

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

**Einfluss antihypertensiver Behandlung auf die Genexpression der
NO-Synthase-Isoformen im Gehirn und in den Nebennieren von
spontan hypertensiven Ratten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von

Alexander Mischnik

aus Gütersloh

Lübeck 2008

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

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Ruth Müller-Bardorff

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.10.2008

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

Inhaltsverzeichnis

A. Abkürzungen	4
1. Einleitung	6
1.1. Zentrales Stickstoffmonoxid	6
1.2. Zentrale Wirkungen von NO	8
1.2.1. Verteilung von NO-produzierenden Neuronen im ZNS	8
1.2.2. Wirkungen von NO in der HHN-Achse und im Hirnstamm	8
1.3. Zusammenspiel zwischen NO, dem Renin-Angiotensin-System und dem Sympathikus	10
1.4. SHR als Modell für die Untersuchung der essentiellen Hypertonie	10
1.5. Hypothesen und Fragestellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.1.1. Tiere	13
2.1.2. Geräte	13
2.1.3. Substanzen	14
2.1.4. Lösungen	17
2.2. Methoden	20
2.2.1. Behandlung der Versuchstiere	20
2.2.2. Blutdruckmessung	20
2.2.3. Gewebeentnahme	21
2.2.4. RT-PCR-Analyse	22
2.2.4.1. Isolierung und Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration	22
2.2.4.2. Reverse-Transkriptase-Reaktion	22
2.2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion	23
2.2.4.4. Restriktionsanalyse	25
2.2.5. Western-Blot-Analyse	26

2.2.5.1. Vorbereitung der Proben	26
2.2.5.2. Gesamtproteinbestimmung nach Lowry	27
2.2.5.3. Western-Blot-Technik	27
2.2.6. Statistische Auswertung	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Einfluss der chronisch antihypertensiven Therapie auf	31
3.1.1. Körpergewicht	31
3.1.2. Systolischen Blutdruck	31
3.1.3. Herzfrequenz	31
3.2. nNOS-mRNA- und Proteinmenge nach antihypertensiver Behandlung	32
3.2.1. Hypothalamus	32
3.2.2. Hypophyse	34
3.2.3. Nebenniere	35
3.2.4. Dorsale Medulla	36
3.2.5. Ventrale Medulla	37
3.3. eNOS-mRNA- und Proteinmenge nach antihypertensiver Behandlung	38
3.3.1. HHN-Achse	38
3.3.2. Hirnstamm-Regionen	40
3.4. iNOS-mRNA- und Proteinmenge nach antihypertensiver Behandlung	42
3.4.1. HHN-Achse	42
3.4.2. Hirnstamm-Regionen	44
3.5. Zusammenfassung	45
4. Diskussion	48
4.1. Einfluss von Antihypertensiva auf die nNOS-Genexpression	48
4.1.1. in der HHN-Achse	48
4.1.2. im Hirnstamm	50
4.2. Einfluss von Antihypertensiva auf die eNOS-Genexpression in der HHN-Achse und im Hirnstamm	52
4.3. Einfluss von Antihypertensiva auf die iNOS-Genexpression in der HHN-Achse und im Hirnstamm	53

4.4. Schlussfolgerung	54
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturverzeichnis	56
7. Danksagung	69
8. Curriculum vitae	70
9. Posterpräsentationen und Publikationen	71

A. Abkürzungen

7-NI	7-Nitroindazol
ACE	Angiotensin I-Konversionsenzym
bpm	Beats per Minute (Herzschläge pro Minute)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CRF	Corticotropin-releasing factor
CVLM	Kaudale ventrolaterale Medulla
DM	Dorsale Medulla
EDRF	Endothelium-derived-relaxing factor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
HF	Herzfrequenz
HHN	Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KG	Körpergewicht
L-NAME	N ⁰ -Nitro-L-Arginin Methylester
L-NIO	N- ^δ Iminoethyl-L-Arginin
L-NMMA	N ⁰ -Monomethyl-L-Arginin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

A. Abkürzungen

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NTS	Nucleus tractus solitarii
PAG	Periaquäduktales Grau
PVN	Nucleus paraventricularis
RAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RVLM	Rostrale ventrolaterale Medulla
SBP	Systolischer Blutdruck
SEM	Standard error of the means = Mittlerer Standardfehler
SHR	Spontan hypertensive Ratten
SON	Nucleus supraopticus
VM	Ventrale Medulla
vs.	versus
WKY-Ratte	Wistar-Kyoto-Ratte

1. Einleitung

1.1. Zentrales Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges Molekül, das viele Funktionen im Organismus übernimmt. Im Jahre 1980 wurde NO erstmals von *Furchgott und Zawadzki* als Endothelium-derived-relaxing factor (EDRF) beschrieben. Beide stellten fest, dass die Endothelzellen der Blutgefäße eine mit den organischen Nitraten verwandte, gefäßerweiternde Substanz freisetzen, die später von *Moncada et al. (1988)* als NO identifiziert wurde.

Das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert unter Mitwirkung von Tetrahydrobiopterin (BH₄), O₂ und Kofaktoren wie NADPH die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin, bei der NO entsteht. Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der NO-Synthese.

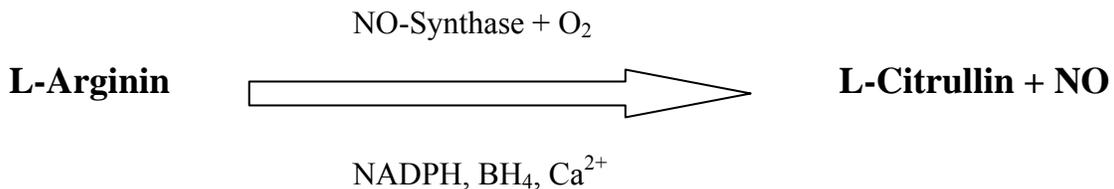


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der NO-Synthese.

NO kann nicht innerhalb der Zelle gespeichert werden. Es wird aus der Zelle, in der es produziert wird, freigesetzt und diffundiert zu umliegenden Gewebezellen. Es bindet an die lösliche Guanylatzyklase und löst eine Kaskade von Effekten aus (*Snyder und Bredt, 1991*).

NO ist extrem kurzlebig. Seine Halbwertszeit beträgt 5-30 Sekunden. Die Inaktivierung von NO geschieht sehr schnell. Dabei entstehen Nitrit und Nitrat.

Die NOS ist ein ubiquitäres Enzym, von dem drei Isoformen existieren: die neuronale NOS (NOS-1 oder nNOS), die induzierbare NOS (NOS-2 oder iNOS) und die endotheliale NOS (NOS-3 oder eNOS). nNOS liegt in neuronalen Zellen konstitutiv vor. Besonders im Gehirn, im Rückenmark, in sympathischen Ganglien, in den Nebennieren und in peripheren nitroxidergen Neuronen wurde nNOS nachgewiesen (*Rodrigo et al., 1997; Vincent und Kimura, 1992*). Auch in Astrozyten im Cortex von Ratten ist die Expression von nNOS nachgewiesen

worden (*Yuan et al., 2004*). Unter unphysiologischen Bedingungen wie z.B. Dehydratation oder Stress kann nNOS vermehrt produziert werden (*Michel und Feron, 1997; Krukoff, 1999*). eNOS wurde im Endothel von Blutgefäßen nachgewiesen, wo das Enzym ebenfalls konstitutiv vorliegt. Auch in glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen (*Michel, 1999*), Thrombozyten sowie in der Lunge (*Le Cras et al., 1996*) und im Gehirn ist eNOS nachweisbar. Bei Scherstress durch den Blutfluss kann eNOS in Gefäßen auch stärker exprimiert werden (*Nishida et al., 1992*). Von eNOS sind zwei Formen durch molekulare Umlagerung möglich: eine membrangebundene und eine zytosolische Form, wobei beide Formen ineinander überführbar sind. Die dritte Isoform iNOS erhielt ihren Namen durch die Beobachtung, dass sich dieses Enzym, das im Gegensatz zu den oben genannten NOS-Isoformen nicht konstitutiv exprimiert ist, durch Entzündungsmediatoren wie Zytokine oder durch LPS induzieren lässt (*Wong et al., 1996*). iNOS wurde zuerst in Makrophagen beschrieben, aber sie ist mittlerweile auch in glatten Muskelzellen, Hepatozyten, Astrozyten und Microglia nachgewiesen (*Busse und Mulsch, 1990; Charles et al., 1993*).

Die physiologische Hemmung der NOS vollzieht sich vor allem durch einen negativen Feedback-Mechanismus. Dabei interagiert NO direkt mit funktionellen Gruppen der NOS, wie der Häm-Gruppe, und führt so zu einer Hemmung des Enzyms (*Griscavage et al., 1994*). Auch andere Moleküle wie Cyanidionen oder CO, die Liganden des Häm sind, hemmen die Aktivität der NOS (*White und Marletta, 1992*).

Iatrogen kann die NO-Synthese durch verschiedene Inhibitoren, die Analoga von L-Arginin sind, kompetitiv gehemmt werden, wie z.B. durch die Behandlung mit N^ω-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N^ω-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME). L-NAME ist ein spezifischer Inhibitor für nNOS und eNOS, während L-NMMA überwiegend selektiv eNOS hemmt. Ein spezifischer Inhibitor für nNOS ist 7-Nitroindazol (7-NI). Der Inhibitor N^δ-Iminoethyl-L-Ornithin (L-NIO) ist spezifisch für iNOS (*Griffith und Kilbourn, 1996*). Eine Hemmung der NO-Synthese kann auch über Calmodulin-Antagonisten und über Kalziumbindende Proteine wie Neuromodulin und Neurogranin erfolgen (*Bredt und Snyder, 1990; Slemmon und Martzen, 1994*).

1.2. Zentrale Wirkungen von NO

1.2.1. Verteilung von NO-produzierenden Neuronen im ZNS

NO-produzierende Zellen wurden in verschiedenen Hirnarealen der Ratten lokalisiert. In den vorderen Hirnarealen und im Hypothalamus wurden NO-produzierende Neurone in der medialen präoptischen Area, außerdem auch im medialen und lateralen Septum nachgewiesen. Es handelt sich hierbei in erster Linie um den Nachweis von nNOS-positiven Zellen. nNOS konnte auch in cholinergen Neuronen im diagonalen Broca-Band und im medialen Septum nachgewiesen werden (*Sugaya und McKinney, 1994*). Im Hypothalamus wurden NO-produzierende Neurone besonders im Nucleus paraventricularis (PVN) und im Nucleus supraopticus (SON) gefunden. Andere Regionen im Hypothalamus mit Nachweis einer nNOS liegen dorsomedial, ventromedial und lateral (*Swanson und Sawchenko, 1983*). Auch in den Nuclei corporis mamillaris konnte der Nachweis von NO-produzierenden Neuronen erbracht werden. Ferner wurden NO-produzierende Neurone im periaquäduktalen Grau (PAG), im Nucleus parabrachialis und in den Raphe-Kernen nachgewiesen. Im Bereich der dorsalen Medulla wurde die größte Dichte an NO-produzierenden Zellen im Nucleus tractus solitarii (NTS) gefunden. Im Bereich der ventralen Medulla liegt sie in der als „depressorische Region“ bezeichneten kaudalen ventrolateralen Medulla (CVLM) und in der als „pressorische Region“ bezeichneten rostralen ventrolateralen Medulla (RVLM) (*Vincent und Kimura, 1992; Ohta et al., 1993*).

1.2.2. Wirkungen von NO in der HHN-Achse und im Hirnstamm

Die Verteilung von NOS in verschiedenen Hirnarealen zeigt die Wichtigkeit von NO als Neuromodulator in verschiedenen physiologischen Systemen, die zentral gesteuert werden. Es wurde gezeigt, dass NO zentral depressiv auf den Sympathikotonus wirkt und dadurch den peripheren arteriellen Blutdruck verringert (*Sakuma et al., 1992; Plochocka-Zulinska und Krukoff, 1997*). In Studien über die Enzymaktivität von NOS in verschiedenen Hirnregionen wurde im Hypothalamus, in der Hypophyse und im Mittelhirn (besonders im NTS) eine besonders hohe Aktivität festgestellt. Dabei handelt es sich in erster Linie um die nNOS, die in den genannten Hirnregionen stark exprimiert wird (*Qadri et al., 1999; 2003*). Intraventrikuläre Infusion eines NO-Donators bei SHR führte zu einem Blutdruckabfall und zu einer Brady-

kardie, die Applikation eines NOS-Inhibitors führte dagegen zu einem Blutdruckanstieg und zu einer Tachykardie (Togashi et al., 1992; Cabrera und Bohr, 1995). Diese Ergebnisse zeigen, dass NO das sympathische Nervensystem als kardiovaskuläres Regulationszentrum hemmt (Hirooka und Takeshita, 2001).

Im hypothalamischen PVN stimuliert Angiotensin II als exzitatorischer Neurotransmitter an der postsynaptischen Membran die Produktion von NO, während NO die präsynaptische Freisetzung von Angiotensin II im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismusses hemmt (Bains und Ferguson, 1994). Horn et al. (1994) konnten nach Mikroinjektionen eines NO-Donors in den PVN einen signifikanten Blutdruckabfall nachweisen. Der blutdrucksenkende Effekt des zentralen NO im PVN scheint durch GABA vermittelt zu werden (Zhang und Patel, 1998).

Im Hirnstamm interagiert NO besonders mit dem PAG, dem NTS und Teilen der ventralen Medulla. NO hemmt vermutlich das PAG im dorsolateralen Teil, so dass es dadurch zu einer reduzierten sympathischen Aktivität kommt, da es nach Mikroinjektionen von NOS-Inhibitoren in das PAG zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks kam, während Mikroinjektionen von NO-Donatoren in das PAG zu einem Blutdruckabfall führten (Hall und Behbehani, 1997; 1998). Es ist bekannt, dass der NTS eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Barorezeptor-Reflexes spielt (Lewis et al., 1991; Harada et al., 1993). Das im NTS gebildete NO stimuliert die Freisetzung der exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat aus der dorsomedialen Medulla, umgekehrt scheinen diese Aminosäuren die Freisetzung von NO in den NTS zu hemmen (Lawrence und Jarrott, 1993; Lo et al., 1997). Das im NTS freigesetzte NO scheint auch mit Adenosin zu interagieren, da Mikroinjektionen von NOS-Inhibitoren oder Adenosin-Rezeptor-Antagonisten in den NTS einen durch NO und Adenosin ausgelösten Blutdruckabfall aufheben konnten (Lo et al., 1998). Mikroinjektionen von L-Arginin in den NTS und in die RVLM bei SHR führten zu starken Blutdruckabfällen und zur Bradykardie (Tseng et al., 1996). Mikroinjektionen des NOS-Inhibitors L-NAME in die RVLM bewirkten eine Steigerung des Blutdrucks und der Sympathikusaktivität (Kagiyama et al., 1998).

Das zentrale NO-System befindet sich bei adulten SHR offenbar in einem Zustand größerer Aktivität als bei WKY-Ratten. Dies zeigte sich auch beim Vergleich der NOS-Aktivität zwischen SHR und WKY im Hypothalamus und im Hirnstamm (Qadri et al., 2003).

Nach intraventrikulärer Gabe von NO-Donatoren bei SHR fiel die Blutdrucksenkung stärker aus als bei WKY. Auch nach Applikation des NOS-Inhibitors L-NAME bei SHR war die Blutdrucksteigerung geringer als bei WKY (*Cabrera et al., 1996*).

1.3. Zusammenspiel zwischen NO, dem Renin-Angiotensin-System und dem Sympathikus

Von vielen Autoren wurde mehrfach bestätigt, dass NO über das Renin-Angiotensin-System (RAS) den Sympathikotonus beeinflusst. Es besteht ein konkordanter Mechanismus zwischen der Renin-Aktivität und der Expression der nNOS-mRNA in der Niere bei Ratten (*Schricker et al., 1996*). Angiotensinogen an sich hat keine vasokonstriktorische Wirkung und beeinflusst auch nicht direkt die Produktion von NO. Die Applikation von NO-Donatoren führt zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) im Plasma bei Sprague-Dawley Ratten im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismusses (*Ackermann et al., 1998*). Es ist unklar, ob dieser Effekt direkt auf NO zurückzuführen ist oder auf einen seiner Metaboliten. NO^2^- induziert eine Dysfunktion von ACE (*Chen und Catravas, 1993*), auch der Metabolit Peroxynitrit könnte dafür verantwortlich sein (*Ackermann et al., 1998*). Über eine Stimulation der Angiotensin- AT_2 -Rezeptoren kommt es zu einer erhöhten Produktion von NO in den Blutgefäßen bei Kaninchen durch die Aktivierung von lokalen Kininen (*Seyedi et al., 1995*). *Cahill et al. (1995)* konnten umgekehrt zeigen, dass es in vitro nach Applikation von NO zu einer Herunterregulation von AT_1 -Rezeptoren in glatten Gefäßmuskulzellen bei Ratten kam.

