

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Institut für Kardiovaskuläre Physiologie
Direktor: Prof. Dr. Rudi Busse

Bedeutung der Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin 1177 und Threonin 495 für die Aktivität der endothelialen NO-Synthase

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Peter Stein
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2006

Dekan: Prof. Dr. Joseph Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Ralf Brandes

Koreferent: PD Dr. Judith Händeler

Tag der mündlichen Prüfung: 02. März 2007

1 Einleitung	1
1.1 Das Endothel	1
1.2 Stickstoffmonoxid – NO	2
1.3 Die endotheliale NO-Synthase – eNOS	4
1.4 Regulation der Aktivität der NO-Synthase	7
1.4.1 Endogene Hemmmechanismen der Aktivität der eNOS	8
1.4.2 Positive Regulation der eNOS	10
1.5 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Herstellung der Adenoviren	19
2.2 Karotidenpräparation und Transfektion	20
2.3 Organbadversuche	22
2.4 cGMP Radioimmunoassay	26
2.4.1 Vorbereitung der Proben	26
2.4.2 Durchführung des cGMP-Radioimmunoassays	27
2.5 Westernblot Analysen	28
2.6 Immunhistochemische Färbung und Mikroskopie	29
2.7 Versuchstiere	30
2.8 Statistik	30
3 Ergebnisse	31
3.1 Transfektion	31
3.1.1 Effektivität der Transfektion	31
3.1.2 Selektivität der Transfektion	32
3.1.3 eNOS-Gehalt transfizierter Endothelzellen	34
3.1.4 Endotheliale Expression der eNOS-Mutanten	36
3.2 Wiederherstellung der Relaxationsfähigkeit	37
3.3 Agonisten-induzierte Stimulation der eNOS-Mutanten	39
3.4 Agonisten-induzierte Kontraktion der eNOS-Mutanten	40
3.5 Basale Stickstoffmonoxidproduktion	41
3.5.1 Kontraktion als Folge der eNOS-Hemmung durch L-NNA	41
3.5.2 Basale Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat	42
4 Diskussion	44
4.1 Ausblick	57
5 Zusammenfassung	58
6 Summary	59
7 Quellenverzeichnis	60
8 Danksagung	68
9 Lebenslauf	69
10 Ehrenwörtliche Erklärung	70

1) Einleitung

1.1) Das Endothel

Furchgott und Zawadzki machten 1980 die Entdeckung, daß die potente vasodilatierende Wirkung von Acetylcholin von einem intakten Endothel abhängig ist. Bei Gefäßen, deren Intima bei der Präparation entfernt wurde, zeigte sich als einzige Reaktion auf eine Stimulation mit Acetylcholin eine Kontraktion, die auf die Wirkung an muskarinergen Rezeptoren der glatten Muskulatur zurückzuführen ist. Sie schlußfolgerten, daß es einen Botenstoff geben müsse, der dem Endothel entspringt und der eine Relaxation in den glatten Muskelzellen der Media bewirkt. Dieser Stoff wurde daher endothelium-derived relaxing factor (EDRF) genannt (Furchgott 1980).

Das Endothel ist eine Einzelschicht, die das komplette Gefäßsystem auskleidet und mit dem Blut in direktem Kontakt steht. Es stellt mit einer Masse von ca. 1 Kg das größte endokrine Organ des Körpers dar. Es fungiert als Schnittstelle zwischen dem Blut und den Gefäßen und kann nicht nur auf die chemischen und humoralen Inhaltsstoffe des Blutes reagieren, sondern detektiert über Kohlenhydratketten auf der Oberfläche, die in den Blutstrom hineinragen, auch die Fließgeschwindigkeit und die damit verbundenen Scherkräfte des Blutes. Der Zellverband des Endothels zeigt in den verschiedenen Organen des Körpers einen strukturellen Aufbau, der den jeweiligen Anforderungen im Stromgebiet entspricht. Stoffwechselaktive Organe wie die Leber benötigen einen regen Austausch mit dem Blut, weshalb das Endothel hier fenestriert ist. Das Gehirn hingegen wird aufgrund seines selektiven Stoffwechsels und seiner Sensibilität gegenüber chemischen Noxen durch das Endothel abgeschirmt, indem die einzelnen Zellen über „tight junctions“ miteinander in Verbindung stehen. Hier bildet das Endothel die sog. Blut-Hirn-Schranke.

Das Endothel dient aber nicht nur der Regulation der Vasomotorik und des Stofftransports in die perfundierten Organe es nimmt auch auf vielfältige Weise an den Stoffwechselläufigkeiten des Blutes Teil. Es trägt sowohl zur Bildung als auch zur Lyse von Thromben bei, beeinflußt die primäre Blutstillung und koordiniert die Adhäsion

von Zellen des Blutes an die Gefäßwand (Radomski 1993). Darüber hinaus reguliert das Endothel die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und die Angiogeneese (Peiro 1995).

1.2) Stickstoffmonoxid – NO

NO wurde trotz seiner vielgestaltigen Auswirkungen lange Zeit nicht als Signalmolekül identifiziert, was daran lag, daß es mit nur zwei Atomen und seinem Radikalcharakter nicht der Vorstellung eines Botenstoffs entsprach. Bis 1987 waren alle bekannten Botenstoffe und Hormone als recht große und komplex geformte Moleküle beschrieben worden. Sie bestanden aus Aminosäuren, Peptiden, Proteinen oder deren Derivaten. Über diese Signalmoleküle wußte man, daß sie nach dem Schlüsselschloßprinzip an ihren Rezeptor binden müssen, um ihre Wirkung zu entfalten. Aber weder der Botenstoff noch ein Rezeptor auf den Muskelzellen ließ sich im Fall des NO finden. Ignarro und Furchgott spekulierten 1986 unabhängig voneinander auf einer Konferenz, daß EDRF und NO identisch seien, aber erst nach sieben Jahren gelang es Ignarro et al. zu zeigen, daß der Stoff, den man mangels anderer Kennzeichen seit Furchgott EDRF nannte, NO ist (Ignarro 1987; Palmer 1987).

Bereits 1977 fand Ferid Murad heraus, daß NO die Aktivität der Guanylatzyklase verstärkt und die glatte Muskulatur entspannt (Murad 1978). Aber erst zehn Jahre später konnte nachgewiesen werden, daß NO nicht an einen membranständigen Rezeptor bindet, sondern seine Wirkung an der löslichen Guanylatzyklase entfaltet (Denninger 1999; Ignarro 1991b). Die Aktivierung des Enzyms Guanylatzyklase erfolgt durch Wechselwirkung mit der Hämgruppe (Baltrons 2003). Viele der NO-Effekte (Vasodilatation, Hemmung der Plättchenaggregation und Wachstumsinhibierung) werden durch den „second messenger“ cGMP (cyclic Guanosinemonophosphate) vermittelt (Clementi 1995; Stamler 1994).

NO reagiert des Weiteren über kovalente Modifizierungen von [FeS]-Clustern und Thiolgruppen in Proteinen und mit Radikalen (Stamler 1994). Zum Beispiel inaktiviert die Nitrosylierung Caspase-3 und Caspase-8, wodurch Apoptose verhindert wird.

Wegen seiner vielfältigen Aufgaben im Körper und seiner einfachen Struktur wird NO von vielen Wissenschaftlern sogar als der Prototyp eines Signalmoleküls gesehen, das zusammen mit cGMP ein universelles Signaltransduktionssystem darstellt.

NO wird nicht nur von sämtlichen Säugetieren gebildet, auch Vögel, Fische und Krebse, die sich schon vor mehr als 500 Millionen Jahren von der Entwicklungslinie der Wirbeltiere getrennt haben, nutzen NO zur Regulation ihrer Körperfunktionen. Entsprechend gehört das Enzym, mit dessen Hilfe das Gas in den Körperzellen produziert wird, vermutlich zu einer Gruppe von Proteinen, deren Ursprünge 3,5 Milliarden Jahre zurückreichen. Sogar in einzelligen Organismen scheint NO eine wichtige Rolle im Stoffwechsel zu spielen.

Stickstoffmonoxid ist ein Radikal und wird im Körper mit einer Halbwertszeit von nur fünf bis zehn Sekunden zu stoffwechselneutralem Nitrat metabolisiert. Auf diese Weise ist garantiert, daß seine Effekte hauptsächlich am Entstehungsort (autokrin) und in direkt benachbarten Geweben (parakrin) zum Tragen kommen (Lancaster, Jr. 1994). Durch seine geringe Molekülgröße und hydrophoben Charakter kann es einige hundert Mikrometer diffundieren. Die Vasomotorik kann daher auf lokaler Ebene in den einzelnen Geweben gesteuert werden. Diese Entdeckung revolutionierte die Lehrmeinung, daß die Vasomotorik im Wesentlichen von Mediatoren reguliert würde, die im Blut zirkulieren. Neben NO existieren noch eine Reihe weiterer Produkte des Endothels, die einen erheblichen Einfluß auf die Gefäßweitstellung haben. Aus der Gruppe der Prostaglandine wirken einige Vertreter vasokonstriktorisches, andere, wie das Prostazyklin (PGI₂), sind ebenfalls sehr potente Vasodilatoren (Smith 1986). Ein weiterer vasodilatierender Faktor des Endothels ist der endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Funktionell wird EDHF als Sicherungssystem bei Ausfall des NO und PGI₂-Systems angesehen, d.h. es steht auch bei einer endothelialen Dysfunktion ein vasodilatierendes System zur Verfügung (Siegel 1989). Endothelium-derived hyperpolarisation factor kann im Gegensatz zu NO nicht durch oxidativen Stress inaktiviert werden.

Neben der direkten Relaxation der glatten Gefäßmuskeln (Ignarro 1991a) limitiert NO die Proliferation dieser Zellen (Garg 1989). NO inhibiert die entzündungsinduzierte Aktivierung der Endothelzellen und reduziert die Expression von Adhäsionsmolekülen

für Lymphozyten und Monozyten (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) und für neutrophile Granulozyten (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) (De Caterina 1995). Es senkt die Aggregationsneigung und die Adhäsion der Plättchen (Bath 1991; Radomski 1993; Sneddon 1988). Außerdem verhindert es die Chemotaxis von Monozyten (Bath 1991). Neben den gefäßprotektiven Funktionen kann das Radikal NO im Rahmen der Immunantwort auch zytotoxisch sein (Karupiah 1993). Entscheidend, ob NO protektiv oder toxisch wirkt, sind die Konzentration von NO und der Redoxstatus der Zelle. Gesteuert wird die Produktion des NO durch verschiedene Signale bzw. Signaltransduktionssysteme, deren Wege konvergieren. Das heißt, sie nutzen das NO als ubiquitären chemischen Botenstoff.

1.3) Die endotheliale NO-Synthase – eNOS

Die Enzyme, die als Klasse der NO-Synthasen zusammengefasst werden produzieren Stickstoffmonoxid durch Katalysierung einer fünf-Elektronen-Oxidation eines Guanidin-Stickstoffs des L-Arginin. Bei Säugetieren unterscheidet man drei Isoenzyme der NOS: Die neuronale NOS (nNOS oder NOS-1), die induzierbare NOS (iNOS oder NOS-2) und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS-3) (Knowles 1994). Die Oxidation von L-Arginin zu L-Zitrullin findet in zwei aufeinander folgenden Monooxygenierungsreaktionen statt. Dabei entsteht $N^{\text{G}}\text{-hydroxy-L-Arginin}$ als ein Intermediat (Koppenol 1996). Zwei Mol molekularer Sauerstoff und 1,5 Mol NADPH werden verbraucht um ein Mol NO zu produzieren (Liu 1996b). NO-Synthasen sind die einzigen bekannten Enzyme, die gleichzeitig fünf gebundene Kofaktoren, bzw. prosthetische Gruppen benötigen. Diese sind FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid), FMN (Flavinmononucleotid), Häm, Tetrahydrobiopterin (BH_4) und im Falle der eNOS und der nNOS Ca^{2+} -Calmodulin (CaM). Die Aktivität der iNOS ist unabhängig von Kalzium, weil sie Calmodulin fest gebunden hat.

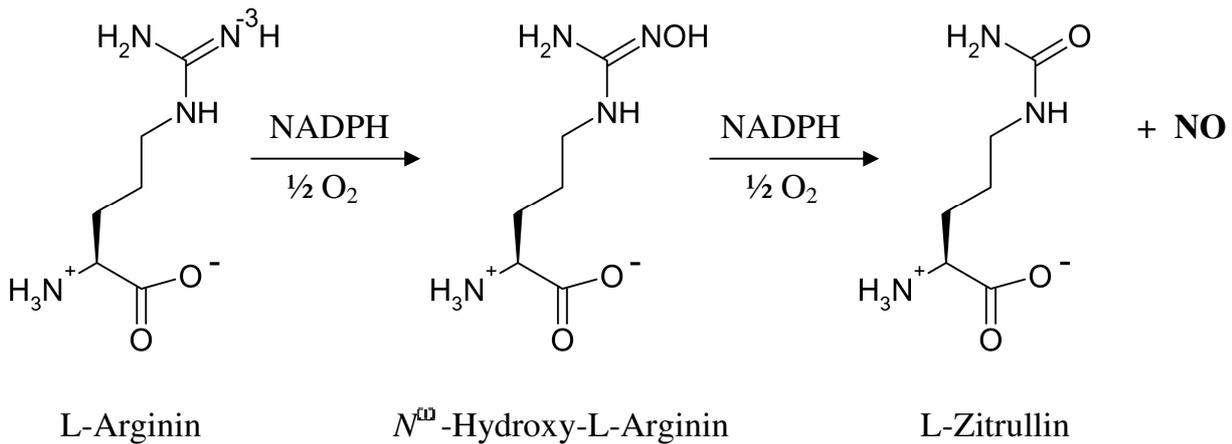
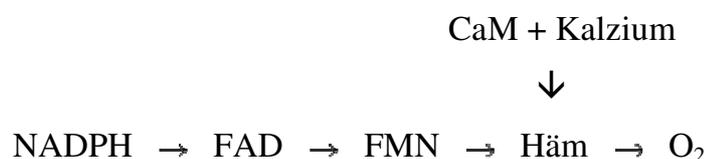


Abb. 1 : Reaktionsgleichung der NO-Bildung aus L-Arginin

Über den Zwischenschritt des Hydroxy-Arginins wird L-Arginin unter Abspaltung eines Moleküls NO zu L-Zitrullin.

iNOS und nNOS sind löslich und werden hauptsächlich im Zytosol gefunden, während die Lokalisation der eNOS in den Zellen des Endothels durch kotranslationale, N-terminale Myristoylierung und Palmitoylierung reguliert wird. Als Homodimere bestehen die Enzyme im nativen Zustand aus einem Komplex aus zwei identischen Aminosäureketten (Marletta 1994). Das Molekulargewicht des Monomers der humanen, endothelialen NO-Synthase beträgt bei der Proteinauftrennung in SDS-Polyacrylamid-Gel ca. 133 kDa.

Jedes dieser Monomere besteht wiederum aus zwei Hauptdomänen: Einer N-terminalen Oxygenasedomäne, welche zur Klasse der Häm-Thiolat-Proteine (Sammelbegriff für alle Hämproteine, deren fünfter Ligand am Hämeisen eine Thiolatgruppe ist) gehört und einer C-terminalen Reduktasedomäne. Die Verbindungsdomäne zwischen der Oxygenase und der Reduktasedomäne enthält eine Bindungssequenz für Calmodulin. Der Elektronenfluß durch das Enzym erfolgt vom NADPH zum Sauerstoff wie folgt:



Die Bindung von Kalzium an CaM reguliert die katalytische Aktivität des Enzyms, indem es den Elektronenfluß durch das Enzym steuert und auf diese Weise Oxygenase- und Reduktasedomäne funktionell miteinander koppelt.

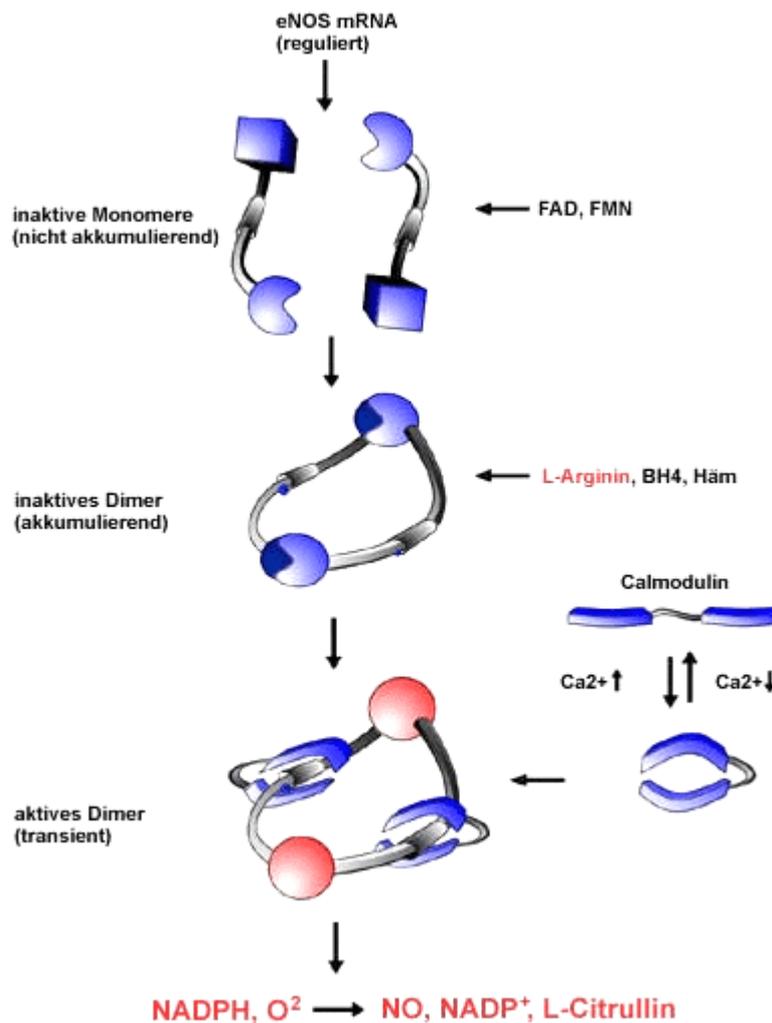


Abb. 2 : Modell der allosterischen Regulation der endothelialen NO-Synthase

Die Bindung der Kofaktoren FAD und FMN überführt die inaktiven Monomere der eNOS in ein inaktives Dimer, an das Häm und Tetrahydrobiopterin (BH₄) und das Substrat L-Arginin binden. Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wird Calmodulin aktiviert. Der Ca²⁺/Calmodulinkomplex führt zur Konformationsänderung des inaktiven Dimers zu seiner katalytisch aktiven Form. (Grafik aus: Borrmann 1998)

Janssens et al. gelang es 1992 erstmals eine cDNA zu isolieren, die für die menschliche endotheliale NO-Synthase kodiert. Das eNOS-Gen erstreckt sich über 21 kb genomischer DNA und kodiert eine mRNA aus 26 Exons und 4052 Nukleotiden (Janssens 1992). Die Charakterisierung der proximalen 5'-Promoterregion zeigte, daß der eNOS-Promoter keine TATA-Box in ausreichender Entfernung für den Initiationskomplex enthält (Robinson 1994), aber Elemente besitzt, die mit einem konstitutiv exprimierten Gen übereinstimmen (SP1- und GATA-Motive) (Marsden 1993). Huang et al. unterbrachen 1995 das eNOS-Gen der Maus und fanden bei den homozygoten Knock-out-Mäusen (eNOS^{-/-}) lebensfähige Tiere, bei denen kein endotheliales NO nachweisbar war. Diese Mäuse wiesen eine Hypertonie auf. Die Autoren schlossen daraus auf die Vermittlung der basalen Vasodilatation durch die eNOS (Huang 1995). Die eNOS ist charakterisiert durch eine „low-output“-Kinetik, wie es für Homöostasemechanismen mit einer kurzfristigen Anpassung (Blutdruckregulation) typisch ist (Nathan 1992).

1.4) Regulation der Aktivität der endothelialen NO-Synthase

In frühen pharmakologischen Studien zur endothelabhängigen Gefäßrelaxation in Organkulturen wurde erstmals beobachtet, daß der Entzug extrazellulären Kalziums im Nährmedium die agonisteninduzierte Freisetzung von NO blockiert (Forstermann 1991; Singer 1982). Weitere Studien, in denen Zelllysate Verwendung fanden, dokumentieren, daß sowohl Kalziumentzug als auch Calmodulinantagonisierung mit spezifischen Inhibitoren die Produktion von NO blockieren. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die eNOS ein Kalzium/Calmodulin-abhängiges Enzym ist (Busse 1987; Busse 1990; Forstermann 1991).

Daß die Produktion von EDRF (NO) neben L-Arginin, NADPH und 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin auch Kalzium/Calmodulin-abhängig ist, wurde auch von Pollock et al. mittels hochgereinigter eNOS nachgewiesen. Dieses Modell bestätigt die Bedeutung des Calmodulinbindungsmotivs in der Aminosäuresequenz, die sich aus der

cDNA der eNOS ableitet. So wurde zunächst angenommen, daß die Regulation der eNOS im Wesentlichen über das Kalzium/Calmodulinsystem vermittelt wird. Etwa seit 1996/97 vermehrten sich die Hinweise, daß eine Vielzahl von Proteinen neben CaM existieren muß, die die Aktivität der eNOS positiv oder negativ regulieren können. Einen ersten Anhalt für diese weiteren Aktivierungsmechanismen lieferte die Beobachtung, daß die eNOS ein N-myristoyliertes Protein ist (Pollock 1992). N-Myristoylierung ist ein Azylierungsprozess, der spezifisch an der N-terminalen Aminosäure Glycin stattfindet. Dieser Prozess betrifft über hundert Proteine in höheren und niederen eukaryotischen Zellen und ist beteiligt an der Ontogenese und der sekundären Signaltransduktion (Boutin 1997).

