

Aus dem Johannes-Müller-Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

# Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die sympathisch-vermittelte Stressreaktion

Untersuchungen an endothelialen und neuronalen  
Stickstoffmonoxidsynthase-knock-out-Mäusen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt der  
Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Ulrike Neumann  
aus Eisenhüttenstadt

Dekan der Medizinischen Fakultät Charité:  
Prof. Dr. Joachim Dudenhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. P. Persson
2. Prof. Dr. H. Ehmke
3. Priv.-Doz. Dr. P. Gohlke

Datum der Promotion: 3. Juli 2002  
Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Hintergrund der Arbeit . . . . .	1
1.2	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthese . . . . .	4
1.3	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthese . . . . .	7
1.4	Fragestellungen und Hypothesen . . . . .	12
1.5	Experimentelle Überlegungen . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Tiere . . . . .	14
2.1.1	Tierstämme . . . . .	14
2.1.2	Tierhaltung . . . . .	15
2.2	Hämodynamische Methoden . . . . .	15
2.2.1	Herstellung des arteriellen Gefäßkatheters . . . . .	15
2.2.2	Implantation des arteriellen Gefäßkatheters . . . . .	17
2.2.3	Herstellung der rektalen Thermosonde . . . . .	19
2.2.4	Aufbau des hämodynamischen Messplatzes . . . . .	20
2.2.5	Hitzestress . . . . .	21
2.2.6	Airjetstress . . . . .	22
2.3	Molekularbiologische und biochemische Methoden . . . . .	22
2.3.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	23
2.3.2	Biochemische Methoden . . . . .	28
2.4	Auswertung der hämodynamischen Messungen . . . . .	34
2.4.1	Software . . . . .	34
2.4.2	Hitzestress . . . . .	35
2.4.3	Airjetstress . . . . .	35
2.5	Auswertung der Biochemischen Methoden . . . . .	35
2.5.1	Western Blots . . . . .	35
2.5.2	RT-PCR . . . . .	36
2.6	Statistik . . . . .	36

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Hämodynamische Messungen . . . . .	38
3.1.1	Hämodynamische Ausgangswerte . . . . .	38
3.1.2	Hämodynamische Antwort auf Stressapplikation . . . . .	40
3.2	Tyrosinhydroxylase . . . . .	45
3.2.1	mRNA (RT-PCR) . . . . .	45
3.2.2	Protein (Western Blot) . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase . . . . .	47
4.1.1	Bedeutung der eNOS für die thermoregulatorische kutane Vasodilatation . . . . .	48
4.1.2	Bedeutung der eNOS für die Regulation der Herzfrequenz	52
4.2	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase . . . . .	53
4.2.1	Bedeutung der nNOS für die Stressantwort . . . . .	54
4.2.2	Bedeutung der nNOS für die TH-Expression . . . . .	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>B</b>	<b>Danksagung</b>	<b>78</b>
<b>C</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>79</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Hintergrund der Arbeit

Als William Harvey im 17. Jahrhundert den Blutkreislauf beschrieb [25], war dies eine bahnbrechende Entdeckung. Bis heute beschäftigt dieser *Motus cordis et sanguinis* Wissenschaftler und Mediziner der verschiedensten Fachbereiche auf der ganzen Welt. Der Blutkreislauf ist eine wesentliche Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen. In den industrialisierten Ländern kosten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems mehr Menschen das Leben als Krebs. Die Untersuchung seiner physiologischen Funktionen und pathophysiologischer Veränderungen stehen deshalb besonders im Interesse der Medizin.

Es scheint eines der Erfolgskonzepte der Natur zu sein, sehr komplizierte und vielfältige Vorgänge mit sehr einfachen Mitteln zu steuern. So ist das nur aus zwei Atomen bestehende Stickstoffmonoxid (NO) ein phylogenetisch sehr altes Signalmolekül, welches entscheidende regulatorische Funktionen für die Entwicklung und Funktion eines Organismus hat.

Den ersten wichtigen Hinweis für die bedeutende Rolle von NO für die Kreislaufphysiologie lieferten vor fast genau zwanzig Jahren Robert Furchgott und

John Zawadzki [22]. Sie hatten beobachtet, dass Aortenringe mit intaktem Endothel eine Acetylcholin-induzierte Vasodilatation aufweisen. Diese im Gegensatz zur direkten kontrahierenden Wirkung von Acetylcholin auf Gefäßmuskelzellen beobachtete Relaxation führten sie auf eine zu dieser Zeit nicht näher charakterisierbare Substanz im Endothel zurück. Dieser Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) wurde 1987 als das gasförmige freie Radikal NO identifiziert [30]. NO wurde 1992 von der Zeitschrift *Nature* zum Molekül des Jahres erklärt, und Furchgott, Murad und Ignarro erhielten schließlich 1998 den Nobelpreis für Medizin für ihre Arbeiten auf diesem Gebiet.

Neben dem Endothel können jedoch auch Nervenzellen [8], Makrophagen [65] und andere Zellen NO freisetzen. Seine Bedeutung liegt also nicht nur in der Regulation des Gefäßtonus [5], sondern in vielfältigen Wirkungen auf das zentrale [26] und periphere Nervensystem [9] sowie das Immunsystem [2].

Für die Produktion von NO konnten drei Isoformen des Enzyms Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) verantwortlich gemacht werden. Drei separate NOS-Gene kodieren für die endotheliale, neuronale und induzierbare Form der NOS. Sie befinden sich auf verschiedenen Chromosomen (7, 12, 17) und zeigen beim Menschen eine Homologie von 50-60% [20].

Endotheliale und neuronale NOS werden unter Ruhebedingungen fortlaufend exprimiert, sind calmodulinabhängig und werden durch Calcium reguliert [21]. Sie bilden kleine Mengen an NO, die regulierende Funktionen für die Neurotransmission und das Herz-Kreislaufsystem haben [20]. Die induzierbare NOS (iNOS) wurde erstmals aus mit Lipopolysaccharid und Interferon  $\gamma$  stimulierten Mäusemakrophagen isoliert [64]. Sie ist calciumunabhängig und kann NO über längere Zeiträume (Stunden bis Tage) produzieren. Dieses ist vor allem für den antiproliferativen Effekt aktivierter Makrophagen verantwortlich [68] und scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese des septischen Schocks zu spielen [2].

NO wird aus dem terminalen Guanidino-Stickstoff der Aminosäure L-Arginin unter Freisetzung von L-Citrullin [31] mit Hilfe der NOS gebildet. NO diffundiert ungehindert durch Membranen und hat eine biologische Halbwertszeit von wenigen Sekunden [6]. Es bindet an die hämhaltige Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (GCs) und führt damit zu einer beschleunigten Konversion von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) [50]. Die erhöhte intrazelluläre cGMP-Konzentration bewirkt eine Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen, die die unterschiedlichen Effekte des NO vermitteln.

Um die vielfältigen Wirkungen von NO experimentell charakterisieren zu können, wird eine pharmakologische Blockade der NOS angestrebt. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Substanzen mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen und Affinitäten für die einzelnen Isoformen bekannt [62, 15]. Sie sind Inhibitoren des aktiven Zentrums der NOS und führen zu einer kompetitiven oder nicht-kompetitiven Hemmung des Enzyms. Als Folge kommt es zu einer Hemmung der Umsetzung von L-Arginin zu NO. Als wichtigste Inhibitoren sind hierbei die L-Arginin-Analoga zu nennen, unter ihnen das seit langem bekannte N $\omega$ -Methyl-L-Arginin (L-NMMA), ein nicht-isoformselektiver kompetitiver NOS-Inhibitor. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind das N $\omega$ -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) oder das L-Thiocitrullin.

Aminoguanidin als nicht-peptiderger Inhibitor ist ein potenter und selektiver nicht-kompetitiver iNOS-Blocker, S-Ethyl-Iso-Thioharnstoff einer der potentesten NOS-Inhibitoren mit einer Inhibitionskonstante im Nanomolbereich.

Als dritte Gruppe sind hier die Hämliganden zu erwähnen, die mit dem in den NOS enthaltenen Cytochrom-P-450-artigen Häm interagieren. Der wichtigste Vertreter ist das 7-Nitroindazol (7-NI), welches eine fünf- bis zehnfach erhöhte Selektivität für die neuronale Isoform gegenüber den anderen Isoformen zeigt [6].

Diese pharmakologische Blockade ist aber transient und nicht absolut isoformspezifisch. Es werden also auch die jeweils anderen Isoformen der NOS zu einem gewissen Grade gehemmt [39]. Weiterhin sind andere Wirkungen neben der Inhibition der NOS nicht auszuschließen und die Vollständigkeit der NOS-Hemmung zu hinterfragen.

## **1.2 Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase**

Die überwiegend in der Plasmamembran der Endothelzellen lokalisierte endotheliale NOS (eNOS) produziert NO als Antwort auf Stimulation mit rezeptor-abhängigen Agonisten und physikalische Stimuli. Seine Aktivität wird vor allem durch die Konzentration des freien intrazellulären Calciums reguliert. So führen Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin und andere Mediatoren zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und damit der NO-Produktion.

Für die schubspannungsabhängige Bildung von NO konnte jedoch eine calciumunabhängige Aktivierung der eNOS verantwortlich gemacht werden. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase, welche die Serin/Threoninproteinkinase Akt/PKB phosphoryliert und damit aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert die eNOS und führt somit zu einer Steigerung der NO-Produktion durch die eNOS [16].

Die NO-Moleküle diffundieren in die Gefäßmuskelzellen und führen dort über die cGMP-Bildung zu einer Relaxation (Abbildung 1.1). Die eNOS trägt damit in bedeutendem Maße zur Regulation des Gefäßtonus und des regionalen Blutflusses bei [49, 3].

Im Endothel gebildetes NO wirkt jedoch nicht nur auf die Gefäßmuskelzellen, sondern diffundiert auch nach luminal, wo es Thrombozyten erreicht und deren lösliche Guanylatzyklase (GCs) aktiviert. Der Anstieg des cGMPs führt zu einer

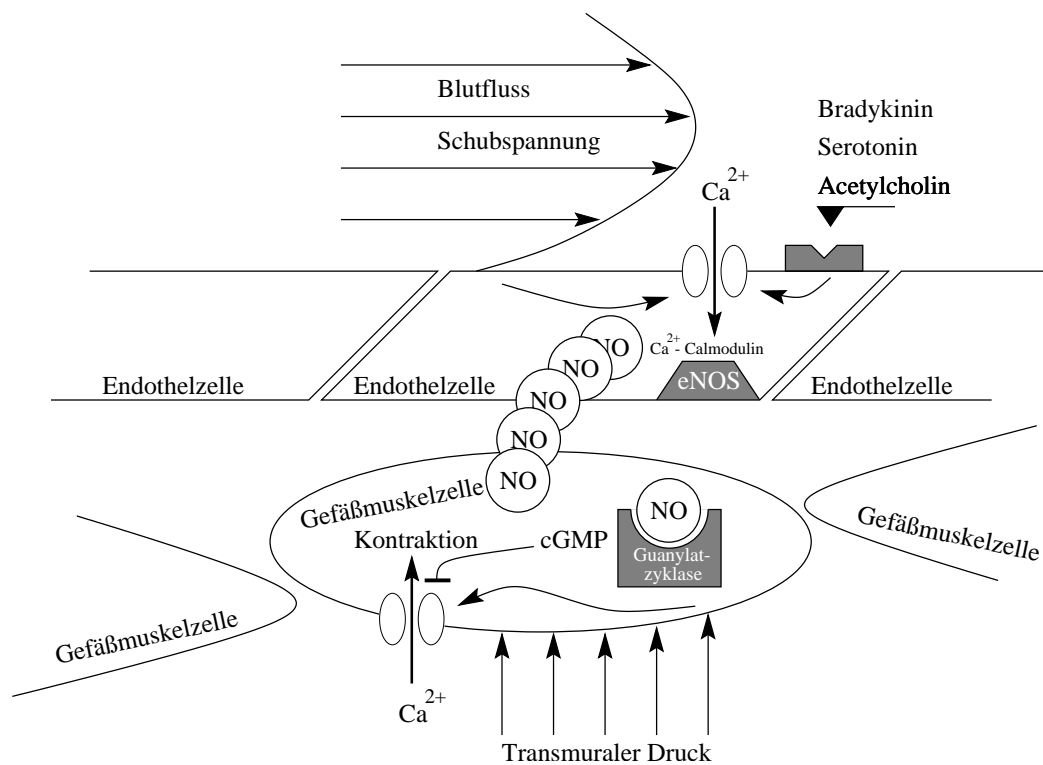


Abbildung 1.1: Prinzip der endothelialen NO-Freisetzung und -Wirkung.

Hemmung der Thrombozytenaktivierung [17].

Bei den weit verbreiteten Krankheiten Atherosklerose [42], Diabetes mellitus [40, 67] und Bluthochdruck [11, 54] oder Hypercholesterinämie [47, 56] finden sich Hinweise auf eine endotheliale Dysfunktion, welche mit einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO in Verbindung gebracht wird. Dieses Defizit an NO wird auf eine verstärkte Oxidation von NO zu Nitrit und Nitrat sowie auf eine verringerte NO-Produktion zurückgeführt [33].

Eine neuartige Möglichkeit zur Beantwortung der Fragestellung nach den Wirkungen von endothelial gebildetem NO bietet die gezielte Ausschaltung der Aktivität der eNOS auf genetischer Ebene. Dies konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen erreicht werden [29, 23]. Dabei wurde das native eNOS-Gen durch

homologe Rekombination mit einem Targeting Vector verändert und die für die  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert) (NADPH)-Ribose- und Adenin-Bindungsstellen kodierenden Exons entfernt. Damit wurde die Enzymaktivität zerstört. Bei der Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen die native Region konnte bei den eNOS-Null-Mutanten im Gegensatz zu Wildtyptieren keine Bande festgestellt werden. Die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation an Aortenringen fehlt bei den eNOS-knock-out-Mäusen. [29]

Diese genetisch veränderten Tiere sind lebensfähig, fertil und unterscheiden sich im Verhalten nicht von den Wildtyptieren. Sie zeigen jedoch einen erhöhten Blutdruck [29] und eine erhöhte Blutdruckvariabilität [63]. Dies unterstreicht die bedeutende Rolle des endothelial gebildeten NO für die Regulation des Blutdrucks.

Eine besondere Bedeutung kommt NO auch bei der thermoregulatorischen Vasodilatation der Hautgefäße zu. Als Mechanismus für diese Wirkung von NO wird eine Aktivierung der NOS über ein "Spill-over" von Acetylcholin von benachbarten sympathisch-cholinerg innervierten Schweißdrüsen angenommen.

Es ist deshalb zu erwarten, dass die eNOS-knock-out-Tiere eine verringerte oder ausbleibende Dilatation der Hautgefäße unter Hyperthermie aufweisen.

Diese thermoregulatorisch bedingte Vasodilatation der Hautgefäße führt zu einer Abnahme des totalen peripheren Widerstandes, welche wiederum einen Abfall des Blutdruckes bewirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Verlauf des Blutdruckes und der Herzfrequenz der eNOS-knock-out-Mäuse sowohl in Ruhe als auch während Hitzestress registriert.

Diese Thematik scheint besonders relevant in Hinblick auf die pathologisch verminderte NO-Produktion und NO-Verfügbarkeit bei Atherosklerose, essentieller Hypertonie und Diabetes mellitus. Die Untersuchung von eNOS-knock-out-Mäusen erlaubt diesbezüglich Rückschlüsse darauf, ob ein Organismus ohne

endotheliale Stickstoffmonoxidfreisetzung - als ein Modell der endothelialen Dysfunktion - in der Lage ist, auf Hitzestress mit einer adäquaten Thermoregulation zu reagieren.

### **1.3 Neuronale Stickstoffmonoxidsynthese**

Die neuronale NOS (nNOS) ist in verschiedenen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems lokalisiert [7] und erfüllt dort vielfältige Aufgaben. Neuronal gebildetes NO ist für die Morphogenese des Nervensystems, die synaptische Plastizität, das Lernen [26] und die Regulation des Tonus des Magen-Darm-Traktes bedeutend, außerdem erfüllt es die Funktion als Neuromodulator im autonomen Nervensystem [28].

Besonders die Effekte von neuronal gebildetem NO im peripheren sympathischen Nervensystem auf die Funktionen des kardiovaskulären Systems stehen im Vordergrund dieser Arbeit. Der periphere Sympathikus besteht aus präganglionären Neuronen des Rückenmarks, deren Axone mit den postganglionären Nervenzellen Synapsen bilden. Acetylcholin dient dabei als ganglionärer Transmitter. Diese postganglionären Neurone innervieren die Effektororgane, welche die vielfältigen Wirkungen des Sympathikus vermitteln.

Die Zellen des Nebennierenmarks sind entwicklungsgeschichtlich den postganglionären Nervenzellen homolog. Sie werden von präganglionären Neuronen des Thorakalmarkes innerviert (Transmitter Acetylcholin) und synthetisieren Katecholamine (80% Adrenalin und 20% Noradrenalin).

Die Noradrenalin- und Adrenalinfreisetzung aus dem Nebennierenmark sowie die Noradrenalinfreisetzung aus den Varikositäten der postganglionären sympathischen Nervenzellen werden nicht nur durch die übergeordneten Neurone reguliert, sondern auch durch lokale Mechanismen. So hemmen die Katecholamine ihre ei-

gene Freisetzung durch präsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren im Sinne einer Feedback-Hemmung. Aber auch Histamin, Acetylcholin oder Serotonin hemmen die Katecholaminfreisetzung. Eine solche Inhibition wird auch für NO diskutiert [58]. Ihm kommt somit möglicherweise eine wichtige Funktion als Modulator der Katecholaminfreisetzung zu.

In dieser Funktion scheint NO Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks und der Herzfrequenz zu haben. Die nNOS ist in über 90% der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes nachgewiesen worden und ist mit der GCs und der Tyrosinhydroxylase (TH) als Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese kolokalisiert [59]. Es konnte gezeigt werden, dass Acetylcholin die Bildung von NO in bovinen chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes erhöht und dies zu einer Aktivierung der GCs führt [52]. Diese stellt den Ausgangspunkt für multiple Signaltransduktionskaskaden dar, wobei an erster Stelle die Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen steht [71].

