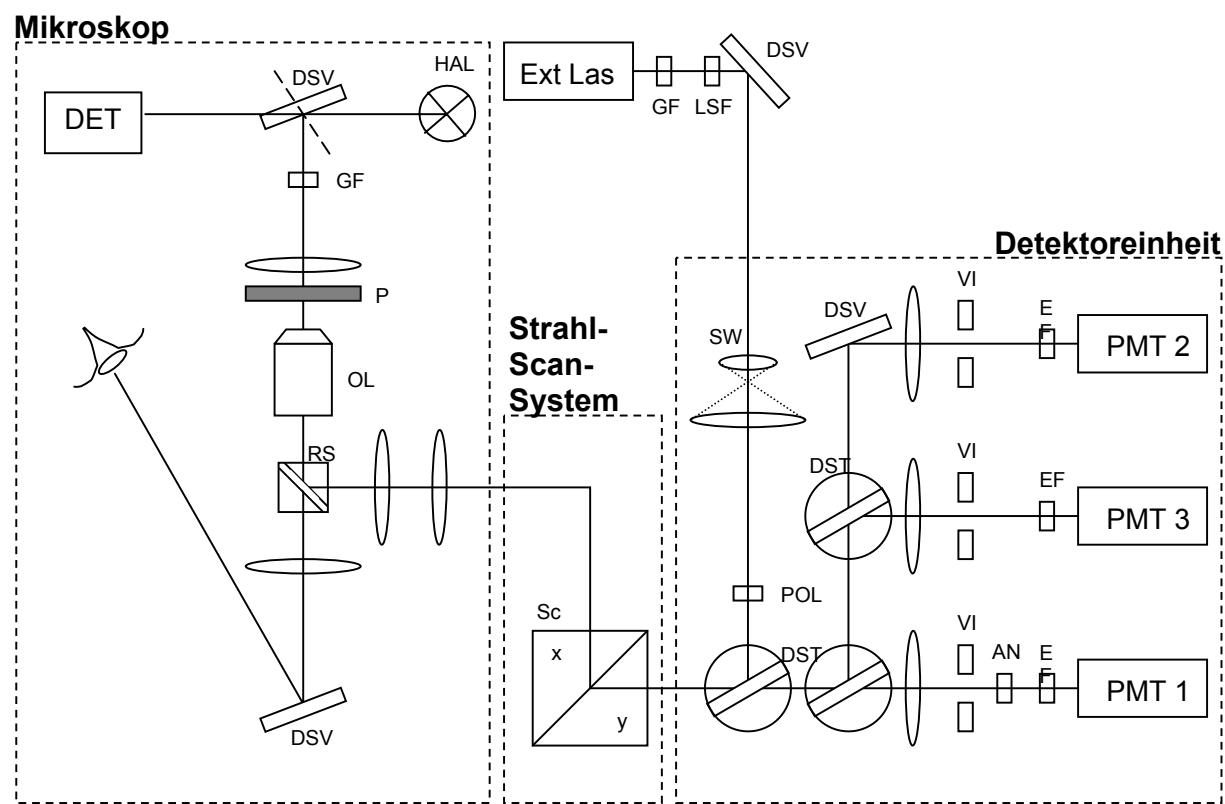


Abb. 4: Schematische Zeichnung des Strahlengangs eines konfokalen Mikroskops (entnommen aus dem Handbuch des Zeiss LSM-410)

Legende:

AN	Analysator	LSF	Linienselektionsfilter
DET	Durchlichtdetektor	OL	Objektivlinse
DST	dichroitischer Strahlenteiler	P	Präparat
DSV	dichroitischer Strahlenvereiniger	PMT	Photomultiplier
EF	Emissionsfilter	POL	Polarisator
Ext Las	Externer Laser	RS	Reflektorschieber
(Argonlaser $\lambda = 488$ bzw. 514 nm)		SC	Spiegelscanner
GF	Graufilter	SW	Strahlauflweiter
HAL	Halogenlampe	VI	variable Irisblende

Um die FITC-markierten Oligonucleotide innerhalb der Arterienwand zu lokalisieren, wurde der Linienselektionsfilter 488 nm und ein Emissionsfilter, der nur für Wellenlängen > 510 nm durchlässig war, verwendet.

2.7. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

2.7.1. Funktionsprinzip

Ein Elektronenstrahl wird mit Hilfe eines Ablenkgenerators zeilenförmig über die Probe geführt, die emittierten Sekundärelektronen und die rückgestreuten Elektronen synchron von einem geeigneten Detektor erfasst und das so erhaltene Signal über einen Videoverstärker an den Bildschirm weitergegeben.

Für die Aufnahmen wurde eine geeignete Vergrößerung und ein geeigneter Bildausschnitt gewählt und das Bild bei 10-fach stärkerer Vergrößerung fokussiert. Anschließend wurden Kontrast und Helligkeit in der gewünschten Vergrößerung optimal eingestellt und das Bild mit Hilfe einer Fotokamera aufgezeichnet.

2.7.2. Vorbereitung der Proben

Präparation der Arterien

Da mit der Elektronenmikroskopie nur Oberflächen untersucht werden können, wurden die kanülierten Arterien gefenstert, indem in der Mitte ein Stück der Wand entfernt wurde, um die das Arterienlumen auskleidende Endotheloberfläche direkt betrachten zu können.

Fixierung und Entwässerung der Arterien

Da die Betrachtung der Proben im Elektronenmikroskop im Hochvakuum durchgeführt werden muss, wurden die Proben mit einer 2,5 %-igen Glutaraldehydlösung (s. 2.8.6) mindestens 12 h bei 4°C fixiert, damit sie sich unter diesen Bedingungen nicht verformen und außerdem über einen längeren Zeitraum untersucht werden konnten.

Um Artefakte bei der Rasterelektronenmikroskopie durch Feuchtigkeit der Proben zu vermeiden, müssen diese getrocknet werden. Beim Trocknen von wässrigen Proben an der Luft würden durch die Oberflächenspannung Schäden an den Proben entstehen, daher wurden diese schrittweise in einer Ethanolreihe entwässert, da der Alkohol eine geringere Oberflächenspannung besitzt.

Trocknung am kritischen Punkt für CO₂

Da aber auch beim Trocknen mit Alkohol Oberflächenkräfte auftreten, die feinere Strukturen zerstören können, wurde in dieser Studie die Trocknung der Proben am kritischen Punkt für CO₂ vorgezogen, um eine optimale Strukturerhaltung zu erreichen. Oberhalb dieses kritischen Punktes (für CO₂ bei einer Temperatur: $T_{kr} = 31\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem Druck am kritischen Punkt: $p_{kr} = 71,5\text{ bar}$) existieren keine Phasengrenzen zwischen flüssiger und gasförmiger Phase und daher können auch keine Oberflächenkräfte auftreten.

Um die vollständig entwässerten Proben am kritischen Punkt für CO₂ zu trocknen, werden sie in eine Druckkammer (Gerät: s. 6.2.1) gebracht und das Ethanol gegen flüssiges CO₂ bei 4°C durch mehrfaches Waschen ausgetauscht. Anschließend wird die Temperatur in der Druckkammer auf 40°C erhöht, wobei der Druck auf 75 bar ansteigt.

Da sich die Proben nun oberhalb des kritischen Punktes befinden, kann durch schrittweises Ablassen des gasförmigen CO₂ der Druck gesenkt werden und die Proben wurden ohne Überschreiten der Phasengrenze zwischen flüssig und gasförmig getrocknet. Die direkte Trocknung am kritischen Punkt für Wasser ist leider nicht möglich, da T_{kr} für Wasser 374°C und p_{kr} 214 bar beträgt.

Aufbringen einer Goldschicht

Proben dürfen sich im Rasterelektronenmikroskop nicht aufladen, da die aufgeladenen Bereiche sonst nicht einwandfrei abgebildet werden können.

Um die Leitfähigkeit und die Sekundärelektronenausbeute zu erhöhen, wurden die getrockneten Proben unter einem Präparationsmikroskop auf Aluminiumprobentellern (s. 6.2.1) mit Hilfe einer doppelseitig klebenden, leitfähigen Kohlefolie (s. 6.2.1) befestigt und anschließend durch Kationenzerstäubung (s. 6.2.1) mit einer 300 nm dünnen Schicht von Goldpartikeln überzogen.

Die Kationenzerstäubung erfolgt durch eine Gleichspannungsentladung (2,4 kV, 20 mA) bei einem Gasdruck von 15 Pa in einer Stickstoffatmosphäre.

Dabei wird die Kathode (eine goldbeschichtete Platte) von den Ionen der Gasentladung getroffen, es werden Goldatome herausgeschlagen, die zur Anode fliegen und auf den darauf befestigten Proben einen Goldüberzug erzeugen.

2.8. Lösungen und Chemikalien

2.8.1. Pufferlösungen

Standard-MOPS-Puffer

145 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 3 mM CaCl₂•2 H₂O; 1,17 mM MgSO₄•7 H₂O;
1,2 mM NaH₂PO₄•2 H₂O; 2 mM Pyruvat; 0,02 mM Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA);

3,0 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS); 5 mM Glucose

Das CaCl₂ wurde der Pufferlösung erst zugesetzt, nachdem alle anderen Inhaltsstoffe gelöst waren, da CaCl₂ sonst mit NaH₂PO₄ einen unlöslichen Komplex bilden würde. Der pH-Wert des Puffers wurde mit 1 M NaOH unter Kontrolle mit einer pH-Elektrode auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer mit einem autoklavierbaren mehrfach verwendbaren Sterilfilter (s. 6.2.1) in autoklavierte Flaschen filtriert.

Calciumfreier Puffer

147 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,17 mM MgSO₄•7 H₂O; 1,2 mM NaH₂PO₄•2 H₂O; 2 mM Pyruvat; 1 mM EDTA; 3,0 mM MOPS; 5 mM Glucose

Calciumfreier Puffer mit erhöhtem Kalium

26,7 mM NaCl, 125 mM KCl; 1,17 mM MgSO₄•7 H₂O; 1,2 mM NaH₂PO₄•2 H₂O; 2 mM Pyruvat; 1 mM EDTA; 3,0 mM MOPS; 5 mM Glucose

Calciumreduzierte Puffer mit erhöhtem Kalium*0,5 mM Calcium*

27,2 mM NaCl; 125 mM KCl; 0,5 mM CaCl₂•2 H₂O; 1,17 mM MgSO₄•7 H₂O;
1,2 mM NaH₂PO₄•2 H₂O; 2 mM Pyruvat; 0,02 mM EDTA; 3,0 mM MOPS; 5 mM
Glucose

1 mM Calcium

26,7 mM NaCl; 125 mM KCl; 1 mM CaCl₂•2 H₂O; 1,17 mM MgSO₄•7 H₂O;
1,2 mM NaH₂PO₄•2 H₂O; 2 mM Pyruvat; 0,02 mM EDTA; 3,0 mM MOPS; 5 mM
Glucose

2 mM Calcium

25,7 mM NaCl; 125 mM KCl; 2 mM CaCl₂•2 H₂O; 1,17 mM MgSO₄•7H₂O;
1,2 mM NaH₂PO₄•2 H₂O; 2 mM Pyruvat; 0,02 mM EDTA; 3,0 mM MOPS; 5 mM
Glucose

Puffer mit normalem Calcium und erhöhtem Kalium

24,7 mM NaCl; 125 mM KCl; 3 mM CaCl₂•2 H₂O; 1,17 mM MgSO₄•7 H₂O;
1,2 mM NaH₂PO₄•2 H₂O; 2 mM Pyruvat; 0,02 mM EDTA; 3,0 mM MOPS; 5 mM
Glucose

2.8.2. Kulturmedium

Leibovitz L-15 (s. A. Leibovitz [45]):

Inhaltsstoffe: 140 mg/l CaCl₂, 400 mg/l KCl, 60 mg/l KH₂PO₄, 93,68 mg/l MgCl₂, 97,67 mg/l MgSO₄, 80000 mg/l NaCl, 190,12 mg/l Na₂HPO₄, 900 mg/l D(+) Galaktose, 10 mg/l Phenolrot (als pH-Indikator), 550 mg/l Na-Pyruvat, 450 mg/l dl-Alanin, 500 mg/l L-Arginin (freie Base), 250 mg/l L-Asparagin, 120 mg/l L-Cystin (freie Base), 300 mg/l L-Glutamin, 200 mg/l Glycin, 250 mg/l L-Histidin (freie Base), 250 mg/l L-Isoleucin, 125 mg/l L-Leucin, 75 mg/l L-Lysin (freie Base), 150 mg/l dl-Methionin, 250 mg/l dl-Phenylalanin, 200 mg/l L-Serin, 600 mg/l dl-Threonin, 20 mg/l L-Tryptophan, 300 mg/l L-Tyrosin, 200 mg/l dl-Valin, 1 mg/l d-Ca Pantothenat, 1 mg/l Cholinchlorid, 1 mg/l Folsäure, 2 mg/l L-Inositol, 1 mg/l Nikotinamid, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 0,1 mg/l Flavin-Mononucleotid, 1 mg/l Thiaminmonophosphat(HCl)

Dieses Medium wird zum größten Anteil über die enthaltenden Aminosäuren, die in deutlich höheren Konzentrationen enthalten sind, als von Zellen oder Gewebe für die Aufrechterhaltung der Stoffwechselfunktionen benötigt, und durch das Dihydrogenphosphat-Hydrogenphosphatpuffersystem gepuffert. Aufgrund seiner CO₂-unabhängigen Pufferung wurde es speziell für den Einsatz außerhalb von Inkubatoren entwickelt. Das Leibovitz L-15-Medium wurde als Pulver in Portionen für 1 l Medium geliefert, die in einem 1 l Kolben in ca. 800 ml bidestilliertem Wasser aufgelöst und danach weiter auf 1 l aufgefüllt wurden. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das so hergestellte Stammmedium steril filtriert (analog 2.8.1).

Kurz vor der chronischen Perfusion der Widerstandsarterien wurde die benötigte Portion Stammmedium mit 15 % hitzeaktiviertem Kälberserum (s. 6.2.2), 20.000 U/l Penicillin, 20 mg/l Streptomycin (s. 6.2.2) und 0,4 µM/l L-Glutamin (s. 6.2.2) versetzt, der pH-Wert mit 1 M HCl unter Kontrolle mit einer pH-Elektrode auf 7,4 eingestellt und das fertige Kulturmedium mit Spritzenaufsatzfiltern (s. 6.2.1) in eine sterile Flasche filtriert.

2.8.3. Transfektionslösung

2,5 µg/ml Oligonucleotide, Stammmedium (Leibovitz L-15 ohne Serum und Antibiotika), 20 µl/ml Superfect® (s.6.2.2) und Kulturmedium (mit Serum, Glutamin und Antibiotika)

7,5 µg Oligonucleotide wurden in 300 µl Leibovitz L-15-Medium (ohne Serum- und Antibiotikazusatz) verdünnt, 60 µl Superfect hinzugefügt und gut durchmischt (Vortexer). Danach wurde die Lösung 20 min ruhen gelassen, um eine Komplexbildung zwischen der DNA und Superfect® zu ermöglichen. Anschließend wurde diese Lösung mit serum- und antibiotikahaltigem Medium auf 3 ml aufgefüllt.

Das kationische Transfektionsreagenz Superfect® (s. 6.2.2) wurde zur Erhöhung der Transfektionseffizienz verwendet, da Oligonucleotide *per se* nur in geringem Maße von Zellen aufgenommen und durch lysosomale Nucleasen leicht abgebaut werden. Superfect® bildet mit der DNA einen Komplex, der positiv geladen ist und daher in der Lage ist, an negativ geladene Rezeptoren (z.B. Asialoglykoproteinrezeptoren) auf der Zellmembran zu binden. Der DNA-Superfect®-Komplex gelangt anschließend durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen, wobei Superfect® nach Verschmelzung des Endosoms mit den sauren Lysosomen durch seine Pufferwirkung den pH-Wert anhebt und so die Aktivität der lysosomalen Nukleasen, die pH-abhängig reguliert wird, deutlich verringert.

2.8.4. Inkubationslösung zur Calciummessung

Fura-2-AM (s.6.2.2) wurde als 1 mM Stammlösung in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO, s. 6.2.2) hergestellt, unter N₂ aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Inkubationslösung: 2 µM Fura-2-AM, 1,2 % BSA (bovine serum albumin = Rinderserumalbumin, s. 6.2.2) und 10 µM Indometacin (s. 6.2.2).

Nach der Verdünnung um den Faktor 1:500, die in der Inkubationslösung verwendet wurde, hatte DMSO keinen Effekt auf die glattmuskulären und endothelialen Funktionen der Arterien.

2.8.5. **Agonisten und Hemmstoffe**

Noradrenalin (NA)

Arterenol® (s. 6.2.2), das eine NA-Konzentration von 5,9 mM aufweist, wurde als Stammlösung bei 4°C aufbewahrt und am Versuchstag mit MOPS-Puffer verdünnt.

Acetylcholin (ACh)

Acetylcholin-Natrium (s. 6.2.2) wurde als 10 mM Stammlösung in MOPS-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Am Versuchstag wurde diese Stammlösung mit MOPS-Puffer verdünnt.