Das zytosolische Enzym, das diese Reaktion katalysiert ist die N-Myristoyltransferase. N-Myristoylierung ist von Bedeutung für die intrazelluläre Adressierung in verschiedene Bereiche der Zelle. Eine Mutation, welche diese Myristoylierung blockiert, hemmt die Signaltransduktion auf komplexe Weise, während die enzymatische Aktivität von nicht-azylierter eNOS in Zelllysaten völlig unbeeinflusst bleibt. Es mußte also neben CaM noch andere Mechanismen der Signaltransduktion geben (Sakoda 1995; Sessa 1995). Außerdem lieferte die Hypothese, daß die korrekte intrazelluläre Lokalisation der eNOS in die Nähe anderer regulierender Proteine (Scaffolds, Chaperone, Kinasen) ausschlaggebend für deren Aktivierung ist, eine Grundlage für die Entdeckung weiterer Proteine, die an der eNOS-Aktivierung positiv oder negativ beteiligt sind.

1.4.1) Endogene Hemmmechanismen der Aktivität der eNOS

Ein Protein, das bekannt ist für eine Hemmung der eNOS ist Caveolin. Es gilt neben Cholesterin als ein Strukturelement der Caveolae und hat verschiedene Eigenschaften, die die Biologie von anderen Proteinen beeinflussen, welche sich an cholesterinreichen Membranen anlagern. Drei Gruppen gelang es unabhängig voneinander nachzuweisen, daß zwischen der eNOS und Caveolin 1 bzw. 3 eine direkte Interaktion stattfindet. Caveolin hat die Fähigkeit die eNOS an den Aminosäuren 60-110 und in geringerem Maße auch 135-178 zu binden (Feron 1996; Garcia-Cardena 1996; Ju 1997). Smart et. al gelang es schließlich eine übereinstimmende Caveolinbindungssequenz

innerhalb der eNOS zu identifizieren, welche sich zwischen den Aminosäuren 350 und 358 befindet (Smart 1999). Die hemmende Eigenschaft von Caveolin auf die Aktivität der eNOS konnte am eindrucksvollsten durch Inkubation von eNOS mit Caveolin1/3-Gerüstpeptiden demonstriert werden. Inkubation reiner eNOS mit diesen resultierte in einer Inhibition der eNOS-Aktivität (Garcia-Cardena 1997). COS7 Zellen, die Caveolin überexprimierten, zeigten eine reduzierte eNOS-Aktivität und eine verminderte Produktion von NO (Michel 1997b). Es wurde weiterhin beobachtet, daß eine Mutation des Caveolinbindungsmotivs innerhalb der eNOS Caveolin die Fähigkeit zur eNOS-Suppression nimmt (Garcia-Cardena 1997). Da die Reduktion der eNOS-Aktivität durch Caveolinpeptide und überexprimiertem Caveolin mittels exogen zugeführtem Calmodulin umgekehrt werden kann, wurde zunächst eine wechselseitige Regulation mit Caveolin als Inhibitor und Calmodulin als Aktivator diskutiert. Vermutungen, daß nur CaM die hemmende Bindung zu Caveolin zu lösen vermag, wurden im Lichte immer neuer eNOS-regulierender Proteine noch nicht umfassend untersucht. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß Caveolin die NO-Produktion negativ reguliert und eine NO-Freisetzung die Lösung aus der inhibierenden Verbindung mit Caveolin voraussetzt (Michel 1997a). Es fehlen allerdings direkte Beweise für eine vermehrte NO-Produktion von Zellen, die keine Caveoline besitzen. Bisher gelang es auch nicht eine verlängerte oder gesteigerte NO-Freisetzung durch Trennung des NOS-Caveolin-Komplexes zu erzielen. Auch Experimente in vivo zu diesem Thema unterstützen eine Interaktion zwischen der eNOS und Caveolin.

Fulton et. al. verwendete 2001 eine membrangängige Form der Caveolin 1-Gerüstdomäne (Aminosäuren 82-101), die an einer Zell-permeablen Führungssequenz fixiert war (Bucci 2000). Bei Exposition von Blutgefäßen wurde dieses Peptid in das Endothel aufgenommen und blockierte die Acetylcholin-induzierte Relaxation ohne einen Einfluß zu haben auf die Natriumnitroprussid-Antwort und die Freisetzung von Prostacyclin. In vivo Experimente an Caveolin-Knock-out-Mäusen belegen, daß der Mangel an Caveolin 1 zu einem dramatischen Anstieg des systemischen NO-Spiegels führt (Zhao 2002). Diese Ergebnisse zeigen, daß Caveolin auch in intakten Blutgefäßen ein potenter eNOS-Inhibitor ist.

Intrazelluläre Anteile G-proteingekoppelter Rezeptoren sind ebenfalls in der Lage die eNOS Aktivität negativ zu regulieren. Es konnte gezeigt werden, daß die intrazelluläre Domäne 4 (ID4) des Bradykinin 2 Rezeptors (Venema 1996) und der Angiotensin II R1 Rezeptor in vitro die Aktivität der eNOS reduzieren (Ju 1998). Das ID4 Peptid beeinflusst die Katalyse der eNOS durch Störung des Elektronentransfers vom Flavin zum Häm (Golser 2000).

Zu einem der neueren Proteine, die mit eNOS interagieren zählt die NOSIP (Dedio 2001). NOSIP ist ein 34 kD Protein, das zunächst als einer der Bindungspartner der eNOS erkannt wurde. Auch wenn NOSIP in vitro keinen Einfluß auf die eNOS ausübt, so zeigte sich in intakten Zellsystemen eine reduzierte eNOS-Aktivität nach Ionomycin-Stimulation. Die Fähigkeit die NO-Produktion intakter Zellen zu inhibieren, wird auf die Rückverteilung aus der Plasmamembran in intrazelluläre Kompartimente zurückgeführt.

1.4.2) Positive Regulation der eNOS

Für Calmodulin konnte als erstes Protein gezeigt werden, daß es bei der eNOS-Regulation eine Rolle spielt. Frühe Studien mit nNOS und eNOS (Bredt 1990; Forstermann 1991) zeigten, daß gereinigte NOS Kalzium/Calmodulin als Aktivator benötigt um NO zu produzieren. Mechanisch betrachtet, bindet Kalzium/Calmodulin an ein CaM-bindendes Motiv der eNOS, was eine angrenzende autoinhibitorische Schleife außer Kraft setzt und auf diese Weise den NADPH-abhängigen Elektronenfluß von der Reduktase- zur Oxygenasedomäne ermöglicht. Der endgültige Elektronenakzeptor ist ein Häm. Hier wird der Sauerstoff gebunden, der dann in das Substrat der NOS (L-Arginin) eingefügt wird. Zwar gibt es bislang keine Veröffentlichungen, die beweisend für die stimulusabhängige Bindung von CaM an die eNOS und den gleichzeitigen Beginn der NO-Produktion sind, aber pharmakologische Untersuchungen haben mit CaM-Inhibitoren und kalziumfreien Puffer indirekt die Notwendigkeit von CaM nachweisen können. Russell et al. hat 2000 zeigen können, daß eNOS, die von menschlichen Endothelzellen immunopräzipitiert wurde, immunoreaktives CaM gebunden hatte (Russell 2000). Es

kann daher angenommen werden, daß CaM als eine prosthetische Gruppe dient, und die Affinität der eNOS durch geringfügige Veränderungen des Kalziumplasmaspiegels bestimmt wird (Cho 1992).

Ebenfalls für ihren stimulierenden Effekt bekannt sind die Hitzeschockproteine (Hsp). Hsp sind ein Gruppe von Proteinen, die in erhöhtem Maße gebildet werden, nachdem Zellen Hitze oder anderen Stressoren wie Ultraviolettstrahlung, Schwermetallen oder Ethanol ausgesetzt wurden. In diesen Situationen stabilisieren Hitzeschockproteine zelluläre Proteine, um sie vor Denaturierung zu schützen oder beschleunigen den Abbau funktionsloser Proteine über das Proteasom. Sie werden in allen eukaryotischen Zellen exprimiert (Pratt 1997). Darüber hinaus mehren sich die Hinweise, daß hsp90 in allen Zellen ein Bestandteil der intrazellulären Signaltransduktion darstellt. So dient hsp90 und seine Orthologe der Signalleitung durch die Tyrosinkinase bei der Fruchtfliege und durch G-proteingekoppelte Rezeptoren in der Hefe.

Im Falle der eNOS wurde zunächst ein 90 kDa großes, Tyrosin-phosphoryliertes Protein gefunden, das mit ihr immunopräzipitierte. Dieses Protein wurde später als hsp90 identifiziert (Garcia-Cardena 1998; Venema 1996). Hsp90 ist in ruhenden Endothelzellen mit der eNOS assoziiert. Für vier verschiedene Stimuli, die zur NO-Freisetzung führen, nämlich VEGF, Histamin, Schubspannung und Östrogen, konnte nach deren Applikation eine vermehrte Interaktion zwischen hsp90 und der eNOS nachgewiesen werden. Diese war zeitlich eng mit der NO-Produktion gekoppelt (Garcia-Cardena 1998; Russell 2000). In Vitro kann hsp90 die eNOS direkt aktivieren und eine Koexpression von hsp90 und eNOS in COS-Zellen erhöht deren Aktivität (Garcia-Cardena 1998). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, daß hsp90 als allosterischer Modulator fungieren könnte. Es bewirkt eine Veränderung der Konformation der eNOS, welche per se die Aktivität des Enzyms steigert oder die Bindung zu anderen aktivierenden Faktoren stabilisiert. Song et al. konnte 2001 zeigen, daß hsp90 die Affinität zwischen CaM und der neuronalen NOS steigert (Song 2001). Alternativ könnte hsp90 auch als Wegbereiter für die Rekrutierung anderer regulierender Proteine, wie Kinasen oder Phosphatasen, dienen.

Lange Zeit wurde ausschließlich CaM für die Dissoziation von eNOS und Caveolin verantwortlich gemacht. Markierung von Endothelzellen mit [³⁵S]Methionin und

anschließende Immunopräzipitation brachte jedoch zahlreiche koassoziierte, radiomarkierte Proteine zum Vorschein, die substöchiometrisch mit der eNOS interagieren (Gratton 2000). Eine Westernblotanalyse dieser Immunopräzipitate demonstrierte die Anwesenheit von eNOS, Caveolin 1 und hsp90 in dem selben Komplex. Eine Rekonstruktion des Komplexes in vitro zeigte ebenfalls eine Interaktion zwischen der eNOS und hsp90 bzw. Caveolin. Diese reagieren selber nicht miteinander, so daß sich annehmen läßt, daß die eNOS als Brücke diesen Komplex zusammenhält. Die Verbindung zwischen Caveolin und der eNOS konnte in vitro nicht alleine durch Kalzium-aktiviertes CaM getrennt werden. Während hsp90 die Interaktion zwischen eNOS und Caveolin selber nicht beeinflusst, unterstützt es die Fähigkeit von CaM das Caveolin von der eNOS zu verdrängen. Es existieren zwei denkbare Modelle, die diese Erkenntnisse vereinbaren. Zum einen könnte die Interaktion mit hsp90 und CaM mit der eNOS zu einer schwachen physikalischen Verdrängung des Caveolin führen, bei der der Komplex aber innerhalb der Caveolae verbleibt. Ein anderes Modell sieht vor, daß hsp90 und Kalzium-aktiviertes CaM zusammen mit der eNOS an Caveolin gebunden ist, und eine leichte Änderung in der eNOS-Konformation ohne massenhafte Translokationsvorgänge zur effizienten Stimulusantwort führt.

Um das Verhältnis zwischen hsp90 und der eNOS in vivo zu untersuchen wurde das Antibiotikum Geldanamycin (GA) verwendet. Geldanamycin ist ein Stoff, der physiologischerweise in Mikroorganismen zur Protektion gebildet wird und ein spezifischer Inhibitor der Hitzeschockproteine ist. GA bindet an die ATP-Bindungsstelle von hsp90 und beeinflusst die Stabilität des Komplexes aus hsp90 und seinem Substrat (Pratt 1997). GA schwächt die cGMP-Produktion nach Stimulation mit Histamin und VEGF in kultivierten Endothelzellen ab und blockiert die ACh-induzierte Relaxation in der Aorta (Garcia-Cardena 1998) und der Arteria cerebralis media der Ratte (Khurana 2000). Weiterhin vermindert es die Fluß-abhängige Vasodilatation (Viswanathan 1999). Hsp90 könnte daher als wichtiger Faktor bei der NO-Freisetzung und der Funktion des Endothels sein.

Dynamin 2 gehört zur Gruppe der großen GTPasen. Es wird vermutet, daß es an der Vesikelbildung und der rezeptorvermittelten Endozytose, sowie der Caveolaeinternalisation und dem Vesikeltransport in und aus dem Golgiapparat beteiligt ist. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, daß Dynamin 2 in den Membranen des Golgiapparates von Endothelzellen mit der eNOS kolokalisiert, und daß es in vivo und in vitro eNOS direkt bindet (Cao 2001). Vorherige Arbeiten konnten die Anwesenheit von Dynamin 2 in der Plasmamembran von Endothelzellen dokumentieren. Es existiert somit, wie die eNOS auch, sowohl im Golgiapparat als auch in der Plasmamembran. In vitro Studien haben gezeigt, daß Dynamin eine Affinität zur eNOS besitzt und in Zellen die Assoziation zwischen eNOS und Dynamin durch Kalzium-Ionophor gesteigert werden kann. In vitro Untersuchungen erbrachten auch, daß Dynamin die NOS-Aktivität direkt steigert. Die physiologische Bedeutung dieser Prozesse wird noch zu erforschen sein.

Immunopräzipitation von eNOS aus Endothelzellen führt zur Kopräzipitation von Kinasen und Proteinen wie Akt, Erk und Raf (Bernier 2000; Michell 1999). Diese Proteine beeinflussen die Aktivität der eNOS durch Phosphorylierung, welche einen weiteren Mechanismus der posttranslationalen eNOS-Regulation darstellt.

Die Möglichkeit mit pharmakologischen Inhibitoren der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3-K) (z.B. Wortmannin und LY298004) die Insulin- und VEGF-stimulierte NO-Freisetzung zu reduzieren, lieferte den ersten Hinweis, daß ein Effektor in der Signaltransduktion, die von der PI-3-k ausgeht, direkten Einfluß nimmt auf die eNOS (Papapetropoulos 1997; Zeng 1996). Die Proteinkinase Akt wird von Phosphatidylinositoltriphosphat (PI-3) generiert, welches ein Produkt der PI-3-Kinase ist. Von Akt weiß man, daß es eine gewisse Zahl von zellulären Substraten phosphoryliert in Abhängigkeit eines bestimmte Substratmotives, wie man es u.a. auch in der eNOS findet (RXRXXXS/T). Akt kann rekombinante eNOS, sowie eNOS in situ an Serin 1177 (Mensch/Maus/Ratte), bzw. Serin 1179 (Rind) direkt phosphorylieren (Dimmeler 1999; Fulton 1999; Gallis 1999; Michell 1999). Aufgrund der komplexen Natur von Kinasekaskaden ist es in vivo schwer eindeutig zu zeigen, daß die eNOS ein direktes Substrat der Akt ist. Es gibt aber einige Hinweise, die dieses Modell unterstützen. So findet sich ein erhöhter Anteil phosphorylierter eNOS

in COS-Zellen, die mit wildtyp-Akt kotransfiziert sind. Dieser Effekt ist Wortmannin-abhängig und läßt sich durch Mutation von Serin 1177 zu Alanin aufheben (Dimmeler 1999; Fulton 1999). Eine Stimulation der Endothelzellen durch Scherkräfte oder mittels VEGF führt zur Phosphorylierung von Akt. Im gleichen Zeitraum wird die eNOS an Serin 1177 auf PI-3-K-abhängige Weise phosphoryliert (Dimmeler 1999; Fulton 1999; Gallis 1999; Michell 1999). Gallis et. al gelang der Nachweis, daß durch Akt phosphorylierte eNOS etwa 15-20 fach aktiver ist als nicht-phosphorylierte eNOS (Gallis 1999). Fulton et. al konnte noch ergänzen, daß die phosphorylierte eNOS bereits bei niedrigeren Kalzium- oder Calmodulinspiegeln vermehrte Aktivität zeigte (Fulton 1999; Michell 1999). Mutation von Serin 1177 zu Aspartat, das die negative Ladung simuliert, die normalerweise durch die Phosphorylierung zustande kommt, erzeugt ein konstitutiv aktives Enzym bereits bei niedrigen Kalziumspiegeln (10nM) (Dimmeler 1999). Dagegen bewirkt eine Mutation von Serin 1177, bzw. 1179 zu Alanin eine Resistenz gegenüber Akt-abhängiger NO-Freisetzung (Fulton 1999). Der adenovirale Gentransfer einer konstitutiv aktivierten Akt in endotheliale Zellen erhöhte die basale NO-Freisetzung, und während aktivierte Akt die stimulierende Wirkung von VEGF verstärkte, wurde sie durch inaktiviertes Akt um 50 – 70% abgeschwächt, ähnlich wie nach Behandlung mit Wortmannin (Fulton 1999; Papapetropoulos 1997). Es wird angenommen, daß die agonisteninduzierte Produktion von NO eine bestimmte intrazelluläre Lokalisation der eNOS voraussetzt. Dadurch kann teilweise begründet werden, warum die agonisteninduzierte NO-Produktion eingeschränkt ist in Zellen, in denen die eNOS fehllokalisiert ist (Liu 1996a; Sessa 1995). Da Wortmannin die Phosphorylierung an Serin 1177 nicht vollständig ausschaltet, ist anzunehmen, daß auch andere Kinasen in der Lage sind die eNOS an dieser Stelle zu phosphorylieren. Des Weiteren scheint es einen Unterschied zwischen VEGF und insulinlike growth factor (IGF-1) zu geben in der Fähigkeit Akt und eNOS zu phosphorylieren. Während IGF-1 im Vergleich zu VEGF eine stärkere Phosphorylierung der Akt bewirkt, ist es doch weniger effektiv in der Phosphorylierung von eNOS (Michell 1999). Weitere Kinasen, die Serin 1177 phosphorylieren sind die AMP-abhängige Kinasen, welche zusätzlich noch Threonin 495 phosphoryliert (Chen 1999), Proteinkinase A, und Proteinkinase G (Butt 2000). Eine Hemmung der Kalzium-Calmodulinkinase mit KN-62 hat keine

Auswirkungen auf die Phosphorylierung von Serin 1177 und die Aktivierung von cGMP-abhängigen Kinasen durch NO (Gallis 1999). Es ist nicht auszuschließen, daß weitere Kinasen, die Serin 1177/1179 phosphorylieren, noch nicht entdeckt wurden.

In der Aminosäuresequenz der eNOS befinden sich noch zahlreiche andere Phosphorylierungsstellen. Scherkräfte induzieren die Phosphorylierung an Serin 116 (Gallis 1999). Die angrenzenden Aminosäuren gehören aber nicht zum vermuteten Akt-Bindungskomplex. Daher ist die genaue Bedeutung, sowie die phosphorylierende Kinase bislang unbekannt. ENOS wird ausserdem noch durch die AMP-aktivierte Kinase und Proteinkinase C phosphoryliert an Threonin 495. Thr 495 wurde als erste Aminosäure identifiziert, deren Phosphorylierung zu einer Reduktion der Aktivität der eNOS führt (Chen 1999). Nach bisherigen Untersuchungen ist Thr 495 unter basalen Bedingungen in allen Endothelzellen konstitutiv phosphoryliert, so daß die NO-Produktion bei Fehlen eines Stimulus gedrosselt ist (Fleming 2001; Harris 2001; Michell 2001). Nach Stimulation mit Bradykinin oder Kalziumionophor kommt es an Thr 495 zu einer vorübergehenden Dephosphorylierung, die über eine Veränderung der CaM-bindenden Domäne eine Bindung zu Kalzium-Calmodulin ermöglicht (Fleming 2001). Weiterhin korreliert die Dephosphorylierung an Thr 495 nach Bradikininstimulus mit einer Phosphorylierung an Ser 1177, wie frühere Versuche, bei denen Endothelzellen aus Schweineaorten mit Bradykinin stimuliert wurden, gezeigt haben.

Die verantwortliche Isoform der Proteinkinase C ist noch nicht identifiziert, aber Proteinkinase C ist in nicht-stimulierten Endothelzellen konstitutiv aktiviert und eine Hemmung mit Proteinkinaseinhibitoren führt über die abgeschwächte Phosphorylierung an Thr 495 zu einer erhöhten NO-Produktion (Lenasi 2003).

