

Aus dem Institut für experimentelle und klinische  
Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Dominiak

---

**Charakterisierung der Stickstoffmonoxid-Synthase-Isoformen  
in kardiovaskulär relevanten Organen während der Entwicklung  
der spontanen Hypertonie bei Ratten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von  
**Antonia Sassmann**  
aus Hamburg

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Dominiak

2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.07.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis	I
	Seitenzahl
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1. Spontan hypertensive Ratten als Tiermodell für die essentielle Hypertonie	1
1.2. Stickstoffmonoxid und Hypertonie	3
1.3. Isoformen der NO-Synthasen	7
1.4. Hypothese und Fragestellung	9
<b><u>2. Material</u></b>	<b><u>11</u></b>
2.1. Tiere	11
2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien	11
2.3. Substanzen	12
2.4. Kommerzielle Kits	14
2.5. Lösungen	15
2.5.1. Lösungen für die RT-PCR	15
2.5.2. Lösungen für den Western Blot	15
2.5.3. Lösungen für die Immunhistologie	17
<b><u>3. Methoden</u></b>	<b><u>18</u></b>
3.1. Plethysmographische Blutdruckmessung	18
3.2. Gewebeentnahme	18
3.3. RNA-Isolierung	19
3.4. RT-PCR	20
3.4.1. Reverse Transkriptase-Reaktion	20
3.4.2. Polymerase-Kettenreaktion	21
3.4.3. Primerdesign und Auswahl	22
3.4.4. Gelelektrophorese	24

---

	Seitenzahl
3.4.5. Auswertung	24
3.4.6. Restriktionsanalyse	25
<b>3.5. Western-Blot</b>	<b>25</b>
3.5.1. Probenherstellung	25
3.5.2. Gesamtproteinbestimmung nach Lowry	26
3.5.3. Gelelektrophorese	26
3.5.4. Transfer	27
3.5.5. Detektion	27
3.5.6. Auswertung	28
<b>3.6. Immunhistologische Lokalisation der NOS-Isoformen</b>	<b>28</b>
<b>3.7. Statistische Auswertung</b>	<b>29</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Kardiovaskuläre Parameter der Versuchstiere</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Optimierung der PCR für nNOS, eNOS und iNOS</b>	<b>31</b>
4.2.1. Primerauswahl	32
4.2.2. Magnesiumchloridkonzentration	33
4.2.3. Annealingtemperatur	35
4.2.4. Zyklenzahl	36
4.2.5. Restriktionsanalyse	37
4.2.6. PRC-Bedingungen für $\beta$ -Aktin	38
<b>4.3. Bestimmung der Genexpression von nNOS und eNOS auf mRNA- und Proteinebene in der HHN-Achse</b>	<b>40</b>
4.3.1. nNOS im Hypothalamus	40
4.3.2. nNOS in der Hypophyse	40
4.3.3. nNOS in der Nebenniere	41
4.3.4. eNOS im Hypothalamus	44
4.3.5. eNOS in der Hypophyse	44
4.3.6. eNOS in der Nebenniere	45
<b>4.4. Bestimmung der Genexpression von nNOS und eNOS auf mRNA- und Proteinebene in dorsaler und ventraler Medulla</b>	<b>47</b>

	Seitenzahl
4.4.1. nNOS in der dorsalen Medulla	47
4.4.2. nNOS in der ventralen Medulla	48
4.4.3. eNOS in der dorsalen Medulla	49
4.4.4. eNOS in der ventralen Medulla	50
<b>4.5. Bestimmung der Genexpression von nNOS und eNOS auf mRNA- und Proteinebene in Aorta und Niere</b>	<b>52</b>
4.5.1. nNOS in der Aorta	52
4.5.2. nNOS in der Niere	52
4.5.3. eNOS in der Aorta	53
4.5.4. eNOS in der Niere	54
4.5.5. Proteinmengen von nNOS und eNOS in Aorta und Niere	54
<b>4.6. Bestimmung der Genexpression von iNOS</b>	<b>55</b>
<b>4.7. Zusammenfassung der Expression der NOS-Isoenzyme</b>	<b>55</b>
<b>4.8. Immunhistologischer Nachweis der NOS-Isoenzyme</b>	<b>55</b>
4.8.1. HHN-Achse	55
4.8.2. Dorsale und ventrale Medulla	59
4.8.3. Zusammenfassung	60
<b>5. Diskussion</b>	<b>61</b>
5.1. NOS-Expression in der HHN-Achse und essentielle Hypertonie	61
5.2. NOS-Expression im Hirnstamm und essentielle Hypertonie	67
5.3. NOS-Expression und essentielle Hypertonie in der Aorta	69
5.4. NOS-Expression und essentielle Hypertonie in der Niere	72
5.5. Expression von iNOS	73
5.6. Schlussfolgerungen	74
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>90</b>

<b>8.1. Veröffentlichungen</b>	<b>90</b>
<b>8.2. Poster</b>	<b>90</b>
<b>8.3. Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>8.4. Lebenslauf</b>	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Conversions-Enzym
ANG II	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
cDNA	komplementäre DNA
CVLM	caudale ventrolaterale Medulla
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	dorsale Medulla
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
ECL	enhanced chemoluminescence
EDRF	endothelium derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-Arginin-methyl-ester
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monomethyl-L-Arginin
LRt	Nucleus reticularis lateralis
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NGS	normal goat serum
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NTS	Nucleus tractus solitarii
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline

---

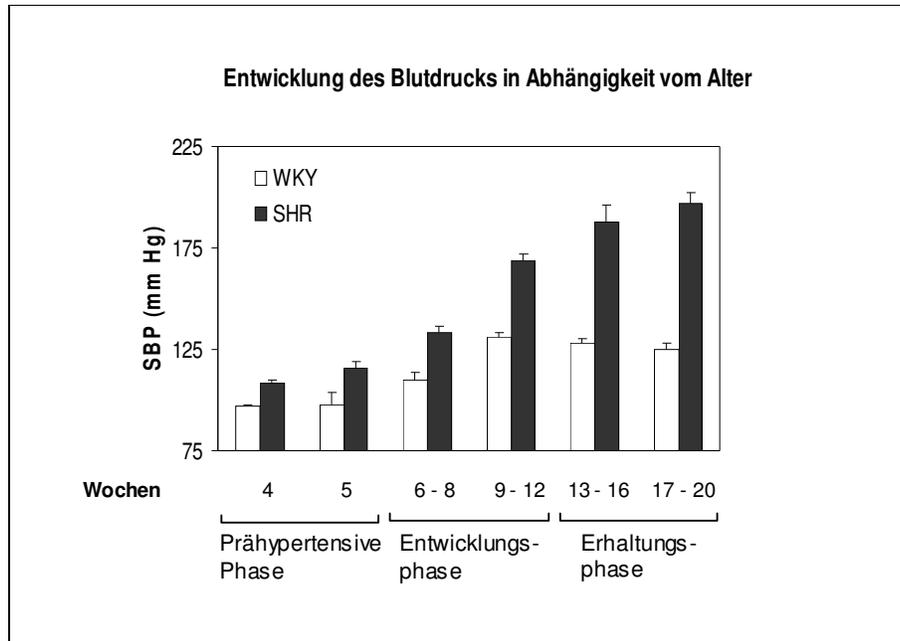
PBST	phosphate buffered saline + Triton X-100
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVN	Nucleus paraventricularis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonulease
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-Reaktion	reverse Transkriptase-Reaktion
RVLM	rostrale ventrolaterale Medulla
SBP	systolischer Blutdruck
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of mean (mittlerer Fehler des Mittelwerts)
SHR	spontan hypertensive Ratte
SON	Nucleus supraopticus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
VM	ventrale Medulla
WKY-Ratte	Wistar-Kyoto Ratte

## 1. Einleitung

### 1.1. Spontan hypertensive Ratten als Tiermodell für die essentielle Hypertonie

Spontan hypertensive Ratten (SHR) werden als Tiermodell für die essentielle Hypertonie des Menschen herangezogen, da es vielfältige Parallelen zwischen den beiden Hypertonieformen gibt. Dazu zählen die genetische Komponente, Ähnlichkeiten im Verlauf der Hochdruckentwicklung sowie ein Zusammenhang zwischen Hochdruck und Salzaufnahme. Auch die Folgeschäden, die durch den erhöhten Blutdruck hervorgerufen werden, treten bei SHR in ähnlicher Weise auf wie beim Menschen. Hier sind insbesondere zerebrale Infarkte oder Blutungen zu nennen, außerdem Myokardinfarkte und -fibrosen sowie die Nephrosklerose (*Ganten, 1987*). Diese Folgeschäden können durch eine antihypertensive Therapie verringert werden, da auch adulte SHR auf antihypertensiv wirkende Medikamente, wie sie in der Humanmedizin eingesetzt werden, ansprechen (*Korner, 1995; Schiffrin, 1998*).

SHR wurden an der Universität von Kyoto aus einer Kolonie von Wistar-Ratten gezüchtet, welche weiterhin die normotensive Kontrolle dieses Hypertoniemodells darstellen. Okamoto und Aoki (*1969*) wählten aus dieser Population ein männliches Tier aus, dessen mittlerer systolischer Blutdruck mit 145-175 mmHg deutlich über dem durchschnittlichen Blutdruck von 120-140 mmHg lag. Dieses Tier wurde mit einem normotensiven weiblichen Tier verpaart, und unter dem Nachwuchs wurden die weiblichen und männlichen Tiere ausgesucht, die über eine Zeit von mehr als einem Monat einen mittleren systolischen Blutdruck von über 150 mmHg aufwiesen. Diese Tiere wurden weiter untereinander gekreuzt, so dass durch weitere Zucht im Jahre 1969 die SHR entstanden (*Okamoto, 1969*). SHR entwickeln zu 100% einen systolischen Blutdruck von über 180 mmHg. Die Entwicklung des Hochdrucks beginnt in der 5.-7. Lebenswoche, bis dahin sind die Tiere normotensiv (prähypertensive Phase). Der Anstieg erfolgt bis zur ca. 10. Woche (Entwicklungsphase) und geht anschließend in ein Plateau über (Erhaltungsphase) (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Entwicklung des systolischen Blutdrucks (SBP) in männlichen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar Kyoto Ratten (WKY) (nach Minami et al., 1989)

Die Blutdruckerhöhung bei SHR ist zum größten Teil durch eine Zunahme des peripheren Widerstandes bedingt. Am Anfang wird dies durch eine neurogen bedingte Vasokonstriktion verursacht, später spielen strukturelle Gefäßwandveränderungen eine Rolle (Dickhout et al., 1997). Zusätzliche hypertoniebedingte Komplikationen wie zerebrale Infarkte, Myokardinfarkte, Myokardfibrose und Nephrosklerose bewirken bei SHR eine eingeschränkte Lebenserwartung von ca. 18 Monaten im Gegensatz zu 24 Monaten bei normotensiven Ratten (Yamori und Lovenberg, 1987). Die Pathomechanismen der Hypertonusentwicklung sind bisher nicht vollständig geklärt, es wird aber angenommen, dass die Ursache in der Fehlfunktion zentraler Regulationsmechanismen liegt. Darauf weisen bei SHR Veränderungen im zentralen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Salaymeh et al., 1986), im noradrenergen System (Wijnen et al., 1980) und in der Vasopressin- (AVP) und Oxytozinausschüttung (Morris et al., 1983) hin. Wegweisend sind außerdem Befunde, dass bei SHR bereits in der prähypertensiven Phase eine verminderte Sensitivität des Baroreflexes (Minami et

*al.*, 1989) sowie ein erhöhter Sympathikotonus (*Cabassi et al.*, 1998) bestehen. Infolge des erhöhten Sympathikotonus reagieren SHR mit einem verminderten Blutdruckabfall auf intrakraniell applizierte Hemmstoffe des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE) (*Berecek et al.*, 1987).

Bei SHR spielt außerdem das zentrale Stickstoffmonoxid (NO)-cGMP-System in der Pathogenese des Hypertonus eine bedeutende Rolle. Es existieren Hinweise, dass ein gestörter L-Arginin-Metabolismus (s. Abb. 2) der SHR für den Hypertonus mitverantwortlich ist, da sich in SHR ein stärkerer Blutdruckabfall nach Injektion von L-Arginin oder einem NO-Donator in die rostrale ventrolaterale Medulla (RVLM) zeigte als bei WKY-Ratten (*Kagiyama et al.*, 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass bei SHR der Blutdruckanstieg auf intrazerebral applizierte NO-Synthase (NOS) -Inhibitoren im Gegensatz zu normotensiven Kontrolltieren geringer ausfiel, was auf eine geringere NOS-Aktivität in zerebralen kardiovaskulären Regulationszentren zurückzuführen ist (*Dominiczak und Bohr*, 1995).

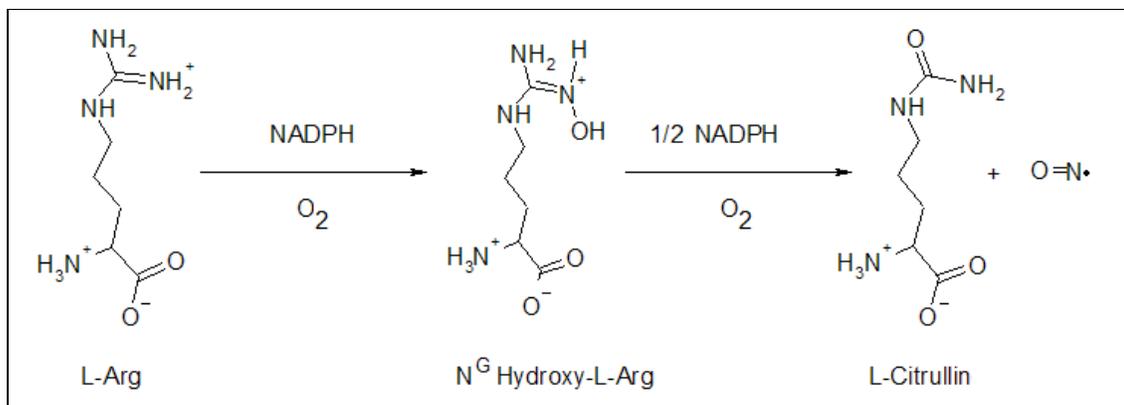
## 1.2. Stickstoffmonoxid und Hypertonie

NO, dessen Rolle als Neurotransmitter und Neuromodulator bekannt ist, wurde Anfang der Achtziger Jahre von Furchgott entdeckt und Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) genannt (*Furchgott und Zawadzki*, 1980). Er beobachtete, dass viele gefäßerweiternde Stoffe ihre Wirkung verlieren, sobald die Endothelzellen der Blutgefäße entfernt worden waren. Hieraus folgerte er, dass diese Stoffe nicht direkt vasodilatierend auf die glatte Gefäßmuskulatur wirken, sondern durch sie vasodilatorische Substanzen aus dem Endothel freigesetzt werden. In den folgenden Jahren stellte sich heraus, dass hierbei in glatten Gefäßmuskelzellen ein vergleichbarer intrazellulärer Signaltransduktionsweg zugrunde liegt wie bei den Nitrovasodilatoren. Später wurde EDRF als NO identifiziert (*Moncada et al.*, 1988).

Physiologische Stimuli für die NO-Produktion sind z.B. Scherstress in Gefäßen oder eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration. Diese stellen auch Stimuli für die vermehrte Genexpression der NOS dar (*Dominiczak und Bohr*, 1995). Außerdem kann die Genexpression sowohl transkriptionell als auch

posttranskriptionell durch NO selbst reguliert werden (*Nathan und Xie, 1994*). NO bewirkt weiterhin eine direkte Inhibition der NOS, indem es an das Häm der prosthetischen Gruppe von NOS bindet (negatives Feedback).

In Endothelzellen wird NO von der (endothelialen) NOS produziert, die durch Stimulierung von membranständigen Rezeptoren durch z.B. Acetylcholin, Serotonin, Histamin u.a. oder mechanische Einflüsse aktiviert wird. Bei der Reaktion wird das Guanidin-Nitrogen-Ende der Aminosäure L-Arginin oxidiert, so dass über die Zwischenstufe N-Hydroxy-L-Arginin L-Citrullin und NO entstehen (Abb. 2). Diese Reaktion benötigt neben den Cosubstraten Sauerstoff und NADPH noch zusätzliche Redoxfaktoren wie enzymgebundenes Häm, reduzierte Thiole, FAD, FMN und Tetrahydrobiopterin (*Michel und Feron, 1997*).



**Abbildung 2:** Reaktionsgleichung der endogenen Stickstoffmonoxid-Synthese.  
L-Arg: L-Arginin

NO hat eine Halbwertszeit von 5-30 Sekunden, in der es ca. 100-600 µm weit diffundieren kann. NO ist membranpermeabel, es kann als Gas zwischen den Zellen frei diffundieren und so als autokriner und parakriner Faktor auf die umgebenden Zellen wirken. Es ist nicht in Vesikeln gespeichert wie andere Transmitter, und es kann die Signaltransduktionswege membrangebundener Rezeptoren umgehen. So wirkt NO nicht an Rezeptoren in der Zellmembran,

sondern hat seine Ziele im Inneren der Zelle. Das am besten erforschte ist die zytosolische Guanylylzyklase (*Kobialka et al., 2000; Pyriochou et al., 2005*). Neben der gefäßdilatierenden und einer immunmodulatorischen (*Bogdan, 2001*) Wirkung erfüllt NO wichtige regulatorische Funktionen als Neurotransmitter im ZNS. Nahezu überall im Gehirn können NOS-Enzymaktivitäten festgestellt werden. Hirnregionen mit hoher NOS-Enzymaktivität sind Cerebellum, Hypothalamus (besonders Nucleus paraventricularis (PVN) und Nucleus supraopticus (SON)), Neurohypophyse und Mittelhirn. Im Verhältnis dazu geringe Aktivitäten zeigten sich in Hippocampus, Striatum, Cortex und Medulla oblongata (*Förstermann et al., 1990; Qadri et al., 1999 und 2003*). Dem Hypothalamus als übergeordnetem Zentrum sowie dem Nucleus tractus solitarii (NTS) und der rostralen ventrolateralen Medulla (RVLM) kommen die zentrale autonome Kontrolle des ausgehenden Sympathikotonus zu, wobei NO als Depressor der sympathischen Aktivität agiert. Dies zeigen Versuche mit intrazerebralen NO-Applikationen in den PVN, den NTS und die RVLM, die signifikante Blutdruckabfälle hervorriefen (*Tseng et al., 1996; Horn et al., 1994; Lewis et al., 1991*). Die Senkung des Sympathikotonus und damit auch des Blutdrucks vermittelt hauptsächlich NO, das durch die neuronale NO-Synthase (nNOS) synthetisiert wird. Die Fähigkeit, den vom Hirnstamm ausgehenden Sympathikotonus zu vermindern, wird z.B. durch GABA vermittelt, deren Freisetzung NO stimuliert (*Zhang und Patel, 1998*). Somit scheint die sympathische Nervenaktivität in vielen Hirnkernen durch NO reguliert und u.a. durch GABA vermittelt zu sein.

Wichtige Regelkreise, die für die Homöostase verschiedener neuroendokriner und vegetativer Funktionen verantwortlich sind, basieren auf der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse). Der Hypothalamus setzt, beeinflusst auch durch NO, Releasinghormone frei, die auf die Hypophyse wirken und dort die Freisetzung anderer Hormone anregen, die dann auf periphere Organe wie die Nebenniere wirken können (*Bredt et al., 1990; Ceccatelli et al., 1993; Kadowaki et al., 1994; Kato, 1992; Rettori et al., 1997*). Hierzu gehört die Produktion von CRH (Corticotropin-Releasing-Hormon) im Hypothalamus, das im Hypophysenvorderlappen die Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) stimuliert. ACTH stimuliert die Freisetzung von Glukokortikoiden in der

Nebenniere, die wiederum über negatives Feedback die CRH- und ACTH-Ausschüttung hemmen.

Im PVN und SON des Hypothalamus existiert NOS zusammen mit AVP und Oxytozin, so dass NO hier inhibierend auf die Synthese dieser Hormone wirken kann. (McCann *et al.*, 1996). Auf die Hypophyse hat NO ebenfalls inhibitorische Effekte, es hemmt hier die Freisetzung von Hormonen wie AVP und Oxytozin. Hierbei greift NO nicht nur in die basale Sekretion ein, sondern es kann zusätzlich stimulierte Hypophysenzellen inhibieren (Costa *et al.*, 1996).

Auch in der Nebenniere ist NOS nachgewiesen worden. Besonders im Nebennierenmark ist sie in Ganglienzellen und Nervenfasern enthalten, die mit den katecholaminproduzierenden chromaffinen Zellen in Kontakt stehen (Snyder und Bredt, 1991; Iwai *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1998; Marley *et al.*, 1995). Außerdem verfügen diese Zellen über ein eigenes autokrines NO-cGMP-System. Da die Gabe des NOS-Inhibitors N<sup>G</sup>-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) die basale Sekretion von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin steigerte und dieser Effekt durch die Applikation von L-Arginin aufgehoben wurde (Ward *et al.*, 1996), wird vermutet, dass die basale NO-Synthese die Sekretion von Katecholaminen in der Nebenniere hemmt (Schwarz *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1991; Ward *et al.*, 1996).

Auch das Blutdruck regulierende RAAS wird von NO beeinflusst. Ein Anstieg von Angiotensin II (ANG II) stimuliert die NO-Synthese und -Freisetzung. Dieses NO hemmt wiederum die ACE-Aktivität und führt zur Downregulation der AT<sub>1</sub>-Rezeptorexpression auf transkriptioneller Ebene, was ein negatives Feedback für die weitere ANG II-Produktion darstellt (LinZ *et al.*, 1999). Diese Balance zwischen NO und RAAS scheint hauptsächlich durch NO gesteuert zu werden (Fernandez-Alfonso und Gonzalez, 1999). ANG II und NO könnten so in homöostatische Mechanismen eingegliedert sein, die der Regulation von Gefäßstruktur und -funktion dienen. Die beiden Systeme beeinflussen sich auch in weiteren Bereichen. So ändert sich die Expression der nNOS-mRNA in der Niere in zeitlichem Zusammenhang konkordant mit der Renin-Aktivität (Schricker *et al.*, 1996), und ANG II bewirkt im Tierversuch eine vermehrte eNOS-mRNA- sowie eNOS-Protein-Synthese im Endothel von pulmonalen Gefäßen (Olson *et al.*, 1997; Hennington *et al.*, 1998). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass SHR im Gegensatz zu WKY-Ratten eine größere Anzahl an Tubuluszellen besitzen, die

nNOS enthalten (*Fernandez et al., 2003*). Dies kann als protektiver Mechanismus für die Nierenfunktion angesehen werden, da erhöhte Mengen von nNOS insbesondere in Tubulus- und Sammelrohrzellen bei SHR einer exzessiven Natriumretention entgegenwirken, die eine bestehende Hypertonie verschlechtern würde.

### 1.3. Isoformen der NO-Synthasen

Von der NO-Synthase existieren drei Isoformen, die neuronale (nNOS), die endotheliale (eNOS) und die induzierbare (iNOS). Benannt wurden die Isoformen nach dem Gewebe, in dem sie vorrangig exprimiert werden bzw. nach ihrer Eigenschaft der Induzierbarkeit. Die nNOS wird von Neuronen exprimiert, die eNOS im Endothel von Blutgefäßen und die iNOS in Immunzellen wie Makrophagen nach Antigenstimulation. Die drei Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Molekulargewichts, der Expressionsorte, der chromosomalen Lokalisation, der Kalziumabhängigkeit der Enzymaktivität und der Induzierbarkeit (Tab. 1). Gemeinsam ist ihnen das katalytische Zentrum, in dem die Bildung von NO aus L-Arginin erfolgt (Abb. 2).

NOS-Isoform	Molekulargewicht (kD)	Genlokation	Ort der Expression	Induzierbarkeit	Kalzium-Abhängigkeit
nNOS	160	Chromosom12 <sup>b</sup>	Neurone	eingeschränkt <sup>a</sup>	ja
eNOS	135	Chromosom 7 <sup>c</sup>	Gefäßendothel	nicht vorhanden	ja
iNOS	135	Chromosom17 <sup>d</sup>	Makrophagen	vorhanden	nein

**Table 1:** Eigenschaften der NOS-Isoformen

<sup>a</sup>Michel und Feron, 1997; Krukoff, 1999; <sup>b</sup>Nakane et al., 1993; <sup>c</sup>Marsden et al., 1993; <sup>d</sup>Xu et al., 1993

Die **nNOS** wird nicht nur im Nervengewebe exprimiert, sondern auch in Skelettmuskelzellen, im Epithel von Bronchien, in der Trachea und in der Nebenniere. Die nNOS ist ein zytosolisches Enzym, bildet nur relativ kleine Mengen NO und wird unter physiologischen Bedingungen konstitutiv im Gewebe exprimiert.