Daher wird vermutet, dass die basale NO-Synthese in der Nebenniere über den Einfluss auf das RAS und den Sympathikus hinaus den systemischen Blutdruck modulieren kann.

1.4. SHR als Modell für die Untersuchung der essentiellen Hypertonie

Bei der Erforschung der essentiellen Hypertonie hat sich das Tiermodell der SHR bewährt. Dieses Rattenmodell geht auf *Okamoto und Aoki* zurück, die 1960 ausgehend von normotensiven WKY-Ratten über mehrere Generationen einen Stamm züchteten, dessen Tiere einen systolischen Blutdruck von mehr als 180 mmHg systolisch entwickeln (Stadium der etablier-

ten Hypertonie: *Zicha und Kunes, 1999*). Die Entwicklung der Hypertonie vollzieht sich in drei Phasen. In der „prähypertensiven Phase“, die bis zu 4-5 Wochen postnatal anhält, sind die Tiere normotensiv. In der so genannten „Entwicklungsphase“ ab der 6. Woche entwickelt sich die Hypertonie, die im Alter von 10 bis 11 Wochen Blutdruckwerte von über 180 mmHg systolisch erreicht. Ab diesem Zeitpunkt befindet sich die Ratte in der sog. „Erhaltungsphase“, in der der Blutdruck bis zur 20. Lebenswoche langsam um noch weitere 10 bis 20 mmHg systolisch steigt. Die Hauptursache für die Entwicklung der genetischen Hypertonie ist noch unklar. Es werden verschiedene Ursachen für die Hypertonieentwicklung in Betracht gezogen. Eine der wichtigsten Ursachen ist der erhöhte periphere Gefäßwiderstand, der bereits bei jungen noch normotensiven SHR zu beobachten ist. Dies führt zunächst zu einer neurogenen funktionalen Vasokonstriktion, später zu einem strukturellen Umbau des Gewebes mit einem veränderten Media-Lumen-Verhältnis zu Ungunsten des Lumens (*Yamori und Lovenberg, 1987*).

Dieses Rattenmodell entspricht am ehesten dem essentiellen Hypertonus des Menschen (*Tobian, 1991; Yamori, 1991*). Durch den Bluthochdruck bedingt entwickeln die Tiere typische Komplikationen, die auch bei Menschen auftreten, wie z.B. zerebrale Infarkte, Blutungen, Herzinfarkte oder Nephrosklerose (*Udenfriend, 1976; Ganten, 1987; Zicha und Kunes, 1999*). Der Zeitverlauf der Entwicklung der Hypertonie bei SHR ist dem beim Menschen ähnlich und eine effiziente Therapie kann in beiden Fällen Folgeschäden verringern.

1.5. Hypothesen und Fragestellung

Alle oben genannten Studien deuten auf eine wichtige Rolle von NO in der Regulation der arteriellen Hypertonie hin. So zeigten Untersuchungen von *Qadri et al. (1999)*, dass die Blockade von nNOS mit 7-Nitroindazol im Gehirn bei SHR den mittleren arteriellen Blutdruck noch weiter erhöht, nicht jedoch bei WKY-Ratten. Sie folgerten daraus, dass es durch den erhöhten Blutdruck zu einer kompensatorisch gesteigerten Synthese von NO kommt. Neu-lich konnte nachgewiesen werden, dass im Vergleich zu gleichaltrigen WKY-Ratten die nNOS-Expression sowie die nNOS-Proteinmenge im Hypothalamus von SHR erhöht war (*Häuser et al., 2005*). Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit

der Blutdruck medikamentös gesenkt. Hier sollte untersucht werden, ob eine chronische antihypertensive Behandlung besonders mit Betablockern, RAS-Inhibitoren und einem Vasodilatator die Genexpression von NOS im Gehirn verändert.

Die HHN-Achse ist eines der wichtigsten Systeme, die an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie beteiligt sind. SHR weisen eine erhöhte Aktivität der HHN-Achse auf (*Hashimoto et al., 1989*). Für eine Beteiligung der Hypophysen- und Nebennierenhormone an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie spricht weiterhin, dass eine Hypophysen- oder Adrenalectomie in der prähypertensiven Phase bei SHR einen Anstieg des Blutdrucks verhinderte (*Ardekani et al., 1989; Hashimoto et al., 1989*).

Für den Nachweis der Hypothese wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen bearbeitet:

- 1) Gibt es Unterschiede bei der mRNA-Menge der NOS-Isoformen in der HHN-Achse (Hypothalamus, Hypophyse und den Nebennieren) und im Hirnstamm (dorsale und ventrale Medulla) nach Blutdrucksenkung durch 4-wöchige antihypertensive Behandlung im Vergleich zu einer Kontroll-Behandlung?
- 2) Übt diese 4-wöchige antihypertensive Behandlung auch einen Einfluss auf die NOS-Proteinmenge in den verschiedenen oben genannten Arealen aus?

Zur Blutdrucksenkung wurden fünf sehr häufig verschriebene Pharmaka mit unterschiedlichen Wirkmechanismen eingesetzt. Es wurden die zwei β -Adrenorezeptor-Antagonisten Bisoprolol (β_1 -selektiver Adrenorezeptor-Antagonist), DL-Propranolol (unspezifischer β -Adrenorezeptor-Antagonist), die zwei Hemmstoffe des RAS Enalapril maleat (ACE-Hemmer) und Candesartan cilexetil (AT_1 -Rezeptor-Antagonist) sowie Hydralazin (peripherer Vasodilatator) eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tiere

Als Versuchstiere wurden SHR verwendet, die von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden. Bei den Tieren handelte es sich um männliche Ratten im Alter von 11 bis 12 Wochen, die in Gruppen zu fünf Tieren in Käfigen in einem klimatisierten Raum bei 24 °C gehalten wurden. Es lag ein normaler Tag-Nacht-Rhythmus vor (12/12 Stunden). Standardfutter der Firma Atromin International und Leitungswasser standen frei zur Verfügung. Die Experimente wurden gemäß den Leitlinien für den Umgang und Gebrauch von Laboratorien des Ministeriums für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt und genehmigt (Nummer des internen Tierversuchsantrags 9/A38/01).

2.1.2. Geräte

Gerät	Firma
Blood Pressure Monitor 8002 Dual Channel	TSE
Blotkammer: Hoefer Semi Phor	Amersham Pharmacia Biotech
Chromatographiepapier	Whatman
Elektrophoresekammer	BioRAD
Electrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech
Film: Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech
Filmkassette: Hypercassette	Amersham Life Science
Gelwanne: Sub-Cell GT	BioRAD
Glasplatten für die Western-Blot-Analyse	BioRAD
Glaspottergefäße: Homogenisator Potters, 2 ml	B. Braun Biotech Int.
Halterungen für die Glasplatten	BioRAD
Inkubationsofen: OV2	Biometra

2. Material und Methoden

Küvetten für Photometer	Sarstedt
Membran: Immobilon™ Transfer Membranes	Millipore
Mikrowelle: M817	Cortina
Recomed für die Blutdruckmessung	Hellige
Safe-Twist-Gefäße	Eppendorf
Schüttler: WT 17	Biometra
Stabhomogenisator: Ultra-Turrax T8	IKA-Werke
Thermocycler: T-Gradient	Biometra
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Ultrospec Plus Spectrophotometer	Pharmacia LKB
UV-Kamera: Cell Cam	Phase
UV-Spektrometer: Smart Spect 3000	BioRAD
Vortexer: REAX top	Heidolph
Zentrifuge für die Western-Blot-Analyse: Centrifuge 5402	Eppendorf

2.1.3. Substanzen

Substanz	Firma
1-Butanol	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	Carl Roth GmbH
Agarose für die Elektrophorese	Sigma
Antikörper:	
- Primärantikörper: Goat-Anti-nNOS, Goat-Anti-eNOS, Goat-Anti-iNOS	Transduction Laboratories
- Sekundärantikörper: Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research
Aprotinin (Trasylo®)	Bayer Vital
Ammoniumpersulfat (APS)	Life Technologies
Bisoprolol	Merck
Bromphenolblau	PlusOne

2. Material und Methoden

BSA, Albumin Bovine, Protease-frei	Sigma
Candesartan cilexetil	AstraZeneca
Chloroform	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Pharmacia Biotech
DL-Propranolol	Sigma
DyNAzyme II DNA Polymerase (2 units/μl) 500 μl	Finnzymes
ECL™ (Western Blotting Detection System)	Amersham Pharmacia Biotech
Enalapril maleat	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	BioRAD
Ethylendiamid Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fixierer GBX	Kodak
Folin Ciocalteus Phenolreagenz	Merck
Glycerol	Life Technologies
Glycin	PlusOne
Gummi arabicum pulv.	Caesar & Loretz GmbH
Hydralazin	Sigma
Kits:	
- für die RNA-Isolierung:	Qiagen
RNase-Free DNase Set,	
RNeasy® Mini Kit	
- für die Reverse-Transkriptase-Reaktion:	Promega
Reverse Transcription System	
- für die Restriktionsanalyse:	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen BsmA I, Dpn II, Sac I,	
Restriktionspuffer	
Kodak® developer and replenisher	Sigma
Kodak® fixer and replenisher	Sigma
Kupfersulfat (II)-Pentahydrat (40 mM)	Merck

2. Material und Methoden

Lachgas (für medizinische Zwecke)	Messer
Marker für die Western-Blot-Analyse:	
Precision Plus Protein™ Standards	BioRAD
Methanol	J. T. Baker
Milchpulver: Skim Milk Powder	Fluka BioChemika
Natrium-Carbonat (20 mM)	Sigma
Natrium-Kalium-Tatrat (100 mM)	Merck
Natriumchlorid	Berlin-Chemie
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natronlauge-Plätzchen	Fluka Chemika
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Primer eNOS, Sense und Antisense	GibcoBRL
Primer iNOS, Sense und Antisense	GibcoBRL
Primer nNOS, Sense und Antisense	GibcoBRL
Primer β-Actin, Sense und Antisense	GibcoBRL
Sauerstoff (für medizinische Zwecke)	Messer
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	Pharmacia Biotech
Supersignal® West Femto	Pierce Biotechnology
TAE-Puffer (10x)	Invitrogen life technologies
TEMED	Amersham Pharmacia Biotech
Tris (Trizma Base®)	Sigma
Tris-HCl (pH 7,4)	Sigma
TrisHCl-Puffer (pH 6,8)	BioRAD
TrisHCl-Puffer (pH 8,8)	BioRAD
Triton® X-100	Promega Corporation
Tween® 20	Carl Roth GmbH
Xylen-Cyanol	Merck

2.1.4. Lösungen

für die PCR:

2% Agarosegel:

Agarose 2 g

TAE-Puffer 100 ml

Ethidiumbromid 2 μ l

DEPC-Wasser (500 ml):

Aqua bidest. 500 ml

0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Autoklavieren bei 100 °C für 15 min

Ladepuffer:

Glycerol 600 μ l

DEPC-Wasser 1200 μ l

2,5% Xylencyanol (91 mg Xylen in 200 ml DEPC-Wasser) 200 μ l

für die Western-Blot-Analyse:

10% APS (5 ml):

APS 0,5 g

Auffüllen mit Aqua bidest.

Elektrophorese-Puffer (3 l):

Tris 9,08 g

Glycin 43,2 g

SDS 3 g

Auffüllen mit Aqua dest.

2. Material und Methoden

Homogenisationspuffer (500 ml):

Tris-HCl (pH 7,4) 3,025 g

EDTA 186,1 mg

NaCl 4,383 g

Triton X-100 5 ml

Auffüllen mit Aqua dest.

Vor Gebrauch zugeben: PMSF 50 mM

Aprotinin 28 mg/10 ml

Milchpuffer (50 ml):

Milchpulver 2,5 g

Waschpuffer 50 ml

7,5% Sammelgelpuffer (für zwei Membranen):

H₂O 3,05 ml

TrisHCl-Puffer (pH 6,8) 1,25 ml

SDS (10%) 50 µl

Acrylamid 0,67 ml

APS (10%) 25 µl

Temed 7,5 µl

10% SDS (100 ml):

SDS 10 g

Auffüllen mit Aqua dest.

Towbin-Blot-Puffer (pH 8,2-8,4) (1 l):

Tris 3,03 g

Glycin 14,41 g

SDS 1 g 8,2

Auffüllen mit Aqua dest. auf 800 ml

Zugabe von Methanol 200 ml

2. Material und Methoden

4% SDS-Page (10 ml):

Tris-HCl (pH 6,8) 5ml
SDS 0,8 g
Glycerol 4 ml
DTT 0,62 g
Bromphenolblau 4 mg
Auffüllen mit Aqua dest.

7,5% Trenngelbuffer (für zwei Membranen):

H₂O 4,85 ml
TrisHCl-Puffer (pH 8,8) 2,5 ml
SDS (10%) 100 µl
Acrylamid 2,5 ml
APS (10%) 50 µl
Temed 10 µl

Waschpuffer PBS-Tween (pH 7,5) (5 l):

Na₂HPO₄ 57,5 g
NaH₂PO₄ 14,8 g
NaCl 29,2 g
18 Plätzchen NaOH
Auffüllen mit Aqua dest.
Zugabe von 5 ml Tween 20

für die Proteinbestimmung:

Folin-Reagenz (9 ml):

Folin 3 ml
NaCl 6 ml

Lowry-Mix (100 ml):

Na-Carbonat (20 mM) 98 ml

Na-K-Tatrat (100 mM) 1 ml

Kupfersulfat (40 mM) 1 ml

2.2. Methoden

2.2.1. Behandlung der Versuchstiere

Die SHR wurden in 6 Gruppen zu je 15 Tieren randomisiert. Eine Gruppe wurde mit 10% Gummi arabicum in Wasser (Vehikel-Lösung) (1 ml/kg KG/Tag) behandelt und diente als Kontrollgruppe. Die verbleibenden Gruppen wurden über 4 Wochen jeweils mit Bisoprolol (10 mg/kg KG/Tag), DL-Propranolol (50 mg/kg KG/Tag), Enalapril maleat (10 mg/kg KG/Tag), Candesartan cilexetil (3 mg/kg KG/Tag) und Hydralazin (3 mg/kg KG/Tag) in Vehikel gelöst per os behandelt. Die Behandlung jeweils zur gleichen Uhrzeit morgens.

2.2.2. Blutdruckmessung

Eine Woche vor Beginn der Behandlung und in der letzten Behandlungswoche erfolgte eine plethysmographische Blutdruckmessung (*Raasch et al., 2002*). Dazu wurden die Tiere mit einer Mischung aus N₂O und O₂ (80/20 vol%) sediert. Der Schwanz wurde mit Infrarotlicht (100 W) bestrahlt, so dass es zu einer Dilatation der Schwanzarterie kam. Ein Piezo-Element auf dem Schwanz registrierte, ob ein Pulssignal auf einem angeschlossenen Rekorder nachweisbar war. Als dieses nachweisbar war, konnte die Manschette auf der Schwanzarterie mit einem Druck von 310 mmHg aufgepumpt werden und der systolische Blutdruck (SBP) und die Herzfrequenz (HF) wurden bestimmt.

2.2.3. Gewebeentnahme

Die Versuchstiere wurden zur Gewebeentnahme dekapitiert. Nach dem Entbluten wurden das Gehirn, die Hypophyse und die Nebennieren entnommen.

Durch das Gehirn wurden zwei koronare Schnitte geführt, einer auf der Ebene des Chiasma opticums, der andere hinter dem Infundibulum. Der Hypothalamus wurde als Block entnommen und enthielt die wichtigen kreislaufregulierenden Kerngebiete wie z.B. PVN, SON, Nucleus suprachiasmaticus, Nucleus periventricularis, Nucleus anterior, Nucleus arcuatus und einen Teil des lateralen und posterioren Hypothalamus (Abbildung 2, linke schraffierte Fläche). Der Hirnstamm wurde unter dem posterioren Cerebellum präpariert und en bloc entnommen. Durch einen Schnitt wurde dieser in die ventrale und die dorsale Medulla geteilt. Der dorsale Teil enthielt die Area postrema, den NTS und das Kerngebiet des Nervus vagus. Der ventrale Teil enthielt CVLM und RVLM sowie den Nucleus ambiguus (Abbildung 2, rechte schraffierte Fläche). Die Hypophyse wurde aus der Sella turcica präpariert. Die entnommenen Gewebe wurden in -30 °C kalten Isopentan schockgefroren und bei -80 °C zur weiteren Verwendung gelagert. Eine schematische Darstellung in Abb. 2 zeigt die Lage der entnommenen Gewebe.

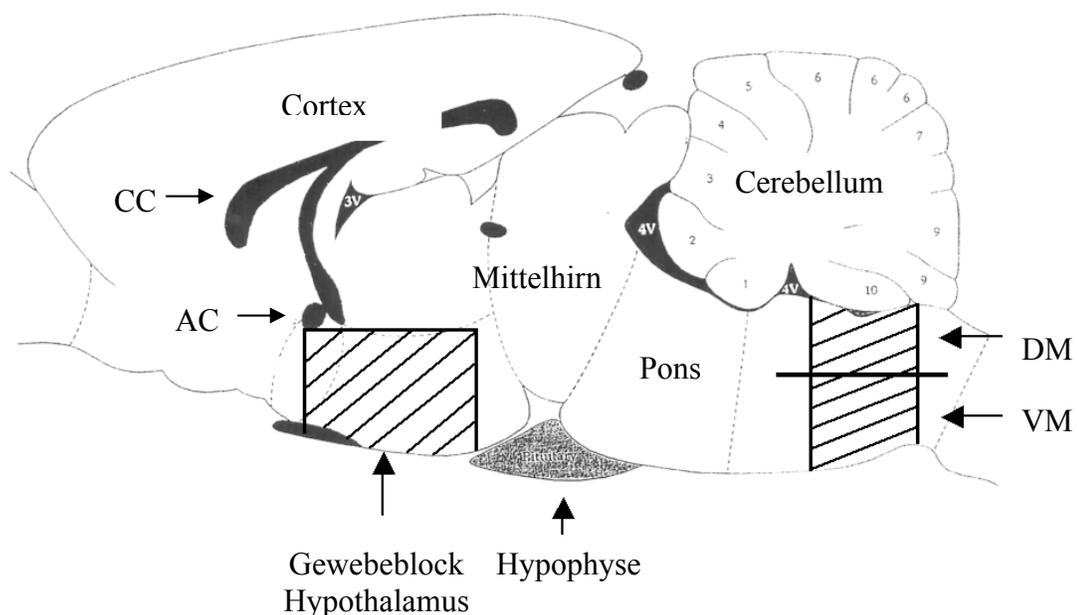


Abbildung 2: Sagittalschnitt durch ein Rattengehirn (Qadri et al., 2003). Die schraffierten Regionen zeigen die Orte der Gewebeentnahme. Abk.: DM = Dorsale Medulla, VM = Ventrale Medulla, CC = Corpus callosum, AC = vordere Kommissur, 3V = 3. Ventrikel, 4V = 4. Ventrikel, 1-10 = Windungen des Cerebellum.

2.2.4. RT-PCR-Analyse

2.2.4.1. Isolierung und Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) nach dem im folgenden beschriebenen Protokoll. Die entnommenen Gewebe (ca. 30 mg) wurden in toto ca. 1 Minute in 700 µl RLT-Puffer, der Guanidin-Isothiocyanat enthielt, homogenisiert. Danach erfolgte eine Chloroform-Extraktion. Dazu wurden 700 µl des Homogenats mit 700 µl Chloroform vermischt und zentrifugiert. Die Chloroform-Extraktion entfiel bei der Hypophyse und bei der Nebenniere. Anschließend wurden 550-650 µl des entstandenen Überstandes mit gleichem Volumen Ethanol versetzt, vermischt und komplett auf die „Spin Column“ RNA-Isolationssäule (Kieselgelsäule) aufgetragen, wonach eine erneute Zentrifugation erfolgte. Im nächsten Schritt wurde 350 µl RW1-Puffer auf die „Spin Column“ gegeben und erneut zentrifugiert. Aus dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) wurde nach Anleitung der DNase-I-Inkubationsmix hergestellt und 80 µl zugegeben, anschließend erfolgte ein 30-minütiger DNA-Verdau im Umluftofen bei 25 °C. Nach Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und anschließender Zentrifugation wurde zweimalig 500 µl RPE-Puffer zugegeben mit abermaliger Zentrifugation. Dabei wurde die „Spin Column“ auf ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt. Nach dem Zusetzen von 50 µl RNase-freiem Wasser und 10-minütiger Einwirkdauer erfolgte eine erneute Zentrifugation.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde mit dem UV-Spektrometer vorgenommen. Dabei wurde zuerst der Leerwert bestimmt, danach wurde bei 260 nm und bei 280 nm die Absorption der Probe gemessen, um die Reinheit der RNA zu bestimmen. Ein Maß für die Reinheit der isolierten RNA gibt der Quotient der Absorption A_{260}/A_{280} an, der zwischen 1,7 und 2,1 liegen sollte (Herstellerempfehlungen). Alle verwendeten Isolationsprodukte entsprachen diesen Anforderungen.

2.2.4.2. Reverse-Transkriptase-Reaktion

Mit der reversen Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) wird die gewonnene RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Die folgenden RT-Reaktionskomponenten wurden für einen Ansatz von 20 µl verwendet:

4 µl $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl RT-Puffer (10x), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 0,5 µl Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 units/µl), 0,75 µl AMV Reverse Transcriptase (20 units/µl),

2. Material und Methoden

1 μl Oligo(dT)-Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 1 μg der gewonnenen RNA. Mit Nuklease-freiem Wasser wurde auf 20 μl ergänzt.

Die Inkubation des Gemisches erfolgte bei 70 °C für 10 Minuten, anschließend wurde die Probe auf 2 °C abgekühlt. Nach Zufügen der übrigen Reaktionskomponenten in den angegebenen Mengen erfolgte im Thermocycler die RT-Reaktion für 15 Minuten bei 42 °C, danach für 5 Minuten bei 99 °C und anschließend für 5 Minuten bei 2 °C.

2.2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die aus der RT-Reaktion resultierende cDNA qualitativ und semiquantitativ auf das Vorhandensein von nNOS-, eNOS-, iNOS- und β -Actin-mRNA untersucht und selektiv vervielfältigt.

Der folgende PCR-Reaktionsansatz für 30 μl wurde mit den Komponenten aus dem RT Promega Kit hergestellt: 0,3 μl dNTP Mix, 1,2 μl MgCl_2 , 2,7 μl RT-Puffer, jeweils 1,5 μl des Sense- und des Antisense-Primers, 0,38 μl DNazyme DNA-Polymerase und 3 μl der zu untersuchenden cDNA. Mit Nuklease-freiem Wasser wurde auf 30 μl ergänzt. Für die PCR von β -Actin wurde zuvor die cDNA mit DEPC-Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt, da β -Actin im Gewebe sehr stark exprimiert ist. Danach erfolgte die Inkubation im Thermocycler für 1 Minute bei 95 °C, anschließend für 1 Minute bei der „Annealing Temperatur“ des verwendeten Primers. Hierauf erfolgte die Inkubation für 30 Sekunden bei 72 °C. Diese Schleife wurde in Abhängigkeit vom verwendeten Gewebe unterschiedlich oft wiederholt (Tabelle 2). Anschließend erfolgte nach 10 Minuten Erhitzen bei 72 °C die Abkühlung auf 2 °C.

12,5 μl des PCR-Produkts wurden mit 2,5 μl Ladepuffer vermischt und auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Danach erfolgte ein 30-minütiger Gellauf bei 120 V und 400 mA. Das Gel wurde auf dem UV-Schirm aufgenommen und mit den Programmen CellCam Video Control 1.4 bearbeitet. Mit dem Programm ScionImage Beta 4.02 (NIH, USA) wurde die Fluoreszenz der registrierten Banden gemessen und ausgewertet. Um quantifizierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die erhaltenen Werte ins Verhältnis zu den entsprechenden Werten von β -Actin gesetzt.

Die verwendeten Sense- und Antisense-Primer-Sequenzen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die optimierten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

2. Material und Methoden

<i>nNOS</i>	Primer Sense	5'-TAGACTCACCCCGTCCTTTG-3'
	Primer Antisense	5'-CCAGGTGCACGATGTCATAC-3'
	PCR Produktgröße	296 bp
	Genbank Acc. No.	U67309
<i>eNOS</i>	Primer Sense	5'-TGGCAGCCCTAAGACCTATG-3'
	Primer Antisense	5'-CGCTCCTGCAAAGAAAAACT-3'
	PCR Produktgröße	306 bp
	Genbank Acc. No.	AJ011116
<i>iNOS</i>	Primer Sense	5'-CAGAGGACCCAGAGACAAGC-3'
	Primer Antisense	5'-TGCTGGAACATTTCTGATGC-3'
	PCR Produktgröße	300 bp
	Genbank Acc. No.	D14051
<i>β-Actin</i>	Primer Sense	5'-GTGGGTATGGGTCAGAAGGA-3'
	Primer Antisense	5'-AGCGCGTAACCCTCATAGAT-3'
	PCR Produktgröße	308 bp
	Genbank Acc. No.	NM-031144

Tabelle 1: Darstellung der Sequenzen der verwendeten Sense- und Antisense-Primer, die Größe des PCR-Produktes sowie die Nummer in der Genbank. Abk.: bp = Basenpaare, Acc. No. = accession number.

2. Material und Methoden

		<i>nNOS</i>	<i>eNOS</i>	<i>iNOS</i>	<i>β-Actin</i>
Hypothalamus	Zyklusanzahl	32	28	30	28
	MgCl ₂ -Konzentration (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing Temperatur (°C)	60	58	56	56
Hypophyse	Zyklusanzahl	29	27	30	28
	MgCl ₂ -Konzentration (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing Temperatur (°C)	60	58	56	56
Nebenniere	Zyklusanzahl	27	27	27	28
	MgCl ₂ -Konzentration (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing Temperatur (°C)	60	58	56	56
Ventrale Medulla	Zyklusanzahl	31	28	33	28
	MgCl ₂ -Konzentration (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing Temperatur (°C)	60	58	56	56
Dorsale Medulla	Zyklusanzahl	31	28	33	28
	MgCl ₂ -Konzentration (mM)	1,5	1,5	1,0	1,5
	Annealing Temperatur (°C)	60	58	56	56

Tabelle 2: Optimierte Zyklusanzahl, MgCl₂-Konzentration und „Annealing Temperatur“ der verwendeten Primer in Abhängigkeit von den untersuchten Geweben.

2.2.4.4. Restriktionsanalyse

Um die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden die drei Restriktionsendonukleasen BsmA I, Dpn II und Sac I verwendet, die die PCR-Produkte der NOS-Isoformen innerhalb der Erkennungssequenz in zwei Fragmente schneiden (*Cerritelli et al., 1989; Kong et al., 1990*). BsmA I verdaut das PCR-Produkt von nNOS in zwei Fragmente von 195 und 101 bp, Dpn II verdaut das PCR-Produkt von eNOS in zwei Fragmente von 208 und 98 bp und Sac I verdaut das PCR-Produkt von iNOS in zwei Fragmente von 180 und 120 bp.

Zu 16 µl des jeweiligen PCR-Produkts wurden bei nNOS 2 µl BsmA und 2 µl von Puffer 3 zugefügt, bei eNOS 1 µl Dpn II und 3 µl Puffer 3, bei iNOS wurden 0,5 µl Sac I und

2. Material und Methoden

3,5 µl von Puffer 3 zugefügt. Anschließend wurde das Gemisch für nNOS bei 55 °C, für eNOS bei 37 °C und für iNOS bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend auf ein 2,5%-iges Agarosegel aufgetragen. Nach einem 30-minütigen Gellauf bei 120 V und 400 mA wurde das Gel auf dem UV-Schirm aufgenommen. Eine repräsentative Restriktionsanalyse ist in Abbildung 3 dargestellt.

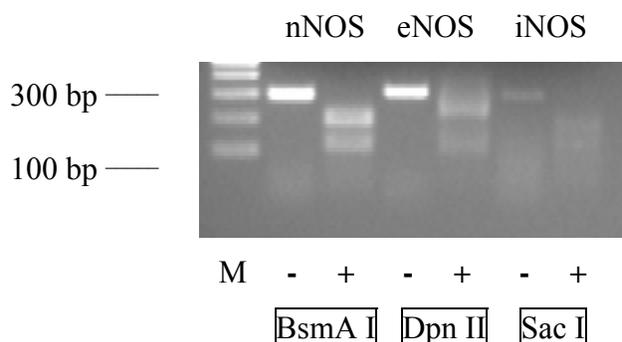


Abbildung 3: Restriktionsanalyse von PCR-Produkten des Hypothalamus nach dem Verdau mit BsmA I, Dpn II und Sac I (+) und ohne Zugabe des Restriktionsenzym (-) nach elektrophoretischer Trennung. Abk.: M = Marker, bp = Basenpaare.

2.2.5. Western-Blot-Analyse

2.2.5.1. Vorbereitung der Proben

Die Gewebe wurden gewogen, das Fünffache des Gewichts an Homogenisationspuffer zugegeben, im Glaspottergefäß für etwa eine Minute manuell homogenisiert und in ein Safe-Twist-Gefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 8000 U und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Safe-Twist-Gefäß überführt und wie folgt proportioniert: 50 µl waren für die Gesamtproteinbestimmung vorgesehen, 200 µl für die Western-Blot-Analyse.

Dem Gewebehomogenat für die Western-Blot-Analyse wurde 37,6 µl SDS-Page (4%) und 2,4 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und vermischt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 98 °C inkubiert und danach auf Eis gekühlt. Hiernach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14000 U und 4 °C. Nach erfolgter Fettentfernung wurde die erhaltene Probe für die Gelelektrophorese verwendet. Die hier zu untersuchenden Proben mit bekannter Proteinkonzentration wurden mit SDS-Page-Lösung auf 3 µg/µl Protein verdünnt und in Aliquots zu 15 µl aufgeteilt und bis zur Analyse auf -20 °C gefroren.

2.2.5.2. Gesamtproteinbestimmung nach Lowry

Bei der Proteinbestimmung nach Lowry (*Lowry et al., 1951*) bildet das Protein mit einem alkalischen kupferhaltigen Reagenz eine Verbindung. Danach erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz durch das komplexierte Protein. Dabei erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau. Die Extinktion des entstandenen blauen Farbstoffs kann photometrisch bestimmt werden.

Zuerst wurde eine Rinderalbumin-Verdünnungsreihe hergestellt. Dabei wurden jeweils 0, 20, 60, 100, 140, 180, 200, 250 und 300 µl Rinderalbumin-Stammlösung (1 mg/ml) mit NaCl (0,9%) auf 1000 µl ergänzt. Von dieser Verdünnung wurden zweimal jeweils 200 µl in weitere Cups pipettiert, so dass zwei Standard-Verdünnungsreihen entstanden. Die Homogenate wurden im Verhältnis 1:150 mit NaCl (0,9%) verdünnt. Anschließend wurde in ein Cup jeweils 800 µl Lowry-Mix vorgelegt und 200 µl der Standard-Verdünnungsreihe bzw. der verdünnten Probe zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Folin-Reagenz folgte eine Inkubationsdauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Mit dem Photometer wurde beim Leerwert und bei den Proben die Extinktion bei 750 nm gemessen. Durch die zwei Standard-Verdünnungsreihen wurde eine Eichkurve errechnet, anhand derer mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes der Gesamtproteingehalt der zu untersuchenden Probe bestimmt wurde.

2.2.5.3. Western-Blot-Technik

Bei der Western-Blot-Methode erfolgt die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches nach seinem Molekulargewicht, so dass bestimmte Proteine mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers identifiziert werden können. Die Komplexe aus Antikörper und Antigen können mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht und quantitativ ausgewertet werden.

Es wurden 7,5%-ige Polyacrylamidgele verwendet, die aus einem unteren Trenngel und einem darauf liegenden Sammelgel bestanden. Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit 150 µl Butanol versetzt. Nach 30-minütiger Aushärtung konnte darüber das Sammelgel gegossen werden, das ebenfalls nach 30 Minuten ausgehärtet war. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Proben sowie eine Positivkontrolle (5 µl Positivkontrolle mit 5 µl SDS (1x)) auf das Gel aufgetragen. Danach erfolgte für 30 Minuten die Elektrophorese bei 200 V, 100 mA und 30 W in einer mit Elektrophorese-Puffer gefüllten Kammer.

2. Material und Methoden

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte im „Semi-Dry-Verfahren“. In die Blotkammer wurde auf vier Lagen Chromatographiepapier, das 5 Minuten im Towbin-Blot-Puffer getränkt worden war, die Nitrozellulosemembran gelegt, die 30 Sekunden in 70% Methanol und 5 Minuten im Towbin-Blot-Puffer getränkt worden war. Darauf wurden erneut vier Lagen im Puffer getränktes Chromatographiepapier gelegt. Anschließend erfolgte der 3-stündige Transfer bei 50 V, 50 mA und 5 W.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden die unspezifischen Antikörper-Bindungen mit einer 5%-igen Milchpufferlösung für 90 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Der Primärantikörper gegen nNOS, eNOS und iNOS (Transduction Laboratories) wurde in einer Konzentration von 1:3000 im Blockpuffer auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach vier Waschschritten von jeweils 10 Minuten Dauer mit dem PBS-Tween-Waschpuffer der Horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper (Jackson Immuno Research) in der vorliegenden Arbeit in einer Konzentration von 1:5000 im Blockpuffer aufgetragen und die Membran für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten erneut vier jeweils 10-minütige Waschschrritte mit dem Waschpuffer. Die Detektion der Peroxidase-markierten Proteinbanden erfolgte nun mit dem „Enhanced Chemiluminescence“-Kit (ECL), das das Substrat H₂O₂ für die HRP enthält. 2 ml Detektionslösung wurde pro Membran aufgetragen und wirkte für zwei Minuten ein. Hierauf erfolgte die Detektion des Signals auf einem Fotofilm. Nach Entwicklung und Fixierung des Films erfolgte die Auswertung der Proteinbanden mit Hilfe des Programms ScionImage Beta 4.02 (NIH, USA). Tabelle 3 zeigt das Protokoll der Western-Blot-Analyse zusammengefasst.

Western-Blot-Analyse

1. **Vorbereitung der Proben**
Verdünnen der Proben mit SDS-Page-Lösung auf 3 µg/µl
Aufteilen in Aliquots zu 15 µl
2. **Herstellen der 7,5%-igen Polyacrylamidgele**
Gießen des Trenngels, mit 150 µl Butanol versetzt, 30 Minuten aushärten lassen
Gießen des Sammelgels, 30 Minuten aushärten lassen
3. **Auftragen der Proben auf das Gel**
Auftragen von jeweils 10 µl der Proben und einer Positivkontrolle auf das Gel
4. **Gelektrophorese**
Elektrophorese bei 200 V, 100 mA, 30 W für 30 Minuten
5. **Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran**
Transfer in der Blotkammer bei 50 V, 50 mA, 5 W für 3 Stunden
6. **Blockade von unspezifischen Antikörperbindungen**
Inkubation der Membran mit 5%-igem Milchpuffer für 90 Minuten
7. **Inkubation des Primärantikörpers**
Auftragen des Primärantikörpers in einer Konzentration von 1:3000
Inkubation über Nacht bei 4 °C
8. **Waschen der Membran**
4 Waschschritte à 10 Minuten mit PBS-Tween-Waschpuffer
9. **Inkubation des Sekundärantikörpers**
Auftragen des Sekundärantikörpers in einer Konzentration von 1:5000
Inkubation bei Raumtemperatur für 90 Minuten
10. **Waschen der Membran**
4 Waschschritte à 10 Minuten mit PBS-Tween-Waschpuffer
11. **Detektion der Proteinbanden**
Auftragen von 2 ml ECL-Detektionslösung auf die Membran
Inkubation für 2 Minuten
Detektion des Signals auf einem Fotofilm
12. **Semiquantitative Auswertung**
Auswertung mit Hilfe des Programms ScionImage Beta 4.02

Tabelle 3: Kurzgefasstes Protokoll der Western-Blot-Analyse.

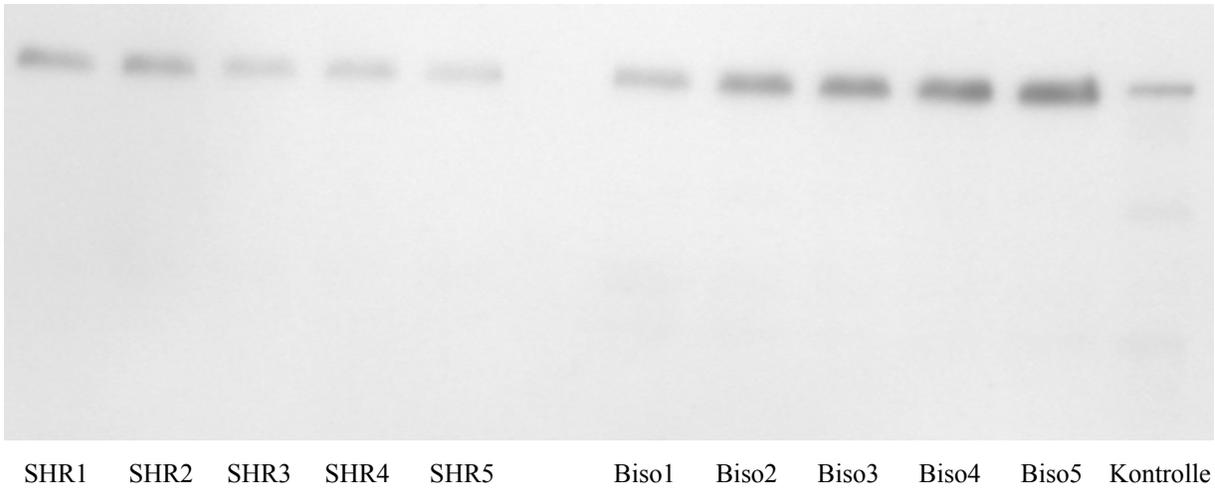


Abbildung 4: Repräsentative Aufnahme einer Western-Blot-Analyse (Hypothalamus). Die Proteinmengen von 5 Proben der SHR sowie 5 Proben der mit Bisoprolol behandelten SHR werden mit Hilfe des Antikörpers gegen nNOS untersucht. Die nNOS-Positivkontrolle ist rechts aufgetragen. Abk.: Biso = Bisoprolol.

2.2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Prism (Graph Pad Software Inc.) durchgeführt. Die Daten sind in der vorliegenden Arbeit als Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die ermittelten Werte in den Behandlungsgruppen wurden ins Verhältnis zum Mittelwert der Kontroll-SHR gesetzt und nach der Ein-Weg-ANOVA evaluiert, gefolgt von einem Tukey-Posttest. Die Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit einem $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss der chronischen antihypertensiven Therapie auf

3.1.1. Körpergewicht

Die randomisierten Gruppen der SHR zeigten vor und nach der Behandlung keine signifikanten Unterschiede bei ihrem Körpergewicht im Vergleich untereinander. Das Körpergewicht der Tiere hat sich wachstumsbedingt in allen Gruppen gleichmäßig erhöht (Tabelle 4).

3.1.2. Systolischen Blutdruck

Vor der Behandlung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim systolischen Blutdruck (SBP) im Vergleich der Gruppen untereinander. Im Verlauf der vierwöchigen Therapie wurde der SBP bei den behandelten SHR durch die verwendeten Pharmaka signifikant um 17-34 mmHg systolisch gesenkt. Bei der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich vor und nach der Behandlung (Tabelle 4).

3.1.3. Herzfrequenz

Vor der Behandlung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Herzfrequenz (HF) im Vergleich der Gruppen untereinander. Nach der Behandlung kam es bei den mit Beta-blockern (Bisoprolol und Propranolol) behandelten SHR wie erwartet zu einem signifikanten Abfall der Herzfrequenz. Bei den Hemmstoffen des RAS (Enalapril und Candesartan) ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Bei Hydralazin kam es zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz. Bei der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Herzfrequenz vor und nach der Behandlung (Tabelle 4).

3. Ergebnisse

Gruppe	Körpergewicht [g]		SBP [mmHg]		HF [bpm]		n
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	
Vehikel	255 ± 3	280 ± 4 *	184 ± 3	192 ± 2	330 ± 3	344 ± 6	15
Bisoprolol	254 ± 2	283 ± 2 *	182 ± 2	164 ± 2 *	336 ± 5	296 ± 4 *	15
Propranolol	252 ± 3	286 ± 7 *	188 ± 2	171 ± 2 *	350 ± 7	304 ± 5 *	15
Enalapril	255 ± 4	276 ± 4 *	180 ± 3	152 ± 2 *	334 ± 4	345 ± 7	15
Candesartan	251 ± 4	277 ± 4 *	182 ± 3	148 ± 1 *	326 ± 5	339 ± 7	15
Hydralazin	255 ± 3	276 ± 4 *	178 ± 3	148 ± 2 *	331 ± 5	372 ± 8 *	15

Tabelle 4: Körpergewicht [g], SBP [mmHg] und HF [bpm] der SHR vor (a) und nach (b) der 4-wöchigen Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg). SBP = systolischer arterieller Blutdruck, HF = Herzfrequenz. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM. * p < 0,05 (b) vs. (a).

3.2. nNOS-mRNA- und Proteinmenge nach antihypertensiver Behandlung

3.2.1. Hypothalamus

Bei den mit Betablockern (Bisoprolol und Propranolol) behandelten SHR zeigte sich eine um 56% bzw. 52% signifikant höhere mRNA-Menge als bei der Kontrolle (p < 0,01). Bei der Proteinmenge zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Behandlung mit Enalapril und Candesartan hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Ebene. Allerdings war nach Candesartan-Behandlung die Proteinmenge um 107% signifikant höher als bei der Kontrolle (p < 0,05), nach Enalapril-Behandlung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Auch bei der Hydralazin-Behandlung blieb die mRNA-Menge unverändert, aber die Proteinmenge von nNOS stieg um 170% im Vergleich zur Kontrollgruppe (p < 0,01) [Abb. 5A und 5B].

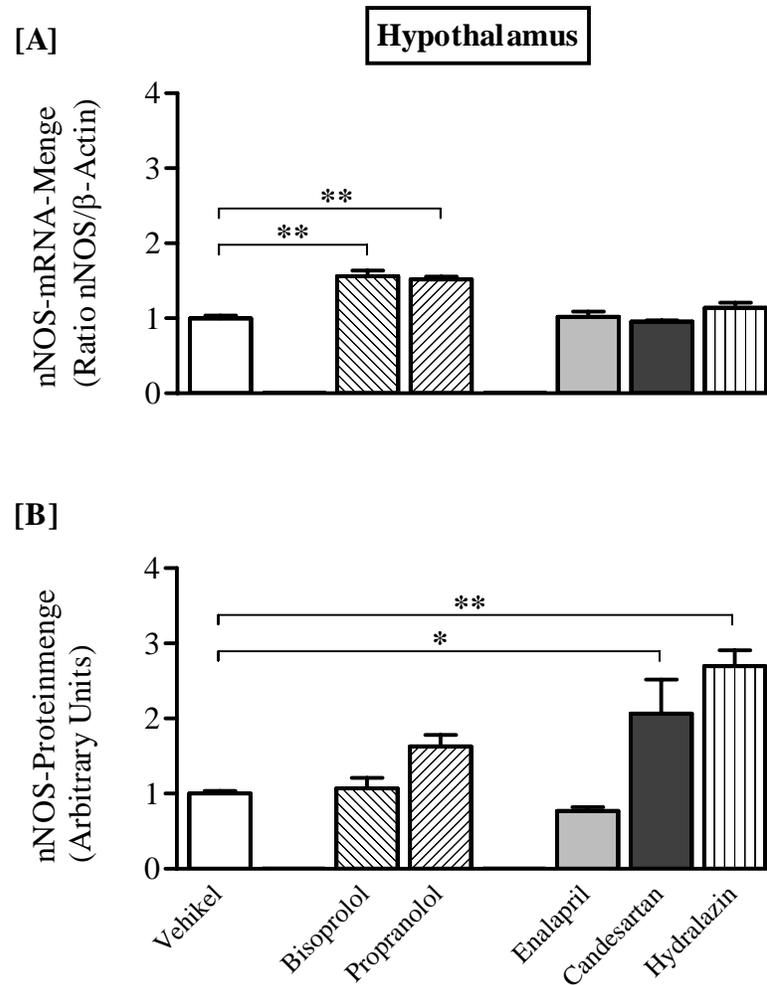


Abbildung 5: nNOS-mRNA- [A] und nNOS-Proteinmenge [B] im Hypothalamus bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. n = 10 [A] bzw. 4 [B] pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * p < 0,05 und ** p < 0,01 vs. Vehikel.

3.2.2. Hypophyse

Bei den mit Betablockern behandelten SHR zeigten sich im Vergleich zu den Vehikel-behandelten SHR keine Unterschiede auf mRNA- und auf Proteinebene. Die Enalapril- und Candesartan-Behandlung hatte auf die mRNA-Ebene auch keinen Einfluss. Nur nach Candesartan-Behandlung war die Proteinmenge von nNOS um 50% signifikant erhöht ($p < 0,01$), während sich nach Enalapril-Behandlung keine Unterschiede nachweisen ließen. Nach Hydralazin-Behandlung zeigten sich auch keine Unterschiede auf mRNA- und auf Proteinebene im Vergleich zu den Vehikel-behandelten SHR [Abb. 6A und 6B].

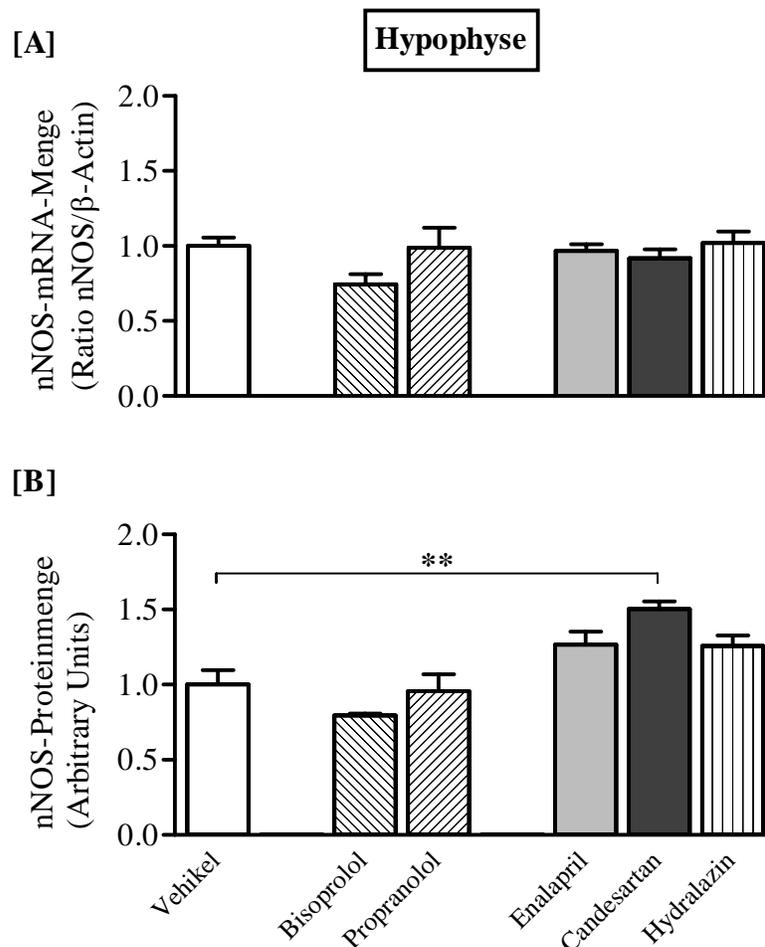


Abbildung 6: nNOS-mRNA- [A] und nNOS-Proteinmenge [B] in der Hypophyse bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. $n = 10$ [A] bzw. 4 [B] pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. ** $p < 0,01$ vs. Vehikel.

3.2.3. Nebenniere

Bei den mit Betablockern behandelten SHR zeigten sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf mRNA-Ebene. Nur nach Bisoprolol-Behandlung zeigte sich eine um 88% signifikant höhere Proteinmenge ($p < 0,05$) als bei der Kontrolle, während sich nach Propranolol-Behandlung keine Unterschiede zeigten. Die Behandlung mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin hatte auf die nNOS-mRNA- und Proteinebene keinen Einfluss [Abb. 7A und 7B].

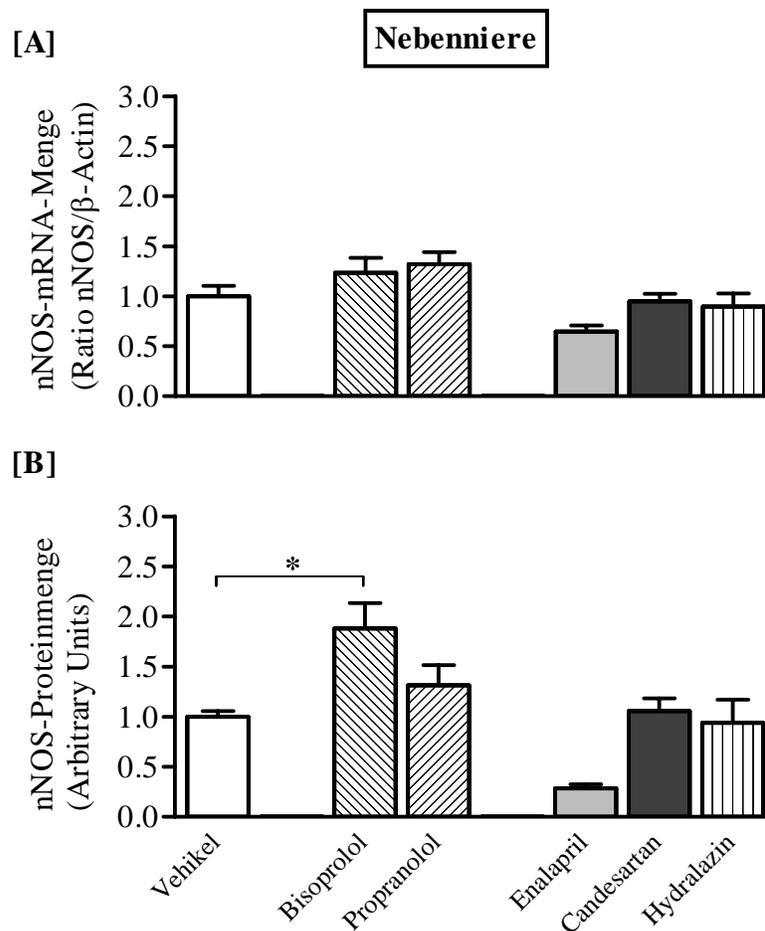


Abbildung 7: nNOS-mRNA- [A] und nNOS-Proteinmenge [B] in der Nebenniere bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. $n = 10$ [A] bzw. 4 [B] pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Vehikel.

3.2.4. Dorsale Medulla

Die Behandlung mit den Betablockern sowie mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin hatte keinen Einfluss auf die nNOS-mRNA- und Proteinebene [Abb. 8A und 8B].

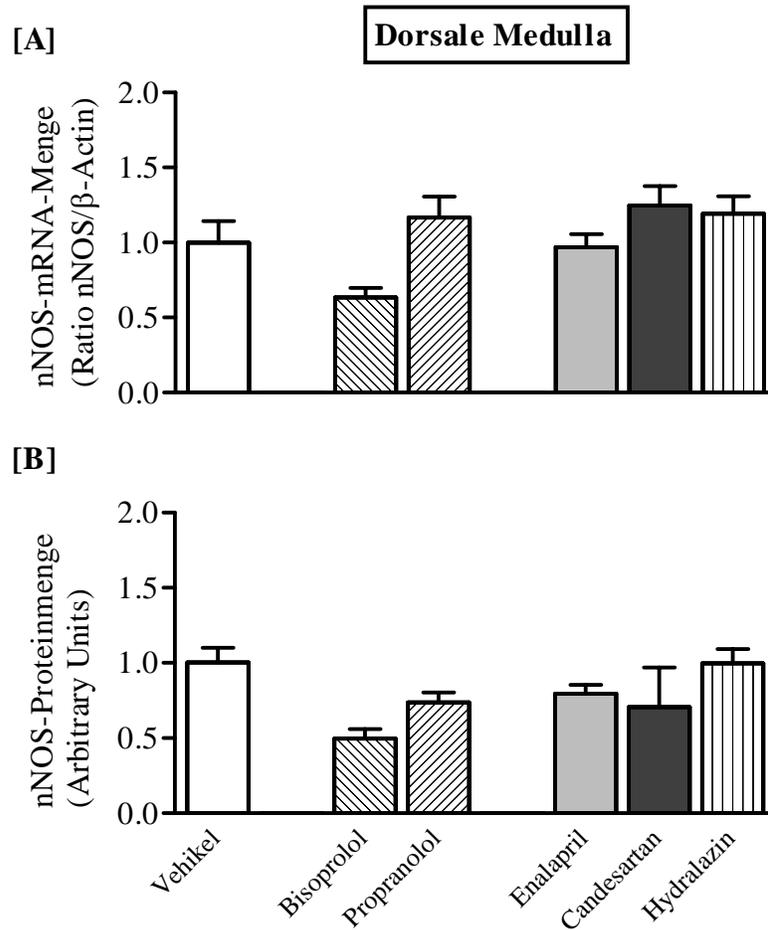


Abbildung 8: nNOS-mRNA- [A] und nNOS-Proteinmenge [B] in der dorsalen Medulla bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. n = 10 [A] bzw. 4 [B] pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

3.2.5. Ventrale Medulla

Die Behandlung mit den Betablockern sowie mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin hatte keinen Einfluss auf die nNOS-mRNA- und Proteinebene [Abb. 9A und 9B].

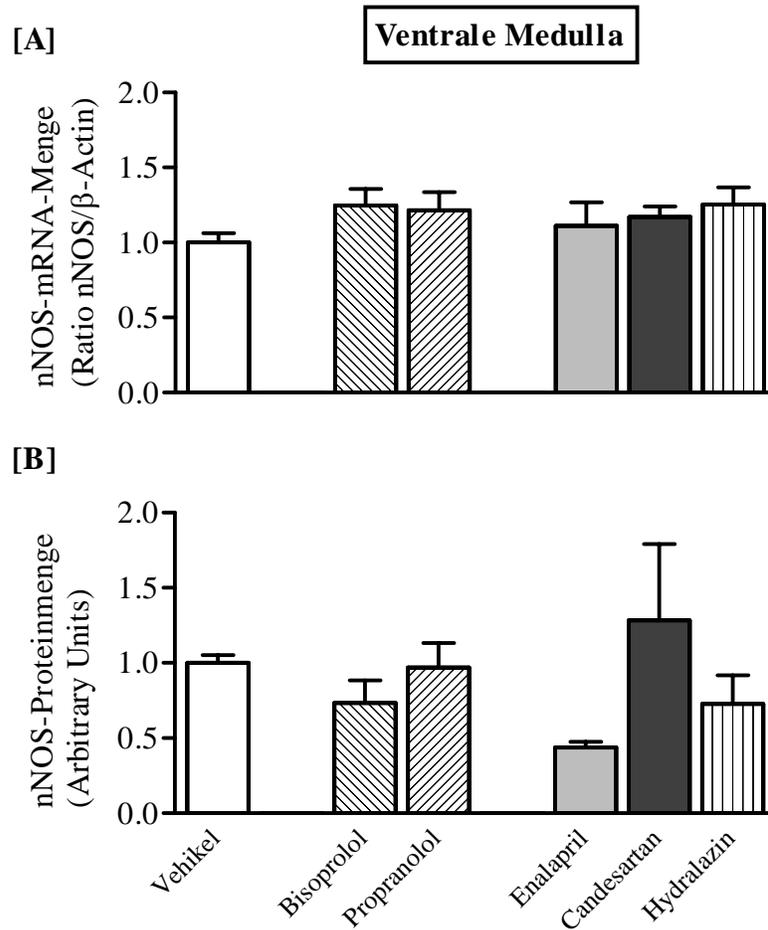


Abbildung 9: nNOS-mRNA- [A] und nNOS-Proteinmenge [B] in der ventralen Medulla bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. n = 10 [A] bzw. 4 [B] pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

3.3. eNOS-mRNA- und Proteinmenge nach antihypertensiver Behandlung

3.3.1. HHN-Achse

Hypothalamus

Bei den mit Betablockern behandelten SHR zeigten sich im Vergleich mit der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede auf mRNA-Ebene. Nach Enalapril-Behandlung war die eNOS-mRNA-Menge um 19% signifikant niedriger ($p < 0,05$) als bei der Kontrollgruppe, während sich nach Candesartan- und Hydralazin-Behandlung keine signifikanten Unterschiede nachweisen ließen [Abb. 10A].

Hypophyse

Nach antihypertensiver Behandlung zeigten sich in keiner Behandlungsgruppe signifikante Unterschiede im Vergleich mit den Kontroll-SHR [Abb. 10B].

Nebenniere

Bei den mit Betablockern behandelten SHR war die mRNA-Menge nach Propranolol-Behandlung um 61% höher als bei den Kontroll-SHR ($p < 0,001$), während sich nach Bisoprolol-Behandlung keine Unterschiede zeigten. Nach Behandlung mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin ließen sich keine signifikanten statistischen Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollgruppe nachweisen [Abb. 10C].

Die eNOS-Proteinmenge war in den untersuchten Geweben nicht nachweisbar.

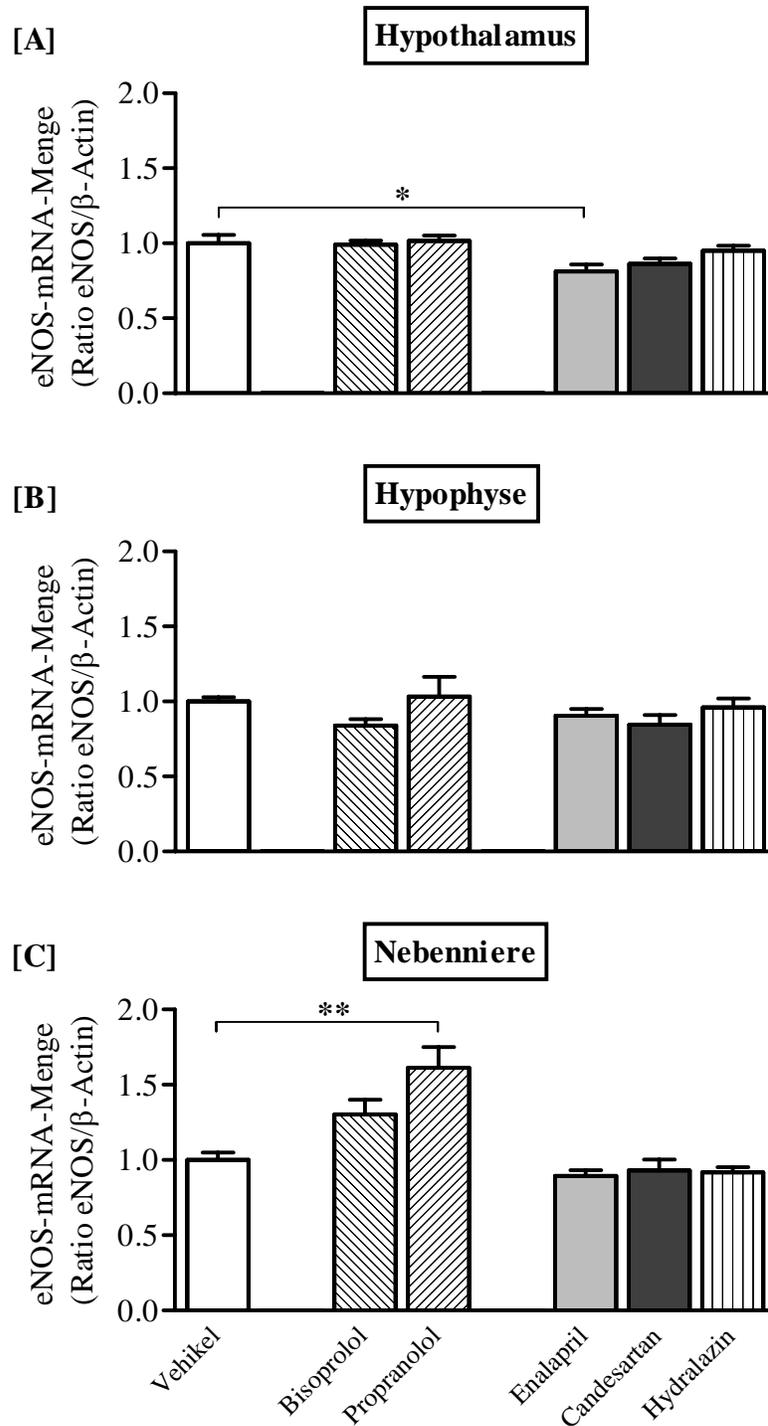


Abbildung 10: eNOS-mRNA-Menge in Hypothalamus [A], Hypophyse [B] und Nebenniere [C] bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. n = 10 pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * p < 0,05 und ** p < 0,01 vs. Vehikel.

3.3.2. Hirnstamm-Regionen

Dorsale Medulla

Nach Bisoprolol-Behandlung war die eNOS-mRNA-Menge 96% höher als bei der Kontrolle ($p < 0,01$), während die Propranolol-Behandlung keinen Einfluss auf die mRNA-Ebene hatte. Nach Behandlung mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin ließen sich keine signifikanten statistischen Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollgruppe nachweisen [Abb. 11A].

Ventrale Medulla

Bei den mit Betablockern behandelten SHR zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der Kontrolle. Nach Enalapril-Behandlung zeigte sich eine um 35% erhöhte mRNA-Menge gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$), während die Candesartan- und Hydralazin-Behandlung keinen Einfluss auf die mRNA-Ebene hatte [Abb. 11B].

Die eNOS-Proteinmenge war in den untersuchten Geweben nicht nachweisbar.

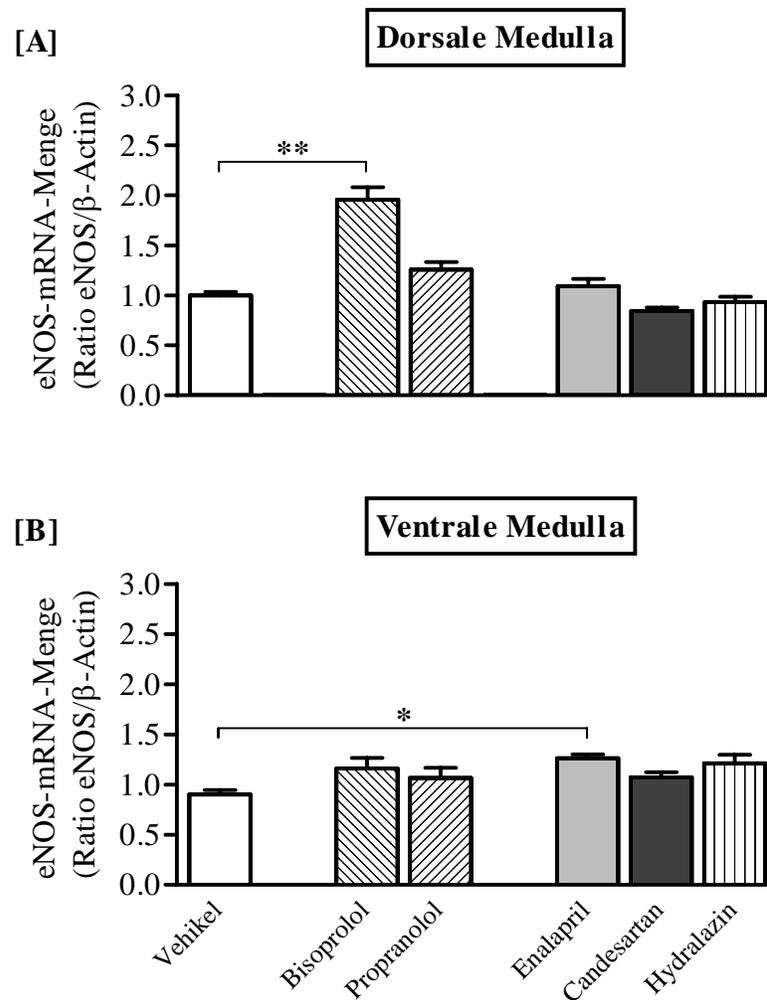


Abbildung 11: eNOS-mRNA-Menge in der dorsalen [A] und der ventralen Medulla [B] bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. $n = 10$ pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. Vehikel.

3.4. iNOS-mRNA- und Proteinmenge nach antihypertensiver Behandlung

3.4.1. HHN-Achse

Hypothalamus

Bei den mit Betablockern behandelten SHR war die iNOS-mRNA-Menge nicht nachweisbar. Enalapril- und Candesartan-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Ebene, während die Behandlung mit Hydralazin die mRNA-Menge gegenüber den Vehikel-behandelten SHR um 160% erhöhte ($p < 0,05$) [Abb. 12A].

Hypophyse

Bisoprolol-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Menge, während Propranolol-Behandlung die mRNA-Menge um 135% erhöhte ($p < 0,05$). Nach Behandlung mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin war die mRNA-Menge von iNOS nicht nachweisbar [Abb. 12B].

Nebenniere

Die Behandlung mit den Betablockern sowie mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin hatte keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Menge [Abb. 12C].

Die iNOS-Proteinmenge war in den untersuchten Geweben nicht nachweisbar.

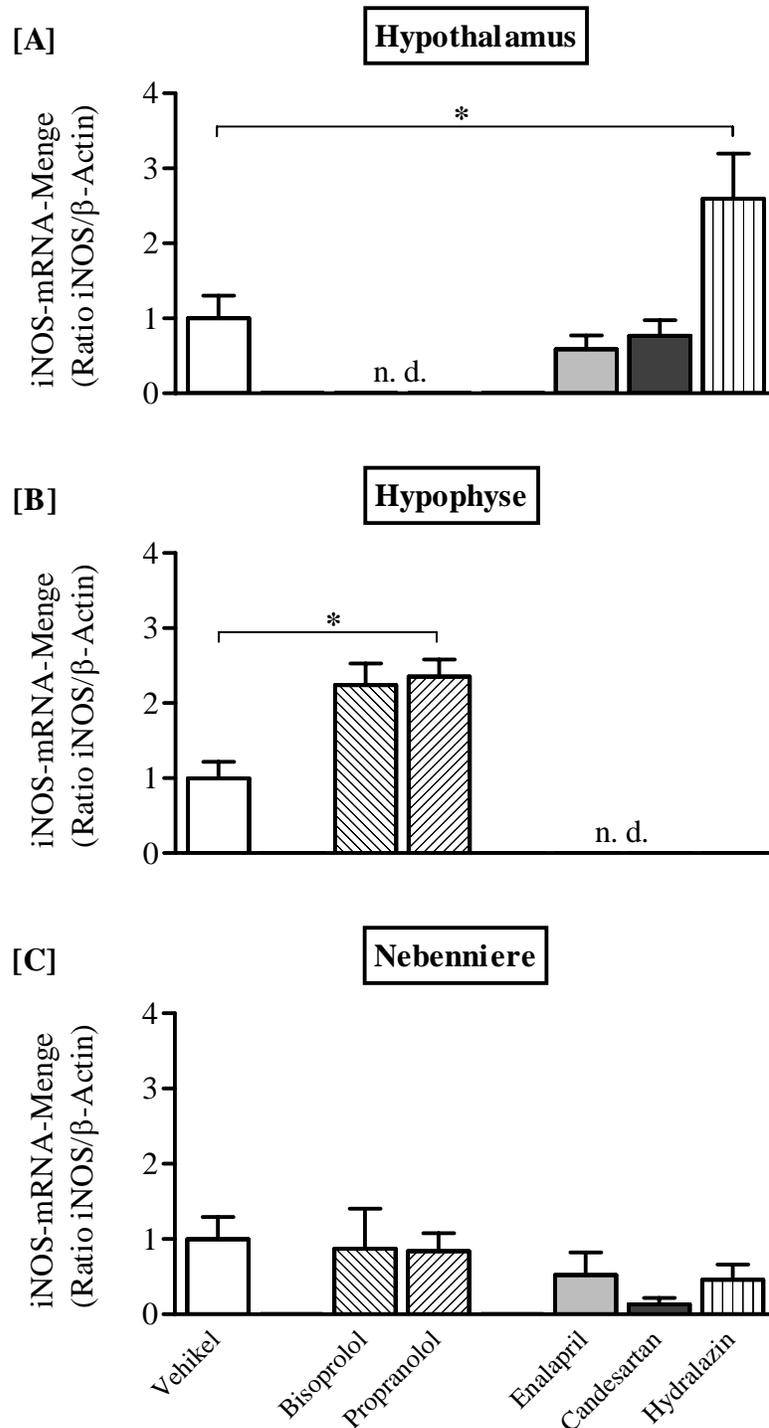


Abbildung 12: iNOS-mRNA-Menge in Hypothalamus [A], Hypophyse [B] und Nebenniere [C] bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. n = 10 pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Vehikel. n. d. = nicht detektierbar.

3.4.2. Hirnstamm-Regionen

Dorsale Medulla

Die Behandlung mit den Betablockern sowie mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin hatte keinen Einfluss auf die iNOS-mRNA-Menge [Abb. 13A].

Ventrale Medulla

Die Behandlung mit den Betablockern, sowie mit Enalapril und Candesartan hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Ebene. Nach Hydralazin-Behandlung zeigte sich jedoch eine um 87% niedrigere mRNA-Menge ($p < 0,05$) als bei den Kontrolltieren [Abb. 13B].

Die iNOS-Proteinmenge war in den untersuchten Geweben nicht nachweisbar.

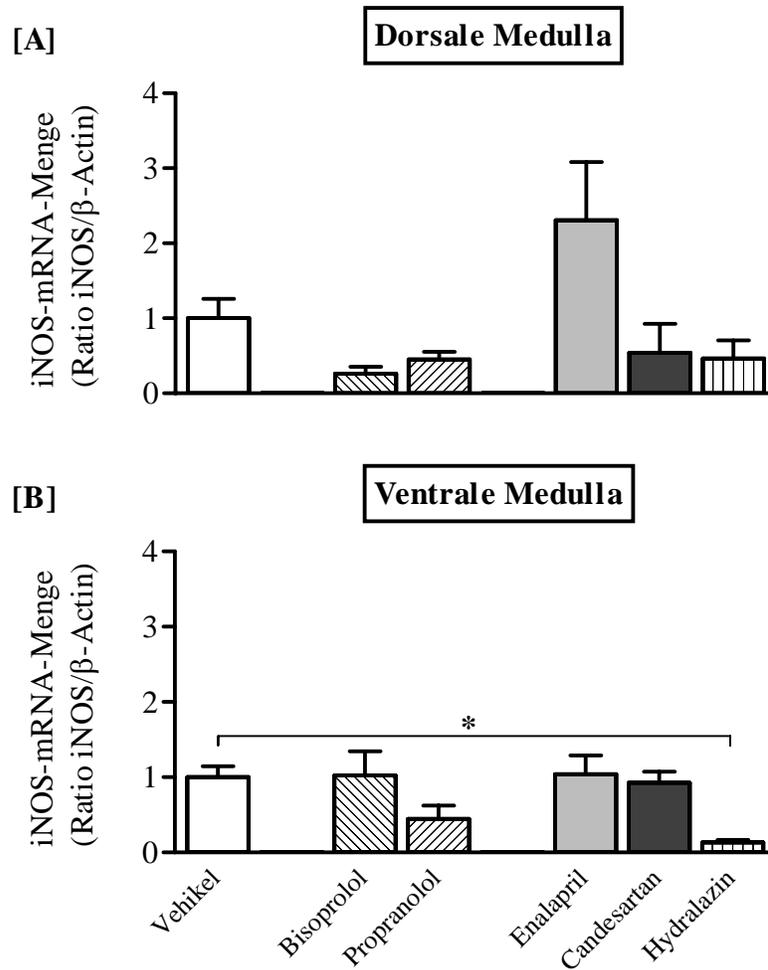


Abbildung 13: iNOS-mRNA-Menge in der dorsalen [A] und der ventralen Medulla [B] bei SHR nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg) im Vergleich mit Vehikel-behandelten SHR. n = 10 pro Gruppe. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Vehikel.

3.5. Zusammenfassung

Die Tabellen 5 und 6 zeigen eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

[A]	nNOS						
	Behandlung	Hypothalamus		Hypophyse		Nebenniere	
		mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Bisoprolol	↑	∅	∅	∅	∅	↑	
Propranolol	↑	∅	∅	∅	∅	∅	
Enalapril	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
Candesartan	∅	↑	∅	↑	∅	∅	
Hydralazin	∅	↑	∅	∅	∅	∅	

[B]	eNOS						
	Behandlung	Hypothalamus		Hypophyse		Nebenniere	
		mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Bisoprolol	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
Propranolol	∅	∅	∅	∅	↑	∅	
Enalapril	↓	∅	∅	∅	∅	∅	
Candesartan	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
Hydralazin	∅	∅	∅	∅	∅	∅	

[C]	iNOS						
	Behandlung	Hypothalamus		Hypophyse		Nebenniere	
		mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein
Bisoprolol	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
Propranolol	∅	∅	↑	∅	∅	∅	
Enalapril	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
Candesartan	∅	∅	∅	∅	∅	∅	
Hydralazin	↑	∅	∅	∅	∅	∅	

Tabelle 5: Übersicht über die signifikanten Änderungen der mRNA- und Proteinmenge von nNOS [A], eNOS [B] und iNOS [C] bei SHR in der HHN-Achse nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg). ↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Erniedrigung, ∅ = kein signifikanter Unterschied.

[A]	nNOS				
	Behandlung	Dorsale Medulla mRNA	Protein	Ventrale Medulla mRNA	Protein
	Bisoprolol	∅	∅	∅	∅
	Propranolol	∅	∅	∅	∅
	Enalapril	∅	∅	∅	∅
	Candesartan	∅	∅	∅	∅
	Hydralazin	∅	∅	∅	∅

[B]	eNOS				
	Behandlung	Dorsale Medulla mRNA	Protein	Ventrale Medulla mRNA	Protein
	Bisoprolol	↑	∅	∅	∅
	Propranolol	∅	∅	∅	∅
	Enalapril	∅	∅	↑	∅
	Candesartan	∅	∅	∅	∅
	Hydralazin	∅	∅	∅	∅

[C]	iNOS				
	Behandlung	Dorsale Medulla mRNA	Protein	Ventrale Medulla mRNA	Protein
	Bisoprolol	∅	∅	∅	∅
	Propranolol	∅	∅	∅	∅
	Enalapril	∅	∅	∅	∅
	Candesartan	∅	∅	∅	∅
	Hydralazin	∅	∅	↓	∅

Tabelle 6: Übersicht über die signifikanten Änderungen der mRNA- und Proteinmenge von nNOS [A], eNOS [B] und iNOS [C] bei SHR in der dorsalen und ventralen Medulla nach 4-wöchiger Behandlung (mg/kg KG/Tag per os) mit Bisoprolol (10 mg), Propranolol (50 mg), Enalapril maleat (10 mg), Candesartan cilexetil (3 mg) und Hydralazin (3 mg). ↑ = signifikante Erhöhung, ↓ = signifikante Erniedrigung, ∅ = kein signifikanter Unterschied.

4. Diskussion

4.1. Einfluss von Antihypertensiva auf die nNOS-Genexpression

4.1.1. in der HHN-Achse

Im Hypothalamus wird durch verschiedene Mediatoren die endokrine und autonome Regulation von kardiovaskulären Funktionen moduliert. NO reduziert die Freisetzung von Vasopressin in den Blutkreislauf (*Yasin et al., 1993, Goyer et al., 1994*). *Krukoff (1999)* konnte ebenfalls eine Erhöhung der nNOS-Genexpression nachweisen und lokalisierte die betroffenen Neurone im PVN und SON. NO hat im PVN über GABA-Stimulation einen inhibitorischen Effekt auf den Sympathikotonus (*Horn et al., 1994; Gerova et al., 1995; Zhang und Patel, 1998*). Die Koexistenz von NO und anderen Neurotransmittern führt also zu einer wechselseitigen Beeinflussung im Hypothalamus. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es durch antihypertensive Behandlung zu Interaktionen mit diesem wichtigen kreislaufregulierenden Zentrum kommt. Dabei scheint der Einfluss der Betablocker am stärksten zu sein, da sowohl nach unspezifischer β -Blockade als auch nach spezifischer β_1 -Blockade die nNOS-mRNA-Menge erhöht ist. Dies scheint jedoch interessanterweise keine Auswirkung auf die nNOS-Proteinmenge zu haben. Umgekehrt zeigte sich nach Behandlung mit Candesartan und Hydralazin lediglich die nNOS-Proteinmenge erhöht, während die nNOS-Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe unverändert war. Das ebenfalls mit dem RAS interagierende Enalapril übte keinen Einfluss auf mRNA- oder Proteinebene aus. Dass substanzspezifische Unterschiede bei RAS-Inhibitoren vorliegen, konnte auch in anderen Untersuchungen vermutet werden. So zeigte sich in Untersuchungen von *Qadri et al. (2003)* nach Behandlung mit Losartan und Enalapril nach 10-tägiger Behandlung eine reduzierte NOS-Aktivität im Vergleich zur Kontroll-SHR. Es wurde jedoch mit der Gesamt-NOS-Aktivität ein anderer Parameter gemessen als bei der semiquantitativen PCR und der Western-Blot-Analyse in der vorliegenden Untersuchung. Proteinmenge und Aktivität eines Enzyms müssen nicht notwendigerweise korrelieren, da die Enzymaktivität auch durch andere Co-Faktoren bestimmt wird. Es scheint, dass es trotz erhöhter nNOS-Proteinmenge zu einem Aktivitätsabfall von nNOS kommt.

In der Hypophyse finden sich NO-produzierende Zellen im posterioren Teil, während im intermediären und im anterioren Lappen keine Aktivität nachweisbar war (*Bredt et al., 1990*). Vermutlich hat jedoch die Hypophyse bei der Homöostase des Blutdrucks im Vergleich mit dem Hypothalamus eine untergeordnete Bedeutung, da sich nach antihypertensiver Behandlung in den Behandlungsgruppen keine Unterschiede auf mRNA-Ebene im Vergleich mit Kontrollgruppe zeigten. Dem Hypothalamus als übergeordnetem Zentrum kommt somit scheinbar eine Kontrolle des Sympathikotonus zu. Die genaue Bedeutung der NO-produzierenden Zellen in der Hypophyse ist bis jetzt noch unklar.

Lediglich nach AT₁-Blockade mit Candesartan zeigte sich in der Hypophyse die nNOS-Proteinmenge signifikant erhöht. Ob Candesartan die Neurohormonfreisetzung direkt oder nur indirekt beeinflusst, ist unbekannt, da in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen mit dieser Fragestellung vorliegen.

Auch die medikamentöse Beeinflussung der Nebenniere scheint bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pharmaka gering zu sein. Nach antihypertensiver Behandlung zeigte sich lediglich nach Behandlung mit Bisoprolol eine Erhöhung der nNOS-Proteinmenge, während in den übrigen Gruppen keine signifikanten Unterschiede vorlagen. Scheinbar gibt es hier auch substanzspezifische Unterschiede bei den zwei verwendeten unspezifischen und β_1 -spezifischen Betablockern. Der genaue Mechanismus bedarf weiterer Untersuchungen. Die komplexen Interaktionen des NO-Systems mit dem RAS wurden bereits mehrfach untersucht. Dabei zeigten sich zum Teil widersprüchliche Resultate. *Ackermann et al. (1998)* konnten zeigen, dass NO und NO-Donatoren eine kompetitive Hemmung der Hydrolyse von ACE-Substraten bewirken können. *Cahill et al. (1995)* konnten zeigen, dass NO AT₁-Rezeptoren herunterreguliert. Vermutlich kommt es umgekehrt nach AT₁-Rezeptorhemmung zu einer verstärkten NO-Produktion. Hier liegen jedoch zum Teil kontroverse Daten vor, die auf eine Interaktion von NO und dem RAS hinweisen, die offenbar auch substanzspezifisch unterschiedlich stark ausfällt. So wurde vermutet, dass zwischen NO und Angiotensin II im Sinne zweier Gegenspieler eine Balance besteht (*Millat et al., 1999; Nishiyama et al., 2001*). Andere Studien hingegen liefern Hinweise, dass Angiotensin II die Barorezeptor-Sensitivität steigern kann (*Dominiak et al., 1989*). Auch zeigten *Michel et al. (1996)*, dass die ACE-Aktivität er-

höht ist, wenn die NOS-Aktivität gering ist, und umgekehrt. Andererseits stimulieren sowohl Angiotensin II als auch Angiotensin-(1-7) die Synthese von NO und dessen Freisetzung. *Qadri et al. (2003)* vermuteten allerdings, dass es zu einer Interaktion von RAS-Inhibitoren mit NO auf hypothalamischer Ebene kommt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei denen sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe bei Interaktion mit dem RAS in Bezug auf die ACE-Hemmung oder AT₁-Blockade zeigten. Möglicherweise kann die mRNA nur am Anfang einer antihypertensiven Behandlung geändert werden, während hier Daten nach 4-wöchiger Behandlung gezeigt werden. In den Untersuchungen von *Sällström et al. (2008)* wurde gezeigt, dass nNOS-Knockout-Mäuse normotensiv sein können. Ein signifikanter Blutdruckunterschied zwischen Mäusen mit und ohne nNOS ließ sich in der Studie nicht nachweisen.

In der Untersuchung von *Qadri et al. (2001)* ließ sich in der Nebenniere nach 10-tägiger antihypertensiver Behandlung mit Captopril, Enalapril und Losartan eine erhöhte Gesamt-NOS-Aktivität nachweisen, wobei die Proteinmenge nicht bestimmt wurde. Inwieweit eine gesteigerte NOS-Aktivität mit einer erhöhten NOS-Proteinmenge einher gehen muss, bleibt unklar.

Nach Behandlung mit dem peripheren Vasodilatator Hydralazin zeigten sich in der HHN-Achse bis auf eine Erhöhung der nNOS-Proteinmenge im Hypothalamus gegenüber der Kontrollgruppe keine Unterschiede auf mRNA- und Proteinebene. Ob dies mit dem peripheren Gefäßsystem als Angriffspunkt des Medikaments zu erklären ist, kann nicht gesagt werden. Vermutlich spielt auch die applizierte Dosis von Hydralazin eine entscheidende Rolle bei der Beeinflussung der NO-Synthase. *Iwai et al. (1995)* führten mit der mehr als dreifachen Hydralazin-Dosis bei SHR eine Blutdrucksenkung von ungefähr 50 mm Hg systolisch durch und wiesen eine erhöhte mRNA-Menge nach. Die in der vorliegenden Arbeit applizierte Dosis des peripheren Vasodilatators scheint noch nicht die nNOS-Transkription zu beeinflussen, obwohl es zu einer signifikanten Blutdrucksenkung kam.

4.1.2. im Hirnstamm

Nach antihypertensiver Behandlung zeigten sich im Hirnstamm keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Dies scheint sich auch in der Aktivität von NOS auszuwirken. *Qadri et al. (2003)* konnten zeigen, dass es nach Gabe eines ACE-Hemmers,

eines AT₁-Antagonisten und eines peripheren Vasodilatators zu keiner Änderung der NOS-Aktivität im Hirnstamm kam. Wahrscheinlich spielt nach chronischer antihypertensiver Behandlung die nNOS-Signaltransduktion in Teilen der HHN eine wichtigere Rolle in der Blutdrucksenkung. *Hojná et al. (2007)* wiesen ebenfalls im Hirnstamm keine Änderung der Expression von nNOS und auch von eNOS gegenüber WKY-Ratten nach. Die NOS-Aktivität war in diesem Gewebe ebenfalls unverändert im Vergleich zu normotensiven Kontrolltieren.

Es konnte gezeigt werden, dass NO im NTS und in der RVLM die Sympathikusaktivität reduziert und den arteriellen Blutdruck senkt (*Shapoval et al., 1991; Togashi, 1992; Tseng et al., 1996; Chan et al., 2001*). Im NTS scheint NO mit anderen Neurotransmittern zu interagieren und deren Freisetzung zu modulieren. So kam es nach Stimulation von NMDA-Rezeptoren zu einer gesteigerten Bildung von NO (*Dipaola et al., 1991*). Auch in der CVLM konnte ein Nachweis für die Beteiligung von NO an der NMDA-induzierten Blutdrucksenkung erbracht werden (*Wu et al., 2003*). Da NO die Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren stimuliert, kann vermutet werden, dass NO und die Aminosäuren gegenseitig die Freisetzung steuern (*Lo et al., 1997*). In der RVLM ist der inhibierende Effekt von NO auf den ausgehenden Sympathikotonus durch GABA vermittelt. Bei SHR kann die RVLM einen veränderten L-Arginin-NO-Reaktionsweg aufweisen (*Kagiyama et al., 1998*). Dabei ist die NO-Bildung im Vergleich mit WKY vermutlich reduziert. Der über GABA vermittelte herabgesetzte Reaktionsweg könnte einen Beitrag zur Hypertension bei SHR leisten. In der Untersuchung von *Ferrari und Fior-Chadi (2005)* wurde vermutet, dass Unterschiede bei der mRNA- und Proteinmenge von nNOS bei SHR im NTS im Vergleich zu normotensiven WKY-Ratten nur in den ersten 15 Lebenstagen bis zu einem Alter von maximal 16 Wochen nachgewiesen werden könnten.

Zwar stellt der Hirnstamm ein wichtiges blutdruckregulierendes Zentrum dar, anscheinend sind aber die Möglichkeiten der Einflussnahme der verschiedenen Medikamente im Vergleich mit der HHN-Achse geringer. Denkbar wären auch Gegenregulationsmechanismen auf lokaler Ebene, z.B. die Freisetzung endothelialer Vasodilatoren oder die Modulation des Barorezeptors, wie in Untersuchungen postuliert (*Qadri et al., 1999*). Inwieweit Hypothalamus, Hypophyse und der Hirnstamm isoliert arbeiten oder sogar synergistisch wirken, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.2. Einfluss von Antihypertensiva auf die eNOS-Genexpression in der HHN-Achse und im Hirnstamm

Bisher liegen wenig vergleichbare Untersuchungen über Veränderungen der eNOS-Genexpression und der eNOS-Proteinmenge in der Entwicklung der Hypertonie vor. In den Untersuchungen von *Häuser et al. (2005)* waren keine signifikanten Unterschiede der eNOS-mRNA- und -Proteinmenge zwischen WKY und SHR nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit war die eNOS-Proteinmenge mit dem verwendeten Assay nicht nachweisbar. Vermutlich lag sie in den untersuchten Geweben unterhalb der Nachweisgrenze, weil sich nach Inkubation des rekombinanten eNOS-Proteins mit dem Anti-eNOS-Antikörper in der Western-Blot-Analyse eine Bande an der richtigen Stelle zeigte.

Es scheint, als ob die chronische antihypertensive Behandlung bei SHR keinen einheitlichen Einfluss auf die eNOS-Genexpression hat. In der HHN-Achse kommt es nach Behandlung mit Enalapril zu einer signifikanten Erniedrigung der eNOS-mRNA-Menge im Hypothalamus, während es nach Behandlung mit Propranolol zu einer Erhöhung der eNOS-mRNA-Menge in der Nebenniere kommt. Kompensationsmechanismen von endothelialer Seite scheinen im kreislaufregulierenden Hypothalamus bei SHR von untergeordneter Bedeutung zu sein, da es zu einer Herunterregulation nach ACE-Blockade statt zu einer Steigerung der eNOS-Genexpression kommt, wie man erwarten würde.

Vermutlich ist der Einfluss auf eNOS im Hirnstamm von geringerer Bedeutung als in der HHN-Achse, da die komplexe Rolle des Hirnstamms bei der Blutdruckregulation bereits betont wurde. Es lässt sich vermuten, dass diesem System eher eine modulierende Funktion von übergeordneten Zentren zukommt, als dass dieses Zentrum direkt von anderen Faktoren beeinflusst werden könnte. Ein Unterschied zu Gegenregulationen, die bei nNOS gezeigt wurden, könnte darin liegen, dass NO (durch eNOS) im Gefäßendothel produziert wird, während das von nNOS produzierte NO direkt sympathische Zentren beeinflusst. Der Einfluss von eNOS könnte also von geringerer Bedeutung sein als im Falle von nNOS.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich nach Gabe des ACE-Hemmers Enalapril in der ventralen Medulla eine signifikante eNOS-mRNA-Erhöhung, während sich dorsal lediglich nach β_1 -selektiver Blockade eine Erhöhung der mRNA-Menge zeigte. Vermutlich lässt sich die Erhöhung der mRNA-Menge durch eine Steigerung der eNOS-Transkription erklären.

Da die eNOS-Proteinmenge im Western-Blot nicht zu bestimmen war, können keine Vermutungen über Veränderungen der eNOS-Aktivität getroffen werden. Inwieweit es zu einer Interaktion des NO-Systems mit den RAS-Inhibitoren oder den Betablockern kommt, bleibt weiterhin unklar. Offenbar sind die Interaktionen von NO und dem RAS sehr komplex und in einzelnen Geweben unterschiedlich. Mehrere Studien zeigten, dass Angiotensin II die Freisetzung von NO über AT₁-Rezeptoren in Arterien stimuliert (*Olson et al., 1997; Thorup et al., 1998*). Ob es auch bei einer Hemmung des AT₁-Rezeptors zu einem signifikanten Abfall der eNOS-mRNA-Menge in der Nebenniere kommt, lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht schlussfolgern. *Brandes et al. (2000)* vermuteten umgekehrt sogar inhibitorische Funktionen von eNOS, da bei eNOS-defizienten Mäusen die Sensitivität für Nitro-Vasodilatoren erhöht war gegenüber Tieren mit gesteigerter Aktivität sowohl von eNOS, als auch von iNOS. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch *Ohashi et al. (1998)*. Verschiedene Autoren haben kontroverse Meinungen über eine entgegengesetzte Wechselbeziehung zwischen der Aktivität von ACE und eNOS in den Blutgefäßen im Sinne eines Regelkreises postuliert, wie von *Fernandez-Alfonso und Gonzalez (1999)* beschrieben. Zwar zeigten *Wiemer et al. (1997)* eine dosisabhängige Steigerung der NO-Freisetzung in der Aorta nach Behandlung mit Ramipril und machten dafür eNOS verantwortlich, aber es scheint demnach keine Verallgemeinerung möglich zu sein. Auch *Linz et al. (1999)* wiesen darauf hin, dass Veränderungen in der eNOS-Expression offenbar nicht regelmäßig mit einer veränderten NO-Menge verbunden sind.

4.3. Einfluss von Antihypertensiva auf die iNOS-Genexpression in der HHN-Achse und im Hirnstamm

Die Bedeutung von iNOS bei der Entwicklung der Hypertonie ist ebenfalls noch nicht häufig untersucht worden. Es konnte nachgewiesen werden, dass in den Neutrophilen von SHR die Expression von iNOS gegenüber der Expression von nNOS gesteigert ist. Man folgerte daraus, dass iNOS bei oxidativem Stress wie Hypertonus vermehrt gebildet wird (*Chatterjee et al., 2007*).

Mit der PCR gelang der Nachweis der iNOS-mRNA, allerdings ist durch die starke Streuung der Werte und die schlechte Detektierbarkeit keine verlässliche Aussage möglich. Mit der

Western-Blot-Analyse ist mit den verwendeten Antikörpern kein Nachweis der iNOS-Proteinmenge gelungen. Vermutlich lag sie in den untersuchten Geweben unterhalb der Nachweisgrenze oder die Spezifität des verwendeten Antikörpers ist nicht hoch genug. In der Literatur ist nur selten der Nachweis der iNOS-Proteinmenge in einem Gewebe mit Hilfe der Western-Blot-Analyse gelungen. Nach der antihypertensiven Behandlung konnte sowohl in der HHN-Achse, aber auch im Hirnstamm iNOS-mRNA nachgewiesen werden, allerdings war bei einigen Gruppen die mRNA-Menge zur Detektion zu gering. In der HHN-Achse kam es dabei im Hypothalamus zu einem Anstieg nach Applikation des peripheren Vasodilatators, während es in der Hypophyse zu einem Anstieg der iNOS-mRNA-Menge nach β_1 -Rezeptorblockade kam.

Im Hirnstamm fiel nur in der ventralen Medulla die iNOS-Expression nach Hydralazin-Gabe signifikant. In der dorsalen Medulla zeigten sich nach antihypertensiver Behandlung keine Unterschiede. Aufgrund der starken Streuung der mRNA-Werte ist eine Interpretation nur bedingt möglich. Man kann vermuten, dass die hohe iNOS-Expression den pathologischen Gefäßstatus reflektiert, allerdings liegen bislang keine Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen vor, die zeigen, wie stark der Stimulus sein muss, um eine stärkere Aktivierung von iNOS herbeizuführen. Ähnlich wie bei eNOS liegen keine einheitlichen Veränderungen vor, so dass vermutlich die Bedeutung von iNOS gegenüber nNOS deutlicher geringer ist in Bezug auf endogene Mechanismen zur Gegenregulation bei der etablierten Hypertonie oder auch nach Behandlung mit Antihypertensiva.

4.4. Schlussfolgerung

Die NO-Synthese ist in wichtigen kardiovaskulär regulierenden Kerngebieten in der HHN-Achse und im Hirnstamm bei mit Antihypertensiva behandelten SHR gegenüber der Kontrolle verändert. Blutdrucksenkung als solche mit verschiedenen Antihypertensiva hat nicht den gleichen Einfluss auf die nNOS-, eNOS- und iNOS-Genexpression, sondern einzelne Antihypertensiva üben einen spezifischen Einfluss auf die NOS-Expression aus.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von NO bei der Blutdruckregulation in der HHN-Achse und im Hirnstamm untersucht. Es wurde untersucht, inwieweit Unterschiede in Bezug auf die mRNA- und die Proteinmenge der drei Isoformen des Enzyms NO-Synthase (NOS) nach chronischer antihypertensiver Behandlung im Vergleich mit einer Kontrollbehandlung vorliegen. SHR wurden mit Bisoprolol (10 mg/kg KG), Propranolol (50 mg/kg KG), Enalapril (10 mg/kg KG), Candesartan (3 mg/kg KG), Hydralazin (3 mg/kg KG) oder Vehikellösung (1 ml/kg KG) vier Wochen lang täglich behandelt. Hypothalamus, Hypophyse, Nebennieren, dorsale und ventrale Medulla wurden mit der RT-PCR auf die mRNA-Menge der NOS-Isoformen untersucht und mit der Western-Blot-Technik die NOS-Proteinmenge bestimmt. Bei nNOS zeigten sich auf hypothalamischer Ebene Veränderungen im Vergleich zu den Kontroll-SHR. Nach Behandlung mit beiden Betablockern kam es zu einer Erhöhung der mRNA-Menge, während sich nach Behandlung mit Candesartan und Hydralazin eine erhöhte nNOS-Proteinmenge zeigte, die mRNA-Menge aber unverändert blieb. Es zeigte sich eine erhöhte nNOS-Proteinmenge nach Behandlung mit Candesartan in der Hypophyse sowie nach Behandlung mit Bisoprolol in der Nebenniere. Im Hirnstamm hat die chronische antihypertensive Behandlung keine Auswirkung auf nNOS-mRNA- und Proteinebene. Vermutlich kann besonders im Hypothalamus die mRNA-Menge und -Proteinmenge von nNOS beeinflusst werden, während dem Hirnstamm eher modulierende Funktionen der HHN-Achse zukommen, aber keine medikamentöse Beeinflussung möglich ist. Der Einfluss von eNOS bei der zentralen Blutdruckregulation scheint geringer zu sein als der von nNOS, da es vermutlich eher zu substanzspezifischen uneinheitlichen Veränderungen in den Gehirnarealen kommt. Die eNOS-Proteinmenge war nicht detektierbar. Bei iNOS ist bisher selten in der Literatur ein Nachweis der Proteinmenge gelungen. Auf mRNA-Ebene zeigten sich in der vorliegenden Arbeit im Hypothalamus, in der Hypophyse und der ventralen Medulla Änderungen gegenüber der Kontrollgruppe, die als Gegenregulation zum erhöhten Blutdruck gedeutet werden könnten. Die mRNA-Menge und -Proteinmenge der Isoformen der NO-Synthase scheinen durch chronische antihypertensive Behandlung bei SHR in zentralen Geweben verändert zu werden. Ob die Enzymaktivität mit der Proteinmenge korreliert, kann nicht abgeleitet werden.

6. Literaturverzeichnis

Ackermann A, Fernandez-Alfonso MS, Sanchez de Rojas R, Ortega T, Paul M, Gonzalez C: Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 124(2), 291-298 (1998)

Ardekani AM, Walker SJ, Donohue SJ, Stitzel RE, Connors JM, Vrana KE: Adrenocorticotropin and corticosterone levels in pre-weanling spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 44(14), 919-925 (1989)

Bains JS, Ferguson AV: Angiotensin II neurotransmitter actions in paraventricular nucleus are potentiated by a nitric oxide synthase inhibitor. *Regul Pept* 50(1), 53-59 (1994)

Brandes RP, Kim D, Schmitz-Winnenthal FH, Amidi M, Godecke A, Mulsch A, Busse R: Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35(1 Pt 2), 231-236 (2000)

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347(6295), 768-770 (1990)

Bredt DS, Snyder SH: Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 87(2), 682-685 (1990)

Busse R, Mulsch A: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 275(1-2), 87-90 (1990)

Cabrera C, Bohr D: The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochem Biophys Res Commun* 206(1), 77-81 (1995)

Cabrera CL, Bealer SL, Bohr DF: Central depressor action of nitric oxide is deficient in genetic hypertension. *Am J Hypertens* 9(3), 237-241 (1996)

Cahill PA, Redmond EM, Foster C, Sitzmann JV: Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 288(2), 219-229 (1995)

Cerritelli S, Springhorn SS, Lacks SA: DpnA, a methylase for single-strand DNA in the Dpn II restriction system, and its biological function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23), 9223-9227 (1989)

Chan SH, Wang LL, Wang SH, Chan JY: Differential cardiovascular responses to blockade of nNOS or iNOS in rostral ventrolateral medulla of the rat. *Br J Pharmacol* 133(4), 606-614 (2001)

Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S: Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23), 11419-11423 (1993)

Chatterjee M, Saluja R, Kanneganti S, Chinta S, Dikshit M: Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Biol* (Noisy-le-grand) 53(1), 84-93 (2007)

Chen X, Catravas JD: Neutrophil-mediated endothelial angiotensin-converting enzyme dysfunction: role of oxygen-derived free radicals. *Am J Physiol* 265(3 Pt 1), L243-249 (1993)

Dipaola ED, Vidal MN, Nistico G: L-glutamate evokes the release of an endothelium-derived relaxing factor-like substance from rat nucleus tractus solitarius. *J Cardiovasc Pharmacol* 17, 5269-5272 (1991)

Dominiak P, Blochl A, Permanetter B: Influence of baroreceptors on hypertension, pharmacotherapy with conversion enzyme inhibitors. *Z Kardiol* 78 Suppl 7, 187-192 (1989)

Fernandez-Alfonso MS, Gonzalez C: Nitric oxide and the rennin-angiotensin system. Is there a physiological interplay between the systems ? *J Hypertens* 17(10), 1355-1361 (1999)

Ferrari MF, Fior-Chadi DR: Differential expression of nNOS mRNA and protein in the nucleus tractus solitarii of young and aged Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23(9), 1683-1690 (2005)

Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789), 373-376 (1980)

Ganten D: Role of Animal Models in Hypertension Research. *Hypertension* 9(Supl. 1), I-2-I-4 (1987)

Gerova M, Masanova C, Pavlasek J: Inhibition of NO synthase in the posterior hypothalamus increases blood pressure in the rat. *Physiol Res* 44(2), 131-134 (1995)

Goyer M, Bui H, Chou L, Evans J, Keil LC, Reid IA: Effects of inhibition of nitric oxide synthesis on Vasopressin secretion in conscious rabbits. *Am J Physiol* 266(2 Pt 2), H822-828 (1994)

Griffith OW, Kilbourn RG: Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods Enzymol* 268, 375-392 (1996)

Griscavage JM, Fukuto JM, Komori Y, Ignarro LJ: Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J Biol Chem* 269 (34), 21644-21649 (1994)

Häuser W, Sassmann A, Qadri F, Jöhren O, Dominiak P: Expression of nitric oxide synthase isoforms in hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the development of spontaneous hypertension in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 138(2), 198-204 (2005)

Hall CW, Behbehani MM: The medial preoptic nucleus of the hypothalamus modulates activity of nitric oxide sensitive neurons in the midbrain periaqueductal gray. *Brain Res* 765(2), 208-217 (1997)

Hall CW, Behbehani MM: Synaptic effects of nitric oxide on enkephalinergic, GABAergic, and glutamatergic networks of the rat periaqueductal gray. *Brain Res* 805(1-2), 69-87 (1998)

Harada S, Tokunaga S, Momohara M, Masaki H, Tagawa T, Imaizumi T, Takeshita A: Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitarius increases renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Circ Res* 72(3), 511-516 (1993)

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(3), 1161-1167 (1989)

Hirooka Y, Takeshita A: Recent trends in studies of the etiology of hypertension: Central nervous system and autonomic nervous system. *Nippon Rinsho* 59(5), 860-866 (2001)

Hojná S, Kadlecová M, Dobesová Z, Valousková V, Zicha J, Kunes J: The participation of brain NO synthase in blood pressure control of adult spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 297(1-2), 21-29 (2007)

Horn T, Smith PM, McLaughlin BE, Bauce L, Marks GS, Pittman QJ, Ferguson AV: Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. *Am J Physiol* 266(1 Pt 2), R306-313 (1994)

Iwai N, Hanai K, Tooyama I, Kitamura Y, Kinoshita M: Regulation of neuronal nitric oxide synthase in rat adrenal medulla. *Hypertension* 25(3), 431-436 (1995)

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(4), 1030-1034 (1998)

Kong HM, Morgan RD, Chen ZF: A new type II restriction endonuclease, BsmA I, from *Bacillus stearothermophilus*. *Nucleic Acids Res* 18(3), 686 (1990)

Krukoff TL, Mactavish D, Jhamandas JH: Activation by hypotension of neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the brainstem. *J Comp Neurol* 385(2), 285-296 (1997)

Krukoff TL: Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Rev* 30(1), 52-65 (1999)

Lawrence AJ, Jarrott B: Nitric oxide increases interstitial excitatory amino acid release in the rat dorsomedial medulla oblongata. *Neurosci Lett* 151(2), 126-129 (1993)

Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA: Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 270 (1 Pt 1), L164-170 (1996)

Lewis SJ, Ohta H, Machado B, Bates JN, Talman WT: 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(1), 135-136 (1991)

Linz W, Wohlfart P, Scholkens BA, Malinski T, Wiemer G: Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res* 43(3), 549-561 (1999)

Lo WC, Lin HC, Ger LP, Tung CS, Tseng CJ: Cardiovascular effects of nitric oxide and N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus tractus solitarii of rats. *Hypertension* 30(6), 1499-1503 (1997)

Lo WC, Jan CR, Wu SN, Tseng CJ: Cardiovascular effects of nitric oxide and adenosine in the nucleus tractus solitarii of rats. *Hypertension* 32(6), 1034-1038 (1998)

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265-275 (1951)

Michel JB, Xu Y, Blot S, Philippe M, Chatellier G: Improved survival in rats administered NG-nitro L-arginine methyl ester due to converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 28(1), 142-148 (1996)

Michel T, Feron O: Nitric Oxide Synthases: which, where, how, and why ? *J Clin Invest* 100(9), 2146-2152 (1997)

Michel T: Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Res* 32(11), 1361-1366 (1999)

Millat LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM: Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept* 81(1-3), 1-10 (1999)

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: The Discovery of Nitric Oxide as the endogenous Nitrovasodilator. *Hypertension* 12(4), 365-372 (1988)

Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ: Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90(5), 2092-2096 (1992)

Nishiyama A, Fujisawa Y, Fukui T, Rahman M, Kondo N, Ogawa Y, Fanzhu L, Guoxing Z, Kimura S, Abe Y: Role of nitric oxide in regional blood flow in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Hypertens Res* 24(4), 421-427 (2001)

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(12), 2061-2071 (1998)

Ohta A, Takagi H, Matsui T, Hamai Y, Iida S, Esumi H: Localization of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the solitary nucleus and ventrolateral medulla oblongata of the rat: their relation to catecholaminergic neurons. *Neurosci Lett* 158(1), 33-35 (1993)

Olson SC, Dowds TA, Pino BA, Barry MT, Burke-Wolin T: ANG II stimulates endothelial nitric oxide synthase expression in bovine pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273(2 Pt 1), L315-321 (1997)

Plochocka-Zulinska D, Krukoff TL: Increased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of adult spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Mol Brain Res* 48(2), 291-297 (1997)

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(3), 279-285 (1999)

Qadri F, Arens T, Schwarz 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(4), 365-369 (2001)

Qadri F, Arens T, Schwarz EC, Häuser W, Dendorfer A, Dominiak P: Brain nitric oxide synthase activity in spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *J Hypertens* 21(9), 1687-1694 (2003)

Raasch W, Bartels T, Schwartz C, Häuser W, Rütten H, Dominiak P: Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors? *J Hypertens* 20(12), 2495-2504 (2002)

Rodrigo J, Riveros-Moreno V, Bentura ML, Uttentahl 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(4), 522-534 (1997)

Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Yanagida M, Tamura M, Kobayashi T, Yasuda H, Gross SS, Levi R: NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone ? *Circ Res* 70(3), 607-611 (1992)

Sällström J, Carlström M, Jensen BL, Skött O, Brown RD, Persson AE: Neuronal nitric oxide synthase-deficient mice have impaired renin release, but normal blood pressure. *Am J Hypertens* 21(1), 111-116 (2008)

Schricker K, Potzl B, Hamann M, Kurtz A: Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (b-NOS) mRNA levels in rat kidneys. *Pflugers Arch* 432(3), 394-400 (1996)

Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH: Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension* 26(1), 164-170 (1995)

Shapoval LN, Sagach VF, Pobegailo LS: Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. *Neurosci Lett* 132(1), 47-50 (1991)

Slemmon JR, Martzen MR: Neuromodulin (GAP-43) can regulate a calmodulin-dependent target in vitro. *Biochemistry* 33(18), 5653-5660 (1994)

Snyder SH, Brecht DS: Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 12(4), 125-128 (1991)

Sugaya K, McKinney M: Nitric oxide synthase gene expression in cholinergic neurons in the rat brain examined by combined immunocytochemistry and in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res* 23(1-2), 111-125 (1994)

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

Thorup C, Kornfeld M, Winaver JM, Goligorsky MS, Moore LC: Angiotensin-II stimulates nitric oxide release in isolated perfused renal resistance arteries. *Pflugers Arch* 435(3), 432-434 (1998)

Tobian L: Salt and hypertension. Lessons from animal models that relate to human hypertension. *Hypertension* 17(1 Suppl), I52-58 (1991)

Togashi H, Sakuma I, Yoshioka M, Kobayashi T, Yasuda H, Kitabatake A, Saito H, Gross SS, Levi R: A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 262(1), 343-347 (1992)

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(1), 36-42 (1996)

Udenfriend S, Ooshima A, Cardinale G, Fuller GC, Spector S: Increased formation of collagen in the blood vessels of hypertensive rats. *Ann N Y Acad Sci* 275, 101-103 (1976)

Vincent SR, Kimura H: Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46(4), 755-784 (1992)

White KA, Marletta MA: Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 31(29), 6627-6631 (1992)

Wiemer G, Linz W, Hatrik S, Scholkens BA, Malinski T: Angiotensin-converting enzyme inhibition alters nitric oxide and superoxide release in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 30(5), 1183-1190 (1997)

Wong ML, Rettori V, al-Shekhlee A, Bongiorno PB, Canteros G, McCann SM, Gold PW, Licinio J: Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat Med* 2(5), 581-584 (1996)

Wu WC, Su CK, Yang CY, Chai CY: The nNos/cGMP mediations of the depressor response to NMDA receptor stimulation in the caudal ventrolateral medulla. *Chin J Physiol* 46(4), 175-179 (2003)

Yamori Y, Lovenberg W: Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 9(1), I13-I14 (1987)

Yamori Y: Overview: studies on spontaneous hypertension-development from animal models toward man. *Clin Exp Hypertens A* 13(5), 631-644 (1991)

Yasin S, Costa A, Trainer P, Windle R, Forsling ML, Grossman A: Nitric oxide modulates the release of Vasopressin from rat hypothalamic explants. *Endocrinology* 133(3), 1466-1469 (1993)

Yuan Z, Liu B, Yuan L, Zhang Y, Dong X, Lu J: Evidence of nuclear localization of neuronal nitric oxide synthase in cultured astrocytes of rats. *Life Sci* 74(26), 3199-3209 (2004)

Zhang K, Patel KP: Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am J Physiol* 275(3 Pt 2), R728-734 (1998)

Zicha J, Kunes J: Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev* 79(4), 1227-1282 (1999)

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Peter Dominiak danke ich für die Überlassung des Themas der Dissertation und für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die wissenschaftliche Unterstützung.

Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Fatimunnisa Qadri und Herrn Dr. Walter Häuser für die optimale und umfassende Betreuung, die konstruktiven Ratschläge und die experimentellen Planungen sowie für die Hilfe bei der Ausarbeitung und Gestaltung dieses Manuskriptes.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie möchte ich mich für ihre kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich besonders bei meinen Eltern Hartmut und Annette sowie meinem Bruder Boris, die mich in allen Belangen stets unterstützt und gefördert haben.

8. Curriculum vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN

Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	12.03.1979
Geburtsort	Gütersloh
Eltern	Hartmut Mischnik, Industriekaufmann Annette geb. Bettenworth, Industriekauffrau

AUSBILDUNG

1998	Abitur Städt. Gymnasium Gütersloh
1998 – 1999	Zivildienst bei der Johanniter Unfallhilfe Paderborn

STUDIUM

1999 – 2001	Universität Marburg
2001	Ärztliche Vorprüfung Medizin
2001 – 2006	Universität Lübeck
2002	1. Staatsexamen Medizin
2005	2. Staatsexamen Medizin
2006	3. Staatsexamen Medizin

WEITERBILDUNG

seit 10/2006	Asklepios Klinik Hamburg Wandsbek Innere Medizin
--------------	---

SPRACHKENNTNISSE

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Sprache und Schrift
Französisch	fließend in Sprache und Schrift
Spanisch	fließend in Sprache und Schrift
Lateinisch	gute Kenntnisse
Katalanisch	gute Kenntnisse
Italienisch	gute Kenntnisse

9. Posterpräsentationen und Publikationen

Posterpräsentationen

Mischnik A, Häuser W, Qadri F, Wasilewski N, Dominiak P: Increased neuronal nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats: a counter-regulatory mechanism to hypertension?

29. Wissenschaftlicher Kongress „Hypertonie“ 2005 in Berlin

Mischnik A, Häuser W, Qadri F, Wasilewski N, Dominiak P: Increased neuronal nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats: a counter-regulatory mechanism to hypertension?

47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie 2006 in Mainz

Publikationen

in Vorbereitung (mögliche Einreichung in *Molecular Brain Research*):

Qadri F, Mischnik A, Häuser W, Dominiak P: Effect of chronic antihypertensive treatment on expression of NOS isoforms in different cardiovascular relevant brain regions of adult SHR.