Die Substrate und damit die Wirkungen dieser Proteinkinasen sind vielfältig und zum Teil noch nicht vollständig verstanden. Für die Regulation der Katecholaminsynthese und -freisetzung werden unterschiedliche Wirkungsmechanismen postuliert. So wird eine Phosphorylierung von Calciumkanälen mit der Folge von verringertem Calciumkanal-Recruitment angenommen, wodurch es zu einer verringerten Katecholaminfreisetzung kommen würde [59].

Abbildung 1.2 skizziert die Wirkung der nNOS auf die Katecholaminfreisetzung. So führt die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Bildung von Calcium-Calmodulin-Komplexen, welche aktivierend auf die nNOS wirken. Diese katalysiert die Synthese von NO aus L-Arginin. NO stimuliert die GCs zur Produktion von cGMP, welches über verschiedene Zwischenschritte den Influx von Calcium über spannungsabhängige Calciumkanäle hemmt. Die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt weniger an, wodurch die Katecholaminfrei-

setzung abnimmt.

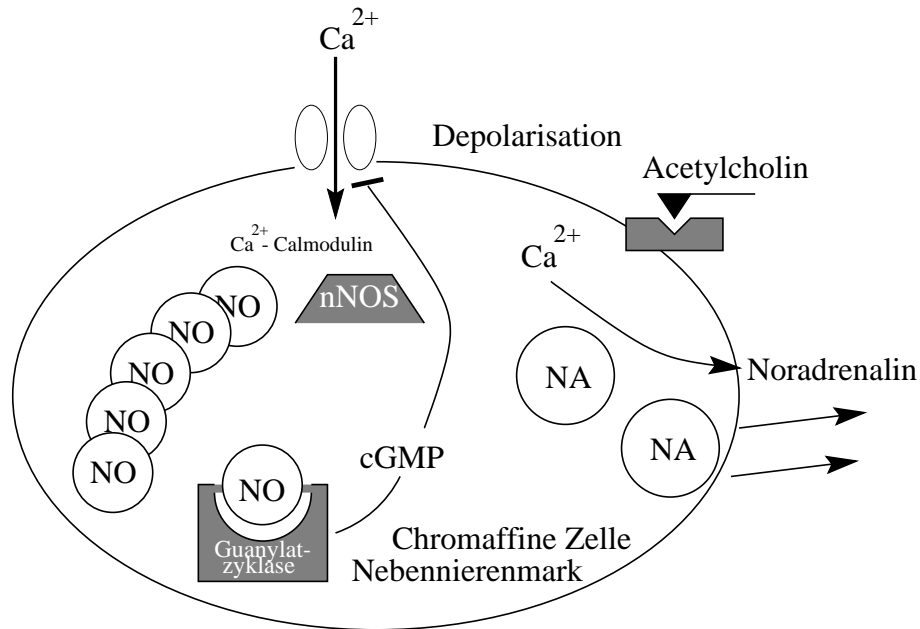


Abbildung 1.2: Prinzip der neuronalen NO-Freisetzung und -Wirkung.

Es konnte aber auch eine Phosphorylierung der TH durch eine cGMP-abhängige Proteinkinase gezeigt werden, was zu einer Aktivierung der TH und damit der Katecholaminsynthese führen würde [51]. Die Bedeutung der von NO ausgehenden verschiedensten Signaltransduktionskaskaden für die Katecholaminfreisetzung ist noch nicht hinreichend geklärt und vor allem der "Netto"-Effekt noch nicht abschließend verstanden.

Wie im Fall der eNOS bietet sich auch für die nNOS die Möglichkeit der Untersuchung seiner Wirkungen an Tieren, deren nNOS auf genetischer Ebene inaktiviert wurde, an. Auch hier wurde in einer embryonalen Stammzelllinie durch homologe Rekombination das erste Exon des nNOS-Genes durch ein Neomycin-resistenzgen ersetzt, und das nNOS Gen somit in seiner Integrität gestört. Die auf diesem Wege entstandenen homozygoten nNOS-knock-out-Mäuse zeigen ähnlich

der eNOS-knock-out-Tiere eine weitgehend normale Entwicklung [28].

Als Hinweis für den Wirkungsmechanismus von NO im Nebennierenmark kann die Beobachtung angesehen werden, dass Inhibitoren der NOS oder der GCs zu einer verstärkten acetylcholininduzierten Katecholaminfreisetzung aus den chromaffinen Nebennierenmarkszellen führen [59]. Mit der Verfügbarkeit der nNOS-knock-out-Mäuse besteht die einzigartige Möglichkeit, spezifisch die Funktion der nNOS für die Katecholaminfreisetzung zu untersuchen.

Eine erhöhte Katecholaminfreisetzung bei fehlender nNOS-Aktivität sollte mit einer Erhöhung des Blutdruckes dieser nNOS-knock-out-Mäuse im Vergleich zu Wildtypkontrollen einhergehen. Allerdings zeigen Messungen an anästhesierten nNOS-knock-out-Mäusen einen im Vergleich zu Wildtyptieren unveränderten oder sogar reduzierten Blutdruck [35, 70].

Da neben dem neuronal gebildeten NO aber auch andere Mechanismen an der Regulation des Blutdruckes beteiligt sind, wird die Rolle des neuronal gebildeten NO vor allem unter Basalbedingungen möglicherweise durch diese anderen kompensatorisch wirkenden Mechanismen maskiert. Die beobachtete Erniedrigung des arteriellen Blutdruckes der nNOS-knock-out-Mäuse in Narkose könnte auf ein Überwiegen der Kompensationsmechanismen bei nur geringer Aktivität des sympathischen Nervensystems in Narkose zurückgeführt werden. Auch besteht die Möglichkeit, dass das Narkosemedikament selbst einen wichtigen Einfluss auf den Blutdruck hat. Es ist deshalb besonders wichtig, den Blutdruck der nNOS-knock-out-Mäuse im wachen Zustand zu untersuchen.

Die Hypothese, dass neuronal gebildetes NO die Katecholaminsynthese und -freisetzung hemmt, könnte bei nNOS-knock-out-Mäusen mit einer verstärkten Reaktion des kardiovaskulären Systems bei sympathischer Aktivierung einhergehen. Deshalb sollen die Auswirkungen des Fehlens von neuronal gebildetem NO nicht nur unter Basalbedingungen sondern auch unter Belastung untersucht wer-

den. Dabei wird die Hypothese überprüft, dass während starker Aktivierung des Sympathikus die kompensatorischen Regulationsmechanismen nicht mehr ausreichen, das Fehlen von neuronal gebildetem NO zu maskieren. Der Defekt des nNOS-Genes sollte also besonders während Stresssituationen in Erscheinung treten.

Als Mechanismus wird eine Hemmung der Katecholaminfreisetzung durch neuronal gebildetes NO angenommen. Bei den nNOS-knock-out-Mäusen müsste es also unter Stressbelastung zu einer verstärkten Katecholaminfreisetzung kommen. Inwieweit neuronal gebildetes NO außerdem Auswirkungen auf die Expression der TH als geschwindigkeitsbestimmendes Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese [19] hat, ist ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

Die Untersuchung des Blutdruckes und der Herzfrequenz der nNOS-knock-out-Mäuse während Stressapplikation scheint besonders relevant als Zeichen für die Fähigkeit dieser nNOS-defizienten Tiere, auf eine sympathische Aktivierung mit einer adäquaten Kreislaufumstellung zu reagieren.

Zur Beurteilung der Wirkung von neuronal gebildetem NO auf die Katecholaminfreisetzung und -synthese wird die Expression der TH im Nebennierenmark auf mRNA-Ebene mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und auf Proteinebene mittels Western Blot bei nNOS-knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Tieren untersucht. Dabei wird von der Beobachtung ausgegangen, dass die Expression der TH mit ihrer Aktivität korreliert und mit dem Plasmaspiegel der Katecholamine in direkter Beziehung steht [46].

## 1.4 Fragestellungen und Hypothesen

Fragestellungen:

- Sind wache nNOS-knock-out-Mäuse - im Gegensatz zu narkotisierten Tieren - hypertensiv?
- Welchen Einfluß hat NO auf die Modulation von Kreislaufgrößen unter Stress?
- Welche spezifische Bedeutung kommt der endothelialen und der neuronalen Isoform der NOS zu?
- Kommt es beim Fehlen der nNOS zu einer verstärkten Expression der TH?

Hypothesen:

- Neuronal gebildetes NO hemmt die Expression der TH und die Katecholaminfreisetzung.
- Endothelial gebildetes NO ist an der Vasodilatation der Hautgefäße unter thermischer Belastung beteiligt.

## 1.5 Experimentelle Überlegungen

Die direkte Messung des arteriellen Blutdruckes mittels eines arteriellen Katheters stellt sich als eine genaue und reproduzierbare Methode für die Beurteilung des Blutdruckes und der Herzfrequenz der Maus dar. Dabei ist die Messung an wachen Tieren besonders aussagekräftig, da Einflüsse durch das Narkosemittel ausgeschlossen werden können. Speziell die Regulation der Durchblutung der verschiedenen Organsysteme, insbesondere der Haut, kann von Narkosemedikamenten stark beeinflusst werden. Der muskelrelaxierende Effekt des Narkotikums

würde außerdem zu einer Verfälschung der Reaktionen im Hitzestressexperiment führen.

Zur sympathischen Aktivierung wird Hitzestress eingesetzt. Hierbei wird die Umgebungstemperatur von Raumtemperatur langsam über 45 Minuten auf etwa 36°C erhöht, so dass auch die Körperkerntemperatur langsam Werte bis 42,5°C erreicht. Im Verlaufe des Hitzestresses steigt also die Stressintensität allmählich an und erreicht gegen Ende des Protokolls ein Maximum.

Bei den nNOS-knock-out-Mäusen wird zusätzlich Airjetstress eingesetzt. Dieses Stressmodell unterscheidet sich vom Hitzestress durch das rasche und intensive Einsetzen des Stresses, der im Verlauf der Beobachtungsperiode allmählich wieder abnimmt.

Für die Frage nach der Bedeutung der eNOS und nNOS für die Kreislaufregulation sind deshalb kontinuierliche direkte Messungen des arteriellen Blutdruckes und der Herzfrequenz an wachen Tieren unter Ruhe- und Stressbedingungen als besonders aussagekräftig anzusehen.

# Kapitel 2

## Methoden

### 2.1 Tiere

#### 2.1.1 Tierstämme

Für die Versuche wurden knock-out-Mäuse und WT-Mäuse eingesetzt. Die WT-Mäuse wurden von Charles River Deutschland, Sulzfeld bezogen. Es wurden Zuchtpaare von homozygoten eNOS-knock-out-Mäusen (C57Bl6J-*NOS3<sup>tm1Unc</sup>*) [29] und von homozygoten nNOS-knock-out-Mäusen (B6;129-*NOS1<sup>tm1Plh</sup>*) [28] bei Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA bestellt und in der Zentralen Versuchstierhaltung der Charité gezüchtet (IVC-Regal = individually ventilated cages). Das mittlere Gewicht dieser Tiere betrug  $27,4 \pm 1,8$  g (eNOS) und  $22,4 \pm 0,7$  g (nNOS) und war nicht signifikant unterschiedlich von den WT-Mäusen.

Für die hämodynamischen Versuche wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet.

## **2.1.2 Tierhaltung**

Alle Tiere wurden von Tierpflegern und Tierärzten in der Zentralen Versuchstierhaltung der Charité bis kurz vor dem Versuch betreut. Sie wurden in Macro-lonkäfigen (je nach Belegung Typ II oder III) mit Einstreu (Weichholzgranulat, Altromin, Lage-Lippe) gehalten. Im Drahtdeckel der Käfige waren die Futterraufe mit dem handelsüblichen Standardfutter (Altromin) in pelletierter Form und die Trinkflasche mit Wasser zur freien Verfügung der Mäuse untergebracht. Es wurde ein Hell- Dunkelrhythmus von jeweils zwölf Stunden eingehalten.

Am Morgen der Operation wurde das jeweilige Tier einzeln in einen Käfig gesetzt und in das Labor gebracht. Nach der Operation kam die Maus in denselben Käfig zurück und hatte 24 Stunden Zeit zur Erholung bei freiem Zugang zu Wasser und Futter.

## **2.2 Hämodynamische Methoden**

### **2.2.1 Herstellung des arteriellen Gefäßkatheters**

Da die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse mit einem Gewicht von ca. 20 bis 30 g einen entsprechend kleinen Femoralarteriendurchmesser aufwiesen, mussten geeignete Katheter mit derart geringem Durchmesser selbst hergestellt werden.

Als Kathetermaterial wurde Polythene Tubing in zwei verschiedenen Größen: #1 Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm (Ref. 800/110/100) #2 Innendurchmesser 0,40 mm, Außendurchmesser 0,80 mm (Ref. 800/110/140) der Firma Portex Limited, Hythe, Kent, England verwendet.

Der 0,28/0,61 mm-Katheter wurde in ca. 3 cm lange Stücke geschnitten und in einem Abstand von 1 cm zwischen zwei Klemmen festgehalten. Unter gleichmäßigem, vorsichtigem Zug wurde nun das 1 cm lange Teilstück auf 3 cm

langgezogen. Als Orientierungshilfe diente ein Lineal. Unter Beibehaltung der neuen Länge wurde der Katheter in heißes (ca 80°C) und sofort danach in eiskaltes Wasser getaucht, somit konnte die neue Form permanent erhalten werden. Nur das langgezogene Zwischenstück wurde weiterverwendet, die Enden abgeschnitten.

Um eine bessere Übertragung des Blutdrucksignals zu erreichen und den Druckabfall im Katheter so gering wie möglich zu halten, musste das sehr dünne Stück an ein zweites mit einem größeren Innendurchmesser geschweißt werden. Dazu wurden jeweils 15 cm lange Stücke des 0,40/0,80 mm-Katheters verwendet. Eines der sauber abgeschnittenen langgezogenen Katheterstückchen wurde unter dem Stereomikroskop auf einen Draht aufgefädelt, auf dessen freien Ende der dickere Katheter ebenfalls aufgeschoben wurde, so dass sich die beiden Katheter unterschiedlichen Durchmessers direkt berührten. Ebenfalls unter dem Mikroskop mussten beide Stücke unter Verwendung eines Lötkolbens geschmolzen und gleichzeitig mit einer leichten Drehbewegung aufeinander zugeschoben werden. Damit erreichte man die Verschmelzung beider Stücke unter Beibehaltung eines durchgängigen Lumens.

An den dickeren Teil des Katheters wurde nun vorsichtig eine Kanüle mit einer mit isotoner Natriumchloridlösung gefüllten Spritze aufgesetzt und die Lösung aus der Spritze rasch durch den Katheter gedrückt. War die Verbindung der beiden Katheterstücke dicht und gut durchgängig, konnte man die Lösung leicht durchspritzen, ohne dass die Flüssigkeit irgendwo an der Verbindungsstelle austrat. War dies nicht der Fall, wurden beide Stücke wieder getrennt und erneut verschweißt.

Die geprüften Katheter mussten den anatomischen Verhältnissen in der Leistenbeuge angepasst werden, indem die Katheterspitze in einen Winkel von ca. 30° zum Rest des Katheters gebracht wurde. Dazu fasste man den Katheter an der Verbindungsstelle und bog ihn vorsichtig in die gewünschte Stellung. Die

Form des Katheters wurde unter Anwendung von heißem und eiskaltem Wasser fixiert. Die Spitze des Katheters musste nun noch auf die richtige Länge gekürzt werden. Diese lag zwischen 5 und 7 mm, je nach Größe der Maus, und wurde erst kurz vor der Operation festgelegt. Beim Abschneiden musste die Spitze geringfügig angespitzt werden, um das Einführen in die Arterie zu erleichtern.

### **2.2.2 Implantation des arteriellen Gefäßkatheters**

Am Morgen wurden die Tiere gewogen und die entsprechende Menge Chloralhydratlösung 4 % in 0,9 % Natriumchloridlösung (40 g Chloralhydrat (Sigma) und 9 g Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe) auf 1 l Aqua bidest) auf eine Spritze (OmniFix -F 1 ml mit einer 24G Kanüle, Sterican, B. Braun, Melsungen) aufgezogen (1 ml/100 g Körpergewicht) und intraperitoneal injiziert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums der Narkose wurde die Haut der rechten Leiste sowie des Nackens rasiert und mit 70 % Ethanollösung (Roth, Karlsruhe) desinfiziert. Das Tier wurde auf dem OP-Tisch mit Klebestreifen (Leukosilk S, Beiersdorf) fixiert, die hinteren Extremitäten in Abduktionsstellung. Durch Palpation der Leiste wurde die Stelle für den Hautschnitt aufgesucht, und die Haut mit einer Schere (BC20, Aesculap) ca. 1 cm eröffnet.

Beim Blick durch das Operationsmikroskop (Leica MZ6) zeigten sich von lateral nach medial der Nervus femoralis, die Arteria femoralis und die Vena femoralis. Die Arterie und Vene wurden durch vorsichtige Präparation freigelegt und stumpf voneinander getrennt. Dabei musste besonders auf die leichte Verletzbarkeit der Vene und kleinerer Gefäßabgänge geachtet werden.

Die Arterie wurde distal mit einem Faden (Ethibond 6/0, Ethicon) ligiert und danach proximal mit einem weiteren Ethibond-Faden unterschlungen. Die Arterie konnte mit Hilfe der beiden Fäden so aufgespannt werden, dass sie durch den Blutstau prall gefüllt war (Abbildung 2.1).



Abbildung 2.1: Arteria femoralis freipräpariert und mit zwei Fäden gespannt.

Mit Hilfe einer Federschere (OC498, Aesculap) wurde sie in der Mitte zwischen den beiden Haltefäden angeschnitten und der Katheter konnte mit einer speziell hergestellten Katheterpinzette (modifizierte BD313R, Aesculap) in das Lumen der Arterie eingeführt und vorsichtig bis zum Schweißpunkt am Katheter vorgeschoben werden (Abbildung 2.2).