Die nNOS spielt eine wichtige Rolle bei der kardiovaskulären Homöostase, wie bereits in Kapitel 1.2. eingehend beschrieben wurde. Sie ist in vielen für die kardiovaskuläre Regulation wichtigen Gehirnregionen zu finden (*Rodrigo et al., 1997; Vincent and Kimura, 1992*), und dort produziertes NO wirkt als potenter inhibitorischer Neurotransmitter, indem es die Aktivität des sympathischen Nervensystems regulieren kann (*Cabrera und Bohr, 1995*). So wirkt nNOS im Hirnstamm inhibierend auf den von dort ausgehenden Sympathikotonus und vermittelt Blutdruckabfall und Abnahme der Herzfrequenz (*Kagiyama et al., 1998; Spyer et al., 1994*). Auch im Hypothalamus ist nNOS die prädominante Form. Dort kann NO neben der sympathischen Nervenaktivität zusätzlich die Aktivität der HHN-Achse beeinflussen, z.B. indem es die Freisetzung von CRH inhibiert.

Die **eNOS** wurde erstmals in Gefäßendothelzellen nachgewiesen. Sie ist aber auch in glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten und Caveolae (*Michel, 1999*), Makrophagen (*Miles et al., 1998*), Thrombozyten und in Neuronen wie den hippocampalen Pyramidenzellen lokalisiert. eNOS wird konstitutiv exprimiert; es existiert sowohl eine membrangebundene als auch eine zytosolische Form (*Alderton et al., 2001*).

Von eNOS produziertes NO reguliert unter physiologischen Bedingungen den Blutfluss sowie den Gefäßtonus. Durch Stimulation von spezifischen endothelialen Rezeptoren, z.B. dem M<sub>3</sub>-Muskarinrezeptor oder dem B<sub>1</sub>-Bradykininrezeptor, oder auch Scherstress kommt es zur Erhöhung der Kalziumkonzentration in den Endothelzellen. Dies bewirkt die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von membrangebundener und zytosolischer eNOS (*Church und Fulton, 2006*). NO, das im Endothel synthetisiert wurde, diffundiert zum einen in die glatten Gefäßmuskelzellen und führt dort zur Relaxation, zum anderen gelangt es in die Blutbahn und entfaltet eine aggregationshemmende Wirkung auf Thrombozyten und beeinflusst so den Blutfluss (*Loscalzo, 2001*). Die Relaxation, als Antwort auf das von eNOS gebildete NO, ist in Arterien deutlich größer als in Venen (*Moncada*

und Higgs, 1993), was die starke Auswirkung auf den Blutdruck bedingt. So führt im Tierexperiment die Überexpression von eNOS in Endothelzellen zu Hypotension, aber auch zu verminderter Reaktivität auf Vasodilatoren, die NO-vermittelt wirken (Ohashi et al., 1998).

Die **iNOS** wurde erstmals aus Makrophagen isoliert. Der Name entstand durch den Befund, dass dieses Enzym bei Immunaktivierung induziert wird. iNOS lässt sich in den unterschiedlichsten Zellarten nachweisen wie z.B. in Muskelzellen, Epithelien, Bindegewebszellen und auch in Leukozyten. Im Gehirn wird iNOS von Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen exprimiert. Da iNOS Kalmodulin als prosthetische Gruppe gebunden hat, ist die Aktivität somit nahezu unabhängig von der Kalziumkonzentration (Cho et al., 1992).

Die NO-Bildung durch iNOS ist ein Teil der nichtspezifischen Immunabwehr (Moncada, 1992), wobei NO als zytotoxisches Agens gegen Tumorzellen, Bakterien, Pilze und Protozoen fungiert. Es wird daher weniger als Teil der Regulation des Gefäßtonus angesehen, obwohl Studien die Beteiligung von iNOS an der Regulation der renalen Funktion und des arteriellen Blutdrucks nahe legen (Mattson et al., 1998). Auch nach Verletzungen ist iNOS an der Gefäßdilatation mit konsekutiver Hyperperfusion beteiligt (Rubinstein et al., 1998). Die wesentliche Rolle der iNOS wird in iNOS-defizienten Mäusen deutlich, die vor allem anfälliger für entzündliche Geschehen sind, aber resistenter gegen septischen Schock (Mashimo und Goyal, 1999), bei dem u.a. iNOS den Blutdruckabfall aufgrund gesteigerter Vasodilatation vermittelt.

#### **1.4. Hypothese und Fragestellung**

Bei der Pathogenese des Hypertonus bei SHR spielt das NO-cGMP-System eine bedeutende Rolle. So führte die spezifische Blockade der nNOS im Rattenhirn durch 7-Nitroindazol nur bei SHR zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks, nicht aber bei WKY-Ratten (Qadri et al., 1999). Wir vermuten daher, dass die vermehrte Produktion von NO durch nNOS im Gehirn einen Gegenregulationsmechanismus zum Hypertonus darstellt, bei dem eine gesteigerte NO-Produktion in den blutdruckrelevanten Hirnregionen einem

erhöhten Blutdruck und Sympathikotonus entgegen zu wirken versucht. Weiterhin konnten wir zeigen, dass im prähypertensiven Stadium bei SHR eine verminderte NOS-Aktivität in Cortex und Hirnstamm besteht, wohingegen diese im Stadium der Erhaltungsphase bei SHR erhöht ist. Die erhöhte NOS-Aktivität in Hypothalamus und Hirnstamm ist daher wahrscheinlich an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie beteiligt (*Qadri et al., 2003*).

Auf diesen Ergebnissen basiert in der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass in verschiedenen blutdruckrelevanten Hirnregionen bei SHR während der Entwicklung der Hypertonie eine im Gegensatz zu normotensiven Kontrolltieren veränderte Genexpression der NOS-Isoformen vorliegt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionsmuster der NOS-Isoformen genauer zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere gezeigt werden, wie sich die Genexpression der NOS-Isoformen auf mRNA- und Proteinebene während der Entwicklung der essentiellen Hypertonie verhält. Untersucht werden sollten mRNA- und Proteinmenge von nNOS, eNOS und iNOS in für die Blutdruckregulation relevanten zentralnervösen Bereichen (Hypothalamus, ventrale Medulla, dorsale Medulla, Hypophyse und Nebenniere) und in peripheren Organen (Aorta, Niere), die an der Blutdruckregulation beteiligt sind. Um die unterschiedliche Expression der NOS-Isoformen darzustellen, werden SHR in der prähypertensiven Phase, der Entwicklungsphase und in der Erhaltungsphase untersucht, jeweils im Alter von 3-4, 7-8 und 12-13 Wochen postnatal. Die gleichaltrigen, normotensiven WKY-Ratten werden als Kontrolltiere verwendet. So kann dargelegt werden, in welchem Alter bzw. in welcher Phase der Blutdruckentwicklung die Genexpression der drei NOS-Isoformen auf RNA- oder Proteinebene Veränderungen aufweist.

## 2. Material

### 2.1. Tiere

Männliche spontan hypertensive Ratten (SHR) und gleichaltrige Wistar-Kyoto Ratten (WKY-Ratten) wurden von Charles River, Sulzfeld, Deutschland im Alter von 3-4 Wochen (prähypertensive Phase), 7-8 Wochen (Entwicklungsphase) und 12-13 Wochen (Erhaltungsphase) bezogen.

Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum bei ca. 24°C und konstanter Luftfeuchtigkeit (65%) in Käfigen zu fünf Tieren bei einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus (7-19 Uhr) gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Altromin<sup>®</sup> Standardfutter für Ratten und Mäuse). Das Streumaterial in den Käfigen (Altromin<sup>®</sup> Tiereinstreufasern) wurde wöchentlich erneuert.

Die Experimente wurden gemäß den Richtlinien der „National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ durchgeführt, die Genehmigungen durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, Deutschland sowie der Ethik-Kommission der Universität Lübeck lagen vor (Universitätsinterne Tierversuchsnummer: 9/A38/01).

Zwei Tage vor der Gewebeentnahme wurden die Tiere gewogen und der systolische Blutdruck (SBP) sowie die Herzfrequenz (HF) mit der Tail-Cuff-Methode bestimmt (*Raasch et al., 2002*).

### 2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blotkammer (Hoefer <sup>®</sup> Semi Phor <sup>™</sup> )	Amersham, Deutschland
Blutdruckmessgerät Recomed 130-T	TSE, Bad Homburg
Brutschrank (Begasungsbrutschrank)	Heraeus, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Deutschland
Electrophoresis Power Supply (EPS 600)	Pharmacia Biotech, UK
Film (Hyperfilm <sup>™</sup> )	Pharmacia Biotech, UK

Filmkassette (Hypercassette)	Pharmacia Biotech, UK
Gelkammer (Mini-Protean <sup>®</sup> 3-Cell)	Bio-Rad, USA
Gelwanne (Sub-Cell <sup>®</sup> )	Bio-Rad, USA
Glaspottergefäße	Schuett, Deutschland
Inkubationsofen (OV2)	Biometra, Deutschland
Kamera (CCD Colour Camera)	Phase, Deutschland
Kamera (Cell Cam)	Phase, Deutschland
Kryotom (CM 3050)	Leica, Deutschland
Küvetten (Cuvettes No./Ref 67.742)	Sarstedt, Deutschland
Leuchttisch (prolite Scan SC)	Kaiser, Deutschland
Membran (Immobilon-P Transfer Membrane)	Millipore Corp., USA
Mikroskop (IM 35)	Zeiss, Deutschland
Mikrowelle (M817)	Cortina, Deutschland
Objektträger (Silane Prep <sup>™</sup> slides)	Sigma, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (mit Deckel; 0,2 ml)	Biometra, Deutschland
Power Supply (Power Pac 300)	Bio-Rad, Deutschland
Schüttler (WT 17)	Biometra, Deutschland
Stabhomogenisator (Ultra-Turrax T8)	IKA-Werke, Deutschland
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415D)	Eppendorf, Deutschland
Thermoblock (Schnipptherm)	Schutron, Deutschland
Thermocycler (T-Gradient, Uno Thermoblock)	Biometra, Deutschland
UV-Spektrometer (Smart Spect <sup>™</sup> 3000)	Bio-Rad, Deutschland
UV-Spektrometer (LKB Ultrospec Plus)	Pharmacia Biotech, UK
UV-Tisch (312nm)	Phase, Deutschland
6-Well-Platten (Cellstar <sup>®</sup> Gewebekulturplatte)	Greiner, Deutschland
Zentrifuge (Centrifuge 5402)	Eppendorf, Deutschland

### 2.3. Substanzen

Acrylamid (Acryl Amide / Bis Solution)	Gibco, UK
Agarose NEE0	Roth, Deutschland
Antikörper Anti-eNOS	Transduction, Deutschland
Antikörper Anti-iNOS	Transduction, Deutschland

---

Antikörper Anti-nNOS	Transduction, Deutschland
Aprotinin (Trasylo <sup>®</sup> )	Bayer Vital, Leverkusen
APS 10% (Ammoniumpersulfat)	Life Technologies, UK
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech, UK
BSA (Albumin aus Rinderserum)	Sigma, Deutschland
Chloroform	Sigma, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Deutschland
Dithiothreitol	Pharmacia Biotech, UK
DNA-Marker (100bp Molecular Ruler DNA Size Standard)	Bio-Rad, Deutschland
DNA-Polymerase (DyNAzyme <sup>™</sup> )	Biometra, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz)	Sigma, Deutschland
EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure)	Sigma, Deutschland
Entwickler (Kodak GBX developer and replenisher)	Sigma, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
Ethidumbromid (Lösung, 10 mg/ml)	Bio-Rad, Deutschland
Eukitt <sup>®</sup>	Kindler, Deutschland
Fixierer (Kodak GBX fixer and replenisher)	Sigma, Deutschland
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck, Deutschland
Glycerol	Life Technologies, UK
Glycin	Pharmacia Biotech, UK
Kaliumchlorid	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat	Merck, Deutschland
Kupfersulfat (II)-Pentahydrat	Merck, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deutschland
Methanol	Sigma, Deutschland
Milchpulver (Skim Milk Powder)	Fluka, Schweiz
Natriumcarbonat	Merck, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung (0,9%)	Merck, Deutschland
Natriumdihydrophosphat-Monohydrat	Merck, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS)	Gibco, UK
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deutschland

---

Primer für $\beta$ -Aktin, nNOS, eNOS, iNOS	Gibco, UK
Protein-Marker (Kaleidoscope™ Prestained Standards)	Bio-Rad, Deutschland
Restriktionsenzym BsmA I	BioLabs, Deutschland
Restriktionsenzym Dpn II	BioLabs, Deutschland
Restriktionsenzym Sac I	BioLabs, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Pharmacia Biotech, UK
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer; 10x)	Gibco, UK
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Pharmacia Biotech, UK
Tris (Trizma® Base)	Sigma, Deutschland
Tris-HCl (Trizma® Hydrochlorid)	Sigma, Deutschland
Tris-Puffer (0,5 M; pH 6,8)	Bio-Rad, Deutschland
Tris-Puffer (1,5 M; pH 8,8)	Bio-Rad, Deutschland
Triton® X-100	Merck, Deutschland
Tween® 20	ICN Biochemicals, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deutschland
Xylencyanol	Bio-Rad, Deutschland
Xylol	Merck, Deutschland

#### 2.4. Kommerzielle Kits

DAB Substrat Kit für Peroxidase	Vector Laboratories, USA
ECL™ (ECL Western Blotting detection system)	Amersham, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Deutschland
Reverse Transcription System	Promega, Deutschland
Vectastain ABC Elite Kit	Vector Laboratories, USA

## 2.5. Lösungen

### 2.5.1 Lösungen für die RT-PCR

Ladepuffer:                    200 µl Xylencyanol 0,1%  
                                      600 µl Glycerol  
                                      1200 µl DEPC-Wasser

DEPC-Wasser:                100 µl Diethylpyrocarbonat  
                                      100 ml Aqua bidest.  
    Lösung 12 h stehen lassen und im  
    Anschluß autoklavieren (100°C; 15 min)

### 2.5.2. Lösungen für den Western-Blot

Homogenisationspuffer:    50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
                                      0,1 mM EDTA  
                                      0,1 mM EGTA  
    1% Triton X-100  
    0,1% β-Mercaptoethanol  
                                      0,1 µM Phenylmethylsulfonylfluorid  
                                      0,1 µM Aprotinin

Folin-Reagenz:                3 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz  
                                      6 ml NaCl 0,9%

Lowry-Mix:                    98 ml NaCO<sub>3</sub> (20mM in 0,1n NaOH)  
                                      1 ml Na-K-Tartrat (100 mM)  
                                      1 ml CuSO<sub>4</sub> (40 mM)

SDS-Page:                    50% Tris-HCl (100 mM; pH 6,8)  
                                      27 mM SDS  
                                      40 % Glycerol

---

	40 mM Dithiothreitol
	60 µM Bromphenolblau
Trenngel:	4,85 ml Aqua bidest.
	2,5 ml Tris-Puffer (1,5 M; pH 8,8)
	100 µl SDS (10%)
	2,5 ml Acrylamid
	50 µl APS (1%)
	10 µl TEMED
Sammelgel:	3,05 ml Aqua bidest.
	1,25 ml Tris-Puffer (0,5 M; pH 6,8)
	50 µl SDS (10%)
	0,67 ml Acrylamid
	25 µl APS (1%)
	5 µl TEMED
Elektrophoresepuffer:	5 mM Tris
	39 mM Glycin
	0,69 mM SDS
	pH 8,4
Milchpuffer 5%:	5 g Magermilchpulver
	100 ml PBS-Tween-Puffer
Towbin-Blot-Puffer:	5 mM Tris
	39 mM Glycin
	0,69 mM SDS
	20% Methanol
	pH 8,2-8,4
PBS-Tween-Puffer:	65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O
	21 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O
	150 mM NaCl



### 3. Methoden

#### 3.1. Plethysmographische Blutdruckmessung

An wachen Ratten wurden systolischer Blutdruck (SBP) und Herzfrequenz (HF) plethysmographisch ermittelt (*Raasch et al., 2002*). Die Messung erfolgte in einer speziellen Messbox unter Begasung mit Sauerstoff (0,5 l/min) und Lachgas (2 l/min). Die Schwanzarterien wurden mit Rotlicht dilatiert, und dabei wurden die arteriellen Pulswellen mit einem Piezo-Element detektiert. Beim Aufpumpen einer angelegten Druckmanschette waren die Pulswellen zu dem Punkt nicht mehr detektierbar, zu dem der Manschettendruck den systolischen Blutdruck überschritt.

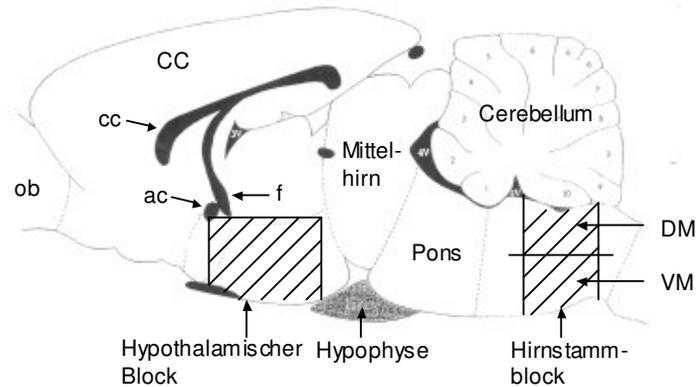
#### 3.2. Gewebeentnahme

Nach Dekapitation wurden Nebennieren, Nieren, Aorta und Gehirn entnommen. Die Hypophyse wurde vorsichtig aus der Sella turcica präpariert.

Durch das Gehirn wurden zwei koronare Schnitte geführt, einer durch das Chiasma opticum, der andere hinter dem Infundibulum. Aus dieser so erhaltenen Gehirnscheibe wurde der Hypothalamus als Block entnommen, indem Schnitte entlang der perihypothalamischen Sulci und horizontal unterhalb der Commissura anterior gesetzt wurden (Abb. 3). Der Hypothalamusblock enthält die großen hypothalamischen Kerngebiete Nucleus paraventricularis (PVN), Nucleus supraopticus (SON), Nucleus suprachiasmaticus, Nucleus periventricularis, Nucleus anterior, Nucleus arcuatus und einen Teil des lateralen und des posterioren Hypothalamus (*Palkovits und Brownstein, 1988*).

Der Hirnstamm wurde unter dem posterioren Cerebellum präpariert und entnommen. Durch einen Schnitt wurde dieser in einen vorderen und einen hinteren Abschnitt geteilt (Abb. 3). Der dorsale Teil, die dorsale Medulla (DM), enthält die Area postrema, den Kernkomplex des Nucleus tractus solitarii (NTS) und das Kerngebiet des Nervus vagus. Der ventrale Teil, die ventrale Medulla (VM), enthält die caudale und rostrale ventrolaterale Medulla (CVLM und RVLM) sowie den Nucleus ambiguus.

Sämtliche Gewebeproben wurden direkt nach ihrer Entnahme in  $-30^{\circ}\text{C}$  kaltem Isopentan schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.



**Abbildung 3:** Schema des Rattenhirns im Sagittalschnitt mit Darstellung der Schnittführungen zur Hirnarealpräparation; ac: Commissura anterior; ob: Bulbus olfactorius; CC: cerebraler Cortex; cc: Corpus callosum; DM: dorsale Medulla; f: Fornix; VM: ventrale Medulla; 1-10: Windungen des Cerebellums (Qadri et al., 2003)

### 3.3. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der Guanidiniumisothiocyanat-Methode mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland), das sämtliche Reagenzien zur RNA-Isolierung enthält.

Die Gewebeproben wurden mit einem Stabhomogenisator für ca. 1 min in RLT-Puffer, dem  $10\ \mu\text{l/ml}$   $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt wurde, homogenisiert, wobei pro 1 mg Gewebe  $20\ \mu\text{l}$  des RLT-Puffers eingesetzt wurden. Anschließend wurde dieses Homogenat (max.  $650\ \mu\text{l}$ ) mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt und für ca. 1 min gevortext. Nach dreiminütiger Zentrifugation ( $13.000\ \text{rpm}$ ) bei Raumtemperatur wurde der wässrige Überstand (max.  $600\ \mu\text{l}$ ) mit gleichem Volumen Ethanol (70%) zusammengeführt und gemischt. Dieses Gemisch wurde auf eine Säule („spin column“) aufgetragen und diese 15 s mit  $10.000\ \text{rpm}$  bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Das untere Ende der Säule war mit einer Silikat-Gel-Membran verschlossen, die polare RNA mit mehr als 200 Nukleotiden bindet. Zum Waschen wurde 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 s bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Hiernach erfolgte ein DNase-Verdau, wobei die RNA auf der Säule für 30 min bei Raumtemperatur mit 80 µl eines DNase-Inkubations-Mixes (RNase-Free DNase Set, Qiagen) inkubiert wurde. Die DNase-Behandlung diente zur Elimination einer potentiellen Kontamination mit genomischer DNA.

Im Anschluß erfolgten Waschschrte mit 350 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer. Im letzten Schritt wurde die an die Silikat-Gel-Membran absorbierte RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst, für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Konzentration der gelösten RNA wurde mit einem UV-Spektrometer bestimmt. Hierzu wurde die RNA im Verhältnis 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) bestimmt. Die Konzentration der RNA wurde mit folgender Formel berechnet:  
RNA-Konzentration =  $40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ .

Zur Prüfung der Reinheit wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt ( $A_{280}$ ), da bei dieser Wellenlänge auch Proteine das Licht absorbieren. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  sollte zwischen 1,9 und 2,3 liegen. Diesen Anforderungen entsprachen alle verwendeten Isolationsprodukte.

### **3.4. RT-PCR**

#### **3.4.1. Reverse Transkriptase-Reaktion**

Mit der Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) kann RNA unter Einsatz der RNA-gesteuerten DNA-Polymerase (auch Reverse Transkriptase) in einen Strang komplementärer DNA (cDNA) transkribiert werden. Die eingesetzte Reverse-Transkriptase (RT) stammt aus dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV).

Für die RT-Reaktion wurde das Reverse Transcription Kit von Promega (Deutschland) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 4 µl  $MgCl_2$  (25 mM), 2 µl RT-Puffer (10x), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,5 µl RNasin® Ribonuklease-Inhibitor

(40 U/ml), 0,8 µl AMV-RT (20 U/ml), 0,5 µg Oligo (dT)<sub>15</sub> Primer (0,5 µg/ml), 1 µg RNA und RNase-freies Wasser bis zum Endvolumen von 20 µl.

Zur Linearisierung und um eventuelle Verdrillungen zu lösen, wurde die RNA zunächst für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf 2°C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe des Reaktionsgemisches, und mit RNase-freiem Wasser wurde bis zum Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Im Thermocycler (T-Gradient, Uno Thermoblock; Biometra, Deutschland) erfolgte nun eine Inkubation bei 42°C für 15 min zur Transkription der RNA in die komplementäre DNA (cDNA). Die Reaktion wurde gestoppt durch Erhitzen auf 99°C für 5 min zur Inaktivierung der Reverse-Transkriptase. Im letzten Schritt wurde das Reaktionsgemisch auf 2°C abgekühlt und für 5 min bei dieser Temperatur gehalten. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Um zu überprüfen, ob RNA-Proben trotz DNase-Verdau mit genomischer DNA verunreinigt waren, wurde die AMV-RT dem Reaktionsansatz nicht zugegeben. Diese Proben wurden mittels PCR auf vorhandene DNA untersucht.

### 3.4.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1986 von Mullis et al. entwickelt. Es handelt sich um eine *in vitro*-Technik, mit der spezifische DNA-Abschnitte vervielfältigt werden können. Bei dieser Methode wird denaturierte DNA mit einer DNA-Polymerase und einem Primerpaar inkubiert, wobei die Primer die Synthese komplementärer DNA-Stränge einleiten; sie entsprechen dem 3'- und dem 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.