Nitroprussidnatrium (sodium nitroprusside = SNP)

Am Versuchstag wurde eine 10 mM Stammlösung des exogenen NO-Donors (s. 6.2.2) mit 1 mM Na-Acetatlösung als Solvens hergestellt und jeweils unmittelbar vor den Stimulationen mit MOPS-Puffer verdünnt.

L-N^ω-Nitro-Arginin (L-NA)

Am Versuchstag wurde mit MOPS-Puffer eine 10 mM Stammlösung des irreversiblen Hemmstoffes der NO-Synthase (s. 6.2.2) hergestellt. Dabei wurde, um die Substanz im Puffer lösen zu können, der MOPS-Puffer für 30 min auf 50 °C erhitzt und die Lösung mehrfach mit einem Vortexer gemischt. Anschließend wurde die Stammlösung mit MOPS-Puffer verdünnt.

NS1619

1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-on (s. 6.2.2) wurde als 10 mM Stammlösung bei Raumtemperatur gelagert und am Versuchstag mit MOPS-Puffer verdünnt.

Charybdotoxin

Charybdotoxin (s. 6.2.2) wurde als 23 µM Stammlösung in MOPS-Puffer gelöst, bei -20°C gelagert und am Versuchstag mit Pufferlösung verdünnt.

2.8.6. Lösungen für die Rasterelektronenmikroskopie

Fixativ

Aus der 50 %-igen Glutaraldehydlösung (s. 6.2.2) wurde mit MOPS-Puffer eine 2,5 %-ige Lösung hergestellt. Die Proben wurden mindestens 12 h bei 4°C in dieser Lösung fixiert, konnten aber mehrere Wochen bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden, bevor sie weiter für die Elektronenmikroskopie vorbereitet wurden.

Äthanolreihe

Aus wasserfreiem Äthanol reinst (s. 6.2.2) wurden mit MOPS-Puffer die benötigten Verdünnungen hergestellt (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % und 95 %).

2.9. Versuchsprotokolle

2.9.1. Präparation und Zuteilung zu den Versuchsgruppen

Für den funktionellen Vergleich frisch isolierter und chronisch perfundierter Arterien wurden Arterien verglichen, die bei der Präparation in zwei Segmente unterteilt wurden, wobei das eine sofort und das andere nach 48 h in Organkultur funktionell getestet und morphologisch untersucht wurde.

Analog dazu wurden bei den Transfektionsexperimenten und den Versuchen mit erhöhtem transmuralem Druck Arterien verglichen, die bei der Präparation in 3 Segmente unterteilt wurden und zufällig zu den verschiedenen Versuchsgruppen (Antisense-, Sense-, Scrambled oligonucleotide, bzw. 45, 120 und 160 mmHg) zugewiesen wurden.

2.9.2. Stimulation der Widerstandsarterien

Die Zugabe von Agonisten und Hemmstoffen erfolgte durch Austausch von 1/3 des Badvolumens gegen den jeweilig zu applizierenden Stoff in einer Konzentration, die dreifach höher war, als die gewünschte Endkonzentration im Bad. Diese Form der Stimulation wurde gewählt, weil ein Austausch des gesamten Badvolumens zu mechanischen Irritationen des Gefäßes und der Austausch eines zu geringen Volumens zu einer ungleichmäßigen Verteilung im Organbad geführt hätte. Die in der Folge genannten Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentrationen im Organbad.

Die Agonisten und Hemmstoffe sowie der MOPS-Puffer wurden in einem Wasserbad auf 40° C erwärmt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Lösung in der Pipette bis zum Zeitpunkt der Stimulation auf 37° C abkühlte, so dass durch Zupipettieren der Agonisten oder Hemmstoffe keine Temperaturschwankungen im Organbad auftraten.

2.9.3. Spontantonus

Nach Beendigung der Fura-2-Inkubation wurden die Außendurchmesserwerte nach 30-minütiger Äquilibrierung bei einem transmuralen Druck von 45 mmHg gemessen und der Spontantonus nach untenstehender Formel berechnet.

$$ST = (d_{Max} - d_{Basal})/d_{Max} \times 100$$

ST: Spontantonus, d_{max} : Maximaldurchmesser (s. 2.9.7), d_{basal} : Außendurchmesser nach 30-minütiger Äquilibrierung.

2.9.4. Myogene Reaktion

Die myogene Reaktion wurde durch einen Drucksprung von 45 mmHg auf 110 mmHg (3 min) ausgelöst und simultan Calcium- und Außendurchmesserwerte gemessen.

Dabei wurden 2 min nach dem Drucksprung die Calciumänderungen (% des Basalwertes) und Außendurchmesseränderungen (% Umkehrung der druckinduzierten initialen Aufdehnung) nach untenstehenden Formeln (s. 2.10) berechnet.

2.9.5. NA-induzierte Kontraktion und ACh-Dosiswirkungskurven

Die glattmuskuläre und endotheliale Funktion der Arterie wurde durch Stimulation mit NA (0,3 µM) und ACh (1 µM) getestet. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass bei einer kumulativen Erhebung der ACh-Dosiswirkungskurven häufig Vasomotion auftrat, die die Auswertung dieser Versuche erheblich erschwerte. Daher wurden ausschließlich nicht kumulative Dosiswirkungskurven für ACh erstellt.

Die Arterien wurden mit 0,3 µM NA vorkontrahiert und nach 2 min mit 1 µM ACh stimuliert, nach weiteren 2 min mit Puffer gewaschen und anschließend die Stimulation beendet. Dieser Zeitablauf der Stimulation konnte gewählt werden, da sich bei diesen Versuchen zeigte, dass sich die Außendurchmesserwerte und die Calciumwerte nach 1 min Stimulation mit NA oder ACh nicht weiter veränderten.

Nach einer 10-minütigen Ruhephase wurde das Gefäß erneut mit NA stimuliert und die niedrigste ACh-Dosis appliziert. Ebenso wurde mit den verbleibenden Dosen in aufsteigender Reihenfolge verfahren und nach Hemmung der NO-Synthase durch Inkubation mit L-NA (30 μ M, 30 min) die Versuchsreihe wiederholt. Die Werte nach 2 min Stimulation mit ACh (0,001-1 μ M) wurden normiert (s. 2.10) in die Kurve eingetragen.

2.9.6. SNP- und NS1619-Dosiswirkungskurven

Die Dosiswirkungskurven für SNP und NS1619 konnten kumulativ erhoben werden, weil im Gegensatz zu der Stimulation mit ACh keine störende Vasomotion auftrat. Die Arterien wurden ebenfalls mit NA vorkontrahiert und mit aufsteigenden Konzentrationen von SNP (0,01-100 μ M) und NS1619 (3-100 μ M) jeweils 2 min lang in Anwesenheit von 0,3 μ M NA stimuliert.

2.9.7. Untersuchung der Calciumsensitivität des Kontraktionsvorganges

Um die Calciumsensitivität des kontraktilen Apparates zu untersuchen, wurde die extrazelluläre Calciumkonzentration mit einem calciumfreien Puffer, der zusätzlich 1mM des calciumbindenden Chelators EDTA enthielt (s. 2.8.1), ausgetauscht. Anschließend folgte ein Austausch mit einem calciumfreien MOPS-Puffer der 125 mM Kalium und 1 mM EDTA enthielt (s. 2.8.1). Das erhöhte Kalium führte zu einer anhaltenden Depolarisation der Zellmembran, daraus resultiert eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle, so dass extrazelluläres Ca^{2+} in die Zelle einströmen kann. Dadurch wird es möglich, die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Änderungen der extrazellulären zu beeinflussen.

Anschließend wurde die extrazelluläre Calciumkonzentration in Anwesenheit des erhöhten Kaliums schrittweise auf 3 mM erhöht (s. 2.8.1) und simultan Außendurchmesser- und intrazelluläre Calciumwerte registriert.

Intrazelluläre Calciumwerte (% des Basalwertes) nach 3 min Einwirkzeit wurden gegen die korrespondierenden Außendurchmesserwerte (% des Maximaldurchmessers) aufgetragen.

Als Maximaldurchmesser wurden die Außendurchmesserwerte nach 3 min Stimulation mit calciumfreien MOPS-Puffer, der 125 mM Kalium und 1 mM EDTA enthielt, verwendet.

2.9.8. Hemmstoffe

Die Auswirkungen von verschiedenen Hemmstoffen (L-NA, Charybdotoxin) wurden auf die ACh- und NS1619-vermittelten Dilatationen untersucht. Dabei wurden Dosiswirkungskurven jeweils vor und nach Einwirken der jeweiligen Hemmstoffe verglichen.

2.10. Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM für n (Anzahl der Experimente) angegeben. Dabei zeigten absolute Außendurchmesserwerte (AD) ebenso wie die absoluten Ratiowerte der Calciummessung sehr geringe Schwankungen innerhalb der Behandlungsgruppen. Bei Betrachtung der Werte unter stimulierten Bedingungen erwiesen sich jedoch einige Normierungen als sinnvoll.

Bei der myogenen Reaktion wurden die Außendurchmesseränderungen (Δ AD) als Umkehr der druckinduzierten initialen Aufdehnung normiert:

$$\Delta AD = (d_0 - d_2) / (d_0 - d_{\text{basal}}) \times 100.$$

d_0 entspricht dem Außendurchmesser, der initial nach der Aufdehnung durch den Drucksprung von 45 auf 110 mmHg gemessen wird, d_2 entspricht dem Außendurchmesser nach 2 min, d_{basal} dem basalen Außendurchmesser vor der Druckerhöhung.

NA-induzierte Kontraktionen wurden auf den maximalen Außendurchmesser:

$\Delta AD = d_{\text{NA}}/d_{\text{max}} \times 100$ und die korrespondierenden Calciumänderungen auf den Ausgangswert normiert:

$$\Delta Ca = R_{\text{NA}}/R_{\text{basal}} \times 100.$$

d_{NA} und R_{NA} entsprechen den Außendurchmesserwerten bzw. der Ratio nach Stimulation mit 1 μ M NA, d_{max} entspricht dem maximalen Außendurchmesser und R_{basal} der Ratio unter unstimulierten Bedingungen.

Dilatationen der Arterien wurden als % der maximalen Dilatationskapazitäten nach der Formel $\Delta AD = ((d_{\text{Dil}} - d_{\text{NA}}) / (d_{\text{Max}} - d_{\text{NA}})) \times 100$ berechnet.

d_{Dil} entspricht dem Außendurchmesser der Arterien nach Stimulation mit einem Vasodilatator (ACh, SNP oder NS1619) d_{NA} dem Außendurchmesser nach Stimulation mit 1 μM NA und d_{Max} dem maximalen Außendurchmesser der Arterie.

Die korrespondierenden Calciumänderungen (ΔCa_i^{2+}) wurden analog normiert (% Umkehr des NA-induzierten Ca^{2+} -Anstieges):

$$\Delta\text{Ca}_i^{2+} = ((R_{\text{NA}} - R_{\text{dil}}) / (R_{\text{NA}} - R_{\text{basal}})) \times 100;$$

R_{NA} : Ratio nach Stimulation mit NA, R_{dil} : Ratio nach Stimulation mit einem Vasodilatator, R_{basal} Ratio unter unstimulierten Bedingungen.

Die Absolutwerte oder normierten Werte nach Erreichen des Gleichgewichtszustands (2 bzw. 3 min nach Applikation) wurden bei Betrachtung von Arterien vor und nach einer Behandlung mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Messwerte untersucht. Die Werte der verschiedenen Vorbehandlungsgruppen untereinander wurden mit Hilfe des t-Tests für ungepaarte Messwerte auf statistisch signifikante Unterschiede hin analysiert. Bei Irrtumswahrscheinlichkeiten unter 5 % ($p < 0,05$) wurden die Mittelwerte als signifikant voneinander verschieden betrachtet. Bei Mehrfachvergleichen wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt und dabei im Ergebnisteil die korrigierten Irrtumswahrscheinlichkeiten der einzelnen Tests angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Funktioneller Vergleich frisch isolierter und chronisch perfundierter Arterien

Um Einflüsse der Kulturbedingungen auf die glattmuskulären und endothelialen Funktionen von Widerstandsarterien zu untersuchen, wurden die Funktionen der Arterien, die unter Kontrollbedingungen (45 mmHg transmuraler Druck, 48 h) chronisch perfundiert worden waren, mit denen frisch isolierter Arterien verglichen. Dabei wurden alle folgenden Experimente in Anwesenheit von Indometacin (30 μ M) durchgeführt, um sichergehen zu können, eine nur durch NO und/oder EDHF-vermittelte Dilatation zu untersuchen. In früheren Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Hemmung der Cyclooxygenase durch Indometacin in diesen Gefäßen keinen Einfluss auf die ACh-induzierte Dilatation hatte [4].

3.1.1. Glattmuskuläre Funktionen

Spontantonus

Als erstes wurde die Entwicklung des Spontantonus (ST) in beiden Gruppen untersucht. Kultivierte Arterien entwickelten während der 30-minütigen Äquilibrierungsperiode einen Spontantonus von $8,4 \pm 2,2$ % des Maximaldurchmessers, der nicht signifikant verschieden von dem der frisch isolierten Arterien ($8,1 \pm 4,2$ %) war. Dabei führte die Inhibition der NO-Synthase mit L-NA in beiden Behandlungsgruppen zu keiner Verstärkung des Spontantonus.

Die Maximaldurchmesser waren bei den kultivierten und frisch isolierten Arterien nicht signifikant voneinander verschieden (frisch isolierte: 217 ± 11 , kultivierte: 211 ± 13 μ m, jeweils $n = 8$).

Myogene Reaktion

Eine Erhöhung des transmuralen Drucks von 45 auf 110 mmHg war in Arterien beider Gruppen gefolgt von einem schnellen Calciumanstieg und einer Vasokonstriktion (s. Abb. 5). Dabei waren die Calciumanstiege (kultivierte Arterien: um $29 \pm 3\%$ und frisch isolierte Arterien: um $29 \pm 11\%$ des Basalwertes) und die Kontraktionen (Umkehrung der initialen Aufdehnung) (kultivierte: um $49 \pm 14\%$ und frisch isolierte: um $51 \pm 16\%$) in beiden Gruppen nahezu identisch.

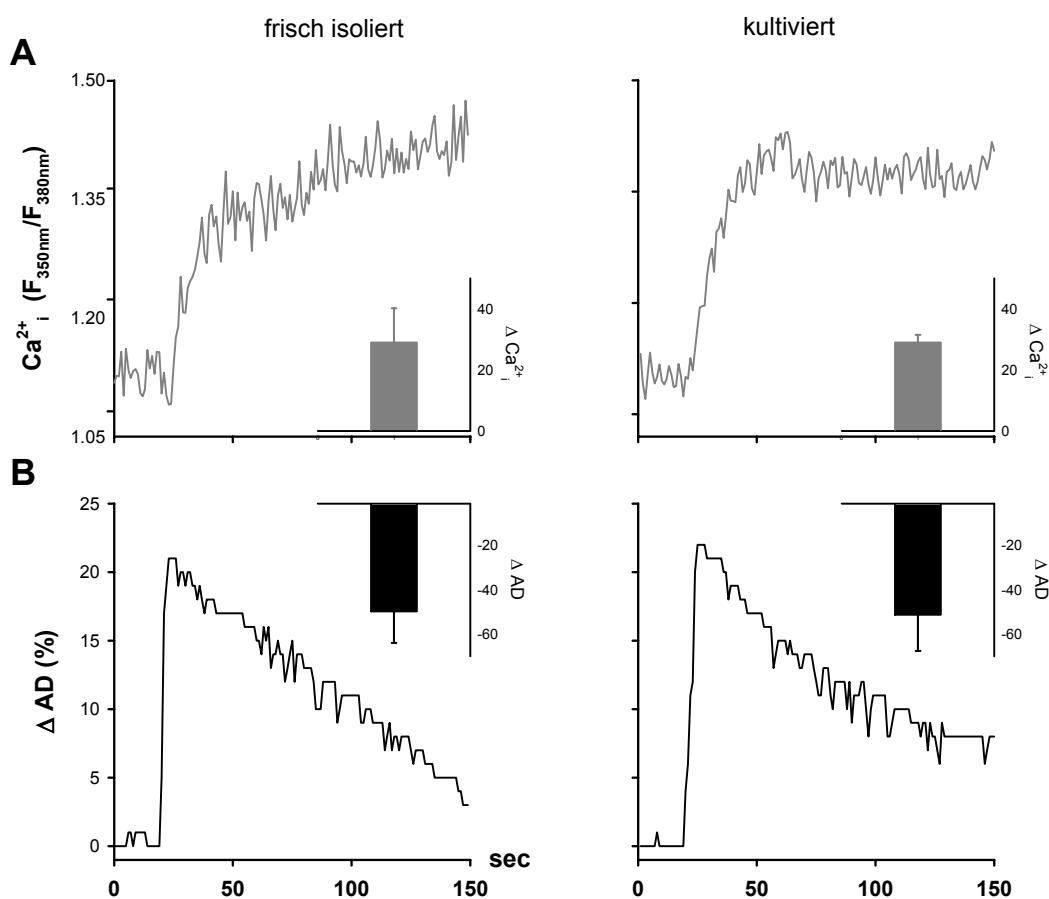


Abb. 5: Myogene Reaktion. A: Originalregistrierungen von Calciumänderungen nach einem Anstieg des transmuralen Drucks von 45 auf 110 mmHg. Links im Bild frisch isolierte Arterien, rechts kultivierte. Die kleinen Abbildungen zeigen Mittelwerte der Calciumänderungen (% des Basalwertes; s. 2.10) nach 2 min erhoben (je $n = 7$). B: Korrespondierende Änderungen des Außendurchmessers (% des Ausgangswertes). Die kleinen Abbildungen zeigen Mittelwerte der Außendurchmesseränderung (% Umkehrung der druckinduzierten initialen Aufdehnung s. 2.10).

NA-induzierte Kontraktion

NA (0,3 μ M) führte bei frisch isolierten und kultivierten Arterien zu ähnlich hohen Calciumanstiegen in der glatten Muskulatur (um 36 ± 3 %, bzw. 33 ± 2 % des Basalwertes), denen eine Kontraktion vergleichbaren Ausmaßes (um 43 ± 5 %, bzw. 42 ± 4 % des Ausgangsdurchmessers) folgte. Diese NA-Konzentration wurde in den folgenden Experimenten verwendet, um die Arterien vorzukontrahieren, da deren Spontantonus zu gering war, um die Wirkung von Vasodilatatoren detailliert beurteilen zu können.

SNP-induzierte Dilatation

Die dosisabhängige Dilatationen nach Stimulation mit dem exogenen NO-Donor SNP (0,01 - 10 μ M) waren in frisch isolierten und kultivierten Gefäßen ebenfalls nicht signifikant voneinander verschieden (s. Abb. 6).

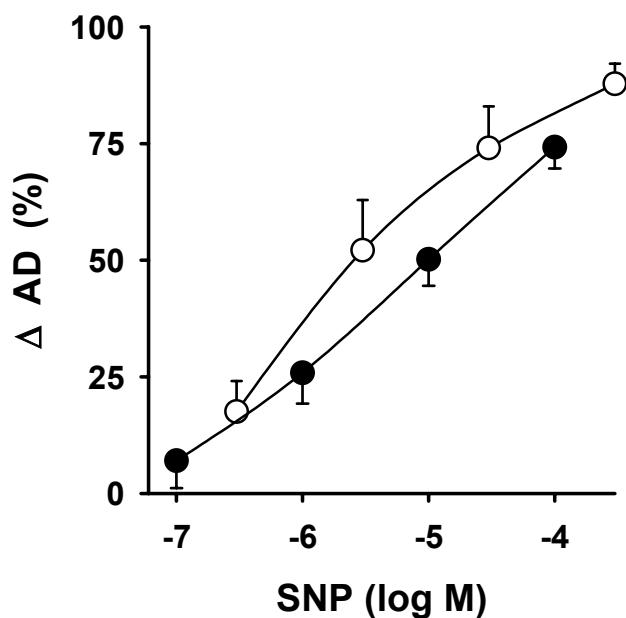


Abb. 6: SNP-Dosiswirkungskurve (0,1-100 μ M), frisch isolierte -○- und kultivierte Arterien -●-, Δ AD (%): Dilatationskapazität (s. 2.10) ; je $n = 6$.

3.1.2. Endothelfunktionen

Calciummessung im Endothel

Abb. 7 zeigt Anstiege des endothelialen Calciums nach Stimulation mit 1 μ M ACh, welche eine Voraussetzung für die Produktion von NO und EDHF darstellen. In frisch isolierten und kultivierten Arterien waren die Calciumanstiege bezüglich ihrer Amplituden und Kinetiken identisch (repräsentative Experimente aus Versuchsgruppen von jeweils $n = 3$).

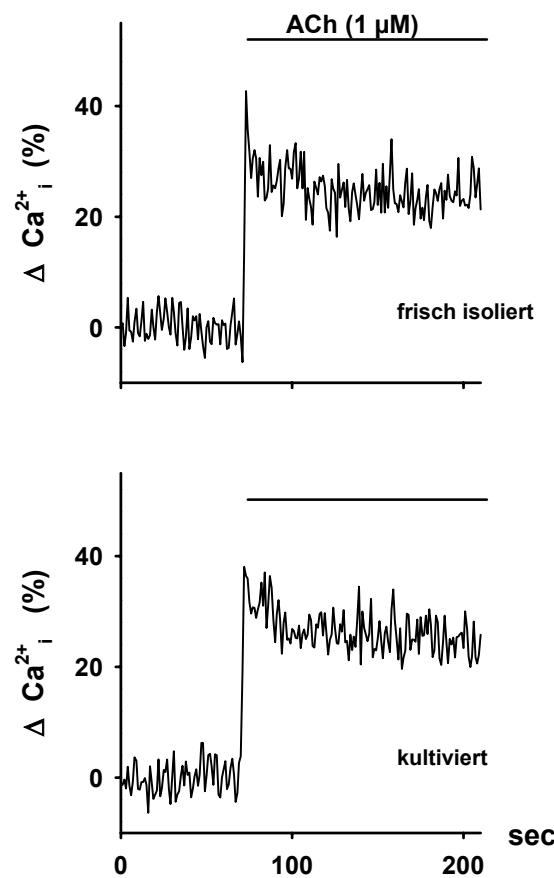


Abb. 7: Endothelialer Calciumanstieg (% des Basalwertes) nach Stimulation mit 1 μ M ACh, oben frisch isolierte, unten kultivierte Arterien (repräsentative Experimente aus Versuchsgruppen von jeweils $n = 3$).

Calciummessung im glatten Muskel

Im glatten Muskel führt die Stimulation einer vorkontrahierten Arterie mit $1 \mu\text{M}$ ACh zu einem Calciumabfall, der von einer Dilatation begleitet wurde (Abb. 8). Dabei zeigten sowohl Calciumabfälle als auch Dilatationen in frisch isolierten und kultivierten Arterien die gleiche Kinetik (Statistik s. Abb. 9).

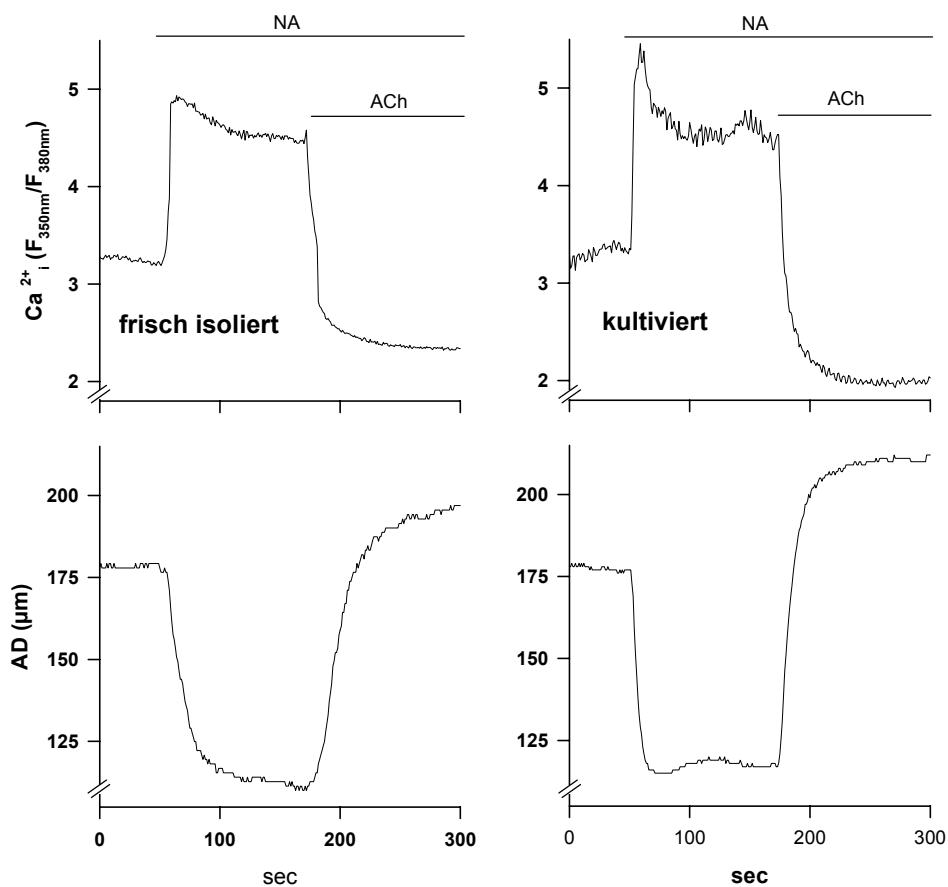


Abb. 8: Originalregistrierungen repräsentativer Experimente (Statistik s. Abb. 9), Calciummessung im glatten Muskel (oben) und simultane Außendurchmessermessung (AD, unten). Links frisch isolierte, rechts kultivierte Arterie. Vorkontraktion mit Noradrenalin (NA, $0,3 \mu\text{M}$) und anschließende Stimulation mit Acetylcholin (ACh, $1 \mu\text{M}$).

Endothelabhängige Dilatation

ACh (0,01-1 μ M) induzierte dosisabhängig Calciumabfälle und Dilatationen (s. Abb. 9), die durch kombinierte Vorbehandlung mit L-NA und Indometacin (jeweils 30 μ M) nur wenig nach rechts verschoben wurden, daher wird in diesen Arterien die ACh-induzierte Dilatation nur in geringem Maße durch NO vermittelt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen kultivierten und frisch isolierten Arterien. Antworten auf 1 μ M ACh wurden durch die Behandlung mit der Kombination von Indometacin und L-NA nicht verringert, während sie nach Behandlung mit dem K_{Ca} -Blocker Charybdotoxin (1 μ M) vollständig gehemmt waren, was darauf hinweist, dass die Antworten auf 1 μ M ACh in diesen Arterien vollständig durch EDHF vermittelt sind.

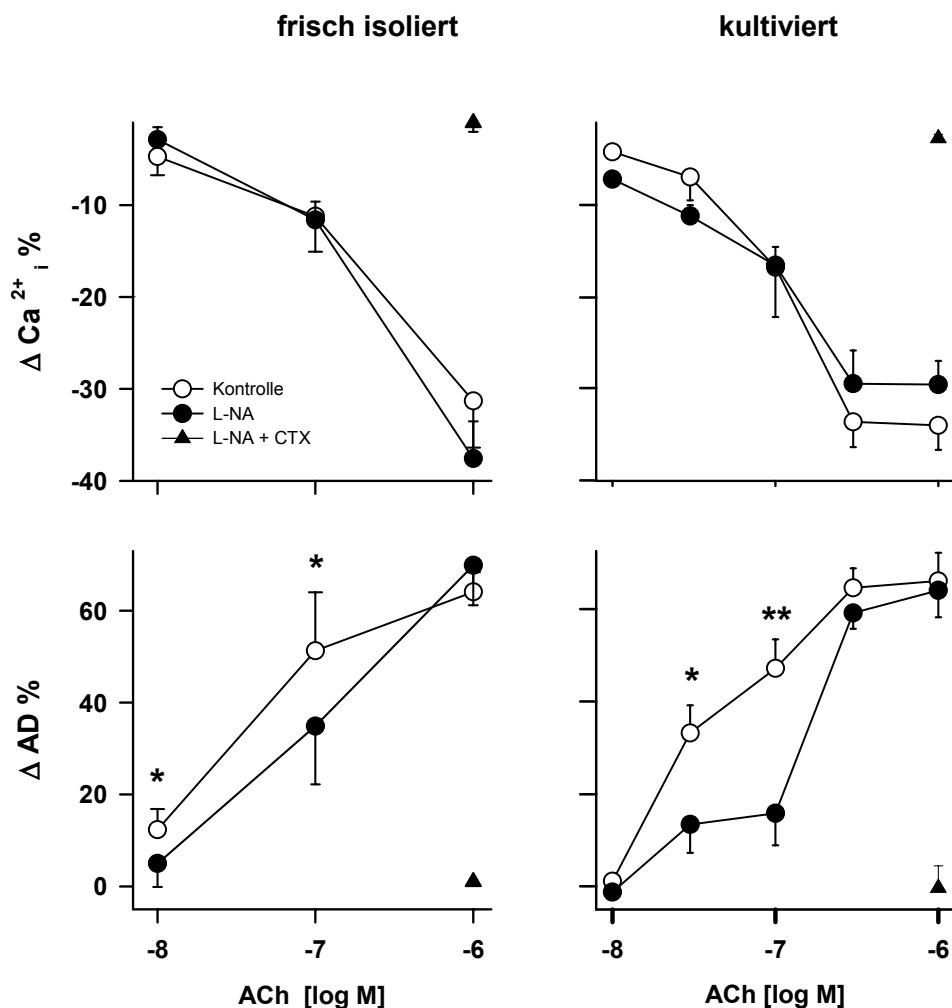


Abb. 9: ACh-Dosiswirkungskurven frisch isolierter (linke Bildhälfte) und kultivierter Arterien (rechte Bildhälfte). Oben sind Calciumänderungen (% Umkehr des NA-induzierten Ca^{2+} -Anstieges; s. 2.10), unten Außendurchmessermesseränderungen (% der Dilatationskapazität) angegeben; je $n = 8$.

*: $p < 0.05$ Kontrolle vs. L-NA; **: $p < 0.01$ Kontrolle vs. L-NA.

Um zu überprüfen, ob diese Antworten endothelvermittelt ablaufen, wurde ein Teil der Arterien ($n = 6$) durch Perfusion mit Luft (5 min) deendothelialisiert.

Dabei verursachten die am Endothel vorbeifließenden Luftblasen durch ihre Oberflächenspannung sehr große Scherkräfte, die zu einem Zerreißen der Endothelzellmembranen führten. In frisch isolierten sowie in kultivierten Arterien führte eine Deendothelialisierung mit Luftblasen zu einem vollständigen Erlöschen der Antworten auf ACh, hatte aber keinen Effekt auf die NA-induzierte Kontraktion (o. Abb.).

3.2. Effekte der Transfektion mit Antisense-Oligonucleotiden gegen CYP450

3.2.1. Expression von CYP2C in der Aorta und der A. gracilis

Um festzustellen, ob CYP2C8 in Hamsterarterien exprimiert wird, wurde RNA aus der Aorta und der A. gracilis isoliert und mittels rtPCR analysiert. Dabei wurde zunächst aus der RNA mittels reverser Transkriptase die komplementäre cDNA hergestellt. In der anschließenden PCR wurde mit Hilfe von PCR-Primern, die aus einer menschlichen CYP2C8-Sequenz stammen, die homolog zu dem Hamster CYP2C25-27 ist, ein Fragment amplifiziert, das 616 bp groß war (s. Abb. 10 A).

Dabei zeigte sich in der A. gracilis, verglichen mit der Aorta des Hamsters, nur ein schwaches Signal. Zur Kontrolle des Erfolgs der rtPCR wurde zusätzlich die mRNA der GAPDH (s. 10 C), eines stabil exprimierten internen Kontrollgens, amplifiziert, die sich in der A. gracilis ebenfalls nur in geringen Mengen nachweisen ließ.

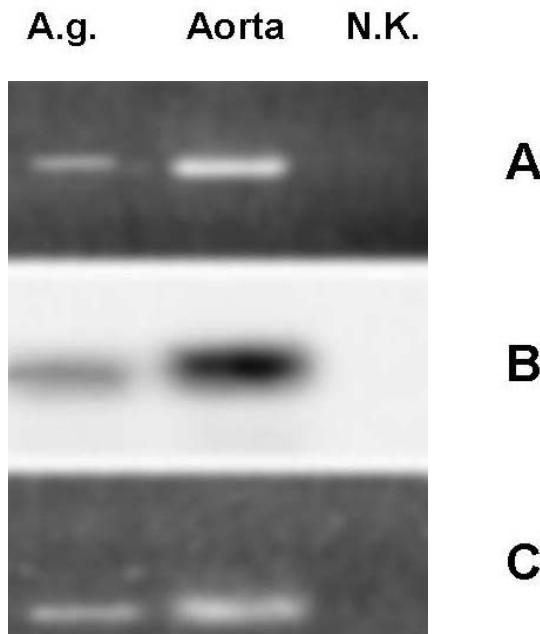


Abb. 10: CYP2C-Genexpression in A. gracilis (A. g.) und Aorta. A: rt-PCR der CYP450 mRNA, B: Hybridisierung mit einem DNA-Segment, dass für CYP2C8 codiert, C: GAPDH, N. K.: Negativkontrolle.

Dies zeigt, dass aus der A. gracilis nur eine geringe Menge RNA isoliert werden konnte und sich dadurch die geringe Amplifikation erklärt. Zusätzlich wurde, um sicherzugehen, ob das Amplifikat die richtige Sequenz aufwies, eine *in-situ*-Hybridisierung mit einem

DNA-Fragment aus dem CYP2C8-Gen durchgeführt (Abb. 10 B). Dabei konnte gezeigt werden, dass CYP2C8 auch in der A. gracilis exprimiert wird.