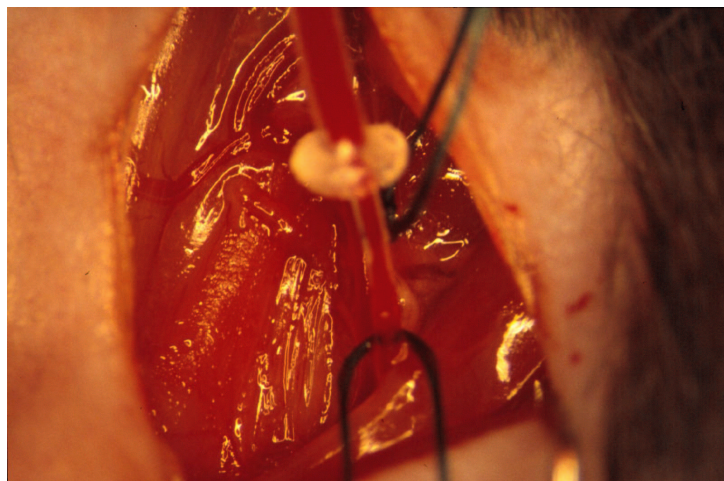


Abbildung 2.2: Katheter in der Arteria femoralis.

Der Katheter war mit heparinierter Kochsalzlösung (5 ml Heparin-Natrium-25000 I.E., Ratiopharm auf 1 l 0,9% Kochsalzlösung) luftfrei gefüllt und durch eine Spritze am distalen Katheterende verschlossen. Die korrekte intraarterielle Lage des Katheters konnte am Pulsieren der Blutsäule im Katheter beurteilt werden. Dieser wurde dann mit den beiden Fäden an der Arterie fixiert.

Das Tier wurde nun in Bauchlage gebracht und ein Hautschnitt am Nacken durchgeführt. Eine Arterienklemme (BH111R, Aesculap) wurde durch den Nackenschnitt subkutan vorsichtig bis zum Leistenschnitt vorgeschoben und mit ihr der Katheter am distalen Ende gefasst, die Spritze entfernt und das Katheterende subkutan zum Nacken geführt. Dieses Ende wurde nun an der Nackenhaut mit Histoacryl Gewebekleber (B. Braun) fixiert und in ca. 2 cm Entfernung von der Austrittsstelle abgeschitten und mit einer Flamme (Feuerzeug) zugeschweißt.

Wieder in Rückenlage, wurde der Hautschnitt in der Leiste zugenäht (Faden: Ethibond Excel 4/0, Ethicon). Die Maus wurde anschließend in ihren Käfig gelegt und bis zum Erwachen aus der Narkose kontinuierlich überwacht.

### **2.2.3 Herstellung der rektalen Thermosonde**

Für die Messung der Körperkerntemperatur während des Hitzestressexperiments wurde eine Thermosonde verwendet. Da für Mäuse keine solche käuflich zu erwerben war, musste die Thermosonde selbst zusammengebaut werden.

Dazu wurde ein Glasperlenthermistor (SP43A503-20, 50 k $\Omega$  bei 25°C, Wuntronic Mess- Steuer- und Regeltechnik, München) an ein Verbindungskabel gelötet, die Thermistoranschlussdrähte wurden dabei mit je einem Polythenschlauch #1 isoliert und von einem Schrumpfschlauch (Conrad Elektronik) ummantelt.

Diese Thermosonde wurde über das Verbindungskabel an einen Messverstärker angeschlossen und die Temperatur konnte kontinuierlich

mit der Software XmAD (<ftp://sunsite.unc.edu/pub/Linux/science/lab>) angezeigt werden. Das Messsystem wurde in einem Wasserbad mit einem Quecksilberlaborthermometer geeicht.

#### **2.2.4 Aufbau des hämodynamischen Messplatzes**

Die Messung des arteriellen Blutdruckes erfolgte direkt mit Hilfe des Katheters in der Arteria femoralis. Dies beinhaltet - gegenüber indirekten Methoden der Blutdruckmessung (wie zum Beispiel der Plethysmographie) den besonderen Vorteil einer sehr genauen und hochauflösenden Messung (Abtastrate 1000 pro Sekunde).

Das Katheterende am Nacken der Maus wurde mit Hilfe einer auf beiden Seiten stumpfen Kanüle (24G) mit einem weiteren Polythene #2 Schlauch verbunden, der seinerseits mit dem Druckwandler (Pressure Transducer DTX Plus, Ohmeda Inc) in Verbindung stand. Dieser Druckwandler befand sich auf Herzniveau. Die Maus wurde dazu vorsichtig von einer Person mit einem Handtuch gehalten, während die andere Person den Katheter abklemmte, das zugeschweißte Ende abschnitt und die Kanüle in den Katheter vorschob. Der Schlauch wurde oben aus dem Käfig geführt und hatte eine Länge von 50 cm, er erlaubte also der Maus, sich während des gesamten Experimentes frei im Käfig zu bewegen.

Der Druckwandler war an den Brückenverstärker (Pressure Processor, Gould 4600 Series, Gould Instrument Systems Inc) angeschlossen, dessen Signal mit Hilfe der frei verfügbaren Software XmAD aufgezeichnet werden konnte. Es wurde das Blutdrucksignal mit einer Abtastrate (sampling rate) von 1000 pro Sekunde kontinuierlich während des gesamten Experimentes aufgezeichnet. Die Herzfrequenz wurde on-line aus dem Blutdrucksignal berechnet.

Vor Beginn jeder Messung wurde das System mittels eines amtlich geeichten Manometers (Boso) kalibriert.

### **2.2.5 Hitzestress**

Das Hitzestressexperiment wurde mit WT- (n=9), eNOS-knock-out- (n=9) und nNOS-knock-out-Mäusen (n=8) durchgeführt.

Nachdem die Maus wie oben beschrieben an das Messsystem angeschlossen worden war, musste für diesen Versuch zur Registrierung der Körperkerntemperatur außerdem noch eine rektale Thermosonde appliziert werden. Dazu wurde die Thermosonde mit etwas Vaseline (MainoPharm) bestrichen, rektal eingeführt und 1,5 cm vorgeschoben. Die Thermosonde wurde mit Klebestreifen (Leukoplast, Beiersdorf) an der Schwanzwurzel des Tieres fixiert und das Kabel durch eine kleine Öffnung am Boden des Käfigs herausgeführt. Dadurch konnte verhindert werden, dass sich der Blutdruckkatheter und das Thermosondenkabel umeinanderwickeln.

Für die Registrierung der Ruheperiode musste solange gewartet werden, bis sich die Maus für mindestens 5 Minuten ruhig verhielt, sich also nicht putzte oder fortbewegte. Dazu waren Wartezeiten von bis zu zwei Stunden und mehr notwendig. Die Ruheherzfrequenz des Tieres lag dabei um 600 Schläge pro Minute (bpm).

Nach der Aufzeichnung der Ruheperiode wurde eine Infrarot-Wärmelampe (150 Watt, 1 Ampere, Phillips) im Abstand von 50 cm über dem offenen Käfig zunächst mit 180 Volt Betriebsspannung und nach 30 min mit 220 Volt Betriebsspannung betrieben. Dies erlaubte eine langsame Erwärmung der Maus. Der Blutdruck, die daraus errechnete Herzfrequenz und die Körperkerntemperatur wurden mit dem XmAD Programm fortlaufend angezeigt und aufgezeichnet. Bei Erreichen einer Körperkerntemperatur von 42,5°C wurde der Versuch abgebrochen und die Tiere durch zervikale Translokation getötet.

### **2.2.6 Airjetstress**

Aufgrund der Ergebnisse der Messungen beim Hitzestressprotokoll wurde zusätzlich das Airjetprotokoll geplant und durchgeführt. Dabei wurden nNOS-knock-out-Mäuse (n=5) mit WT-Mäusen (n=9) verglichen.

Bei diesem Experiment wurde die Maus gleichfalls an das beschriebene Messsystem angeschlossen, jedoch ohne rektale Thermosonde. Auch hier wurde wie beim Hitzestressexperiment mit der Ruheperiode begonnen, wobei wieder bis zu zwei Stunden auf einen fünfminütigen Ruhezeitraum gewartet werden musste. Auch hier wurden Blutdruck und Herzfrequenz mit dem XmAD Programm aufgezeichnet.

Sobald diese Ruheperiode aufgezeichnet worden war, konnte mit der Stressapplikation des Airjetstresses begonnen werden. Dazu wurde eine Düse mit einem kontinuierlichen Luftstrom (100 ml/s) aus ca. 5 cm Entfernung auf den Nacken der Maus gerichtet. Die Düse wurde manuell mit der Maus mitbewegt. Die Maus adaptierte sich im Verlauf des Experiments rasch an die Irritation durch den Luftstrom und kam in der Regel nach etwa fünf Minuten zur Ruhe. Blutdruck und Herzfrequenz wurden vom Ansetzen des Luftstromes an für weitere 25 Minuten lang aufgezeichnet. Danach wurde das Experiment beendet.

## **2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden**

Für die Beurteilung des Einflusses von Stickstoffmonoxid auf die Katecholaminsynthese wurde das Enzym TH als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Katecholaminsynthese näher untersucht.

Es wurden Analysen auf mRNA-Ebene (RT-PCR) und Proteinebene (We-

stern Blot) durchgeführt. Dabei wurden die nNOS-knock-out-Mäuse mit den WT-Tieren verglichen.

Die Nebennieren von nativen WT-Mäusen und nNOS-knock-out-Mäusen wurden entnommen und sofort mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden von einem Tier jeweils eine Nebenniere für die RT-PCR und eine für den Western Blot genutzt.

### **2.3.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **Probenaufbereitung**

Zur Isolierung der RNA wurden die tiefgefrorenen Nebennieren in einem von flüssigem Stickstoff umspülten Eppendorfgefäß mit einem Mörser (Mikrohomo-genisator - konisch, Roth) mechanisch zerkleinert und sofort mit 500  $\mu$ l TRIzol (GibcoBRL) aufgefüllt.

TRIzol enthält Guanidiniumisothiozyanat und Phenol. Guanidiniumisothiozyanat ist ein starkes Denaturierungsmittel und führt zur Inaktivierung zellulärer RNAsen und Isolierung intakter RNA. Phenol dient der Entfernung von Proteinen aus der Nukleinsäurelösung. Es bildet Wasserstoffbrücken und zeigt außerdem hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten. Es dissoziiert Protein-Nukleinsäure-Komplexe und führt zur Denaturierung und Anreicherung der Proteine in der Phenolphase.

Es wurde weiterhin 100  $\mu$ l Chloroform (Roth) dazugegeben, die Mischung gut geschüttelt und bei 15000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC5B Plus, DuPont). Chloroform führt ebenfalls zur Proteindenaturierung und erleichtert die Phasentrennung. Somit trennte sich die Mischung in eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere farblose wässrige Phase, in welcher sich die RNA befand.

Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die RNA konnte dann mit Hilfe von 250  $\mu\text{l}$  100%igem Isopropylalkohol (Roth) aus der wässrigen Phase präzipitiert werden. Diese Mischung wurde wieder bei 4°C und 15000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, danach war die RNA als Pellet am seitlichen Boden des Eppendorfgefäßes sichtbar. Der Isopropylalkohol wurde abgegossen, das RNA-Pellet mit 500  $\mu\text{l}$  70% Ethanol (Roth) gewaschen und nochmals bei 4°C und 15000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgegossen und das Eppendorfgefäß mit dem RNA-Pellet kurz an der Raumluft getrocknet. RNase-freies Wasser (mit Diethylpyrocarbonat versetztes und autoklaviertes Wasser) wurde zum Pellet gegeben.

### **RNA-Bestimmung**

Die Konzentration an RNA in der Probenlösung wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt. Nukleinsäuren zeigen eine Absorption von UV-Licht dieser Wellenlänge. Es gilt, dass eine Nukleinsäurenlösung mit 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eine Absorption von eins bei 260 nm aufweist. Zusätzlich dazu wurde die Absorption der Probenlösungen bei 280 nm gemessen, und ein Absorptionsquotient  $A_{260}/A_{280}$  gebildet. Für diesen Quotienten wurde bei allen Proben der Zielwert von  $<0,5$  unterschritten; dieser Wert stellt ein Maß für eine eventuelle Verunreinigung durch Proteine dar.

Nach Abgleich mit DEPC-Wasser wurde 1  $\mu\text{l}$  Probe 1:100 in DEPC-Wasser verdünnt mit dem Beckmann-Photometer DU 640 in einer Microküvette gemessen und danach die für ein  $\mu\text{g}$  reiner RNA notwendige Menge an RNA-Lösung errechnet.

## **Reverse-Transkriptase-Reaktion**

Zur Vervielfachung der RNA ist es notwendig, die RNA in DNA umzuschreiben. Dies wird durch das Enzym Reverse Transkriptase erreicht. Hierbei dient RNA als Matrize für die cDNA-Erststrangsynthese. Durch die Wahl eines Oligo(dT)-Primers, welcher an den Poly(A)-Schwanz am 3'Ende eukaryotischer mRNA hybridisiert, erfolgt die selektive Umschreibung der mRNA-Moleküle (2-4% der Gesamt-RNA) in cDNA.

Die RNA-Lösungen wurden mit 0,5  $\mu$ l Oligo-(dT)-Primer (Life Technologies) vermischt und mit DEPC-Wasser auf 6  $\mu$ l aufgefüllt. Diese Proben wurden in einen Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) gestellt und auf 72°C erwärmt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Es wurden 3,5  $\mu$ l einer Mischung aus 2  $\mu$ l RT-Puffer (Life Technologies), 1  $\mu$ l 0,1 M Dithiothreitol und 0,5  $\mu$ l dNTPs (eine Mischung aller Desoxinukleotidtriphosphate: dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Roth, Karlsruhe) zu den Proben gegeben. Bei 42°C wurde schließlich 0,5  $\mu$ l Reverse Transkriptase (Superscript II, Life Technologies) hinzugegeben und die mRNA konnte in cDNA umgeschrieben werden. Im Anschluss wurde die Reverse Transkriptase 15 min bei 72°C inaktiviert.

## **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die entstandene cDNA (RT-Produkt) wird als Ausgangspunkt für die PCR genutzt. Dieses auf Mullis [55] zurückgehende Verfahren beruht auf einer Amplifikation der nachzuweisenden DNA. Die gesuchte cDNA kann durch einen spezifischen Primer erkannt und mit der Taq-Polymerase (eine thermostabile DNA-Polymerase des *Thermophilus aquaticus*) amplifiziert werden. Bei 30 Zyklen kann im Idealfall eine milliardenfache Vermehrung der gewünschten cDNA erreicht werden. Um die Applifikationseffizienz beurteilen zu können, wird neben der gesuchten cDNA auch die cDNA des im Gewebe sehr gleichmäßig transkribierten

und exprimierten  $\beta$ -Actins im gleichen Ansatz amplifiziert.

- TH-Primer: 5'-AAGAGCCGTCTCAGAGCAGGA-3' (forward), 5'-ACTGCGCACATCGTCAGACAC-3' (reverse)
- $\beta$ -Actin-Primer: 5'-AACTGCAGAGGACTCCTATGTGGGTGACG-3' (forward), 5'-CGGGATCCGATGGCTACGTACATGGCTGG-3' (reverse)

Dazu wurden 2  $\mu$ l RT-Produkt mit einem Mastermix PCR, welcher unter anderem die Taq-Polymerase und die beiden Primer enthielt, angesetzt und im Thermocycler mit dem PCR-Programm ( Denaturierung 3 min bei 94°C, 29 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Annealing bei 58°C und 30 s Elongation bei 72°C, sowie zum Abschluss 10 min bei 72°C Inaktivierung der Taq-Polymerase) inkubiert.

Mastermix PCR	
10*Puffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2 $\mu$ l
dNTP's 10 mM Roth	1 $\mu$ l
Aqua bidest	37,5 $\mu$ l
TH-Primer	1 $\mu$ l
$\beta$ -Actin-Primer	1 $\mu$ l
Taq Polymerase	0,5 $\mu$ l

### **Agarosegelelektrophorese**

Das Prinzip der Auftrennung der PCR-Produkte ist die kontinuierliche Zonenelektrophorese in einem horizontalen Flachbettagarosegel. Agarose ist ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen, welches sich beim Erhitzen löst und beim Abkühlen Bündel doppelhelikaler Strukturen bildet. Es entsteht ein dreidimensionales Netzwerk mit je nach Agarosekonzentration unterschiedlicher Porengröße.

Die DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld zur Anode, ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist hierbei umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Dem Agarosegel wird Ethidiumbromid beigemischt. Ethidiumbromid intercaliert zwischen die Basenpaare der DNA und fluoresziert in diesem Zustand stark, so dass bei UV-Anregung (302nm) eine Fluoreszenzemission im rot-orangen Bereich des sichtbaren Lichtes (509 nm) erfolgt.

Für die Elektrophorese wurde ein 0,8% Agarosegel mit Ethidiumbromid hergestellt und die Flachbettelektrophoresekammer von BioRad verwendet.

---

Agarosegel (0,8%)
0,8% Agarose
0,01% Ethidiumbromid (10 mg/ml)
Elektrophoresepuffer
Elektrophoresepuffer (TBE)
45 mM Tris
44 mM Borsäure
10 mM EDTA (pH=8,0)
Aqua bidest

---

Je 20  $\mu$ l des PCR-Produktes wurden mit 5  $\mu$ l DNA-Ladepuffer vermischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Marker wurde ein 100-Basenpaar-Marker (100bp DNA Ladder, GibcoBRL) verwendet und ebenfalls aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 90 Volt 45 Minuten durchgeführt.

---

DNA-Ladepuffer
0,25% Bromophenolblau
30% Glyzerol
Aqua bidest

---

Durch diese elektrophoretische Auftrennung konnten  $\beta$ -Actin-cDNA und TH-cDNA eindeutig unterschieden werden. Unter UV-Licht konnten die Banden sichtbar gemacht und mit einer Kamera aufgenommen werden. Das Gel mit den durch UV-Licht sichtbaren Banden konnte mit Hilfe eines Kamerasystems (Polaroid GDS System) aufgenommen und im Computer gespeichert werden.