Während eines Reaktionszyklus wird zuerst die Doppelstrang-DNA in Einzelstränge denaturiert, dann erfolgt die Anlagerung der Primer. Schließlich werden von der DNA-Polymerase komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Die benutzte DNA-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*; sie ist hitzestabil und muss daher nicht nach jedem einzelnen Reaktionszyklus erneut hinzugegeben werden.

Damit die PCR unter bestmöglichen Bedingungen ablaufen kann, müssen die Primer für das zu amplifizierende Segment ausgewählt und verschiedene Reaktionsbedingungen optimiert werden. Dies sind MgCl<sub>2</sub>-Konzentration,

Temperatur der Primer-Anlagerung und Anzahl der Zyklen der Amplifikation. Zu diesem Zweck wurde für jedes einzelne Gewebe in PCR-Testläufen die optimalen Bedingungen ermittelt.

Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 3 µl cDNA, 0,3 µl dNTP (10 mM), 0,6 bzw. 1,2 µl (primerspezifisch) MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,7 µl Reverse Transcription Puffer (10x), 1,5 µl Sense Primer (10 pmol/µl), 1,5 µl Antisense Primer (10 pmol/µl), 0,38 µl Taq-DNA-Polymerase (2 U/µl) und nukleasefreies Wasser bis zum Endvolumen von 30 µl. Für die PCR für nNOS, eNOS und iNOS wurde die jeweilige cDNA unverdünnt eingesetzt. Für die PCR des internen Standards β-Aktin („housekeeping gene“) wurde die cDNA 1:100 verdünnt, da β-Aktin in hoher Konzentration ubiquitär in jedem Gewebe exprimiert wird. Für die in den Testläufen ermittelte Anzahl von Zyklen (Tab. 3) wurde dieser Ansatz im Thermocycler (T-Gradient, Uno Thermoblock; Biometra, Deutschland) inkubiert. Jeder Zyklus bestand dabei aus den folgenden Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen cDNA (1 min bei 95 °C)
2. Primeranlagerung („Annealing“) (1 min bei 56-60 °C; primerspezifisch)
3. Extension der cDNA (1 min bei 72 °C)

Nach der entsprechenden Anzahl von Wiederholungen wurde das PCR-Produkt zuerst für 10 min bei 72 °C gehalten, anschließend auf 2 °C abgekühlt und bei Bedarf bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C tiefgefroren.

### 3.4.3. Primerdesign und Auswahl

Die Auswahl der Primer erfolgte nach mehreren Kriterien. Es mußte darauf geachtet werden, dass

- die Primer eine Länge von 20-30 bp aufweisen, um eine relativ hohe Temperatur zur Primeranlagerung zu erlauben,
- alle 4 Basen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) gleichmäßig oft vertreten sind,
- der Gehalt an Guanin und Cytosin (GC-Gehalt) in beiden Primern ähnlich ist, damit ähnliche Schmelz- und Siedetemperaturen resultieren,
- Bereiche vermieden werden, in denen sich wiederholende Motive, Polypurin oder Polypyrimidin, sowie ausgeprägte Sekundärstrukturen vorkommen,

- die Sequenzen an den Enden weder inter- noch intramolekular komplementär zueinander sind, um Primerdimerbildung zu verhindern,
- der Bindungsabstand an der DNA 10 kbp nicht überschreitet (besser sollte er unter 3 kbp liegen),
- die beiden Primer eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur aufweisen und
- die amplifizierten Fragmente mindestens eine Schnittstelle für ein verfügbares Restriktionsenzym enthalten.

(Newton und Graham, 1994; Dieffenbach et al., 1993)

Basierend auf den veröffentlichten cDNA-Sequenzen wurden mittels der Primer-3-Software von S. Rozen und H. J. Skaletsky ([http://www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)) spezifische „sense“ und „antisense“ Primerpaare für nNOS, eNOS, iNOS und  $\beta$ -Aktin entwickelt und von der Firma Life Technologies GmbH (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert. Die Primersequenzen lauteten wie folgt:

<b>nNOS</b>	sense	5` - TAGACTCACCCCGTCCTTTG -3`
	antisense	5` - CCAGGTGCACGATGTCATAC -3`
<i>(GeneBank Acc. No. U67309; Magee et al., 1996)</i>		
<b>eNOS</b>	sense	5` - TGGCAGCCCTAAGACCTATG -3`
	antisense	5` - CGCTCCTGCAAAGAAAAACT -3`
<i>(GeneBank Acc. No. AJ011116; Seidel et al., 1998)</i>		
<b>iNOS</b>	sense	5` - CAGAGGACCCAGAGACAAGC -3`
	antisense	5` - TGCTGGAACATTTCTGATGC -3`
<i>(GeneBank Acc. No. D14051; Nunokawa et al., 1993)</i>		
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	sense	5` - GTGGGTATGGGTCAGAAGGA -3`
	antisense	5` - AGCGCGTAACCCTCATAGAT -3`
<i>(GeneBank Acc. No. NM-031144; Nudel et al., 1983)</i>		

#### 3.4.4. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde Ethidiumbromid (2 µl/100 ml) zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert mit DNA und bildet Komplexe, die bei UV-Bestrahlung (312 nm) fluoreszieren. Dadurch lässt sich eine qualitative und quantitative Aussage über die mit RT-PCR amplifizierte RNA treffen.

Jeweils 15 µl der PCR-Produkte wurden mit 3 µl Ladepuffer gemischt; davon wurden 15 µl auf das Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker wurde ein DNA-Marker („Molecular Ruler DNA Size Standard“ BioRad) verwendet. Bei einer Spannung von 10 V/cm Gellänge und 400 mA wurden die PCR-Produkte 30-40 min im elektrischen Feld aufgetrennt.

#### 3.4.5. Auswertung

Mit einem digitalen Kamerasystem wurde das Gel auf einem UV-Schirm aufgenommen. Mit der Software „Scion Image<sup>®</sup> for Windows“ ([http://www.scioncorp.com/pages/scion\\_image\\_windows.htm](http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm)) wurde die Fluoreszenz der Banden gemessen und ausgewertet werden. Bestimmt wurde dabei die optische Dichte aus Intensität und Fläche der Bande abzüglich der Hintergrundhelligkeit.

Zur Ermöglichung einer quantitativen Aussage wurde ein interner Standard als Vergleich herangezogen, in diesem Fall  $\beta$ -Aktin („housekeeping gene“). Ein Vergleich mit der  $\beta$ -Aktin-Expression erlaubt eine semiquantitative Aussage über die Expression der untersuchten Sequenzen (*Bustin, 2000*). Die gemessenen Werte der optischen Dichten der NOS-Isoenzyme wurden daher in das Verhältnis zu den entsprechenden  $\beta$ -Aktin-Werten gesetzt.

### 3.4.6. Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung der Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Jeweils 15 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl Reaktionspuffer (10x; BioLabs, Deutschland), 2 µl Restriktionsendonukleasen (BsmA I, Dpn II und Sac I; BioLabs, Deutschland) und Wasser bis zum Endvolumen von 20 µl versetzt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Die ausgewählten Restriktionsendonukleasen schnitten das amplifizierte DNA-Segment in zwei Fragmente, die sich nach der Gelelektrophorese als 2 Banden unterschiedlichen Molekulargewichts darstellten.

## 3.5. Western-Blot

Die Methode des Western-Blotting ermöglicht es, Proteine zu identifizieren und quantifizieren. Hierbei wird eine Proteinmischung zunächst in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine an eine Nitrozellulosemembran gebunden, auf der sie mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden können.

### 3.5.1. Probenherstellung

Die Gewebe wurden mit Homogenisationspuffer, dessen Menge jeweils das 5-fache des Probengewichtes betrug, in ein Glaspottergefäß gegeben und für 1 min homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 1,7 ml Safe-Twist-Cup überführt und anschließend für 1 min bei 4°C und 14.000 U zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Safe-Twist-Cups portioniert, wobei 20 µl für die Proteinbestimmung (*Lowry et al., 1951*) und 200 µl für den Western-Blot bestimmt waren. Die für den Western-Blot bestimmten 200 µl wurden mit 37,6 µl SDS-Page Lösung (4x) und 2,4 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Sie wurden gemischt und für 10 min auf 98°C erhitzt. Anschließend wurden sie für 30 min bei 4°C zentrifugiert (14.000 U) und der Überstand in ein neues 0,5 ml Cup überführt. Eine

Fettentfernung stellte den abschließenden Schritt dar, bei dem das an der Oberfläche schwimmenden Fett abpipettiert wurde.

Nach Quantifizierung des Gesamtproteins nach Lowry (1951) wurden alle aufgearbeiteten Probenhomogenate mit SDS-Page Lösung (1x) auf eine Proteinkonzentration von 3 µg/µl verdünnt, in Aliquots zu 15 µl gebracht und bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei -20 °C verwahrt.

### 3.5.2. Gesamtproteinbestimmung nach Lowry

Aus einer Rinderalbumin-Stammlösung (1 mg/ml) wurden zwei Standard-Verdünnungsreihen hergestellt, indem 0, 20, 60, 100, 140, 180, 200, 250 und 300 µl des Rinderalbuminstandards mit NaCl-Lösung (0,9%) auf ein Endvolumen von 1000 µl aufgefüllt wurden.

Die Homogenate wurden 1:150 mit NaCl-Lösung (0,9%) verdünnt. Für jeden Messwert (Probe und Standard) wurden in einen Cup jeweils 800 µl Lowry-Mix vorgelegt, dazu 200 µl Standard bzw. verdünnte Probe pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µl Folinreagenz wurden dazu pipettiert und nach 30-45 min die Extinktion des blauen Kupfer-Chelat-Komplexes mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wird die gemessene Extinktion als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt. Aus den zwei Standard-Verdünnungsreihen wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben bestimmt wurde (Lowry *et al.*, 1951).

### 3.5.3. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Polyacrylamidgele (7,5%) verwendet, die aus dem unteren Trenngel und dem darüber liegenden Sammelgel bestanden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl (entsprechend 30 µg Protein), ein Protein-Molekular-Weight-Marker sowie eine Positivkontrolle für nNOS, eNOS oder iNOS aufgetragen. Im Anschluss folgte die Gelelektrophorese, wobei die Gele für 30 min

in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Kammer bei 200 V, 100 mA und 30 W liefern.

#### **3.5.4. Transfer**

Im anschließenden Transfer wurden die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) transferriert und immobilisiert. In der Blotkammer (Hoefer<sup>®</sup> Semi Phor<sup>™</sup>; Amersham, Deutschland) wurden auf 4 Lagen mit Towbin-Blot-Puffer getränktem Filterpapier die Nitrozellulosemembran (mit Methanol getränkt), darauf das Gel und darauf wieder 4 Lagen Puffer-getränktes Filterpapier platziert. Der Transfer hatte eine Dauer von 3 h bei bis zu 50 V, 50 mA und 5 W.

#### **3.5.5. Detektion**

Um potentielle unspezifische Antikörper-Bindungsstellen auszuschalten, wurde jeweils eine Membran mit 5 ml Milchpufferlösung (5%) eingeschweißt und auf einem Schüttler 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung des Primärantikörpers Anti-nNOS, Anti-eNOS bzw. Anti-iNOS (jeweils Transduction, Deutschland). Dazu wurde der Primärantikörper in der Milchpufferlösung 1:3000 verdünnt. Jeweils eine Membran wurde mit 5 ml dieser Antikörper-Verdünnung eingeschweißt und bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden die Membranen in 4 Waschschritten mit PBS-Tween-Puffer für jeweils 10 min gewaschen, um überschüssigen Erstantikörper zu beseitigen.

Im folgenden Schritt erfolgt die Bindung des Sekundärantikörpers. Dieser Sekundärantikörper (Anti-Rabbit, Jackson, USA) war gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und besaß Peroxidaseaktivität („horse-radish peroxidase“). Er wurde in der Milchpufferlösung verdünnt (1:5000). 5 ml dieser Lösung wurden mit einer Membran für 90 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Nach erneuten 4 Waschschritten mit PBS-Tween-Puffer für jeweils 10 min erfolgte die Detektion der Peroxidase-markierten Proteinbanden mit dem „enhanced chemoluminescence“-Kit (Amersham, Deutschland). Die Membranen wurden auf ihrer Oberfläche mit dem ECL („enhanced chemiluminescence“)-Gemisch beschichtet und für 2 min inkubiert. Hierauf erfolgte die Detektion des Signals auf einem Film (Hyperfilm™; Pharmacia Biotech, UK), der für 2 min oder 5 min exponiert und anschließend entwickelt und fixiert wurde (Kodak GBX developer und Kodak GBX fixer; Sigma, Deutschland).

### **3.5.6. Auswertung**

Nachdem die Filme digital photographiert worden waren, erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Programms „Scion Image® for Windows“ ([http://www.scioncorp.com/pages/scion\\_image\\_windows.htm](http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm)). Bestimmt wurde damit die optische Dichte aus Intensität und Fläche der Bande abzüglich der Hintergrundhelligkeit.

## **3.6. Immunhistologische Lokalisation der NOS-Isoformen**

Für die immunhistologische Lokalisation von nNOS, eNOS und iNOS wurden mit einem Kryotom (CM 3050; Leica, Deutschland) 45 µm dicke koronare Schnitte des Großhirns und des Hirnstamms sowie 20 µm dicke Schnitte der Hypophyse und der Nebenniere angefertigt, die über Nacht bei 4°C in Paraformaldehyd (PFA)-Lösung in 6-Well-Platten (Cellstar Gewebekulturplatten; Greiner, Deutschland) gelagert wurden. Nach der Entfernung der überschüssigen PFA-Lösung wurden 3 ml eines Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gemisches (20 ml Methanol + 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugegeben, für 2 min geschüttelt und dann abgesaugt. Die Schnitte wurden nun 2x mit jeweils 5 ml Aqua bidest. gewaschen. Anschließend folgte ein Waschschriff mit 1x „phosphate buffered saline“ (PBS), dann 2 Waschschriffe mit PBS + Triton X-100 (PBST), wobei die Schnitte während des letzten Waschschriffes für 20 min in PBST belassen wurden.

Nun erfolgte bei Raumtemperatur eine Inkubation (1h) in PBST + Normal-Goat-Serum (NGS; 5%), von denen jeweils 3 ml zugegeben wurden.

Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:1000 in PBST + NGS gelöst und die Schnitte hiermit über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle diente PBST + NGS statt der Primärantikörper-Lösung. Im Anschluss wurde der Primärantikörper abgesaugt, und es folgten 3 Waschschritte mit je 5 ml PBST.

Nun wurde der Sekundärantikörper zugegeben. Es handelte sich hierbei um einen biotinylierten Anti-Rabbit-Antikörper (Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories, USA) mit Peroxidaseaktivität, der die farbliche Darstellung der gebundenen Erstantikörper ermöglicht. Von diesem wird 1 Tropfen mit 10 ml PBST und 3 Tropfen NGS gemischt. Von diesem Ansatz werden 3 ml pro Well zugegeben. Nach 2-3 min auf dem Schüttler wird der Ansatz bei 37°C für 45 min inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde mit 3-maligem Waschen mit PBST entfernt.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit einem Peroxidase-Komplex (AB-Peroxidase-Komplex, Vectastain Elite ABC; 10 ml PBST + 4 Tropfen Lösung A + 4 Tropfen Lösung B) bei 37°C für 45 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde überschüssige Lösung mit 1-maligem Waschen mit PBST und 2-maligem Waschen mit PBS entfernt. Mit der Diaminobenzidin (DAB)-Färbung (DAB Substrat Kit für Peroxidase; Vector Laboratories, USA) konnten jetzt die Bereiche angefärbt werden, in denen die NOS lokalisiert ist.

Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht, getrocknet, mit Eukitt® (Kindler, Deutschland) eingedeckt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Dabei können die Bereiche bestimmt werden, in denen die entsprechende NOS-Isoform vorhanden ist. Die NOS-positiven Zellen können anhand ihrer Färbung identifiziert und gezählt werden, wobei die Anzahl an NOS-positiven Zellen in einem Bereich Rückschlüsse auf die Menge des vorhandenen Enzyms zulässt.

### **3.7. Statistische Auswertung**

Alle Daten wurden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Graph Pad Prism® Software (Version 3.0 für Windows, Graph Pad Software, San Diego, USA). Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Dabei wurde das ANOVA 2-Wege-Testverfahren mit einem Bonferroni Posttest zur Ermittlung

---

signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen bzw. zwischen den verschiedenen Altersklassen verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Kardiovaskuläre Parameter der Versuchstiere

In der prähypertensiven Phase waren keine signifikanten Unterschiede in systolischem Blutdruck (SBP), Körpergewicht (KG) und Herzfrequenz (HF) zwischen SHR und WKY-Ratten zu verzeichnen, ebenso in der Entwicklungsphase. In der Erhaltungsphase allerdings zeigten sich ein erhöhter SBP und ein geringeres KG bei SHR im Gegensatz zu den WKY-Ratten, die HF wies jedoch keine Unterschiede auf (Tab. 2).

Alter (W)	Körpergewicht (g)		SBP (mmHg)		HF (min <sup>-1</sup> )	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
3-4	72 ± 2	74 ± 2	120 ± 2	124 ± 6	426 ± 4	438 ± 6
7-8	260 ± 4	220 ± 3	125 ± 3	138 ± 8	380 ± 10	368 ± 14
12-13	335 ± 2	261 ± 3***	128 ± 2	180 ± 6***	356 ± 8	325 ± 10

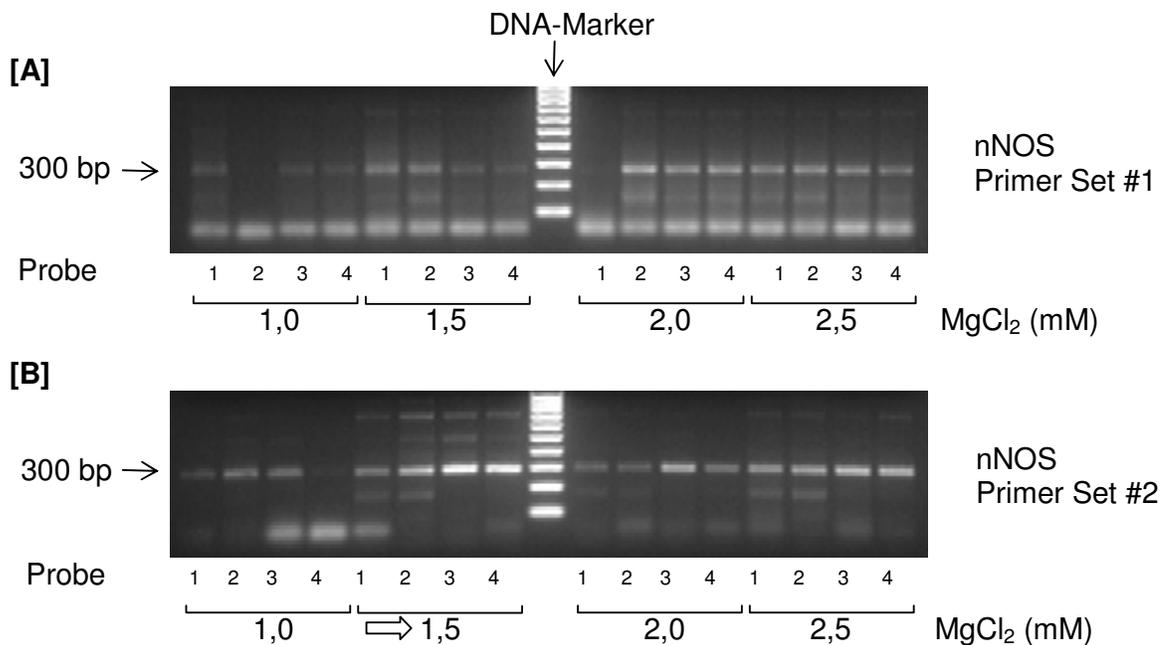
**Tabelle 2:** Körpergewicht (g), SBP (mmHg) und HF (Schlägen pro Minute) in 3-4, 7-8 und 12-13 Wochen (W) alten SHR vs. gleichaltrigen WKY-Ratten. Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt (n=10 pro Gruppe und Alter). \*\*\*p<0,001 SHR vs. WKY-Ratten

### 4.2. Optimierung der PCR für nNOS, eNOS und iNOS

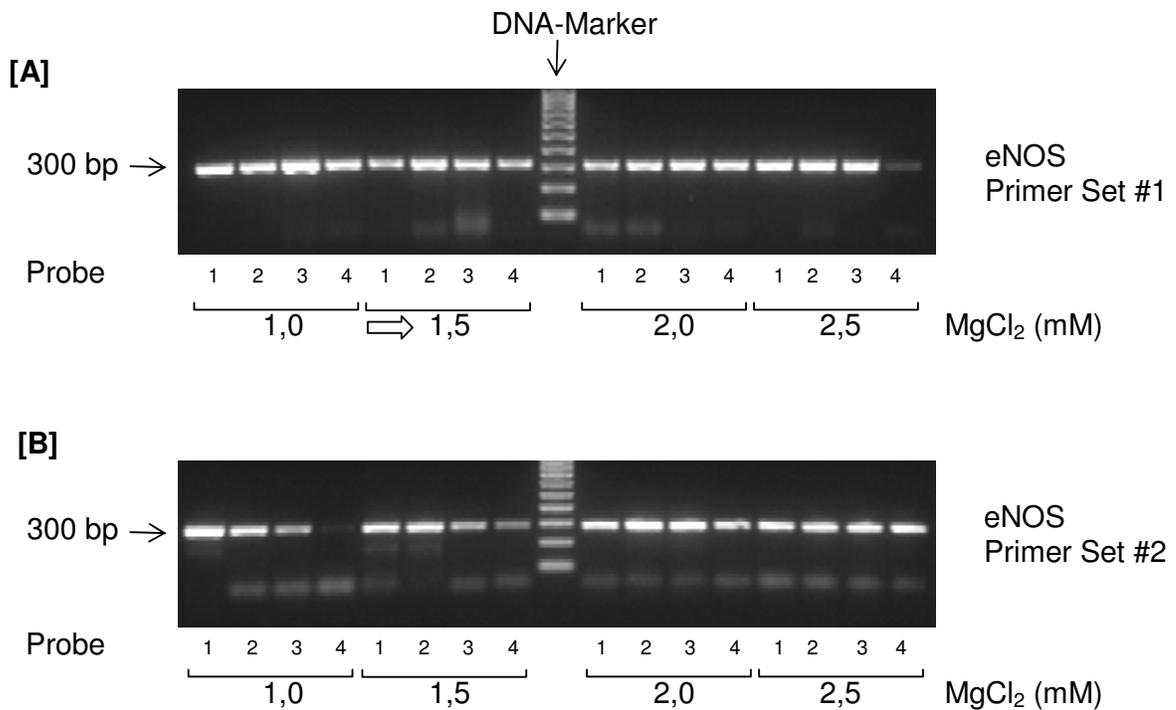
Damit die PCR unter optimalen Bedingungen abläuft, müssen die Magnesiumchloridkonzentration im Reaktionsansatz, die Temperatur für die Primeranlagerung („annealing temperature“) sowie die die Anzahl der PCR-Zyklen für die verwendeten Primer ermittelt werden, unter denen bestmögliche Ergebnisse erzielt werden.

### 4.2.1 Primerauswahl

Das Design der Primer wurde im Kapitel Methoden, Primerdesign und Auswahl (3.4.3) bereits beschrieben. Jeweils zwei Primerpaare (Primer Set #1 und Set #2) für nNOS, eNOS und iNOS wurden in einer Test-PCR unter verschiedenen  $MgCl_2$ -Konzentrationen untersucht. Dasjenige Paar wurde ausgewählt, das eine spezifische Bande mit einer Länge von 300 bp erzeugt (Abb. 4-6). Für das weitere Vorgehen wurden nNOS Set #2 Primer, eNOS Set #1 Primer und iNOS Set #1 verwendet.