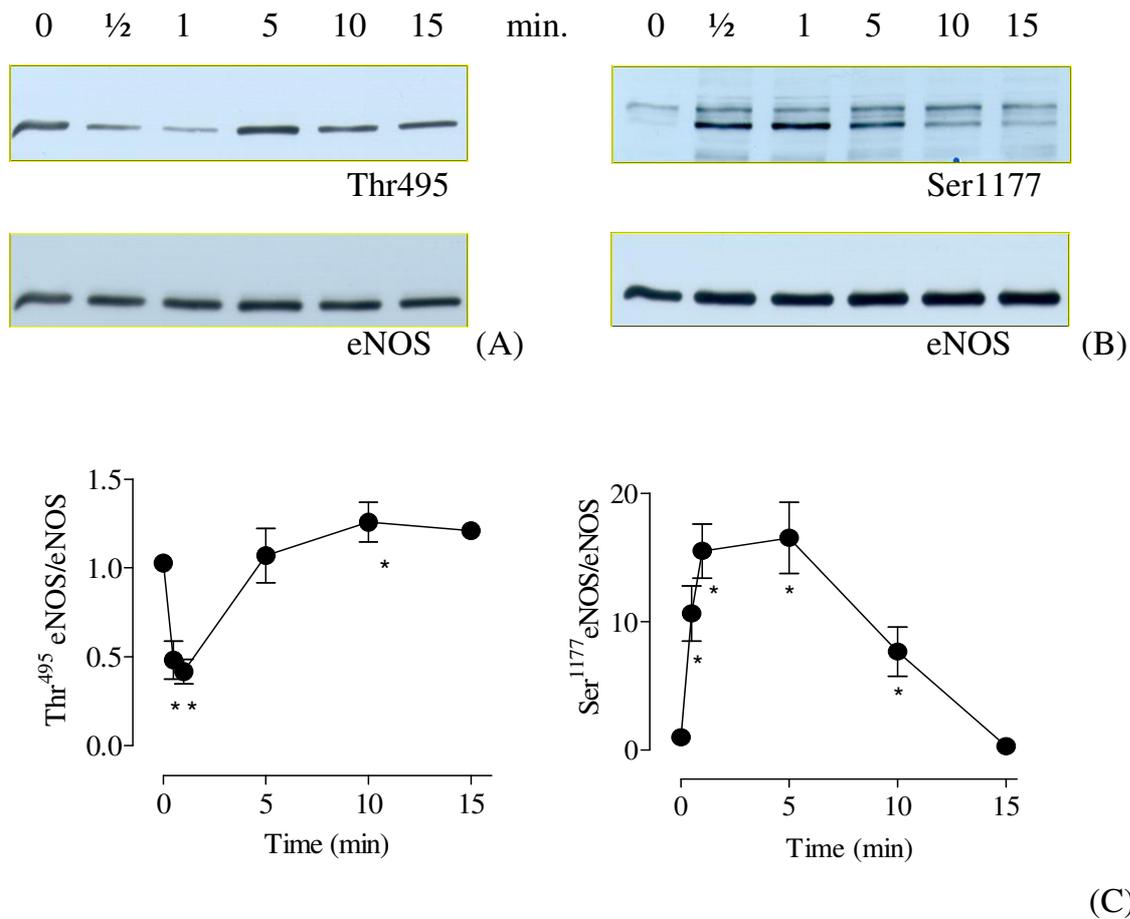


Abb. 3 : Westernblotanalysen zum zeitlichen Verlauf der Bradykinin-induzierten Veränderungen an den Phosphorylierungsstellen Thr 495 (A) und Ser 1177 (B) der eNOS und densitometrische Auswertung (C) Endothelzellen aus Schweinaorten wurden nach Stimulation mit Acetylcholin zu unterschiedlichen Zeitpunkten schockgefroren. Danach wurde mittels Westernblotanalyse die Menge an phosphorylierter eNOS bestimmt. (Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$) (Fleming 2001)

Die Bedeutung von Serin 1177/1179 ist durch zahlreiche Veröffentlichungen unterstrichen worden. Trotzdem sind einige Mechanismen noch nicht vollständig aufgedeckt worden. Nicht eindeutig geklärt ist die Frage, auf welche Weise eine Phosphorylierung bzw. eine Dephosphorylierung an einer spezifischen Stelle die enzymatische Aktivität oder die Sensitivität gegenüber Kalzium/Calmodulin erhöht. Es wird diskutiert, daß Änderungen der Konformation und Verdrängung der selbsthemmenden Anteile am C-terminalen Ende des Enzyms verantwortlich seien.

Dieses Modell wird zusätzlich von der Entdeckung unterstützt, daß eine experimentell verkürzte eNOS, deren Aminosäuresequenz nach Serin 1177 endet, mehr Aktivität zeigt als die wt-Variante (Chen 1999). Im Vergleich zwischen rekombinanter wt-eNOS und einer S1177D-Mutante, die an dieser Stelle phosphomimetische Eigenschaften besitzt, zeigt sich, daß die S1177D-eNOS deutlich effizienter arbeitet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die Dissoziation von CaM langsamer von Statten geht als dies beim Wildtyp der Fall ist. Ein ebenfalls denkbares Szenario ist, daß die Phosphorylierung die Konformation zwischen dem C-terminalen Ende und den Calmodulin-autoinhibitorischen Anteilen beeinflusst (Fulton 1999).

1.5) Zielsetzung

Ziel dieser Doktorarbeit ist die Entwicklung einer Methode, mit deren Hilfe genetisch veränderte eNOS-Varianten, die durch (anti-)phosphomimetische Substitution unterschiedliche Phosphorylierungszustände simulieren, in einem intakten Blutgefäß untersucht werden können. Mit Hilfe dieser Methode wurden drei eNOS-Varianten untersucht und miteinander verglichen, um Aufschluß über die Bedeutung der Aminosäuren Serin 1177 und Threonin 495 zu erlangen. Aufgrund der speziellen Fragestellung nach einem Synergismus zwischen diesen beiden Phosphorylierungsstellen, wurden folgenden eNOS-Varianten generiert und untersucht.

Wildtyp-eNOS

Serin1177Aspartat (S1177D) - Einfachmutante

Serin1177Aspartat/Threonin495Alanin (S1177D/T495A) - Doppelmutante

Am Anfang stand die Wahl eines geeigneten Versuchstieres und des günstigsten Gefäßabschnitts, sowie die Entwicklung eines Applikationsverfahrens, das möglichst selektiv das Endothel transfiziert. Bei den Experimenten sollte ein Versuchsaufbau konstruiert werden, der physiologische Bedingungen für die zu untersuchenden Gefäße bietet. Als wichtigster Parameter wurde die endothelabhängige Relaxation bewertet,

als der physiologische Effekt des NO. Da außer NO noch weitere Signalmoleküle existieren, die zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führen können, war eine Voraussetzung, daß alle anderen vasodilatierenden Effekte blockiert sind, so daß eine Vasodilatation als Wirkung des NO zu verstehen ist. Die Entwicklung eines solchen Transfektionssystems und dessen Optimierung und Testung ging den Versuchen mit genetisch manipulierten NO-Synthasen voraus. Auf der Grundlage der Ergebnisse, die mit diesem Versuchsaufbau gewonnen wurden, konnten Rückschlüsse auf die Aktivität der einzelnen eNOS-Mutanten gezogen werden.

2) Material und Methoden

2.1) Herstellung der eNOS Adenoviren

Die von der menschlichen wildtyp-eNOS abgeleiteten Mutanten der eNOS wurden für diese Arbeit zu Verfügung gestellt. Sie wurden generiert mit Hilfe eines PCR-basierten mutagenese Kits (Stratagene). Die Mutation von Ser 1177 und Thr 495 zu Alanin bzw. Aspartat wurde verifiziert durch Sequenzierung wie beschrieben in (Fleming 2001):

Die komplette, myc/his-markierte wildtyp-eNOS und die mutierten cDNA Abschnitte wurden von der pcDNA3.1 myc/his mit PmeI/HindIII ausgeschnitten und anschließend mittels Gelreinigung aufbereitet. Dazu wurde ein Gen Extraktions Kit von Genomed (Loehne, Germany) benutzt. Die Überhänge dieser Abschnitte wurden mit dem großen Fragment der Escherichia coli DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) abgetrennt und anschließend eingebunden in die linearisierten und dephosphorylierten adenoviralen shuttle Vektoren pAd-Track-CMV und pAdShuttle-CMV (Bert Vogelstein, Howard Hughes Medical Institute, Baltimore, MD). Die Plasmide wurden durch homologe Rekombination in E. Coli in das Adenovirus 5 Genom integriert.

Die eNOS-cDNA-tragenden Shuttle Vektoren wurden geschnitten mit PmeI und die lineare DNA wurde gereinigt mittels Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol Präzipitation. Diese Vektoren wurden verwendet, um den E.Coli-Stamm BJ5183, der das pAdEasy-1 Plasmid trägt, zu transformieren. Das resultierende rekombinante Plasmid verleiht eine Resistenz gegen Kanamycin (70 µg/ml). Daraufhin wurden Plasmide von Antibiotika resistenten Kolonien isoliert und durch Restriktionsenzymverdau analysiert nach eNOS mit KpnI/HindIII. Positive Plasmide wurden zur Isolation in E.Coli JM109 transformiert. Darauf folgten die Linearisierung mit PacI, die Extraktion mit Phenol/Chloroform und die Präzipitation mit Ethanol. Danach wurden die Plasmide in HEK 293 Zellen kotransfiziert (American Type Culture Collection). Die transfizierten Zellen wurden zur Virusproduktion für zwei Wochen inkubiert und regelmäßig auf GFP-Expression (inserts in pAdTrack-CMV) und Morphologie der Plaques untersucht. Die Viren wurden von diesen Zellen gewonnen und in frische HEK 293 Zellen zur Amplifikation und zur Bestätigung der

Expression von mRNA und des Proteins infiziert. Konstrukte, die eNOS mRNA exprimierten wurde mittels Northernblot auf eNOS Proteine untersucht. Für eine Amplifikation und Reinigung größerer Virusmengen wurden nun fünf T175 Behälter mit 90%-konfluierenden HEK-Zellen mit dem Virus infiziert. Die Viruspartikel wurden mit Hilfe des BD Adeno-X Virus Aufbereitungs Kits (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) gemäß den Instruktionen des Herstellers gereinigt. Der resultierende Titer einer jeden Präparation war ungefähr 10^9 plaque forming units (pfu)/ml.

2.2) Karotidenpräparation und Transfektion

Zum Zwecke der Transfektion des Endothels mit einem Adenovirus, wurden die Arteriae Carotis des Versuchstiers katheterisiert und mit einer virushaltigen Lösung befüllt. Danach wurden die Gefäße zur Inkubation verschlossen und herauspräpariert.

Mit einer intraperitonealen Pentobarbitalinjektion (1 mg/g Körpergewicht) wurde die Maus zunächst terminal narkotisiert. Danach wurde mit einem 1 cm langen Transversalschnitt in Höhe des Processus xiphoideus das Abdomen eröffnet. Dieser Zugang wurde genutzt, um die Haut lateral, im Bereich des Rippenbogens, abzulösen. Der ursprüngliche Schnitt wurde nun entlang des Rippenbogens erweitert, so daß dieser vollständig frei lag. Anschließend wurde die Bauchmuskulatur vom Rippenbogen abgesetzt und das nun sichtbare Zwerchfell ringsum von den Rippen abgetrennt. Um die Eingeweide entfernen zu können, wurde das Abdomen longitudinal, entlang der Linea alba eröffnet. Das Gefäßsystem des Versuchstiers wurde mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) perfundiert, indem der linke Ventrikel mit einer Kanüle punktiert wurde. Als Anhalt für blutleere Gefäße wurde das Ablassen der Pfoten gewertet. Mit einem Longitudinalschnitt entlang des Brustbeins nach kranial bis zur Unterlippe wurde der Halsbereich freigelegt. Mit zwei Pinzetten wurde die Schilddrüse abpräpariert. Der Brustkorb wurde eröffnet, indem die Rippen lateral durchtrennt wurden bis hin zur obersten Halsrippe, so daß die obere Thoraxapertur eröffnet wurde. Anschließend wurden die beiden Schlüsselbeine etwa medioclavicular durchtrennt um alle an Brustbein, Clavicula und Rippen ansetzenden

Muskeln mit den abgetrennten knöchernen Strukturen hochzuklappen. Der Thymus wurde mit zwei Pinzetten abpräpariert, um eine gute Sicht auf den Aortenbogen zu gewährleisten. Durch diesen Zugang wurde der gesamte Aortenbogen, einschließlich der Karotiden gut sichtbar. Die Karotiden wurden jetzt aus ihrer Gefäß-/Nervenscheide durch leichten Zug am N. Vagus befreit, so daß die ersten Abgänge der Karotiden gut zu beurteilen waren. Proximal der ersten Abgänge aus den Karotiden wurde nun eine Fadenschlinge vorgelegt. Dieser Vorgang wurde bei der rechten Karotis distal des Abgangs der A. brachialis, sowie proximal, nahe am Aortenbogen auf beiden Seiten wiederholt. Zum Einführen des Katheters wurde nun auf ca. 1 cm Länge das Fettgewebe vor der Bauchaorta abpräpariert, um anschließend einen halbmondförmigen Schnitt in Höhe des Brustwirbelkörpers 10 zu setzen. Der Katheter wurde nun unter mehrmaligem Spülen mit Nährlösung (MCDB 131-Medium von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) vorgeschoben bis in die Karotiden. Dort angelangt wurde der Katheter mit der jeweils caudalen Ligatur im Gefäß fixiert. Über diesen PET-Katheter mit einem Durchmesser von 0,3 mm wurde die Karotide mit virushaltiger Nährlösung perfundiert (3 µl). Um die Transfektionsrate zu erhöhen wurde der Lösung Antennapediapeptid (0,5 mM) zugesetzt, ein zellpermeables Peptid, das die Virusaufnahme und die Genexpression verbessert (Gratton 2003). Aufgrund der stärkeren eNOS-Expression nach Transfektion mit T495A/S1177D-eNOS wurde hier die Transfektionslösung mit Antennapedia und den Adenoviren um den Faktor 1:3 mit der gleichen Nährlösung verdünnt. Anschließend wurde die obere Ligatur geschlossen, so daß es möglich war, die Karotide mit der virushaltigen Nährlösung prall aufzufüllen. Wenn dies geschehen war, wurde durch den Schluß der unteren Ligatur unter gleichzeitigem Entfernen des Katheters verhindert, daß die Nährlösung, die jetzt unter Druck im Gefäß war, entweichen konnte. Diese Prozedur wurde auf der Gegenseite in gleicher Weise wiederholt. Nachdem dann der Katheter aus dem Gefäßsystem komplett entfernt wurde, konnte die Karotide mit einer Pinzette und einer Federschere herauspräpariert werden, um sie für 4 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in MCDB 131-Medium zu inkubieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ligaturen zu beiden Seiten mit einem Skalpell abgeschnitten, und das Gefäß wurde für weitere 44 Std. zurück in MCDB 131 gelegt.

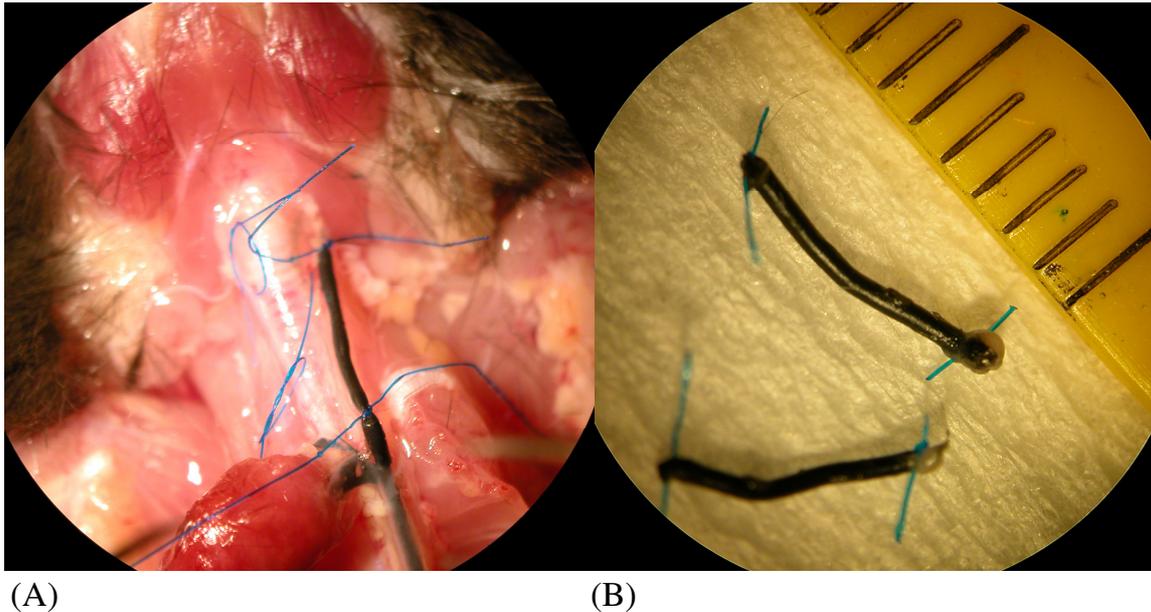


Abb. 4 : Katheterisierung und Füllung der Karotiden

Zur besseren Darstellung wurde die Nährlösung für diese Aufnahmen durch schwarze Tinte ersetzt. Die Karotis wird über den Katheder am unteren Bildrand mit der Lösung befüllt (A). Nach dem Schluß der distalen und der proximalen Ligatur werden die gefüllten und verschlossenen Karotiden herauspräpariert (B).

2.3) Organbadversuche

Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurden die Karotiden zwischen zwei Kraftaufnehmern aufgespannt in 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung (pH 7,4) mit der folgenden Zusammensetzung (in mmol/l): NaCl 119; KCl 4,7; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,2; Ca²⁺-EDTA 0,026; Glukose 12. Das Organbad wurde stetig mit einem Carbogen-Gasgemisch, bestehend aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, begast. Die Temperatur im System war konstant bei 37 °C.

Der obere der metallenen Haken war an ein Übertragungssystem angeschlossen, welches aus einem Kraftaufnehmer (F30 Force-Tranducer) von Hugo Sachs Elektronik-Harvard-Apparatus und Zwei-Kanal-Brückenverstärkern zusammengesetzt war. Diese Anordnung ermöglichte die Messung isometrischer Kraftänderungen, die

als Spannungsänderung (Volt) auf einem x/y-Mehrkanalschreiber (Rikadenki R40 und R80) aufgezeichnet wurden. Die oben genannte Messgeräte-Konfiguration erfuhr vor jedem Experiment eine Eichung mit genormten Gewichten. Die Registrierung der Kraftänderung in Newton erfolgte entsprechend der Eichung mittels Eichgewichten in Gramm.

Um die nötige Vorspannung der Gefäße von 500 mg zu erreichen, wurden die Präparate schrittweise innerhalb von einer ½ Std. vorgespannt. Die Plotter wurden so geeicht, daß diese Grundspannung von 500 mg fortan der Nulllinie entsprach. Nun wurde die Krebslösung entfernt und durch kaliumreiche Krebs-Henseleit-Lösung (KCl 80 mM; NaCl 40 mM; sonstige Zusammensetzung s.o.) ersetzt, was dazu führte, daß die Karotide endothelunabhängig kontrahierten. Mit dem Erreichen eines maximalen Kontraktionsplateaus wurde die kaliumreiche Krebslösung wieder durch normale Krebslösung ersetzt. Die daraufhin stattfindende Relaxation wurde erneut abgewartet. Da nach dieser kaliumvermittelten Kontraktion die Spannung auf dem Gefäß meist unter die definierte Nulllinie fiel, wurde der Karotidenring nachgespannt, bis er wieder stabil die gewünschte Grundspannung hielt. Dieser Vorgang wurde noch weitere zwei Mal wiederholt. Die letzte Kaliumkontraktion, welche zugleich die Kräftigste war, wurde als maximale Kontraktion definiert, auf die die späteren Kontraktionen eingestellt wurden.