### 2.3.2 Biochemische Methoden

Die Bestimmung der TH wurde nicht nur auf Ebene der mRNA sondern auch auf Proteinebene durchgeführt. Dazu wurde das Western Blotting angewendet. Hier wurden wie bei der RT-PCR die Nebennieren als ein wichtiges Organ für die Katecholaminsynthese untersucht.

#### Probenaufbereitung

Die Nebennieren wurden im tiefgefrorenen Zustand in flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert (Mörser) und mit 200  $\mu$ l Probenpuffer - zum Zellaufschluss und Proteinschutz - versetzt.  $\beta$ -Mercaptoethanol verhindert dabei die Oxidation von Thiolgruppen und damit eine artifizielle Aggregation von Proteinen.

Probenpuffer	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,0ml
Glycerol	1,6ml
10% SDS	3,2ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,8ml

0,5 M Tris HCL	1 l
Tris (Hydroximethylaminomethan)	60,57 g
pH einstellen mit HCl auf 6,8	

10% SDS	1 l
SDS (Natriumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat)	100 g

### **Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde die spektrophotometrische Messung der Absorption der Proteinlösung bei 280 nm angewandt. Dieses Verfahren beruht auf einer direkten Lichtabsorption aromatischer Aminosäuren (Tryptophan und Tyrosin) im nahen UV-Bereich. Eine optische Dichte (OD) von eins wird einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml gleichgesetzt.

Es wurde das Photometer DU 640 von Beckmann eingesetzt. Nach Abgleich mit dem Probenpuffer wurden je 2  $\mu$ l Proteinlösung 1:50 mit Aqua bidest verdünnt und in einer Microküvette gemessen.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Das Prinzip der Auftrennung der Proteine ist hier die diskontinuierliche SDS-PAGE modifiziert nach Laemmli (1970). Dabei werden die Proteine einem elektrischen Feld ausgesetzt und legen durch ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit verschiedene Distanzen im Gel zurück. Das anionische Detergenz SDS führt zu einer Auffaltung der Proteine und einer Vereinheitlichung ihrer Ladung. Zur Aufspaltung der Disulfidbrücken wird  $\beta$ -Mercaptoethanol eingesetzt. Die so entfalten und gleichmäßig geladenen Proteine wandern nun nur noch abhängig von ihrem Molekulargewicht. Die Wahl der Acrylamid/Bisacrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße des Gels. Als Crosslinker und Reaktionsstarter dienen Ammoniumpersulfat und TEMED.

Das Elektrophoresesystem arbeitet nach folgendem Prinzip:

**Gelaufteilung** In der Elektrophoresekammer sind zwei verschiedene Gele

übereinander angeordnet. Das Sammelgel ist hierbei über das Trenngel geschichtet, so daß die Proben zuerst das Sammelgel und dann das Trenngel durchlaufen.

**Probe, Sammel- und Trenngel** enthalten Chloridionen, während der Laufpuffer Glycinionen enthält.

**Sammelgel** Bei einem pH-Wert von 6,8 liegt Glycin als Zwitterion vor. Es entsteht deshalb ein Spannungsgradient zwischen den schnell wandernden Clorid-Ionen und den nur sehr langsam wandernden Glyzinzwitterionen als Folgeionen. Die Proteine können sich in dem starken lokalen elektrischen Feld relativ ungehindert bewegen, die Poren des Sammelgels sind groß (Polyacrylamidkonzentration 4,5%). Hier kommt es zu einer Konzentration der Proteine zwischen den Leit- und Folgeionen.

Sammelgel (4,5%)	
0,5M Tris-HCl pH 6,8	2,0ml
Aqua bidest	4,7ml
Acrylamid-Bisacrylamidstammlösung 30% (29:1)	1,4ml
Ammoniumperoxodisulfat 10% in Aqua bid.	75µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10µl

**Trenngel** Nach Erreichen des Trenngels (pH 8,8) wird Glycin wieder in den geladenen Zustand versetzt und der Ionenmangel ausgeglichen. Die Spannung ist über den gesamten Bereich des Trenngels gleich. Die Poren des Trenngels sind engmaschiger (Polyacrylamidkonzentration 7,5%), es kommt zu einer Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Trenngel (7,5%)	
1,5M Tris-HCl pH 8,8	4,7ml
Aqua bidest	9,3ml
Acrylamid-Bisacrylamidstammlösung 30% (29:1)	4,7ml
Ammoniumperoxodisulfat 10% in Aqua bid.	150 $\mu$ l
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 $\mu$ l
<hr/>	
1,5 M Tris-HCl	1 l
<hr/>	
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	181,71 g
pH einstellen mit HCl auf 8,8	
<hr/>	
Laufpuffer (pH 8,8)	
<hr/>	
50 mM Tris (Hydroxymethylaminomethan)	
Aqua bidest	
1,8 mM Ethylendiamin-tetraessigsäure-	
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA-DiNa)	
0,38 M Glyzin	
0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat)	
pH einstellen auf 8,8	

Als Elektrophoresekammer wurde die Hoefer mini VE von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Dicke der Gele betrug 1mm, pro Gel wurden zehn Slots verwendet. Nach der Proteinbestimmung wurde den Proben 0,5% Bromophenolblau (5 $\mu$ l) zum Sichtbarmachen der Proteinfront im Gel zugesetzt. Außerdem wurde zur Denaturierung eine fünfminütige Inkubation der Proben bei 100°C vor der Elektrophorese durchgeführt. In die Slots wurde je 50 $\mu$ g Protein geladen und es wurde eine Spannung von 300 Volt angelegt.

Proteinstandards dienen der Bestimmung der Molekülmasse der Proteine im Gel. Sie enthalten eine Mischung von Proteinen mit definierten Molekulargewichten und wandern wie die Proben in elektrischen Feld. Bei einem Molekularge-

wicht der TH von 60 kDa wurde der Full-Range-Rainbow (Amersham) mit einer Spannweite von 10 bis 250 kDa eingesetzt.

### **Transfer**

Um bestimmte Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung immunologisch nachweisen zu können, müssen sie vom Gel auf eine Membran transferiert (“geblottet”) werden, da die Gelmatrix die Reaktion der Antikörper mit den Proteinen stören würde.

Zum Transfer der Proteine wurde hier das “semidry-blotting” angewendet. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen steht in direktem Kontakt mit der Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech), die zwischen transferpuffergetränkten Schwämmen liegen. Nach Anlegen der Spannung (25 Volt) zwischen den Schwämmen wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran. Die Membran bindet die Proteine, welche vorrangig auf der Membranoberfläche bleiben. Dort sind sie für den Antikörper gut zugänglich.

Transferpuffer	1 l
25 mM Tris	3,03 g
Aqua bidest	850 ml
192 mM Glyzin	14,40 g
Methanol	150 ml

### **Immunologischer Nachweis**

Zur spezifischer Erkennung der TH wird ein Antikörper gegen die TH auf die Membran gegeben, dieser bindet in einer Antigen-Antikörperreaktion an das Protein. Ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten gerichtet und mit Merettichperoxidase markiert ist, erkennt und bindet an diesen. Es wird Luminol hinzuge-

geben, welches durch die Meerrettichperoxidase zur Chemilumineszenz angeregt wird. Die Stärke der Chemilumineszenz kann mit einem Luminographen detektiert werden und ist Ausdruck der in der Probe vorhandenen Menge an TH.

Freie Bindungsstellen auf der Membran müssen vor Zugabe der Antikörper durch Blocken mit Rinderserumalbumin 2% (Sigma) und Magermilchpulver 5% (Fluka) in Tween-Tris-buffered-Saline (TTBS) abgedeckt werden.

---

Tween-Tris-buffered-Saline (TTBS)	1 l
10 mM Tris	
Aqua bidest	
150 mM NaCl	
0,1% Tween	
pH einstellen auf 8,0	

---

**Erster Antikörper** Zur spezifischen Detektion der TH auf der Membran wurde ein Antikörper gegen dieses Protein (Anti-Tyrosine Hydroxylase, Rat (Mouse) IgG monoclonal, Calbiochem, Katalog-Nr. 657010) in einer Konzentration von 1:5000 in TTBS und 5% Magermilchpulver angewendet. Die Membran wurde mit dem Antikörper bei Zimmertemperatur 150 Minuten lang unter ständigem leichtem Schütteln inkubiert.

Die Lösung mit dem ersten Antikörper wurde in drei fünfzehnminütigen Waschschritten mit TTBS abgewaschen.

**Zweiter Antikörper** Der zweite Antikörper (Anti-Mouse Horseradish Peroxidase Conjugate: ECL Western Blotting System Kit, Amersham Pharmacia Biotech) dient der Erkennung des gebundenen ersten Antikörpers. Er ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase markiert und ist somit in der Lage, Luminol zu oxidieren, wobei Licht entsteht. Er wurde in einer Konzentration von

1:5000 in TTBS für 60 Minuten bei Zimmertemperatur unter ständigem leichtem Schütteln auf die Membran gegeben. Auch hier wurde die Antikörperlösung in drei fünfzehnminütigen Waschschritten mit TTBS abgewaschen.

**Chemilumineszenzmessung** Die Luminol-enthaltenden ECL- (Enhanced Chemiluminescence) Detektionsreagenzien (ECL Western Blotting System Kit, Amersham) führen zu einem Substrat- (Luminol) Umsatz an den Stellen auf der Membran, wo der zweite Antikörper mit der Meerrettichperoxidase gebunden ist. Die lokalen Lichtemissionen wurden mit einer Kamera (Hamamatsu CCD Camera C2400) erfasst, mit einem Prozessor (Image Processor Argus, Hamamatsu) und dem Image Intensifier Controller (M4314, Hamamatsu) umgewandelt und im Computer mit dem Programm HPD-CP(X) (Device Control Program, Hamamatsu Phototonics Deutschland GmbH) verarbeitet und als TIFF-Datei gespeichert.

## **2.4 Auswertung der hämodynamischen Messungen**

### **2.4.1 Software**

Für die Auswertung der hämodynamischen Experimente wurden die mit XmAD aufgenommenen Daten in das XmANA (<ftp://sunsite.unc.edu/pub/Linux/science/lab>) Auswerteprogramm geladen. Für die gesamte Ruheperiode wurde jeweils ein Mittelwert für den systolischen, diastolischen und mittleren Blutdruck sowie die Herzfrequenz vom Programm errechnet. Die Werte der Stressperiode wurden je nach Stressart gewonnen. Diese Mittelwerte wurden mit dem Statistikprogramm XmSTAT (<ftp://sunsite.unc.edu/pub/Linux/science/lab>) auf ihre Signifikanz hin geprüft. Mit Hilfe des Grafikprogrammes Grace (<ftp://plasmagate.weizmann.ac.il/Grace/>) konnten die Diagramme erstellt werden. Bei der Auswertung wurden nur artefaktfreie Abschnitte verwendet.

## **2.4.2 Hitzestress**

Beim Hitzestressversuch wurde neben den Blutdruck- und Herzfrequenzwerten auch die Körperkerntemperatur aufgezeichnet. Diese diente nun als Maß für die Ermittlung der Blutdruck- und Herzfrequenzmittelwerte. Nach Bestimmung der Werte für die Ruheperiode (einschließlich der mittleren Ruhekerntemperatur) wurden die Mittelwerte für ca. 30-Sekunden-Intervalle nach jeweils einem halben Grad Körperkerntemperaturerhöhung gegenüber der Ruhetemperatur bestimmt. Dies hatte einen Ruhewert und 13 Hitzewerte zum Ergebnis.

## **2.4.3 Airjetstress**

Während der Airjetstudie wurden die ersten Mittelwerte von Blutdruck (systolisch, diastolisch, mittel) und Herzfrequenz für fünf Minuten bis unmittelbar vor Beginn der Applikation des Luftstromes ermittelt. Nach Einsetzen des Airjetstresses wurden minütlich die Werte für Blutdruck und Herzfrequenz aus jeweils ca. 30-Sekunden-Intervallen errechnet, so dass insgesamt fünf Ruhemittelwerte und 25 Mittelwerte während Stressapplikation pro Messung vorlagen.

## **2.5 Auswertung der Biochemischen Methoden**

### **2.5.1 Western Blots**

Die als TIFF-Datei gespeicherten Bilder der Western Blots konnten mittels der Imaging Software Khoros (Khoral Research Inc, Albuquerque, NM, USA) ausgewertet werden. Die Intensität der Blots wurde als Maß für die Proteinmenge der TH bestimmt und als Zahlenwerte ausgegeben. Diese wurden mit dem Statistikprogramm XmSTAT erfasst und auf ihre Signifikanz geprüft.

Für die Erstellung eines Diagrammes der Ergebnisse der Dichtemessungen wurde die mittlere Dichte der Western-Blot-Banden der Wildtypiere 100% gleichgesetzt und die Dichte der nNOS-knock-out-Banden entsprechend umgerechnet.

### **2.5.2 RT-PCR**

Die Auswertung der RT-PCR-Banden erfolgte analog der Auswertung der Western Blots. Die Dichte der Banden der TH-c-DNA und der  $\beta$ -Actin-cDNA wurden für jede Probe ermittelt und im XmStat ausgewertet. Hier wurde der Quotient TH/ $\beta$ -Actin für jede Probe gebildet und die mittleren Quotienten für WT- und nNOS-knock-out-Mäuse dargestellt.

## **2.6 Statistik**

Alle Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angeben. Für die Auswertung der Ergebnisse der hämodynamischen Messungen wurden zwei-Weg-Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Dabei stellte der Tierstamm (WT, eNOS-knock-out und nNOS-knock-out) den ersten Weg dar (unabhängige Stichproben), der zweite Weg war beim Airjetstress die Zeit und beim Hitzestress die Erhöhung der Körperkerntemperatur in halben Gradschritten (verbundene Stichproben).

Wurden in der ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Tierstämmen oder zwischen den Zeitpunkten bzw. Körperkerntemperaturen gefunden, so wurden post-hoc Tests durchgeführt um festzustellen, zwischen welchen beiden Tierstämmen bzw. zwischen welchen Zeitpunkten (Airjetstress) bzw. welchen Körperkerntemperaturen (Hitzestress) Unterschiede vorliegen. Für den Vergleich der Tierstämme wurde der Student-t-Test für unverbundene Stichproben als post-

hoc Test angewendet. Die Zeitpunkte bzw. Körperkerntemperaturen wurden mit dem Scheffé Test verglichen.

Die Quotienten TH/ $\beta$ -Actin bzw. die Zahlenwerte der Dichte der Western Blot-Banden wurde mit dem Wilcoxon-Test auf ihre Signifikanz hin untersucht.

Für alle angewendeten statistischen Tests galt als Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha=0,05$ , das heißt, eine Hypothese wird angenommen, wenn sich bei dem entsprechenden Test ein p-Wert kleiner als 5% ergab.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Hämodynamische Messungen

#### 3.1.1 Hämodynamische Ausgangswerte

##### Hitzestress

Bei den Ruheregistrierungen vor Applikation des Hitzestresses zeigten sich signifikante Unterschiede im Blutdruck und der Herzfrequenz zwischen WT-, eNOS- und nNOS-knock-out-Mäusen. Die Werte der einzelnen Gruppen sind als Mittelwerte und Standardfehler für WT- (n=9), eNOS knock-out- (n=9) und nNOS-knock-out-Mäuse (n=8) in der Abbildung 3.1 dargestellt.

Der arterielle Mitteldruck betrug bei den WT-Mäusen  $131 \pm 2$  mmHg, bei den eNOS-knock-out-Mäusen  $149 \pm 7$  mmHg und bei den nNOS-knock-out-Mäusen  $145 \pm 5$  mmHg. Sowohl der diastolische als auch der mittlere Blutdruck war bei beiden knock-out-Mäusestämmen gegenüber den WT-Kontrollen signifikant erhöht; dieser Unterschied konnte bei der Herzfrequenz nicht beobachtet werden.

Bei der Bewertung dieser Ruhewerte ist zu beachten, dass die wachen Mäuse mit einer rektalen Thermosonde instrumentiert waren. Diese stellt eine kontinu-

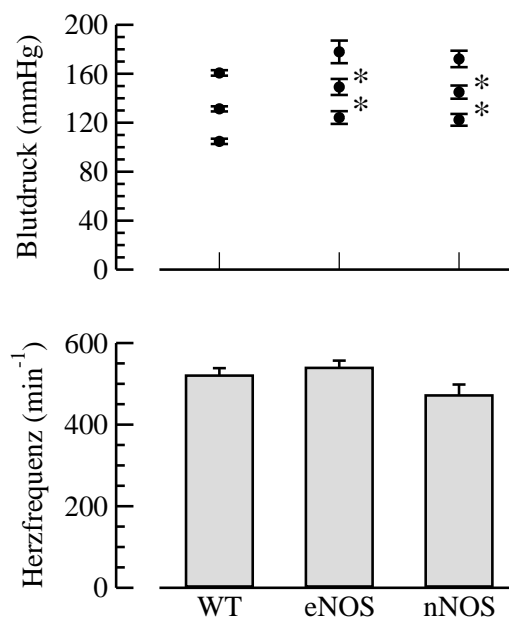


Abbildung 3.1: Systolischer, mittlerer und diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz von WT-, eNOS-knock-out- und nNOS-knock-out-Mäusen vor Hitzestress (\*:  $p < 0,05$  versus WT).

ierliche Irritation dar, die eventuell Auswirkungen auf die Ruhewerte haben kann.

### Airjetstress

Abbildung 3.2 zeigt die Blutdruck- und Herzfrequenzwerte der beiden Tiergruppen unter Ruhebedingungen vor Stressapplikation. Der Mitteldruck betrug bei den WT-Mäusen  $102 \pm 3$  mmHg, die Herzfrequenz  $502 \pm 22$  Schlägen pro Minute (bpm). Der mittlere arterielle Blutdruck betrug bei den nNOS-knock-out-Mäusen  $109 \pm 4$  mmHg. Die Herzfrequenz lag bei den nNOS-knock-out-Mäusen bei  $480 \pm 48$  bpm. In diesem Teilprojekt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Ruhewerte zwischen nNOS-knock-out-Mäusen und WT-Kontrollen.