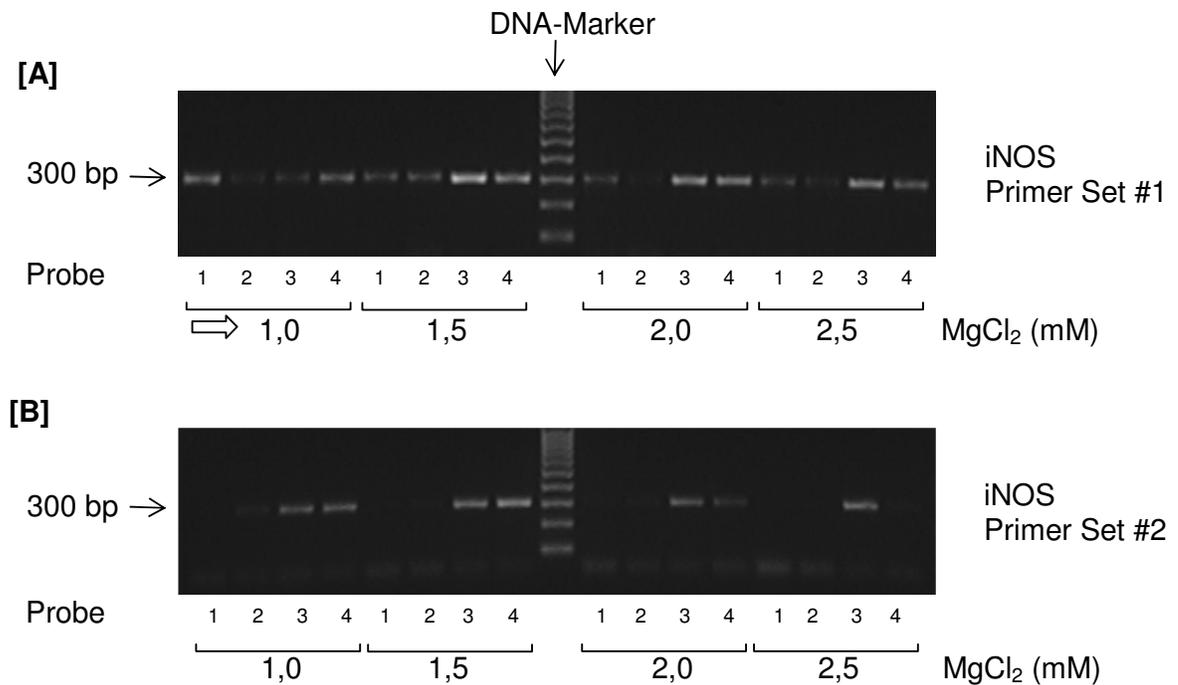
**Abbildung 4:** PCR-Analyse von cDNA aus der Milz von WKY-Ratten ( $n=4$ ; Proben 1-4) mit zwei unterschiedlichen nNOS-Primerpaaren mit aufsteigenden  $MgCl_2$ -Konzentrationen (Set #1, Abb. A; Set #2, Abb. B; PCR-Zyklen: 34; Annealingtemperatur: 56 °C). Ziel ist eine Bande bei 300 bp; ⇨ zeigt die optimale, in der vorliegenden Arbeit verwendete  $MgCl_2$ -Konzentration beim ausgewählten Primer-Set.



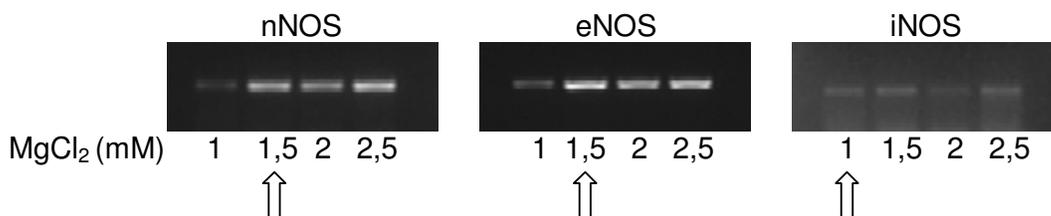
**Abbildung 5:** PCR-Analyse von cDNA aus der Milz von WKY-Ratten ( $n=4$ ; Proben 1-4) mit zwei unterschiedlichen eNOS-Primerpaaren mit aufsteigenden MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (Set #1, Abb. A; Set #2, Abb. B; PCR-Zyklen: 34; Annealingtemperatur: 56 °C). Ziel ist eine Bande bei 300 bp; ⇔ zeigt die optimale, in der vorliegenden Arbeit verwendete MgCl<sub>2</sub>-Konzentration beim ausgewählten Primer-Set.

#### 4.2.2. Magnesiumchloridkonzentration

Für die ausgewählten Primerpaare wurden in weiteren Test-PCRs die optimalen Magnesiumchloridkonzentrationen (MgCl<sub>2</sub>-Konzentration) ermittelt, bei denen die höchste Menge an PCR-Produkt nach der Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte (Abb. 7 und Tab. 3). Im Weiteren wurden für nNOS eine MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 1,5 mM, für eNOS 1,5 mM und für iNOS 1,0 mM eingesetzt.



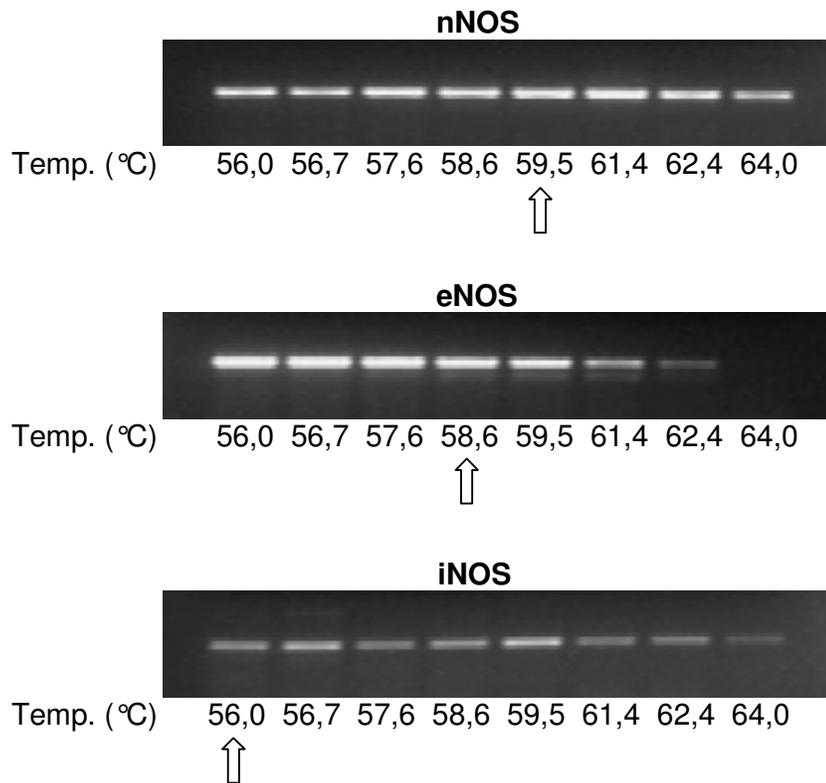
**Abbildung 6:** PCR-Analyse von cDNA aus der Milz von WKY-Ratten ( $n=4$ ; Proben 1-4) mit zwei unterschiedlichen iNOS-Primerpaaren mit aufsteigenden  $MgCl_2$ -Konzentrationen (Set #1, Abb. A; Set #2, Abb. B; PCR-Zyklen: 34; Annealingtemperatur: 56 °C). Ziel ist eine Bande bei 300 bp; ⇔ zeigt die optimale, in der vorliegenden Arbeit verwendete  $MgCl_2$ -Konzentration beim ausgewählten Primer-Set.



**Abbildung 7:** PCR zur Optimierung der  $MgCl_2$ -Konzentrationen für die Primerpaare nNOS (Set #2), eNOS (Set #1) und iNOS (Set #1) am Beispiel gepoolter cDNA der Nebenniere von WKY-Ratten (PCR-Zyklen: 34; Annealingtemperatur: 56 °C); ⇔ zeigt die optimale, in der Arbeit verwendete  $MgCl_2$ -Konzentration.

### 4.2.3. Annealingtemperatur

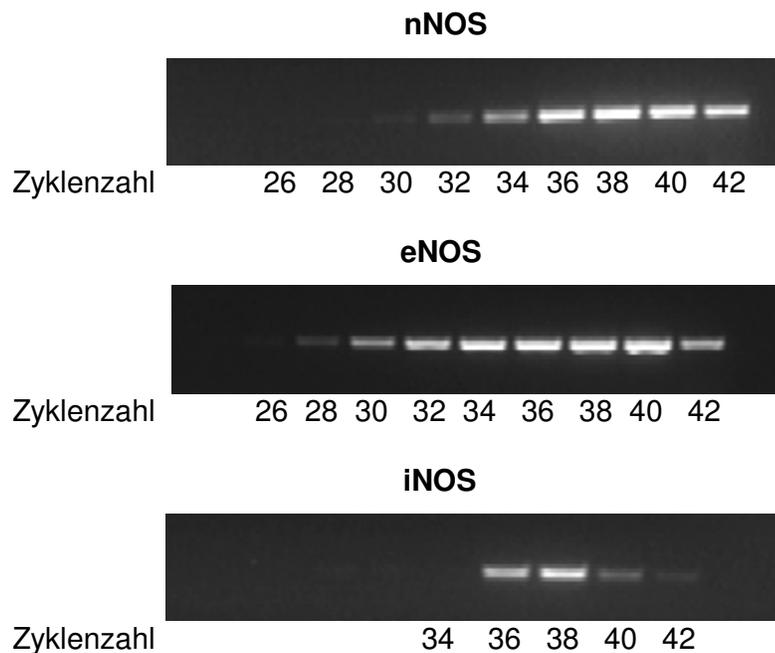
Die optimale Temperatur für die Primeranlagerung, bei der die höchste Menge an spezifischem PCR-Produkt nachweisbar ist, wurde für jedes Primerpaar ermittelt. Der Temperaturgradient für die Primeranlagerung reichte von 56°C bis 64°C, aus diesem Bereich wurden 8 verschiedene Annealingtemperaturen ausgewählt und Test-PCRs durchgeführt (Abb. 8 und Tab. 3). Für die weiteren PCRs wurde für nNOS eine Annealingtemperatur von 60°C, für eNOS von 58°C und für iNOS von 56°C ausgewählt.



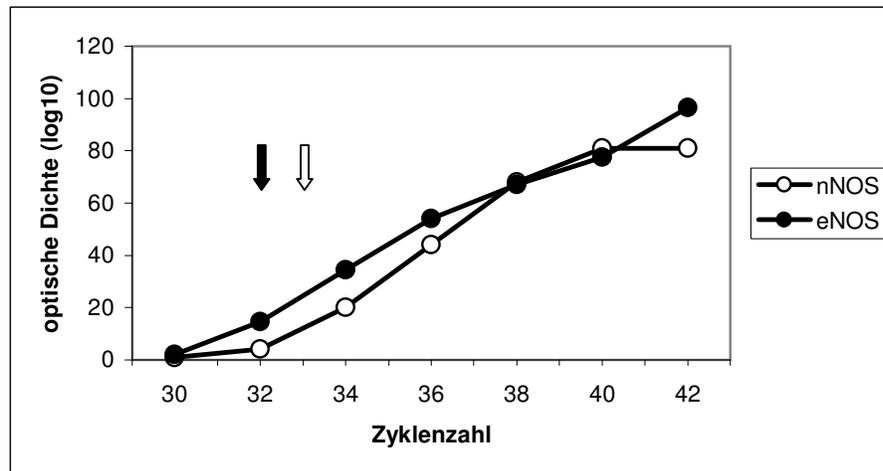
**Abbildung 8:** PCR zur Optimierung der Annealingtemperatur für die Primerpaare nNOS (Set #2), eNOS (Set #1) und iNOS (Set #1) am Beispiel gepoolter cDNA der Nebenniere von WKY-Ratten; Temp.: Temperatur (PCR-Zyklen: 34; Magnesiumchlorid-konzentration: 1,5 mM für nNOS und eNOS, 1,0 mM für iNOS); ⇩ zeigt die optimale Annealingtemperatur, die in den folgenden PCR-Analysen in auf- bzw. abgerundeter Form verwendet wurde.

#### 4.2.4. Zyklenzahl

Für jedes Primerpaar und Gewebe ist die optimale Anzahl an PCR-Zyklen ermittelt worden, mit der die PCR-Produkt-Menge nachweisbar ist, aber noch keine optische Sättigung nach densitometrischer Analyse des Gels erreicht ist, so dass quantitative Unterschiede deutlich werden. Es wurden im Weiteren gewebeabhängig Zyklenzahlen von 31-33 für nNOS, 27-31 für eNOS und 27-38 für iNOS verwendet (Tab. 3). In Abb. 9 und Abb. 10 sind beispielhaft die Ergebnisse der Zyklenoptimierung für cDNA aus Hypophyse und Nebenniere von WKY-Ratten dargestellt.



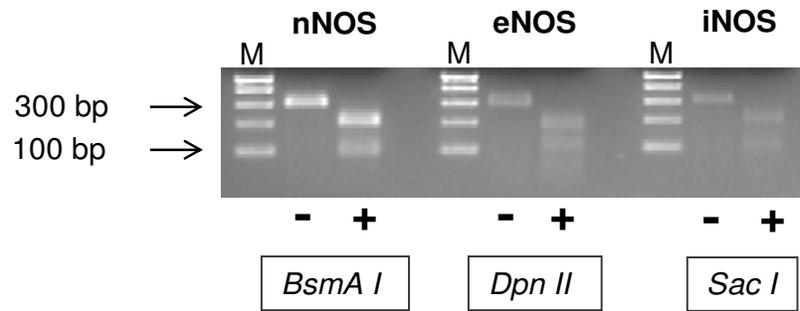
**Abbildung 9:** PCR zur Zyklenoptimierung für die Primerpaare nNOS (Set #2), eNOS (Set #1) und iNOS (Set #1) am Beispiel gepoolter cDNA der Nebenniere von WKY-Ratten (Magnesiumchloridkonzentration: 1,5 mM für nNOS und eNOS, 1,0 mM für iNOS; Annealingtemperatur: 60 °C für nNOS, 58 °C für eNOS, 56 °C für iNOS).



**Abbildung 10:** Graphische Darstellung der Zyklenoptimierung für die Primerpaare nNOS (Set #2) und eNOS (Set #1) am Beispiel von cDNA aus der Hypophyse von WKY-Ratten (Annealingtemperatur: 60 °C für nNOS, 58 °C für eNOS; Magnesiumchloridkonzentration: 1,5 mM für nNOS und eNOS); ⇔ zeigt die in der Arbeit verwendete Zyklusanzahl für nNOS, → zeigt die in der Arbeit verwendete Zyklusanzahl für eNOS.

#### 4.2.5. Restriktionsanalyse

Die mit den Restriktionsenzymen BsmA I, Dpn II und Sac I durchgeführte Restriktionsanalyse ergab spezifische Fragmente für jedes PCR-Produkt, das mit den eingesetzten Primerpaaren erzeugt wurde. Die Restriktionsendonukleasen schneiden das amplifizierte DNA-Segment in zwei Fragmente, die sich nach der Gelelektrophorese als zwei Banden unterschiedlichen Molekulargewichts darstellen. BsmA I erzeugte aus dem PCR-Produkt von nNOS zwei Banden der Größe 195 und 101 bp, Dpn II erzeugte zwei Banden der Größe 208 und 98 bp aus dem PCR-Produkt von eNOS und Sac I erzeugte zwei Banden der Größe 180 und 120 bp für das PCR-Produkt von iNOS (Abb. 11). Hiermit wurde die Spezifität der durchgeführten PCR nachgewiesen.



**Abbildung 11:** Restriktionsanalyse, durchgeführt mit aus cDNA aus dem Hypothalamus amplifizierten PCR-Produkt; M: Marker; +: Reaktionsansatz mit Restriktionsenzym; -: Reaktionsansatz ohne Restriktionsenzym.

#### 4.2.6. PCR-Bedingungen für $\beta$ -Aktin

Für  $\beta$ -Aktin wurde ein vorab ausgewähltes Primerpaar verwendet, dessen Reaktionsbedingungen bereits optimiert wurden. Die optimale Magnesiumchloridkonzentration, Zyklenzahl und Temperatur für die Primeranlagerung in den untersuchten Geweben sind in Tab. 3 zusammengefasst.

<b>Gewebe</b>	<b>Primer</b>	nNOS	eNOS	iNOS	$\beta$ -Aktin
<b>Hypothalamus</b>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing-Temperatur (°C)	60	58	56	56
	Zyklenzahl	32	28	32	28
<b>Hypophyse</b>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing-Temperatur (°C)	61	57	56	56
	Zyklenzahl	33	32	30	28
<b>Nebenniere</b>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing-Temperatur (°C)	61	57	56	56
	Zyklenzahl	33	31	27	28
<b>ventrale Medulla</b>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing-Temperatur (°C)	60	58	56	56
	Zyklenzahl	31	28	33	28
<b>dorsale Medulla</b>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing-Temperatur (°C)	60	58	56	56
	Zyklenzahl	31	28	33	28
<b>Aorta</b>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing-Temperatur (°C)	61	57	56	56
	Zyklenzahl	35	27	38	28
<b>Niere</b>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing-Temperatur (°C)	61	57	56	56
	Zyklenzahl	33	27	33	28

**Tabelle 3:** Reaktionsbedingungen für die Detektion von nNOS, eNOS, iNOS und  $\beta$ -Aktin mittels semiquantitativer RT-PCR nach Optimierung für Hypothalamus, Hypophyse, Nebenniere, ventrale Medulla, dorsale Medulla, Aorta und Niere.

### **4.3. Bestimmung der Genexpression der NOS-Isoenzyme auf mRNA- und Proteinebene in der HHN-Achse**

#### **4.3.1 nNOS im Hypothalamus**

##### ***mRNA-Menge***

In allen drei Altersgruppen zeigte sich im Vergleich zu gleichaltrigen WKY-Ratten eine Erhöhung der mRNA-Menge bei SHR, wobei diese in den Altersgruppen 7-8 Wochen mit 51% und 12-13 Wochen mit 72% ausgeprägter war als in den 3-4 Wochen alten Tieren mit nur 20%. Innerhalb der WKY-Gruppe war zu beobachten, dass ältere Tiere in Entwicklungs- und Erhaltungsphase eine geringere mRNA-Menge aufwiesen als jüngere in der prähypertensiven Phase ( $p < 0,001$  für 3-4 vs. 7-8 Wochen,  $p < 0,001$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen). Auch in der SHR-Gruppe war dies nachzuweisen ( $p < 0,05$  für 3-4 vs. 7-8 Wochen,  $p < 0,01$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 12A, linke Graphik).

##### ***Proteinmenge***

Die Proteinmengen bei den SHR waren im Gegensatz zu den WKY-Ratten in den Altersgruppen 7-8 Wochen und 12-13 Wochen um 95% bzw. 90% signifikant erhöht, in der Altersgruppe 3-4 Wochen war kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Der Vergleich der Altersgruppen innerhalb WKY-Ratten bzw. SHR ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12A, rechte Graphik).

#### **4.3.2. nNOS in der Hypophyse**

##### ***mRNA-Menge***

In der Hypophyse konnte in allen SHR-Altersgruppen eine höhere mRNA-Menge detektiert werden als in den WKY-Gruppen, die im Alter von 3-4 Wochen um 69%, mit 7-8 Wochen um 54% und mit 12-13 Wochen um 89% erhöht war. Innerhalb

der WKY-Gruppe ließ sich bei Tieren der prähypertensiven und Entwicklungsphase eine höhere Menge von nNOS-mRNA als bei 12-13 Wochen alten Tieren in der Erhaltungsphase nachweisen ( $p < 0,01$  für 3-4 und 7-8 vs. 12-13 Wochen), was ähnlich auch in der SHR-Gruppe zu beobachten war ( $p < 0,05$  3-4 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 12B, linke Graphik).

### ***Proteinmenge***

Die Proteinmenge in der Hypophyse zeigte in allen Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen WKY-Ratten und SHR. Im Vergleich der verschiedenen Altersgruppen wiesen die WKY-Ratten der prähypertensiven Phase eine höhere Proteinmenge auf als Tiere in der Entwicklungs- oder Erhaltungsphase ( $p < 0,01$  für 3-4 vs. 7-8 Wochen und  $p < 0,001$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen). Auch bei den SHR war in der Erhaltungsphase die Proteinmenge gegenüber den jüngeren Tieren erniedrigt ( $p < 0,01$  für 3-4 Wochen vs. 12-13 Wochen und  $p < 0,05$  für 7-8 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 12B, rechte Graphik).

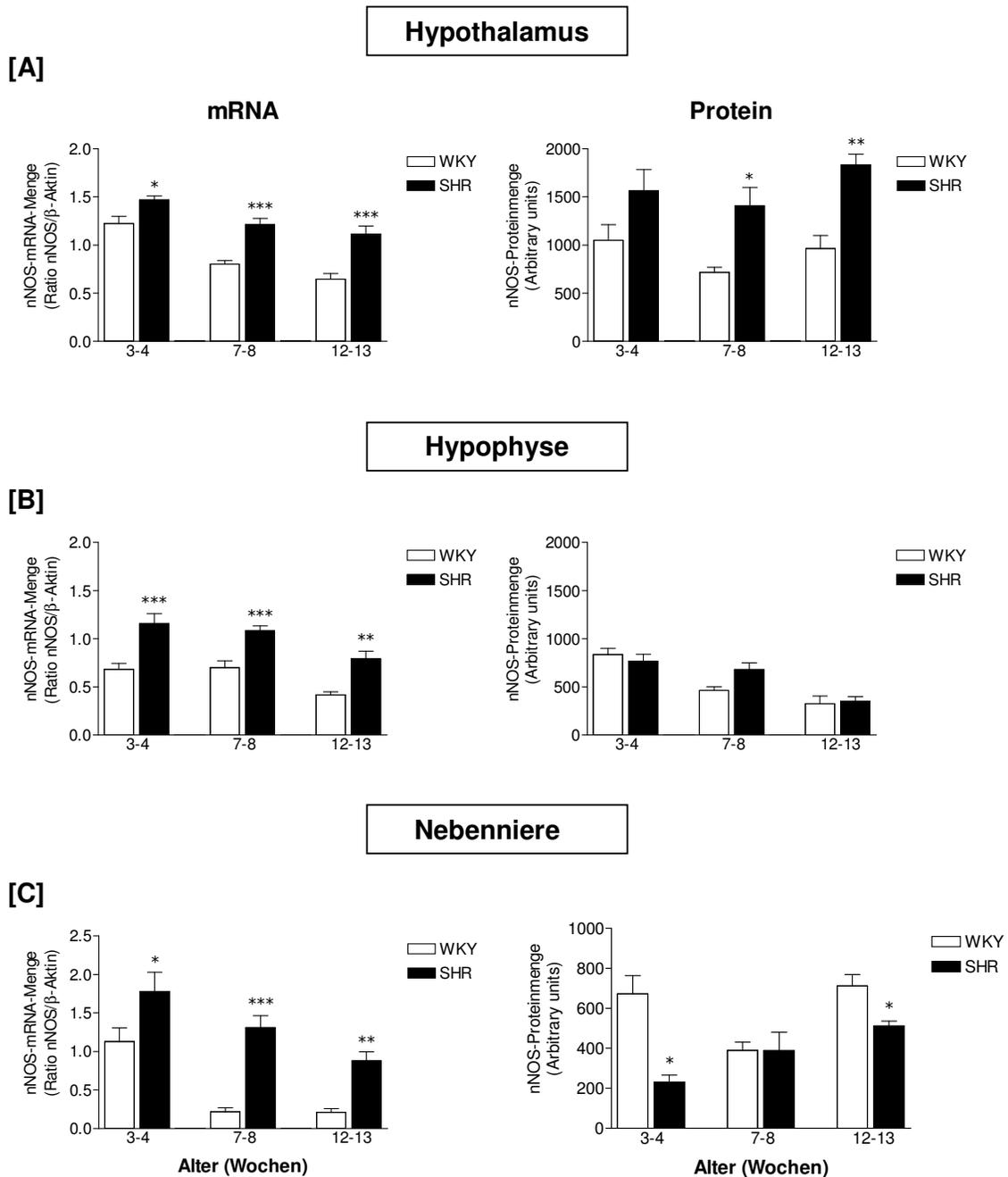
### **4.3.3. nNOS in der Nebenniere**

#### ***mRNA-Menge***

In der Nebenniere war in allen untersuchten Altersstufen eine Erhöhung der mRNA-Menge von nNOS bei SHR im Gegensatz zu WKY-Ratten zu detektieren, die im Alter von 3-4 Wochen 57%, im Alter von 7-8 Wochen 610% und im Alter von 12-13 Wochen 420% betrug. Beim Vergleich der Altersgruppen untereinander innerhalb von WKY-Ratten und SHR ließ sich beobachten, dass jüngere Tiere eine höhere mRNA-Menge aufwiesen als ältere (WKY:  $p < 0,001$  für 3-4 vs. 7-8 und 12-13 Wochen; SHR:  $p < 0,01$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 12C, linke Graphik).