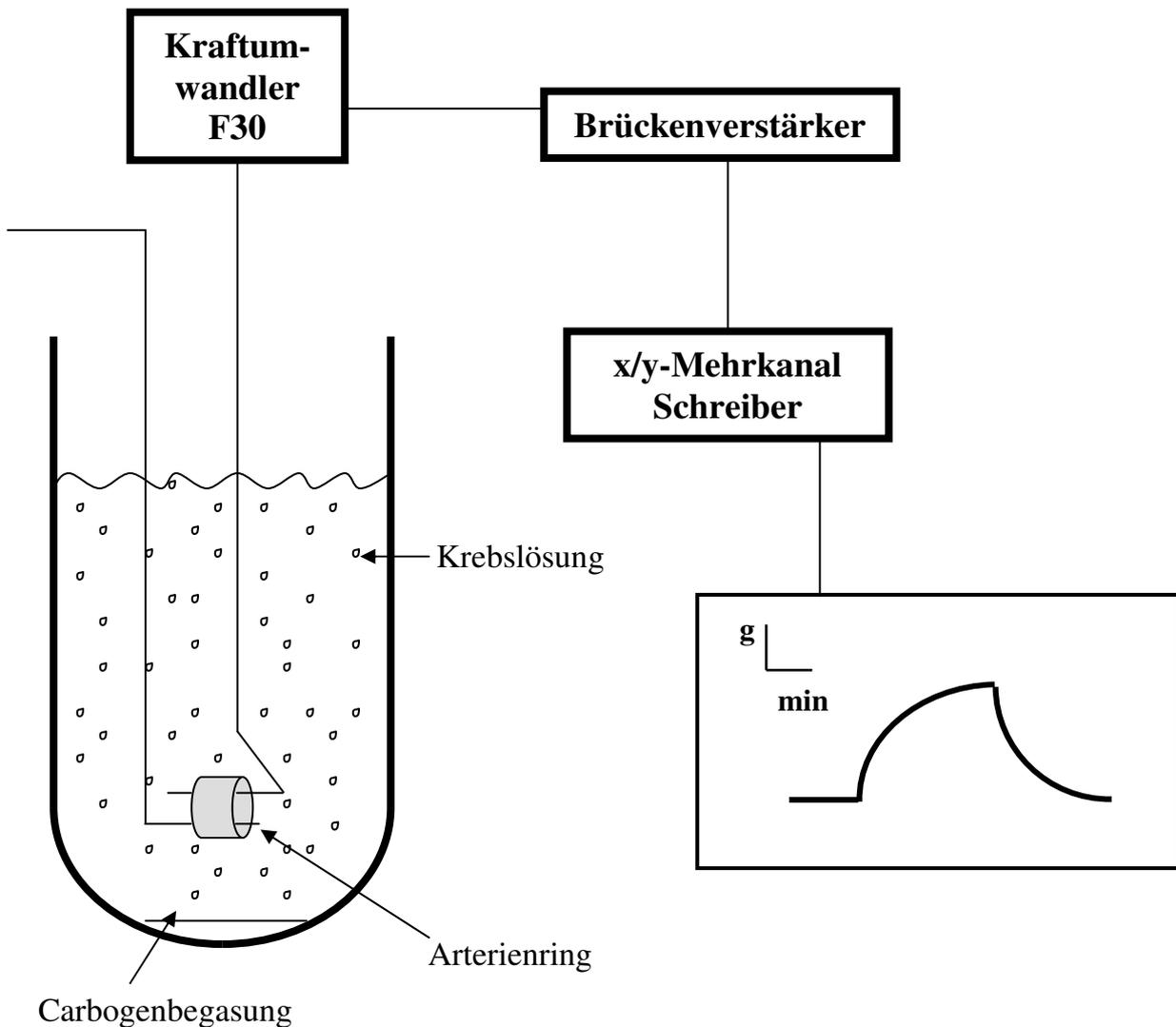


Abb. 5 : Organbadanlage in schematischer Darstellung

Es wurde nun so lange Phenylephrin in das Organbad gegeben, bis 80 % der Kaliumkontraktion erreicht waren. Die Konzentration von Phenylephrin im Organbad wurde schrittweise erhöht (10^{-8} mol/l, $3 \cdot 10^{-8}$ mol/l, 10^{-7} mol/l, $3 \cdot 10^{-7}$ mol/l, 10^{-6} mol/l, $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l ...). Nach Erreichen einer stabilen Spannung, die 80 % der Maximalspannung der letzten Kaliumkontraktion entsprach, wurde die Reaktion auf Acetylcholin getestet. Dazu wurde die Acetylcholinkonzentration im Organbad wie folgt erhöht: Begonnen wurde mit einer Konzentration $C = 10^{-10}$ mol/l, danach wurde die Konzentration erhöht auf $3 \cdot 10^{-10}$ mol/l, 10^{-9} mol/l, $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l... 10^{-5} mol/l und $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Eine weitere Acetylcholinzugabe hätte keine weitere Relaxation mehr herbeigeführt. Danach wurde das Organbad mit der Kreblösung mehrere Male durchgespült. Sollte die Spannung dabei unter die Nulllinie fallen, wurde die Karotide

erneut nachgespannt, bis sie wieder ihre Vorspannung von 500 mg hält. Mit der oben erwähnten Konzentrationsreihe von Phenylephrin wurde nun das Gefäß auf 10 % des Maximums der letzten Kaliumkontraktion kontrahiert, um anschließend mittels 300 µl einer 10^{-2} molaren N-Nitro-L-Arginin-Lösung (L-NNA) die eNOS zu hemmen. L-NNA ist ein Inhibitor der eNOS. Die Kontraktion, als Folge der aufgehobenen Wirkung der eNOS, wurde aufgezeichnet. Vor Beendigung des Versuchs wurde erneut gründlich mit Krebslösung gespült.

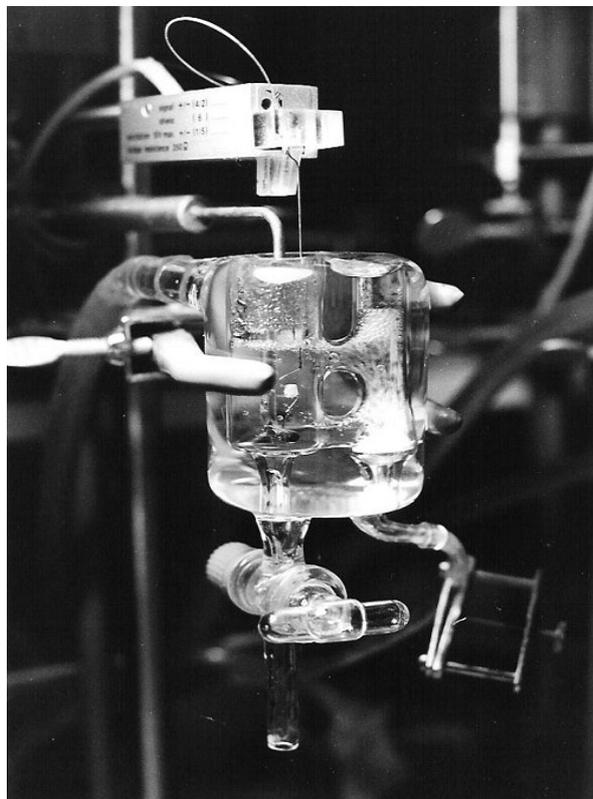


Abb. 6 : Foto eines Organbades mit Kraftaufnehmer

Man sieht einen auf zwei Stahlhaken gespannten Arterienring in 10ml Carbogen-begaster Krebs-Henseleit-Lösung. Der untere Haken ist fixiert, der obere mit dem Kraftaufnehmer verbunden. Zur besseren Darstellung wurde hier eine Kaninchencarotis verwandt.

2.4) Bestimmung der cGMP-Konzentration mittels Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay ist eine analytische Methode, die auf der Reaktion zwischen einem Antikörper und einem Antigen, dessen Konzentration bestimmt werden soll, beruht. Bei dem indirekten Radioimmunoassay, der hier zur Anwendung kam, wird eine bekannte Menge eines radioaktiv markierten Antigens mit einer Verdünnungsreihe des zu detektierenden Antigens gemischt. Diese Verdünnungsreihe wird mit einer fixen Menge an Antikörpern versetzt. Der Antikörper bindet spezifisch sowohl das markierte als auch das zu detektierende Antigen. Diese Beiden konkurrieren um die Bindungsstelle am Antikörper. Nach dem Auswaschen ungebundener Antigene wird die Radioaktivität der Probe in einem γ -Counter gemessen. Hohe Antigenkonzentrationen resultieren aufgrund der Verdrängung in wenig Radioaktivität und umgekehrt. Die Konzentration des gesuchten Antigens wird anhand einer Standardkurve bestimmt. Durch die vorteilhafte Kombination der Radioaktivität mit der Immunreaktion erhält man eine einfache, präzise und spezifische Bestimmungsmethode, mit deren Hilfe es möglich ist, Substanzkonzentrationen im Bereich von Nano- oder sogar Pikogramm pro Milliliter zu bestimmen. Diese Methode zur Messung von Peptiden wurde von Yalow und Berson (1960) beschrieben.

2.4.1) Vorbereitung der Proben

Die Karotiden wurde nach Ablauf der Inkubationszeit von vier Stunden mit 10^{-5} mol/l Acetylcholin stimuliert und anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 10%ige Trichloressigsäure (TCA) aufgenommen. Damit kam der Metabolismus vollständig zum Erliegen und die Konzentrationen der Stoffe änderten sich nicht mehr. Die Proteinsuspension wurde bei 15000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert und das Protein von der wässrigen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde mit wassergesättigtem Diethylether extrahiert, um die TCA zu entfernen und anschließend lyophilisiert. Zur Bestimmung der extra- und intrazellulären cGMP-Konzentration der Proben durch RIA wurde das Lyophilisat in Probenpuffer wieder aufgenommen und

verdünnt. Das sedimentierte Zellpellet wurde in 1N NaOH gelöst, über Nacht bei Raumtemperatur hydrolysiert und für die Protein-Bestimmung bei -20°C aufbewahrt.

2.4.2) Durchführung des cGMP-Radioimmunoassays

Die Proben wurden im Probenpuffer gelöst und mit einem Radioimmunoassay (Amersham Biosciences) bestimmt (Ivanova et al. 1990). Für die Ermittlung der Standardkurve wurde mit einer Standard-Stammlösung von 32 nM cGMP eine Verdünnungsreihe mit Probenpuffer hergestellt. Als Kontrollen dienten die 1,5 nM und 5,5 nM cGMP-Lösungen sowie NSB als nichtspezifische Bindung (100 µM cGMP) und Bo-Probe, die nur Probenpuffer enthielt. Die Proben und die Standards wurden auf Mikrotiterplatten (Polypropylen-Immuno-Röhrchen und Aluminiumhalterung, Fa. Sarstedt) eingesetzt. Je 50 µl Probe bzw. Standard (0,125 bis 32 nM cGMP) wurden mit 50 µl cGMP-Tracer und 50 µl Antikörpergemisch über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 250 µl 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, anschließend zentrifugiert (10 min, 2200 g, 10°C) und der Überstand abgesaugt. Nach zweimaliger Wiederholung des Waschschrittes wurden die Röhrchen in die Counter-Racks überführt und die Radioaktivität im γ -Counter (Wallac, Finnland) gemessen. Die Probenkonzentration wurde aus der Standardkurve in nM ermittelt.

Probenpuffer (50 mM): Na-Acetat 0,1 % (w/v), NaN₃ 0,02 % (w/v), in aqua bidest. (pH = 4)

Antikörper-Lösung (pH 7,4): Kaninchen-Anti-cGMP Antikörper in NaAc-Puffer (50 mM) + bovines Serumalbumin (0,5 %); 1:45000 (BSA)

Antikörpergemisch (pH 7,4): 1. Antikörper-Lösung 15 ml, 0,9 %iges NaCl 14,625 ml,
2. Antikörper 375 µl, Kaninchen- γ -Globulin 150 µl, aqua bidest. 29,850 ml

2.5) Westernblot Analysen

Mäusekarotiden wurden 48 Stunden nach der Transfektion direkt in 50 µl zweifachem Laemmlipuffer gekocht (2% SDS (Natriumduodecylsulfat); 20 mM Dithiotreitol; 8,5% Glycerin; 0,001% Bromphenolblau; 63 mM Tris-HCl (pH 6,8)), bei 5000 g für eine Minute zentrifugiert und 30 µl Extrakt anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel bestehend aus 5%igem Sammelgel und 8%igem Trenngel aufgetragen. Nun erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei einer Stromstärke von 60mA über eine Stunde. Der Laufpuffer bestand aus 192 mM Glycin, 3,6 mM SDS und 25 mM Tris-HCl. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Biorad). Der ca. 60-minütige Transfer fand in einem Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris-HCl und 20 % Methanol) bei einer Spannung von 150 V und einer maximalen Stromstärke von 250 mA statt. Die Nitrocelluloseblots wurden nun zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend 30 sec. in 0,2 % Ponceau S-Lösung gefärbt. Nach Entfernen des ungebundenen Farbstoffs mit Wasser konnte anhand der Intensität der Proteinfärbung der Erfolg des Transfers sowie die gleichmäßige Beladung des Gels überprüft werden. Nach Entfärben der Nitrocelluloseblots in Puffer A (Tween 20 0,1 %; NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM (pH7,4)) wurden nun die unspezifischen Proteinbindungsstellen über eine Stunde mit 3 %igem Rinderserumalbumin in Puffer B geblockt (Puffer B enthält ferner 0,05 % Tween 20, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)). Bei 4°C erfolgte daraufhin die 12-stündige Inkubation der Blots mit einem spezifischen, polyklonalen Antikörper (1:1000 in Puffer B; Kaninchen) gegen endotheliale NO-Synthase (Santa Cruz). Anschließend wurden die Blots fünfmal mit Puffer A gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nach erneuter Inkubation in Puffer B wurden die Blots für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten, polyklonalen Antikörper (1:20000 in Puffer B, Ziege), der sich gegen die Fc-Region von γ -Immunglobulinen des Kaninchens richtet, inkubiert. Der ungebundene Antikörper wurde durch Waschen (s.o.) entfernt und anschließend die Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion gestartet (ECL, Amersham-Buchler, Deutschland). Nach Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji RX-Film, Du Pont de Nemours) konnte die eNOS als lokale Schwärzungen des Films detektiert werden.

2.6) Immunhistochemische Färbung und Mikroskopie

Als Antikörperfärbung oder auch Immunhistochemie wird eine Methode bezeichnet, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Damit kann bestimmt werden, in welchem Gewebe das Protein vorhanden ist und in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist. Voraussetzung für die Durchführung einer immunhistochemischen Färbung ist ein Antikörper, der spezifisch gegen die darzustellende Struktur gerichtet ist.

Bei der indirekten Methode wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten AK richtet. Es ist der sog. Sekundärantikörper, der hier mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und die Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie erlaubt.

Nach der Transfektion und der Präparation wurden die Karotiden der Länge nach aufgeschnitten und mit Minutiennadeln in einer PBS befüllten Schale mit Sylgardboden aufgespannt. Zur Fixation diente 1 ml 4%iges Paraformaldehyd, in dem die Karotiden 1 Stunde inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen jeweils mit PBS und 2%iger Glycin / PBS – Lösung wurden die Karotiden mit 0,05%igem Triton für 25 Minuten permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Präparate für eine Stunde in 3%iger BSA / PBS – Lösung inkubiert. Danach wurden die Karotiden mit dem eNOS- und PECAM-Primärantikörper (jeweils 1:300 in 3%iger BSA / PBS – Lösung) für 12 Stunden behandelt. Die Inkubation fand bei 4°C statt. Nach mehrmaligem waschen mit PBS + Tween 0,2%ig und drei mal 15 Minuten mit PBS-Lösung wurde erneut mit 3%iger BSA / PBS – Lösung geblockt. Anschließend wurden die Karotiden mit dem sekundären Antikörper (1:300 Alexa Fluor-546, Molekular Probes) für ein Stunde inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Topro-3-iodine (5µM) eingefärbt. Vor dem Eindecken mit Mounting Medium (Dako, Germany ©) wurden die Salzreste mit Aqua bidest entfernt.

2.7) Versuchstiere

Es wurden eNOS-Knock-out Mäuse aus eigener Zucht verwendet. Die Linie stammte von A.Gödecke (Physiologie, Universität Düsseldorf). Die Versuchstiere hatten ein Gewicht von > 20 g. Als Kontrollen dienten Wildtyp-Mäuse (C57 BL/6 Charles River, Sulzfeld, Deutschland).

2.8) Statistik

Die Angabe sämtlicher Werte erfolgte als Mittelwert +/- des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM = standard error of the mean). n bedeutet die Anzahl der unabhängigen einzelnen Versuchsansätze bzw. der einzelnen Mäuse, aus denen die im Versuch benötigten Karotiden gewonnen wurden. Die Registrierung von Kontraktion und Relaxation der Gefäße erfolgte im Organbadversuch anhand von Veränderungen der Vorspannung in Gramm. Das Relaxationsverhalten nach Gabe eines Vasodilatators wurde prozentual zur maximalen Vorkontraktion mittels des Vasokonstriktors Phenylephrin angegeben, die Kontraktion durch kontrahierend wirkende Agonisten wurde immer in Relation zur maximalen Vorkontraktion mit Kaliumchlorid gesetzt. Berechnungen sowie graphische Darstellungen wurden mit dem Software Programm Graph Pad Prism 3.0 durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Student t-Test für paarige bzw. unpaarige Stichproben, bzw. einseitigen oder zweiseitigen Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen und Fisher, LSD-Test mit Bonferronikorrektur. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant, eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ als hochsignifikant eingeschätzt.

3) Ergebnisse

3.1) Transfektion

Um nachzuweisen, daß bei dem beschriebenen Transfektionsverfahren das Ergebnis der Transfektion relativ konstant ist, wurde nach der 48-stündigen Inkubation mit dem eNOS-DNA-tragenden Virus zunächst der Erfolg der Transfektion im Endothel untersucht. Nach Anfärbung mit markierten Anti-eNOS-Antikörpern wurden mikroskopische Bilder angefertigt, die Aussagen zuließen über Effektivität und Selektivität der Transfektion. Die Expression von eNOS im transfizierten Gewebe der eNOS-Knock-out-Mäuse wurde durch Westernblots und immunhistochemische gefärbte Präparate überprüft.

3.1.1) Effektivität der Transfektion

Die zur Anfärbung des Präparates verwendeten Antikörper binden spezifisch an die endotheliale NO-Synthase, so daß nur Zellen angefärbt werden, die eNOS enthalten. In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die Virustransfektion erfolgreich verlaufen ist und wie viel Prozent der Endothelzellen wt-eNOS enthalten. Anhand der en face Aufnahmen des Endothels zeigte sich eine Transfektionseffizienz im Bereich von 40 – 60 % bei einem Virustiter von 10^9 plaque-forming units/ml (pfu/ml). In dem mit markierten Anti-eNOS-Antikörpern gefärbten Präparat zeigen sich signalreiche Areale, die mit den Zellgrenzen der Endothelzellen zu vereinbaren sind. Besonders signalreich hebt sich die Region um den Zellkern der Endothelzellen hervor. In einem Kontrollversuch mit nicht-transfizierten Karotiden waren die Zellen nicht angefärbt.

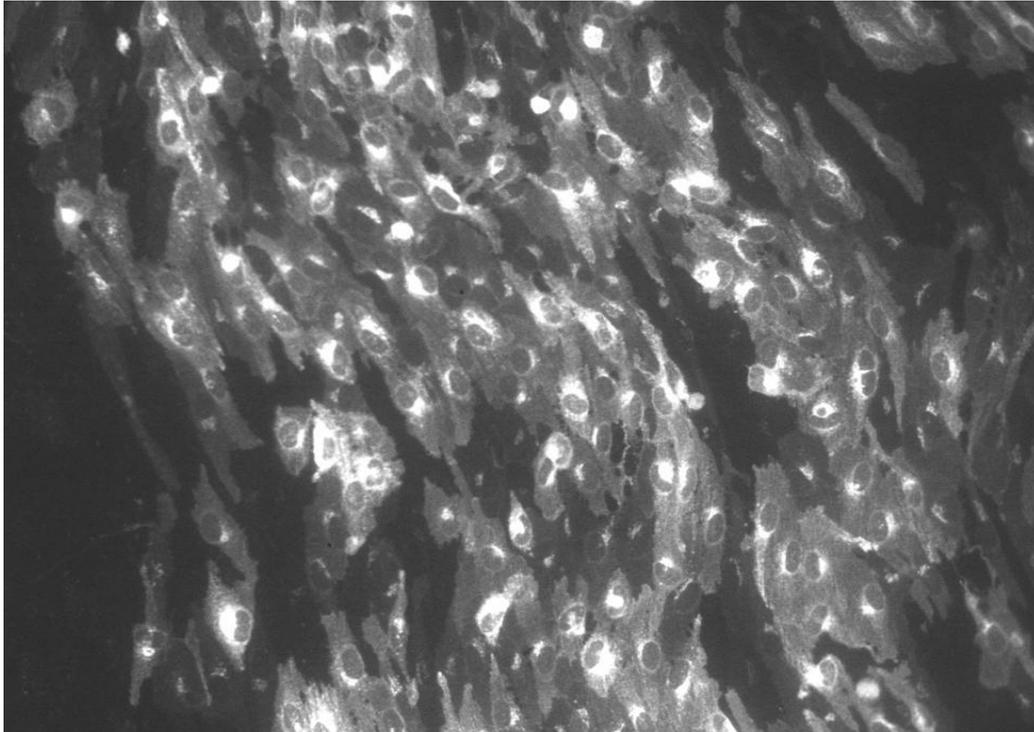


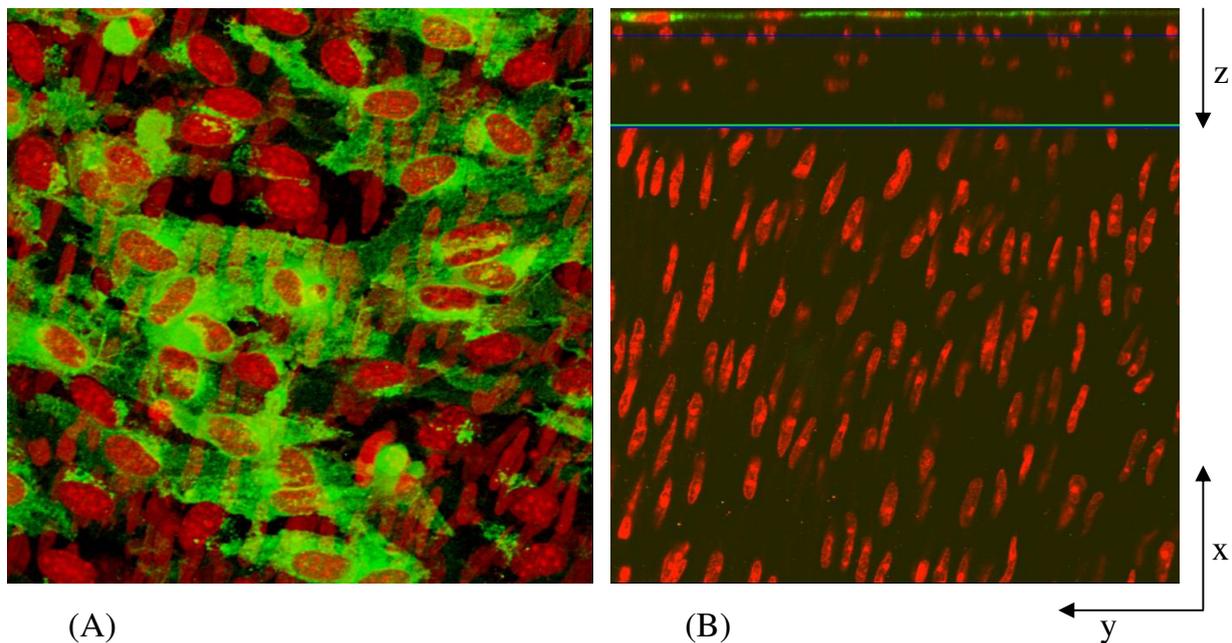
Abb. 7 : Mikroskopische en face Aufnahme zur Darstellung der Effektivität der Transfektion

Die Arteria Carotis einer eNOS-Knock-out-Maus wurde mit einem eNOS-Adenovirus infiziert und anschließend für zwei Tage inkubiert. Das Präparat wurde mit Anti-eNOS-Antikörpern (Alexa 488 nm Ziege anti-Rabbit) und passenden sekundären Antikörpern immunhistochemisch gefärbt.