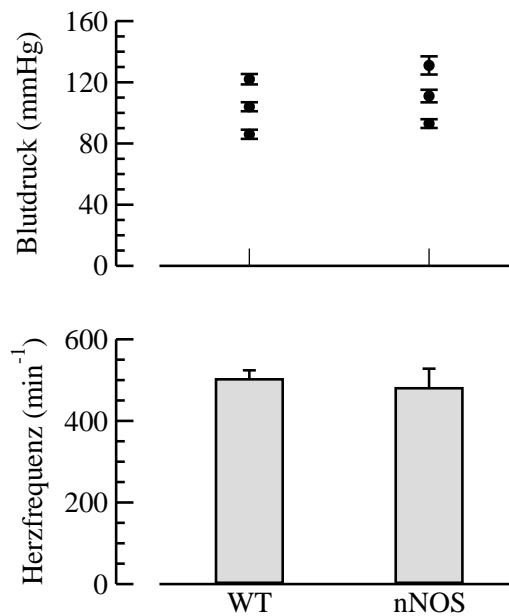


Abbildung 3.2: Systolischer, mittlerer und diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz von WT- und nNOS-knock-out-Mäusen vor Airjetstress.

### 3.1.2 Hämodynamische Antwort auf Stressapplikation

#### Hitzestress

Blutdruck, Herzfrequenz und Körperkerntemperatur (gemessen mit einer rektalen Thermosonde) sind vor und während des Hitzestresses kontinuierlich aufgezeichnet worden. Abbildung 3.3 zeigt die Originalregistrierung einer WT-Maus mit einer siebenminütigen Ruheperiode und dem folgenden Hitzestress. Am Beginn der Registrierung ist deutlich zu erkennen, dass sich die Maus in einer Ruhephase befand, Blutdruck und Herzfrequenz sind sehr stabil, die Herzfrequenz lag um 600 bpm.

Nach Einsetzen des Wärmereizes kommt es zunächst zu einem Blutdruck- und Herzfrequenzabfall, im weiteren Verlauf steigen jedoch beide Parameter wieder an. Bei Erreichen von ca. 40 °C Körperkerntemperatur sind die Ausgangswerte

wieder erreicht. Bei einer Körperkerntemperatur oberhalb von 40 °C kommt es zu einem Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz über die Ruhewerte hinaus.

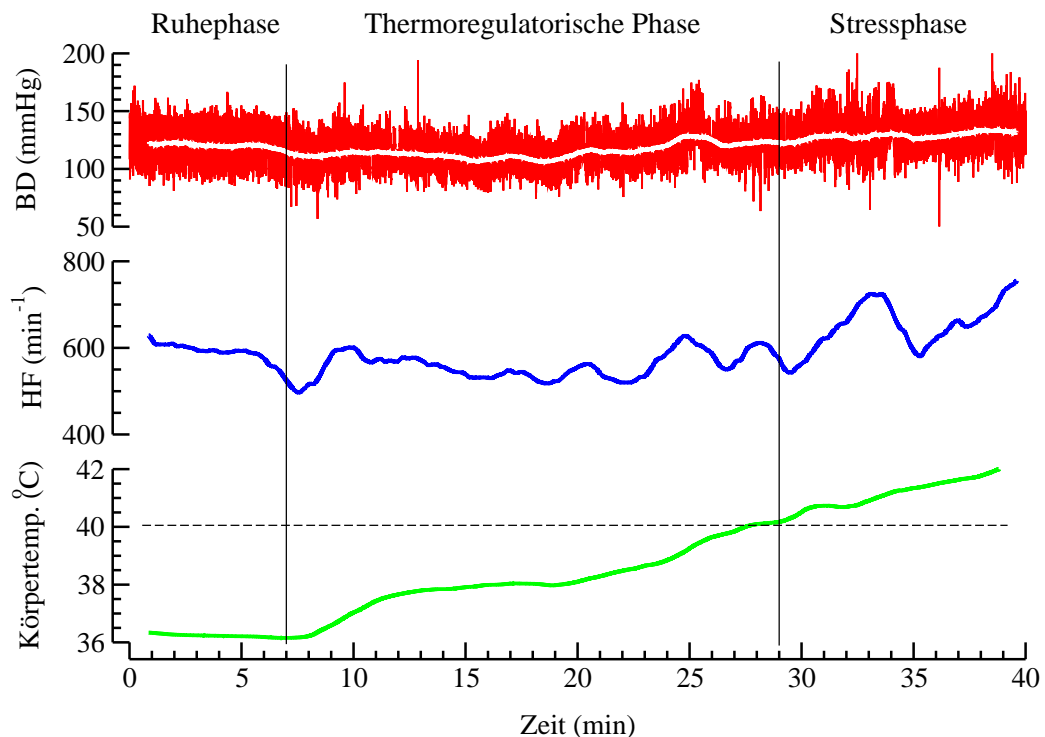


Abbildung 3.3: Originalregistrierung von Blutdruck, Herzfrequenz und Körperkerntemperatur einer WT-Maus vor und während Hitzestress.

Die Verläufe von Blutdruck und Herzfrequenz der einzelnen Tierstämme sind in Abbildung 3.4 gegen die Körperkerntemperatur aufgetragen. Hier sind deutliche Unterschiede der Antworten auf den Hitzestress zu erkennen. Während die WT- und nNOS-knock-out-Mäuse einen signifikanten Abfall des Blutdrucks während des initialen Körperkerntemperaturanstieges zeigen, ist dieser Abfall bei den eNOS-knock-out-Mäusen stark abgeschwächt und zeitlich verzögert. An-

dererseits erfolgt der spätere Wiederanstieg des Blutdruckes bei den WT- und den eNOS-knock-out-Mäusen langsam und in geringerem Maße als dies bei den nNOS-knock-out-Tieren der Fall ist. Diese zeigen am Ende des Protokolls einen signifikanten Anstieg des Blutdruckes um  $26 \pm 4$  mmHg über den Ausgangswert.

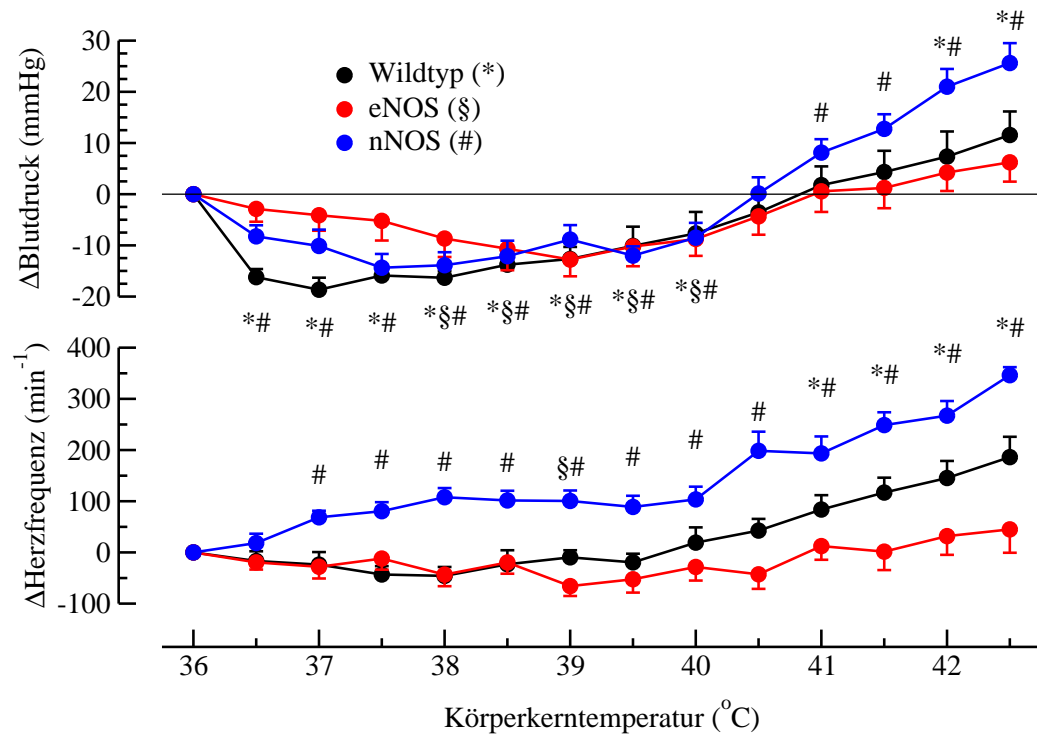


Abbildung 3.4: Blutdruck und Herzfrequenz von WT-, nNOS-knock-out- und eNOS-knock-out-Mäusen vor und während Hitzestress (\*, §, #:  $p < 0,05$ . Absolute Werte bei den Temperaturstufen gegen Ruhewerte).

Auch die Herzfrequenzantwort unterscheidet sich zwischen den einzelnen Gruppen. Während sich bei den eNOS-knock-out-Mäusen die Herzfrequenz durch die Applikation von Hitzestress nicht signifikant verändert, kommt es bei den WT-Tieren ab einer Körperkerntemperatur von 41 °C zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz. Besonders stechen aber die nNOS-knock-out-

Mäuse hervor. Diese zeigen einen schnellen und sehr starken Herzfrequenzanstieg ( $+346 \pm 16$  bpm), sie erreichen am Ende des Experiments eine Herzfrequenz von durchschnittlich 850 bpm.

### Airjetstress

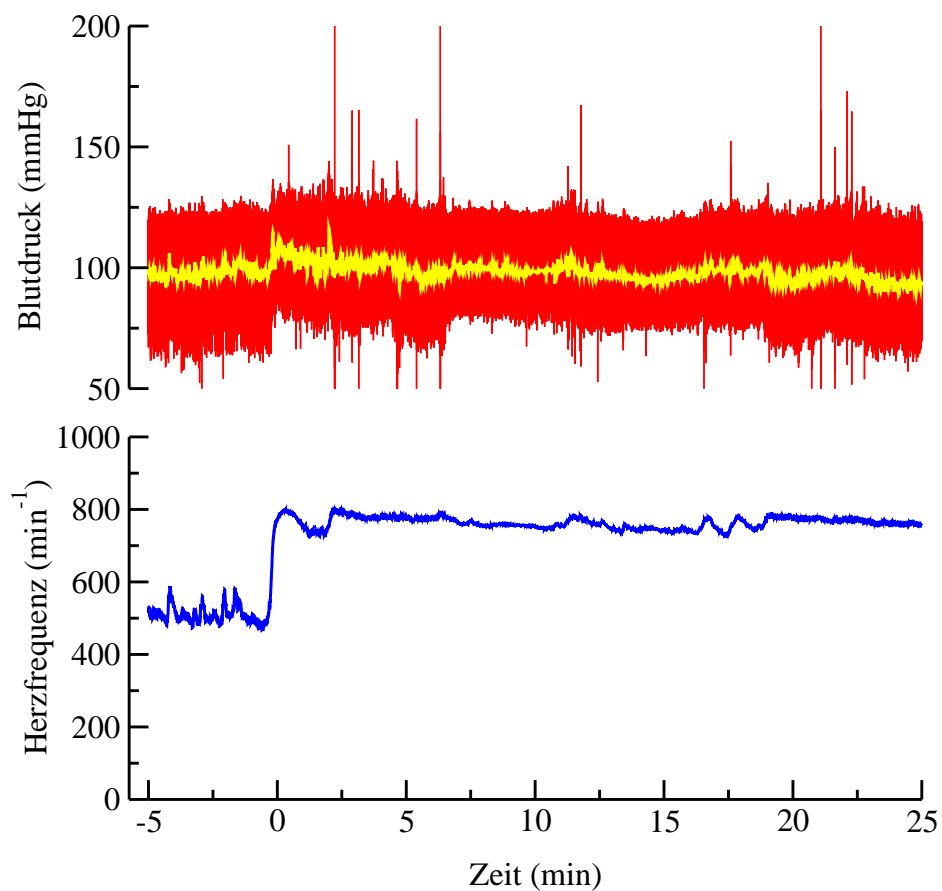


Abbildung 3.5: Originalregistrierung einer WT-Maus vor und während Airjetstress (Beginn Airjetstress bei 0 Minuten).

In Abbildung 3.5 ist eine Originalregistrierung einer WT-Maus mit fünfminütiger Ruheregistrierung und 25minütiger Airjetstressapplikation zu sehen. Es zeigt sich deutlich die homogene Ruheperiode und das abrupte Einsetzen

des Stresses am Anstieg sowohl des Blutdrucks als auch der Herzfrequenz. Es ist ebenfalls erkennbar, dass sich die erhöhten Werte relativ lange auf ihrem Niveau halten.

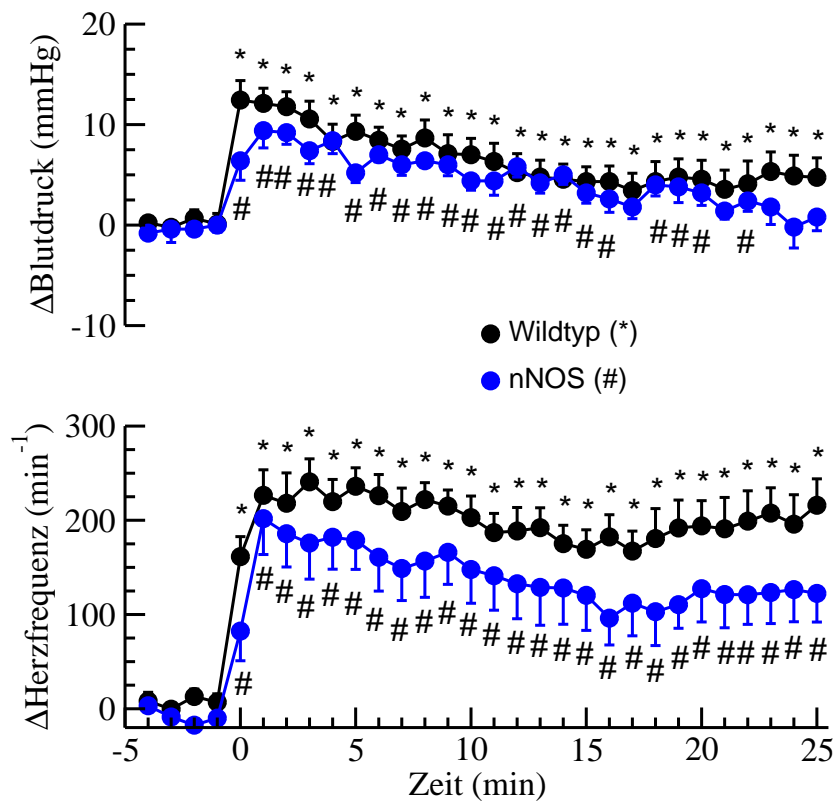


Abbildung 3.6: Blutdruck und Herzfrequenz von WT- und nNOS-knock-out-Mäusen vor und während Airjetstress (\*,#:  $p < 0,05$ . Absolute Werte im Verlauf der Airjetapplikation gegen Ruhewerte).

Der gemittelte Verlauf der Blutdruck- und Herzfrequenzantworten aller gemessenen Tiere ist in Abbildung 3.6 für die beiden Tierstämme dargestellt. Auch hier sind die Ruhephase und die Stressphase deutlich zu unterscheiden. Die Tierstämme untereinander zeigen jedoch keine signifikanten Unterschiede im Verlauf von Herzfrequenz und Blutdruck.

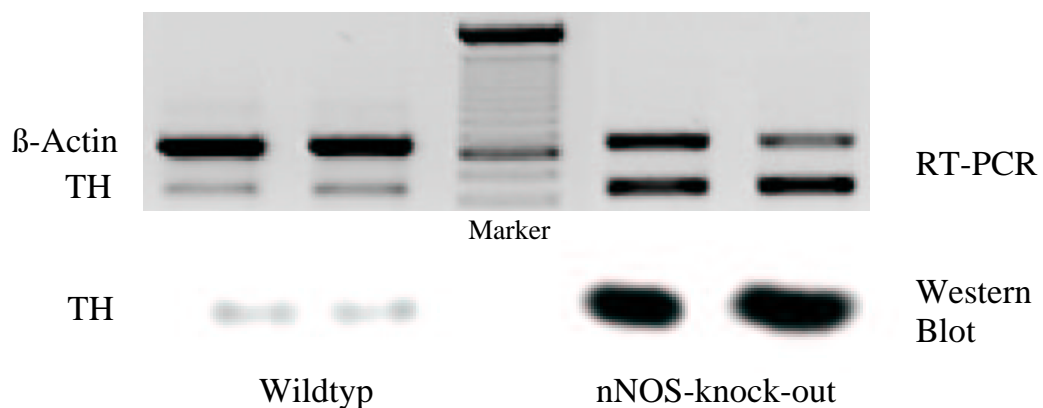


Abbildung 3.7: RT-PCR (oben:  $\beta$ -Actin-cDNA und TH-c-DNA) und Western Blot (unten: TH-Protein) in Nebennieren von nNOS-knock-out- und WT-Mäusen.

## 3.2 Tyrosinhydroxylase

### 3.2.1 mRNA (RT-PCR)

Im oberen Teil der Abbildung 3.7 sind elektrophoretisch aufgetrennte RT-PCR-Produkte dargestellt. Die obere Bande zeigt die amplifizierte  $\beta$ -Actin-cDNA, welche als Vergleichsparameter für die Amplifikationseffizienz dient. Die untere Bande entspricht der im selben Ansatz amplifizierten TH-cDNA. Weiterhin sind in jedem Gel Basenpaarmarker (Mitte) aufgetragen worden.

Die Intensität der einzelnen Banden wurde densitometrisch ermittelt und der Quotient TH/ $\beta$ -Actin gebildet. Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, ist dieser Quotient bei den nNOS-knock-out-Mäusen signifikant höher als bei den WT-Tieren.