***Proteinmenge***

Im Vergleich zu WKY-Ratten waren die Proteinmengen von nNOS in der Nebenniere von SHR im Alter von 3-4 Wochen um 65% und im Alter von 12-13 Wochen um 28% erniedrigt, während im Alter von 7-8 Wochen kein Unterschied festzustellen war. Im Vergleich der verschiedenen Altersgruppen zeigte sich bei WKY-Ratten eine reduzierte nNOS Proteinmenge im Alter von 7-8 Wochen im Gegensatz zu 3-4 und 12-13 Wochen alten Tieren ( $p < 0,05$  für 3-4 Wochen vs. 7-8 Wochen und  $p < 0,05$  7-8 Wochen vs. 12-13 Wochen). Bei den SHR war die Proteinmenge von nNOS im Alter von 12-13 Wochen im Gegensatz zu 3-4 Wochen erhöht ( $p < 0,05$  3-4 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 12C, rechte Graphik).



**Abbildung 12:** mRNA- (linke Spalte) und Proteinmenge (rechte Spalte) von nNOS im Hypothalamus [A], in der Hypophyse [B] und Nebenniere [C] von 3-4, 7-8 und 12-13 Wochen alten SHR vs. gleichaltrigen WKY-Ratten. Die Daten sind als  $MW \pm SEM$  dargestellt ( $n=10$  (mRNA),  $n=5$  (Protein) pro Gruppe und Alter). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  SHR vs. WKY-Ratten.

#### 4.3.4. eNOS im Hypothalamus

##### ***mRNA-Menge***

Die mRNA-Menge von eNOS zeigte in keiner der Altersgruppen signifikante Unterschiede zwischen WKY-Ratten und SHR. Beim Vergleich der mRNA-Mengen in den verschiedenen Altersstufen innerhalb der Gruppen ergab sich eine erhöhte mRNA-Menge bei 3-4 Wochen alten WKY-Ratten gegenüber den älteren WKY-Tieren ( $p < 0,01$  für 3-4 vs. 7-8 und 12-13 Wochen). In der SHR-Gruppe ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (Abb. 13A, linke Graphik).

##### ***Proteinmenge***

Die Messungen der Proteinmengen von eNOS im Hypothalamus ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen SHR und WKY-Ratten zu den untersuchten Zeitpunkten (Abb. 13A, rechte Graphik).

#### 4.3.5. eNOS in der Hypophyse

##### ***mRNA-Menge***

Die Menge von eNOS-mRNA in der Hypophyse wies keine signifikanten Unterschiede bei WKY-Ratten vs. SHR in allen untersuchten Altersstufen auf. In der Gruppe der WKY war eine geringere mRNA-Menge bei Tieren der Entwicklungs- und Erhaltungsphase gegenüber Tieren der prähypertensiven Phase zu verzeichnen ( $p < 0,001$  für 3-4 vs. 7-8 und 12-13 Wochen), ebenso in der Gruppe der SHR ( $p < 0,05$  für 3-4 vs. 7-8 und  $p < 0,001$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 13B, linke Graphik).

***Proteinmenge***

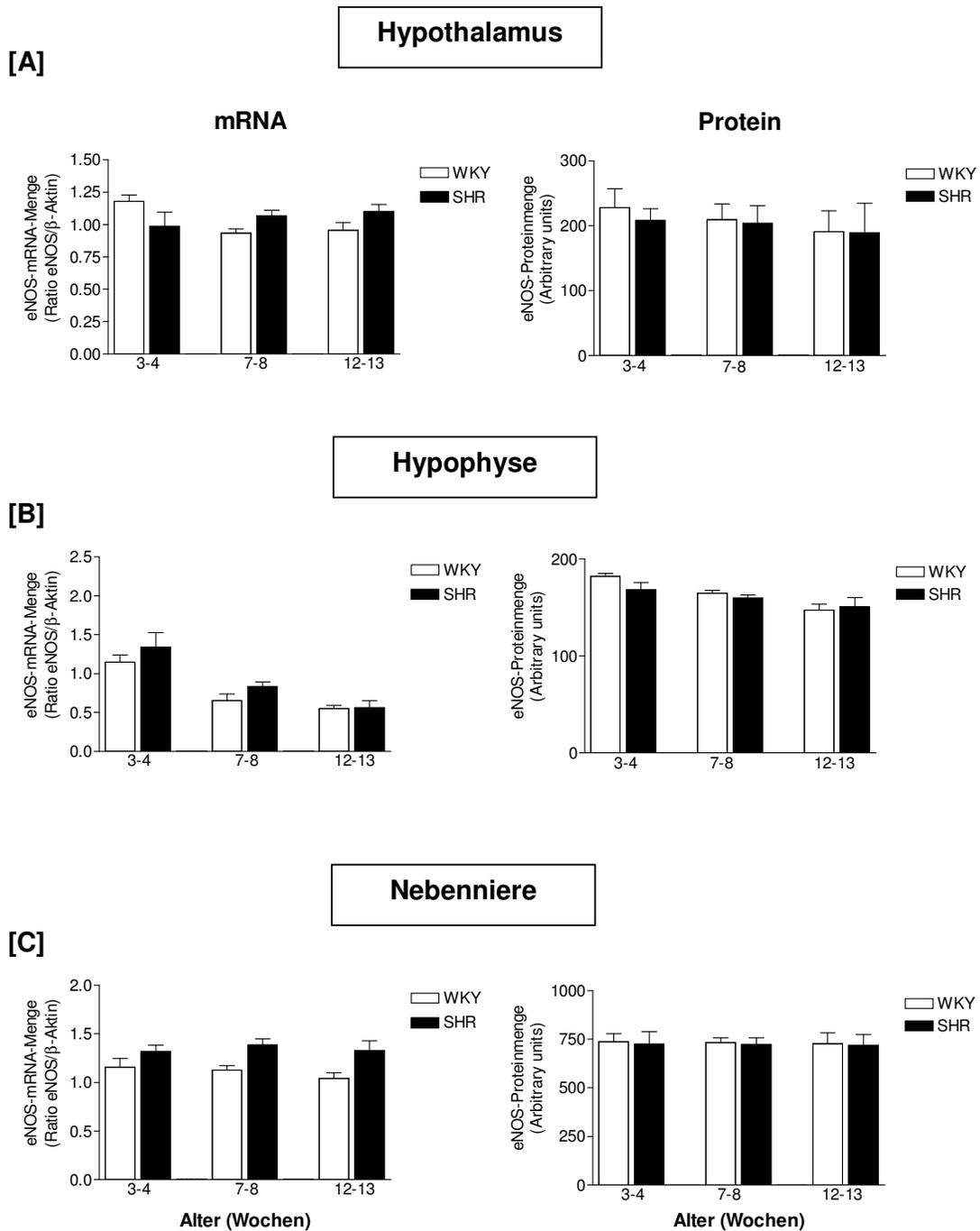
Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Proteinmengen von eNOS in der Hypophyse zwischen SHR und WKY-Ratten zu den untersuchten Zeitpunkten feststellen (Abb. 13B, rechte Graphik).

**4.3.6. eNOS in der Nebenniere*****mRNA-Menge***

Bei der mRNA-Menge von eNOS ließen sich in der Nebenniere keine signifikanten Unterschiede zwischen WKY-Ratten und SHR nachweisen. Auch ändert sich die mRNA-Menge sowohl in WKY-Ratten als auch in SHR nicht signifikant mit dem Alter (Abb. 13C, linke Graphik).

***Proteinmenge***

In der Nebenniere waren keine signifikanten Unterschiede der Proteinmengen von eNOS zwischen SHR und WKY-Ratten zu den untersuchten Zeitpunkten zu verzeichnen (Abb. 13C, rechte Graphik).



**Abbildung 13:** mRNA- (linke Spalte) und Proteinmenge (rechte Spalte) von eNOS im Hypothalamus [A], in der Hypophyse [B] und Nebenniere [C] von 3-4, 7-8 und 12-13 Wochen alten SHR vs. gleichaltrige WKY-Ratten. Die Daten sind als  $MW \pm SEM$  dargestellt ( $n=10$  (mRNA),  $n=5$  (Protein) pro Gruppe und Alter).

#### **4.4. Bestimmung der Genexpression der NOS-Isoenzyme auf mRNA- und Proteinebene in dorsaler und ventraler Medulla**

##### **4.4.1. nNOS in der dorsalen Medulla**

###### ***mRNA-Menge***

Nur bei 3-4 Wochen alten SHR zeigte sich im Vergleich zu den gleichaltrigen WKY-Ratten eine um 80% erhöhte mRNA-Menge. In den anderen Altersgruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Auch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen innerhalb von WKY-Ratten bzw. SHR (Abb. 14A, linke Graphik).

###### ***Proteinmenge***

Beim Vergleich von SHR mit WKY-Ratten ließen sich keine Unterschiede der nNOS-Proteinmengen in allen Altersstufen beobachten. Beim Vergleich der Proteinmenge in den verschiedenen Altersstufen innerhalb der WKY-Gruppe zeigte sich eine signifikant geringere Proteinmenge bei Tieren der Erhaltungsphase gegenüber jüngeren Tieren ( $p < 0,05$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen und  $p < 0,05$  für 7-8 vs. 12-13 Wochen). Auch in der SHR-Gruppe stellte sich diese Konstellation in ähnlicher Weise dar ( $p < 0,01$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 14A, rechte Graphik).

#### 4.4.2. nNOS in der ventralen Medulla

##### ***mRNA-Menge***

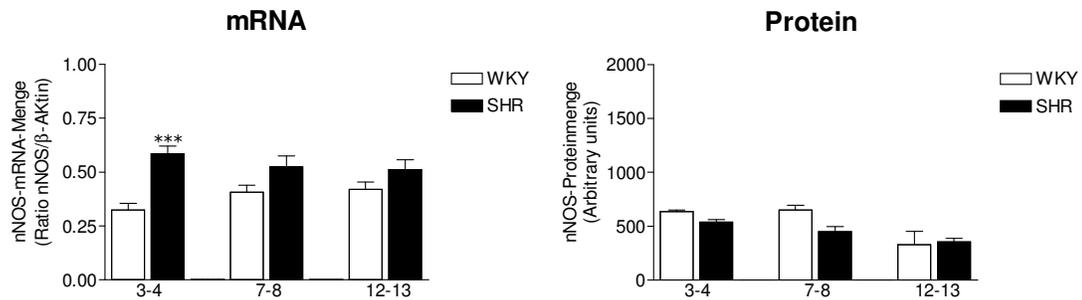
Es zeigte sich nur eine Erhöhung der mRNA-Menge bei SHR vs. WKY-Ratten im Alter von 3-4 Wochen von 34%. In den anderen Altersgruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen WKY-Ratten und SHR feststellen. Beim Vergleich der Altersgruppen innerhalb von WKY-Ratten bzw. SHR waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (Abb. 14B, linke Graphik).

##### ***Proteinmenge***

Beim Vergleich von SHR und WKY-Ratten ließen sich in der ventralen Medulla keine Unterschiede in den verschiedenen Altersgruppen beobachten. Innerhalb der WKY-Ratten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Altersstufen. Bei den SHR war die Proteinmenge bei den 7-8 Wochen alten Tieren vs. 3-4 Wochen alten Tieren vermindert ( $p < 0,01$ ) (Abb. 14B, rechte Graphik).

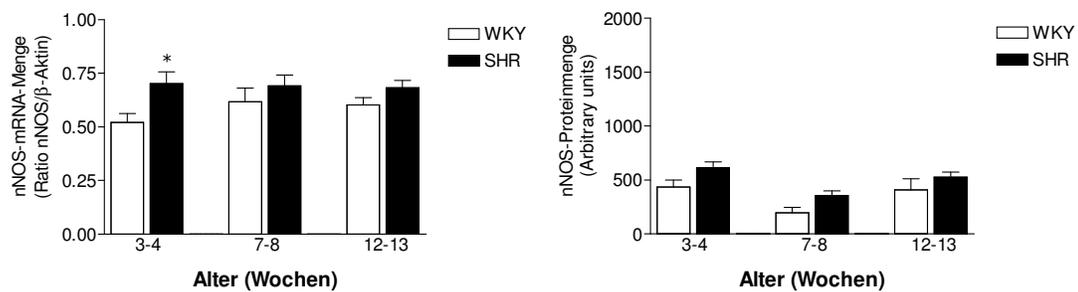
dorsale Medulla

[A]



ventrale Medulla

[B]



**Abbildung 14:** mRNA- (linke Spalte) und Proteinmenge (rechte Spalte) von nNOS in dorsaler Medulla [A] und ventraler Medulla [B] von 3-4, 7-8 und 12-13 Wochen alten SHR vs. gleichaltrigen WKY-Ratten. Die Daten sind als MW  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=10$  (mRNA),  $n=5$  (Protein) pro Gruppe und Alter). \* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$  SHR vs. WKY-Ratten.

#### 4.4.3. eNOS in der dorsalen Medulla

##### mRNA-Menge

Bei der mRNA-Menge von eNOS in der dorsalen Medulla ließen sich in den Altersgruppen 3-4 und 7-8 Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen

WKY-Ratten und SHR nachweisen. Im Alter von 12-13 Wochen dagegen war bei den SHR die mRNA-Menge im Gegensatz zu gleichaltrigen WKY-Ratten um 77% erhöht. Bei den Kontrolltieren (WKY-Ratten) waren keine Unterschiede der mRNA-Mengen von eNOS zwischen den verschiedenen Altersgruppen zu detektieren. Bei den SHR hingegen zeigte sich eine signifikant höhere ( $p < 0,001$ ) Expression der 12-13 Wochen alten Tiere vs. 7-8 und 3-4 Wochen alten Tieren (Abb. 15A, linke Graphik).

### ***Proteinmenge***

Beim Vergleich ergab sich eine signifikant erniedrigte Proteinmenge in SHR vs. gleichaltrigen WKY-Ratten in den Altersgruppen 3-4 und 12-13 Wochen, die im Alter von 3-4 Wochen um 51% reduziert war, im Alter von 12-13 Wochen um 60%. Beim Vergleich der Proteinmenge in den verschiedenen Altersstufen innerhalb SHR und WKY-Ratten erwies sich die Proteinmenge in prähypertensiven Tieren, bei SHR auch in Tieren der Entwicklungsphase, gegenüber Tieren in der Erhaltungsphase als erhöht (WKY:  $p < 0,01$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen; SHR:  $p < 0,01$  für 3-4 und 7-8 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 15A, rechte Graphik).

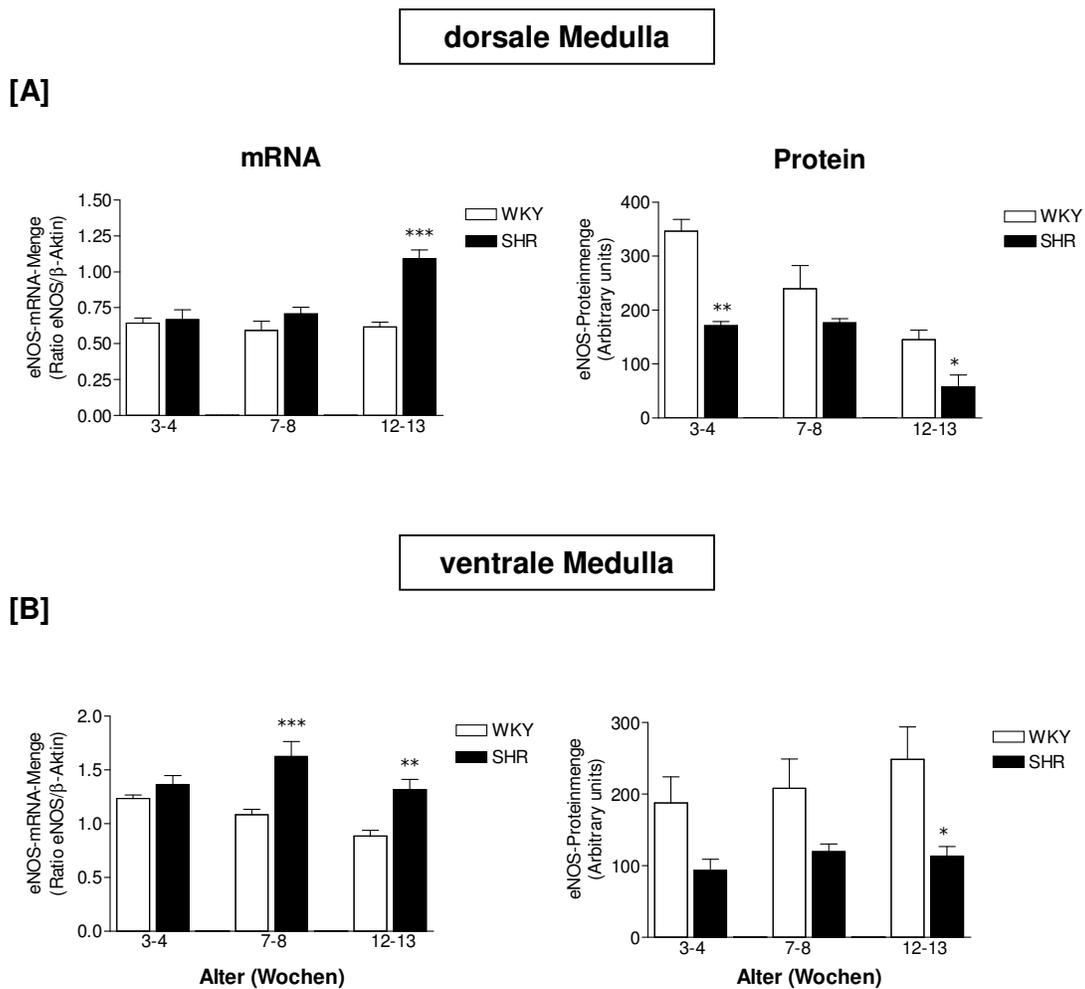
#### **4.4.4. eNOS in der ventralen Medulla**

### ***mRNA-Menge***

Es ergab sich eine um 49% erhöhte mRNA-Menge von eNOS bei 7-8 und um 47% bei 12-13 Wochen alten SHR vs. gleichaltrigen WKY-Ratten. Im Alter von 3-4 Wochen waren dagegen keine Unterschiede zu beobachten. Bei den WKY-Ratten, nicht aber bei den SHR, ließen sich in der prähypertensiven und in der Entwicklungsphase vermehrte mRNA-Mengen gegenüber Tieren der Erhaltungsphase nachweisen ( $p < 0,001$  für 3-4 vs. 12-13 Wochen;  $p < 0,05$  für 7-8 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 15B, linke Graphik).

### Proteinmenge

Beim Vergleich zeigte sich eine erniedrigte Proteinmenge in SHR vs. gleichaltrige WKY-Ratten, die im Alter von 12-13 Wochen eine Reduktion um 54% aufwies. Beim Vergleich der Proteinmenge in den verschiedenen Altersstufen innerhalb SHR und WKY-Ratten ließ sich keine signifikante Veränderung der Proteinmenge mit dem Alter verzeichnen (Abb. 15B, rechte Graphik).



**Abbildung 15:** mRNA- (linke Spalte) und Proteinmenge (rechte Spalte) von eNOS in dorsaler Medulla [A] und ventraler Medulla [B] von 3-4, 7-8 und 12-13 Wochen alten SHR vs. gleichaltrigen WKY-Ratten. Die Daten sind als MW  $\pm$  SEM dargestellt ( $n=10$  (mRNA),  $n=5$  (Protein) pro Gruppe und Alter). \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  SHR vs. WKY-Ratten.

## **4.5. Bestimmung der Genexpression von nNOS und eNOS auf mRNA- und Proteinebene in Aorta und Niere**

### **4.5.1. nNOS in der Aorta**

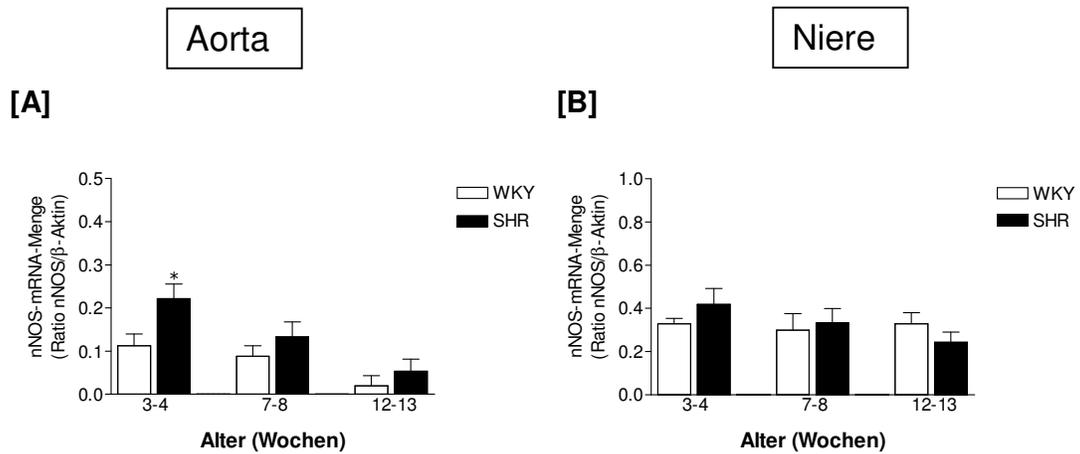
#### ***mRNA-Menge***

Die mRNA-Menge von nNOS bei SHR vs. WKY-Ratten war im Alter von 3-4 Wochen um 97% erhöht. In den anderen Altersgruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Beim Vergleich der verschiedenen Altersgruppen innerhalb WKY-Ratten bzw. SHR zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikant geringere nNOS-mRNA-Menge bei Tieren der Erhaltungsphase gegenüber Tieren der prähypertensiven Phase (WKY:  $p < 0,05$  3-4 vs. 12-13 Wochen; SHR:  $p < 0,01$  3-4 vs. 12-13 Wochen) (Abb. 16A).

### **4.5.2. nNOS in der Niere**

#### ***mRNA-Menge***

Die mRNA-Menge von nNOS wies in der Niere in keiner Altersgruppe signifikante Unterschiede zwischen WKY-Ratten und SHR auf. Auch ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen innerhalb von WKY-Ratten bzw. SHR nachweisen (Abb. 16B).



**Abbildung 16:** mRNA-Menge von nNOS in Aorta [A] und Niere [B] von 3-4, 7-8 und 12-13 Wochen alten SHR vs. gleichaltrigen WKY-Ratten. Die Daten sind als  $MW \pm SEM$  dargestellt ( $n=10$  pro Gruppe und Alter). \* $p<0,05$  SHR vs. WKY-Ratten.

#### 4.5.3. eNOS in der Aorta

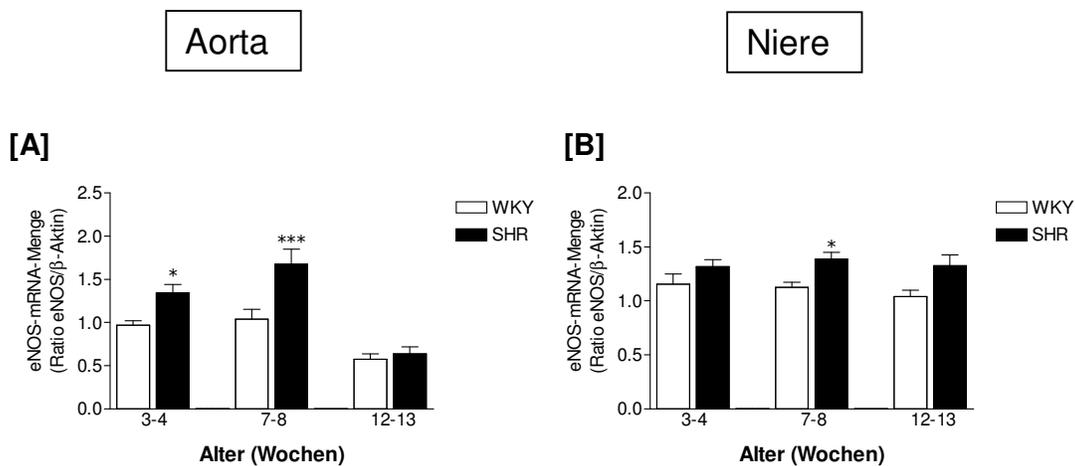
##### **mRNA-Menge**

Die mRNA-Mengen von eNOS in der Aorta waren in den Altersgruppen 3-4 Wochen und 7-8 Wochen in SHR signifikant um 39% bzw. 48% erhöht, während im Alter von 12-13 Wochen dies nicht nachzuweisen war. Innerhalb der WKY-Gruppe zeigte sich eine signifikant niedrigere mRNA-Menge in 12-13 Wochen im Gegensatz zu 7-8 und 3-4 Wochen alten Tieren ( $p<0,01$ ). Bei der SHR-Gruppe konnte ebenfalls eine verminderte Expression im Alter von 12-13 Wochen festgestellt werden, die im Vergleich zu 3-4 und 7-8 Wochen alten Tieren signifikant war ( $p<0,001$ ) (Abb. 17A).