Als zusätzliche Positivkontrolle für CYP2C8 wurden die Leber und das Herz des Hamsters, die CYP2C8 sehr stark exprimieren, mittels rtPCR analysiert, wobei sich eine starke Amplifikation eines Fragments von ebenfalls 616 bp nachweisen ließ (o. Abb.).

3.2.2. Lokalisation der Oligonucleotide in der Arterienwand/ Transfektionseffizienz

Die Lokalisation der FITC-markierten Oligonucleotide in der Arterienwand erfolgte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie (s. 2.6).

Unbehandelte Arterien zeigten im Vergleich zu behandelten keine nennenswerte Emission (> 510 nm), wenn sie mit Laserlicht ($\lambda = 488$ nm) angeregt wurden.

Abb. 11 A zeigt ein konfokales Bild, bei dem die Schnittebene längs zur Arterienachse in der Ebene der Endothelzellen gewählt wurde. Dabei ist ein Durchlichtbild (rote Farbcodierung), das in der Ebene fokussiert wurde, in dem die FITC-Fluoreszenz (grüne Farbcodierung) aufgenommen wurde, übereinander projiziert dargestellt.

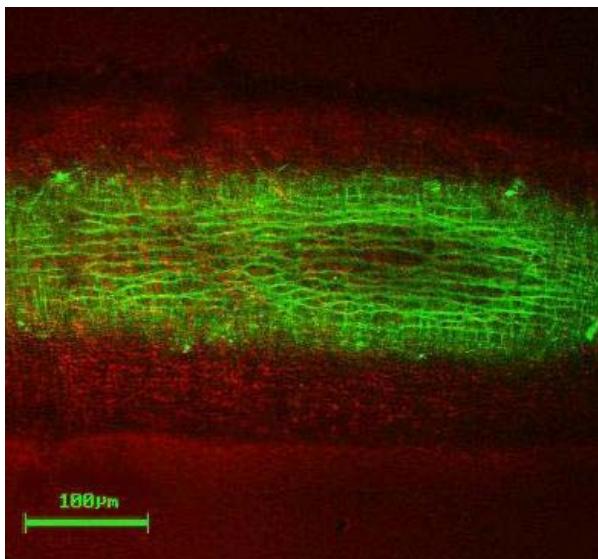
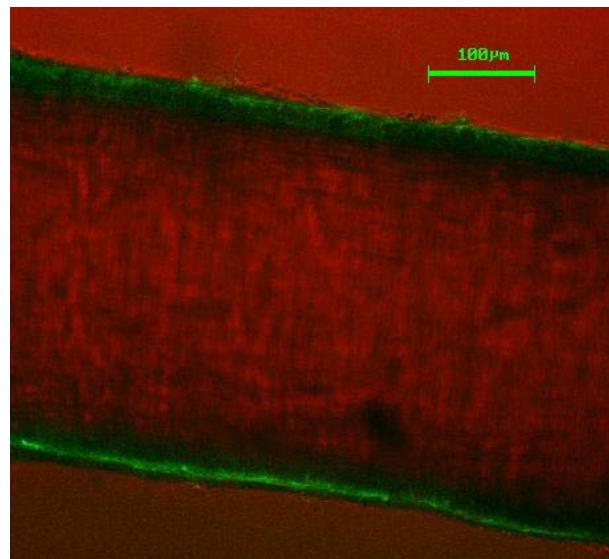
A**B**

Abb. 11: Verteilung der FITC-markierten Oligonucleotide (grüne Fluoreszenz) in der Gefäßwand. A: tangentialer Schnitt durch die Intima, B: Schnitt durch die Mitte der Arterie.

Das Fluoreszenzbild zeigt gleichmäßig angefärbte, spindelförmige Elemente, die längs zur Achse der Arterie angeordnet sind und deren Form und Größe (Länge: $32,5 \pm 5,6 \mu\text{m}$ und Breite: $11,6 \pm 1,8 \mu\text{m}$, $n = 50$) den Endothelzellen in einem intakten Gefäß entsprechen.

Abb. 11 B zeigt ein analog angefertigtes Bild, bei dem der Rand der Arterie fokussiert wurde, dabei fluoreszierten nur die luminalen Anteile der Arterienwand.

Zusätzlich wurden in einigen Arterien ($n = 5$) optische Schnitte im Abstand von $5 \mu\text{m}$ angefertigt und in Serie aufgezeichnet, dabei zeigte sich eine durchgehende Fluoreszenz des Endothels, woraus man eine hohe Transfektionseffizienz ableiten kann (o. Abb.).

Außerdem wurden deendothelialisierte Arterien mit Oligonucleotiden transfiziert und unter dem konfokalen Mikroskop untersucht (o. Abb.). Dabei zeigten sich nur spindelförmige Strukturen, die senkrecht zur Gefäßachse orientiert und deutlich schmäler und länger als die oben erwähnten, waren. Form und Lokalisation in der Arterienwand sprechen dafür, dass es sich hierbei um glatte Muskelzellen handelte.

3.2.3. NA-induzierte Kontraktion

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Effekten einer Antisensebehandlung um einen spezifischen Effekt der Antisense-Oligonucleotide (AS, $n = 8$) auf die EDHF-vermittelte Dilatation handelt, wurden zusätzliche Arterien mit den Kontrolloligonucleotiden Sense- (S, $n = 6$) und Scrambled- (Scr, $n = 6$) transfiziert und deren Einfluss auf die NA-induzierte Kontraktion untersucht.

Die NA-induzierten Calciumanstiege (AS: um 43 ± 5 , S: 41 ± 2 und Scr: 39 ± 4 % des Basalwertes) und Kontraktionen (AS: um 43 ± 1 , S: 41 ± 2 und Scr: 45 ± 1 % des Maximaldurchmessers) waren in Sense-, Scrambled- und Antisense-behandelten Arterien nicht signifikant voneinander verschieden.

3.2.4. EDHF-vermittelte Dilatation

ACh (1 μ M) induzierte in Anwesenheit von L-NA bei Sense- und Scrambled-transfizierten Arterien einen Calciumabfall, der nicht signifikant verschieden von dem der nicht transfizierten Arterien war (s. Abb. 12). Die Dilatationen der Sense- (auf 86 \pm 3 % der Dilatationskapazität), Scrambled (auf 77 \pm 6 %) und nicht transfizierten Arterien (auf 87 \pm 7 %) waren ebenso nicht signifikant voneinander verschieden.

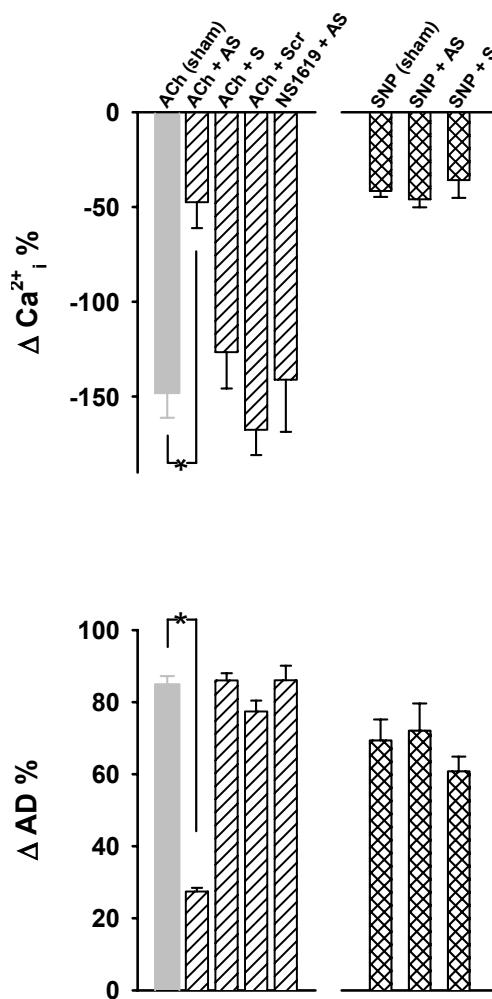


Abb. 12: Effekte der Oligonukleotidbehandlung [antisense (n = 8), sense (n = 4) und scrambled (n = 4)] auf die ACh (1 μ M), NS1619 (100 μ M) und SNP (30 μ M) -induzierten Calciumabfälle (% Umkehr der NA-induzierten Ca^{2+} -Anstiegs; s. 2.10) und Dilatationen (% der Dilatationskapazität).

Im Gegensatz dazu reduzierte die Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden den ACh-induzierten Calciumabfall um 58 % und die Dilatationen um 76% (auf 47 \pm 8% der Dilatationskapazität, $p < 0,05$), verglichen mit den nicht transfizierten Arterien.

Die Antworten auf Stimulation mit dem spezifischen K_{Ca} -Kanalöffner NS1619 blieben durch die Antisensebehandlung unbeeinflusst.

3.2.5. SNP-induzierte Dilatation

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen antisense- und sensebehandelten Arterien in der maximalen SNP-induzierten Dilatation (10 μ M; um $62 \pm 4\%$, $72 \pm 8\%$ der Dilatationskapazität; s. Abb. 12).

3.2.6. Endothelialer Calciumanstieg

Im Gegensatz zum Calciumabfall im glatten Muskel war der ACh-induzierte (1 μ M) Calciumanstieg im Endothel in Antisense-transfizierten Arterien verglichen mit Sense-transfizierten nicht verringert (s. Abb. 13).

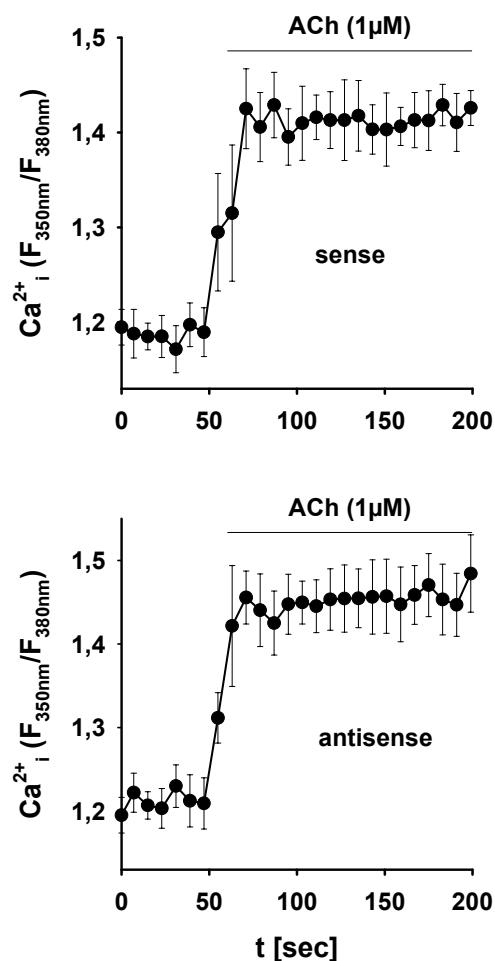


Abb. 13: Endothelialer Calciumanstieg in Antisense- und Sense-transfizierten Widerstandsarterien. Die Abbildungen zeigen die Summenkurven der Calciumwerte (Ratio) nach Stimulation mit 1 μ M ACh aus Versuchsgruppen von $n = 5$ (Sense-) bzw. $n = 4$ (Antisensegefäß) \pm SEM.

3.3. Effekte von chronisch erhöhtem transmuralen Druck

Um den isolierten Effekt von chronisch erhöhten transmuralen Drucken auf die glattmuskuläre und endotheliale Funktion zu untersuchen, wurden Skelettmuskelarterien für 48 h mit Kulturmedium bei transmuralen Drucken von 45, 120 und 160 mmHg (SMA_{45} , SMA_{120} , SMA_{160}) perfundiert und deren Morphologie und Funktionen miteinander verglichen.

3.3.1. Morphologische Untersuchungen

Abb. 14 zeigt jeweils repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von einer frisch isolierten Arterie (A) und Arterien, die unter transmuralen Drucken von 120 (B) und 160 mmHg (C) perfundiert wurden. Die Arterienwand wurde dabei gefenstert, um die Intima beurteilen zu können. Frisch isolierte Arterien, SMA_{120} und SMA_{160} zeigen eine durchgängige Zellschicht, die das Lumen auskleidet. Es waren also keine strukturellen Schäden, die sich mit der Rasterelektronenmikroskopie auflösen lassen, an der Endothelschicht zu erkennen.

In Abb. 14 B im rechten Bildrand und in C in der Mitte handelt es sich um Präparationsartefakte.

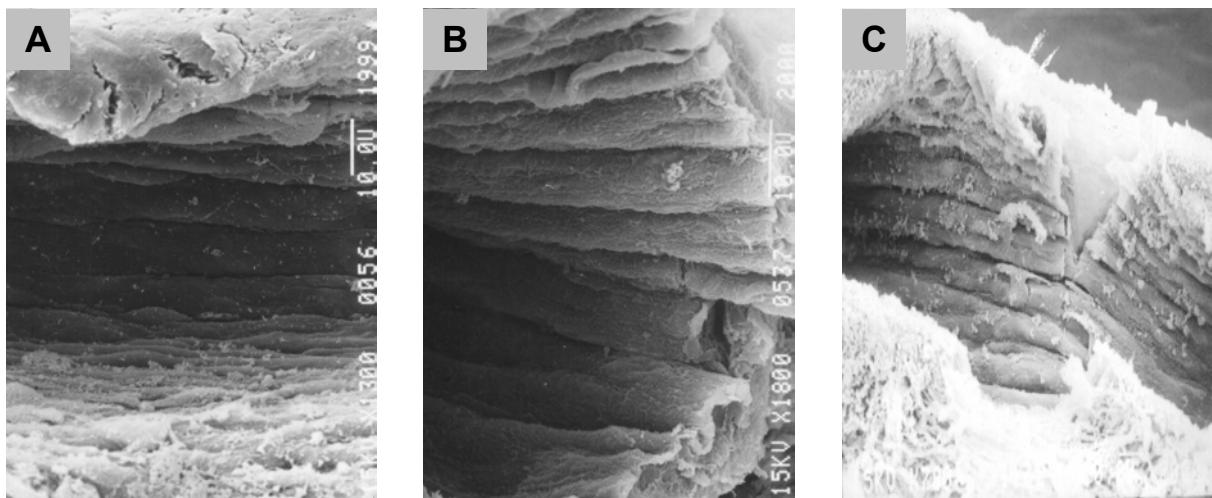


Abb. 14: REM-Bilder von frisch isolierten Widerstandsarterien (A), SMA_{120} (B) und SMA_{160} (C), Aufsicht auf die Intima der gefensterten Arterien.

3.3.2. Basalwerte

Arterien, die unter transmuralen Drucken von 120 und 160 mmHg kultiviert wurden, zeigten unter unstimulierten Bedingungen (30 min Äquilibrierung bei 45 mmHg) um 25 bzw. 49 % ($p < 0,05$) höhere Calciumwerte (Ratio) verglichen mit Arterien, die unter Kontroldruck perfundiert wurden (s. Abb. 15 A). Die korrespondierenden Außendurchmesser waren in SMA₁₂₀ und SMA₁₆₀ signifikant kleiner (um 16 bzw. 8 %, $p < 0,05$) als bei SMA₄₅ (s. Abb. 15 B), während die Maximaldurchmesser (s. 2.9.7) der unter den verschiedenen Drucken kultivierten Arterien nicht signifikant voneinander verschieden waren (SMA₄₅: $255 \pm 10 \mu\text{m}$, SMA₁₂₀: $230 \pm 11 \mu\text{m}$ und SMA₁₆₀: $237 \pm 17 \mu\text{m}$).

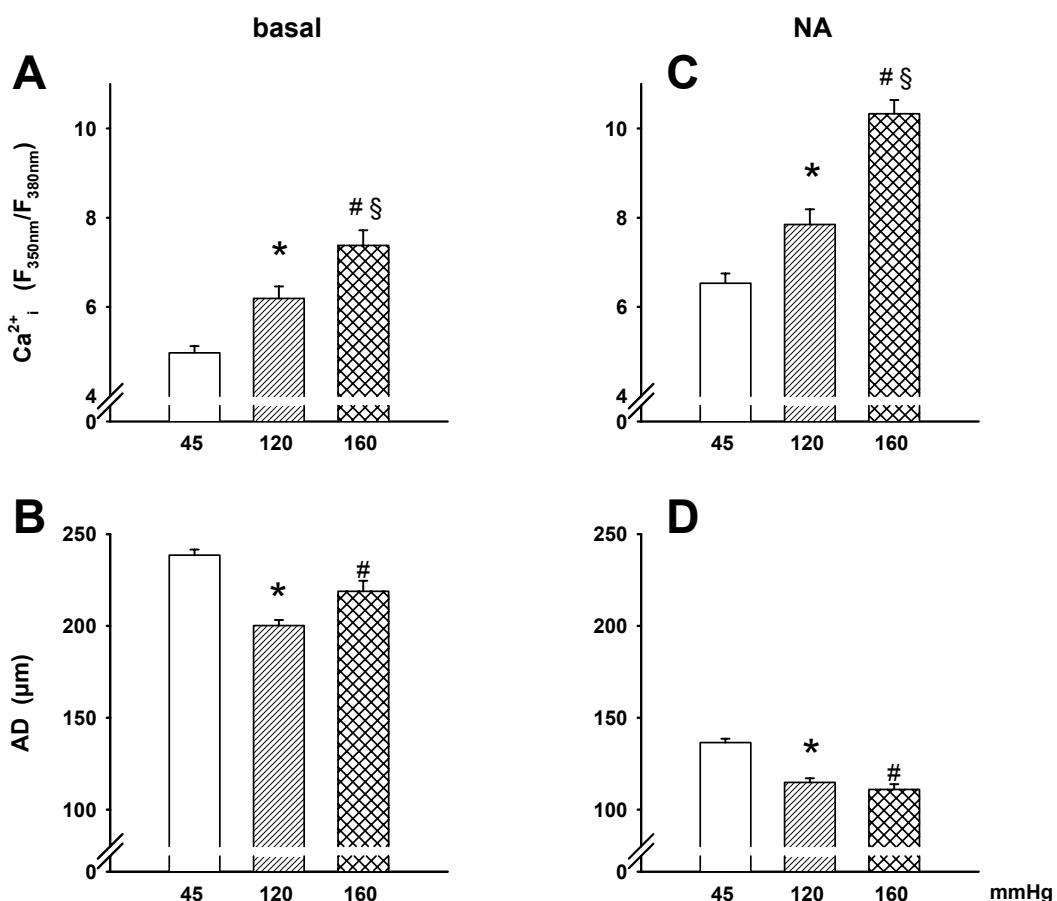


Abb. 15: Calcium und Außendurchmesserwerte von SMA₄₅ ($n = 7$), SMA₁₂₀ ($n = 7$) und SMA₁₆₀ ($n = 4$) unter unstimulierten Bedingungen und nach Stimulation mit Noradrenalin.

*: $p < 0,05$ SMA₁₂₀ vs. SMA₄₅; #: $p < 0,05$ SMA₁₆₀ vs. SMA₄₅, §: $p < 0,05$ SMA₁₆₀ vs. SMA₁₂₀.

3.3.3. NA-induzierte Kontraktion

Calciumwerte, die nach Stimulation mit NA (0,3 μ M 2 min) erreicht wurden, waren in Arterien, die unter transmuralen Drucken von 120 und 160 mmHg perfundiert wurden, gegenüber der Kontrolle (45 mmHg) erhöht (um 20 bzw. 58 %, $p<0.05$) (s. Abb. 15 C). Außerdem waren die korrespondierenden Außendurchmesser um 16 bzw. 18 % geringer als die der Arterien, die unter Kontroldruck perfundiert wurden (s. Abb. 15 D). Zusätzlich zeigte sich, dass Arterien, die unter transmuralen Drucken von 160 mmHg kultiviert wurden, auch einen um 53 % höheren Noradrenalin-induzierten Calciumanstieg (% des Basalwertes) aufwiesen und die nachfolgende Kontraktion um 16 % im Vergleich zur Kontrolle verstärkt war (o. Abb.).

3.3.4. Calciumsensitivität der Myofilamente

Abb. 16 zeigt Arterien, die mit calciumfreiem MOPS-Puffer, der 125 mM Kalium enthielt, vorstimuliert wurden. Anschließend wurde in Anwesenheit von 125 mM Kalium die extrazelluläre Calciumkonzentration gesteigert (0,5; 1; 2; 3 mM, Versuchsprotokoll s. 2.9.7). Dabei zeigte sich, dass bei vergleichbaren Calciumwerten auch etwa gleiche Außendurchmesser resultierten.

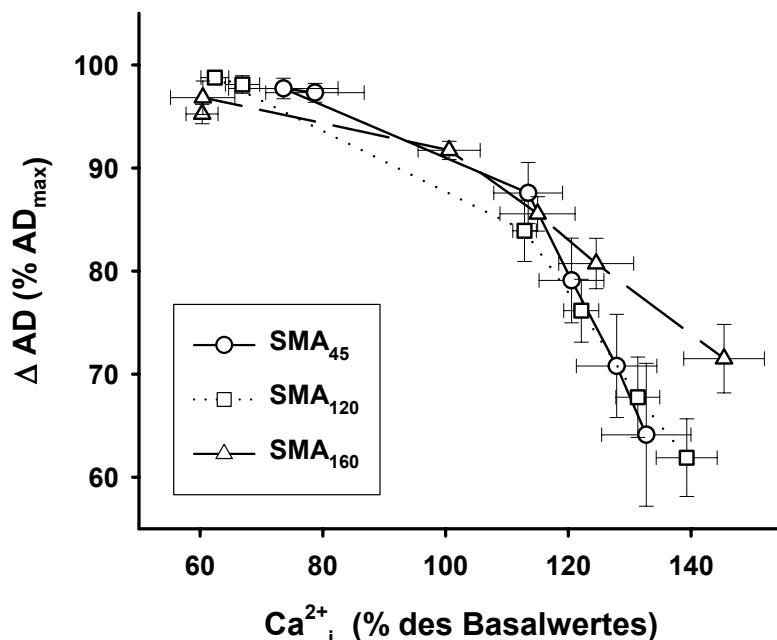


Abb. 16: Stimulation von SMA₄₅ (n = 4), SMA₁₂₀ (n = 4) und SMA₁₆₀ (n = 3) mit MOPS-Pufferlösungen, die 125 mM Kalium und verschiedene Calciumkonzentrationen (0,5; 1; 2; 3 mM) enthielten, dabei wurden die Außendurchmesser- und Calciumwerte simultan gemessen.

3.3.5. Endothelabhängige Dilatation

ACh (0,01-1 μ M) induzierte in den unter verschiedenen transmuralen Drucken kultivierten Arterien dosisabhängig Dilatationen und Calciumabfälle (s. Abb. 17 und 18). Die Calciumabfälle waren nur bei SMA₁₆₀ verringert (um 33 % geringer als SMA₄₅; 1 μ M ACh). Dagegen waren die korrespondierenden Dilatationen sowohl bei SMA₁₂₀ als auch bei SMA₁₆₀ abgeschwächt (um 10 bzw. 21 % im Vergleich zur Kontrolle).

Nach Vorinkubation mit L-NA waren die ACh-induzierten Dilatationen im unteren Dosisbereich (10^{-8} - 10^{-7} M) vollständig aufgehoben (s. Abb. 17), daher sind die Antworten in diesem Dosisbereich NO-vermittelt und wurden durch die Hochdruckbehandlung um 25 bzw. 38% ($3 \cdot 10^{-7}$ bzw. 10^{-7}) abgeschwächt (SMA₁₂₀) bzw. vollständig aufgehoben (SMA₁₆₀).

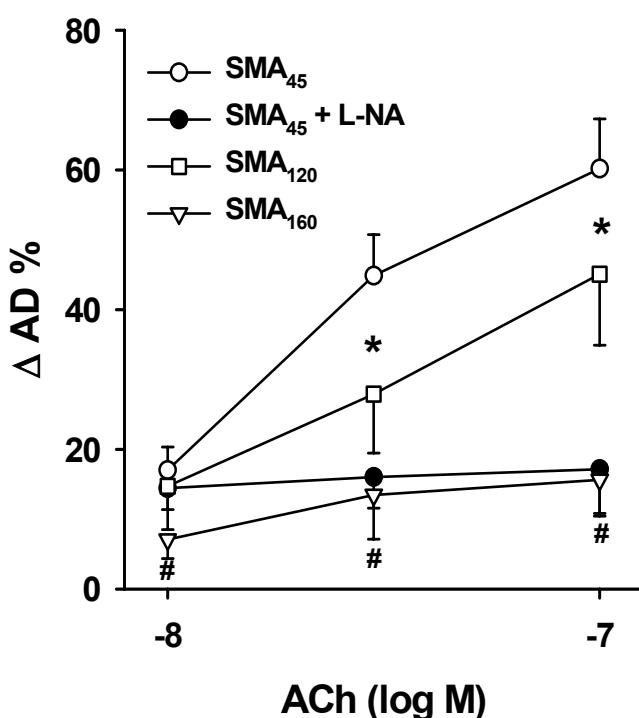


Abb. 17: ACh-Dosiswirkungskurve (10^{-8} - 10^{-7});
*: $p < 0,05$ SMA₁₂₀ vs. SMA₄₅; #: $p < 0,05$ SMA₁₆₀ vs. SMA₄₅, je $n = 7$.

Im höheren Dosisbereich ($>10^{-7}$) ist die ACh-vermittelte Dilatation größtenteils EDHF-mediiert, da sie durch L-NA nur geringfügig beeinflusst wird und mit einem Calciumabfall einhergeht (s. Abb. 9).

Nach Vorinkubation mit L-NA und Indometacin (jeweils 30 μ M) zeigte sich eine Abschwächung des ACh-induzierten Calciumabfalls der SMA₁₆₀ (um 41 %; 1 μ M ACh) und eine Abschwächung der Dilatationen der SMA₁₂₀ und SMA₁₆₀ (um 20 bzw. 47 %; 1 μ M ACh, s. Abb 18).

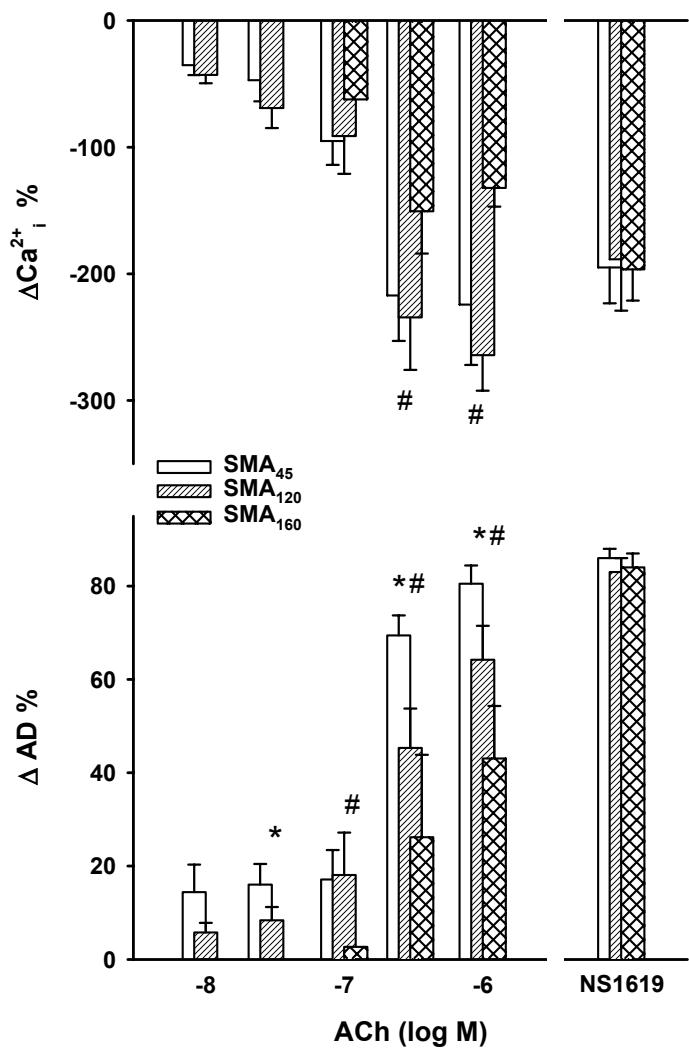


Abb. 18: ACh-Dosiswirkungskurve (10^{-8} - 10^{-6}) von SMA₄₅ (n = 7), SMA₁₂₀ (n = 7), SMA₁₆₀ (n = 4) nach Vorinkubation mit L-NA und Indometacin (jeweils 30 μ M, 30 min) und Stimulation mit NS1619 (100 μ M); *: p < 0,05 SMA₁₂₀ vs. SMA₄₅; #: p < 0,05 SMA₁₆₀ vs. SMA₄₅.

3.3.6. NS1619-induzierte Dilatation

Stimulation mit dem K_{Ca}-Kanalöffner (100 μ M, 2 min) führte in den Arterien, die unter den erhöhten Drucken perfundiert wurden, zu einer vergleichbar starken Dilatation (SMA₁₂₀: 84 \pm 1, SMA₁₆₀: 84 \pm 4 % der Dilatationskapazität) wie bei SMA₄₅ und ACh (1 μ M) bei den Kontrollarterien (81 \pm 6 %) (Abb. 18).

3.3.7. SNP-induzierte Dilatation

SNP ($0,1\text{-}10\mu\text{mol/L}$) führte in SMA_{45} , SMA_{120} und SMA_{160} zu dosisabhängigen Dilatationen, die durch die chronische Erhöhung des Perfusionsdrucks nicht beeinflusst wurden (s. Abb. 19).

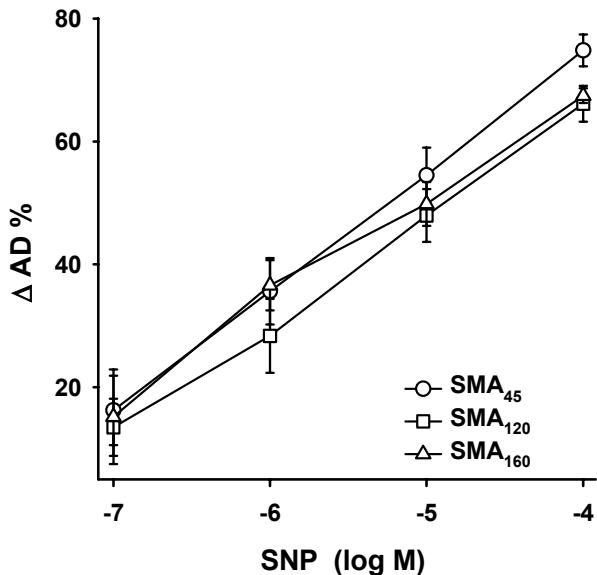


Abb. 19: SNP-Dosiswirkungskurve ($10^{-7}\text{-}10^{-4}$) für SMA_{45} ($n = 6$), SMA_{120} ($n = 6$) und SMA_{160} ($n = 4$); Außendurchmesseränderungen werden als % der Dilatationskapazität angegeben.

3.3.8. Calciummessung im Endothel

Die endothelialen Calciumanstiege, die Voraussetzung für die NO- und EDHF-Produktion sind, waren in SMA_{45} und SMA_{120} nahezu identisch (repräsentative Experimente aus Versuchsgruppen mit je $n = 3$) (s. Abb. 20).

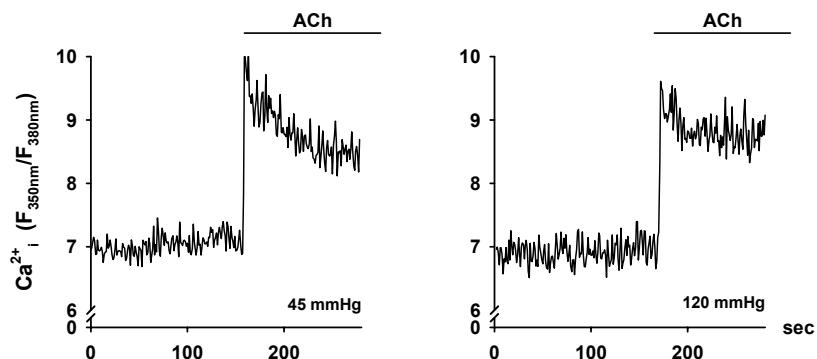


Abb. 20: Endotheliale Calciumanstiege nach Stimulation mit $1\mu\text{M ACh}$ in SMA_{45} und SMA_{120} . Die gezeigten Originalregistrierungen waren repräsentativ für $n = 3$.

4. Diskussion

In dieser Studie konnten zum ersten Mal endotheliale und glattmuskuläre Funktionen isolierter Widerstandsarterien über 48 h in Kultur intakt gehalten werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, nun in intakten Arterien Transfektionsversuche durchzuführen, was bisher nur in Zellkulturen möglich war. Zusätzlich können adaptive Prozesse der Gefäßwand und Veränderungen des Genexpressionsmusters untersucht werden. Hierzu gehören z. B. Auswirkungen von isoliert erhöhtem transmuralen Druck, Mechanismen des vaskulären Remodeling, sowie die Analyse chronischer Effekte von Pharmaka. Bisher wurde die Wirkung verschiedener Pharmaka an Arterien akut, also im Bereich von wenigen Minuten untersucht. Nun können die chronischen Effekte, die erst nach ein bis zwei Tagen auftreten, untersucht werden. Der Vorteil dieser isoliert perfundierten Arterien liegt darin, dass die Kulturbedingungen, wie z. B. die Zusammensetzung des Mediums oder der transmurale Druck der Gefäße definiert und kontrolliert werden können. Im Gegensatz dazu sind in Ganztiermodellen systemische Effekte nicht kontrollierbar und erschweren daher die Interpretation der Versuchsergebnisse bezüglich der Ursache der erzielten Effekte.

Ergebnisse aus Experimenten unter Verwendung von Zellkulturen sind nur schwer auf die Verhältnisse in intakten Gefäßen übertragbar. Unter Kulturbedingungen können Änderungen des Phänotyps im Vergleich zu Zellen, die sich in ihrer natürlichen Umgebung befinden, auftreten. Durch die Auflösung des Zellverbandes ist eine Interaktion der verschiedenen Zelltypen nicht mehr gegeben und es kommt z. B. zu Veränderungen des Cytoskeletts und z. B. der Expression oder Präsentation von Rezeptoren. Für den glatten Muskel ist bekannt, dass die Zellen rasch vom kontraktilem in den synthetischen Phänotyp entdifferenzieren [6, 64, 73], wobei das Genexpressionsmuster insgesamt stark verändert wird. Diese Veränderungen der Zellen unter Kulturbedingungen im Vergleich zu Zellen, die sich in ihrer natürlichen Matrix befinden, erschweren die Interpretation von Daten aus Zellkulturexperimenten zusätzlich. Daher können Organkulturen wie die hier entwickelte zum besseren Verständnis von Gefäßfunktionen beitragen.

In vorherigen Versuchen wurden nur größere Arterien (z.B. A. carotis, Aorta) kultiviert und lediglich biochemische, strukturelle und funktionelle Untersuchungen des glatten

Muskels durchgeführt, jedoch keine Untersuchungen über endotheliale Funktionen. Kleppisch et al. berichten sogar darüber, dass es ihnen nicht gelungen sei, die Endothelfunktion zu erhalten [40]. Zusätzlich wurde in einer Studie festgestellt, dass unter deren statischen Bedingungen die glattmuskuläre Kontraktion abnahm [10] oder es wurden nur strukturelle und keine funktionellen Tests durchgeführt [1].

In dieser Untersuchung wurden die isolierten Arterien 48 h lang unter physiologischem transmuralem Druck und unter Fluss kultiviert. Auf diese Weise erfolgt eine physiologische Dehnung der Arterienwand und das Endothel wird durch die Wandschubspannung chronisch stimuliert. Arterien, die ohne diese Stimuli in Petrischalen kultiviert wurden, zeigten eine, verglichen mit frisch isolierten Arterien, deutlich abgeschwächte glattmuskuläre Kontraktion [10, 40] und keine endothelabhängige Dilatation [40]. Im Gegensatz dazu waren isolierte Arterien, die 48 h lang unter physiologischem transmuralen Druck und Fluss kultiviert wurden, in der Lage, einen –wenn auch geringen- Spontantonus zu entwickeln, der nicht signifikant verschieden von dem der Kontrollarterien war. Ferner zeigten die kultivierten Arterien vergleichbare kontraktile und endotheliale Funktionen wie die frisch isolierten. Diese Stimuli scheinen also die Entdifferenzierung der Endothel- und glatten Muskelzellen in diesem Modell zu verhindern.

Dass Arterien, die unter diesen Bedingungen kultiviert wurden, eine intakte Noradrenalin-induzierte Konstriktion aufweisen, zeigt, dass sich die glatten Muskelzellen während der Kulturzeit nicht in dem Maße entdifferenziert haben, das dies in einem Verlust der Kontraktilität resultieren würde. Im Gegensatz zu vorherigen Studien [40] waren die ACh-induzierten Dilatationen in frisch isolierten und kultivierten Arterien identisch. Es konnten also die Endothelfunktionen vollständig erhalten werden. Dieses ist ein deutlicher Vorteil gegenüber Endothelzellkulturen, in denen typischerweise eine Herunterregulation der muskarinergen Rezeptoren auftritt, die in einem Verlust der ACh-Antwort resultiert [68]. Die ACh-induzierte Dilatation wird durch verschiedene Autakoide vermittelt, daher wurde zusätzlich zu der Summenantwort auch überprüft, ob die Effekte der verschiedenen Autakoide in kultivierten Arterien erhalten und ob deren Anteil an der Dilatation konstant geblieben war.

In Versuchen an frisch isolierten Arterien konnte gezeigt werden, dass die ACh-induzierte Dilatation durch NO und EDHF vermittelt wird und der Dilatation ein

endothelialer Calciumanstieg vorausgeht. Der größte Anteil der ACh-induzierten Dilatation in den Widerstandsarterien ist EDHF-vermittelt. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Anteilen der NO und der EDHF-vermittelten Dilatation und im *endothelialen* Calciumanstieg in frisch isolierten und kultivierten Arterien. Daher scheint durch die Organkultur die funktionelle Integrität des muskarinergen Rezeptors und die Koppelung an intrazelluläre Signalwege in den kultivierten Arterien im Gegensatz zu Endothelzellkulturen unverändert zu sein.

Als ein Kandidat für die Identität des EDHF gilt ein Cytochrom P450-abhängiger Metabolit der Arachidonsäure. Durch die geringe Selektivität der zurzeit verfügbaren pharmakologischen CYP-Inhibitoren, die zusätzlich zu CYP auch K_{Ca} -Kanäle blockieren, konnte allerdings nicht geklärt werden, ob die Effekte dieser Substanzen durch die CYP-Inhibition oder durch die K_{Ca} -Blockade hervorgerufen werden. Außerdem erlauben die pharmakologischen Hemmstoffe keine Differenzierung zwischen den verschiedenen Isoformen.

Da mit der Organkulturmethode die Widerstandsarterien über einen Zeitraum von 48 h funktionell intakt gehalten werden konnten, war es mittels der Antisensetechnik möglich, die Auswirkungen einer spezifischen Inhibition von CYP auf die EDHF-vermittelte Dilatation zu untersuchen. Diese Methode der Inhibition der Proteinbiosynthese erlaubt zusätzlich die Differenzierung zwischen den verschiedenen Isoformen.

Für die Transfektion wurden Antisense-Oligonucleotide ausgewählt, die gegen die kodierende Region von CYP2C8 gerichtet waren, da in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass diese Isoform im Endothel exprimiert wird [47] und verschiedene Stereoisomere der Epoxyeicosatriensäure (11,12-; 14,15- und 5,6-EET) durch Epoxygenierung der Arachidonsäure produziert werden [59]. Für 14,15-EETs und 11,12-EETs konnte gezeigt werden, dass sie K_{Ca} -Kanäle in glatten Muskelzellen aktivieren können [5, 46], die Kaliumkanäle, die an der EDHF-vermittelten Dilatation in den Skelettmuskelwiderstandsarterien des Hamsters beteiligt sind [4]. Zusätzlich konnten Fisslthaler et al. [19] und Fleming et al. [20] mittels Gabe des CYP-Inhibitors Sulfaphenazol zeigen, dass in Schweinekoronararterien nur CYP2C9 an der Signalkaskade des EDHF beteiligt ist.

CYP2C8/9 sind die 2C Isoformen, die in menschlichen Endothelzellen isoliert und geklont wurden und entsprechen dem 2C11 der Ratte und dem 2C25-27 des Hamsters.

Die Antisensentransfektion des Endothels von Widerstandsarterien gegen CYP2C8 reduzierte die EDHF-vermittelte Dilatation um 76 % und den korrespondierenden Calciumabfall um 42 %, während die Transfektion mit den Kontrolloligonukleotiden (Sense- und Scrambled-) keine Effekte auf die endotheliale Relaxation zeigte.

Im Gegensatz zu den pharmakologischen Hemmstoffen hatte die Antisensentransfektion keinen Einfluss auf die Funktion des K_{Ca} -Kanals im glatten Muskel, da die Wirkung des K_{Ca} -Kanalöffners NS1619 durch die Transfektion nicht beeinträchtigt wurde. Zusätzlich zeigten sich keine Unterschiede der AS-transfizierten Arterien bezüglich der NA-induzierten Vorkontraktion und der SNP-induzierte Dilatation im Vergleich zur Kontrolle. In den glatten Muskelzellen von transfizierten Arterien, deren Endothel intakt war, konnte keine FITC-Fluoreszenz detektiert werden. Daher kann die Verringerung der ACh-induzierten Dilatation in den antisensebehandelten Arterien nicht durch eine ungewollte Transfektion der glatten Muskelzellen erklärt werden.

Das Endothel der transfizierten Arterien dagegen zeigte in konfokalen Serienschnitten eine homogene Anfärbung mit FITC, was auf eine hohe endotheliale Transfektionsrate der Methode hinweist. In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich in intakten Gefäßen Endothelzellen selektiv mit lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen, wie z. B. Fluo-3-AM und di-ANEPPS-AM, beladen lassen, daher scheint die Endothelschicht eine Barrierefunktion für lipophile Substanzen darzustellen, wodurch die spezifische Transfektion der Endothelzellen erklärt werden könnte.

Untersuchungen von Graier et al. [27] haben gezeigt, dass CYP-Metaboliten eine wichtige Rolle bei der Regulation des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms in Endothelzellen haben.

Da sowohl die EDHF-Synthase [21] als auch die PLA_2 [12, 43], die Arachidonsäure aus Membranlipiden freisetzt, durch einen Anstieg des intrazellulären Calciums aktiviert werden, war es wichtig auszuschließen, dass die Antisense-Oligonukleotide das Calciumsignal im Endothel beeinflussten.

Keines der Oligonukleotide hatte einen Effekt auf den *endothelialen* Calciumanstieg, daher kann eine verringerte ACh-Antwort nicht durch einen verringerten Calciumanstieg im Endothel oder durch eine funktionelle Beeinträchtigung des ACh-Rezeptors infolge der Antisenseoligonukleotid-Behandlung erklärt werden.

Mit Hilfe der selektiven Inhibition von CYP2C8 mittels Antisensetechnik konnte die Beteiligung dieser Isoformen an der EDHF-vermittelten Dilatation der Skelettmuskelwiderstandsarterien des Hamsters gezeigt werden. Ob Metaboliten von CYP2C8 eine direkte hyperpolarisierende Wirkung oder eine permissive Wirkung für einen anderen EDHF besitzen, kann in diesem Modell nicht unterschieden werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese(r) Metabolit(en) ein integraler Bestandteil der Signalkaskade der EDHF-vermittelten Antworten in Widerstandsarterien ist (sind).

Mit der Organkulturmethode wurden anschließend die Effekte des kardiovaskulären Risikofaktors Hochdruck auf Widerstandsarterien und insbesondere auf die EDHF-vermittelten Dilatationen untersucht.

Zu diesem Zweck wurde der Perfusionsdruck in isoliert perfundierten Arterien 48 h lang auf 120 bzw. 160 mmHg erhöht und die so behandelten Arterien mit Gefäßen verglichen, die bei 45 mmHg perfundiert wurden. So konnten der chronische Effekt des hohen Druckes unabhängig von anderen Einflüssen untersucht werden. *In vivo* wurde in Arterien der Backentaschen von anästhesierten Hamstern, in Gefäßen, die eine vergleichbare Funktion wie die in dieser Studie untersuchten Arterien haben, ein mittlerer arterieller Druck von 62 mmHg gemessen [39]. Daher ist der in dieser Studie gewählte „Kontrolldruck“ mit 45 mmHg (der dieselben Ergebnisse bezüglich Langzeitkultivierung von Gefäßen erbrachte) etwas zu niedrig. Dennoch war bei SMA₁₂₀ bzw. SMA₁₆₀ der transmurale Druck deutlich im Vergleich auch zu diesem Normwert erhöht.

Es wurde gezeigt, dass erhöhter transmuraler Druck den Spontantonus der Arterien steigert, ob dieses jedoch aus einer veränderten Anordnung der glatten Muskelzellen infolge des erhöhten Druckes oder aus einem persistierenden myogenen Tonus resultiert, konnte nicht geklärt werden. Für ein Remodeling spricht, dass der Spontantonus trotz einer „Inkubationsperiode“, d.h. einer Periode während der 2 h ein transmuraler Druck von 45 mmHg bestand, immer noch erhöht war.

Zusätzlich zeigte sich, dass die glattmuskuläre Reaktivität auf Stimulation mit Noradrenalin verstärkt war. Diesem Effekt könnte eine vermehrte Expression von adrenergen Rezeptoren zugrunde liegen, da der NA-induzierte Calciumanstieg ebenfalls erhöht war und somit die verstärkte Kontraktion aus einer verstärkten Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum durch IP₃ resultiert. Aus

diesem Grund könnte neben einer Verstärkung der Expression oder funktionellen Wirkung des adrenergen Rezeptors [38] auch eine Erhöhung der Aktivität der Phospholipase C oder eine verstärkte Wirkung von IP_3 auf die Calciumfreisetzung im glatten Muskel verantwortlich sein.

Die Calciumsensitivität des glatten Muskels wurde durch isolierte Erhöhung des transmuralen Drucks durch die Hochdruckbehandlung nicht beeinflusst, während in SHR und in einem renalen Hypertoniemodell die Calciumsensitivität der Arterien der hypertensiven Tiere deutlich erhöht war [61, 69]. Diese Befunde wurden jedoch in Ganztiermodellen untersucht, in denen nicht zwischen direkten Effekten des erhöhten Blutdrucks und sekundären systemischen Effekten unterschieden werden kann.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die ACh-induzierten Dilatationen durch erhöhten transmuralen Druck abgeschwächt wurden und dass dieses aus einer Abschwächung sowohl der NO- als auch der EDHF-vermittelten Dilatationen resultierte. Der *endotheliale* Calciumanstieg war in SMA₁₂₀ im Vergleich zur Kontrolle nicht verringert, daher ist scheinbar die Funktion des ACh-Rezeptors durch die Perfusion mit erhöhtem transmuralen Druck nicht beeinträchtigt worden. Daher ist die Beeinträchtigung der endothelvermittelten Dilatation durch den erhöhten Druck in einem nachgeschalteten Signaltransduktionsweg zu vermuten.

Die Verringerung der ACh-induzierten Dilatation scheint durch eine Wirkung des erhöhten Druckes am Endothel zu erfolgen, da die glattmuskuläre Fähigkeit, auf verschiedene Stimuli, wie z. B. den exogenen NO-Donor SNP oder den K_{Ca} -Kanalöffner NS1619, zu dilatieren, nicht beeinträchtigt wurde. Zwar wurde der K_{Ca} -Kanalöffner NS1619 nur in einer Dosierung verwendet, so dass letztlich nicht gesagt werden kann, ob auch hier eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve erfolgte. Da jedoch die Dosis-Wirkungskurve von SNP durch den erhöhten Druck nicht verschoben wurde, kann zunächst ausgeschlossen werden, dass die verringerten ACh-induzierten Dilatationen durch eine erhöhte glattmuskuläre Elastance infolge der Druckerhöhung hervorgerufen wurden.

Die unveränderte Wirkung des K_{Ca} -Kanalöffners zeigt ferner, dass nach der Hochdruckbehandlung noch ausreichend funktionelle K_{Ca} -Kanäle im glatten Muskel vorhanden waren.

Es ist unwahrscheinlich, dass die verringerten endothelvermittelten Dilatationen auf eine Zerstörung von Endothelzellen infolge der Druckerhöhung zurückzuführen sind, da mittels Rasterelektronenmikroskopie keine strukturellen Schäden in der Intima bei SMA₁₂₀ und SMA₁₆₀ im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden konnten.

Unklar bleibt jedoch, welche Mechanismen diesen Veränderungen zugrunde liegen. Der NO-vermittelte Anteil an der Dilatation könnte durch eine gesteigerte Produktion von O₂⁻ verringert werden, da die Superoxidanionen NO durch Reaktion zu Peroxynitrit inaktivieren können und Huang et al. [35] gezeigt haben, dass isoliert erhöhter Druck von 140 mmHg (30 min) in Arteriolen aus dem M. gracilis (Ratte) die O₂⁻-Produktion steigerte und dadurch die NO-vermittelte flussabhängige Dilatation verringert wurde.

Ob O₂⁻ auch einen Effekt auf die EDHF-vermittelte Dilatation haben könnte und ob der Effekt der kurzzeitigen Druckerhöhung auch auf Langzeiteffekte übertragbar ist, bleibt jedoch unklar.

Als wahrscheinliche Ursachen für die nach erhöhtem transmuralen Druck auftretenden Einschränkungen der endothelialen Dilatation könnten Störungen im Bereich der Gap Junctions (z.B. myoendothiale) oder eine spezifische Hemmung der EDHF-Bildung durch veränderte subzelluläre Signaltransduktionswege in Frage kommen.

Anhand des Organkulturmodells konnte gezeigt werden, dass isoliert erhöhter transmuraler Druck unabhängig von systemischen Effekten, den Spontantonus und die Reaktivität des glatten Muskels gegenüber Noradrenalin verstärkt und die Endothelfunktion stark einschränkt. Passend zu den in der vorgelegten Arbeit erhobenen Befunden zeigten Sunano et al. [65] in spontan hypertensiven Ratten (SHR) eine verringerte ACh-induzierte Dilatation und Hyperpolarisation, verglichen mit normotensiven Tieren. Zusätzlich konnte eine weitere Arbeitsgruppe zeigen, dass der ACh-induzierte Abfall des Perfusionsdruckes in isoliert perfundierten Nieren von SHR, Deoxycorticosteronacetat-induzierten salzabhängigen (DOCA-Salz) und hypertensiven Dahl-Ratten verglichen mit deren Kontrolltieren deutlich verringert war [31]. Dabei zeigten sich unterschiedliche Befunde bezüglich der betroffenen endothelialen Autacoide. Bei DOCA-Salz- und Dahl-Ratten war der NO-vermittelte Anteil deutlich verringert, während dieser bei den SHR unverändert und stattdessen der EDHF-vermittelte Anteil völlig erloschen war. Im Gegensatz dazu konnten weitere Arbeitsgruppen an hypertensiven Dahl-Ratten [26] und SHR [34] keine Beeinträchtigung

der ACh-induzierten Dilatationen feststellen, jedoch waren die Substanz-P-induzierten Dilatationen deutlich verringert.

In einigen hypertensiven Tiermodellen zeigte sich im Gegensatz zu den Resultaten aus dieser Arbeit in hypertensiven Tieren eine erhöhte Calciumsensitivität des Kontraktionsvorgangs im Vergleich zu den normotensiven Kontrolltieren. Dabei wurden in unterschiedlichen Tiermodellen verschiedene Mechanismen (Proteinkinase-C-Aktivierung [61] und Rho-Kinase-Aktivierung [69]) dafür verantwortlich gemacht.

Es bleibt jedoch unklar, ob die beobachteten Effekte in hypertensiven Tieren durch den erhöhten Blutdruck oder durch Nebeneffekte wie z. B. begleitende endokrine Veränderungen in dem Modell ausgelöst werden, die eine wahrscheinliche Ursache für die z.T. widersprüchlichen Resultate darstellen. In genetischen Modellen könnte überdies eine verminderte Endothelfunktion die Ursache und nicht die Folge der Hypertonie sein, da der Pathomechanismus ihrer Entstehung nicht genau bekannt ist.

Obwohl die an isolierten Gefäßen erhobenen Befunde nicht ohne weiteres auf die *in-vivo*-Situation übertragbar sind, legen sie v.a. zusammen mit den Ergebnissen der erwähnten Tierversuche nahe, dass eine frühzeitige konsequente antihypertensive Therapie sinnvoll ist. Auf diese Weise könnte die druckinduzierte Verstärkung der glattmuskulären Reaktivität und die Einschränkung der Endothelfunktion verringert und eine daraus resultierende weitere Erhöhung des Blutdruckes zu verhindert werden.

5. Zusammenfassung

Widerstandsarterien spielen eine wichtige Rolle bei der Durchblutungsregulation. Bisher konnte der wichtigste endothiale Dilatator in diesen Gefäßen, EDHF, nicht eindeutig identifiziert werden, da pharmakologische Inhibitoren unspezifische Nebenwirkungen aufwiesen. Die spezifische Inhibition von Enzymen mittels Antisensetechnik konnte in intakten Arterien nicht durchgeführt werden, da diese nur über einen kurzen Zeitraum funktionell intakt erhalten werden konnten.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein neues Organkulturmodell entwickelt, in dem erstmalig die endothelabhängigen EDHF- und NO-vermittelten Dilatationen über 48 h vollständig erhalten werden konnten. Zusätzlich entwickelten die kultivierten Arterien einen mit dem frisch isolierter Arterien vergleichbaren Spontantonus und zeigten eine myogene Reaktion, die sich in Kinetik und Ausmaß der Kontraktion nicht von den Kontrollarterien unterschied. Ebenso kontrahierten die chronisch perfundierten Arterien auf Stimulation mit Noradrenalin und dilatierten nach Applikation des NO-Donors SNP in vergleichbarem Ausmaß wie frisch isolierte Arterien.

Um zu untersuchen, ob möglicherweise eine CytochromP450-Epoxygenase in der Signalkaskade des EDHF eine Rolle spielt, wurde zunächst die Expression von CYP2C8 in Widerstandsarterien mittels rtPCR und *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Da mit dem Organkulturmodell die Arterien funktionell vollständig intakt gehalten werden konnten, wurde die Wirkung von Antisense-Oligonucleotiden, die gegen CYP2C8 gerichtet waren, untersucht. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die FITC-markierten Oligonucleotide sich nur in der Intima befanden und die Transfektion des Endothels eine hohe Effizienz aufwies. Die Transfektion hatte keinen Effekt auf die NA-induzierte Kontraktion, auf die durch NS1619 (K_{Ca} -Kanalöffner)- oder die SNP-vermittelte Relaxation, was zeigt, dass die Funktion des glatten Muskels durch die Transfektion unbeeinträchtigt blieb. Die EDHF-vermittelten Dilatationen wurden durch die Transfektion mit den Antisense-Oligonucleotiden um 76% und die korrespondierenden Calciumabfälle um 58 % reduziert, während die Kontrolltransfektionen mit Scrambled- oder Senseoligonucleotiden keinen Einfluss auf die EDHF-mediierten Dilatationen hatten. Die *endothelialen* Calciumanstiege nach Stimulation mit ACh blieben in den Antisense-transfizierten Arterien unverändert. Das

bedeutet, dass die Signaltransduktion der ACh-Rezeptoren durch die Transfektion funktionell nicht beeinträchtigt wurde.

Auf diese Weise konnte mit einem spezifischen Inhibitor gezeigt werden, dass CYP2C8 eine EDHF-Synthase ist oder dessen Metabolit einen permissiven Faktor für einen anderen EDHF darstellt und ein elementarer Bestandteil der EDHF-Signalkaskade ist.

Zusätzlich wurden mit diesem Organkulturmodell die Auswirkungen des kardiovaskulären Risikofaktors Hochdruck durch isolierte Erhöhung des transmuralen Drucks auf 120 und 160 mmHg (SMA₁₂₀ bzw. SMA₁₆₀) während einer Kulturperiode (48 h) untersucht. In den funktionellen Testungen zeigten sich nach 48 h geringere Außendurchmesserwerte in SMA₁₂₀ und SMA₁₆₀ im Sinne eines Remodelings.

Der erhöhte Perfusionsdruck führte darüber hinaus zu einer Verstärkung der Noradrenalin-vermittelten Kontraktion. Dies ist jedoch nicht durch eine Erhöhung der Calciumsensitivität der Myofilamente zu erklären, da diese im Vergleich zur Kontrolle unverändert war, sondern durch eine Verstärkung der NA-induzierten Calciumanstiege.

Neben den Veränderungen in der glatten Muskulatur zeigte sich insbesondere auch eine Beeinträchtigung der Endothel-vermittelten Relaxationen.

Die NO-medierte Dilatation wurde durch die chronische Perfusion bei 120 mmHg um 38% reduziert und bei SMA₁₆₀ vollständig aufgehoben. Ebenso wurde die EDHF-vermittelte Relaxation bei SMA₁₂₀ um 20 % und bei SMA₁₆₀ um 47% verringert und der korrespondierende Calciumabfall um 41 % reduziert. Diese Reduktion der endothelialen Dilatationen wurde nicht durch eine Erhöhung der Elastance der Arterienwand hervorgerufen, da die dosisabhängige SNP-medierte Relaxation unbeeinträchtigt war. Zusätzlich scheint eine strukturelle Schädigung des Endothels durch den erhöhten Druck unwahrscheinlich, da mittels Rasterelektronenmikroskopie keine Schäden an der Intima dargestellt werden konnten. Die Expression des ACh-Rezeptors scheint auch nicht in dem Maße verringert zu sein, dass sich daraus die verringerten NO- und EDHF-medierten Relaxationen erklären ließen, da der endotheliale Calciumanstieg in SMA₁₂₀ im Vergleich zu SMA₄₅ unverändert war. Daher wird die Beeinträchtigung durch den erhöhten Druck in einem nachgeschalteten Signaltransduktionsweg vermutet.

Erhöhter transmuraler Druck hat in diesem Modell innerhalb von 2 Tagen schon zu einer erheblichen Beeinträchtigung der endothelialen Funktionen und zu einer verstärkten Reaktivität des glatten Muskels in Widerstandsarterien geführt. Zwar ist eine Erhöhung

des transmuralen Drucks für 48 h nicht mit einem jahrelang bestehenden Hypertonus vergleichbar, jedoch könnte man die so erhobenen Befunde als Hinweis werten, dass eine frühzeitige konsequente antihypertensive Therapie sinnvoll ist, um die druckinduzierte Verstärkung der glattmuskulären Reaktivität und die Einschränkung der Endothelfunktion zu verringern und eine daraus resultierende weitere Erhöhung des Blutdruckes zu verhindern.

6. Anhang

6.1. Abkürzungen

Δ AD: Außendurchmesseränderung (% der Dilatationskapazität)

Δ Ca²⁺_i: Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration

ACh: Acetylcholin

AS: Antisense-Oligonucleotide oder antisenseoligonucleotidtransfizierte Arterien

bp: Basenpaare

BSA: bovine serum albumin, Rinderserumalbumin

Ca²⁺_i: intrazelluläre Calciumkonzentration

CTX: Charybdotoxin, K_{Ca}-Kanalblocker

CYP oder CYP450: Cytochrom P450

DAG: Diacylglycerol

EDHF: endothelium-derived hyperpolarizing factor (aus dem Endothel stammender hyperpolarisierender Faktor)

EDRF: endothelium-derived relaxing factor (aus dem Endothel stammender relaxierender Faktor; = NO)

EDTA: Ethyldiamintetraessigsäure, Chelator

IP₃: Inositoltriphosphat

K_{ATP}: ATP-abhängiger Kaliumkanal

K_{Ca}-Kanal: calciumabhängiger Kaliumkanal

L-NA: L-N-^ω-Nitro-Arginin, NO-Synthaseinhibitor

MLCK: Myosinleichtkettenkinase

MLCP: Myosinleichtkettenphosphatase

MOPS: 3-Morpholinopropansulphonsäure, Puffersubstanz

NA: Noradrenalin

NO: Stickstoffmonoxyd

NS1619: K_{Ca}-Kanalöffner

PGI₂: Prostaglandin I₂ = Prostacyclin

PIP₂: Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat

PLA₂: Phospholipase A₂

REM: Rasterelektronenmikroskopie

S: Senseoligonucleotide oder senseoligonucleotid-transfizierte Arterien

Scr: Scrambledoligonucleotide oder scrambledoligonucleotid-transfizierte Arterien

SHR: spontan hypertensive Ratten (hypertensives Ganztiermodell)

SMA₄₅, SMA₁₂₀, SMA₁₆₀: Skelettmuskelarterien, die 48 h unter transmuralen Drucken von 45, 120 oder 160 mmHg perfundiert wurden

SNP: sodium nitroprusside = Nitroprussidnatrium

6.2. Gerätebezeichnungen und Bezugsquellen

6.2.1. Technische Geräte

Präparation und Kanülierung der Arterien

Präparationsmikroskop

Fa. Carl Zeiss, Jena

Vertikalpuller

Die Borosilikatglaselmikropipetten (L = 100 mm, Da = 1,2 m, Di = 0,6 mm, da = 0,16 mm, Fa. Hilgenberg, Malsfeld) wurden in einem Vertikalpuller (Fa. Getra, München) in der Mitte erhitzt und auseinander gezogen, so dass zwei Mikropipetten mit sehr feinen Spitzen an einem Ende entstanden.

Organkultur

peristaltische Pumpe

Minipuls 3, Fa. Gilson, Vertrieb in Deutschland durch Fa. Abimed, Langenfeld

Sterilfilter

Autoklavierbare: Fa. Nalgene, Vertrieb durch Fa. Labotec, Wiesbaden, wurden mit Filtermembranen der Fa. Schleicher & Schuell, Vertrieb durch Fa. Labotec, Wiesbaden, bestückt.

Einmalartikel: Acrodisc®, Porenweite: 0,2 µm, hydrophil; Fa. Gelman, Vertrieb durch Fa. Labotec, Wiesbaden

Perfusor

Perfusor E, Fa. Braun, Melsungen

Calciummessung*Calciummessgerät*

Monochromatoren: Fa. Photomed GmbH, Wedel/Holstein

Bandpass Filter 510 nm: Photomed GmbH

Beheizter Mikroskopisch

Der beheizte Mikroskopisch bestand aus einer hohlen Aluminiumplatte mit einer Aussparung für das Objektiv, durch die kontinuierlich heißes Wasser gepumpt wurde und in der institutseigenen Werkstatt hergestellt wurde. Die Temperatur des durchströmenden Wassers wurde so gewählt, dass im Organbad eine Temperatur von 37°C herrschte.

inverses Mikroskop

Modell: Diaphot 300, Fa. Nikon, Düsseldorf

Außendurchmessermessung*Restlichtkamera*

Modell: FA76 SIT, Fa. Grundig, Fürth

Konfokales Mikroskop

Modell: LSM 410 invert, Fa. Zeiss

Rasterelektronenmikroskopie*Gerät für die Trocknung am kritischen Punkt von CO₂*

Modell: CPD 030, Fa. Baltec, Fürstentum Liechtenstein

Probenteller

Die Probenteller für die Rasterelektronenmikroskopie bestanden aus Aluminium und hatten einen Durchmesser von ca. 1,5 cm. Sie wurden mit Hilfe eines Stiftes, der unten

an den Probentellern befestigt war, auf dem Probenschlitten für das Elektronenmikroskop befestigt.

Klebefolie

elektrisch leitende, doppelseitig haftende Klebefolie, mit Kohle beschichtet
Fa. W. Planet, Wetzlar

kalte Kationenentladung

Modell: SEM Coating System, Fa. Polarion

Rasterelektronenmikroskop

Fa. JEOL, Japan

6.2.2. Chemikalien und Medikamente

Acetylcholin: Fa. Fluka, Vertrieb über Fa. Sigma, Deisenhofen

Antibiotikakombinationspräparat: Penicillin/ Streptomycin, Fa. Sigma, Deisenhofen

BSA: Fa. Biomol, Hamburg

Charybdotoxin: Fa. Sigma, Deisenhofen

DMSO (wasserfrei): Fa. Sigma, Deisenhofen

Ethanol 99 % (wasserfrei): Fa. Merck, Darmstadt

Fura-2-AM und Fura-freie-Säure: Fa. Molecular Probes, Vertrieb durch Fa. Mo Bi Tec, Göttingen

Glutaraldehyd für die Elektronenmikroskopie: Fa. Sigma, Deisenhofen

Indomethacin: Confortid®, Fa. Dumex, Bad Vilbel

Isopropanol: Fa. Fluka, Steinheim

Kälberserum: Cool Calf-2®, Fa. Sigma, Deisenhofen

Leibovitz L-15: Fa. Sigma, Deisenhofen

L-Glutamin: Fa. Sigma, Deisenhofen

L-NA: Fa. Sigma, Deisenhofen

Noradrenalin: Arterenol®, Fa. Höchst, Frankfurt a.M.

Oligonucleotide: Fa. MWG Biotech, Ebersberg

Pentobarbital: Narcoren®, Fa. Rhone Merieux, Laupheim

SNP: Fa. Sigma, Deisenhofen

Transfektionsreagenz: Superfect®: Fa. Qiagen, Hilden

Trizol: Fa. Life Technologies, Eggenstein

Virkon®: Flächendesinfizienz, Fa. Merck, Darmstadt

6.2.3. Sonstiges

mikrochirurgischer Faden: 11-0 monofil, Fa. Ethicon, Norderstedt

Präparationsbesteck: Fa. Dumont et fils, Schweiz

Syrische Hamster Fa. Charles River, Sulzfeld, (Nachzuchten)

6.3. Berechnungen

6.3.1. Berechnung der Wandschubspannung

Die Wandschubspannung (WSS), die bei einer Arteriole unter kontinuierlicher Perfusion am Endothel auftritt, wurde nach der Formel $WSS = 8 v \eta / D$ bestimmt [11], wobei für v die Flussgeschwindigkeit (Berechnung s. 6.3.2), für η die Viskosität des Mediums und für D der Innendurchmesser der Arteriole eingesetzt wurde.

Bei einer Flussrate von 1 ml/h errechnete sich eine Wandschubspannung von 104 mPa.

6.3.2. Berechnung der Änderung des transmuralen Druckes unter Perfusion

Unter Perfusion verringert sich der Druck p [Pa] im Gefäß abhängig von der Flussgeschwindigkeit v [m / s] und der Dichte der Flüssigkeit (Kulturmedium) ρ [kg / m³].

$$\frac{1}{2} \rho v^2 + p = \text{const.}$$

Die Flussgeschwindigkeit v [m / s] errechnet sich aus der Flussrate F [ml / h] und dem Innendurchmesser der Arteriole bzw. der Wassersäule wie folgt:

$$v = \frac{4 F}{\pi d^2}$$

Da sich der transmurale Druck in der Arteriole unter konstanter Perfusion mit 1 ml / h um nur $2,1 \cdot 10^{-4}$ mmHg verringerte, war dieses im Vergleich zu den Drucken in der Wassersäule (45 mmHg unter Kontrollbedingungen bzw. 120 und 160 mmHg unter Hochdruckbedingungen) vernachlässigbar gering. Daher kann der hydrostatische Druck, der durch die Wassersäule erzeugt wird, dem transmuralen Druck unter Perfusion in der Widerstandarteriole gleich gesetzt werden.

6.3.3. Berechnung der Fluoreszenzratio

$$R = (F_{350\text{nm}} - A_{350\text{nm}}) / (F_{380\text{nm}} - A_{380\text{nm}});$$

R: Ratio

$F_{350\text{nm}}, F_{380\text{nm}}$: gemessene Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungs-Wellenlängen 350 bzw. 380nm

$A_{350\text{nm}}, A_{380\text{nm}}$: Autofluoreszenz (nach „Quenching“ mit MnCl_2) bei den Anregungs-Wellenlängen 350 bzw. 380nm.

7. Literatur

- 1 **Bardy N, Karillon G J, Merval R, Samuel J L and Tedgui A.** Differential effects of pressure and flow on DNA and protein synthesis and on fibronectin expression by arteries in a novel organ culture system. *Circulation Research* 77: 684-694, 1995.
- 2 **Beach J M, McGahren E D, Xia J and Duling B R.** Ratiometric measurement of endothelial depolarization in arterioles with a potential-sensitive dye. *American Journal of Physiology* 270: H2216-H2227, 1996.
- 3 **Beny J L and Pacicca C.** Bidirectional electric communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *American Journal of Physiology* 266: H1465-H1472, 1994.
- 4 **Bolz S S, de Wit C and Pohl U.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca^{2+} during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *British Journal of Pharmacology* 128: 124-134, 1999.
- 5 **Campbell W B, Gebremedhin D, Pratt P F and Harder D R.** Identification of Epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation Research* 78: 415-423, 1996.
- 6 **Chamley-Campbell J H, Campbell G R and Ross R.** Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *Journal of Cell Biology* 89: 379-383, 1981.
- 7 **Chaytor A T, Evans W H and Griffith T M.** Central role of heterocellular gap junctional communication in endothelium-dependent relaxations of rabbit arteries. *Journal of Physiology* 508: 561-573, 1998.
- 8 **Chen G, Yamamoto Y, Miwa K and Suzuki H.** Hyperpolarisation of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *American Journal of Physiology* 260: H1888-H1892, 1991.

- 9 **Chen G and Cheung D W.** Modulation of endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in rat mesenteric artery by cytochrome P450 enzyme activity. *Circulation Research* 79: 827-833, 1996.
- 10 **De Mey J G R, Uitendaal M P, Boonen H C M, Vrijdag M J J F, Daemen M J A P and Struyker-Boudier H A J.** Acute and long-term effects of tissue culture on contractile reactivity in renal arteries of the rat. *Circulation Research* 65: 1125-1135, 1989.
- 11 **De Wit C, Schäfer C, von Bismarck P, Bolz S S and Pohl U.** Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflügers Archiv* 434: 354-361, 1997.
- 12 **Debbagh A, Hidi R, Vargaftig B B and Tourqui L.** Inhibition of phospholipase A2 activity in guinea pig eosinophils by human recombinant IL-1 beta. *Journal of Immunology* 149: 1374-1380, 1992.
- 13 **Doughty J M, Plane F and Langton P D.** Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *American Journal of Physiology* 276: H1107-H1112, 1999.
- 14 **Doughty J M, Boyle J P and Langton P D.** Potassium does not mimic EDHF in rat mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology* 130: 1174-1182, 2000.
- 15 **Eckman D M, Hopkins N, McBride C and Keef K D.** Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in guinea-pig coronary artery: role of epoxyeicosatrienoic acid. *British Journal of Pharmacology* 124: 181-189, 1998.
- 16 **Edwards G, Zygmunt P M, Högestätt E D and Weston A H.** Effects of cytochrome P450 inhibitors on potassium currents and mechanical activity in rat portal vein. *British Journal of Pharmacology* 119: 691-701, 1996.
- 17 **Edwards G, Dora K A, Gardener M J, Garland C J and Weston A H.** K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396: 269-272, 1998.

- 18 **Edwards G, Gardener M J, Féletou M, Brady G, Vanhoutte P M and Weston A H.** Further investigation of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in rat hepatic artery: studies using 1-EBIO and ouabain. *British Journal of Pharmacology* 128: 1064-1070, 1999.
- 19 **Fisslthaler B, Hinsch N, Chataigneau T, Popp R, Kiss L, Busse R and Fleming I.** Nifedipine increases Cytochrome P4502C Expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension* 36: 270-275, 2000.
- 20 **Fleming I, Michaelis U R, Bredenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes R P and Busse R.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circulation Research* 88: 44-51, 2001.
- 21 **Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I and Kitabatake A.** Sources of Ca^{2+} in relation to generation of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *British Journal of Pharmacology* 120: 1328-1334, 1997.
- 22 **Fulep E E, Vedernikov Y P, Saade G R and Garfield R E.** The role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of the uterine circulation in pregnant rats *Am Journal of Obstetrical Gynecology* 185: 638-642, 2001.
- 23 **Furchtgott R F and Zawadzki J V.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
- 24 **Furchtgott R F, Carvalho M H, Khan M T and Matsunaga K.** Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels* 24: 145-149, 1987.
- 25 **Garland C J, Plane F, Kemp B K and Cocks T M.** Endothelium-dependent hyperpolarization: A role in the control of vascular tone. *TIPS* 16: 23-30, 1995.

- 26 **Gauthier-Rein K M and Rusch N J.** Distinct endothelial impairment in coronary microvessels from hypertensive Dahl rats. *Hypertension* 31: 328-334, 1998.
- 27 **Graier W F, Simecek S and Sturek M.** Cytochrome P450 mono-oxygenase-regulated signalling of Ca^{2+} -entry in human and bovine endothelial cells. *Journal of Physiology* 482: 259-274, 1995.
- 28 **Gruetter C A, Barry B K, McNamara D B, Gruetter D Y, Kadowitz P J and Ignarro L J.** Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. *Journal of Cyclic Nucleotide Research* 5: 211-224, 1979.
- 29 **Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien R Y.** A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of biological chemistry* 260: 3440-3450, 1985.
- 30 **Harris D, McCulloch A I, Kendall D A and Randall M D.** Characterization of vasorelaxant responses to anandamide in the rat mesenteric bed. *Journal of Physiology* 539: 893-902, 2002.
- 31 **Hayakawa H, Hayata Y, Suzuki E, Sugimoto T, Matsuoka H, Kikuchi K, Nagano T and Hirobe M.** Mechanisms for altered endothelium-dependent vasorelaxation in isolated kidneys from experimental hypertensive rats. *American Journal of Physiology* 264: H1535-1541, 1993.
- 32 **Holt C M, Francis S E, Rogers S, Gadson P A, Taylor T, Clelland C, Soyombo A, Newby A C and Angelini G D.** Intimal proliferation in an organ culture of human internal mammary artery. *Cardiovascular Research* 26: 1189-1194, 1992.
- 33 **Holzmann S, Kukovetz W R and Schmidt K.** Mode of action of coronary arterial relaxation by prostacyclin. *Journal of Cyclic Nucleotide Research* 6: 451-460, 1980.

- 34 **Huang A and Koller A.** Both nitric oxide and prostaglandin-mediated responses are impaired in skeletal muscle arterioles of hypertensive rats. *Journal of hypertension* 14: 887-895, 1996.
- 35 **Huang A, Sun D, Kaley G and Koller A.** Superoxide released to high intra-arteriolar pressure reduces nitric oxide-mediated shear stress- and agonist-induced dilations. *Circulation Research* 83: 960-965, 1998.
- 36 **Ignarro L J, Buga G M, Wood K S, Byrns R E and Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 9265-9269, 1987.
- 37 **Jackson W F, Konig A, Dambacher T and Busse R.** Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *American Journal of Physiology* 264: H238-H243, 1993.
- 38 **Ji-Ming Y and Colquhoun E Q.** Changes in functional expression of alpha-1 adrenoceptors in hindlimb vascular bed of spontaneously hypertensive rats and their effects on oxygen consumption. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286: 599-286, 1998.
- 39 **Joyner W L.** Intravascular pressure distribution and dimensional analysis of microvessels in hamsters with renovascular hypertension. *Microvascular Research* 22: 190-198, 1981.
- 40 **Kleppisch T, Winter B and Nelson M T.** ATP-sensitive potassium channels in cultured arterial segments. *American Journal of Physiology* 271: H2462-H2468, 1996.
- 41 **Knot H J, Zimmermann P A and Nelson M T.** Extracellular K⁺-induced hyperpolarizations and dilations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁺ channels. *Journal of Physiology* 492: 419-430, 1996.

- 42 **Konishi M and Watanabe M.** Resting cytoplasmatic free Ca^{2+} concentration in frog skeletal muscle measured with fura-2 conjugated to high molecular weight dextran. *J Gen Physiol* 106: 1123-1150, 1995.
- 43 **Kudo N, Nakagawa Y and Waku K.** Inhibition of the liberation of arachidonic acid by cadmium ions in rabbit alveolar macrophages. *Archives of Toxicology* 66: 131-136, 1992.
- 44 **Lamontagne D, Pohl U and Busse R.** Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. *Circulation Research* 70: 123-130, 1992.
- 45 **Leibovitz A.** The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free exchange with the atmosphere *American Journal of Hygiene* 78: 173-180, 1963.
- 46 **Li P L and Campbell W B.** Epoxyeicosatrienoic acids activate K^+ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circulation Research* 80: 877-884, 1997.
- 47 **Lin J H C, Kobari Y, Zhu Y, Stemerman M B and Pritchard K A.** Human umbilical vein endothelial cells express P450 1C8 mRNA: Cloning of endothelial P450 epoxygenase. *Endothelium* 4: 219-229, 1996.
- 48 **Lincoln T M, Cornwell T L and Taylor A E.** cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cAMP in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* 258: C399-C407, 1990.
- 49 **Lincoln T M and Cornwell T L.** Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *The FASEB journal* 7: 338, 1993.
- 50 **Lincoln T M, Komalavilas P and Cornwell T L.** Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 23: 1141-1147, 1994.

- 51 **Meininger G A, Zawieja D C, Falcone J C, Hill M A and Davey J P.** Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation. *American Journal of Physiology* 261: H950-H959, 1991.
- 52 **Miura H and Guterman D D.** Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca^{2+} activated K^+ channels. *Circulation Research* 83: 501-507, 1998.
- 53 **Murphy M E and Brayden J E.** Apamin-sensitive K^+ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *Journal of Physiology* 489: 723-734, 1995.
- 54 **Oltman C L, Weintraub N L, VanRollins M and Dellsperger K C.** Epoxyeicosatrienoic acids and Dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circulation Research* 83: 932-939, 1998.
- 55 **Palmer R M, Ferrige A G and Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- 56 **Popp R, Bauersachs J, Hecker M, Fleming I and Busse R.** A transferable, β -naphtoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *Journal of Physiology* 497: 699-709, 1996.
- 57 **Quignard J-F, Féletalou M, Thollon C, Vilaine J-P, Duhault J and Vanhoutte P M.** Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarizing factor in guinea-pig carotid and porcine coronary arteries. *British Journal of Pharmacology* 127: 27-34, 1999.
- 58 **Randall M D.** An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant *Biochem Biophys Res Comm* 229: 114-120, 1996.

- 59 **Rifkind A B, Lee C, Chang T K and Waxman D J.** Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1 and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 320: 380-389, 1995.
- 60 **Sandow S L, Tare M, Coleman H A, Hill C E and Parkington H C.** Involvement of myoendothelial gap junctions in the rat actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation Research* 90 (10): 1108-1113, 2003.
- 61 **Sasajima H, Shima H, Toyoda Y, Kimura K, Yoshikawa A, Hano T and Nishio I.** Increased Ca^{2+} sensitivity of contractile elements via protein kinase C in α -toxin permeabilized SMA from young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research* 36: 86-91, 1997.
- 62 **Schultz K D, Schultz K and Schultz G.** Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 265: 751, 1977.
- 63 **Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada M K, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M and Takeshita A.** The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *Journal of cardiovascular pharmacology* 28: 703-711, 1996.
- 64 **Sjolund M, Nilsson J, Palmberg L and Thyberg J.** Phenotype modulation in primary culture of arterial smooth-muscle cells. Dual effect of prostaglandin E1. *Differentiation* 27: 158-162, 1984.
- 65 **Sunano S, Watanabe H, Tanaka S, Sekiguchi F and Shimamura K.** Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats. *British Journal of Pharmacology* 126: 709-716, 1999.

- 66 **Taylor S G, Southerton J S, Weston A H and Baker J R.** Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. *British Journal of Pharmacology* 94: 853-863, 1988.
- 67 **Taylor S G and Weston A H.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends in Pharmacological Science* 9: 272-274, 1988.
- 68 **Traish A M, Kim N, Carson M P and de Tejada I S.** Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Recept Res* 14: 153-166, 1993.
- 69 **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maikawa M and Narumiya S.** Calcium sensitisation of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389: 994, 1997.
- 70 **Vanhoufte P M and Shimokawa H.** Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation* 80: 1-9, 1989.
- 71 **Waldron G J and Cole W C.** Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 180-184, 1999.
- 72 **Wang D, Borrego-Conde L J, Falck J R, Sharma K K, Wilcox C S and Umans J G.** Contributions of nitric oxide, EDHF, and EETs to endothelium-dependent relaxation in renal afferent arterioles. *Kidney International* 63 (3): 2187-2193, 2003.
- 73 **Worth N F, Rolfe B E, Song J and Campbell G R.** Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 49: 130-145, 2001.

- 74 **Wu S, Chen W, Murphy E, Gabel S, Tomer K B, Foley J, Steenbergen C, Falck J R, Moomaw C R and Zeldin D C.** Molecular cloning, expression and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *Journal of biological chemistry* 272: 12551-12559, 1997.
- 75 **Wu X, Somlyo A V and Somlyo A P.** Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-Protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Biochem Biophys Res Comm* 220: 658-663, 1996.
- 76 **Zygmunt P M, Edwards G, Weston A H, Davis S C and Högestätt E D.** Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic artery. *British Journal of Pharmacology* 118: 1147-1152, 1996.

8. Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Pohl für das spannende Thema und die unzähligen anregenden und motivierenden Diskussionen im Verlauf dieser Dissertation danken.

Steffen-Sebastian Bolz danke ich für das herzliche und angenehme Arbeitsklima in seinem Labor sowie für die aufheiternden und anspornenden Gespräche während der zeitaufwendigen und komplizierten Experimente.

Meiner Mutter und meinem Vater danke ich vor allem für die unermüdliche Ermutigung, diese Arbeit fertig zu stellen, sowie dafür dass sie es mir ermöglicht haben, nach München zu gehen.

Außerdem danke ich meinem Kommilitonen und meinem Freundeskreis in Mainz, insbesondere Arienza Quagliotti und Nicole Peters sowie Klaus Papadakis, Gaylord Wulf, Edward Chwalak und Frank Götz für ihre Geduld und die aufmunternden Unternehmungen während der „heißen“ Phase der Experimente.

Zusätzlich danke ich meinem Freundeskreis in München für die liebevolle Unterstützung während des Schreibens. Insbesondere möchte ich Gerd Steinlein für den Ansporn in der Abschlussphase sowie Angela Götz und Florian Illing für die intensive Suche nach verbliebenen Rechtschreibfehlern danken.

Nicht zuletzt danke ich allen, die mich im Verlauf dieser Dissertation immer wieder angespornt haben und deren Namen einzeln hier zu erwähnen unmöglich ist.

München, 08. Juli 2005

Susanne Pieperhoff

Lebenslauf

Name	Susanne Pieperhoff
Wohnort	Buschingstr. 26 81677 München
Telefonnummer	089 95456887 oder 0179 2942723
Email	Piep.s@web.de
Geburtsdatum und -ort	17.01.1975 in Aachen
Vater	Hans-Joachim Pieperhoff ★ 25.09.1944 in Bad Brückenau
Mutter	Sybille Pieperhoff ★ 19.05.1941 in Halberstadt

Schulischer Werdegang

1981 - 1983	Grundschule Riemerling
1983 - 1985	Grundschule Abbehausen
1985 - 1986	Orientierungsstufe Nordenham
1986 - 1994	Frauenlobgymnasium Mainz
10.06.1994	Abitur Note: 1,9

Studium der Medizin

WS 1994 - SS 1998	Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
16.09.1996	Ärztliche Vorprüfung Note: 1,6
28.08.1997	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Note 2
WS 1998/99	Urlaubssemester (Laboraufbau in München)
SS 1999 - SS 2001	Ludwig-Maximilians-Universität München
13.09.2000	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Note 2
10.10.2001	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Note 2

Famulaturen

Allgemeinmedizin	Praxis von H.-P. Heß, praktischer Arzt Mainz
Chirurgie	St. Vinzenz und Elisabeth Krankenhaus Mainz
Kardiologie	Uniklinikum Mainz
Orthopädie	Praxis von Erhard Müller, Orthopäde, Viersen
Neurochirurgie	Charity Hospital, New Orleans, Louisiana

Praktisches Jahr

Innere Medizin (Kardiologie)	Krankenhaus München-Harlaching
Chirurgie	Krankenhaus München-Harlaching
Neurologie	Krankenhaus München-Harlaching

Dissertation

Titel	Rolle von Cytochrom P450-Metaboliten bei der EDHF-vermittelten Dilatation von Widerstandsarterien und Effekte von chronisch erhöhtem Perfusionsdruck auf glattmuskuläre und endotheliale Funktionen
-------	---

ÄIP

01.01.2002 - 30.06.2003	Neurochirurgische Klinik und Poliklinik Großhadern
-------------------------	--

Assistenzärztin

01.08.2003 - 31.12.2004	Intensivstation der Neurologischen Abteilung, Krankenhaus München-Harlaching
ab 01.01.2005	Institut für Physiologie, LMU-München

Unterschrift

München, den 08. Juli 2005

Susanne Pieperhoff