### 3.2.2 Protein (Western Blot)

Es wurden die Proteinmengen der TH der WT- und nNOS-knock-out-Mäuse miteinander verglichen. Abbildung 3.7 enthält einen repräsentativen Western Blot. Auch auf Proteinebene zeigt sich eine signifikante Erhöhung der TH in der Ne-

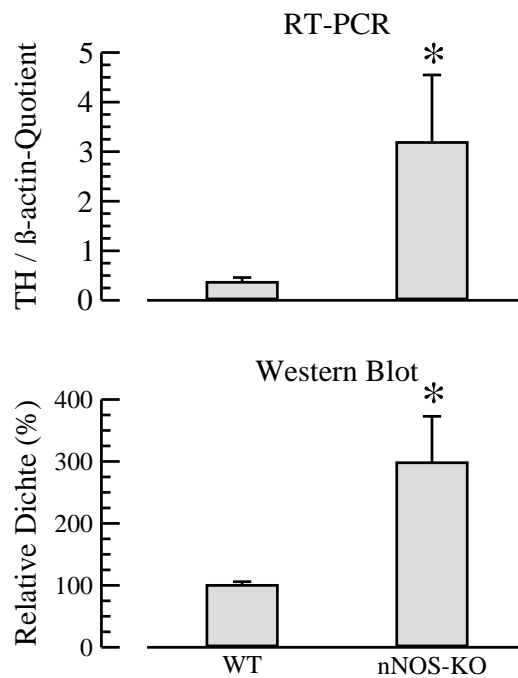


Abbildung 3.8: Expression der TH in der Nebenniere von WT- und nNOS-knock-out-Mäusen. Oben: Relative Dichte der Banden der TH-cDNA - im Vergleich zur  $\beta$ -Actin-cDNA (RT-PCR, WT: n=5, nNOS: n=5). Unten: Relative Dichte der TH-Protein-Banden - WT entspricht 100% (Western Blot, WT: n=3, nNOS: n=3). (\*:  $p < 0,05$ . nNOS-knock-out- gegen WT-Mäuse).

benniere bei den nNOS-knock-out-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren (Abbildung 3.8).

# Kapitel 4

## Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass NO eine wichtige Bedeutung für die Blutdruckregulation in Ruhe, die thermoregulatorische Vasodilatation und die hämodynamische Stressantwort hat.

Der eNOS kommt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung eines normalen Blutdruckes und für die Vermittlung der kutanen thermoregulatorischen Vasodilatation zu.

Neuronal gebildetes NO konnte als ein Modulator der Stressantwort identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es die Expression der TH und damit die Synthese von Katecholaminen hemmt. Sein Fehlen kann erhöhte Blutdruckwerte bewirken, und löst eine verstärkte hämodynamische Reaktion auf Stress aus.

### 4.1 Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase

Das hämodynamische Antwortmuster auf Hitzestress zeigt einen biphasischen Verlauf. Der erste Abschnitt ist durch die thermoregulatorische Anpassung an die erhöhte Umgebungstemperatur gekennzeichnet, während in der zweiten Phase die

sympathisch vermittelte hämodynamische Antwort auf die Hitzestressbelastung im Vordergrund steht.

Die eNOS-knock-out-Mäuse unterscheiden sich in ihrem hämodynamischen Reaktionsmuster in beiden Phasen der Antwort auf Hitzestress deutlich von den WT-Mäusen. Diese Unterschiede werden im den folgenden Abschnitten diskutiert.

#### **4.1.1 Bedeutung der eNOS für die thermoregulatorische kutane Vasodilatation**

In thermoneutraler Umgebung beansprucht die Haut weniger als 5% des Herzminutenvolumens. Bei thermischer Belastung kann die Hautdurchblutung jedoch bis auf das Zehnfache ihres Ruhewertes zunehmen [57].

Bei einer Erhöhung der Umgebungstemperatur über den thermoneutralen Bereich hinaus kommt es zu einer Vasodilatation in den Hautgefäßen. Der auf diesem Wege gesteigerte kutane Blutfluß dient der Wärmeabgabe über die Haut. Die damit einhergehende Verringerung des lokalen Hautwiderstandes führt über die Verringerung des totalen peripheren Widerstandes gemäß des Ohmschen Gesetzes zu einem Absinken des systemischen Blutdruckes.

Während sich die Blutdruckantwort der nNOS-knock-out-Mäuse während der ersten Phase der Hitzeapplikation kaum von der der WT-Mäuse unterscheidet, zeigen die eNOS-knock-out-Tiere einen stark verminderten initialen Blutdruckabfall. Dies spricht für eine besondere Beteiligung der eNOS an der thermoregulatorischen Dilatation der Hautgefäße. Neuronal gebildetes NO scheint in diesem Zusammenhang nicht essentiell zu sein.

In der Literatur gibt es eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung von NO an der thermoregulatorischen Vasodilatation in der Haut. Vor allem direkte Messungen des kutanen Blutflusses mit Laser-Doppler-Sonden konnten zeigen, dass das

Vorhandensein einer funktionierenden NOS Voraussetzung für die aktive kutane Vasodilatation ist [36, 61].

So wurde der kutane Blutfluss am Ohr des Kaninchens als thermoregulatorisches Organ dieser Spezies während Ganzkörpererwärmung gemessen. Es konnte eine sehr starke Zunahme des Blutflusses am Ohr im Vergleich zu thermoneutralen Bedingungen festgestellt werden. Infusion des NOS-Inhibitors  $N\omega$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA) über die Arteria lingualis führte zu einem Absinken des Flusses unter Ganzkörpererwärmung auf Werte nahe denen der Ruhewerte. L-Arginin ist als Substrat der NOS in der Lage, L-NNA kompetitiv von der NOS zu verdrängen und die NO-Synthese wiederherzustellen. Es wurde im Anschluss an die L-NNA-Infusion intravenös verabreicht und bewirkte wieder einen Anstieg der Flusswerte. Es wird deshalb von den Autoren eine Beteiligung von NO an der aktiven Vasodilatation während Hitze angenommen [66].

Auch beim Menschen wurde durch lokale Hauterwärmung das Verhalten des kutanen Blutflusses untersucht. Die Steigerung der Hautdurchblutung bei lokaler Erwärmung wurde durch die Applikation von L-NAME über intradermale Mikrodialysekatheter stark abgeschwächt. Der NO-Donor Natriumnitroprussid konnte die Durchblutungswerte wiederherstellen. Deshalb wird auch beim Menschen NO eine wichtige Rolle für die Vasodilatation bei lokaler Hauterwärmung zugeschrieben [37].

Die Ergebnisse dieser Arbeit können diese Beobachtungen bestätigen. Durch die gezielte Inaktivierung des eNOS-Genes bzw. des nNOS-Genes war es zusätzlich möglich, diesen Effekt eindeutig der endothelialen Isoform der NOS zuzuschreiben. Es kann hier die Schlussfolgerung gezogen werden, dass endothelial gebildetes NO eine entscheidende Komponente bei der thermoregulatorischen kutanen Vasodilatation darstellt. Die nNOS scheint in diesem Zusammenhang - wenn überhaupt - nur eine geringe Bedeutung zu haben. Diese Erkenntnis wird

hier aus der Beobachtung gewonnen, dass die eNOS-knock-out-Mäuse keinen signifikanten initialen Blutdruckabfall zeigen. Sie unterscheiden sich damit signifikant von den WT- und nNOS-knock-out-Mäusen, die beide einen Abfall des Blutdruckes am Beginn des Hitzestresses aufweisen.

Doch neben der Bedeutung von endothelial gebildetem NO für die kutane Vasodilatation stellt sich die Frage nach dem Ausmaß der NO-Beteiligung und vor allem dem Mechanismus der NO-Freisetzung. So sind Unterschiede zwischen lokaler Hauterwärmung und Ganzkörpererwärmung zu beachten. Es wird postuliert, dass die Vasodilatation bei lokaler Hauterwärmung nicht neuronal gesteuert ist sondern einen lokalen Mechanismus zur Ursache hat. Diese These stützt sich auf die Beobachtung, dass denervierte Haut nach Verbrennungen oder Hautverpflanzungen eine erhaltene Vasodilatation als Reaktion auf lokale Erwärmung aufweist [4].

Es konnte gezeigt werden, dass es beim Menschen in Folge einer lokalen Erwärmung der Haut des Armes zu einer Vasodilatation im Bereich des erwärmten Hautareals, nicht jedoch auf der nichterwärmten Gegenseite des Probanden kommt [34]. Der Mechanismus dieser lokalen durch Hauterwärmung vermittelten Vasodilatation ist noch nicht eindeutig definiert. Es könnte zu einer verstärkten Bildung und Freisetzung von Gewebsmediatoren (zum Beispiel Bradykinin oder Serotonin) kommen, welche über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Aktivierung der NOS im Endothel führen.

Neben diesen durch NO vermittelten Effekten wird auch eine Temperaturabhängigkeit von vasokonstriktorisches  $\alpha_2$ -Rezeptoren diskutiert, die bei Erwärmung zu einer verringerten Ansprechbarkeit der glatten Muskelzellen auf Noradrenalin führt [14]. Diese Verringerung der Vasokonstriktion - also die daraus folgende Vasodilatation - scheint aber nur einen geringen Anteil (max. 10%) an der thermisch vermittelten Vasodilatation zu haben [37].

Für die Zunahme der Hautdurchblutung bei Hitzestress wird aber neben den beschriebenen lokalen Mechanismen auch eine neuronale Steuerung verantwortlich gemacht [37]. So bewirkt die durch Hitzestress verursachte Erhöhung der Körperkerntemperatur ebenfalls eine Erhöhung der Hautdurchblutung. So könnte die durch Hitze verursachte Sympathikusaktivierung über die sympathisch-cholinerge Innervation der Hautgefäße eine NO-Freisetzung bewirken.

Weiterhin könnte diese Sympathikusaktivierung auch über die cholinerge Innervation von Schweißdrüsen zu einem Acetylcholin-”spill-over” in das Endothel führen. Beide Mechanismen würden über die endotheliale NO-Freisetzung zu einer Dilatation der Hautgefäße führen.

Die Frage, ob Acetylcholin als Aktivator der NOS die kutane Vasodilatation unter Hyperthermie vermittelt, wird kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise, dass eine Aktivierung der NOS durch Acetylcholin über muskarinerge Rezeptoren keine wesentliche Bedeutung in diesem Zusammenhang hat [61]. In dieser Arbeit wurde der kutane Blutfluß beim Menschen mit Hilfe einer Laser-Doppler-Sonde abgeschätzt. Die Versuchspersonen wurden mit einem wasserperfundierten Ganzkörperanzug erwärmt, und nach einer Erhöhung der Körpertemperatur um ein Grad Celsius wurde der kutane Blutfluß gemessen. Atropin als Antagonist an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren wurde über die Arteria brachialis infundiert. Dies führte zu keiner Veränderung der Hautdurchblutung. Diese Beobachtung würde gegen die Theorie eines Acetylcholin-”spill-over” von sympathischen cholinergen postganglionären Neuronen sprechen.

Andererseits konnte in anderen Studien Acetylcholin eine Teilbedeutung in diesem Rahmen zugeschrieben werden: Atropin führte zu einer verzögerten und verringerten Vasodilatation in der Haut unter Hyperthermie. Auch eine Kotransmission an cholinergen Nerven wird diskutiert [38]. Hierbei wird eine Freisetzung eines nicht charakterisierten Neurotransmitters zusammen mit Acetylcholin ange-

nommen, welcher seinerseits die aktive kutane Vasodilatation vermittelt.

Neben dem Ausbleiben eines initialen Blutdruckabfalls bei den eNOS-knock-out-Mäusen ist jedoch ein im Vergleich zu den WT- und nNOS-knock-out-Mäusen verspäteter und verringerter leichter Blutdruckabfall zu verzeichnen. Dies deutet auf eine Beteiligung anderer Mechanismen als die der endothelialen NO-Freisetzung für die kutane thermoregulatorische Vasodilatation hin. So könnte hier die Temperaturabhängigkeit der  $\alpha_2$ -Rezeptoren mit verringerter Ansprechbarkeit bei erhöhten Temperaturen zum Tragen kommen. Ob dieser und möglicherweise andere Mechanismen bei einer intakten eNOS eine Rolle spielen, ist durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht zu klären.

#### **4.1.2 Bedeutung der eNOS für die Regulation der Herzfrequenz**

Nicht nur in der Blutdruckantwort sondern auch im Verlauf der Herzfrequenzantwort unterscheiden sich die eNOS-knock-out-Mäuse von den beiden anderen Gruppen. Während die Herzfrequenz der WT-Tiere ab 41,0°C signifikant über die Ruhefrequenz ansteigt und dies bei den nNOS-knock-out-Mäusen sogar schon ab 37°C zu beobachten ist, steigt die Herzfrequenz der eNOS-knock-out-Tiere im gesamten Verlauf des Hitzestressexperimentes überhaupt nicht an. Für dieses Verhalten könnte eine stimulierende Wirkung von NO auf die Schrittmacherzellen des Herzens verantwortlich gemacht werden. Das Fehlen der eNOS würde also eine negativ chronotrope Reaktion bewirken.

Dieser Effekt konnte in der Literatur für nano- bis micromolare Dosen von NO beschrieben werden. So wurde bei einer Untersuchung der Rolle von NO für kardiale Arrhythmien erstmals eine negativ chronotrope Wirkung an Langendorff-perfundierten Rattenherzen auf eine micromolare Dosis des NO-Donors Natriumnitroprussid beobachtet werden [48].

In einer weiteren Studie konnte die Bedeutung von NO für die Chronotropie genauer beleuchtet werden [43]. Sinusknoten/Vorhofpräparationen von Meeresschweinchen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der NO-Donoren Natriumnitroprussid und 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) inkubiert und eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. Dabei konnte ein biphasischer Verlauf festgestellt werden mit einer positiv chronotropen Wirkung bei niedrigen Konzentrationen der NO-Donoren und einem negativ-chronotropen Effekt für höhere Dosen.

Als Ursache für diese Reaktion konnte eine Stimulation des durch Hyperpolarisation aktivierbaren Einwärtsstromes  $I_f$  der Schrittmacherzellen des Herzens verantwortlich gemacht werden. Gezielte Blockade dieses Stromes führte zum Ausbleiben der Reaktion ebenso wie eine Blockade der zyklischen Guanylatzyklase durch Oxadiazoloquinoxalin (ODQ). Es wird deshalb postuliert, dass es durch NO zu einer cGMP-Bildung kommt, wodurch  $I_f$  aktiviert wird. Die Aktivierung von  $I_f$  führt zu einem Natriumeinwärtsstrom und damit zu einer Akzeleration der Schrittmacherfunktion im Sinusknoten.

Diese Beobachtung könnte den Schluss erlauben, dass bei einer verminderten endogenen NO-Synthese der positiv chronotrope Effekt durch NO abgeschwächt ist. Der fehlende Herzfrequenzanstieg der eNOS-knock-out-Mäuse unter Hitzestress könnte demnach auf das Ausbleiben der positiv chronotropen Wirkung von NO zurückzuführen sein und würde diese These unterstützen.

## 4.2 Neuronale Stickstoffmonoxidsynthese

Die nNOS-knock-out-Mäuse zeigen im Hitzestressprotokoll einen bereits in Ruhe erhöhten mittleren und diastolischen Blutdruck. Die Blutdruck- und Herzfrequenzantwort auf Hitzestress zeigt ebenfalls starke Abweichungen vom Verlauf der WT-Mäuse. Der vor Beginn des Hitzestressprotokolls erhöhte mittlere und

diastolische Blutdruck der nNOS-knock-out-Mäuse zeigt sich jedoch nicht vor Beginn des Airjetprotokolls. Als Erklärung für dieses Phänomen kann die Aktivierung des sympathischen Nervensystems bereits vor Einsetzen des Hitzestresses aufgrund der Irritation durch die rektale Thermosonde angesehen werden.

#### **4.2.1 Bedeutung der nNOS für die Stressantwort**

Im Verlauf der zweiten Phase des Hitzestresses ist ein stärkerer Blutdruckanstieg bei den nNOS-knock-out-Mäusen als bei den WT- und eNOS-knock-out-Mäusen zu beobachten. Noch eindrucksvoller stellt sich die Herzfrequenzantwort der nNOS-knock-out-Mäuse dar. Im Hitzestressversuch steigt die Herzfrequenz schon nach einem Grad Temperaturerhöhung signifikant über das Ausgangsniveau an und erreicht im weiteren Verlauf Werte um 800 bpm. Dieser Anstieg liegt weit über dem Anstieg der Herzfrequenz der WT- und eNOS-knock-out-Mäuse. Dieser extreme Herzfrequenzanstieg sowie der Anstieg des Blutdruckes sprechen für eine verstärkte sympathische Wirkung am Herzen und an den Blutgefäßen.

Diese Ergebnisse sind mit der in der Einleitung der Arbeit formulierten Hypothese, dass neuronal gebildetes NO die Katecholaminfreisetzung hemmt, vereinbar. Auch die Literatur unterstützt diese These. So wurde bei im Langendorff-Modus perfundierten Rattenherzen die Noradrenalinfreisetzung unter sympathischer Nervenstimulation nativ und in Reaktion auf verschiedene Chemikalien untersucht. Für zwei unabhängige NOS-Inhibitoren (L-NNA und L-NMMA) konnte eine Verstärkung der Noradrenalinfreisetzung festgestellt werden. Die NO-Donoren SNAP (S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin) und SIN-1 führten zu einer Inhibition der Noradrenalinfreisetzung während der sympathischen Nervenstimulation. Die inhibierende Wirkung von NO auf die Noradrenalinfreisetzung wird der nNOS zugeschrieben, da eine Schädigung der endothelialen NO-Freisetzung durch das nichtdenaturierende Detergenz Cholamidopropyl-

dimethylammonio-propansulfonat (CHAPS) zu keiner Änderung der Untersuchungsergebnisse führte [58].

In einer weiteren Arbeit [13] wurde der Einfluss von NO auf die Herzfrequenz und die Inotropie näher untersucht. So konnte die These eines hemmenden Effektes von NO auf die Katecholaminfreisetzung anhand der Reaktion der Herzfrequenz und Kontraktionsstärke bestätigt werden. NOS-Inhibitoren führten zu einer verstärkten positiv chronotropen und inotropen Reaktion auf sympathische Nervenstimulation von Ganglion-stellatum/Vorhofpräparationen des Meerschweinchens. Auch der selektive nNOS-Inhibitor 7-NI führte zu dieser Reaktion. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass cGMP in dieser Regulationskaskade eine Rolle spielen muss. Der lösliche-Guanylatzyklase-Inhibitor ODQ führte zu einer verstärkten, das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP zu einer abgeschwächten positiv inotropen Reaktion auf sympathische Nervenstimulation.