3.1.2) Selektivität der Transfektion

In weiteren Versuchen wurde untersucht, wie spezifisch die Virustransfektion bei der angewandten Technik ist. Dazu wurde wie bisher das Karotidenpräparat zur Transfektion 48 Stunden mit dem Virus inkubiert und anschließend mit markierten Anti-eNOS-Antikörpern gefärbt. Die Zellkerne stellen sich bei dieser Färbung rot (Exzitation: 643 nm, Emission: 660 nm) dar, während sich die eNOS grün (Exzitation: 488 nm, Emission: 515 nm) anfärbt. Auf Abbildung 8 sind vereinzelte ovale Zellkerne zu erkennen, die zum Teil umgeben sind von eNOS-haltigem Plasma, dessen Verteilung sich wieder mit den Zellgrenzen des Endothels erklären läßt.

Darunter befinden sich Schichten länglicher Zellkerne. Zusätzlich wurde eine 3-dimensionale Rekonstruktion des Präparates angefertigt. Hier erkennt man, daß sich die grün angefärbten eNOS-haltigen Zellen ausschließlich in der obersten Zellschicht befinden. Da bei der Präparation der Karotiden darauf geachtet wurde, daß die luminale Seite des Gefäßes auf dem Objektträger nach oben weist, handelt es sich bei den grün gefärbten Zellen um das Endothel. Auf Bildern von Kontrollpräparaten, die nicht transfiziert wurden, stellten sich ausschließlich die roten Zellkerne dar.



(A)

(B)

Abb. 8 : Mikroskopische Aufnahme zur Darstellung der Selektivität der Transfektion in der Präparatebene (A) und im Querschnitt (B)

Die Arteria Carotis einer eNOS-Knock-out-Maus wurde mit einem eNOS-Adenovirus infiziert und anschließend für zwei Tage inkubiert. Das Präparat wurde anschließend mit Anti-eNOS-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt (A). Aufnahme (B) ist eine 3-dimensionale Rekonstruktion des Präparates. Der Querschnitt wurde an der Markierung der en face Darstellung in den unteren 2/3 des Bildes gemacht.

3.1.3) eNOS-Gehalt transfizierter Endothelzellen

Die intrazelluläre Konzentration der eNOS ist nicht alleine abhängig von einer konstanten Transfektionseffizienz, da u.a. auch noch die Menge des genetischen Materials sowie dessen Transkription und Translation von Bedeutung sind. Um die tatsächliche Konzentration des Enzyms nach Transfektion mit den unterschiedlichen eNOS-Mutanten abschätzen zu können, wurden Westernblots angefertigt. Ziel war es, am Ende des Transfektionsprozesses gleiche Konzentrationen der eNOS in den Endothelzellen vorzufinden. Unter der Annahme, daß stets eine relativ konstante Zahl an Endothelzellen transfiziert wurde, konnten dann Effekte nur auf die spezifische Enzymaktivität der transfizierten eNOS zurückgeführt werden. Es wurden zunächst Endothelzellen aus den Karotiden eines Versuchstieres jeweils mit der T495A/S1177D-eNOS und auf der Gegenseite mit der S1177D-eNOS transfiziert. In Abbildung 9 sieht man, daß die T495A/S1177D-eNOS bei gleicher Virusmenge stärker exprimiert wird.

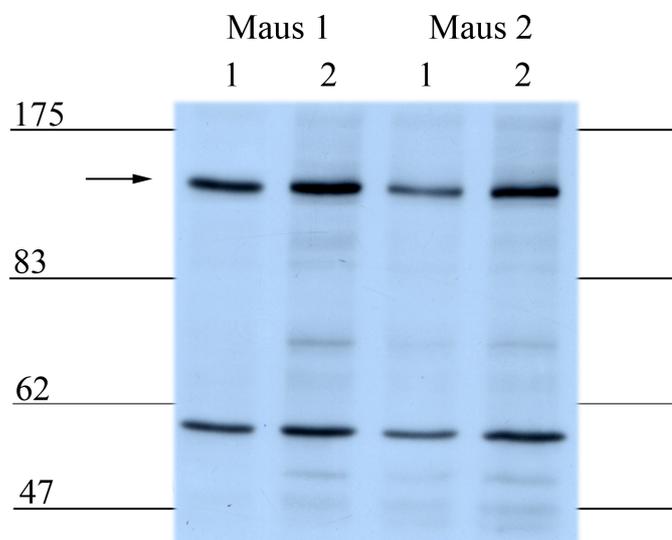


Abb. 9 : eNOS-Expression nach Transfektion mit der T495A/S1177D-eNOS und der S1177D-eNOS

Die eine Karotide (1) der Versuchstiere wurde mit der S1177D-eNOS transfiziert, die Andere (2) mit der T495A/S1177D-eNOS. Es fällt auf, daß die mit T495A/S1177D-eNOS transfizierten Karotiden eNOS deutlich stärker exprimieren.

Bei einem Verhältnis von S1177D-eNOS zu T495A/S1177D-eNOS von 3:1 findet man gleiche Mengen der eNOS vor. Das Zelloberflächenprotein Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) ist ein Glykoprotein, welches integraler Bestandteil von Zellmembranen ist. Es ist auf vaskulären Endothelzellen mit einer Dichte von bis zu einer Million Molekülen pro Zelle sehr stark ausgeprägt. Der PECAM-Westerblot dokumentiert gleiche Mengen an Endothelzellen in den Beiden Karotiden.

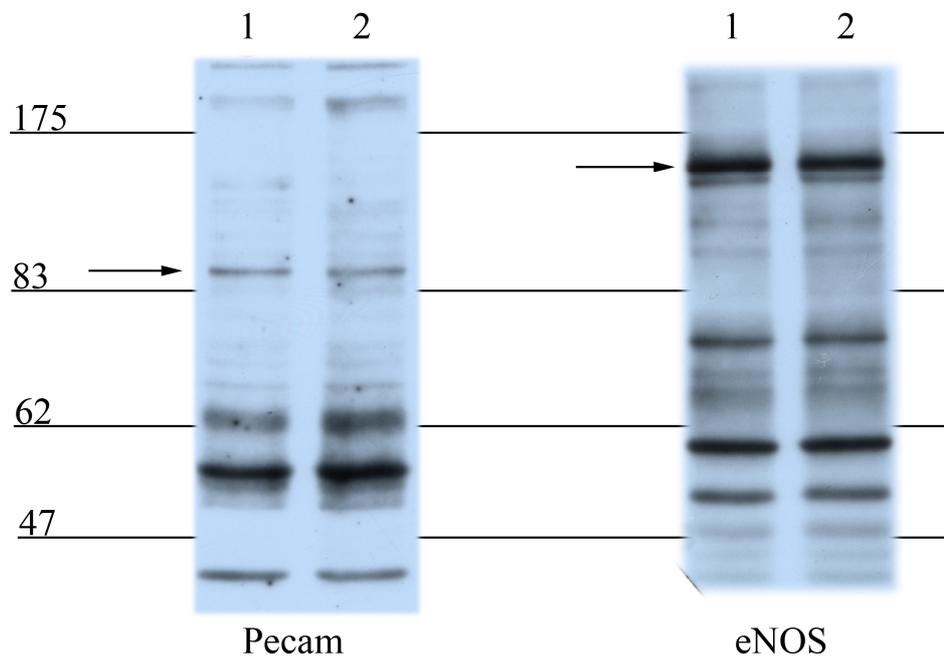


Abb. 10 : eNOS-Expression nach Transfektion mit der T495A/S1177D-eNOS (2) und der S1177D-eNOS (1) bei einem Verhältnis des Virustiters von 1:3

Die Westernblots zeigen gleiche Mengen an eNOS bei gleicher Menge an Endothelzellen. Das Verhältnis des Virustiters ist 1:3.

3.1.4) Endotheliale Expression der eNOS-Mutanten

In einem weiteren Experiment wurden Karotiden, die entweder mit dem S1177D-eNOS-Virus oder mit dem T495A/S1177D-eNOS-Virus im Verhältnis 3:1 für 48 Stunden inkubiert wurden immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch dargestellt. Es wurden die Gefäße von eNOS Knock-out-Mäusen verwendet. Die NOS exprimierenden Zellen stellen sich bei dieser Färbemethode rot dar.

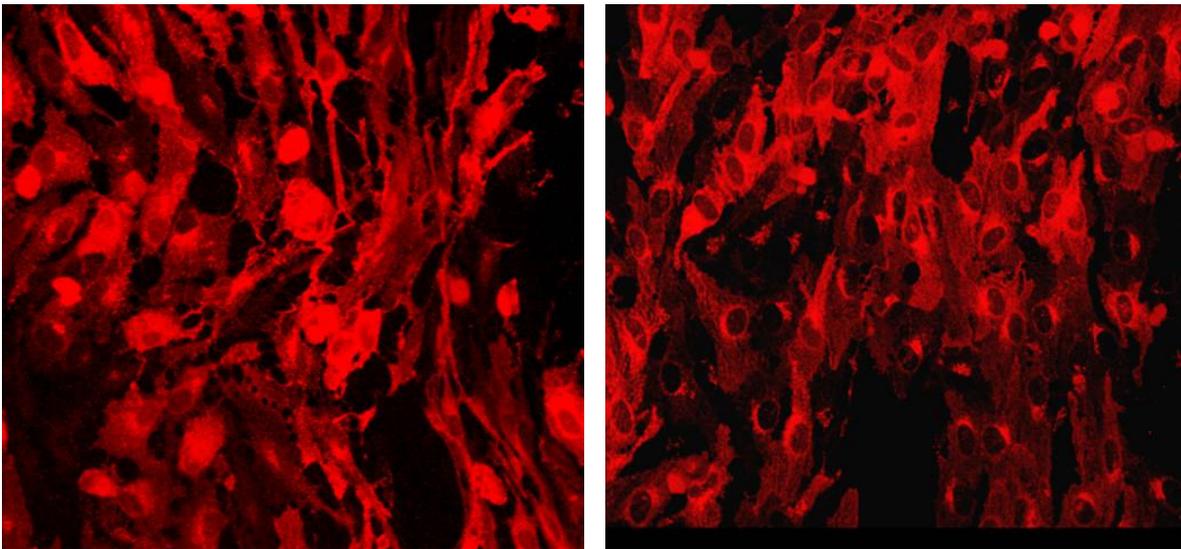


Abb. 11 : Vergleich der endothelialen Expression von eNOS S1177D (A) und eNOS T495A/S1177D (B) in der Arteria Carotis von eNOS^{-/-} Mäusen

Die Karotiden wurden mit einem S1177D- und T495A/S1177D-eNOS-Adenovirus transfiziert. Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Präparate mit markierten Anti-eNOS-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Die eNOS kommt hier rot (Exzitation: 545 nm, Emission: 576 nm) zur Darstellung.

Auf den Bildern erkennt man, daß das Verhältnis von NO-produzierenden Zellen zu inaktiven Zellen bei den beiden eNOS Mutanten keine wesentlichen Unterschiede aufweist. Das eNOS-typische Verteilungsmuster mit einer Anreicherung im Bereich des Zellkerns scheint jedoch bei der Einfachmutante weniger stark ausgeprägt zu sein.

3.2) Wiederherstellung der Relaxationsfähigkeit

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Zellen das für die eNOS kodierende Genmaterial aufgenommen hatten und nun eNOS produzierten, wurde untersucht, wie sich die transfizierten Karotiden der Knock-out-Mäuse im Vergleich zu nicht transfizierten Karotiden und Karotiden von Wildtyp-Mäusen im Organbadversuch verhalten. Für diese Versuche wurden die Karotiden der Knock-out-Mäuse mit der Wildtyp-Variante der eNOS transfiziert, um einen Vergleich mit Karotiden der Wildtypmäuse zu ermöglichen. Bewertet wurden sowohl die Kontraktion nach Phenylephringabe, als auch die endothelabhängige Relaxation und die dafür verwendete Menge an Acetylcholin. Alle Karotiden wurden auf 80 % der Kraft kontrahiert, die zuvor mit der kaliumreichen Krebslösung erreicht wurde.

Die abgebildeten Ergebnisse der Organbadversuche zeigen, daß die transfizierten Knock-out-Karotiden im Vergleich zum Wildtyp zunächst eine gleiche Konzentration an Phenylephrin ($1,4 * 10^{-7}$ mol/l) benötigten um 80% ihrer vorherigen Kaliumkontraktion zu erreichen, während bei den nicht transfizierten Knock-out-Karotiden $4 * 10^{-8}$ mol/l Phenylephrin ausreichend waren. Des Weiteren reagierten die transfizierten Knock-out-Karotiden auf die Gabe von Acetylcholin ab einer Konzentration von $4 * 10^{-9}$ mol/l mit einer Relaxation. Im Vergleich dazu reagierten die Wildtyp-Gefäße bei etwas niedrigeren Konzentrationen (10^{-9} mol/l). Bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/l Acetylcholin hatten die Gefäße der Wt-Mäuse und die transfizierten Gefäße der Knock-out-Mäuse vollständig relaxiert, während die nicht-transfizierten Knock-out-Karotiden auch bei höchsten Dosen Acetylcholin keinerlei Relaxation zeigten. Mit diesem Versuch wurde gezeigt, daß die endothelabhängige Relaxation, die in Karotiden von Knock-out-Mäusen vollständig aufgehoben ist, mit der angewandten Technik wieder vollständig hergestellt werden kann.

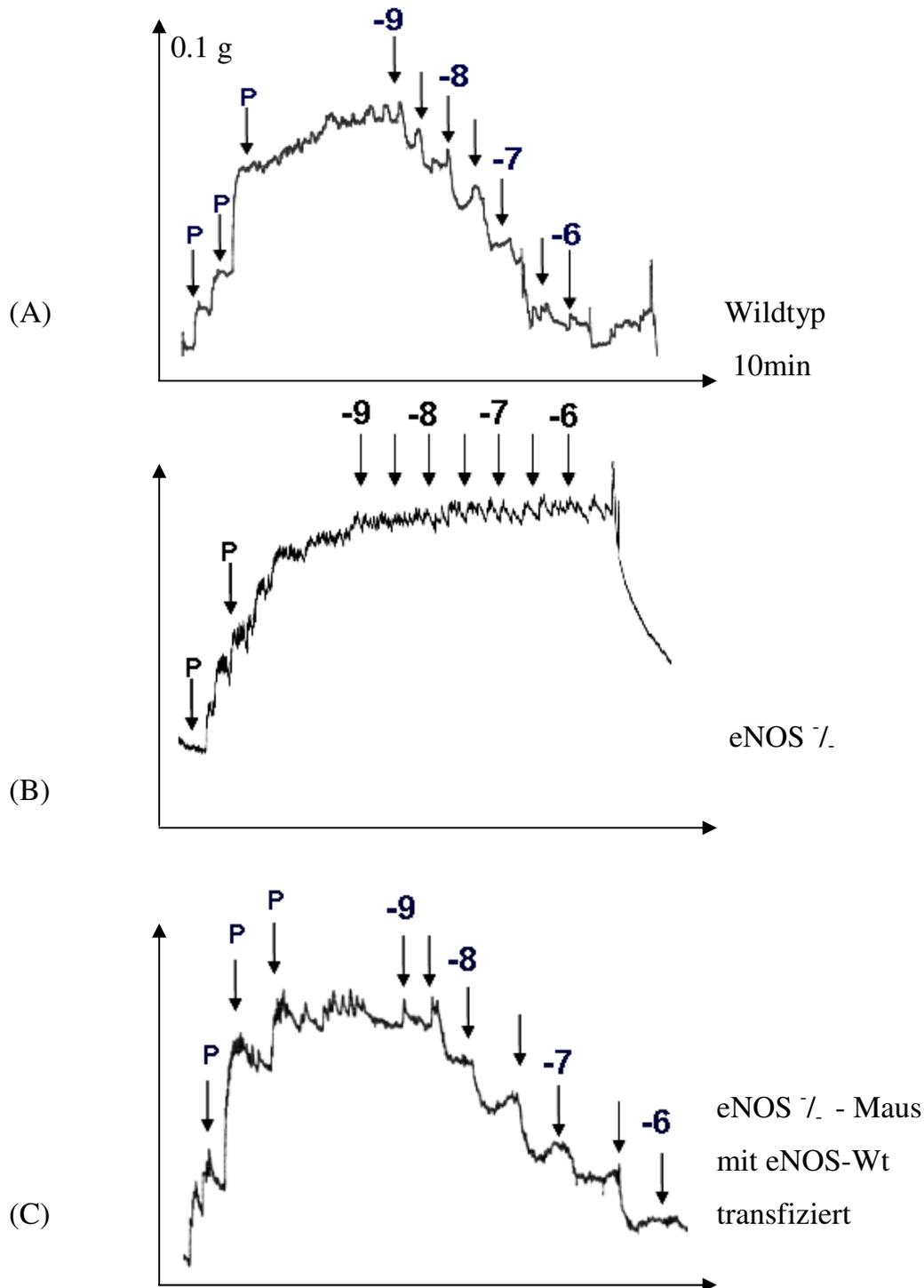


Abb. 12 : Exemplarische Darstellung zur Wiederherstellung der Relaxationsfähigkeit von Aa. Carotis aus Knock-out-Mäusen

Karotiden von Wildtypmäusen (A) relaxieren nach Acetylcholingabe vollständig, während Knock-out-Gefäße keine Reaktion zeigen (B). Nach Transfektion mit Wildtyp-eNOS-Adenoviren ist die Relaxationsfähigkeit bei Gefäße aus Knock-out-Mäusen vollständig wiederhergestellt (C).

3.3) Agonisten-induzierte Stimulation der eNOS-Mutanten

Als nächstes wurden in Organbadversuchen Karotiden aus Knock-out-Mäusen verglichen, die jeweils mit einem T495A/S1177D -, S1177D- und einem Wildtyp-eNOS-Adenovirus transfiziert wurden. Es wurde die Relaxation gegen die verwendete Acetylcholinmenge graphisch aufgetragen. Die Relaxation wurde angegeben in Prozent der Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion.

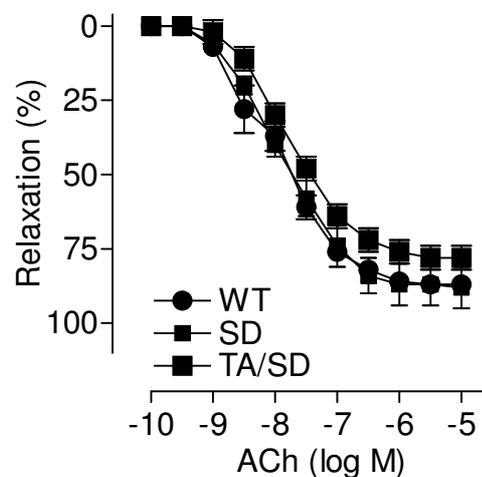


Abb. 13 : Relaxationsverhalten von Karotiden aus Knock-out-Mäusen, die mit den unterschiedlichen eNOS-Mutanten transfiziert wurden

Die Aa. Carotis der eNOS-Knock-out-Mäuse wurden mit dem Wildtyp-eNOS-Adenovirus sowie dem S1177D- und dem T495A/S1177D-eNOS-Adenovirus infiziert. Im Organbad wurde das Relaxationsverhalten auf kumulative Gabe von Acetylcholin untersucht.

Das Ergebnis zeigt, daß die mit der T495A/S1177D-Mutante transfizierten Karotiden mehr Acetylcholin benötigten, um den gleichen Grad an Relaxation zu erreichen, als die Gefäße des Wildtyps und der S1177D-Mutante. Eine 80%ige Relaxation wurde bei der Doppelmutante erst bei 10^{-6} mol/l Acetylcholin erreicht, während die Wildtyp-eNOS und die Einfachmutante diesen Grad der Relaxation schon bei 10^{-7} mol/l Acetylcholin aufwiesen. Es zeigte sich ferner, daß die mit der Wildtyp- und

S1177D-eNOS transfizierten Karotiden auf über 87% der Vorkontraktion relaxieren konnten, während die T495A/S1177D-transfizierten Gefäße ca. 10% weniger ($78 \pm 4\%$) erreichten.

3.4) Agonisten-induzierte Kontraktion der eNOS-Mutanten

In den vorherigen Versuchen deutete sich an, daß die Karotiden, die mit den unterschiedlichen eNOS-Mutanten transfiziert wurden, sich zwar bei der Kalium-induzierten Kontraktion gleich verhielten, jedoch bei der Vorkontraktion mit Phenylephrin unterschiedliche Konzentrationen benötigt wurden, um das gleiche Maß an Spannung in Bezug auf die Kaliumkontraktion zu erreichen.

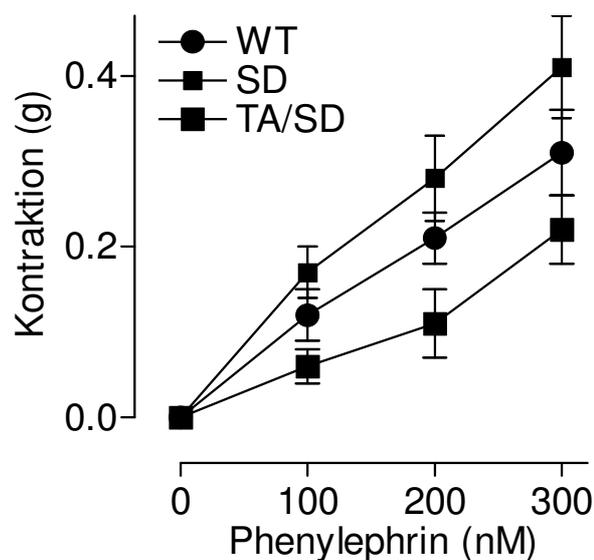


Abb. 14 : Kontraktionsverhalten von Karotiden aus Knock-out-Mäusen, die mit den unterschiedlichen eNOS-Mutanten transfiziert wurden

Aa. Carotis aus Knock-out-Mäusen wurden mit S1177D-, T495A/S1177D- und Wildtyp-eNOS-Adenoviren transfiziert. Gemessen wurde die Kontraktion bei ansteigender Konzentration von Phenylephrin. Die T495A/S1177D-eNOS kontrahiert signifikant schwächer ($P < 0,05$) als die Vergleichsgefäße.

Zur Quantifizierung wurden nun Karotiden, die mit den unterschiedlichen Mutanten transfiziert waren mit ansteigenden Konzentrationen von Phenylephrin im Organbadversuch untersucht. Bei Erreichen der Endkonzentration von 300 nM Phenylephrin zeigte sich, daß die agonisteninduzierte Kontraktion der Karotiden, die T495A/S1177D-eNOS exprimierten, mit $0,22 \pm 0,04$ g um ca. die Hälfte schwächer war als bei den Karotiden, die S1177D-eNOS exprimieren ($0,41 \pm 0,06$ g). Für die Gefäße, die mit dem Wildtyp transfiziert wurden ergab sich mit $0,31 \pm 0,05$ g ein Mittelwert zwischen dem der Einfach- und der Doppelmutante.

3.5) Basale Stickstoffmonoxidproduktion

3.5.1) Kontraktion als Folge der eNOS-Hemmung durch L-NNA

Die bisherigen Ergebnisse implizierten eine gesteigerte NO-Produktion der T495A/S1177D-eNOS exprimierenden Arterien. Um eine vermehrte basale NO-Produktion nachzuweisen wurde ein spezifischer eNOS-Inhibitor (L-NNA) eingesetzt. Die Karotiden mit den einzelnen eNOS-Mutanten wurden im Organbadversuch auf 10% ihrer vorherigen Kaliumkontraktion mit Phenylephrin vorkontrahiert. Anschließend wurde der NO-Synthaseinhibitor L-NNA ($300 \mu\text{mol/l}$) hinzugegeben. Die darauf folgende Kontraktion ist auf den Wegfall der relaxierenden Wirkung des NO zurückzuführen und läßt Rückschlüsse zu, wie viel Stickstoffmonoxid initial in den Endothelzellen vorhanden war. Die Grafik zeigt, daß die Karotiden, die mit der Doppelmutante transfiziert wurden auf $0,43 \pm 0,06$ g Spannung kontrahierten und damit signifikant ($P < 0,05$) stärker reagierten als die Karotiden, die mit der Wildtyp- und S1177D-Mutante transfiziert wurden. Die Wildtyp-eNOS-transfizierten Karotiden kontrahierten mit einer Spannung von $0,14 \pm 0,02$ g doppelt so stark wie die S1177D-eNOS exprimierenden Karotiden ($0,07 \pm 0,04$ g). Eine Kontrolle von Knock-out-Karotiden, die nicht transfiziert wurden zeigte kaum Kontraktion bei Zugabe von L-NNA ($0,01 \pm 0,01$ g).

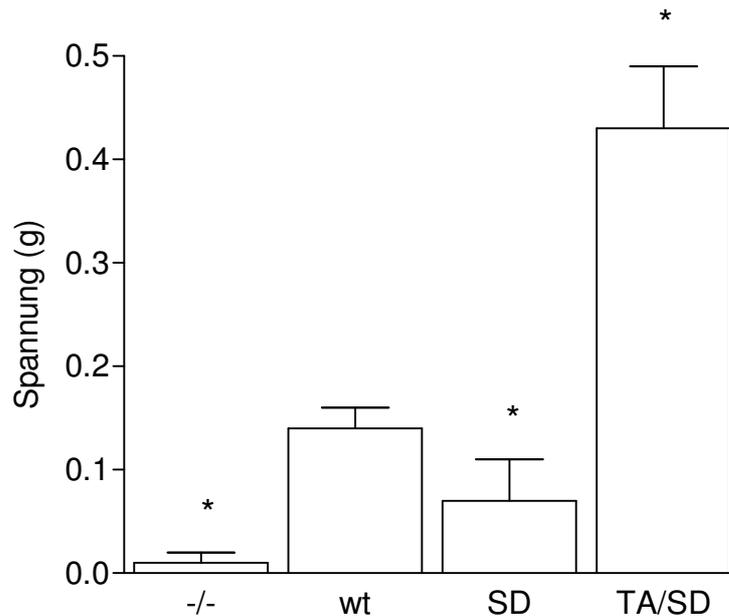


Abb. 15 : Kontraktion nach Gabe von L-NNA

Aa. Carotis aus Knock-out-Mäusen wurden mit einem S1177D-, T495A/S1177D- und Wildtyp-eNOS-Adenovirus transfiziert. Nach einer Vorkontraktion auf 10 % der Kaliumkontraktion mit Phenylephrin wurde L-NNA hinzugegeben (300 $\mu\text{mol/l}$) und die Kontraktion aufgezeichnet. (Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$)

3.5.2) Basale Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat

Der relaxierende Effekt von NO an den glatten Gefäßmuskelzellen kommt über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zustande. NO bindet an die hämhaltige Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase und führt über eine Konformationsänderung im katalytischen Zentrum zu einer vermehrten Konversion von GMP zu cGMP. Zyklisches Guanosin 3',5'-Monophosphat ist somit sekundärer Botenstoff des Stickstoffmonoxid und Mediator der vaskulären Relaxierung glatter Muskelzellen. Es wurde als nächstes untersucht, ob die erhöhte NO Konzentration in den Endothelzellen der T495A/S1177D-eNOS-transfizierten Karotiden auch mit erhöhten cGMP Spiegeln einhergeht.

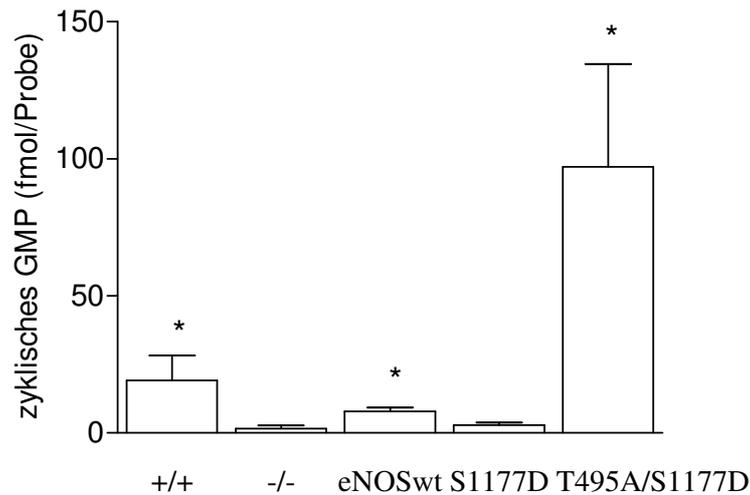


Abb. 16 : Radioimmunoassay zur Bestimmung des basalen zyklischen Guanosinmonophosphat

Nach Transfektion mit den unterschiedlichen eNOS-Mutanten, zeigten sich bei der T495A/S1177D-eNOS signifikant höhere Menge an basalem zyklischem Guanosinmonophosphat. (Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$)

Das Ergebnis des Radioimmunoassays (RIA) zur Bestimmung der cGMP Konzentrationen zeigte mit einem Mittelwert von $97,12 \pm 37,55$ fMol/Probe eine signifikant ($P < 0,05$) höhere Konzentration in den Karotiden, die mit der Doppelmutante transfiziert wurden gegenüber der Wildtyp-eNOS ($7,91 \pm 1,48$ fMol/Probe) und der Einfachmutante ($2,92 \pm 0,97$ fMol/Probe). In Arterien von nicht-transfizierten Knock-out-Mäusen konnte eine durchschnittliche Konzentration von $1,62 \pm 0,97$ fMol/Probe im Vergleich zu Wildtypmäusen mit $19,22 \pm 9,11$ fMol/Probe gemessen werden.

4) Diskussion

Regulation der eNOS-Aktivität

Die molekulare Funktion der endothelialen NO-Synthase und die funktionelle Bedeutung der einzelnen Abschnitte des Enzyms ist bereits seit über 20 Jahren Gegenstand intensiver Forschung (Griffith 1984). Die eNOS enthält eine C-terminale Reduktasedomäne, welche in der Lage ist NADPH zu binden. Von hier werden Elektronen über FAD und FMN zur N-terminal gelegenen Oxidasedomäne transferiert. Die Oxidasedomäne enthält ein Häm und Bindungsstellen für Arginin, Tetrahydrobiopterin und CaM. ENOS benötigt molekularen Sauerstoff sowie die Elektronen, die von dem NADPH stammen, um ihr Substrat L-Arginin in OH-L-Arginin umzuwandeln, welches schließlich oxidiert wird zu NO und L-Zitrullin (Griffith 1995). Eine Möglichkeit diesen Vorgang in seiner Geschwindigkeit zu regulieren ist die Phosphorylierung der eNOS an spezifischen Aminosäuren. Es existieren zwei hemmende Kontrollelemente (Autoinhibitory Control Element), welche die regulierenden Phosphorylierungsstellen beinhalten. Dadurch wird die Kalzium/CaM-Sensitivität des Enzyms, sowie dessen Aktivität und Aktivierbarkeit beeinflusst (Lane 2002; Salerno 1997). Die eNOS ist phosphorylierbar an Serinresten, sowie in geringerem Ausmaß an Tyrosin- und Threoninresten (Corson 1996; Garcia-Cardena 1996; Michel 1993). Die Phosphorylierungsstellen Threonin 495, Serin 617 und Serin 635 befinden sich im Bereich des einen Kontrollelementes, während Serin 1177 sich in dem anderen befindet. Es konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an diesen Aminosäuren eine Veränderung in der Konfiguration dieser Abschnitte bewirkt, die ein sterisches Hindernis für den Elektronenfluß von der Reduktase- zur Oxidaseuntereinheit darstellen. Auf diese Weise kann die eNOS durch Phosphorylierung positiv und negativ reguliert werden (McCabe 2000). Während es schon zahlreiche Veröffentlichungen über die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren gegeben hat, ist das Zusammenspiel der Phosphorylierungsstellen untereinander noch vergleichsweise wenig bearbeitet. Die bisherigen Erkenntnisse lassen jedoch vermuten, daß eine gegensinnige Veränderung

im Phosphorylierungszustand bei Threonin 495 und Serin 1177 besteht, die zur Koordination der eNOS-Aktivierung beiträgt.

Westernblotanalysen, die den zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung an den Aminosäuren Threonin 495 und Serin 1177 darstellen, zeigen, daß es innerhalb der ersten Minute nach Stimulation mit Acetylcholin zur Dephosphorylierung an Threonin 495 und zu einer Phosphorylierung an Serin 1177 kommt (Fleming 2001).

Bei der Aminosäure Serin 1177 handelt es sich um die am besten untersuchte Phosphorylierungsstelle der eNOS. In der Vergangenheit konnten bereits mehrere Kinasen identifiziert werden, die in der Lage sind eNOS an dieser spezifischen Stelle zu phosphorylieren. Die AMP-Kinase (AMPK) (Chen 1999), die Proteinkinase B (Akt) (Dimmeler 1999; Fulton 1999; Gallis 1999; Michell 1999) und Proteinkinase A (Butt 2000) können Serin 1177 phosphorylieren. Es konnte gezeigt werden, daß diese Aminosäure eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der eNOS spielt. Eine gentechnisch veränderte eNOS bei der Serin 1177 durch Alanin ersetzt wurde (S1177A), kann an dieser Aminosäure nicht mehr phosphoryliert werden. Eine derart veränderte Form des Enzyms ist nicht mehr dazu in der Lage Akt-abhängig aktiviert zu werden (Dimmeler 1999; Fulton 1999). Wird die eNOS allerdings an Ser 1177 mit Aspartat substituiert (S1177D), welches phosphomimetische Eigenschaften besitzt, so stellt sich ein konstitutiv aktiver Zustand ein (McCabe 2000). Diese Versuche basieren, wie unsere Experimente, darauf, daß die Mutation von Serin oder Threonin zu Aspartat den phosphorylierten Zustand dieser Aminosäure imitiert, wohingegen eine Mutation zu Alanin eine Phosphorylierung verhindert. Trotzdem können hier unberechenbare Veränderungen in der Proteinkonformation entstehen, die eine hundertprozentige Voraussagbarkeit im Verhalten des Enzyms unmöglich machen (Bauer 2003). Versuche dieser Art wurden auch für das Threonin 495 bereits durchgeführt. Von dieser Aminosäure weiß man, daß die Agonisten-induzierte Dephosphorylierung komplett von Kalzium abhängig ist und durch den PP1-Inhibitor Calyculin A verhindert werden kann. CaM wird in Zellen, die nicht stimuliert wurden, nur in geringem Ausmaß an eNOS gebunden. Nach der Agonisten-induzierten Dephosphorylierung der eNOS vermehrt sich diese CaM-Assoziation. Eine Mutation

von Threonin 495 zu Alanin kann diese verstärkte CaM-Bindung auch in Abwesenheit jeglicher Stimuli hervorrufen, wohingegen die korrespondierende Aspartatmutante so gut wie kein CaM binden kann. Entsprechend ist die Thr495Ala-Mutante deutlich sensitiver gegenüber Kalzium/CaM, als die Thr495Asp-eNOS (Fleming 2001).

In Veröffentlichungen, die sich mit der Funktion der beiden Aminosäuren in der eNOS beschäftigt haben, konnten gezeigt werden, daß G-Protein-gekoppelte Rezeptoragonisten die Dephosphorylierung an Threonin 495 bewirken und gleichsinnig Serin 1177 phosphoryliert wird. Die Phosphorylierungsstellen befinden sich jeweils in den beiden autoinhibitorischen Kontrolleinheiten, so daß spekuliert werden muß, daß sowohl die Phosphorylierung als auch die Dephosphorylierung eine Rolle spielt in der Aktivierung der eNOS und der Freisetzung von NO (Fleming 2001; Harris 2001; Michell 2001). Vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) bewirkt eine vorübergehende Phosphorylierung der eNOS an Ser 1179 (Fulton 1999; Michell 1999). Im Gegensatz zu Bradykinin stimuliert es aber nicht die Phosphorylierung an Threonin 497. Weiterhin hat Wortmannin keinen Effekt auf die Bradykinin-abhängige Dephosphorylierung von Threonin 497 (Harris 2001). Daraus kann man ableiten, daß die NO-Freisetzung, die durch Bradykinin verursacht wird, auch ein Effekt der Dephosphorylierung an Threonin 497 ist. Dieser Umstand würde auch zur Erklärung beitragen, warum Bradykinin die eNOS in weit größerem Umfang aktiviert, als VEGF. Das hohe Maß an Aktivierung durch Bradykinin kann nur durch die Dephosphorylierung der hemmenden Aminosäure Threonin 497 bei gleichzeitiger Phosphorylierung des aktivierenden Serin 1177 zustande kommen. Im Vergleich dazu aktiviert VEGF die eNOS zwar ebenfalls über eine Phosphorylierung an Serin 1177, aufgrund der fehlenden Deinhibition an Threonin 497 wird die NO-Produktion jedoch nicht in gleichem Maße gesteigert. Diese These wird auch von der Tatsache gestützt, daß die Bradykinin-induzierte Dephosphorylierung zeitlich viel enger mit der gesteigerten NO-Freisetzung korreliert, als die Phosphorylierung an Serin 1177.

Andere Phosphorylierungsstellen, deren genaue Funktion es noch zu erforschen gilt, konnten in neuerer Zeit identifiziert werden. Dazu zählen Serin 116 (Corson 1996; Kou 2002), Serin 617 und Serin 635 (Michell 2002). Serin 116 ist in endothelialen

Zellen basal phosphoryliert und wird, wie Threonin 495, auf bestimmte Stimuli dephosphoryliert.

Serin 617 und Serin 635 sind Bestandteil der autoinhibitory loops und werden durch Stimulation mit VEGF und ATP, sowie Bradykinin phosphoryliert (Boo 2002; Michell 2002). Die Bedeutung der Phosphorylierungsstellen ist aber nach bisherigen Erkenntnissen nicht als gleichwertig einzustufen. In den experimentellen Studien zu diesem Thema werden Serin 1177 und Threonin 495 immer wieder klar hervorgehoben, wohingegen die Phosphorylierung von Serin 635 sowie Konsequenzen in Bezug auf die Enzymaktivität nicht regelmäßig nachgewiesen werden können (Dimmeler 1999; Fulton 1999). Hieraus wird die Notwendigkeit einer Studie ersichtlich, die sich mit der Kooperation dieser beiden Aminosäuren beschäftigt.

Um die mutmaßlich synergistische Wirkung der Phosphorylierung an Serin 1177 und der Dephosphorylierung an Threonin 495 zu untersuchen, wurden Adenoviren entwickelt, die an der Aminosäure 495 anstatt Threonin Alanin enthielten, sowie an der Aminosäure Serin 1177 das phosphomimetische Aspartat anstatt Serin enthielten (S1177D/T495A-Doppelmutante). Eine weitere Mutante wurde ausschließlich an Serin 1177 durch Aspartat ersetzt (S1177D-Einfachmutante). Studien von Scotland et al. konnten bereits zeigen, daß die S1177D-eNOS im Vergleich zu einer S1177A eNOS verstärkt sowohl basal als auch VEGF-stimuliert NO produziert hat. Dazu wurden ebenfalls Endothelzellen mit den entsprechenden Adenoviren transfiziert. Es gelang, die endothelabhängige Vasodilatation in Arterien von Knock-out-Mäusen wieder vollständig herzustellen. In dieser Studie wurde jedoch kein Vergleich angestellt zwischen den beiden Mutanten der eNOS und einer ebenfalls transfizierten Wildtyp-eNOS mit der Begründung, daß es nicht möglich sei, den Phosphorylierungsstatus des Wildtyps zu kontrollieren. Derartige Versuche sind in der Tat wenig aussagekräftig, wenn die Rolle einer bestimmten Aminosäure als Kontrollelement der eNOS-Aktivität bestimmt werden soll. In dieser Dissertation wird jedoch ein Schwerpunkt gelegt auf die basale und Agonisten-stimulierte Produktion von NO. Dabei werden die Einfach (S1177D)- und die Doppelmutante (T495A/S1177D), sowie die Wildtyp-eNOS miteinander verglichen. Auch wenn

hierbei der Phosphorylierungszustand der Wildtyp-Variante der eNOS nicht bestimmt werden kann, so ist davon auszugehen, daß sie an den untersuchten Phosphorylierungsstellen den physiologischen Kontrollmechanismen unterliegt, was nicht für die Einfach- und die Doppelmutante gilt.

Etablierung der „endothelialen Gentherapie“

Zur Untersuchung der unterschiedlichen eNOS-Varianten wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, die endothelabhängige Vasomotorik vollständig wiederherzustellen. Durch luminale Applikation eines Adenovirus wurde sichergestellt, daß nur die Endothelzellen mit dem Virus transfiziert werden. Anschließend wurden die Gefäße unter physiologischen Bedingungen in Bezug auf Temperatur, pH und Osmolarität im Organbad funktionell untersucht. Die Zielsetzung bestand darin, eine Technik zu entwickeln, mit der es möglich ist die DNA-Abschnitte, die für die eNOS, bzw. deren korrespondierenden Mutanten kodieren, in Form von Plasmiden in die Endothelzellen zu integrieren ohne die funktionelle Einheit aus Intima und Media zu stören. Die meisten Studien zu diesem Thema fanden ausschließlich in Zellkulturen statt. Der Vorteil dieser Methode ist eine funktionelle Untersuchung am intakten Organ durch das endothelspezifische Applikationsverfahren des Adenovirus. Für diese Versuche wurden eNOS-Knock-out-Mäuse verwendet um eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen eNOS-Varianten zu gewährleisten ohne eine Hintergrundproduktion von NO berücksichtigen zu müssen. So konnte mit Hilfe der verschiedenen eNOS-Mutanten die Bedeutung von posttranslationalen Phosphorylierungen - auch in Kombination miteinander - untersucht werden. Diese Methode ist auch eine attraktive Alternative zu Experimenten an Zellkulturen, weil die Reaktivität der untersuchten Gefäße durch das Verfahren des Gentransfers nicht beeinflußt wird. Ausserdem kann die Effizienz der Transfektion im lebenden Zellverband durch immunhistochemische Darstellung mit GFP-markierten Proteinen eingeschätzt werden. Das ist gerade bei dem Vergleich verschiedener eNOS-Mutanten von besonderer Bedeutung, da Unterschiede des Titers und des Transfektionserfolgs eine erhebliche Störgröße darstellen können. In Abbildung 7 ist zu erkennen, daß ungefähr die Hälfte der Endothelzellen eNOS exprimieren. Da es sich um

Knock-Out-Mäuse handelt ist eine intrinsische eNOS-Expression ausgeschlossen. Dem entsprechend färbten sich nicht-transfizierte Kontrollgefäße nicht an. Dieses Ergebnis erreichten wir mit ausreichender Reproduzierbarkeit. Es ist weiterhin zu erkennen, daß sich zwar im gesamten Bereich innerhalb der Zellgrenzen eNOS befindet, aber die Region um den Zellkern und teilweise auch der Bereich der Zellgrenzen besonders signalreich hervorgehoben sind. In den letzten Jahren wurde immer offensichtlicher, daß nicht nur Protein-Proteininteraktionen über den Aktivierungsgrad der eNOS und damit die NO-Produktion entscheiden. Vielmehr wurde deutlich, daß die Steuerung der eNOS ein hochdynamischer Prozess ist, bei dem zeitliche Abläufe und die räumliche Verteilung ebenfalls von größter Bedeutung sind.