#### 4.5.4. eNOS in der Niere

##### *mRNA-Menge*

Beim Vergleich der mRNA-Mengen von eNOS ergab sich nur in der Altersgruppe von 7-8 Wochen eine um 23% erhöhte mRNA-Menge in SHR. Die mRNA-Mengen erwiesen sich innerhalb der Gruppen WKY-Ratten und SHR über das Alter verteilt als nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 17B).



**Abbildung 17:** mRNA-Menge von eNOS in Aorta [A] und Niere [B] von 3-4, 7-8 und 12-13 Wochen alten SHR vs. gleichaltrigen WKY-Ratten. Die Daten sind als  $MW \pm SEM$  dargestellt ( $n=10$  pro Gruppe und Alter). \* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$  SHR vs. WKY-Ratten.

#### 4.5.5. Proteinmengen von nNOS und eNOS in Aorta und Niere

Die Proteinmengen von nNOS und eNOS in Aorta und Niere ließen sich in WKY-Ratten und SHR zu keinem der untersuchten Zeitpunkte detektieren.

## **4.6. Bestimmung der Genexpression von iNOS**

In keinem der untersuchten Gewebe (HHN-Achse, Hirnstamm, Aorta und Niere) waren iNOS-mRNA und -Protein zu den angegebenen Entwicklungszeitpunkten in WKY-Ratten oder SHR nachzuweisen.

## **4.7. Zusammenfassung der Expression der NOS-Isoenzyme**

Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab. 4 dargestellt.

## **4.8. Immunhistologischer Nachweis der NOS-Isoenzyme**

Die immunhistologische Lokalisation der NOS-Isoenzyme wurde an WKY-Ratten im Alter von 12-13 Wochen durchgeführt.

### **4.8.1. HHN-Achse**

#### ***Hypothalamus***

Im PVN ist nNOS ebenso wie eNOS und iNOS gut nachzuweisen, eNOS und iNOS in geringeren Mengen als nNOS (Abb. 18). Im SON können alle NOS-Isoformen nachgewiesen werden, wobei nNOS in größeren Mengen vorhanden ist als eNOS und iNOS (Abb. 19).

Hypothalamus	nNOS		eNOS	
Alter (W)	mRNA	Protein	mRNA	Protein
3 - 4	↑	↔	↔	↔
7 - 8	↑	↑	↔	↔
12 - 13	↑	↑	↔	↔

Hypophyse	nNOS		eNOS	
Alter (W)	mRNA	Protein	mRNA	Protein
3 - 4	↑	↔	↔	↔
7 - 8	↑	↔	↔	↔
12 - 13	↑	↔	↔	↔

Nebenniere	nNOS		eNOS	
Alter (W)	mRNA	Protein	mRNA	Protein
3 - 4	↑	↓	↔	↔
7 - 8	↑	↔	↔	↔
12 - 13	↑	↓	↔	↔

dorsale Medulla	nNOS		eNOS	
Alter (W)	mRNA	Protein	mRNA	Protein
3 - 4	↑	↔	↔	↓
7 - 8	↔	↔	↔	↔
12 - 13	↔	↔	↑	↓

ventrale Medulla	nNOS		eNOS	
Alter (W)	mRNA	Protein	mRNA	Protein
3 - 4	↑	↔	↔	↔
7 - 8	↔	↔	↑	↔
12 - 13	↔	↔	↑	↓

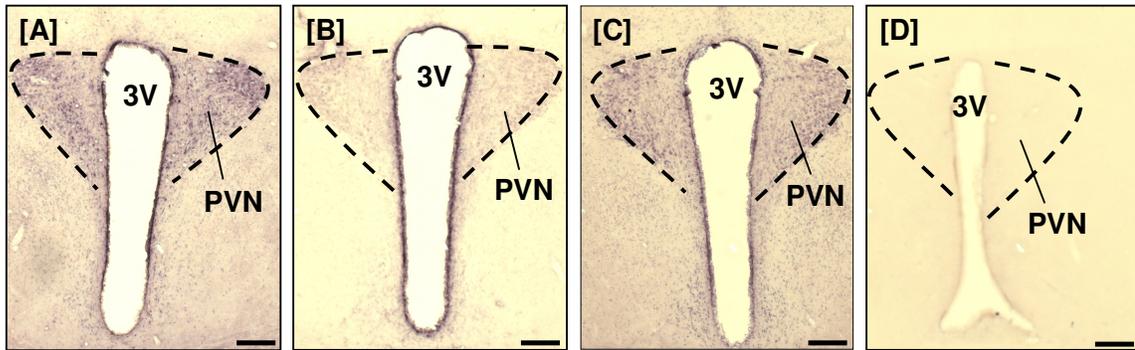
  

Aorta	nNOS		eNOS	
Alter (W)	mRNA	Protein	mRNA	Protein
3 - 4	↑	n. d.	↑	n. d.
7 - 8	↔	n. d.	↑	n. d.
12 - 13	↔	n. d.	↔	n. d.

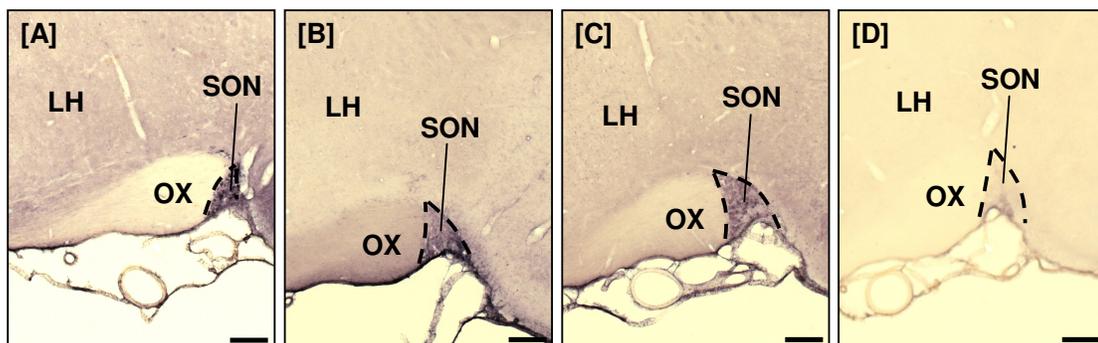
  

Niere	nNOS		eNOS	
Alter (W)	mRNA	Protein	mRNA	Protein
3 - 4	↔	n. d.	↔	n. d.
7 - 8	↔	n. d.	↑	n. d.
12 - 13	↔	n. d.	↔	n. d.

**Table 4:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse, dargestellt ist die mRNA- bzw. Proteinexpression bei SHR im Vergleich zu WKY-Ratten; W: Wochen; ↑: erhöhte Expression; ↔: unveränderte Expressionen; ↓: erniedrigte Expression; n. d.: nicht detektierbar.



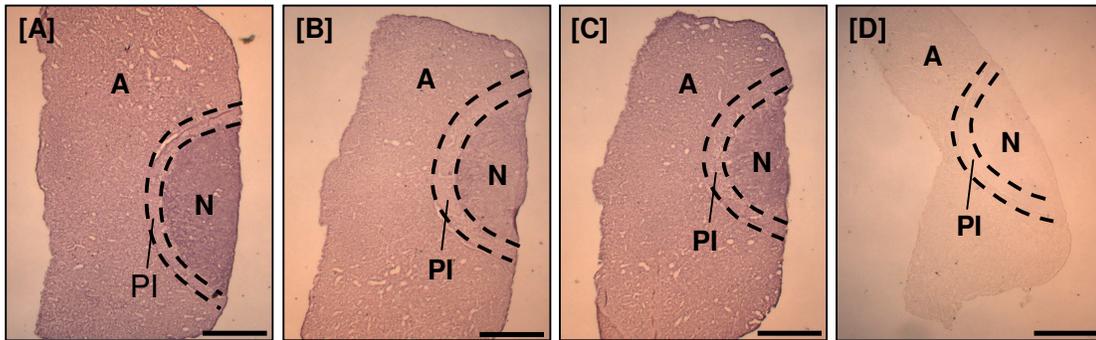
**Abbildung 18:** Koronarschnitt von 45  $\mu\text{m}$  Dicke durch den Nucleus paraventricularis (PVN), Immunhistologie; A: nNOS; B: eNOS; C: iNOS; D: Kontrolle; 3V: 3. Ventrikel; Messbalken: 500  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 19:** Koronarschnitt von 45  $\mu\text{m}$  Dicke durch den Nucleus supraopticus (SON), Immunhistologie; A: nNOS; B: eNOS; C: iNOS; D: Kontrolle; LH: Area hypothalamica lateralis; OX: Chiasma opticum; Messbalken: 500  $\mu\text{m}$ .

### Hypophyse

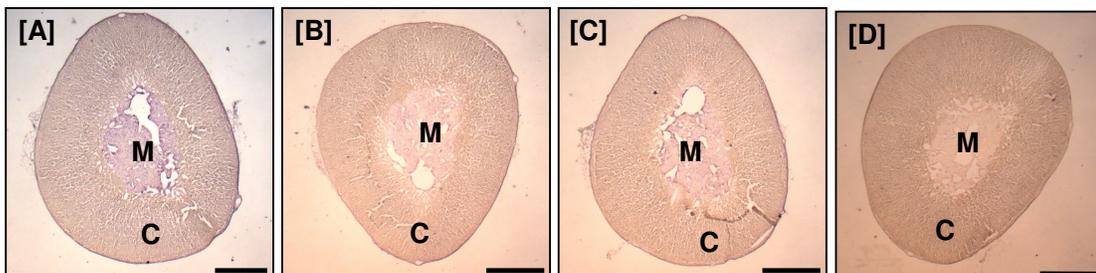
In der Hypophyse ist nNOS ausgeprägt exprimiert in der Neurohypophyse zu finden. Auch eNOS und iNOS sind dort stärker als in der Adenohypophyse lokalisiert, wobei der Unterschied geringer ausgeprägt ist als bei nNOS. Die Pars intermedia weist gering niedrigere nNOS-, eNOS- und iNOS-Mengen im Vergleich zur Adenohypophyse auf (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Hypophyse, 20  $\mu\text{m}$  Schnittdicke, Immunhistologie; A: nNOS; B: eNOS; C: iNOS; D: Kontrolle; A: Adenohypophyse; PI: Pars intermedia; N: Neurohypophyse; Messbalken: 1 mm.

### **Nebenniere**

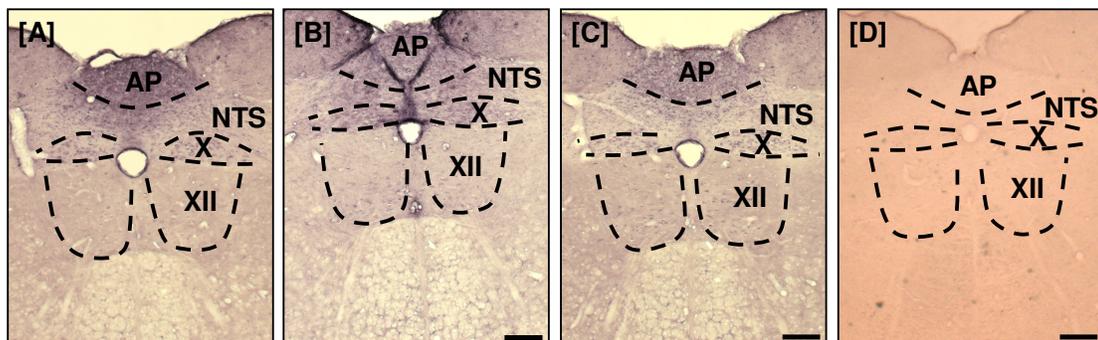
In der Nebenniere lässt sich nNOS hauptsächlich im Nebennierenmark nachweisen, doch auch in der Rinde fällt der Nachweis positiv aus. eNOS ist, ebenso wie iNOS, vermehrt in der Nebennierenrinde lokalisiert (Abb. 21).



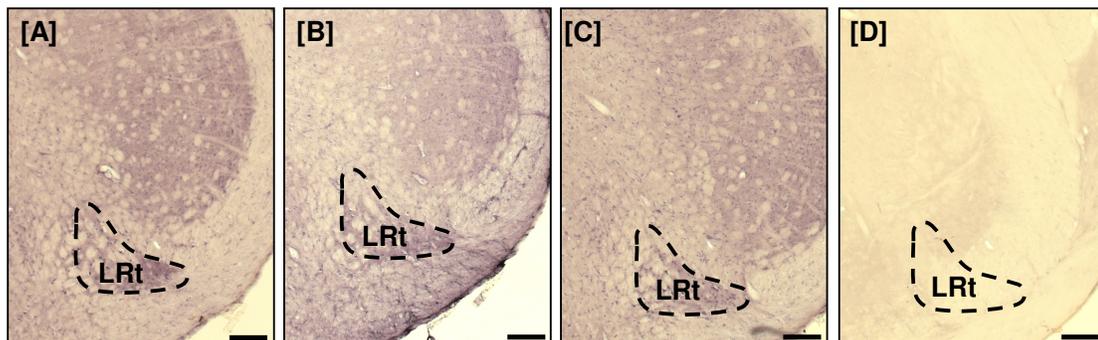
**Abbildung 21:** Nebenniere, Schnittdicke 20  $\mu\text{m}$ , Immunhistologie; A: nNOS; B: eNOS; C: iNOS; D: Kontrolle; C: Cortex; M: Medulla; Messbalken: 1 mm.

#### 4.8.2. Dorsale und ventrale Medulla

Zu den Hirnstammarealen gehören u.a. die Area postrema und der Nucleus reticularis lateralis (LRt). In der Area postrema lässt sich nNOS in höheren Mengen nachweisen als eNOS und iNOS, im Nucleus tractus solitarii (NTS) sowie in den Kernen der Hirnnerven X und XII sind nNOS, eNOS und iNOS in gleich hohen Mengen vorhanden (Abb. 22). Im LRt zeigen sich einige nNOS-, eNOS- und iNOS-positive Zellen (Abb. 23).



**Abbildung 22:** Koronarschnitt von 45  $\mu\text{m}$  Dicke, Immunhistologie; A: nNOS; B: eNOS; C: iNOS; D: Kontrolle; AP: Area postrema; NTS: Nucleus tractus solitarii; X: Nucleus N. vagi; XII: Nucleus N. hypoglossi; Messbalken: 500  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 23:** Koronarschnitt von 45  $\mu\text{m}$  Dicke durch den Nucleus reticularis lateralis (LRt), Immunhistologie; A: nNOS; B: eNOS; C: iNOS; D: Kontrolle; Messbalken: 500  $\mu\text{m}$ .

### 4.8.3. Zusammenfassung

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunhistologie befindet sich in Tab. 5.

Organ/Hirnregion	nNOS	eNOS	iNOS
PVN	++	+	+
SON	++	+	+
Adenohypophyse	+	+	+
Neurohypophyse	++	+	+
Nebennierenmark	++	-	-
Nebennierenrinde	+	+	+
Area postrema	++	+	+
NTS	+	+	+
LRt	+	+	+
Hirnnerv X	+	+	+
Hirnnerv XII	+	+	+

**Tabelle 5:** Expression der NOS-Isoformen in den immunhistologisch untersuchten Geweben; Auswertung basierend auf der Analyse von Schnitten von  $n=4$  WKY-Ratten (++ hohe Expression; + geringe Expression; - keine Expression); PVN: Nucleus paraventricularis; SON: Nucleus supraopticus; NTS: Nucleus tractus solitarii; LRt: Nucleus reticularis lateralis.

## 5. Diskussion

### 5.1. NOS-Expression in der HHN-Achse und essentielle Hypertonie

In dieser Arbeit konnten bei der Untersuchung der Expression der NOS-Isoformen in der HHN-Achse Unterschiede in der mRNA- und Proteinmenge von nNOS, nicht aber von eNOS, nachgewiesen werden. Für nNOS sind bei SHR bereits eine vermehrte NO-Produktion sowie erhöhte NOS-Aktivitäten in Teilen des ZNS beschrieben worden, die für die Blutdruckregulation relevant sind (*Qadri et al., 1999; Qadri et al., 2003*), womit sich die hier erhobenen Befunde ergänzen.

Im Hypothalamus ist in allen untersuchten Entwicklungsstufen die mRNA-Menge von nNOS in SHR gegenüber WKY-Ratten erhöht. Für adulte SHR sind bereits ähnliche Befunde erhoben worden (*Iwai et al., 1995; Plochocka-Zulinska und Krukoff, 1997*). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich jetzt, dass dieses Phänomen bereits während der prähypertensiven Phase besteht und in den folgenden Entwicklungsstufen anhält. Die erhöhten Mengen könnten zum einen auf eine gesteigerte Transkriptionsrate, zum anderen auf eine erhöhte Stabilität der mRNA zurückzuführen sein. Eine gesteigerte Transkriptionsrate fanden Hennington et al. (*1998*) nach akuter intravenöser Gabe von ANG II, wonach die mRNA von eNOS um 70% erhöht war. Für eine Stabilisierung der mRNA sprechen die Ergebnisse neuerer Studien mit mRNA aus Hepatozyten und glatten Gefäßmuskelzellen, in denen gezeigt werden konnte, dass in der prähypertensiven Phase bei SHR eine Stabilisierung der mRNA vorliegt (*Klett et al., 2004; Sherer et al., 1998*). Welcher der beiden Mechanismen zu der erhöhten mRNA-Menge in SHR geführt hat, wurde hier nicht geklärt, möglicherweise tragen beide dazu bei.

Im Hypothalamus übernimmt NO die Aufgabe eines nichtkonventionellen Neurotransmitters. Es befinden sich dort wichtige kardiovaskuläre Regulationszentren, in denen NO den ausgehenden Sympathikotonus und damit den Blutdruck steuert. Eine gesteigerte nNOS-Aktivität und konsekutiv erhöhte Konzentrationen von NO bewirken eine Reduktion des ausgehenden Sympathikotonus und entsprechend eine Senkung von Blutdruck und Herzfrequenz. Vice versa führt eine geringere NO-Konzentration zur Erhöhung des

ausgehenden Sympathikotonus. Dieser Mechanismus ist u.a. über GABA vermittelt (*Zhang und Patel, 1998*).

In unseren Untersuchungen fanden wir erhöhte Proteinmengen von nNOS im Hypothalamus von SHR, allerdings nur in Entwicklungs- und Erhaltungsphase. Dies stellt eine mögliche Ursache für die von Qadri et al. (2003) veröffentlichten Ergebnisse dar, die eine erhöhte NOS-Aktivität im Hypothalamus von adulten SHR zeigen. Eine gesteigerte NO-Produktion im Hypothalamus bei adulten SHR, die wahrscheinlich durch nNOS bedingt ist, kann als Versuch, den erhöhten Blutdruck zu kompensieren, interpretiert werden. Unterstützt wird diese These von dem Befund, dass die Blockade von nNOS durch intrazerebroventrikuläre Injektion von 7-Nitroindazol, einem selektiven nNOS-Inhibitor, bei adulten SHR zu einer Blutdrucksteigerung führt, nicht aber bei gleichaltrigen WKY-Ratten (Qadri et al., 1999). Während der prähypertensiven Phase ist von Qadri et al. (2003) bei SHR allerdings eine reduzierte NOS-Aktivität festgestellt worden. In diesem Stadium ist die Konstellation der niedrigen Aktivität bei unveränderten Proteinmengen möglicherweise Teil der Pathogenese des genetischen Hypertonus.

Das sympathische Nervensystem spielt in der prähypertensiven Phase eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Hypertonie. Schon während dieser Phase wurde in SHR in peripheren Geweben wie Skelettmuskel und weißem Fettgewebe eine erhöhte sympathische Nervenaktivität festgestellt (*Cabassi et al., 1998*), und die Sympathektomie bei jungen SHR verhindert die Entstehung der Hypertonie (*McCarty et al., 1987; Zicha et al., 1999*). Auch auf diesem Hintergrund läge die Bedeutung der erhöhten mRNA- und Proteinmenge von nNOS in der versuchten Kompensation des erhöhten Sympathikotonus und des Hypertonus.

NO hat Einfluss auf verschiedene Regelkreise der HHN-Achse, so z.B. den Regelkreis Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) - Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) - Kortikoide, den Regelkreis Growth-Hormon-Releasing-Hormon (GHRH) - luteinisierendes Hormon (LH) oder den Regelkreis FSH-Releasing-Hormon (FSHRF) - Follikelstimulierendes Hormon (FSH). Im Hypothalamus konnte nNOS mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistologischen Färbungen hauptsächlich im PVN und im SON nachgewiesen werden, wie es auch von anderen Autoren beschrieben worden ist (*Iwase et al., 1998*). Die NO-Produktion

erfolgt dort zusammen mit anderen Neurotransmittern und Hormonen wie AVP, Oxytocin, CRH und Enkephalinen (Swanson *et al.*, 1983). NO beeinflusst die Freisetzung dieser Hormone und Transmitter positiv und somit auch die endokrine und autonome Regulation kardiovaskulärer Effekte. Durch die Koexistenz mit AVP und Oxytozin in PVN und SON kann NO als autokriner Regulator für diese Hormone bzw. parakriner Regulator für CRH fungieren. Dies zeigen Studien, bei denen intrazerebral appliziertes NO zu erhöhten Expressionen von CRH und AVP im PVN führt und so die Sekretion von ACTH und Kortikosteron stimuliert (McCann *et al.*, 1998; Seo and Rivier, 2001). Weiterhin gibt es Hinweise, dass Kortikosteron während der prähypertensiven Phase die Entwicklung des Hypertonus in SHR begünstigt (Ruch *et al.*, 1984; Hashimoto *et al.*, 1989). Erhöhte ACTH- und Kortikosteron-Spiegel sind auch von Wasilewski *et al.* (2004) in prähypertensiven SHR gefunden worden. Da zum einen die Entfernung der Nebenniere bei prähypertensiven SHR die Hypertonieentstehung verhindert, zum anderen aber auch die Gabe von Kortikosteron bei diesen Tieren den Bluthochdruck wieder herzustellen vermag, scheint der o.g. Regelkreis in die Pathogenese der genetischen Hypertonie eingebunden zu sein. Die gefundenen erhöhten nNOS-Proteinmengen zusammen mit der erhöhten Aktivität können also über den Weg der Steigerung der CHR- und ACTH-Sekretion und konsekutiv der Kortikosteronspiegel bei SHR zur Erhöhung des Blutdrucks beitragen. Im Hypothalamus kann NO auf diesem Weg daher auch die Entstehung des Hypertonus begünstigen und nicht nur über die Reduktion des ausgehenden Sympathikotonus zu einer Senkung des Blutdrucks führen.