Auch der spezifische nNOS-Inhibitor Trifluoromethylphenylimidazol (TRIM) führte zu einer signifikanten Verstärkung der durch sympathische Stimulation ausgelösten Tachykardie am Kaninchen [60].

Immunohistochemische Untersuchungen zeigen eine nNOS-Immunoreaktivität im Ganglion stellatum sowohl in präganglionären Fasern als auch in postganglionären Neuronen. Fast alle Ganglienzellen weisen eine leichte bis mittlere nNOS-Aktivität auf. Ebenso zeigen diese Zellen eine mittlere bis starke TH-Immunoreaktivität [58]. Auch für die große Mehrzahl der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes (>92%) konnte eine Kollokalisierung von TH und nNOS sowie der löslichen GCs festgestellt werden [59]. Diese starke Kopplung der Katecholaminsynthese und -freisetzung und der NO-Bildung bietet somit die Voraussetzung für eine auto- und parakrine Regulation der Katecholaminsynthese und -freisetzung durch NO.

Die Kollokalisierung von nNOS, TH und GCs sowie die Untersuchungen mit

einem GCs-Inhibitor und cGMP-Analogon weisen auf eine Beteiligung der GCs an der NO-vermittelten Hemmung der Katecholaminfreisetzung hin. Für cGMP konnte in Primärkulturen von bovinen chromaffinen Zellen eine Inhibition der Katecholaminsekretion nachgewiesen werden [53]. Diese Inhibition konnte auf die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) zurückgeführt werden, da eine Hemmung der PKG zu einer Umkehr der durch NO vermittelten Effekte führte.

Als eine der Wirkungen der PKG konnte eine Inhibition von L-Typ Calciumkanälen in Pinealozyten von Ratten festgestellt werden [12]. Vor kurzem konnte diese Inhibition für den kardialen L-Typ Calciumkanal von Kaninchen genauer charakterisiert werden. Seine Untereinheiten wurden geklont und in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Somit war eine gezielte Untersuchung der Funktion von PKG auf die einzelnen Untereinheiten möglich. Die Messung der Calciumkanalströme unter Perfusion mit dem cGMP-Analogon 8-Br-cGMP führte zu einer deutlichen Reduktion gegenüber unbehandelten Kontrollen. Diese Reduktion war bei vorheriger Inkubation mit dem PKG-Inhibitor KT5823 aufgehoben, was für eine Modulation des Calciumkanalstromes durch cGMP über PKG spricht.

Ferner konnte der direkte Angriffspunkt der PKG identifiziert werden: die Phosphorylierung von Ser533 in der  $\alpha_{1C}$  Untereinheit des Calciumkanals führt zu einem längeren Verbleiben des Kanals in der geschlossenen Position [32]. In dieser Arbeit wird auch eine analoge Phosphorylierung der  $\alpha_{1D}$  Untereinheit des neuronalen L-Typ Calciumkanals diskutiert.

Abbildung 4.1 fasst die in dieser Arbeit postulierten Mechanismen der Interaktion von Katecholaminsynthese und -freisetzung und neuronal gebildetem NO zusammen. Eine Aktivierung der präganglionären sympathischen Neurone führt zu einer Freisetzung von Acetylcholin, welches über eine Bindung an den postsynaptischen Acetylcholinrezeptor zu einem Calciumeinstrom führt. Dadurch wird die nNOS aktiviert (Weg 1 in 4.1) und über eine Aktivierung der GCs kommt es zu ei-

ner Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels, welcher seinerseits die PKG aktiviert, welche den L-Typ Calciumkanal phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bedeutet eine Verminderung der Kanalaktivität. In der Folge kommt es zu einem verringerten Calciumeinstrom bei Depolarisation und somit zu einer verminderten intrazellulären Calciumkonzentration. Da die Exozytose von transmittergefüllten Vesikeln calciumabhängig ist [10], kommt es bei einer verringerten intrazellulären Calciumkonzentration zu einer verringerten Exozytose von Katecholaminen (Weg 3 in 4.1).

Bei Fehlen der nNOS würde diese inhibierende Wirkung auf den Calciumkanal ausbleiben, die Exozytose von Noradrenalin und Adrenalin wäre somit bei einer sympathischen Stimulation erhöht. Die Wirkung der verstärkten Katecholaminfreisetzung unter Sympathikusaktivierung - positive Chronotropie, Inotropie und auch Vasokonstriktion - kann das Verhalten von Blutdruck und Herzfrequenz der nNOS-knock-out-Mäuse in dieser Arbeit erklären.

Die Ergebnisse der Hitzstresstudie deuten stark auf eine Beteiligung der nNOS an der Regulation der Katecholaminfreisetzung hin. Die Hypothese einer negativen Wirkung von neuronal gebildetem NO auf die Adrenalin- und Noradrenalinfreisetzung kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit, die hämodynamische Messungen an wachen Tieren beinhaltet, unterstützt werden.

Im Airjetstressversuch konnten keine dementsprechenden Beobachtungen gemacht werden. Dies ist möglicherweise auf die sich vom Hitzstress stark unterscheidende Art des Stresses zurückzuführen. Das plötzliche Einsetzen des Stresses - am abrupten Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz zu erkennen - würde über eine starke Sympathikusaktivierung zu einer schnellen Entleerung der Transmitterreserven sowohl bei den nNOS-knock-out- als auch bei den WT-Mäusen führen. Hemmende Effekte von neuronal gebildetem NO bei den WT-Tieren würden bei einer so starken plötzlichen Sympathikusaktivierung kaum hervor-

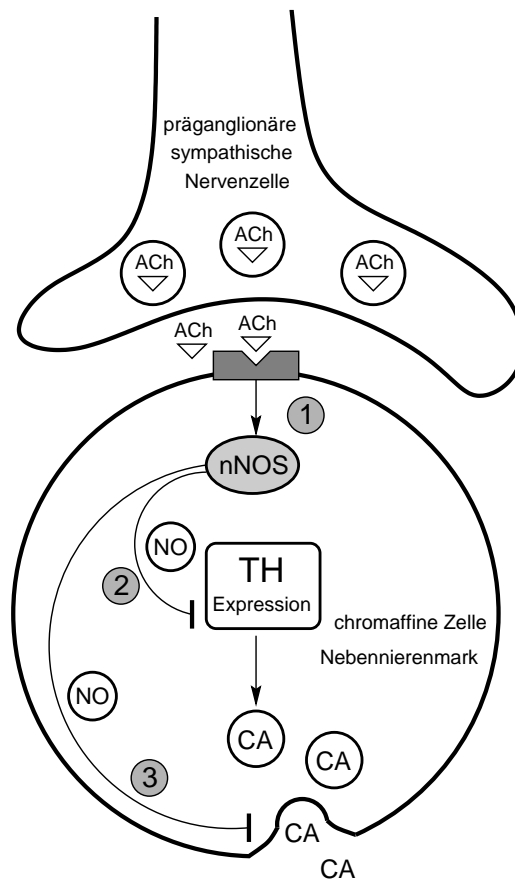


Abbildung 4.1: Bedeutung von neuronal gebildetem NO für die Katecholaminsynthese und -freisetzung. ACh (Acetylcholin), CA (Katecholamine). Erläuterung im Text.

treten. Deshalb könnten die hämodynamischen Effekte auf Airjetstress in beiden Mäusestämmen gleich stark ausfallen.

Die fehlende Inhibition der Katecholaminfreisetzung bei den nNOS-knock-out-Mäusen könnte sogar zu einer "unökonomischen" und damit schnelleren Entleerung der Transmittervesikel führen. Dies würde dann die tendentiell niedrigeren Herzfrequenzwerte gegen Ende des Airjetprotokolls bei den nNOS-knock-out-Mäusen erklären.

## 4.2.2 Bedeutung der nNOS für die TH-Expression

Die hämodynamischen Befunde in Ruhe und bei Hitzstress lassen auf eine erhöhte Katecholaminfreisetzung bei Fehlen der nNOS schließen. Es stellt sich daher die Frage, ob auch die Katecholaminsynthese bei nNOS-knock-out-Mäusen verändert ist.

Die Bestimmungen der TH - welches sich als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Katecholaminsynthese im peripheren Nervensystem erwiesen hat [19] - werden zur Beurteilung der Regulation der Katecholaminsynthese herangezogen. So konnte in dieser Arbeit durch die Bestimmung der TH-mRNA mittels RT-PCR ein erhöhter TH-mRNA-Gehalt in den Nebennieren von nNOS-knock-out-Mäusen nachgewiesen werden. Auch Western Blots von WT- und nNOS-knock-out-Mäusen zeigen signifikant stärkere Banden des TH-Proteins bei den nNOS-knock-out-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren.

Es wird deshalb angenommen, dass es parallel zur verstärkten Katecholaminfreisetzung und der damit einhergehenden Verringerung der Katecholaminspeicher zu einer kompensatorischen Induktion der TH kommt (Weg 2 in 4.1). Eine solche Induktion wurde für Reserpin nachgewiesen. Reserpin ist in der Lage, das Speichervermögen der Vesikel für Katecholamine aufzuheben, Noradrenalin kann dabei nicht mehr als Salz in den Vesikeln gespeichert werden. Es diffundiert deshalb in das Zytoplasma und wird in den Mitochondrien durch die Monoaminoxidase abgebaut [44].

Reserpin führt somit zu einer Depletion der Katecholaminspeicher. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reserpinbehandlung im Ganglion cervicale superior und dem Ganglion stellatum von Ratten zu einer drei- bis sechsfachen Erhöhung der TH-mRNA-Menge führt [24]. Auch in einer anderen Studie führte Reserpin im Nebennierenmark und dem Ganglion cervicale superior von Ratten zu einer Verstärkung der TH-Expression [18].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Reserpin auch eine Erhöhung der GTP-Zyklohydrolase I (GTPCH)-mRNA bewirkt. Die GTPCH ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Tetrahydrobiopterinbiosynthese. Dieses wiederum ist ein Kofaktor der TH [27].

Es sollte deshalb die Schlussfolgerung möglich sein, dass eine verstärkte Freisetzung von Katecholaminen in Folge des Fehlens von neuronal gebildetem NO mit einer verstärkten Expression der TH und der GTPCH einhergeht.

In diesem Zusammenhang wird auch ein positiver Effekt des bei der Depolarisation einströmenden Calciums auf die TH-Expression beschrieben. Als Angriffspunkte des intrazellulären Calciums werden zwei Promotorelemente verantwortlich gemacht: cAMP-response element (CRE) und Aktivator Protein-1 Transkriptionsfaktor-Komplex (AP-1), die auch das TH-Gen flankieren und kontrollieren [45]. Durch den Calcium-Calmodulin-Komplex kommt es unter anderem zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, welche cAMP bildet. cAMP führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, und diese phosphoryliert im Zellkern das cAMP-response element binding protein (CREB). Das auf diesem Wege aktivierte CREB führt über die Bindung an das CRE zu einer verstärkten Transkription der abhängigen Gene. Auch diese Befunde zeigen, dass es durch Calciumeinstrom in die Zelle, welcher seinerseits die Katecholaminfreisetzung auslöst, zu einer direkten Induktion der TH kommt.

Vor kurzem wurde auch ein direkter Einfluss von NO auf die TH-Expression beschrieben. Männliche Ratten wurden mit NOS-Inhibitoren behandelt. Sie erhielten eine Injektion in den linken Hirnseitenventrikel von entweder L-NMMA, HP-228 (zwei NOS-Inhibitoren) oder einem Vehikel als Kontrolle. Schnitte durch den Nucleus arcuatus wurden mit markierten Oligonukleotiden komplementär zur TH-kodierenden Region der Ratten cDNA inkubiert und das Signal autoradiografisch aufgezeichnet. Es zeigte sich eine hochsignifikante Erhöhung der TH-

mRNA bei L-NMMA- und HP-228-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen [69]. Diese Arbeit zeigt, dass es bei einer Inhibition der NOS zu einer verstärkten Expression der TH kommt.

In einer anderen Arbeit wurde der Einfluss von NO auf die TH-Expression unter Sauerstoffmangel näher untersucht. Es ist bekannt, dass Hypoxie zu einer verstärkten Expression der TH führt. Dies wird auf eine Stimulation von c-fos, welches den AP-1 aktiviert, zurückgeführt. AP-1 wiederum stimuliert stromabwärts gelegene Gene wie das TH-Gen [41].

In Phäochromocytomzellen (PC12) von Ratten führte der NO-Donor spermines NO zu einer signifikanten Inhibition der TH-mRNA-Expression und der TH-Promotoraktivität unter Hypoxie. Es konnte gezeigt werden, dass die unter Hypoxie verstärkte Bindung von Transkriptionsfaktoren (zB. AP-1) an den TH-Promotor durch spermines NO inhibiert wurde. Es wird deshalb geschlossen, dass die Hemmung der TH-Expression durch NO über eine verminderte Bindung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 an den TH-Promotor vermittelt wird [1].

Die Ergebnisse der Studien können durch die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen hinsichtlich der starken Blutdruck- und Herzfrequenzantwort auf Hitzestress der nNOS-knock-out-Mäuse und der verstärkten Banden der TH in der RT-PCR und dem Western Blot unterstützt werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an nNOS-knock-out-Mäusen und WT-Mäusen sowie aufgrund der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

Das Fehlen von neuronalem NO führt zu einer verstärkten Katecholaminfreisetzung in sympathischen postganglionären Neuronen und den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes. Als Mechanismus konnte die durch NO ausgelöste Hemmung des spannungsabhängigen Calciumkanals verantwortlich gemacht werden. Fehlt NO, so kommt es zu einem verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle,

welcher die Freisetzung der Katecholamine in den synaptischen Spalt und die Blutbahn bewirkt.

Diese verstärkte Katecholaminfreisetzung geht mit einer erhöhten Expression des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Katecholaminsynthese - der TH - einher. Die TH-Expression wird in diesem Zusammenhang durch folgende Mechanismen beeinflusst:

1. Die der Katecholaminfreisetzung vorausgehende Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt eine Aktivierung der Promotorelemente CRE und AP-1, welche eine erhöhte Transkriptionsrate des TH-Gens zur Folge hat.
2. NO inhibiert die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den TH-Promotor. Bei Fehlen von NO ist diese Hemmung aufgehoben und es kommt zu einer verstärkten Transkription.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die thermoregulatorische Dilatation der Hautgefäße vor allem durch endothelial gebildetes NO vermittelt wird. Weiterhin konnte die Bedeutung des hemmenden Einflusses von neuronal gebildetem NO auf die sympathische Übertragung gezeigt werden.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die Frage nach der Bedeutung der NOS für die Regulation von Kreislaufparametern stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die in den letzten Jahren immer größer werdende Zahl an Erkenntnissen zu den Angriffspunkten und Effekten von NO gibt wichtige Einblicke in die Regulation verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Funktionen. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des Fehlens der nNOS und eNOS auf den Gesamtorganismus zu untersuchen. Dabei war von Interesse, ob neben dem Fehlen der eNOS auch das Fehlen der nNOS zu einer basalen Erhöhung des Blutdruckes führt. Auch die Reaktion des Organismus mit gestörter endothelialer oder neuronaler NOS auf Stressreize im Vergleich zu Organismen mit intakter NOS war in Hinblick auf mögliche Kompensationsmechanismen in Ruhe von großem Interesse.

Die Verfügbarkeit genetisch veränderter Mäuse machte die Beantwortung dieser Fragestellungen möglich. Ein dauerhaftes und zuverlässiges Ausschalten spezifischer Isoformen der NOS durch genetisches knock-out ist auf diesem Weg gewährleistet. Als Stressformen wurden Hitzestress und Airjetstress angewendet. Blutdruck und Herzfrequenz als wichtige kreislaufphysiologische Parameter wurden während der Experimente kontinuierlich an wachen Tieren aufgezeichnet.

Im Hitzestressversuch ließ sich das Fehlen eines initialen Blutdruckabfalls der eNOS-knock-out-Mäuse feststellen. Die nNOS-knock-out-Mäuse dagegen zeigten diesen initialen Blutdruckabfall ebenso wie die WT-Mäuse. Der nachfolgende, stressinduzierte Blutdruckanstieg fiel aber bei den nNOS-knock-out-Mäusen signifikant höher als bei den WT-Tieren und eNOS-knock-out-Tieren aus. Vor allem die Herzfrequenz zeigte bei den nNOS-knock-out-Mäusen einen viel stärkeren Anstieg von Beginn des Experimentes an.

Aus diesen Ergebnissen können mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen deuten diese Untersuchungsergebnisse auf eine wichtige Beteiligung von NO an der thermoregulatorischen Dilatation der Hautgefäße hin. Dieser NO-vermittelte Effekt kann auf die eNOS zurückgeführt werden. Die nNOS scheint in diesem Zusammenhang keine Bedeutung zu haben.

Zum anderen konnte in dieser Arbeit eine signifikante Erhöhung des Blutdrucks bei nNOS-knock-out-Mäusen vor Beginn und während des Hitzestresses gezeigt werden. Es kann auf eine erhöhte stressinduzierte Katecholaminfreisetzung bei nNOS-knock-out-Mäusen geschlossen werden. Neuronal gebildetes NO hat also einen hemmenden Einfluss auf die Katecholaminfreisetzung.

Untersuchungen zur Expression der TH - dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Katecholaminsynthese - zeigen einen erhöhten Gehalt an TH-mRNA und -Protein in den Nebennieren von nNOS-knock-out-Mäusen. Es wird deshalb geschlossen, dass neuronal gebildetes NO ein wichtiger Modulator der Katecholaminfreisetzung und -synthese im peripheren sympathischen Nervensystem mit überwiegend inhibitorischen Funktionen ist.

Die Arbeit mit wachen Tieren zeigt, dass NO für den Gesamtorganismus im Rahmen der thermoregulatorischen Modulation der Hautdurchblutung (eNOS) und für die Regulation der Katecholaminsynthese während Stressapplikation (nNOS) von besonderer Bedeutung ist.

# Literaturverzeichnis

- [1] G. Adhikary, D. R. Premkumar, and N. R. Prabhakar. Dual influence of nitric oxide on gene regulation during hypoxia. *Adv Exp Med Biol*, 475:285–92, 2000.
- [2] D. Annane, S. Sanquer, V. Sebille, A. Faye, D. Djuranovic, J. C. Raphael, P. Gajdos, and E. Bellissant. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet*, 355:1143–8, 2000.
- [3] J. F. Arnal, A. T. Dinh-Xuan, M. Pueyo, B. Darblade, and J. Rami. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci*, 55(8-9):1078–87, 1999.
- [4] L. H. Aulick, D. W. Wilmore, A. D. Mason, Jr., and B. A. Pruitt, Jr. Influence of the burn wound on peripheral circulation in thermally injured patients. *Am J Physiol*, 233(4):H520–6, 1977.
- [5] E. Bassenge. Clinical relevance of endothelium-derived relaxing factor (edrf). *Br J Clin Pharmacol*, 34 Suppl 1:37S–42S, 1992.
- [6] J. L. Boucher, C. Moali, and J. P. Tenu. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for l-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci*, 55(8-9):1015–28, 1999.

- [7] D. S. Bredt, P. M. Hwang, and S. H. Snyder. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347:768–70, 1990.
- [8] D. S. Bredt and S. H. Snyder. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(2):682–5, 1990.
- [9] H. Bult, G. E. Boeckxstaens, P. A. Pelckmans, F. H. Jordaens, Y. M. Van Maercke, and A. G. Herman. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter [see comments]. *Nature*, 345:346–7, 1990.
- [10] R. D. Burgoyne. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*, 1071:174–202, 1991.
- [11] C. Cardillo and J. A. Panza. Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension. *Vasc Med*, 3(2):138–44, 1998.
- [12] C. L. Chik, Q. Y. Liu, B. Li, E. Karpinski, and A. K. Ho. cgmp inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channel currents through protein phosphorylation in rat pinealocytes. *J Neurosci*, 15(4):3104–9, 1995.
- [13] J. K. Choate and D. J. Paterson. Nitric oxide inhibits the positive chronotropic and inotropic responses to sympathetic nerve stimulation in the isolated guinea-pig atria. *J Auton. Nerv. Syst.*, 75(2-3):100–108, 1999.
- [14] J. P. Cooke, J. T. Shepherd, and P. M. Vanhoutte. The effect of warming on adrenergic neurotransmission in canine cutaneous vein. *Circ Res*, 54(5):547–53, 1984.
- [15] G. R. Cooper, K. Mialkowski, and D. J. Wolff. Cellular and enzymatic studies of n(omega)-propyl-l-arginine and s- ethyl-n-[4-

- (trifluoromethyl)phenyl]isothiourea as reversible, slowly dissociating inhibitors selective for the neuronal nitric oxide synthase isoform. *Arch Biochem Biophys*, 375:183–94, 2000.
- [16] S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, and A. M. Zeiher. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399:601–5, 1999.
- [17] M. G. Doni, A. Alexandre, E. Padoin, S. Bertonecello, and R. Deana. Nitrovasodilators and cgmp inhibit human platelet activation. *Cardioscience*, 2(3):161–5, 1991.
- [18] N. Faucon Biguet, S. Vyas, and J. Mallet. In vitro and in vivo regulation of the expression of the tyrosine hydroxylase gene. *J Physiol (Paris)*, 85(3):105–9, 1991.
- [19] T. Flatmark. Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol. Scand.*, 168(1):1–17, 2000.
- [20] U. Forstermann, E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, and H. Kleinert. Nitric oxide synthase isozymes. characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23(6 Pt 2):1121–31, 1994.
- [21] U. Forstermann, L. D. Gorsky, J. S. Pollock, K. Ishii, H. H. Schmidt, M. Heller, and F. Murad. Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in n1e-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol Pharmacol*, 38(1):7–13, 1990.
- [22] R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373–373, 1980.

- [23] A. Gödecke, U. K. Decking, Z. Ding, J. Hirchenhain, H. J. Bidmon, S. Gödecke, and J. Schrader. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ. Res.*, 82(2):186–194, 1998.
- [24] J. Hanze, W. Kummer, M. Haass, and R. E. Lang. Effect of catecholamine depletion and denervation on neuropeptide y(npv) and tyrosine-hydroxylase (th) mrna levels in rat sympathetic ganglia. *Exp Clin Endocrinol*, 102(1):54–9, 1994.
- [25] William Harvey. *De motu cordis et sanguinis in animalibus, anatomica exercitatio*. William Fitzer, Frankfurt, 1628.
- [26] R. D. Hawkins, H. Son, and O. Arancio. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res*, 118:155–72, 1998.
- [27] K. Hirayama, S. I. Lentz, and G. Kapatos. Tetrahydrobiopterin cofactor biosynthesis: Gtp cyclohydrolase i mrna expression in rat brain and superior cervical ganglia. *J Neurochem*, 61(3):1006–14, 1993.
- [28] P. L. Huang, T. M. Dawson, D. S. Bredt, S. H. Snyder, and M. C. Fishman. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, 75(7):1273–1286, 1993.
- [29] Paul L. Huang, Zhihong Huang, Hiroshi Mashimo, Kenneth D. Bloch, Michael A. Moskowitz, John A. Bevan, and Mark C. Fishman. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 377:239–242, 1995.
- [30] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24):9265–9, 1987.

- [31] R. Iyengar, D. J. Stuehr, and M. A. Marletta. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and n-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(18):6369–73, 1987.
- [32] L. H. Jiang, D. J. Gawler, N. Hodson, C. J. Milligan, H. A. Pearson, V. Porter, and D. Wray. Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 275(9):6135–43, 2000.
- [33] S. John and R. E. Schmieder. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *J Hypertens*, 18(4):363–74, 2000.
- [34] J. M. Johnson, D. S. O’Leary, W. F. Taylor, and W. Kosiba. Effect of local warming on forearm reactive hyperaemia. *Clin Physiol*, 6(4):337–46, 1986.
- [35] P. Jumrussirikul, J. Dinerman, T. M. Dawson, V. L. Dawson, U. Ekelund, D. Georgakopoulos, L. P. Schramm, H. Calkins, S. H. Snyder, J. M. Hare, and R. D. Berger. Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory g protein activity in heart rate regulation in conscious mice. *J Clin Invest*, 102(7):1279–85, 1998.
- [36] D. L. Kellogg, Jr., C. G. Crandall, Y. Liu, N. Charkoudian, and J. M. Johnson. Nitric oxide and cutaneous active vasodilation during heat stress in humans. *J Appl Physiol*, 85(3):824–9, 1998.
- [37] D. L. Kellogg, Jr., Y. Liu, I. F. Kosiba, and D. O’Donnell. Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans. *J Appl Physiol*, 86(4):1185–90, 1999.
- [38] D. L. Kellogg, Jr., P. E. Pergola, K. L. Piest, W. A. Kosiba, C. G. Crandall, M. Grossmann, and J. M. Johnson. Cutaneous active vasodilation in humans

- is mediated by cholinergic nerve cotransmission. *Circ Res*, 77(6):1222–8, 1995.
- [39] Y. Lee, P. Martasek, L. J. Roman, B. S. Masters, and R. B. Silverman. Imidazole-containing amino acids as selective inhibitors of nitric oxide synthases. *Bioorg Med Chem*, 7(9):1941–51, 1999.
- [40] A. W. Miller, M. E. Hoenig, and M. R. Ujhelyi. Mechanisms of impaired endothelial function associated with insulin resistance. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 3(2):125–134, 1998.
- [41] R. R. Mishra, G. Adhikary, M. S. Simonson, N. S. Cherniack, and N. R. Prabhakar. Role of c-fos in hypoxia-induced ap-1 cis-element activity and tyrosine hydroxylase gene expression. *Brain Res Mol Brain Res*, 59(1):74–83, 1998.
- [42] G. Mozes, I. J. Kullo, T. G. Mohacsi, D. G. Cable, D. J. Spector, T. B. Crotty, P. Gloviczki, Z. S. Katusic, and T. O'Brien. Ex vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to atherosclerotic rabbit aortic rings improves relaxations to acetylcholine. *Atherosclerosis*, 141(2):265–71, 1998.
- [43] P. Musialek, M. Lei, H. F. Brown, D. J. Paterson, and B. Casadei. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current,  $i(f)$ . *Circ. Res.*, 81(1):60–68, 1997.
- [44] E. Mutschler. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 7 edition, 1997.
- [45] K. Nagamoto-Combs, K. M. Piech, J. A. Best, B. Sun, and A. W. Tank. Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic amp-

- responsive element and ap1 sites following calcium influx. evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation. *J Biol Chem*, 272(9):6051–8, 1997.
- [46] B. B. Nankova and E. L. Sabban. Multiple signalling pathways exist in the stress-triggered regulation of gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and several neuropeptides in the rat adrenal medulla. *Acta Physiol Scand*, 167(1):1–9, 1999.
- [47] J. A. Osborne, M. J. Siegman, A. W. Sedar, S. U. Mooers, and A. M. Lefer. Lack of endothelium-dependent relaxation in coronary resistance arteries of cholesterol-fed rabbits. *Am J Physiol*, 256(3 Pt 1):C591–7, 1989.
- [48] R. Pabla and M. J. Curtis. Effects of no modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart. *Circ Res*, 77(5):984–92, 1995.
- [49] P. B. Persson. Modulations of cardiovascular control mechanisms and their interaction. *Physiol. Rev.*, 76(1):193–244, 1996.
- [50] R. M. Rapoport, M. B. Draznin, and F. Murad. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, 306(5939):174–6, 1983.
- [51] F. Rodriguez-Pascual, R. Ferrero, M. T. Miras-Portugal, and M. Torres. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cGMP-dependent protein kinase in intact bovine chromaffin cells. *Arch Biochem Biophys*, 366(2):207–14, 1999.
- [52] F. Rodriguez-Pascual, M. T. Miras-Portugal, and M. Torres. Activation of NO:cGMP pathway by acetylcholine in bovine chromaffin cells. possible role of Ca<sup>2+</sup> in the down-regulation of cGMP signaling. *Biochem Pharmacol*, 50(6):763–9, 1995.

- [53] F. Rodriguez-Pascual, M. T. Miras-Portugal, and M. Torres. Effect of cyclic gmp-increasing agents nitric oxide and c-type natriuretic peptide on bovine chromaffin cell function: inhibitory role mediated by cyclic gmp-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol*, 49(6):1058–70, 1996.
- [54] H. Ruetten, U. Zabel, W. Linz, and H. H. Schmidt. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 85(6):534–41, 1999.
- [55] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–4, 1985.
- [56] J. Sato, T. Mohacsi, A. Noel, C. Jost, P. Gloviczki, G. Mozes, Z. S. Katusic, T. O'Brien, and W. G. Mayhan. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to carotid arteries from hypercholesterolemic rabbits enhances endothelium- dependent relaxations. *Stroke*, 31(4):968–75, 2000.
- [57] R.F. Schmidt and G Thews. *Physiologie des Menschen*. Springer, 1997.
- [58] P. Schwarz, R. Diem, N. J. Dun, and U. Förstermann. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. *Circ. Res.*, 77(4):841–848, 1995.
- [59] P. M. Schwarz, F. Rodriguez-Pascual, D. Koesling, M. Torres, and U. Förstermann. Functional coupling of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in controlling catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 82(1):255–265, 1998.

- [60] C. E. Sears, J. K. Choate, and D. J. Paterson. Effect of nitric oxide synthase inhibition on the sympatho-vagal control of heart rate. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 73(1):63–73, 1998.
- [61] S. Shastry, C. T. Minson, S. A. Wilson, N. M. Dietz, and M. J. Joyner. Effects of atropine and l-name on cutaneous blood flow during body heating in humans. *J Appl Physiol*, 88(2):467–72, 2000.
- [62] G. J. Southan and C. Szabo. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol*, 51(4):383–94, 1996.
- [63] H. M. Stauss, A. Godecke, R. Mrowka, J. Schrader, and P. B. Persson. Enhanced blood pressure variability in enos knockout mice. *Hypertension*, 33(6):1359–63, 1999.
- [64] D. J. Stuehr, H. J. Cho, N. S. Kwon, M. F. Weise, and C. F. Nathan. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an fad- and fmn-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17):7773–7, 1991.
- [65] D. J. Stuehr and M. A. Marletta. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(22):7738–42, 1985.
- [66] W. F. Taylor and V. S. Bishop. A role for nitric oxide in active thermoregulatory vasodilation. *Am J Physiol*, 264(5 Pt 2):H1355–9, 1993.
- [67] J. E. Tooke and M. M. Hannemann. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med*, 247(4):425–31, 2000.

- [68] P. Vincendeau and S. Daulouede. Macrophage cytostatic effect on trypanosoma musculi involves an l- arginine-dependent mechanism. *J Immunol*, 146(12):4338–43, 1991.
- [69] H. Wang, S. Li, and G. Pelletier. Role of nitric oxide in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and tyrosine hydroxylase gene expression in the male rat brain. *Brain Res*, 792(1):66–71, 1998.
- [70] T. Wang, F. M. Inglis, and R. G. Kalb. Defective fluid and hco<sub>3</sub><sup>(-)</sup> absorption in proximal tubule of neuronal nitric oxide synthase-knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(3):F518–24., 2000.
- [71] X. Wang and P. J. Robinson. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem*, 68(2):443–56, 1997.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Prinzip der endothelialen NO-Freisetzung und -Wirkung. . . . .	5
1.2	Prinzip der neuronalen NO-Freisetzung und -Wirkung. . . . .	9
2.1	Arteria femoralis freipräpariert. . . . .	18
2.2	Katheter in der Arteria femoralis. . . . .	18
3.1	Blutdruck und Herzfrequenz vor Hitzestress . . . . .	39
3.2	Blutdruck und Herzfrequenz vor Airjetstress. . . . .	40
3.3	Originalregistrierung einer WT-Maus vor und während Hitzestress. . . . .	41
3.4	Blutdruck und Herzfrequenz von WT-, nNOS-knock-out- und eNOS-knock-out-Mäusen vor und während Hitzestress. . . . .	42
3.5	Originalregistrierung einer WT-Maus vor und während Airjetstress. . . . .	43
3.6	Blutdruck und Herzfrequenz von WT- und nNOS-knock-out-Mäusen vor und während Airjetstress. . . . .	44
3.7	RT-PCR und Western Blot. . . . .	45
3.8	Expression der TH in der Nebenniere von WT- und nNOS-knock-out-Mäusen. . . . .	46
4.1	Bedeutung von neuronal gebildetem NO für die Katecholaminsynthese und -freisetzung. . . . .	58

# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

**AP-1** Aktivator Protein-1 Transkriptionsfaktor-Komplex

**bpm** Schläge pro Minute

**cDNA** komplementäre DNA

**cGMP** zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat

**CREB** cAMP-response element binding protein

**CRE** cAMP-response element

**DNA** Desoxyribonukleinsäure

**eNOS** endotheliale NOS

**GCs** lösliche Guanylatzyklase

**GTPCH** GTP-Zyklohydrolase I

**GTP** Guanosintriphosphat

**iNOS** induzierbare NOS

**L-NAME** N $\omega$ -Nitro-L-Arginin-Methylester

**L-NMMA** N $\omega$ -Methyl-L-Arginin

**L-NNA** N $\omega$ -Nitro-L-Arginin

**mRNA** messenger RNA

**NADPH**  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)

**7-NI** 7-Nitroindazol

**nNOS** neuronale NOS

**NOS** Stickstoffmonoxidsynthase

**NO** Stickstoffmonoxid

**ODQ** Oxadiazoloquinoxalin

**PKG** cGMP-abhängige Proteinkinase

**RNA** Ribonukleinsäure

**RT-PCR** Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

**SIN-1** 3-Morpholinosydnonimin

**TH** Tyrosinhydroxylase

**WT** Wildtyp

# Anhang B

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums und dieser Promotion immer unterstützten.

Ich danke meinem Doktorvater, Prof. Dr. Persson, und meinem Betreuer, P.D. Dr. Stauß für die beispiellose Förderung. Sie ermöglichten mir die Durchführung eines großen Spektrums an Methoden, die Zusammenarbeit mit anderen Instituten und den Aufenthalt an der University of Iowa, USA. Nicht zuletzt standen sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Prof. Dr. Kregel gilt mein Dank für die Unterstützung während meines Aufenthaltes am Institut für Exercise Physiology an der University of Iowa.

Frau Amonait danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen und der Lösung im Labor aufgetretener Probleme. Frau Richter und Frau Grätzsch lehrten mich die Methode der Polymerasekettenreaktion und standen mir hilfreich zur Seite.

Ich möchte mich auch für die finanzielle Unterstützung durch die Studentische Forschungsförderung der Charité und des DAAD bedanken.

Schließlich danke ich all denen, die hier nicht namentlich erwähnt wurden aber mich direkt oder indirekt bei meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

# Anhang C

## Veröffentlichungen

1. H. M. Stauss, U. Neumann, K. D. Roigk, P. B. Persson. Autonomic control of blood pressure and heart rate during heat stress in mice. *Europ J Physiol*, 437: R170, 1999.
2. U. Neumann, Y. Amoneit, P. B. Persson, H. M. Stauss. Modulation of hemodynamic responses to different stressors in conscious endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knock-out mice. *DMW*, 124:S112, 1999.
3. U. Neumann, Y. Amoneit, P. B. Persson, H. M. Stauss. Differential effects of NO derived from eNOS or nNOS on the cardiovascular responses to different stressors in conscious mice. *Europ J Physiol*, 439(6):R338, 2000.
4. U. Neumann, K. D. Wagner, H. Scholz, P. B. Persson, H. M. Stauss. Neuronally derived nitric oxide limits sympathetic responses to stress by inhibiting tyrosine hydroxylase gene expression. *Europ J Physiol*, 441(6):R145, 2001.
5. U. Neumann, P. B. Persson, H. M. Stauss. Mechanisms for hypertension in conscious mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase. *Submitted*.

# Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar, die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Ulrike Neumann

3. Juli 2002