Damit sämtliche beschriebenen Schritte der NO-Freisetzung effizient ablaufen können, muß sich die eNOS zur rechten Zeit am rechten Ort befinden. In einem Zellverband aus Endothelzellen reichert sich die eNOS stets in der Golgiregion und dem plasmalemalen Caveolae an, wo sie aktiviert wird (Fulton 2002). Zu diesem Zweck sind ko- und posttranslationale Verknüpfungen mit Fettsäuren eine notwendige Bedingung (Busconi 1993; Garcia-Cardena 1996; Sessa 1995). Welche Rolle Protein-Proteininteraktionen bei der räumlichen Verteilung der eNOS spielen ist dagegen komplexer und weniger genau untersucht. Eine große Zahl interagierender Proteine in den Caveolae könnten bedeutende Faktoren bei der Lokalisation der eNOS in diesem Kompartiment sein. Proteine wie Dynamin 2 (Cao 2001) oder NOSIP (Dedio 2001) sind wahrscheinlich verantwortlich für die Lokalisation in den Golgiapparat und andere Zellkompartimente. Die Umverteilung der eNOS ist eines der nächsten Ereignisse nach deren Aktivierung. Die Beobachtung, daß die NO-Produktion schneller einsetzt als die Umverteilung des Enzyms, läßt darauf schließen, daß es sich dabei aber eher um einen Prozess handelt, der die eNOS-Aktivierung wieder beendet. Zimmermann et al. gelang es zu zeigen, daß Überexpression von NOSTRIN in Zellen aus Hamsterovarien, zu einer massiven Verlagerung der NOS von der Plasmamembran und dem Golgiapparat in vesikelähnliche Strukturen, die gleichmäßig im Plasma verteilt sind, führt (Zimmermann 2002). Diese Umverteilung könnte der Grund für eine verminderte eNOS-Aktivität sein in diesen NOSTRIN überexprimierenden Zellen. NOSTRIN wird in Endothelzellen ebenso produziert und es ist wahrscheinlich,

daß es auch hier an der intrazellulären Verteilung der eNOS beteiligt ist. Es zeichnet sich ab, daß auch der Kontakt zwischen NO und seinem Rezeptor der löslichen Guanylatzyklase (sGC) nicht allein von „NO-Wolken“ und Diffusionsgradienten abhängt. In Endothelzellen wurden eNOS sowie sGC in Caveolae gefunden (Zabel 2002). Auf diese Weise müßte NO nicht, wie bisher angenommen, durch verschiedene Zellen diffundieren, um zu seinem löslichen Rezeptor zu gelangen, sondern der Kontakt würde an einem Proteinkomplex stattfinden, der sich wahrscheinlich im Bereich der Zellmembran befindet. Bislang ist nicht untersucht, auf welche Weise der Phosphorylierungsstatus der eNOS auf ihre intrazelluläre Verteilung Einfluß nimmt. In Abbildung 11 fällt jedoch auf, daß sich transfizierte S1177D-eNOS im Vergleich zu T495A/S1177D-eNOS weniger deutlich im Bereich des Golgiapparates anreichert. Eine relativ geringe NO-Produktion, wie man sie von einem konstitutiv aktivierten Enzym nicht erwarten würde, könnte möglicherweise auch auf gestörten Transportvorgängen im Inneren der Zelle beruhen.

In frühen Ansätzen isolierte Blutgefäße mit Adenoviren zu infizieren, wurden die präparierten Arterienringe in der virushaltigen Organkultur inkubiert (z.B. (Lake-Bruse 1999)). Da bei dieser Herangehensweise aber sowohl die Intima als auch die Adventitia der virushaltigen Lösung ausgesetzt sind, kommt es nicht, wie gewünscht, zum isolierten Gentransfer in das Endothel.

Scotland et al. entwickelten erstmals eine Methode, bei der nur das Gefäßlumen mit virushaltiger Lösung gefüllt wurde. Hier konnte zunächst gezeigt werden, daß die Transfektion mit einem Adenovirus per se keinen Einfluß auf die Kontraktilität eines Gefäßes hat. Gefäße, die mit dem Reporter gen LacZ transfiziert wurden, zeigten dementsprechend keine abweichende Reaktion auf Acetylcholin zu Referenzgefäßen, die nicht transfiziert wurden. Auch ein verändertes Verhalten nach Stimulation mit PGF 2α ließ sich nicht nachweisen. Der luminale Gentransfer ist somit eine Methode, die es möglich macht verschiedene eNOS Mutanten in ein und demselben Individuum zu untersuchen, indem die beiden Karotiden mit einem unterschiedlichen Virus befüllt werden. Auf diese Weise sind intraindividuelle Unterschiede keine zu beachtende Störgröße. Voraussetzung dafür ist eine konstante und selektive Transfektion des

Endothels. Die Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop (Abb. 7) zeigen in der en face-Darstellung, daß ca. 40 – 60 % der Zellen eNOS produzieren, und daß das intrazelluläre Verteilungsmuster dem gewohnten Bild mit einer Anreicherung um die Kernregion entspricht. Eine weitere Aufnahme (Abb. 8) zeigt zusätzlich eine 3-dimensionale Rekonstruktion der en face-Darstellung. Um die gelungene, selektive Transfektion des Endothels zu dokumentieren haben Arbeitsgruppen, die mit zum Teil unterschiedlichen Methoden gearbeitet haben, bislang histologische Gefäßquerschnitte gefärbt (Scotland 2002). Hier war ebenfalls zu erkennen, daß nur eine Einzellschicht auf der luminalen Seite des Präparates transfizierte Zellen enthält, aber mit Hilfe des konfokalen Mikroskops war es möglich in einem Präparat sowohl die en face- als auch die Querschnittsansicht zu beurteilen. Damit wurde gezeigt, daß bei der verwendeten Methode ausschließlich Zellen des Endothels nach der Transfektion mit Ad-eNOS-Viren eNOS exprimieren.

Effekte der „endothelialen Gentherapie“

Der Darstellung transfizierter Endothelzellen schlossen sich Untersuchungen an, in welchem Umfang die Transfektion die Relaxationsfähigkeit der Gefäße wiederherstellt. Dazu wurde bei transfizierten Karotiden im Organbad schrittweise die Acetylcholin-Konzentration in der Lösung angehoben. Mittels eines Kraftaufnehmers konnte dann der Tonusverlust aufgezeichnet werden. In Abbildung 12 ist zu erkennen, daß die Karotiden der Wt-Mäuse bei einer Phenylephrinkonzentration von $1,4 \cdot 10^{-7}$ mol/l die 80% der Kaliumkontraktion erreicht hatten. Die Relaxation setzte bei einer Konzentration im Bereich von 10^{-9} mol/l Acetylcholin ein. Vergleichbare Resultate ergaben sich für Gefäße, die von Knock-out-Mäusen stammen und mit wt-eNOS transfiziert wurden. Da Wt-Karotiden und Knock-out-Karotiden, die mit wt-eNOS transfiziert wurden, im Organbadversuch kein unterschiedliches Verhalten zeigen, ist anzunehmen, daß sie funktionell gleichwertig sind. Damit ist gezeigt, daß es möglich ist, die Relaxationsfähigkeit in knock-out-Gefäßen mittels Gentransfer einer wt-eNOS vollständig wiederherzustellen. Unbehandelte Karotiden von Knock-out-Mäusen benötigten zum Kontrahieren eine zehn Mal geringere Phenylephrinkonzentration und zeigten danach keinerlei Reaktion

auf Acetylcholin. Eine Restaktivität oder eine Relaxation, die auf andere Faktoren zurückzuführen ist, konnte damit ausgeschlossen werden (Chataigneau 1999). Diese Ergebnisse stimmen mit den Entdeckungen anderer Arbeitsgruppen überein, die mit Hilfe unterschiedlicher Methoden die Relaxationsfähigkeit wiederherstellen konnten.

Scotland et. al gelang es 2002 zu zeigen, daß ein endothelselektiver Gentransfer in Knock-out-Mäusekarotiden mit einem Wt-eNOS-Virus zu einer vollständigen Wiederherstellung der basalen NO-Freisetzung, sowie der Relaxation nach Stimulation mit Acetylcholin führen kann. Dieser Effekt läßt sich durch Zugabe von L-NAME wieder aufheben und ist damit auf die Wirkung von NO zurückzuführen. L-NAME hatte keinen Einfluß auf nicht-transfizierte Kontrollgefäße (Scotland 2002). Weiterhin wurden in dieser Studie auch gentechnisch manipulierte eNOS-Varianten untersucht. Die zentrale Fragestellung war, welche Rolle die Phosphorylierung an Serin 1179 spielt. Dabei zeigte sich, daß Gefäße, die mit S1179A- und S1179D-eNOS transfiziert wurden beide etwa 40 % der Relaxation erbrachten, die zuvor bei Wt-Gefäßen gesehen wurde. Wobei die S1179D-Mutante mit $43 \pm 3,5$ % signifikant stärker relaxierte als die S1179A-Mutante ($38 \pm 9,8$ %). Der Unterschied in der Relaxationsfähigkeit vergrößerte sich mit Verringerung der Acetylcholindosis, so daß eine Modulation in der Acetylcholinsensitivität als Ursache diskutiert werden kann. Die von uns durchgeführten Versuche sollen nun die Wechselwirkungen zwischen den Phosphorylierungsstellen Serin 1177 und Threonin 495 herausarbeiten. Dazu wurde die wt-eNOS mit der S1177D- und der S1177D/T495A-Mutante im Organbadversuch verglichen. Die Ergebnisse zeigen, daß die S1177D/T495A-eNOS-Gefäße erst bei zehn Mal höherer Acetylcholinkonzentration den gleichen Grad an Relaxation wie die Vergleichsgefäße erreichten. Ferner beträgt die absolute Relaxation ca. 10% weniger als bei der S1177D- und wt-eNOS. Diese Beobachtung für sich genommen unterstützt noch nicht die Annahme, daß eine Phosphorylierung an Serin 1177 gemeinsam mit einer Dephosphorylierung an Threonin 495 das Enzym in seiner Aktivität steigert. In diesem Fall wäre zu erwarten gewesen, daß die Gefäße, welche die Doppelmutante exprimieren in besonderem Maße NO produzieren und daher eher stärker relaxieren. Es fiel jedoch auf, daß bei der vorangegangenen Kontraktion mit Phenylephrin sehr

unterschiedliche Dosen zur Verwendung kamen. Darum wurde die Phenylephrin-induzierte Kontraktion näher untersucht.

Die Ergebnisse demonstrieren, daß die Doppelmutante von allen untersuchten eNOS-Varianten die zögerlichste Kontraktion nach Konzentrationserhöhung mit Phenylephrin zeigt. Zusammenfassend kann man also sagen, daß die Doppelmutante zwar deutlich mehr Phenylephrin benötigte, um die angestrebten 80 % der Kaliumkontraktion zu erreichen, sie aber auf den Acetylcholinstimulus weniger sensibel reagierte. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß bereits zu Beginn des Versuchs in den Gefäßen mit der Doppelmutante die NO-Produktion deutlich höher war als bei den Vergleichsgefäßen. Eine Steigerung der NO-Freisetzung durch Acetylcholin war jedoch im Vergleich zum Wildtyp und der Einfachmutante schwächer ausgeprägt. Diese Entdeckungen sprechen dafür, daß die Phosphorylierung an Serin 1177 zusammen mit der Dephosphorylierung an Threonin 495 die basale Aktivität der eNOS erhöhen und die NO-Produktion konstant verstärken. Ein Enzym, das gentechnisch an diesen Stellen auf beschriebene Weise verändert ist, kann als partiell konstitutiv aktiviert betrachtet werden. Damit läßt sich erklären, warum die basale NO-Freisetzung erhöht ist. Eine Agonisten-induzierten Aktivierung dieses Enzyms ist jedoch nicht zu erwarten, wenn der Agonist seine Wirkung bei der Wt-eNOS an Phosphorylierungsstellen entfaltet, die in unseren Experimenten substituiert und damit nicht veränderbar sind. Für Acetylcholin trifft das im Fall der T495A/S1177D-eNOS zu:

Die Stimulation durch Acetylcholin wird vermittelt über eine Aktivierung der Phospholipase C. Diese katalysiert die Produktion von Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2). IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum (ER), worauf Kalzium aus dem ER in das Zytoplasma freigesetzt wird, dadurch wird CaM aktiviert und bindet an der CaM-Bindungsdomäne der eNOS. Diese Bindung wird durch die Dephosphorylierung an Threonin 495, bzw. durch Substitution mit Alanin, in höchstem Maße begünstigt (Fleming 2001; Harris 2001). Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung der Proteinkinase C durch DAG. Die Proteinkinase C kann die

Wildtyp-eNOS im Gegensatz zur T495A/S1177D-eNOS an Threonin 495 phosphorylieren und an Serin 1177 dephosphorylieren, was diese negativ reguliert oder das CaM-Bindungsverhalten ändern könnte. Die Assoziation mit CaM hat zur Folge, daß sich die Oxydase- und die Reduktasedomäne des Enzyms so ausrichten, daß ein ungehinderter Elektronenfluß stattfinden kann - eine Voraussetzung für die effektive NO-Produktion. Des Weiteren dissoziiert die eNOS aus der Bindung mit Caveolin und diffundiert ins Zytoplasma (Arnal 1999; Ghosh 1998). Aktuelle Studien weisen jedoch darauf hin, daß von den ca. 12 Isoenzymen der PKC-Familie nicht alle diesen Effekt auf die eNOS haben. Für die PKC α konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression mit einer vermehrten Phosphorylierung an Serin 1177, sowie einer gesteigerten NO-Produktion und einem höheren Blutfluß in Ruhe einhergeht. Die Vasodilatation läßt sich durch L-NAME suprimieren (Partovian 2005). Neben der bereits beschriebenen Änderung der Konformation aktiviert CaM die CaM-Kinase II, die die eNOS durch Phosphorylierung an Serin 1177 aktiviert. Bei einer eNOS, die an Serin 1177 phosphomimetisch substituiert ist, kann also auch über diesen Schenkel der acetylcholininduzierten Signaltransduktion keine Leistungssteigerung mehr erreicht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine acetylcholinvermittelte Modulation der NO-Produktion, die von Phosphorylierungen durch die CaM-Kinase II oder die Proteinkinase C abhängig ist, nicht erwartet werden kann, da die zu phosphorylierenden Aminosäuren unveränderbar substituiert wurden. Über den Effekt den CaM selbst durch die Bindung an der eNOS ausübt, sagt dies jedoch nichts aus. Ein Grund warum wir in unseren Versuchen trotz eines genetisch veränderten Enzyms mit Acetylcholin noch für eine Relaxation sorgen konnten, obwohl alle dem Acetylcholin nachgeschalteten Kinasen an Aminosäuren angreifen, die nicht mehr de-/phosphorylierbar waren, ist wahrscheinlich, daß auch die dauerhaft aktivierte eNOS immer noch von CaM abhängig ist, um die sterische Veränderung zu erreichen, auch wenn die CaM-bedingten Phosphorylierungsvorgänge keinen Einfluß mehr auf das Verhalten des Enzyms haben können. Der Kalziumanstieg nach Stimulation mit Acetylcholin aktiviert dieses notwendige CaM, was die abgeschwächte, aber vorhandene Antwort auf Acetylcholin erklärt. Um in diesem komplexen,

interdependenten System keine acetylcholininduzierte Relaxation zu verursachen die nicht durch NO vermittelt wird, müssen die alternativen zweiten Botenstoffe bedacht werden. So aktiviert Diacylglycerin nicht nur die Proteinkinase C, sondern dient neben anderen Phospholipiden als Substrat für die Phospholipase A2 und die durch Acetylcholin aktivierte Phospholipase C. Beide Enzyme können Arachidonsäure aus Phospholipiden abspalten. Arachidonsäure ist Ausgangssubstanz für die Synthese von Prostaglandinen. Katalysiert wird diese Reaktion von der Cyclooxygenase. Die Aktivierung von PLC durch Acetylcholin resultiert somit in der gleichzeitigen Bildung mehrerer zweiter Botenstoffe in der Zielzelle und ist mit der Bildung von NO und Prostaglandinen Ausgangspunkt für zwei separate Wege der Signaltransduktion, die auf die Vasomotorik Einfluß nehmen. Um keine Interferenz mit dem Prostaglandinstoffwechsel berücksichtigen zu müssen, wurde die Signaltransduktion mit 3 mg/l Diclofenac auf der Ebene der COX inhibiert. Da in unseren Versuchen die Karotiden aus eNOS-Knock-out-Mäusen keine messbare Reaktion auf Acetylcholin zeigten bis hin zu einer Konzentration, bei der eNOS-transfizierte Gefäße bereits auf Grundniveau relaxiert waren, kann davon ausgegangen werden, daß die Produktion der Prostaglandine, die durch Acetylcholin entstehen, vernachlässigbar klein ist.

Zehn Jahre nachdem Furchgott nachweisen konnte, daß eine acetylcholinvermittelte Vasodilatation durch das Endothel vermittelt wird, charakterisierte 1990 Rees et. al. drei Inhibitoren der endothelialen NO-Synthase. Bei den drei Vertretern dieser Klasse (L-NMMA, L-NIO, L-NAME) handelt es sich um verschiedene L-Arginin-Analoga, die kompetitiv die eNOS hemmen (Griffith 1996). Man bediente sich vornehmlich dem L-NAME, um zu demonstrieren, daß ein gesehener Effekt auf der Wirkung des NO bzw. der eNOS basiert. L-Nitro-n-Arginin, ein weiteres L-Arginin-Analogon, das drei Jahre später von Furfine et al. charakterisiert wurde ist ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor mit einer Selektivität für die neuronale und die endotheliale Isoform der NOS. Es bietet gegenüber dem L-NAME den Vorteil, daß es nicht zuerst durch einen Hydrolyseschritt in seine aktive Form überführt werden muß (Furfine 1993).

In den Experimenten mit L-NNA konnte gezeigt werden, daß Karotiden, die mit der Doppelmutante transfiziert wurde, signifikant mehr kontrahierten als der Wildtyp und

die Einfachmutante. Im Vergleich zwischen der Wildtyp-eNOS und der S1177D-eNOS stellte sich heraus, daß die Gefäße, die mit der Einfachmutante transfiziert wurden, signifikant weniger kontrahierten. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die basale NO-Produktion der Doppelmutante erheblich gesteigert ist, und daß die phosphomimetische Substitution an Serin 1177 nicht ausgereicht hat, um die basale NO-Freisetzung zu steigern. Die Ergebnisse lassen eine um die Hälfte reduzierte NO-Produktion der S1177D-Mutante im Vergleich zur Wt-eNOS vermuten. Die bereits erwähnten Untersuchungen von Scotland et. al. dokumentierten zwar, daß ein signifikanter Unterschied im Relaxationsverhalten zwischen an Serin 1177 konstitutiv-phosphorylierter und konstitutiv-dephosphorylierter eNOS besteht, was den Stellenwert dieser Aminosäure unterstreicht. Der Unterschied der beiden Varianten war zwar signifikant, aber mit 5% nicht besonders groß. Daher ist anzunehmen, daß diese Phosphorylierungsstelle im Zusammenspiel aller Regulationsmechanismen nur eine von vielen Stellgrößen darstellt. Unterstützt wird diese Einschätzung von der Tatsache, daß eine Phosphorylierung von Serin 1177 mit einem geringen Anstieg der Enzymaktivität verbunden ist. Mit einer Aktivitätssteigerung, die ca. dem doppelten der Ruheaktivität entspricht, kann eine Phosphorylierung an Serin 1177 nicht für die enorme NO-Produktion verantwortlich sein, die nach Gabe von Substanzen zu beobachten ist, die den intrazellulären Kalziumspiegel anheben. Die Arbeitsgruppe um Scotland stellte damals zwar keine Vergleiche zwischen den gentechnisch modifizierten eNOS-Typen und der Wildtyp-eNOS an, aber im Vergleich zu Karotiden aus Wt-Mäusen erreichten die S1177D-eNOS-transfizierten Gefäße ca. 40% der Relaxation. Da wir bereits zeigen konnten, daß die mit dem Wildtyp der eNOS transfizierten Karotiden funktionell Wildtypkarotiden entsprechen, kann man schlußfolgern, daß sich auch bei den Versuchen von Scotland et. al. die NO-Produktion der Einfachmutanten im Bereich von 40% im Vergleich zum Wildtyp bewegt haben. Übereinstimmend kann gesagt werden, daß die Phosphorylierung an Serin 1177 die eNOS-Aktivität steigert, aber jede Mutante, die konstitutiv an dieser Aminosäure modifiziert ist nur etwa die Hälfte der NO-Produktion leistet, die man bei Wildtypgefäßen, oder Knock-out-Gefäßen, die mit der Wt-eNOS transfiziert wurden, beobachtet. Mitverantwortlich dafür ist sicherlich die Tatsache, daß der Ersatz einer Aminosäure zu einer statischen

Veränderung in einem hochdynamischen System führt. Daß dieser Effekt die Doppelmutante nicht daran hindert deutlich mehr NO zu produzieren unterstreicht auf eindrucksvolle Weise den Synergismus der zwischen Serin 1177 und Threonin 495 bestehen muß.

4.1) Ausblick

Frühere Studien haben gezeigt, daß Gentherapie mit eNOS eine attraktive Strategie gegen verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt, wie z.B. Atherosklerose (Ooboshi 1998), Diabetes (Lund 2000) und Restenosierung (Kaneda 1997). Die Expression einer konstitutiv-aktivierten S1179D/T495A-eNOS im Endothel moduliert die basale NO-Produktion der Endothelzellen ohne die endotheliale Ansprechbarkeit allzu stark einzuschränken. Damit könnte die T495A/S1179D-eNOS Vorteile in der gentherapeutischen Anwendung gegenüber der Wt-eNOS und der S1177D-eNOS bei krankheitsbedingten Zuständen haben, die mit einer reduzierten basalen NO-Produktion oder eingeschränkter Angiogenese einhergehen. Im speziellen auch, weil die Aktivität des Akt, das die eNOS durch Phosphorylierung an Serin 1177 aktiviert, durch atherogene Stimuli inhibiert wird. Hier könnte ein Enzym vorteilhaft sein, welches unabhängig von Akt an Serin 1177 phosphomimetisch substituiert ist. Durch den Austausch des Threonin 495 durch Alanin wird die Inhibition an dieser Stelle zusätzlich aufgehoben und ein Enzym entsteht, das dauerhaft NO produziert. Auf diese Weise könnte die S1179D/T495A-eNOS ein neues Behandlungskonzept für endotheliale Dysfunktion im Rahmen einer Hypercholesterinämie oder Atherosklerose sein.

5) Zusammenfassung

Fragestellung: In zahlreichen Studien wurden die Regulationsmechanismen der endothelialen NO-Synthase aufgedeckt und untersucht. Neben vielen Faktoren, die bei der Aktivierung eine Rolle spielen, kommt der Phosphorylierung einzelner Aminosäuren des Proteins eine besondere Bedeutung zu. In dieser Arbeit werden die Aminosäuren Threonin 495 und Serin 1177 untersucht mit der speziellen Fragestellung nach einer synergistischen Wirkung.

Zielsetzung: Unter der Annahme, daß sowohl die Dephosphorylierung an Thr 495 als auch die Phosphorylierung an Ser 1177 zur Aktivierung der eNOS beitragen, wurde eine eNOS-Mutante untersucht, die an Thr 495 antiphosphomimetisch und an Ser 1177 phosphomimetisch substituiert wurde. Diese wurde in Bezug auf die Relaxationsfähigkeit mit dem Wildtyp der eNOS und einer eNOS verglichen, die ausschließlich an Ser 1177 phosphomimetisch substituiert wurde.

Material und Methoden: Für die Experimente wurden Knock-out-Mäuse verwendet deren Endothelzellen keine NO-Synthase exprimieren. Mit Hilfe eines Adenovirus als Vektor wurden die Endothelzellen der Arteria Carotis mit den entsprechenden eNOS-Mutanten transfiziert. Im Organbad konnte das intakte Gefäß unter physiologischen Bedingungen auf die Reaktion nach Gabe von vasoaktiven Substanzen untersucht werden.

Ergebnisse: Mit Hilfe der entwickelten Methode ist es möglich, die Relaxationsfähigkeit von Gefäßen aus eNOS-Knock-out-Mäusen wieder vollständig herzustellen. Im Relaxationsverhalten nach Stimulation mit Acetylcholin zeigten Gefäße, die jeweils mit einer der drei eNOS-Mutanten transfiziert waren, keinen großen Unterschied. Zur Vorspannung der Gefäße wurde jedoch deutlich mehr Phenylephrin benötigt bei den Gefäße, die mit der T495A/S1177D-eNOS transfiziert waren. Nach Hemmung mit L-NNA kontrahierten diese Gefäße am stärksten, und sie zeigten auch die höchste intrazelluläre Konzentration basalen cGMPs im RIA.

Schlussfolgerung: Die alleinige Phosphorylierung von Serin 1177 führt nicht zu einer vollständigen Aktivierung der eNOS, während eine Phosphorylierung an Serin 1177 in Kombination mit einer Dephosphorylierung von Threonin 495 die NO-Produktion steigert und diese Endothelzellen basal hohe Konzentrationen an NO enthalten.

6) Summary

Introduction: In addition to several other mechanisms, the phosphorylation of specific amino acids within the protein plays a major role in the activation of endothelial NO synthase (eNOS). This work focuses on the function of the amino acids threonine 495 und serine 1177 within the eNOS protein particularly with regard to a synergistic effect on enzyme activity.

Objective: Recent studies suggested that the dephosphorylation of threonine 495 as well as the phosphorylation of serine 1177 contribute to the activation of eNOS. We examined an eNOS-mutant with phosphomimetic substitution at serine 1177 by aspartat and antiphosphomimetic substitution at threonine 495 by alanine. This mutant was compared with a wildtyp-eNOS and an eNOS substituted at serine 1177 on its effect on vasomotor function in an ex vivo overexpression system.

Material and methods: In these experiments knockout mice were used, which do not express eNOS (eNOS^{-/-}). With an adenovirus as a vector, endothelial cells were transfected from the luminal side with the different eNOS-mutants. This approach allowed an expression confined to the endothelium. In organbath chambers the endothelium-dependent, NO-mediated vasomotor function of intact blood vessels was subsequently examined under physiological conditions.

Results: Using this method a selective gene transfer into endothelial cells was achieved. Endothelial eNOS transfection restored endothelial-dependent relaxation in isolated carotid arteries. Vessels transfected with the three different eNOS-mutants showed no significant difference in the relaxation induced by acetylcholine, but the T495A/S1177D-eNOS required more phenylephrine to reach a contraction level comparable to the other forms studied. Moreover, consistent with higher basal NO release, the contraction to eNOS inhibition was significantly enhanced in blood vessels transfected with T495A/S1177D-eNOS. Finally, these vessels also showed the highest intracellular concentrations of cGMP under basal conditions as compared to the other forms.

Conclusion: The isolated phosphorylation of serine 1177 in eNOS does not lead to altered NO-dependent vascular effect. In contrast, phosphorylation of serine 1177 in combination with a dephosphorylation of threonine 495 induces enhanced basal NO-production by increasing the constitutive activity of eNOS.

7) Quellenverzeichnis

- Arnal J F, Dinh-Xuan A T, Pueyo M, Darblade B, Rami J (1999) Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology *Cell Mol.Life Sci.* 55: 1078-1087
- Baltrons M A, Pedraza C, Sardon T, Navarra M, Garcia A (2003) Regulation of NO-dependent cyclic GMP formation by inflammatory agents in neural cells *Toxicol.Lett.* 139: 191-198
- Bath P M, Hassall D G, Gladwin A M, Palmer R M, Martin J F (1991) Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro *Arterioscler.Thromb.* 11: 254-260
- Bauer P M, Fulton D, Boo Y C, Sorescu G P, Kemp B E, Jo H, Sessa W C (2003) Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase *J.Biol.Chem.* 278: 14841-14849
- Bernier S G, Haldar S, Michel T (2000) Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase *J.Biol.Chem.* 275: 30707-30715
- Boo Y C, Hwang J, Sykes M, Michell B J, Kemp B E, Lum H, Jo H (2002) Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 283: H1819-H1828
- Borrmann S (1998) Regulation der endothelialen NO-Synthase unter Hypoxie und proinflammatorischer Stimulation in pulmonal-arteriellen Endothelzellen
- Boutin J A (1997) Myristoylation *Cell Signal.* 9: 15-35
- Bredt D S, Snyder S H (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 682-685
- Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, Sessa W C, Cirino G (2000) Geldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90 (Hsp90) mediated signal transduction has anti-inflammatory effects and interacts with glucocorticoid receptor in vivo *Br.J.Pharmacol.* 131: 13-16
- Busconi L, Michel T (1993) Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization *J.Biol.Chem.* 268: 8410-8413
- Busse R, Luckhoff A, Bassenge E (1987) Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 336: 566-571
- Busse R, Mulsch A (1990) Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin *FEBS Lett.* 265: 133-136
- Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich L G, Sickmann A, Meyer H E, Lohmann S M, Schmidt H H (2000) Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases *J.Biol.Chem.* 275: 5179-5187

- Cao S, Yao J, McCabe T J, Yao Q, Katusic Z S, Sessa W C, Shah V (2001) Direct interaction between endothelial nitric-oxide synthase and dynamin-2. Implications for nitric-oxide synthase function *J.Biol.Chem.* 276: 14249-14256
- Chataigneau T, Feletou M, Huang P L, Fishman M C, Duhault J, Vanhoutte P M (1999) Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice *Br.J.Pharmacol.* 126: 219-226
- Chen Z P, Mitchelhill K I, Michell B J, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters L A, Power D A, Ortiz de Montellano P R, Kemp B E (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase *FEBS Lett.* 443: 285-289
- Cho H J, Xie Q W, Calaycay J, Mumford R A, Swiderek K M, Lee T D, Nathan C (1992) Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages *J.Exp.Med.* 176: 599-604
- Clementi E, Sciorati C, Riccio M, Miloso M, Meldolesi J, Nistico G (1995) Nitric oxide action on growth factor-elicited signals. Phosphoinositide hydrolysis and $[Ca^{2+}]_i$ responses are negatively modulated via a cGMP-dependent protein kinase I pathway *J.Biol.Chem.* 270: 22277-22282
- Corson M A, James N L, Latta S E, Nerem R M, Berk B C, Harrison D G (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress *Circ.Res.* 79: 984-991
- De Caterina R, Libby P, Peng H B, Thannickal V J, Rajavashisth T B, Gimbrone M A, Jr., Shin W S, Liao J K (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines *J.Clin.Invest.* 96: 60-68
- Dedio J, Konig P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Muller-Esterl W (2001) NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity *FASEB J.* 15: 79-89
- Denninger J W, Marletta M A (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway *Biochim.Biophys.Acta.* 1411: 334-350
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher A M (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation *Nature* 399: 601-605
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith T W, Kelly R A, Michel T (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells *J.Biol.Chem.* 271: 22810-22814
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp B E, Busse R (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity *Circ.Res.* 88: E68-E75
- Forstermann U, Pollock J S, Schmidt H H, Heller M, Murad F (1991) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88: 1788-1792

- Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton J P, Lin M, Li K X, Michell B, Kemp B E, Rodman D, Sessa W C (2002) Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme *J.Biol.Chem.* 277: 4277-4284
- Fulton D, Gratton J P, McCabe T J, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke T F, Papapetropoulos A, Sessa W C (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt *Nature* 399: 597-601
- Furchgott R F, Zawadzki J V (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine *Nature* 288: 373-376
- Furfine E S, Harmon M F, Paith J E, Garvey E P (1993) Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-NG-nitroarginine *Biochemistry* 32: 8512-8517
- Gallis B, Corthals G L, Goodlett D R, Ueba H, Kim F, Presnell S R, Figeys D, Harrison D G, Berk B C, Aebersold R, Corson M A (1999) Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 *J.Biol.Chem.* 274: 30101-30108
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa W C (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90 *Nature* 392: 821-824
- Garcia-Cardena G, Fan R, Stern D F, Liu J, Sessa W C (1996) Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1 *J.Biol.Chem.* 271: 27237-27240
- Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer J E, Sessa W C (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 6448-6453
- Garg U C, Hassid A (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells *J.Clin.Invest.* 83: 1774-1777
- Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti M P, Stuehr D J (1998) Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis *J.Biol.Chem.* 273: 22267-22271
- Golser R, Gorren A C, Leber A, Andrew P, Habisch H J, Werner E R, Schmidt K, Venema R C, Mayer B (2000) Interaction of endothelial and neuronal nitric-oxide synthases with the bradykinin B2 receptor. Binding of an inhibitory peptide to the oxygenase domain blocks uncoupled NADPH oxidation *J.Biol.Chem.* 275: 5291-5296
- Gratton J P, Fontana J, O'Connor D S, Garcia-Cardena G, McCabe T J, Sessa W C (2000) Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1 *J.Biol.Chem.* 275: 22268-22272

- Gratton J P, Yu J, Griffith J W, Babbitt R W, Scotland R S, Hickey R, Giordano F J, Sessa W C (2003) Cell-permeable peptides improve cellular uptake and therapeutic gene delivery of replication-deficient viruses in cells and in vivo *Nat.Med.* 9: 357-362
- Griffith O W, Kilbourn R G (1996) Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids *Methods Enzymol.* 268: 375-392
- Griffith O W, Stuehr D J (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism *Annu.Rev.Physiol.* 57: 707-736
- Griffith T M, Edwards D H, Lewis M J, Newby A C, Henderson A H (1984) The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor *Nature* 308: 645-647
- Harris M B, Ju H, Venema V J, Liang H, Zou R, Michell B J, Chen Z P, Kemp B E, Venema R C (2001) Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation *J.Biol.Chem.* 276: 16587-16591
- Huang P L, Huang Z, Mashimo H, Bloch K D, Moskowitz M A, Bevan J A, Fishman M C (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase *Nature* 377: 239-242
- Ignarro L J (1991a) Physiological significance of endogenous nitric oxide *Semin.Perinatol.* 15: 20-26
- Ignarro L J (1991b) Signal transduction mechanisms involving nitric oxide *Biochem.Pharmacol.* 41: 485-490
- Ignarro L J, Buga G M, Wood K S, Byrns R E, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84: 9265-9269
- Janssens S P, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch D B, Bloch K D (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase *J.Biol.Chem.* 267: 14519-14522
- Ju H, Venema V J, Marrero M B, Venema R C (1998) Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase *J.Biol.Chem.* 273: 24025-24029
- Ju H, Zou R, Venema V J, Venema R C (1997) Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity *J.Biol.Chem.* 272: 18522-18525
- Kaneda Y, Morishita R, Dzau V J (1997) Prevention of restenosis by gene therapy *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 811: 299-308
- Karupiah G, Xie Q W, Buller R M, Nathan C, Duarte C, MacMicking J D (1993) Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase *Science* 261: 1445-1448
- Khurana V G, Feterik K, Springett M J, Eguchi D, Shah V, Katusic Z S (2000) Functional interdependence and colocalization of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 90 in cerebral arteries *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 20: 1563-1570

- Knowles R G, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals *Biochem.J.* 298 (Pt 2): 249-258
- Koppenol W H, Traynham J G (1996) Say NO to nitric oxide: nomenclature for nitrogen- and oxygen-containing compounds *Methods Enzymol.* 268: 3-7
- Kou R, Greif D, Michel T (2002) Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A *J.Biol.Chem.* 277: 29669-29673
- Lake-Bruse K D, Faraci F M, Shesely E G, Maeda N, Sigmund C D, Heistad D D (1999) Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in eNOS-deficient mice *Am.J.Physiol.* 277: H770-H776
- Lancaster J R, Jr. (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91: 8137-8141
- Lane P, Gross S S (2002) Disabling a C-terminal autoinhibitory control element in endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylation provides a molecular explanation for activation of vascular NO synthesis by diverse physiological stimuli *J.Biol.Chem.* 277: 19087-19094
- Lenasi H, Kohlstedt K, Fichtlscherer B, Mulsch A, Busse R, Fleming I (2003) Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser1177 and Thr495 *Cardiovasc.Res.* 59: 844-853
- Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa W C (1996a) Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization *Biochemistry* 35: 13277-13281
- Liu Q, Gross S S (1996b) Binding sites of nitric oxide synthases *Methods Enzymol.* 268: 311-324
- Lund D D, Faraci F M, Miller F J, Jr., Heistad D D (2000) Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves relaxation of carotid arteries from diabetic rabbits *Circulation* 101: 1027-1033
- Marletta M A (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis *Cell* 78: 927-930
- Marsden P A, Heng H H, Scherer S W, Stewart R J, Hall A V, Shi X M, Tsui L C, Schappert K T (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene *J.Biol.Chem.* 268: 17478-17488
- McCabe T J, Fulton D, Roman L J, Sessa W C (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation *J.Biol.Chem.* 275: 6123-6128
- Michel J B, Feron O, Sacks D, Michel T (1997a) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin *J.Biol.Chem.* 272: 15583-15586

- Michel J B, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T (1997b) Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase *J.Biol.Chem.* 272: 25907-25912
- Michel T, Li G K, Busconi L (1993) Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 6252-6256
- Michell B J, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power D A, Sim A T, Kemp B E (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase *J.Biol.Chem.* 276: 17625-17628
- Michell B J, Griffiths J E, Mitchelhill K I, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano P R, Kemp B E, Pearson R B (1999) The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase *Curr.Biol.* 9: 845-848
- Michell B J, Harris M B, Chen Z P, Ju H, Venema V J, Blackstone M A, Huang W, Venema R C, Kemp B E (2002) Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635 *J.Biol.Chem.* 277: 42344-42351
- Murad F, Mittal C K, Arnold W P, Katsuki S, Kimura H (1978) Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin *Adv.Cyclic.Nucleotide.Res.* 9: 145-158
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells *FASEB J.* 6: 3051-3064
- Ooboshi H, Toyoda K, Faraci F M, Lang M G, Heistad D D (1998) Improvement of relaxation in an atherosclerotic artery by gene transfer of endothelial nitric oxide synthase *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18: 1752-1758
- Palmer R M, Ferrige A G, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor *Nature* 327: 524-526
- Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri J A, Sessa W C (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells *J.Clin.Invest.* 100: 3131-3139
- Partovian C, Zhuang Z, Moodie K, Lin M, Ouchi N, Sessa W C, Walsh K, Simons M (2005) PKCalpha activates eNOS and increases arterial blood flow in vivo *Circ.Res.* 97: 482-487
- Peiro C, Redondo J, Rodriguez-Martinez M A, Angulo J, Marin J, Sanchez-Ferrer C F (1995) Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation *Hypertension* 25: 748-751
- Pollock J S, Klinghofer V, Forstermann U, Murad F (1992) Endothelial nitric oxide synthase is myristylated *FEBS Lett.* 309: 402-404
- Pratt W B (1997) The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 37: 297-326

- Radomski M W, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S (1993) Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide *Cardiovasc.Res.* 27: 1380-1382
- Robinson L J, Weremowicz S, Morton C C, Michel T (1994) Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene *Genomics* 19: 350-357
- Russell K S, Haynes M P, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa W C, Bender J R (2000) Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release *J.Biol.Chem.* 275: 5026-5030
- Sakoda T, Hirata K, Kuroda R, Miki N, Suematsu M, Kawashima S, Yokoyama M (1995) Myristoylation of endothelial cell nitric oxide synthase is important for extracellular release of nitric oxide *Mol.Cell Biochem.* 152: 143-148
- Salerno J C, Harris D E, Irizarry K, Patel B, Morales A J, Smith S M, Martasek P, Roman L J, Masters B S, Jones C L, Weissman B A, Lane P, Liu Q, Gross S S (1997) An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase *J.Biol.Chem.* 272: 29769-29777
- Scotland R S, Morales-Ruiz M, Chen Y, Yu J, Rudic R D, Fulton D, Gratton J P, Sessa W C (2002) Functional reconstitution of endothelial nitric oxide synthase reveals the importance of serine 1179 in endothelium-dependent vasomotion *Circ.Res.* 90: 904-910
- Sessa W C, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock J S, Bradley J, Thiru S, Braverman I M, Desai K M (1995) The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide *J.Biol.Chem.* 270: 17641-17644
- Siegel G, Grote J, Schnalke F, Zimmer K (1989) The significance of the endothelium for hypoxic vasodilatation *Z.Kardiol.* 78 Suppl 6: 124-131
- Singer H A, Peach M J (1982) Calcium- and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta *Hypertension* 4: 19-25
- Smart E J, Graf G A, McNiven M A, Sessa W C, Engelman J A, Scherer P E, Okamoto T, Lisanti M P (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction *Mol.Cell Biol.* 19: 7289-7304
- Smith W L (1986) Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells *Annu.Rev.Physiol.* 48: 251-262
- Sneddon J M, Vane J R (1988) Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85: 2800-2804
- Song Y, Zweier J L, Xia Y (2001) Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca²⁺/calmodulin binding *Biochem.J.* 355: 357-360
- Stamler J S (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide *Cell* 78: 931-936

- Venema V J, Marrero M B, Venema R C (1996) Bradykinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation promotes endothelial nitric oxide synthase translocation to the cytoskeleton *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 226: 703-710
- Viswanathan M, Rivera O, Short B L (1999) Heat shock protein 90 is involved in pulsatile flow-induced dilation of rat middle cerebral artery *J.Vasc.Res.* 36: 524-527
- Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer J E, Schmidt H H (2002) Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide *Nat.Cell Biol.* 4: 307-311
- Zeng G, Quon M J (1996) Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells *J.Clin.Invest.* 98: 894-898
- Zhao Y Y, Liu Y, Stan R V, Fan L, Gu Y, Dalton N, Chu P H, Peterson K, Ross J, Jr., Chien K R (2002) Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99: 11375-11380
- Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Muller-Esterl W, Oess S (2002) NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99: 17167-17172

8) Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ralf Brandes für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, seine konstruktive Kritik und seine gute Betreuung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir stets mit Liebe und Verständnis zur Seite standen.

9) Lebenslauf

Peter Stein

Persönliche Daten	
Geburtsdatum	14. Juli 1977
Geburtsort	Frankfurt
Nationalität	Deutsch
Eltern	Erika und Klaus-Peter Stein
Schulbildung	
Sep 1984 – Jul 1988	Grundschule Holzhausenschule · Frankfurt
Sep 1988 – Jun 1997	Gymnasium Anna-Schmidt-Schule · Frankfurt
Jun 1997	Abitur
Zivildienst	
Okt 1997 – Okt 1998	Deutsches Rotes Kreuz · Kreisverband Hochtaunus Abteilung für Rettungsdienst
Studium / Universität	
Wintersemester 1998	Johann Wolfgang Goethe-Universität · Frankfurt Studium der Humanmedizin
11. Sep 2000	Physikum
21. Mär 2002	Erstes Staatsexamen
31. Mär 2004	Zweites Staatsexamen
16. Jun 2005	Drittes Staatsexamen
Beruf	
Seit Jun 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie · Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität

_____, den _____, Ort _____ Datum _____ Unterschrift _____

10) Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Bedeutung der Phosphorylierung an den Aminosäuren Serin 1177 und Threonin 495 für die Aktivität der endothelialen NO-Synthase“

in dem Institut für kardiovaskuläre Physiologie

unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Ralf Brandes ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in keinem Publikationsorgan veröffentlicht.

_____, den _____, _____
Ort Datum Unterschrift