Die Veränderungen der nNOS-mRNA-Spiegel in SHR unterscheiden sich von Modellen wie der Goldblatt-Hypertonie oder der des chronischen Nierenversagens, bei denen die Hypertonie durch Stenosierung einer Nierenarterie bzw. durch eine 5/6 Nephrektomie induziert wird. Bei der Goldblatt-Hypertonie ist die nNOS-mRNA-Menge 6 Wochen nach Induktion der Hypertonie im Hypothalamus erhöht (Krukoff *et al.*, 1995). Beim chronischen Nierenversagen lässt sich ebenfalls eine gesteigerte nNOS-mRNA-Menge in PVN und NTS nachweisen (Ye *et al.*, 1997). Dies wird als Reaktion auf den erhöhten Blutdruck gedeutet, wobei so eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems vermindert werden kann. Sowohl bei der induzierten als auch bei der genetischen Hypertonie bei Tieren mit

bestehendem Hypertonus besteht eine erhöhte nNOS-mRNA-Menge in den verschiedenen Hirnregionen, was bei der induzierten Hypertonie als Reaktion auf den gestiegenen arteriellen Blutdruck geschieht. Daher kann bei ähnlichen Veränderungen des Expressionsmusters von nNOS im Hypothalamus bei adulten SHR bei der genetischen Hypertonie ebenfalls von einer Reaktion auf den Hypertonus und somit von einem Kompensationsmechanismus ausgegangen werden. In der prähypertensiven Phase dagegen unterscheiden sich die nNOS-mRNA-Mengen im Hypothalamus zwischen SHR und Kontrolltieren geringfügig, die Proteinmengen nicht signifikant. In dieser Phase, in der der Blutdruck noch nicht erhöht ist, scheint daher der Versuch der Kompensation über NO im Hypothalamus nicht zu bestehen.

In der Hypophyse ist NOS-Aktivität besonders in der Neurohypophyse gefunden worden, in der sich alle drei NOS-Formen in den in dieser Arbeit durchgeführten immunhistologischen Färbungen nachweisen ließen. Über dieses Organ kann NO das kardiovaskuläre System beeinflussen (*McCann et al., 1998; Costa et al., 1996*). Die Hypophyse ist u.a. in den Regelkreis der CHR-ACTH-Glukokortikoid-Sekretion involviert, durch den sie wie der Hypothalamus auf das kardiovaskuläre System wirken kann. So könnte NO in der Hypophyse diesen Regelkreis stimulieren und zur Erhöhung des Blutdrucks beitragen. Da allerdings nur die mRNA-Mengen von nNOS erhöht sind, nicht aber die Proteinmengen, scheint es unwahrscheinlich, dass NO an dieser Stelle maßgeblich in die Regulation eingreift. Das mRNA-Expressionsmuster von nNOS in der Hypophyse gleicht dem des Hypothalamus, in allen untersuchten Altersgruppen war die mRNA-Menge von nNOS bei SHR gegenüber gleichaltrigen WKY-Ratten erhöht. Die Proteinmengen ließen dagegen keine Unterschiede erkennen. Daher scheint in der Hypophyse die Proteinexpression im Vergleich zum Hypothalamus unterschiedlich reguliert zu sein. Möglicherweise wird auf der Ebene der Translation die nNOS-Proteinsynthese so gesteuert, dass vergleichbare Mengen an nNOS entstehen wie bei Kontrolltieren.

In der Nebenniere lässt sich NO im Nebennierenmark nachweisen. Dort wird es durch Nervenzellen, die chromaffine Zellen innervieren, synthetisiert und freigesetzt (*Snyder und Brecht, 1991; Iwai et al., 1995; Chou et al., 1998; Marley et*

*al.*, 1995). Das Nebennierenmark ist über die Katecholaminsekretion mit Vasokonstriktion und Blutdruck verbunden. Endogenes NO vermindert die basale Sekretion von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark und aus peripheren sympathischen Nervenendigungen und damit die biologische Wirkung der Katecholamine. Folglich trägt NO über die Nebenniere zur physiologischen Regulation des Blutdrucks bei. Aufgrund der Rolle von NO, sowohl von nNOS aber auch von eNOS synthetisiert, als Gegenspieler verschiedener Vasokonstriktoren wie z.B. Angiotensin II (ANG II), ist es wahrscheinlich, dass ein erhöhter Katecholaminspiegel oder Sympathikotonus die nNOS-mRNA-Expression gegenregulatorisch steigert (*Grange-Messent et al.*, 2004), wie unsere Ergebnisse in allen Altersgruppen widerspiegeln. Auf der anderen Seite existieren auch Studien, die zeigen, dass eine antihypertensive Therapie mit dem AT<sub>1</sub>-Antagonisten Candesartan cilexetil und Hydralazin die nNOS-Expression erhöhen (*Iwai et al.*, 1995).

In der Nebenniere besteht ein Gegensatz zwischen erhöhter mRNA-Menge einerseits und einem erniedrigtem nNOS-Proteingehalt andererseits, der sich sowohl in der prähypertensiven als auch in der Erhaltungsphase bei SHR zeigt. Die Ergebnisse der Proteinexpression ergänzen sich mit den Befunden, die in unserem Labor erhoben worden sind, dass bei SHR eine niedrigere nNOS-Aktivität und damit NO-Produktion in der Nebenniere bereits während der prähypertensiven Phase vorliegt (*Qadri et al.*, 2001). Dies kann in der Nebenniere zu einer pathologischen Erhöhung der Katecholaminsekretion und der Steroidgenese führen, welche durch NO sowohl basal als auch ACTH-induziert moduliert wird, wie Studien mit NO-Donatoren an Zona-fasciculata- und Zona-glomerulosa-Zellen in vitro zeigten (*Natarajan et al.*, 1997; *Schwarz et al.*, 1998). Eine verminderte NO-Produktion in der Nebenniere adulter SHR trägt folglich zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks auf erhöhtem Niveau bei.

Die in allen Organen der HHN-Achse gleichsinnig erhöhten nNOS-mRNA-Mengen in SHR lassen auf ihre wesentliche Rolle bei der genetischen Hypertonie schließen. Die korrespondierenden Proteinmengen zeigen dagegen kein einheitliches Muster. Es ist daher davon auszugehen, dass die Proteinexpression weiteren Einflüssen unterliegt, die möglicherweise organspezifisch sind. Die

unterschiedliche Regulation der nNOS-Genexpression in der HHN-Achse existiert von Geburt an und kann auf der einen Seite zur Entwicklung der Hypertonie beitragen, auf der anderen Seite aber in späteren Stadien gegenregulatorisch verändert sein. Möglicherweise bestehen beide Prozesse parallel. So hat NO im Hypothalamus über die Senkung des ausgehenden Sympathikotonus hypotone Einflüsse, wirkt dagegen aber gleichzeitig über eine Steigerung der CRH-Bildung und -Freisetzung hypertoniefördernd.

Die mRNA- und Proteinmengen von eNOS wiesen in den Organen der HHN-Achse zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede zwischen SHR und WKY-Ratten auf. Die Bedeutung für die Pathogenese und die Beteiligung an der Kompensation des Hypertonus von eNOS in der HHN-Achse scheint gering zu sein, bedingt möglicherweise durch die hauptsächlichliche Lokalisation von eNOS im ZNS in zerebralen Gefäßendothelzellen (*Stanarius et al., 1997*). Dort ist eNOS in die Regulation der regionalen Durchblutung involviert.

In den Organen der HHN-Achse war bei adulten Tieren oftmals eine geringere mRNA-Menge vorhanden als bei jüngeren Tieren. Bezüglich der geringeren mRNA-Spiegel bei adulten Tieren wird über eine Beteiligung von NO in neurodegenerative Prozesse diskutiert (*Moncada et al. 2006*), wobei die NOS-Expression in physiologische Altersprozesse eingebunden zu sein scheint. Im Gegensatz zu den nach unseren Ergebnissen geringeren nNOS-Genexpressionen im Hypothalamus bei alten SHR und WKY, beschreiben Pearce et al., (1997) eine höhere nNOS-Genexpression bei erwachsenen SHR im Gegensatz zu jungen. Allerdings wurden hier Homogenate des gesamten Gehirns verwendet und keine einzelnen Regionen, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Es ist bereits in mehreren Studien über altersabhängige Expression der NOS-Isoformen berichtet worden, wobei alle Autoren zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen gelangen (*Strosnjajder et al., 2004; Siles et al., 2002; Liu et al., 2003; Hilbig et al., 2002*). Diskutiert wird die Hypothese, dass sich die NOS-Expressionen in den einzelnen Hirnarealen durch bisher unbekannte Mechanismen gegenseitig beeinflussen, so dass eine hohe Expression in der einen Region die Expression in einer anderen hemmt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistologischen Färbungen für nNOS, eNOS und iNOS weisen diese in PVN und SON des Hypothalamus nach, wobei nNOS die höchste Immunreaktivität besitzt. Die bereits beschriebene Rolle von nNOS in diesen Kernen ist für die Blutdruckregulation bedeutend.

In der Hypophyse lassen sich die drei Isoformen, prädominant auch hier nNOS, vor allem in der Neurohypophyse nachweisen, in der die Hormone AVP und Oxytozin gespeichert und sezerniert werden. nNOS kann insbesondere die Freisetzung dieser Hormone inhibieren und so Einfluss auf den Blutdruck nehmen. In der Nebenniere ist nNOS hauptsächlich im Nebennierenmark nachzuweisen. Dort greift es hemmend in die Sekretion der Katecholamine ein, und beeinflusst so die physiologische Blutdruckregulation. Alle drei Isoformen sind in geringen Mengen in der Nebennierenrinde zu finden. Da die Mengen sehr gering sind, scheinen die NOS-Isoformen hier eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Auch iNOS zeigte in diesen Färbungen Immunreaktivität, im Gegensatz zu RT-PCR und Western-Blot, in denen iNOS nicht detektiert werden konnte. Es ist beschrieben worden, dass iNOS im Rattenhirn erst ab einem Alter von 3 Monaten in detektierbaren Mengen exprimiert wird (*Vernet et al., 1998*). Die Tiere, deren Organe für die immunhistologischen Färbungen verwendet wurden, waren im Alter von 12-13 Wochen und somit möglicherweise gerade alt genug, um mittels Immunhistologie detektierbare Mengen an iNOS zu exprimieren.

## **5.2. NOS-Expression im Hirnstamm und essentielle Hypertonie**

Im Hirnstamm ist nNOS besonders im NTS und in der RVLM lokalisiert (*Plochocka-Zulinska und Krukoff, 1997*). In diesen Regionen hat nNOS Relevanz bei der Regulation der kardiovaskulären Homöostase. Es wirkt sich hier inhibierend auf den ausgehenden Sympathikotonus aus und führt damit zur Senkung des Blutdrucks. Gezeigt wurde dies in Studien, in denen in den NTS applizierte NO-Donoren zu einem Abfall des Blutdrucks führten, wohingegen NOS-Inhibitoren diesen anhoben (*Lewis et al., 1991*). Da sich in unseren Untersuchungen beim Vergleich der Proteinmengen keine Unterschiede ergeben haben, ist nicht von einer wesentlichen Beteiligung von nNOS in den

Hirnstammarealen an der Pathogenese oder Kompensation der genetischen Hypertonie auszugehen. In Kontrast dazu stehen allerdings Studien, die einen verminderten L-Arginin-NO-Reaktionsweg und damit eine geringere NO-Produktion in der RVLM bei SHR nachweisen konnten (*Kagiyama et al., 1998*).

Die mRNA-Mengen von nNOS in VM und DM waren nur in der prähypertensiven Phase bei SHR erhöht, in den anderen Phasen ergaben sich keine Unterschiede. Auch dieser Befund steht in Kontrast zu anderen Studien, in denen in der prähypertensiven Phase keine Veränderungen der nNOS-Expression in RVLM und DM von SHR gefunden wurde, wohl aber in adulten Tieren (*Plochocka-Zulinska und Krukoff, 1997*). Die mRNA könnte eine höhere Stabilität besitzen oder die Transkriptionsrate könnte durch Mechanismen hochreguliert sein, die den bereits in prähypertensiven SHR gesteigerten Sympathikotonus versuchen zu kompensieren. In späteren Phasen besteht der Kompensationsmechanismus nicht mehr, und die mRNA-Spiegel sinken, wobei die Proteinmengen dem nicht folgen. Dem könnten Regulationsmechanismen zu Grunde liegen, die zwar die mRNA-, nicht aber die Proteinexpression beeinflussen.

In den Hirnstammarealen zeigte sich eine erhöhte mRNA-Menge von eNOS bei SHR in der Erhaltungsphase, in der VM sogar schon während der Entwicklungsphase. Hier könnte eNOS-mRNA direkt auf den Reiz der Blutdruckerhöhung und des damit verbundenen zunehmenden Scherstressses vermehrt exprimiert werden, da sich in der prähypertensiven Phase, ohne diesen Stimulus, keine erhöhte Expression zeigt. Im Gegensatz zu den erhöhten mRNA-Mengen in Entwicklungs- und Erhaltungsphase in SHR stehen die Befunde der eNOS-Proteinmengen. Während der prähypertensiven Phase ließen sich bei SHR verminderte Proteinmengen in DM nachweisen, während der Erhaltungsphase in DM und VM. Diese Diskrepanz lässt auf komplexe Regulationsmechanismen schließen im Hirnstamm schließen. Denkbar wäre, dass sich die eNOS-Expressionen mit den NOS-Expressionen anderer Hirnareale gegenseitig beeinflussen und modulieren.

Eine blutdruckregulierende Rolle von eNOS in den Hirnstammarealen ist von Sakai et al. (2000) und Kishi et al. (2001) beschrieben worden. RVLM und NTS bekommen Impulse von autonomen, viszerosensorischen Neuronen, dabei auch den kardiovaskulären Bereich betreffende Informationen aus der Peripherie, und

geben diese an verschiedene Großhirnbereiche weiter (*Torvik, 1956; Ricardo et al., 1978*). Eine Überexpression von eNOS in NTS und RVLM führte im Tierversuch zu einer Verminderung von Blutdruck, Herzfrequenz und Sympathikotonus. Die verminderten eNOS-Proteinmengen könnten folglich zur Erhöhung des Blutdrucks und zu dessen Erhaltung beitragen. In Zusammenhang mit einer verminderten NOS-Aktivität in Cortex und Hirnstamm von 3-4 Wochen alten SHR, die allerdings hauptsächlich auf nNOS zurückzuführen ist und die von *Qadri et al. (2003)* beschrieben worden ist, tragen sie möglicherweise zur Pathogenese der essentiellen Hypertonie bei.

Eine erniedrigte NO-Produktion durch eNOS und nNOS im Hirnstamm bewirkt einen Anstieg der Aktivität des sympathischen Nervensystems (*Kagiyama et al., 1998; Sakai et al., 2005*) und spiegelt somit möglicherweise die genetische Disposition zum Hypertonus wider. Auch könnte eine verminderte NOS-Aktivität und konsekutiv verminderte NO-Synthese in diesen Hirnarealen das sympathische Nervensystem in aktiviertem Zustand halten. Solch eine Veränderung scheint bei SHR vorzuliegen, da diese Tiere generell eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems zeigen (*Tucker et al., 1984; Yamori et al., 1985; Janssen et al., 1989; Cabassi et al., 1997; Cabassi et al., 1998*).

Nach unseren immunhistologischen Färbungen findet sich nNOS in der Area postrema, die an der Regulation des kardiovaskulären Systems und des ausgehenden Sympathikotonus beteiligt ist (*Barnes et al., 1984*), der durch NO inhibiert werden könnte. eNOS und iNOS sind hier in nur geringen Mengen zu finden, sie scheinen also eine wenig bedeutende Rolle in Bezug auf die Beteiligung an der Pathogenese des Hypertonus zu spielen.

In NTS und LRt, wichtigen Kerngebieten des Hirnstammes, finden sich alle drei Isoformen in geringen Mengen. Anscheinend ist in diesen Arealen die Beteiligung an der Blutdruckregulation eher gering.

### **5.3. NOS-Expression und essentielle Hypertonie in der Aorta**

In der Aorta ist die nNOS-mRNA-Expression nur in 3-4 Wochen alten SHR gegenüber WKY erhöht, in den anderen Altersgruppen existieren keine

Unterschiede. Außerdem ist bei adulten SHR und WKY-Ratten die nNOS-mRNA-Menge im Gegensatz zu 3-4 Wochen alten Tieren vermindert.

nNOS ist in perivaskulären Nerven lokalisiert, wird von dort freigesetzt und bewirkt so eine Vasodilatation durch lokale Hemmung des Sympathikotonus. Da in der prähypertensiven Phase bei SHR bereits ein gesteigerter Sympathikotonus besteht, kann eine erhöhte NO-Produktion durch erhöhte nNOS-Mengen diesem lokal entgegenwirken. Da während Entwicklungs- und Erhaltungsphase keine erhöhten mRNA-Level und damit, in der Annahme, dass sich mRNA- und Proteinexpression gleichsinnig verhalten, wahrscheinlich auch keine erhöhten Proteinlevel bestehen, entfällt dieser Kompensationsmechanismus, was zum Blutdruckanstieg beiträgt. Hier fügt sich der Befund ein, dass in adulten SHR weniger nNOS-mRNA vorhanden ist als in jungen. Zwar zeigt sich dieses Bild auch in den Kontrolltieren, jedoch weniger ausgeprägt.

Für eNOS, die im Endothel der Gefäße enthalten ist, sieht das Expressionsmuster der mRNA in der Aorta ähnlich aus wie das von nNOS. Eine höhere eNOS-mRNA-Menge findet sich bei SHR während der prähypertensiven Phase und ausgeprägter noch in der Entwicklungsphase, während in der Erhaltungsphase kein Unterschied mehr zu beobachten sind. Auch hier ist eine kompensatorische Erhöhung in der prähypertensiven Phase gegen einen erhöhten Sympathikotonus bzw. Gefäßtonus denkbar. Der Reiz zur kompensatorischen Steigerung der eNOS-mRNA wird möglicherweise durch den steigenden Blutdruck oder steigenden Scherstress verstärkt, was sich in der erhöhten Expression in der Entwicklungsphase ausdrückt. Bei 12-13 Wochen alten SHR und WKY existieren dagegen vergleichbare eNOS-mRNA-Level. In diesem Stadium besteht offenbar kein Versuch der Kompensation über die Erhöhung der eNOS-mRNA-Menge mehr. In Einklang dazu steht der Befund, dass in adulten SHR weniger mRNA nachzuweisen ist als in jungen. Auch adulte WKY-Ratten zeigen diese niedrigere Expression im Vergleich zu jüngeren Tieren, wenn auch der Unterschied geringer ausgeprägt ist, was zu den Ergebnissen aus anderen Studien passt, in denen gezeigt wurde, dass alte WKY-Ratten in der Aorta weniger eNOS-Aktivität und eNOS-Protein besitzen als junge (*Chou et al., 1998*).

Lockette et al. (1986) konnten an Rattenaorten zeigen, dass ein experimentell erhöhter Blutdruck mit einer geringeren endothelabhängigen Relaxation vergesellschaftet ist. Piech et al. (2003) veröffentlichten den Befund, dass SHR in

der Erhaltungsphase erhöhte eNOS-Proteinmengen aufweisen. Ein erhöhter Blutdruck scheint also die eNOS-Expression zu stimulieren. Auf der anderen Seite zeigten Chou et al. (1998), dass in der prähypertensiven Phase bei WKY und SHR keine Unterschiede in Expression und Aktivität von eNOS in der Aorta zu beobachten waren, in adulten SHR zeigte sich allerdings eine erniedrigte eNOS-Proteinmenge und -Aktivität im Gegensatz zu WKY-Ratten. Diese Befunde geben Erklärungen für die Pathogenese der Hypertonie, stehen aber teilweise im Gegensatz zu den hier erhobenen Befunden der mRNA-Menge.

Die niedrigere Expression von eNOS in der Aorta adulter SHR hängt möglicherweise auch mit der zunehmenden Schädigung des Endothels durch den hohen Blutdruck zusammen. Von Chou et al. (1998) konnte gezeigt werden, dass die Endothelfunktion in der prähypertensiven Phase bei SHR noch intakt ist, allerdings nicht mehr im Alter von 14 Wochen, in dem sich der Hochdruck etabliert hat. So wird auf der einen Seite das Endothel durch hohen Blutdruck geschädigt, im weiteren kann das geschädigte Endothel nicht mehr in vollem Maße seine Funktion ausüben und zu einer ausreichenden Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen führen, so dass der Hochdruck weiter verstärkt wird. Hinzu kommt, dass in SHR die Gefäßwände einen veränderten Aufbau zeigen (*Dickhout und Lee, 1997*). Es wurde in kleinen muskulären Arterien ein größeres Volumen der Media gefunden, ferner eine höhere Anzahl Lagen glatter Muskelzellen. Außerdem kontrahierten sich die Arterien bei SHR stärker auf vasokonstriktive Reize hin. Festgestellt wurden diese Befunde bereits in der prähypertensiven Phase, sie tragen also auch zur Entstehung des Hypertonus bei (*Dickhout und Lee, 1997*).

Die Proteinmengen von nNOS konnten in unseren Untersuchungen zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. Zurückzuführen ist dies möglicherweise auf eine unzureichende Bindung des verwendeten Erstantikörpers in der Aorta, so dass mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode nNOS-Protein in diesem Organ nicht nachzuweisen war.

Auch die Proteinmengen von eNOS konnten mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Dies könnte generell an einer zu geringen Menge an eNOS-Protein in unseren Proben liegen, so dass der verwendete Erstantikörper dieses nicht in dem Maße bindet, das für

die Detektion notwendig wäre. Auch ein für dieses Gewebe ungeeigneter Antikörper könnte dem zu Grunde liegen. Dies scheint wahrscheinlich, da in anderen Studien eNOS-Protein in Rattenaorten nachgewiesen werden konnte.

#### **5.4. NOS-Expression und essentielle Hypertonie in der Niere**

In der Niere ist die nNOS-mRNA in allen Altersgruppen in SHR und WKY gleich hoch exprimiert, wohingegen eNOS-mRNA geringfügig vermehrt bei SHR während der Entwicklungsphase vorhanden ist. In der Niere findet sich große NOS-Aktivität in den Vasa recta, den afferenten Arteriolen und Glomeruli, in denen eNOS und nNOS nachzuweisen sind und eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle des segmentalen renalen Gefäßwiderstandes spielen (*Mattson und Wu, 2000*). Es sind auch Beziehungen zwischen nNOS und RAAS nachgewiesen worden, und nNOS scheint ein Mediator der Reninfreisetzung zu sein (*Persson et al., 2000*). Da allerdings keine Hinweise auf eine veränderte nNOS-Expression bei SHR vorliegen, scheint der Einfluss von nNOS in der Niere auf den Hypertonus eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Außerdem gibt es Hinweise, dass von nNOS produziertes NO in der Niere an der kurzfristigen Regulation des Blutdrucks beteiligt ist, nicht jedoch an der langfristigen (*Ollerstam et al., 2002*). Auf diesem Hintergrund lassen auch unsere Ergebnisse einen Einfluss auf den Hypertonus unwahrscheinlich erscheinen.

Auch eNOS und RAAS beeinflussen sich gegenseitig. ANG II bewirkt eine Steigerung der eNOS-Aktivität und damit der NO-Produktion. Dieses wiederum hemmt die ACE-Aktivität (*Linz et al., 1999*) und führt zur Downregulation der AT<sub>1</sub>-Rezeptoren auf transkriptioneller Ebene (*Fernandez-Alfonso et al., 1999*). So können ANG II und NO in homöostatische Mechanismen eingegliedert sein, die der Regulation von Gefäßstruktur und -funktion dienen. Mit steigendem Blutdruck kann zusätzlich durch das vermehrt im Endothel gebildete NO auch der Gefäßwiderstand in der Niere gesenkt werden. So kann auf zwei Wegen dem Hypertonus entgegengewirkt werden. Der Befund, dass in der Entwicklungsphase bei SHR vermehrt eNOS-mRNA vorhanden ist, lässt eine Hemmung der ACE-Aktivität wahrscheinlich erscheinen. So werden durch eine geringere Bildung von ANG II vasokonstriktorische Stimuli vermindert. Hieraus ergibt sich, dass eine

erhöhte eNOS-mRNA-Menge dem Hypertonus entgegen wirkt. Da die Veränderungen in der Niere im Ganzen gering ausgefallen sind, ist eine Beteiligung an der Pathogenese des genetischen Hypertonus eher von untergeordneter Bedeutung.

Sowohl nNOS- als auch eNOS-Protein konnten in den hier durchgeführten Untersuchungen zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. Mit immunhistologischen Färbungen sind beide Formen in der Niere nachgewiesen worden (*Fernandez et al., 2003*), so dass es an einer ungenügenden Affinität oder Selektivität des in dieser Arbeit verwendeten Erstantikörpers in Nierengewebe liegen könnte.

### **5.5. Expression von iNOS**

Sowohl mRNA als auch Protein von iNOS konnten in keinem der untersuchten Organe nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt es daran, dass bei unseren Versuchstieren iNOS erwartungsgemäß nicht induziert war und daher in nicht detektierbaren Mengen vorlag. Erst nach einer Induktion mit LPS oder Zytokinen, die mehrere Stunden dauert, wird iNOS vermehrt exprimiert und produziert große Mengen NO. In nicht-induziertem Zustand sind die Genexpression und die Aktivität von iNOS entsprechend gering und mit unseren Methoden nicht nachweisbar.

In anderen Publikationen konnte iNOS-Aktivität in 14-17 Wochen alten SHR in der Aorta nachgewiesen werden, nicht jedoch in gleichaltrigen WKY. Im Alter von 63 Wochen konnte dann in beiden Gruppen iNOS-Aktivität festgestellt werden (*Chou et al., 1998*). Vermutet wird, dass durch die Schädigung des Endothels durch den anhaltenden hohen Blutdruck in SHR die Expression von iNOS angeregt und damit früher detektierbar wird. Auch Vernet et al., (1998) fanden heraus, dass die iNOS-Expression im Hypothalamus bei normotensiven Ratten erst im Alter von 24 Monaten zu detektieren ist, bei jungen Tieren im Alter von einem Monat war dies nicht möglich, im Alter von 3 Monaten nur eingeschränkt. Mit höchstens 12-13 Wochen waren unsere Versuchstiere möglicherweise zu jung, um detektierbare iNOS-Expressionen aufzuweisen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-PCR und des Western-Blots ließ sich iNOS in den durchgeführten immunhistologischen Färbungen in der HHN-Achse und den Hirnstammregionen nachweisen. Es scheint, dass diese Methode sensitiver ist, so dass auch geringe Mengen an iNOS detektierbare Signale ergeben.

## **5.6. Schlussfolgerungen**

Die Befunde dieser Arbeit weisen darauf hin, dass das NO-cGMP-System an der Pathogenese sowie an der Kompensation der genetisch bedingten Hypertonie insbesondere in der HHN-Achse durch die nNOS-Expression bereits vor und während der Hypertonieentwicklung beteiligt ist. In Hirnstamm, Aorta und Niere dagegen scheint es weniger stark involviert zu sein. Unsere Ergebnisse in Bezug auf die eNOS-Expression deuten darauf hin, dass diese Isoform hauptsächlich im Hirnstamm zur Pathogenese des Hypertonus beiträgt, während iNOS auf die Hypertonie keinen besonderen Einfluss auszuüben scheint.

## 6. Zusammenfassung

Frühere Befunde über eine Blutdruckerhöhung nach zentraler nNOS-Blockade sowie über veränderte NOS-Aktivitäten in Hypothalamus und Hirnstamm bei SHR legen eine Beteiligung des NO-cGMP-System an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie nahe. Wir erhoben die Hypothese, dass in verschiedenen blutdruckrelevanten Hirnregionen während der Hypertonieentwicklung veränderte Genexpressionen der NOS-Isoformen bei SHR vorliegen, die in dieser Arbeit in HHN-Achse, Hirnstammregionen, Aorta und Niere untersucht wurden. Mit RT-PCR und Western-Blot-Methode wurden mRNA- und Proteinmengen von nNOS, eNOS und iNOS bei SHR im Alter von 3-4 (prähypertensive Phase), 7-8 (Entwicklungsphase) und 12-13 Wochen (Erhaltungsphase) analysiert und mit gleichaltrigen normotensiven WKY-Ratten verglichen. In der gesamten HHN-Achse zeigte sich bei den SHR eine Erhöhung der nNOS-mRNA, die Proteinmenge war im Hypothalamus erhöht, in der Hypophyse unverändert und in der Nebenniere erniedrigt. Die eNOS-Expression blieb in der HHN-Achse unverändert. In den Hirnstammregionen war eine Erhöhung der nNOS-mRNA nur bei prähypertensiven SHR zu beobachten, während die Proteinmengen unbeeinflusst blieben. Die eNOS-mRNA war bei 7-8 und 12-13 Wochen alten SHR erhöht, wohingegen die Proteinmengen zu jedem untersuchten Zeitpunkt erniedrigt waren. In Aorta und Niere zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der nNOS-mRNA, die eNOS-mRNA war bei 3-4 und 7-8 Wochen alten SHR erhöht. iNOS konnte weder auf mRNA- noch auf Proteinebene detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das NO-cGMP-System bei der Entstehung des genetisch bedingten Hypertonus beteiligt ist. Insbesondere die veränderte Expression von nNOS in der HHN-Achse könnte dabei ursächlich sein, und die erniedrigten Proteinmengen von eNOS im Hirnstamm geben einen Hinweis auf hypertoniefördernde Einflüsse. In Aorta und Niere sind die Veränderungen geringer ausgeprägt, so dass auf eine schwache Beteiligung an der Pathogenese geschlossen werden kann. Auch der Einfluss von iNOS kann als untergeordnet interpretiert werden. Die beteiligten molekularen Mechanismen dieser veränderten Expression der NOS-Isoformen bedürfen weiterer Aufklärung, um die genetisch bedingte Hypertonie eingehender zu charakterisieren und neue pharmakologische Angriffspunkte für die Behandlung zu finden.

## 7. Literaturverzeichnis

**Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG:** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615 (2001)

**Barnes KL, Ferrario CM, Chernicky CL, Brosnihan KB:** Participation of the area postrema in cardiovascular control in the dog. *Fed Proc* 43, 2959-2962 (1984)

**Berecek KH, Kirk KA, Nagahama S, Oparil S:** Sympathetic function in spontaneously hypertensive rats after chronic administration of captopril. *Am J Physiol* 252, H796-H806 (1987)

**Bogdan C:** Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907-916 (2001)

**Bredt D, Hwang P, Snyder S:** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770 (1990)

**Bustin SA:** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193 (2000)

**Cabassi A, Vinci S, Calzolari M, Bruschi G, Cavatorta A, Borghetti A:** The relationship between regional sympathetic activity and the onset of arterial hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Cardiologia* 42, 393-396 (1997)

**Cabassi A, Vinci S, Calzolari M, Bruschi G, Borghetti A:** Regional sympathetic activity in pre-hypertensive phase of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 62, 1111-1118 (1998)

**Cabrera C, Bohr D:** The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 77-81 (1995)

**Ceccatelli S, Hulting A, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hokfelt T:** Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11292-11296 (1993)

**Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C:** Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176, 599-604 (1992)

**Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA:** Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31, 643-648 (1998)

**Church JE, Fulton D:** Differences in eNOS activity because of subcellular localization are dictated by phosphorylation state rather than the local calcium environment. *J Biol Chem* 281, 1477-1488 (2006)

**Costa A, Poma A, Navarra P, Forsling ML, Grossman A:** Gaseous transmitters as new agents in neuroendocrine regulation. *J Endocrinol* 149, 199-207 (1996)

**Dickhout JG, Lee RM:** Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29, 781-789 (1997)

**Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS:** General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* 3, S30-37 (1993)

**Dominiczak AF, Bohr DF:** Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension* 25, 1202-1211 (1995)

**Fernandez AP, Serrano J, Castro S, Salazar FJ, Lopez JC, Rodrigo J, Nava E:** Distribution of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 21, 2375-2388 (2003)

**Fernandez-Alfonso MS, Gonzalez C:** Nitric oxide and the renin-angiotensin system. Is there a physiological interplay between the systems? *J Hypertens* 17, 1355-1361 (1999)

**Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F:** Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 727-732 (1990)

**Furchgott RF, Zawadzki JV:** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376 (1980)

**Ganten D:** Role of animal models in hypertension research. *Hypertension* 9 [Suppl I], I-2 - I-4 (1987)

**Grange-Messent V, Raison D, Dugas B, Calas A:** Noradrenaline up-regulates the neuronal and the inducible nitric oxide synthase isoforms in magnocellular neurons of rat brain slides. *J Neurosci Res* 78, 683-690 (2004)

**Hashimoto K, Makino S, Hirasawa R, Takao T, Sugawara M, Murakami K, Ono K, Ota Z:** Abnormalities in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats during development of hypertension. *Endocrinology* 125, 1161-1167 (1989)

**Häuser W, Sassmann A, Qadri F, Jöhren O, Dominiak P:** Expression of nitric oxid synthase isoforms in hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the development of spontaneous hypertension in rats. *Mol Brain Res* 138: 198-204 (2005)

**Hennington BS, Zhang H, Miller MT, Granger JP, Reckelhoff JF:** Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* 31, 283-288 (1998)

**Hilbig H, Holler J, Dinse HR, Bidmon HJ:** In contrast to neuronal NOS-I, the inducible NOS-II expression in aging brains is modified by enriched environmental conditions. *Exp Toxicol Pathol* 53, 427-431 (2002)

**Horn T, Smith P, McLaughlin BE, Bauce L, Marks GS, Pittman QJ, Ferguson AV:** Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. *Am J Physiol* 266, R306-R313 (1994)

**Iwai N, Hanai K, Tooyama I, Kitamura Y, Kinoshita M:** Regulation of neuronal nitric oxide synthase in rat adrenal medulla. *Hypertension* 25, 431-436 (1995)

**Iwase K, Iyama K, Akagi K, Yano S, Fukunaga K, Miyamoto E, Mori M, Takiguchi M:** Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. *Mol Brain Res* 53, 1-12 (1998)

**Janssen BJ, van Essen H, Vervoort-Peters LH, Struyker-Boudier HA, Smits JF:** Role of afferent renal nerves in spontaneous hypertension in rats. *Hypertension* 13, 327-333 (1989)

**Kadowaki K, Kishimoto J, Leng G, Emson P:** Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology* 134, 1011-1017 (1994)

**Kagiyama S, Tsuchihashi T, Abe I, Fujishima M:** Enhanced depressor response to nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31, 1030-1034 (1998)

**Kato M:** Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology* 131, 2133-2138 (1992)

**Kishi T, Hirooka Y, Sakai K, Shigematsu H, Shimokawa H, Takeshita A:** Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. *Hypertension* 38, 896-901 (2001)

**Klett CP, Anderson D, Sholook M, Granger JP:** Antisense oligodeoxynucleotides directed against a novel angiotensinogen mRNA-stabilizing protein reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol* 287, R619-R626 (2004)

**Kobialka M, Gorczyca WA:** Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation. *Acta Biochim Pol* 47, 517-28 (2000)

**Korner PI:** Cardiovascular hypertrophy and hypertension: causes and consequences. *Blood Press Suppl.* 2: 6-16 (1995)

**Krukoff TL, Gehlen F, Ganten D, Wagner J:** Gene expression of brain nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in hypothalamus and medulla of two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 26, 171-176 (1995)

**Krukoff TL:** Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Rev* 30, 52-65 (1999)

**Lewis S, Ohta H, Machado B, Bates J, Talman W:** Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarius decreases arterial pressure and heart rate via activation of soluble guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 202, 135-136 (1991)

**Linz W, Wohlfart P, Schnölkens BA, Malinski T, Wiemer G:** Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res* 43, 549-561 (1999)

**Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK:** Nitric oxide synthase and arginase in the rat hippocampus and the entorhinal, perirhinal, postrhinal, and temporal cortices: regional variations and age-related changes. *Hippocampus* 13, 859-867 (2003)

**Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK:** Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience* 119, 679-687 (2003)

**Lockette W, Otsuka Y, Carretero O:** The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 8, 1161-1166 (1986)

**Loscalzo J:** Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 88, 756-762 (2001)

**Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275 (1951)

**Ma SX, Long JP:** Effects of nitroglycerin on release, synthesis and metabolism of norepinephrine and activation of tyrosine hydroxylase in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* 199, 27-33 (1991)

**Magee T, Marquez D, Rodriguez JA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF:** Cloning of a novel neuronal nitric oxide synthase expressed in penis and lower urinary tract. *Biochem Biophys Res Commun* 226, 145-151 (1996)

**Marley PD, McLeod J, Anderson C, Thomson KA:** Nerves containing nitric oxide synthase and their possible function in the control of catecholamine secretion in the bovine adrenal medulla. *J Auton Nerv Syst* 54, 184-194 (1995)

**Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Steward RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT:** Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268, 17478-17488 (1993)

**Mashimo H, Goyal RK:** Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol* 277, G745-G750 (1999)

**Mattson D, Wu F:** Nitric oxide synthase activity and isoforms in rat renal vasculature. *Hypertension* 35, 337-341 (2000)

**Mattson D, Maeda CY, Bachman TD, Cowley AW:** Inducible nitric oxide synthase and blood pressure. *Hypertension* 31, 15-20 (1998)

**McCann SM, Karanth S, Kimura M, Yu WH, Rettori V:** The role of nitric oxide (NO) in control of hypothalamic-pituitary function. *Rev Bras Biol* 56, 105-112 (1996)

**McCann SM, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH:** Hypothalamic control of FSH and LH by FSH-RF, LHRH, cytokines, leptin and nitric oxide. *Neuroimmunomodulation* 5, 193-202 (1998)

**McCarty R, Kirby RF, Cierpial MA, Jenal TJ:** Accelerated development of cardiac sympathetic responses in spontaneously hypertensive (SHR) rats. *Behav Neural Biol* 48, 321-333 (1987)

**Michel T, Feron O:** Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100, 2146-2152 (1997)

**Michel T:** Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res* 32, 1361-1366 (1999)

**Miles PR, Bowman L, Rengasamy A, Huffman L:** Constitutive nitric oxide production by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol* 274, L360-L368 (1998)

**Minami N, Imai Y, Munakata M, Sasaki S, Sekino H, Abe K, Yoshinaga K:** Age-related changes in blood pressure, heart rate and baroreflex sensitivity in SHR. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 15, 85-87 (1989)

**Moncada S, Radomski MW, Palmer RM:** Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 37, 2495-2501 (1988)

**Moncada S, Higgs A:** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-12 (1993)

**Moncada S:** Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *J Lab Clin Med* 120, 187-191 (1992)

**Moncada S, Bolanos JP:** Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J Neurochem 97, 1676-1689 (2006)

**Morris M, Keller M, Sundberg DK:** Changes in paraventricular vasopressin and oxytocin during the development of spontaneous hypertension. Hypertension 5, 476-481 (1983)

**Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H:** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Biotechnology 24, 17-27 (1986)

**Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Förstermann U, Murad F:** Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. FEBS Lett 316, 175-180 (1993)

**Natarajan R, Lanting L, Bai W, Bravo EL, Nadler J:** The role of nitric oxide in the regulation of aldosterone synthesis by adrenal glomerulosa cells. J Steroid Biochem Mol Biol 61, 47-53 (1997)

**Nathan C, Xie QW:** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 269, 13725-13728 (1994)

**Newton CR, Graham A:** PCR. 1. Auflage, 40-46, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1994)

**Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D:** The nucleotide sequence of rat cytoplasmic beta-actin gene. Nucleic Acids Res. 11, 1759-1771 (1983)

**Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S:** Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 191, 89-94 (1993)

**Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, Yokoyama M:** Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 102, 2061-2071 (1998)

**Okamoto K:** Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol* 7, 227-270 (1969)

**Ollerstam A, Persson AE:** Macula densa neuronal nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 56, 189-196 (2002)

**Olson SC, Dowds TA, Pino PA, Barry MT, Burke-Wolin T:** Ang II stimulates endothelial nitric oxide synthase expression in bovine pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273, L315-L321 (1997)

**Palkovits M, Brownstein M:** Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier Verlag, New York (1988)

**Pearce WJ, Tone B, Ashwal S:** Maturation alters cerebral NOS kinetics in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 273, R1367-R1373 (1997)

**Persson AE, Gutierrez A, Pittner J, Ring A, Ollerstam A, Brown R, Liu R, Thorup C:** Renal NO production and the development of hypertension. *Acta Physiol Scand* 168, 169-174 (2000)

**Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL:** Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 57: 456-67 (2003)

**Plochocka-Zulinska D, Krukoff TL:** Increased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of adult spontaneously hypertensive rats. *Mol Brain Res* 48, 291-297 (1997)

**Pyriochou A, Papapetropoulos A:** Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal* 17, 407-413 (2005).

**Qadri F, Carretero OA, Scicli AG:** Centrally produced neuronal nitric oxide in the control of baroreceptor reflex sensitivity and blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 81, 279-285 (1999)

**Qadri F, Arens T, Schwartz EC, Häuser W, Dominiak P:** Angiotensin-converting enzyme inhibitors and AT1-receptor antagonist restore nitric oxide synthase (NOS) activity and neuronal NOS expression in the adrenal glands of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 85, 365-369 (2001)

**Qadri F, Arens T, Schwartz EC, Häuser W, Dendorfer A, Dominiak P:** Brain nitric oxide synthase activity in spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *J Hypertens* 21, 1687-1694 (2003)

**Raasch W, Bartels T, Schwartz C, Häuser W, Rutten H, Dominiak P:** Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors? *J Hypertens* 20, 2495-2504 (2002)

**Rettori V, Canteros G, McCann SM.** Interaction between NO and oxytocin: influence on LHRH release. *Braz J Med Biol Res* 30, 453-457 (1997)

**Ricardo JA, Koh ET:** Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153, 1-26 (1978)

**Rodrigo J, Riveros-Moreno V, Bentura ML, Uttenthal LO, Higgs EA, Fernandez AP, Polak JM, Moncada S, Martinez-Murillo R:** Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *J Comp Neurol* 378, 522-534 (1997)

**Ruch W, Baumann J, Hausler A, Otten U, Siegl H, Girard J:** Importance of the adrenal cortex for development and maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 105, 417-424 (1984)

**Rubinstein I, Abassi Z, Coleman R, Milman F, Winaver J, Better OS:** Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J Clin Invest* 101, 1325-1333 (1998)

**Sakai K, Hirooka Y, Matsuo I, Eshima K, Shigematsu H, Shimokawa H, Takeshita A:** Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo. *Hypertension* 36, 1023-1028 (2000)

**Sakai K, Hirooka Y, Shigematsu H, Kishi T, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K:** Overexpression of eNOS in brain stem reduces enhanced sympathetic drive in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2159-H2166 (2005)

**Salaymeh B, Lee MF, Weyhenmeyer JA:** A comparison of CNS angiotensin II binding in the hypothalamus-thalamus-septum-midbrain region of developing spontaneously hypertensive and normotensive rats. *J Hypertens* 4, 617-622 (1986)

**Schiffrin EL:** Vascular remodeling and endothelial function in hypertensive patients: effects of antihypertensive therapy. *Scand Cardiovasc J Suppl* 47, 15-21 (1998)

**Schricker K, Pötzl B, Hamann M, Kurtz A:** Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (b-NOS) mRNA levels in rat kidneys. *Pflügers Arch (Eur J Physiol)* 432, 394-400 (1996)

**Schwarz PM, Rodriguez-Pascual F, Koesling D, Torres M, Förstermann U:** Functional coupling of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in controlling catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 82, 255-265 (1997)

**Seidel B, Jiang L, Wolf G:** Cloning and expression of the rat endothelial nitric oxide synthase. PubMed Nucleotide Query, Acc No AJ011116 (1998)

**Seo DO and Rivier C:** Microinfusion of a nitric oxide donor in discrete brain regions activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 13, 925-933 (2001)

**Sherer TB, Neff PS, Hankins GR, Tuttle JB:** Mechanisms of increased NGF production in vascular smooth muscle of the spontaneously hypertensive rat. *Exp Cell Res* 241, 186-193 (1998)

**Siles E, Martinez-Lara E, Canuelo A, Sanchez M, Hernandez R, Lopez-Ramos J, Del Moral M, Esteban F, Blanco S, Pedrosa J, Rodrigo J, Peinado M:** Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. *Brain Research* 956, 385-392 (2002)

**Snyder SH, Bredt DS:** Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 12, 125-128 (1991)

**Spyer KM:** Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol* 1, 1-19 (1994)

**Stanarius A, Topel I, Noack H, Wolf G:** Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide synthase in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta Histochem* 99, 411-429 (1997)

**Strosznajder JB, Jesko H, Zambrzycka A, Eckert A, Chalimoniuk M:** Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats. *Neurosci Lett* 370, 175-179 (2004)

**Swanson LW, Sawchenko PE:** Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6, 269-324 (1983)

**Torvik A:** Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *J Comp Neurol* 106, 51-141 (1956)

**Tseng CJ, Liu HY, Lin HC, Ger LP, Tung CS, Yen MH:** Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. *Hypertension* 27, 36-42 (1996)

**Tucker DC, Johnson AK:** Development of autonomic control of heart rate in genetically hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol* 246, R570-R577 (1984)

**Vernet D, Bonavera JJ, Swerdloff RS, Gonzalez-Cadavid NF, Wang C:** Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain regions of aging rats. *Endocrinology* 139, 3254-3261 (1998)

**Vincent SR, Kimura H:** Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46, 755-784 (1992)

**Ward LE, Hunter LW, Grabau CE, Tyce GM, Rorie DK:** Nitric oxide reduces basal efflux of catecholamines from perfused dog adrenal glands. *J Auton Nerv Syst* 61, 235-242 (1996)

**Wasilewski N, Qadri F, Häuser W, Dendorfer A, Dominiak P:** Expression of beta-adrenergic receptors in HPA axis during the development of hypertension in rats. *J Hypertens* 22, S170-S171 (2004)

**Wijnen HJ, Spierenburg HA, de Kloet ER, de Jong W, Versteeg DH:** Decrease in noradrenergic activity in hypothalamic nuclei during development of spontaneous hypertension. *Brain Res* 184, 153-162 (1980)

**Xu W, Charles IG, Moncada S, Gorman P, Sheer D, Liu L, Emson P:** Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics* 21, 419-422 (1994)

**Yamori Y, Lovenberg W:** Spontaneously hypertensive rats. Hypertension 9 [Suppl I], I-13 - I-14 (1987)

**Yamori Y, Ikeda K, Kulakowski EC, McCarty R, Lovenberg W:** Enhanced sympathetic-adrenal medullary response to cold exposure in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 3, 63-66 (1985)

**Ye S, Nosrati S, Campese VM:** Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF). J Clin Invest 99, 540-548 (1997)

**Zhang K, Patel KP:** Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. Am J Physiol 275, R728-R734 (1998)

**Zicha J, Kunes J:** Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. Physiol Rev 79, 1227-1282 (1999)

## **8. Anhang**

### **8.1. Veröffentlichungen**

**Häuser W, Sassmann A, Qadri F, Jöhren O, Dominiak P:** Expression of nitric oxid synthase isoforms in hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the development of spontaneous hypertension in rats. Mol Brain Res 138: 198-204 (2005)

### **8.2. Poster**

**Häuser W, Sassmann A, Qadri F, Jöhren O, Dominiak P:** Unterschiedliche mRNA-Expression der NOS Isoenzyme in Gehirn und Nebennieren spontan hypertensiver Ratten in Abhängigkeit von der Entstehung des Bluthochdrucks. 25. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes. Deutsche Hypertonie Gesellschaft. 28.11.-1.12.2001. Stadthalle Bielefeld.

### **8.3. Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Peter Dominiak für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck.

Frau Dr. Fatimunnisa Qadri und Herrn Dr. Walter Häuser für die umfassende Betreuung, die Ratschläge und Unterstützung bei der Konzipierung und Durchführung der Experimente sowie bei der Gestaltung und Bearbeitung dieses Manuskripts.

Frau Christine Eichholz für die Einarbeitung in die Western Blot Methode sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

## 8.4. Lebenslauf

Name: Antonia Barbara Sassmann  
Geburtstag: 10.10.1977  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

Schulen:	1984-1988	Grund- und Hauptschule Hittfeld
	1988-1990	Orientierungsstufe Hittfeld
	1990-1997	Gymnasium Hittfeld
Schulabschluß:	1997	Abitur am Gymnasium Hittfeld

### Hochschulstudium

Immatrikulation: WS 1997/1998  
an der Medizinischen Universität zu Lübeck

Ärztliche Vorprüfung: bestanden am 20.09.1999

Erstes Staatsexamen: bestanden am 29.08.2000

Zweites Staatsexamen: bestanden am 19.09.2002

Drittes Staatsexamen: bestanden am 14.04.2004

Ärztliche Prüfung: bestanden am 14.04.2004

Promotion: Dezember 1999 bis März 2002 im Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck

### Berufstätigkeit

Ärztin im Praktikum: vom 01.05.2004 bis 30.09.2004  
im Pharmakologischen Institut der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Assistenzärztin: seit 01.10.2004  
im Pharmakologischen Institut der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg