

**Endothelprotektion durch Acetylsalicylsäure:  
Stickstoffmonoxid und cGMP als antioxidative Mediatoren**

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Nina Großer

geb. am: 01. August 1973 in Düsseldorf

Gutachter:

1. Prof. Dr. Henning Schröder, Halle (Saale)
2. PD Dr. habil. Eva Krause, Halle (Saale)
3. Prof. Dr. Karsten Schrör, Düsseldorf

Halle (Saale), 27. September 2002 (Tag der Verteidigung)

**urn:nbn:de:gbv:3-000004409**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004409>]

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Atherogenese.....	5
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress.....	6
1.3 Stickstoffmonoxid.....	8
1.3.1 NO-Synthase.....	10
1.3.2 Effekte von Stickstoffmonoxid und cGMP.....	11
1.3.3 Antioxidative und zellprotektive Effekte von Stickstoffmonoxid.....	12
1.4 Acetylsalicylsäure.....	13
<b>2 Problemstellung.....</b>	<b>16</b>
<b>3 Methoden und Material.....</b>	<b>18</b>
3.1 Zellkultur.....	18
3.2 Isolierung vaskulärer Endothelzellen aus Schweineaorten.....	18
3.3 Viabilitätsassays.....	19
3.3.1 Kristallviolettassay.....	19
3.3.2 LDH-Assay.....	19
3.4 Bestimmung von cGMP.....	20
3.4.1 Radioimmunoassay.....	20
3.4.2 Enzymimmunoassay.....	21
3.5 Bestimmung der eNOS-Proteinexpression.....	21
3.5.1 Inkubationsprotokoll.....	21
3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	21
3.5.3 Western-Blot-Analyse.....	21
3.6 Bestimmung der Stickstoffmonoxid-Synthase-Aktivität.....	22
3.7 Material.....	24
3.8 Lösungen.....	25
3.9 Statistik.....	26

<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
4.1 Untersuchungen zur Cytoprotektion .....	27
4.1.1 Endothelprotektion durch NO-Donoren .....	27
4.1.2 Cytoprotektion durch Acetylsalicylsäure.....	28
4.1.3 Cytoprotektiver Effekt von Acetylsalicylsäure im Vergleich mit anderen Cyclooxygenase-Inhibitoren .....	31
4.1.4 Modulation der protektiven Effekte von Acetylsalicylsäure (Kristallviolett-Assay) .....	33
4.1.5 Modulation der protektiven Effekte von Acetylsalicylsäure (LDH-Freisetzung).....	37
4.1.6 Zusammenfassung.....	39
4.2 Messung von intrazellulären cGMP-Spiegeln .....	40
4.2.1 Effekt eines NO-Donors auf die cGMP-Bildung in verschiedenen kultivierten Zellen.....	40
4.2.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Bildung von cGMP .....	41
4.2.2.1 <i>Messung in LLC-PK1-Zellen .....</i>	<i>41</i>
4.2.2.2 <i>Messung in vaskulären Schweineaortenzellen.....</i>	<i>42</i>
4.2.3 cGMP-Stimulation durch Acetylsalicylsäure im Vergleich mit anderen nichtsteroidalen Antiphlogistika .....	43
4.2.4 Effekt des NO-Radikalfängers PTIO auf die cGMP-Bildung durch Acetylsalicylsäure .....	44
4.2.5 Nachweis der Beteiligung der NO-Synthase an der Acetylsalicylsäure-vermittelten cGMP-Bildung.....	45
4.2.5.1 <i>Effekt von Acetylsalicylsäure und SIN-1 auf die cGMP-Bildung in RFL-6-Zellen.....</i>	<i>45</i>
4.2.5.2 <i>Hemmung der Acetylsalicylsäure-abhängigen cGMP-Akkumulation durch NO-Synthase-Inhibitoren.....</i>	<i>46</i>
4.2.6 Intrazelluläre cGMP-Bildung durch Stimulation der löslichen Guanylylcyclase .....	47
4.2.6.1 <i>Intrazellulärer cGMP-Anstieg durch YC-1 und NO-Donoren .....</i>	<i>47</i>
4.2.6.2 <i>Stimulation der cGMP-Bildung durch YC-1 und Acetylsalicylsäure .....</i>	<i>49</i>
4.2.6.3 <i>Effekte anderer NSAIDs auf die YC-1-induzierte cGMP-Biosynthese .....</i>	<i>51</i>

---

4.2.6.4	<i>Modulation des YC-1- und Acetylsalicylsäure-Synergismus durch NO-Synthase-Inhibitoren</i> .....	51
4.2.7	Zusammenfassung.....	53
4.3	Bestimmung der NO-Synthase-Aktivität.....	54
4.3.1	Zusammenfassung.....	57
4.4	Effekt von Acetylsalicylsäure auf die eNOS-Proteinexpression .....	58
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>92</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
cGMP	Cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
COX	Cyclooxygenase
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDRF	„Endothelial-derived relaxing factor“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FBS	Fötales Rinderserum
FMN	Flavinmononukleotid
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HO-1	Hämoxygenase-1
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	„Low-density-lipoprotein“
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginin-methylester
L/D-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L/D-arginin
LPS	Lipopolysaccharid
NADPH	Nicotin-amid-dinukleotid-phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NSAID	„Nonsteroidal anti-inflammatory derivatives“
ODQ	1H-(1,2,4,-)Oxadiazol(4,3-a)quinoxalin-1-on
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PTIO	2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
PG	Prostaglandin
PGL <sub>2</sub>	Prostacyclin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumlaurylsulfat
sGC	Lösliche Guanylylcyclase
SIN-1	3-Morpholinosydnonimin / Linsidomin
SOD	Superoxiddismutase
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
YC-1	(3-(5-Hydroxymethyl-2 furyl)-1-benzylindazol

## 1 Einleitung

Atherosklerose ist die häufigste Systemerkrankung der Arterien und die Haupttodesursache in westlichen Industrieländern. Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören erhöhter Blutdruck, Diabetes, Störungen des Fettstoffwechsels, Rauchen und Übergewicht (Ross 1995). Die Pathogenese der Atherosklerose ist nicht eindeutig geklärt. Von zentraler Bedeutung sind jedoch reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS), die bei Patienten mit Risikofaktoren und klinisch manifester Atherosklerose vermehrt gebildet werden (Reilly *et al.* 1998; Kiowski 1999; Jones 2000; McNamara und FitzGerald 2001). Initial werden Endothelzellen, die die Gefäßwand auskleiden, wiederholten oder kontinuierlichen Schädigungen ausgesetzt, die ihre Homöostase- und Schutzfunktion beeinträchtigen. Dadurch können Plasmabestandteile, wie z.B. oxidierte Lipoproteine, in die Gefäßwand eindringen und inflammatorische Reaktionen auslösen, die zur Bildung atherosklerotischer Plaques führen („response to injury“-Theorie) (Ross und Glomset 1973).

### 1.1 Atherogenese

Endothelzellen bilden eine dynamische Grenzschicht zwischen Blutstrom und Gefäßwandgewebe. Sie regulieren thrombotische und fibrinolytische Prozesse sowie die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an ihrer Oberfläche (Quyyumi 1998). Zahlreiche Faktoren, wie Scherkräfte, Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, aber auch ADP und ATP, bewirken in Endothelzellen die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin. Diese beiden Vasodilatoren werden in den subendothelialen Raum und in den Blutstrom sezerniert. Sie hemmen die Kontraktion und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und die Thrombozytenaggregation. Daneben bildet das Endothel weitere antithrombotische Faktoren, die in die Gerinnungskaskade eingreifen und z.B. die Produktion von Thrombin inhibieren (Lüscher und Barton 1997).

Wird das Endothel durch akute oder chronische Verletzung in seiner Funktion gestört, fördert dies Vasokonstriktion, Thrombozytenaktivierung und Koagulation. Besonders wichtig ist hierbei die Beeinträchtigung der Produktion und Bioaktivität von NO. Dies scheint ein frühes Ereignis in der Pathogenese der Atherosklerose zu sein und tritt bereits bei Patienten auf, bevor atherosklerotische Plaques sichtbar werden (Zeiher *et al.* 1991). Neben der Reduktion der NO-Freisetzung in Endothelzellen werden auch vermehrt vasokonstriktorische Substanzen, wie Endothelin, Angiotensin II und Thromboxan gebildet. Durch Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Mediatoren erleichtern geschädigte Endothelzellen die Anlagerung und Einwanderung von Leukozyten. Dieser Prozess ist durch NO hemmbar (Böger *et al.* 1996).

Die prothrombotischen und proinflammatorischen Eigenschaften des Endothels sind wichtige Bestandteile des physiologischen Reparatursystems, das bei Verletzung der Gefäßwand zur Blutstillung führt. Ist die Regulation dieser Prozesse jedoch durch dauerhafte Schädigung des Endothels gestört, kommt es zur pathologischen Endotheldysfunktion, der Vorstufe der Atherosklerose. Zahlreiche Faktoren, wie oxidativer

Stress und Einlagerung von Lipoprotein-Partikeln in den subendothelialen Raum, können eine endotheliale Dysfunktion verursachen (Harrison 1994; Lüscher und Noll 1995; Mombouli und Vanhoutte 1999; Shimokawa 1999; Lum und Roebuck 2001).

Die eingelagerten Lipoproteine („low density lipoprotein“, LDL) werden durch Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation verändert und tragen dadurch zur Atherogenese bei. Die hierfür bedeutendste Modifikation ist die Lipidperoxidation, die aus dem Kontakt der Lipoproteine mit ROS resultiert (Mylonas und Kouretas 1999). Zunächst entstehen hierbei nur geringfügig oxidierte LDL-Spezies, die u.a. die NO-Freisetzung zusätzlich hemmen können (Vergnani *et al.* 2000). Durch weitere Reaktionen mit ROS bildet sich „hoch-oxidiertes“ LDL (oxLDL). Eingewanderte T-Lymphozyten und Monozyten sezernieren zahlreiche Mediatoren, einschließlich Wachstumsfaktoren, Cytokinen und chemotaktischen Faktoren (zur Übersicht siehe Lüscher 2000). Unter deren Einfluss werden Monozyten zu Makrophagen ausdifferenziert, die oxLDL über „scavenger-Rezeptoren“ (z.B. CD 36) aufnehmen können. Durch die verstärkte Lipidaufnahme entwickeln sie sich zu sogenannten Schaumzellen („foam cells“). Auch an diesem Prozess sind ROS beteiligt: Peroxydierte Lipide können als Liganden des nukleären Rezeptors „peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ “ (PPAR  $\gamma$ ) fungieren (Neve *et al.* 2000), der in Makrophagen die Expression des oxLDL Rezeptors, CD36, induziert und die Aufnahme von oxLDL erhöht (Nagy *et al.* 1998; Tontonoz *et al.* 1998).

Schaumzellen bilden zusammen mit glatten Muskelzellen die ersten sichtbaren Läsionen der Gefäßwand, die „fatty streaks“ (Fettstreifen). In der Folge kommt es zur Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen und zur Synthese großer Mengen extrazellulärer Matrixproteine. Daraus entstehen atherosklerotische Plaques mit sogenannten „fibrous caps“ und mit einem lipidreichen nekrotischen Inneren („necrotic core“). Die atherosklerotischen Plaques können schließlich rupturieren und intravaskuläre Thrombosen auslösen, die zu akuten Koronarsyndromen oder Schlaganfall führen (Lüscher 2000).

## 1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

ROS sind eine Gruppe von bioaktiven Molekülen, die über ein oder mehrere ungepaarte Elektronen verfügen und sich von Sauerstoff ableiten. Eine übermäßige Produktion von ROS, die die Kapazität endogener antioxidativer Mechanismen übersteigt, führt zur deletären Oxidation biologischer Moleküle, wie DNA, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide (Davies und Goldberg 1987; Ames 1989; Rice-Evans und Burdon 1993). Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet.

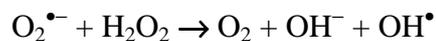
ROS sind an einer Vielzahl physiologischer, aber auch pathophysiologischer Prozesse beteiligt (Barnes 1990; Berk 1999; Babior 2000; Hensley *et al.* 2000). Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen, wie zum Beispiel Atherosklerose (Cai und Harrison 2000), Bluthochdruck (Kiowski 1999), Diabetes (Cai und Harrison 2000), Alzheimer (Pratico *et al.* 2001) und Lebererkrankungen (Meagher *et al.* 1999).

Als Quellen von ROS im Organismus kommen verschiedene Stoffwechselprozesse in Frage, beispielsweise die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (Chance *et al.* 1979;

Shigenaga *et al.* 1994), der Abbau von Xenobiotika und Autoimmunprozesse (Shackelford *et al.* 2000). Daneben entstehen ROS in der Zelle durch enzymatische Reaktionen (u.a. Xanthin-Oxidase, NADH/NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase) sowie in Peroxisomen (Uratoxidase) und Mikrosomen.

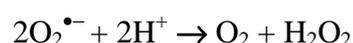
Neben pathophysiologischen Funktionen übernehmen Sauerstoffradikale im Organismus auch physiologische Aufgaben. ROS können als intrazelluläre Signalmoleküle fungieren (Dreher *et al.* 1995; Finkel 1998, 1999; Kojda und Harrison 1999; Finkel 2000), die das Zellwachstum beeinflussen (Rao und Berk 1992; Li *et al.* 1997; Berk 1999; Greene *et al.* 2000), NO abfangen (Harrison 1997; Halliwell *et al.* 1999; Patel *et al.* 2000) oder auch als immunologische Effektormoleküle direkte zelluläre Schädigungen verursachen (Halliwell und Aruoma 1991; Masutani 2000). So spielen sie eine wichtige Rolle innerhalb der unspezifischen zellulären Immunabwehr. Die hauptsächlich von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildeten aktiven Sauerstoffspezies repräsentieren einen der Hauptmechanismen zur Abwehr von eindringenden Mikroorganismen und Tumorzellen (Bellavite 1988).

Viele ROS besitzen ungepaarte Elektronen und werden dann auch als freie Radikale bezeichnet. Dazu gehören Moleküle wie das Superoxid-Anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), das Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\bullet}$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ ) und Lipid-Radikale. Andere ROS wie  $H_2O_2$ , Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) und hypochlorische Säure (HOCl) sind selbst keine freien Radikale. Das reaktivste dieser Radikale ist das Hydroxylradikal, das in biologischen Systemen im Verlauf der Haber-Weiss-Reaktion durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) mit Hilfe von Superoxid entsteht:

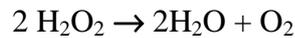


Diese Reaktion wird hauptsächlich durch zweiwertiges Eisen ( $Fe^{2+}$ ) katalysiert (Minotti und Aust 1989).  $H_2O_2$  diffundiert als apolares Molekül leicht durch die Zellmembran und kann dadurch nicht nur am Entstehungsort wirken, sondern auch Makromoleküle in benachbarten Zellen schädigen, z. B. durch Oxidation von SH-Gruppen. Dagegen kann das hochreaktive Hydroxyl-Radikal die Cytoplasmamembran nicht passieren. Dies bedeutet, dass die meisten seiner Effekte entweder durch intrazelluläre  $OH^{\bullet}$ -Produktion oder Oxidation von Membrankomponenten bedingt sind (Dreher *et al.* 1995).

Obwohl das Superoxidradikal  $O_2^{\bullet-}$  ein polares Molekül ist, kann es Zellmembranen passieren (Gomes *et al.* 1993) und so auch von außen in die Zellen gelangen. Es wird in nahezu allen aeroben Zellen nicht nur innerhalb der mitochondrialen Atmungskette, sondern auch durch Enzyme wie Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen gebildet. Das Radikal ist selbst nur wenig reaktiv und agiert hauptsächlich als Reduktionsmittel (Dreher *et al.* 1995). In wässriger Lösung und bei physiologischem pH-Wert unterliegt das Superoxidradikal einer spontanen Dismutation zu  $H_2O_2$  und molekularem Sauerstoff (Fridovich 1983):



Durch die Katalyse des Enzyms Superoxiddismutase (SOD) kann diese Reaktion erheblich beschleunigt werden. Neben der SOD gibt es in den Zellen mehrere Systeme, die die Schädigung zellulärer Komponenten durch ROS verhindern, indem sie die Radikale direkt abfangen (sogenannte „Scavenger“-Enzyme). Dazu gehört auch die an den Peroxisomen lokalisierte Katalase, die die Dismutationsreaktion von überschüssigem  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und molekularem Sauerstoff katalysiert (del Rio *et al.* 1992):



Eine Besonderheit der Reaktionen von freien Radikalen mit anderen Molekülen ist die Bildung von neuen Radikalen. So kann eine Vielzahl neuer aktiver Reaktionsprodukte mit ungepaarten Elektronen an Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel entstehen. Diese Kettenreaktion kommt erst zum Erliegen, wenn zwei Radikale miteinander reagieren (Babior 2000).

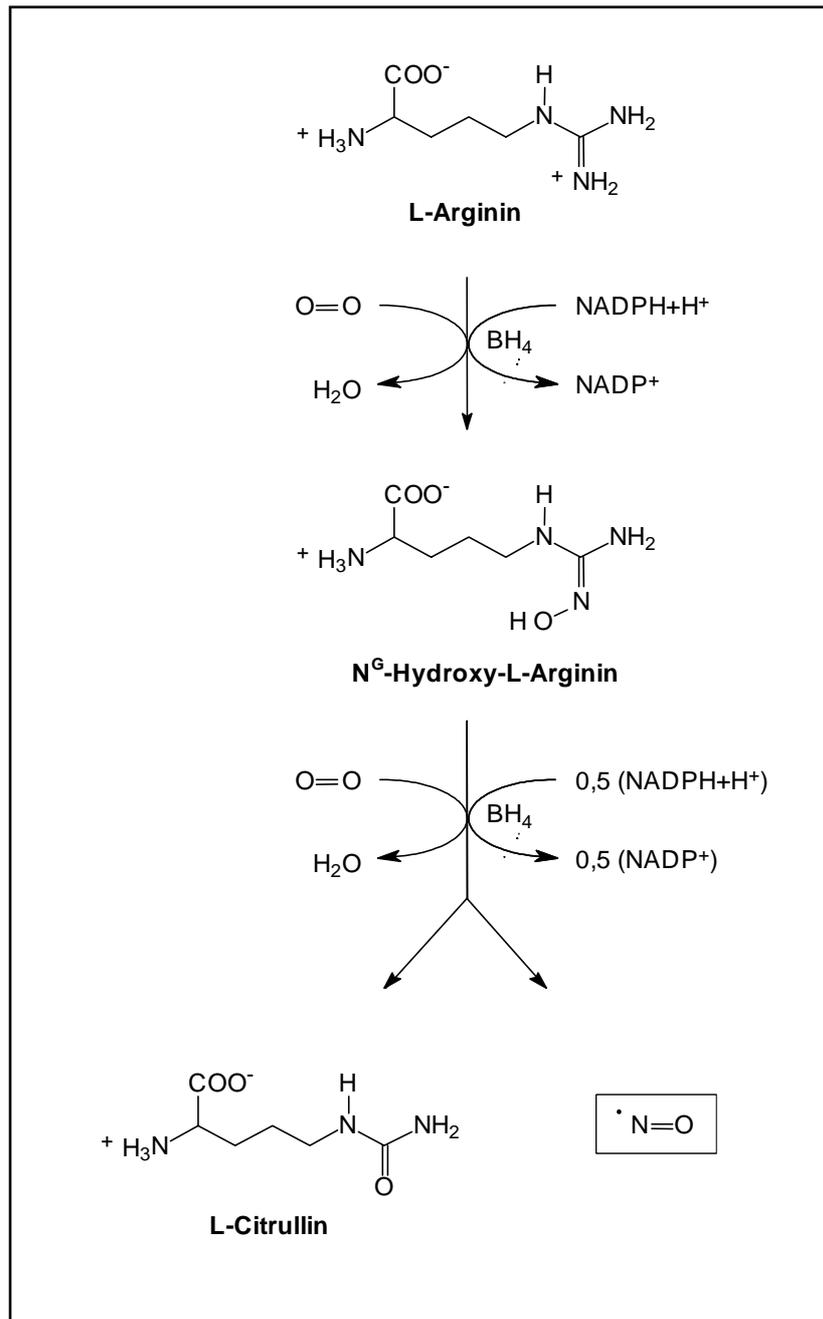
Bei Reaktionen von Radikalen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren können Lipidperoxide wie die Isoprostane entstehen, die im Rahmen cytotoxischer und atherogener (Awad *et al.* 1996) Prozesse eine Rolle spielen könnten. Isoprostane sind Prostaglandin-Isomere, die nicht enzymatisch, sondern durch Peroxidation von Arachidonsäure gebildet werden (Morrow *et al.* 1992). Isoprostane eignen sich auf Grund ihrer hohen chemischen Stabilität als sensitive, nicht invasive Marker zur Messung von oxidativem Stress (Lawson *et al.* 1999). Neben Lipiden werden durch Radikale auch weitere zelluläre Komponenten wie Proteine und Nukleinsäuren geschädigt, wodurch eine Dysfunktion oder sogar das Absterben der Zelle ausgelöst werden kann (Herbst *et al.* 1999).

### 1.3 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist ein zentrales Signalmolekül in Endothelzellen, das bei gestörter Endothelfunktion vermindert gebildet wird. Es ist ein lipophiles Radikal mit einer Halbwertszeit von ca. 4 Sekunden, das in wässrigem Milieu Membranen durch Diffusion weitgehend frei passieren kann. NO besitzt als Radikal die Fähigkeit, sich an Proteine anzulagern und mit ihnen eine chemische Reaktion einzugehen, wodurch viele physiologische und pathologische Prozesse reguliert werden können (Wink *et al.* 1996).

Furchgott und Zawadzki wiesen 1980 erstmals nach, dass Endothelzellen in den Gefäßen eine wesentliche Rolle bei der Gefäßerweiterung spielen (Furchgott und Zawadzki 1980). Nur bei intakten Endothelzellen konnte eine Dilatation der isolierten Gefäße durch Acetylcholin oder Bradykinin gezeigt werden. In darauffolgenden Arbeiten wurde eine vom Endothel kontinuierlich freigesetzte gefäßerweiternde Substanz entdeckt, der man die Bezeichnung „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) gab (Ignarro *et al.* 1987). Sie wird durch die Stimulation vasoaktiver Mediatoren von Endothelzellen gebildet und bewirkt eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur sowie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion. Weitere Untersuchungen zeigten, dass EDRF mit NO identisch ist (Ignarro *et al.* 1987; Palmer *et al.* 1987). NO entsteht

substratspezifisch aus der Aminosäure L-Arginin durch enzymatische Umwandlung der terminalen Guanidingruppe mit Hilfe des Enzyms NO-Synthase (Palmer und Moncada 1989; Förstermann *et al.* 1993; Förstermann 1994) (Abbildung 1). In einem ersten Oxidationsschritt wird aus Arginin und molekularem Sauerstoff zunächst das Zwischenprodukt L-Hydroxyarginin gebildet, das dann in einem zweiten Oxidationsschritt wieder unter Verbrauch von Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umgewandelt wird. Wichtige Kofaktoren beider Reaktionsschritte sind Tetrahydrobiopterin und NADPH (Marletta 1994; Andrew und Mayer 1999).



**Abb. 1:** Reaktionsweg des L-Arginin-NO-Stoffwechsels

### 1.3.1 NO-Synthase

Katalysatoren der zellulären NO-Produktion sind die NO-Synthasen. Die Familie der NO-Synthasen setzt sich aus drei verschiedenen Isoformen zusammen (Tabelle 1), der neuronalen NO-Synthase (nNOS, NOS I), der induzierbaren NO-Synthase (iNOS, NOS II) und der endothelialen NO-Synthase (eNOS, NOS III) (Bredt und Snyder 1990).

	<i>nNOS (NOS I)</i>	<i>iNOS (NOS II)</i>	<i>eNOS (NOS III)</i>
<b>Subfamilie</b>	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
<b>Genlokus</b>	Chromosom 12 (12q24.1-12q24.3)	Chromosom 17 (17p11-17q11)	Chromosom 7 (7q35-7q36)
<b>Molekulargewicht</b>	160 kD	130 kD	135 kD
<b>Vorkommen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuronen</li> <li>• Epithelzellen</li> <li>• Mesangialzellen</li> <li>• Skelettmuskelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Makrophagen</li> <li>• Endothelzellen</li> <li>• Mesangialzellen</li> <li>• glatte Muskelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endothelzellen</li> <li>• glatte Muskelzellen</li> <li>• Epithelzellen</li> <li>• etc.</li> </ul>
<b>Enzymlokalisation</b>	cytosolisch	cytosolisch	membrangebunden / cytosolisch
<b>Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin- Abhängigkeit</b>	Ja	Nein	Ja
<b>Stimulatoren</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L-Glutamat</li> <li>• Lithium</li> <li>• etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1<math>\beta</math></li> <li>• IFN-<math>\gamma</math></li> <li>• TNF-<math>\alpha</math>, -<math>\beta</math></li> <li>• LPS</li> <li>• etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetylcholin</li> <li>• Bradykinin</li> <li>• Ionomycin</li> <li>• „shear stress“</li> <li>• etc.</li> </ul>
<b>NO-Produktion</b>	pmol (sec)	nmol (h bis d)	pmol (sec)
<b>Biologische Wirkung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurotransmission</li> <li>• penile Erektion</li> <li>• etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cytotoxizität</li> <li>• DNA-Schädigung</li> <li>• Enzymnitrosylierung</li> <li>• etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatation</li> <li>• Thrombozytenaggregationshemmung</li> <li>• Proliferationshemmung glatter Muskelzellen</li> <li>• etc.</li> </ul>

**Tabelle 1:** Charakterisierung der NO-Synthasen

Während die neuronale und die endotheliale NO-Synthase als konstitutiv exprimierte Enzyme beschrieben sind, wird die iNOS durch inflammatorische Prozesse im Rahmen der Zellimmunität induziert. Die Umsatzrate  $V_{\max}$  der konstitutiven NO-Synthasen ist um ein Vielfaches geringer als die der iNOS, die eine „high-output“-Kinetik aufweist (Nathan und Hibbs 1991). Die iNOS kann durch proinflammatorische Stimulantien in Endothelzellen,

Makrophagen oder Mesangialzellen exprimiert werden (Kanno *et al.* 1994). Die Aktivität der iNOS ist Calcium-unabhängig und bleibt über Tage konstant (Nathan und Hibbs 1991; Nathan und Xie 1994). Die dabei erreichte intrazelluläre NO-Konzentration ist cytotoxisch (Liew und Cox 1991).

Die Aktivität der eNOS und nNOS sind durch den intrazellulären Calciumspiegel kontrolliert. Intrazelluläres Calcium steuert die Bindung des Calcium/Calmodulin-Komplexes an die konstitutiven NO-Synthasen und bewirkt eine Konformationsänderung, die das Enzym in seine aktive Form überführt (Schmidt *et al.* 1992; Förstermann, Closs *et al.* 1994; Förstermann *et al.* 1995). Der Effekt ist transient (Minuten) und durch eine „Low-output“-Kinetik charakterisiert.

Alle Isoformen der NO-Synthasen haben eine gemeinsame Grundstruktur: eine Oxygenase-Domäne, bestehend aus Häm-, L-Arginin- und Tetrahydrobiopterin-Domänen, und eine Reduktase-Domäne aus FMN-, FAD- und NADPH-Domänen, verbunden durch eine Calcium/Calmodulin-Bindungsdomäne. Alle Isoenzyme formen Homodimere und bilden mit den Coenzymen Tetrahydrobiopterin, NADPH, FMN und FAD sowie mit Häm einen katalytisch aktiven Komplex (Stuehr *et al.* 1991).

Die eNOS ist im unphosphorylierten Zustand membrangebunden in den sogenannten Caveolen lokalisiert, die eine wichtige regulatorische Funktion haben (Feron *et al.* 1996). Agonist-stimulierte Phosphorylierung kann eine Translokation in das Cytoplasma hervorrufen (Michel *et al.* 1993). Obwohl die eNOS konstitutiv exprimiert wird, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass sie nicht nur auf Proteinebene, sondern auch transkriptionell reguliert wird. Erhöhte Scherkräfte („shear stress“) des Blutes induzieren die eNOS-Expression (Sessa 1994). Ebenso beeinflusst die Zelldichte die Induktion der eNOS: Konfluente, ruhende Endothelzellen exprimieren geringere Mengen eNOS-mRNA als proliferierende, subkonfluente Endothelzellen (Arnal *et al.* 1994). OxLDL, TNF- $\alpha$  und Hypoxie dagegen vermindern die Menge der eNOS-Transkripte (Förstermann *et al.* 1998).

### 1.3.2 Effekte von Stickstoffmonoxid und cGMP

Neben der endogen gesteuerten, enzymatischen Bildung aus L-Arginin kann NO in biologischen Systemen auch aus exogen zugeführten, chemisch definierten Agenzien freigesetzt werden. Diese Verbindungen enthalten NO präformiert und haben als sogenannte NO-Donoren bei der Therapie der koronaren Herzkrankheit Anwendung gefunden. NO-Donoren werden aufgrund ihrer chemischen Struktur und der Freisetzungskinetik von NO in zwei Klassen eingeteilt: die organischen Nitrate und die spontan NO-freisetzenden NO-Donoren. Salpetersäureester, wie Glyceryltrinitrat, werden über reduktive enzymatische Prozesse (z. B. Cytochrom P-450) zu NO und anderen Metaboliten umgesetzt (Schröder und Schrör 1990; Bennett *et al.* 1992; Minamiyama *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu kommt es bei spontanen NO-Donoren bereits in wässrigem Milieu und ohne Beteiligung von Enzymen zur Abspaltung von NO. In diese strukturell sehr heterogene Gruppe gehören NO-Donoren, wie SNAP, SperminNONOat und SIN-1 (aktiver Metabolit des Koronartherapeutikums Molsidomin) (zu Übersicht siehe Feelisch und Stamler 1996). In der Literatur wird nach wie vor

kontrovers diskutiert, ob SIN-1 als NO-Donor angesehen werden kann. Es ist bekannt, dass SIN-1 Superoxid und NO generiert, die miteinander zu Peroxynitrit reagieren (Feelisch und Stamler 1996). SIN-1 wird daher oft als Peroxynitrit-Donor charakterisiert. Als Donor von Superoxid oder Peroxynitrit fungiert SIN-1 allerdings ausschließlich in rein wässrigen Puffersystemen und in Abwesenheit von biologischem Material. In Anwesenheit von weiteren Elektronenakzeptoren außer Sauerstoff, z.B. in Zellkulturen oder anderen biologischen Systemen, wirkt SIN-1 überwiegend als Donor von NO (Beckman und Koppenol 1996; Singh *et al.* 1999).

Die meisten physiologischen Effekte von NO werden durch das cyclische Nukleotid cGMP vermittelt (Waldman und Murad 1987; Dierks und Burstyn 1996). NO aktiviert die lösliche Guanylylcyclase („soluble guanylyl cyclase“, sGC). Dieses Enzym gehört zusammen mit der membranständigen Guanylylcyclase und der Adenylylcyclase zu der Familie der Nukleotid-Cyclasen. Die sGC besteht als Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, und enthält Häm als prosthetische Gruppe. Physiologische Aktivatoren der sGC sind NO und Kohlenmonoxid (CO) (Furchgott und Jothianandan 1991). Außerdem wurde 1994 eine neue Klasse von exogenen Stimulatoren der sGC entdeckt (Ko *et al.* 1994; Wu *et al.* 1995) und, ein direkter, NO-unabhängiger Aktivator der sGC, YC-1 ((3-(5-Hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzylindazol), entwickelt (Stasch *et al.* 2001). NO wirkt direkt auf die prosthetische Hämgruppe der sGC und bindet an das zentralständige Eisen-Atom der Häm-Domäne des Protoporphyrins. Daraus resultiert eine Konformationsänderung; das Enzym wird aktiviert und katalysiert die Bildung von cGMP aus GTP unter Abspaltung von Pyrophosphat (Stone und Marletta 1995). Das entstandene cGMP hat die Funktion eines „second messenger“ und reguliert als solcher cGMP-abhängige Proteinkinase, Ionenkanäle und Phosphodiesterasen (Lincoln 1989). Auf diese Weise werden die Proteinphosphorylierung, der Calciumeinstrom durch die Plasmamembran und der Katabolismus cyclischer Nukleotide beeinflusst (Cornwell und Lincoln 1989). Diese biochemischen Abläufe sind von Bedeutung für die Regulation des Gefäßtonus, sowie der Plättchenfunktion, Neurotransmission und Immunabwehr (Lincoln *et al.* 1988; Liew und Cox 1991; Lowenstein *et al.* 1994).

### 1.3.3 Antioxidative und zellprotektive Effekte von Stickstoffmonoxid

Die Rolle von NO bei der Vermittlung cytoprotektiver Effekte wurde lange Zeit kontrovers diskutiert (Wink *et al.* 1996). Es konnte zunächst nur gezeigt werden, dass NO in verschiedenen Zelltypen cytotoxische, pro-apoptotische Eigenschaften besitzt. Im Gegensatz dazu zeigen neuere Studien, dass NO neben seiner vasodilatierenden oder antithrombotischen Funktion im Gefäßsystem auch cytoprotektiv und antioxidativ wirken kann (Wink *et al.* 1993; Wink *et al.* 1996; Oberle und Schröder 1997; Polte *et al.* 1997a). Darüber hinaus erwies sich NO als Hemmstoff des programmierten Zelltodes. Es wurde unter anderem eine Hemmung der proapoptotischen Caspasen und eine Induktion des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins beschrieben (Genaro *et al.* 1995; Kim *et al.* 1998; Rossig *et al.* 1999; Suschek *et al.* 1999).

Die Diskrepanz dieser Befunde lässt sich durch konzentrationsabhängige Effekte von NO erklären: In hohen Konzentrationen, wie sie von der iNOS gebildet werden können, ist NO cytotoxisch, während geringe Mengen von NO vorwiegend protektive Effekte ausüben (Bruckdorfer *et al.* 1990; Nathan 1992; Dawson 1995; Dimmeler und Zeiher 1997; Kim *et al.* 1997). Die molekularen Vorgänge, die dieser Schutzfunktion in der Gefäßwand zugrunde liegen, sind erst teilweise aufgedeckt worden. Neben einer direkten Inaktivierung von ROS (Wink *et al.* 1993) konnte auch die Aktivierung zellulärer, antioxidativer Mechanismen, wie die Induktion cytoprotektiver Gene, gezeigt werden (Pilz *et al.* 1995; Oberle und Schröder 1997; Polte *et al.* 2000).

#### 1.4 Acetylsalicylsäure

Im Jahr 1897 stellte Felix Hoffmann durch Acetylierung von Salicylsäure erstmals Acetylsalicylsäure in chemisch reiner Form her. Bald darauf wurden ihre analgetischen, antipyretischen und antiinflammatorischen Eigenschaften entdeckt (Dreser 1899). In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde eine weitere interessante Wirkqualität der Acetylsalicylsäure beobachtet: Eine Hemmung der Thrombozytenaggregation, die heute Anwendung bei der Prophylaxe des Myokardinfarktes, Schlaganfalls und anderer Formen von Gefäßerkrankungen thromboembolischen Ursprungs findet (Craven 1950).

Es dauerte noch 20 Jahre bis der Wirkmechanismus der Acetylsalicylsäure (ASS) und anderer nichtsteroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) aufgeklärt werden konnte. Unter Verwendung einer ungereinigten Präparation der Prostaglandinsynthase (Cyclooxygenase) konnte die Forschergruppe um John Vane 1971 eine dosisabhängige Hemmung der Prostaglandin (PG)-Bildung mit ASS beobachten (Vane 1971).

Die Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure verläuft unter Katalyse der Prostaglandin G/H Synthase (= Cyclooxygenase) in zwei Schritten, einer Cyclooxygenase- und einer Peroxidasereaktion. Zunächst erfolgt die Bildung des instabilen Prostaglandin-Hydroendoperoxids PGG<sub>2</sub>. Dies wird zu dem instabilen PGH<sub>2</sub> reduziert, aus dem unter Katalyse gewebespezifischer Isomerasen Prostaglandine (PG), wie Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), entstehen (Schrör 1992). Zwei Isoformen, COX-1 und COX-2, für die unterschiedliche Gene codieren, wurden isoliert (Hla 1996; Smith *et al.* 1996; Vane *et al.* 1998). Nach der Entdeckung der zweiten COX-Isoform vor etwa 10 Jahren wurde zunächst eine eindeutige funktionelle Abgrenzung zwischen beiden Isoformen postuliert. Der COX-1 wurden vorwiegend homöostatische Funktionen zugeschrieben, wie die Hemmung der Thrombozytenaktivierung und Schutz des gastrointestinalen Epithels. Die induzierbare COX-2 wurde zunächst nur in inflammatorisch veränderten Geweben nachgewiesen. Auf der Basis dieser Befunde wurden die selektiven COX-2-Inhibitoren entwickelt, von denen man sich eine verstärkte antientzündliche Wirkung ohne die Nebenwirkungen der nichtselektiven NSAIDs versprach. Dieses Konzept beruhte auf der Annahme, dass die gastralen, renalen und kardiovaskulären Nebenwirkungen der nichtselektiven NSAIDs ausschließlich durch eine Hemmung der COX-1 verursacht wurden. Neuere Arbeiten haben die Hypothese der „physiologischen und pathophysiologischen Arbeitsteilung“ zwischen COX-1 und COX-2 jedoch widerlegt und

zahlreiche funktionelle Überschneidungen der beiden Isoformen demonstriert (Lipsky 1999). So ist nicht nur die COX-2 induzierbar, sondern auch die Expression von COX-1 kann in inflammatorischen Prozessen erhöht sein (Crofford *et al.* 1994). Umgekehrt wird die COX-2 in vielen gesunden Geweben konstitutiv exprimiert, wie z.B. in Hirn, Nieren, Schilddrüse und Magenschleimhaut und hat dort physiologische Funktionen (Zimmermann *et al.* 1998; Meyer-Kirchrath und Schror 2000; Hinz und Brune 2002;). Ein überraschendes Ergebnis dieser Studien war, dass selektive COX-2-Inhibitoren die systemische Prostacyclin-Bildung um etwa 70% supprimieren. (McAdam *et al.* 1999). Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) wird vorwiegend im makrovaskulären Endothel synthetisiert und ist ein funktioneller Antagonist von TXA<sub>2</sub> *in vivo* (Cheng *et al.* 2002). Das in Thrombozyten gebildete TXA<sub>2</sub> stimuliert die Plättchenaggregation und wirkt vasokonstriktiv, während endotheliales PGI<sub>2</sub> plättchenhemmende und vasodilatierende Wirkungen hat. Es wird deshalb befürchtet, dass selektive COX-2-Inhibition in Patienten mit vermehrter Plättchenaktivierung, z.B. bei Atherosklerose oder Diabetes, wegen der verminderten Prostacyclinbildung zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko führt (Mukherjee *et al.* 2001). Tatsächlich war die Herzinfarkttrate in der VIGOR-Studie bei Patienten, die mit der COX-2-selektiven Substanz Rofecoxib behandelt wurden, fünffach höher als in der Kontrollgruppe, die mit einem klassischen, nichtselektiven COX-Inhibitor, Naproxen, behandelt wurde (Bombardier *et al.* 2000). Ob dieser Befund negative Effekte des COX-2-Hemmers im Herz-Kreislauf-System oder eine kardiovaskuläre Protektion der Vergleichssubstanz Naproxen widerspiegelt, muss in weiteren Studien geklärt werden. Sollte sich eine nachteilige Beeinflussung der Plättchen- bzw. Gefäßfunktion durch COX-2-Hemmer bestätigen, wäre der Einsatz dieser Arzneistoffe bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko oder bestehender endothelialer Dysfunktion sehr problematisch.

ASS ist ein nicht selektiver Inhibitor beider COX Isoformen. Durch eine irreversible Acetylierung der COX hemmt ASS schon in geringen Konzentrationen die TXA<sub>2</sub>-Bildung (Roth und Majerus 1975). Da die kernlosen Thrombozyten über einen limitierten Proteinsyntheseapparat verfügen, kann COX nur begrenzt nachsynthetisiert werden. Eine effektive TXA<sub>2</sub>-Synthese ist somit erst durch eine erneuerte Thrombozytenpopulation nach etwa 7-10 Tagen möglich. Obwohl durch ASS auch die Prostacyclinsynthese gehemmt wird, ist dadurch der antithrombotische Effekt der Substanz nicht stark beeinflusst. Prostacyclin kann in den kernhaltigen Endothelzellen innerhalb von kurzer Zeit nachsynthetisiert werden und steht somit dem System wieder zur Verfügung. Daher kommt es durch die Therapie mit niedrigen ASS-Tagesdosen (75-300 mg) vorrangig zur Hemmung der Thrombozytenaggregation (Reilly und FitzGerald 1988).

Neuere Studien haben gezeigt, dass ASS neben seinen antiaggregatorischen auch vasoprotektive Eigenschaften besitzt. So gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass ASS *in vitro* und *in vivo* proatherogene Modifikationen von LDL und Fibrinogen verhindern kann (Steer *et al.* 1997; Upchurch *et al.* 1998). ASS wirkt darüber hinaus antioxidativ und endothelprotektiv (Shacter *et al.* 1991; Podhaisky *et al.* 1997; Saini *et al.* 1998; Wahn und Hammerschmidt 2001). In einer klinischen Studie wurde bei 14 Atherosklerose-Patienten der Blutfluss in der Oberschenkelarterie gemessen. ASS verbesserte bei diesen Patienten

im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation, die als Maß für die Funktion des Endothels gilt (Husain *et al.* 1998). Ähnliche Befunde wurden bei Patienten mit Hypertonie erhoben (Monobe *et al.* 2001). Interessanterweise gibt es nur wenige Informationen aus prospektiven kontrollierten klinischen Studien über die potenzielle antiatherogene Wirkung von ASS. Bei einer kleinen Gruppe von Patienten konnte gezeigt werden, dass ASS in einer Dosierung von 900 mg/Tag die Progression atherosklerotischer Veränderungen in den Carotiden verlangsamt (Ranke *et al.* 1993).

## 2 Problemstellung

Schädigungen des Endothels werden für Entstehung und Progression atherosklerotischer Prozesse verantwortlich gemacht. Endothelprotektive Pharmaka erscheinen deshalb als ein vielversprechender präventiver und therapeutischer Ansatz.

Klinische Studien weisen darauf hin, dass ASS die Endothelfunktion bei kardiovaskulär erkrankten Patienten verbessern und die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen verzögern kann (Ranke *et al.* 1993; Husain *et al.* 1998; Noon *et al.* 1998; Monobe *et al.* 2001).

Auch in verschiedenen atherosklerotischen Tiermodellen verminderte ASS im Vergleich zu Placebo die durch Cholesterol-reiche Diät oder Verletzung des Gefäßes induzierte Atherogenese (Pick *et al.* 1979; Kim *et al.* 1983; Schaub *et al.* 1983; Volker und Faber 1990; Paul *et al.* 2000).

Die zugrunde liegenden molekularen Effekte sind nicht geklärt. Einige Untersuchungen weisen auf einen antioxidativen Effekt von ASS hin. ASS reduziert die Bildung von ROS in Makrophagen (Saini *et al.* 1998) und vermindert Gefäßschäden durch aktivierte Neutrophile und ROS (Wahn und Hammerschmidt 1998). Ein potenzieller Mechanismus ist die Induktion zellprotektiver Proteine. Aus der Vielzahl antioxidativ wirkender Peptide oder Enzyme kämen vor allem die Stressproteine Ferritin und Hämoxigenase-1 (HO-1) als Mediatoren in Frage, da ihre Expression in Endothelzellen durch ASS gesteigert wird (Oberle *et al.* 1998; Abate *et al.* 2001). Interessanterweise sind Ferritin und HO-1 auch durch NO induzierbar (Oberle und Schröder 1997; Polte *et al.* 2000). Diese Befunde lassen eine signaltransduzierende Funktion von NO bei der Vermittlung endothelprotektiver ASS-Effekte möglich erscheinen.

Da kultivierte Endothelzellen ein sehr gut charakterisiertes Modellsystem zur Untersuchung antioxidativer und zellprotektiver Effekte sind (Podhaisky *et al.* 1997), sollte in diesem System die Bedeutung von NO als Mediator cytoprotektiver ASS-Effekte untersucht werden.

Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

### 1. Ist die cytoprotektive Wirkung von Acetylsalicylsäure Stickstoffmonoxid-vermittelt?

In früheren Untersuchungen wurden protektive Effekte von ASS gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induziertem oxidativem Stress in Endothelzellen der Rinderpulmonalarterie beobachtet (Podhaisky *et al.* 1997). Mit Hilfe von Inhibitoren des NO-Signalweges sollte eine mögliche Beteiligung von NO an der ASS-abhängigen Cytoprotektion aufgedeckt werden. Darüber hinaus sollte der Frage nachgegangen werden, ob ASS zu einer Steigerung der enzymatischen Aktivität und Proteinexpression endothelialer NO-Synthasen führt.

**2. Ist die cytoprotektive Wirkung von Acetylsalicylsäure cGMP-vermittelt?**

In vielen Fällen sind NO-Wirkungen cGMP-vermittelt. Sie können aber auch unabhängig von der Aktivierung der sGC sein (Beckman *et al.* 1990; Lancaster und Hibbs 1990; Wink *et al.* 1991). Deshalb sollte die Bedeutung von cGMP für die ASS-vermittelte Cytoprotektion unter Verwendung von membrangängigen cGMP-Analoga und dem direkten sGC-Aktivator YC-1 (Koesling 1999) sowie durch Messung der intrazellulären cGMP-Akkumulation untersucht werden.

**3. Ist die cytoprotektive Wirkung ein Klasseneffekt der nichtsteriodalen Antiphlogistika oder ist sie spezifisch für Acetylsalicylsäure?**

Die cytoprotektiven und cGMP-stimulierenden Effekte von ASS sollten im Vergleich zu anderen, strukturell unterschiedlichen Inhibitoren der Cyclooxygenasen (z.B. Indometacin und Diclofenac) charakterisiert werden. Diese Untersuchungen sollten auch Aufschluss darüber geben, ob die beobachtete Endothelprotektion auf eine Hemmung der Cyclooxygenasen und der endothelialen Prostaglandinsynthese zurückzuführen ist.

### 3 Methoden und Material

#### 3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Zelllinien verwendet: immortalisierte Endothelzellen aus Rinderpulmonalarterien (CPAE, „cow pulmonary artery cells“) und aus humanen Nabelschnurvenen (EA.hy 926), primäre Endothelzellen aus der Schweineaorta (PAE, „porcine aortic endothelial cells“), tubuläre Epithelzellen aus der Schweineniere (LLC-PK1) und Rattenlungen-Fibroblasten (RFL-6, „rat lung fibroblast“).

Die Zellen wurden in verschiedenen Zellkulturmedien unter Zusatz von fetalem Rinderserum (FBS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte in einem Inkubator kultiviert (s. Tabelle 2). Die Medien wurden zweimal wöchentlich gewechselt.

Zelllinie	Zellkulturmedium	FBS (%)	Passage
CPAE	MEM	20 %	2-6
EA.hy 926	DMEM	10 %	61-67
PAE	DMEM	15 %	2-4
LLC-PK1	Ham's F12 + 20% DMEM	15 %	201-208
RFL-6	Ham's F12 Kaighn's Modification	10 %	2-6

**Tabelle 2:** Kulturmedien und Passagen der verwendeten Zelllinien

#### 3.2 Isolierung vaskulärer Endothelzellen aus Schweineaorten

Die Isolierung der vaskulären Endothelzellen erfolgte nach der Methode von Gryglewski und Mitarbeitern (1986). Unter sterilen Bedingungen wurden thorakale Aorten frisch geschlachteter Schweine von dem umliegenden Bindegewebe befreit, die Interkostalgefäße ligiert und am unteren Ende der Aorta mit Hilfe einer Arterienklemme verschlossen. Nach dreifachem Spülen des Inneren der Aorta mit PBS und Überprüfung der Dichtigkeit der Ligationen wurde die Aorta mit 70%igem Ethanol von außen abgespült. Zur Isolierung der Endothelzellen wurde Kollagenase (1 mg/ml PBS) in die Aorta gefüllt und das Gefäß auch am oberen Ende verschlossen. Es folgte eine Inkubation der Kollagenase für 20 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die Lösung mit den darin befindlichen abgelösten Endothelzellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Durch den Zusatz des gleichen Volumens Medium (DMEM, 15% fetales Kälberserum, 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) wurde die Kollagenase inaktiviert und dann für 10 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden die Endothelzellen in 12 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) überführt.

### 3.3 Viabilitätsassays

#### 3.3.1 Kristallviolettassay

Zur Bestimmung der cytotoxischen Sensitivität der Zellen und der Wirkung von potenziell protektiven Substanzen wurde ein Viabilitätstest durchgeführt. Dieser Test ist ein spektralphotometrisches Verfahren, das auf der Anfärbbarkeit von Zellen mit dem Farbstoff Gentianaviolett (Kristallviolett) beruht (Flick und Gifford 1984; Wink *et al.* 1996; Oberle und Schröder 1997; Oberle *et al.* 1998). Die Experimente zur Zellviabilität wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit der bovinen Endothelzelllinie CPAE durchgeführt.

Konfluente Endothelzellen wurden trypsinisiert (0,05% Trypsin / 0,02% EDTA), passagiert und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen („well“) subkultiviert ( $2 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  serumhaltigem Medium je well). Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen bis zur Konfluenz erfolgte die Zugabe der potenziell protektiven Substanzen. Diese Vorinkubation wurde, wenn nicht anders erwähnt, für 12 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  in das Inkubationsmedium gegeben und für weitere 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität. Der Zellüberstand mit den toten Zellen wurde entfernt, und die am Boden haftenden, noch lebenden Zellen wurden mit 100  $\mu\text{l}$  absolutem Methanol für 10 Minuten denaturiert und fixiert. Nach mehrmaligem Waschen unter fließendem Leitungswasser wurden die Zellen für 10 Minuten mit 100  $\mu\text{l}$  einer 0,1%igen Gentianaviolettlösung gefärbt. Es folgten erneut mehrere Waschschritte und schließlich das Lösen des von den Zellen aufgenommenen Farbstoffs mit ethanolischer Natriumcitratlösung (0,1 M). Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplattenphotometers (Biotek EL 311s) vermessen. Die Extinktion kann hierbei als direktes Maß für die Anzahl lebensfähiger Zellen angesehen werden.

#### 3.3.2 LDH-Assay

Die Zerstörung der Cytoplasmamembran der Zellen ist ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose. Sie führt zu einer Freisetzung von cytoplasmatischen Bestandteilen, wie z.B. Enzymen in das Zellkulturmedium, von denen die meisten schnell abgebaut werden. Eine Ausnahme bildet die Lactatdehydrogenase (LDH), die auch außerhalb der Zelle sehr stabil ist. Im LDH-Assay wird die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag des gelösten Salzes, der photometrisch quantifiziert werden kann (Parks *et al.* 1979; Szekeres *et al.* 1981; Murphy *et al.* 1993).

Der LDH-Assay wurde zusätzlich zu dem unter 3.3.1 beschriebenen Viabilitätsassay durchgeführt. Subkultivierung und Inkubation der Testsubstanzen erfolgte nach dem gleichen Protokoll. Nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde ein Teil des Zellüberstandes abgenommen und in eine 96-well-Platte überführt. Es folgte eine Inkubation mit Natriumlactat,  $\text{NAD}^+$ , Jodtetrazolchlorid und Diaphorase. Die aus den Zellen freigesetzte LDH setzt Natriumlactat mit  $\text{NAD}^+$  als Coenzym zu Pyruvat um. Dabei

entsteht  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , wobei die Wasserstoffatome von der Diaphorase zur Reduktion des Jodtetrazolchlorids eingesetzt werden. Die Extinktion des Formazansalzes wird bei 490 nm gemessen. Dabei ist die Intensität der Rotfärbung proportional zu der Zahl der lysierten Zellen (Szekeres *et al.* 1981).

### 3.4 Bestimmung von cGMP

Die Bestimmung des cGMP erfolgte bei den Versuchen mit ASS wegen der höheren Sensitivität mit einem Enzymimmunoassay(EIA)-Kit (Pradelles *et al.* 1989; Polte und Schröder 1998) und bei den Untersuchungen zu NO-Donoren mit einem Radioimmunoassay (Steiner *et al.* 1972; Schröder *et al.* 1985).

Für die Versuche wurden, soweit nicht anders vermerkt, Nierenepithelzellen (LLC-PK1) verwendet. Die Zellen wurden in 35-mm Kulturschalen in der Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen/well eingesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz (48 Stunden) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 24 Stunden serumfreies Kulturmedium zugesetzt. Vor Versuchsbeginn wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen.

Zunächst wurden die Zellen für 10 Minuten mit dem unselektiven Phosphodiesterasehemmer Isobutylmethylxanthin (0,5 mM in serumfreiem Medium; IBMX) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen für 10 Minuten. Bei Experimenten mit Inhibitoren wurden diese 10 Minuten vorher zugesetzt. Das Endvolumen betrug 1 ml. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und zum Abstoppen der Reaktion 0,7 ml Ethanol zu den Zellen gegeben (Friedl *et al.* 1985). Dieser wurde bei 60°C im Trockenschrank abgedampft und dann 0,5 ml destilliertes Wasser zugesetzt. Die Zellen wurden kurzzeitig bei -80°C eingefroren, um die Zellmembran durch Einfrieren und Wiederauftauen aufzubrechen und so eine vollständige Freisetzung von cyclischem GMP zu erreichen. Nach dem Auftauen und anschließendem Zentrifugieren wurde der Überstand aliquotiert (Schröder und Schröder 1993; Hinz und Schröder 1998).

#### 3.4.1 Radioimmunoassay

Das Messprinzip beruht auf einer Kompetition zwischen radioaktiv markiertem cGMP und cGMP aus dem Zelllysate um die Bindung an einen Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität zu cGMP. Als Tracer wurde [ $^3\text{H}$ ]cGMP, gelöst in Tris/EDTA-Puffer, verwendet. Das Probenmaterial wurde zusammen mit dem Antikörper und der [ $^3\text{H}$ ]cGMP-Lösung für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Gemisch mit eiskalter Ammoniumsulfatlösung durch Schütteln ausgefällt. Das Präzipitat wurde zentrifugiert, in Wasser gelöst, und der freie Tracer konnte dann im Überstand bestimmt werden. Die gemessene Radioaktivität ist ein reziprokes Maß für das von den Zellen gebildete cGMP (Steiner *et al.* 1972).

### 3.4.2 Enzymimmunoassay

Bei diesem Test sind auf einer 96-well-Mikrotiterplatte spezifische cGMP-Antikörper immobilisiert, um deren limitierte Bindungsstellen freies, aus dem Zellüberstand gewonnenes und an Acetylcholinesterase gekoppeltes cGMP konkurriert. Nach Beendigung der Reaktion wurden die ungebundenen Reagenzien ausgewaschen. Die Acetylcholinesterase-Aktivität wurde mit Ellmanns Reagenz bestimmt. Dabei katalysiert das Enzym die Bildung der 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, deren Extinktion bei 412 nm vermessen werden kann. Die Extinktion ist der Konzentration an freiem cGMP proportional (Pradelles *et al.* 1989).

### 3.5 Bestimmung der eNOS-Proteinexpression

Die Expression endothelialer NO-Synthase (eNOS) in den verwendeten Zelllinien wurde mittels des Western-Blots (Towbin *et al.* 1979; Burnette 1981) analysiert. Dazu wurden die Zellen nach der Inkubation lysiert und das Gesamtprotein unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe eines Tank-Blot-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion des eNOS-Proteins erfolgte über einen spezifischen monoklonalen eNOS-Antikörper unter Nutzung eines Chemilumineszenz-Systems.

#### 3.5.1 Inkubationsprotokoll

Humane Endothelzellen (EA.hy 926) wurden in Kulturschalen mit einer Wachstumsfläche von 60 cm<sup>2</sup> ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit Medium und den zu untersuchenden Substanzen für 8 Stunden. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA geerntet und in Lysepuffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes.

#### 3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit einem kommerziellen Kit (Bio-Rad, München) nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Diese Methode basiert auf der Farbreaktion der zu bestimmenden Proteine mit Coomassie-Brilliantblau, wobei Komplexe mit einem Absorptionsmaximum von 595 nm entstehen.

Der Proteingehalt der Proben wurde einer Eichkurve entnommen, die parallel zu jeder Proteinbestimmung mit Rinderserumalbumin erstellt wurde.

#### 3.5.3 Western-Blot-Analyse

Zur optimalen Auftrennung der Proteine wurden Polyacrylamid-Konzentrationen von 5% im Sammelgel und 7,5% im Trenngel verwendet. Die Proteinproben (100 µg) wurden vor der Gelelektrophorese mit 5-fach konzentriertem Ladepuffer (0,1 M Tris, 0,01 M EDTA,

2% SDS, 20% Glycerol, 0,5 M DTT) denaturiert (100°C / 10 Minuten) und mit SDS-haltigem Laufpuffer (50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1% SDS) gelelektrophoretisch aufgetrennt (40 V / 3 Stunden).

Zum Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde das Tank-Blot-Verfahren angewendet. Der Transfer erfolgte bei 100 mA und 4°C für 16 Stunden (Tankblotter: Biometra, Göttingen) auf eine Nitrocellulosemembran (Biometra, Göttingen). Zur Überprüfung der Transfereffizienz diente ein vorgefärbtes Proteingemisch (Gibco, Karlsruhe). Die Beladung der Gele wurde mit Hilfe der Coomassie-Brilliantblau-Färbung kontrolliert (Sambrook *et al.* 1989).

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zur Maskierung unbesetzter Bindungsstellen für eine Stunde mit Blockierungslösung (Tris-Puffer mit 4% fettfreiem Trockenmilchpulver) inkubiert. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation der Membran mit dem in Blockierungslösung verdünnten eNOS-Antikörper (133 kDa; Sigma, Deisenhofen). Nach zweimaligem Waschen der Membran mit Blockierungslösung schloss sich eine 30-minütige Inkubation mit einem Horse-Raddish-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Anti-Kaninchen IgG-HRP; Sigma, Deisenhofen) an. Danach wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit Blockierungslösung und zweimal für 10 Minuten mit Tris-Puffer (mit 0,5% Tween) gewaschen.

Zur Detektion wurde ein Chemilumineszenz-Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Mit Hilfe dieses Systems erfolgt der Nachweis der Zweitantikörper (Anti-Kaninchen IgG-HRP), die an die eNOS-Antikörper auf der Membran gebunden wurden. Durch die Peroxidase des Zweitantikörpers wird das Substrat Luminol oxidiert, und es entsteht Licht mit einem Maximum von 428 nm. Dies kann durch die Exposition der Membran mit einem Autoradiographiefilm (Roche, Mannheim) nachgewiesen werden. Die Expositionszeit betrug 5-30 Minuten.

### 3.6 Bestimmung der Stickstoffmonoxid-Synthase-Aktivität

Der Assay zur Bestimmung der totalen Stickstoffmonoxid-Synthase(NO-Synthase)-Aktivität beruht auf der enzymatischen Umwandlung von L-[<sup>3</sup>H]-Arginin zu L-[<sup>3</sup>H]-Citrullin unter Abspaltung von NO (Bredt und Snyder 1990; Heller *et al.* 1999). Die Trennung des bei pH 5,5 ungeladenen L-[<sup>3</sup>H]-Citrullins von dem bei diesem pH-Wert positiv geladenen L-[<sup>3</sup>H]-Arginin erfolgte säulenchromatographisch, wobei die Säulen mit einem Kationenaustauscherharz gefüllt wurden.

Die Zellen wurden in 60-mm-Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert, zweimal mit HEPES-Puffer (pH 7,4), der 1,5 mM Calciumchlorid und 0,25% Rinderalbumin enthielt, gewaschen und dann 30 Minuten darin inkubiert. Zur Bestimmung der basalen Citrullin-Synthese oder zur Hemmung der Stimulation wurde während dieser Inkubationszeit der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME (1 mM) zugesetzt. Danach wurden 3 µCi L-[<sup>3</sup>H]-Arginin, 10 µM unmarkiertes L-Arginin sowie Ionomycin (2 µM) als Positivkontrolle und die zu untersuchenden Substanzen hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die

Reaktion mit einer eiskalten Lösung aus 5 mM L-Arginin und 4 mM EDTA in PBS gestoppt und die Zellen mit reinem Ethanol denaturiert. Der Alkohol wurde abgedampft und die löslichen Zellkomponenten in 20 mM HEPES-Na-Puffer (pH 5,5) gelöst. Der Überstand wurde über eine mit Dowex AG-50W-X8 (Natrium-Form) gefüllte Säule aufgetrennt. Die Radioaktivität des L-[<sup>3</sup>H]-Citruillin-haltigen Eluats wurde mittels Flüssigkeitsszintillations-Spektrometrie bestimmt. Die totale NO-Synthase-Aktivität für jede Probe wurde als Differenz zwischen der Radioaktivität in An- und Abwesenheit des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME (1 mM) berechnet (Marletta 1989).

### 3.7 Material

Alexis Deutschland, Grünberg	ODQ, PTIO, SperminNONOat
American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA	CPAE (ATCC CCL 209), LLC-PK1 (ATCC CL 101), RFL-6 (ATCC CCL 192)
Amersham, Braunschweig	cGMP[ <sup>3</sup> H]-RIA, [ <sup>3</sup> H]-cGMP, [ <sup>3</sup> H]-Arginin
Aventis, Frankfurt/Main	SIN-1
Boehringer, Mannheim	LDH-Cytotoxizitäts-Kit
Gibco, Eggenstein	Fetales Kälberserum, RNase-freies Wasser, PBS, Penicillin/Streptomycin, Trypsin/EDTA, Zellkulturmedien, Tris, SDS
E. Merck, Darmstadt	Methanol <sub>abs</sub> , Natriumcitrat p.a., Salzsäure 36%, Chromatographiesäulen
Packard, Dreieich	Szintillationscocktail Ultima Gold
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	Acetylsalicylsäure, L-Arginin, Ammoniumsulfat, 8-Br-cGMP, CaCl <sub>2</sub> , DDT, Diclofenac, Dowex AG-50W-X8, eNOS-Antikörper, Gentianaviolett, HEPES, HEPES-Na, IBMX, Indometacin, Ionomycin, Kollagenase, L-NAME, L/D- NMMA, MgCl <sub>2</sub> , Rinderalbumin, Salicylsäure, Triton X-100, Wasserstoffperoxid
Stratagene, Heidelberg	cGMP-EIA

### 3.8 Lösungen

Die bei den Versuchen verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

PBS (pH 7,3): NaCl 138 mM; KCl 2,7 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM; in bidestilliertem Wasser lösen.

HEPES-Na-Puffer (pH 7,4): NaCl 145 mM; KCl 5 mM; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; HEPES-Na 10 mM; Glucose 10 mM; in bidestilliertem Wasser lösen.

HEPES-CaCl<sub>2</sub>-BSA-Puffer: 1,5 ml CaCl<sub>2</sub> (100 mM Stammlösung); 100 ml HEPES-Na-Puffer (pH 7,4); 0,25 g BSA.

PBS-EDTA-Arginin-Puffer: L-Arginin 5 mM; EDTA 4 mM in PBS lösen.

Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Indometacin und Salicylsäure wurden jeweils vor Versuchsbeginn in DMSO gelöst (1 M Stammlösung) und anschließend in PBS verdünnt, wobei die Endkonzentration von DMSO unter 1:1000 lag.

YC-1, ODQ und Ionomycin wurden in DMSO gelöst und als Stammlösung bei -20°C gelagert. Die Verdünnung erfolgte am Versuchstag in PBS, wobei die Endkonzentration von DMSO unter 1:1000 lag.

Die NO-Donoren SIN-1 und SperminNONOat sowie PTIO wurden jeweils am Versuchstag in den entsprechenden Mengen kaltem PBS gelöst.

8-Br-cGMP wurde in PBS gelöst und als Stammlösung (10 mM) bei -20°C gelagert. Die Verdünnung erfolgte am Versuchstag.

L-Arginin und seine Derivate L/D-NMMA und L-NAME wurden vor Versuchsbeginn in den entsprechenden Mengen in PBS gelöst.

Der Phosphodiesterasehemmer IBMX wurde in destilliertem Wasser gelöst (5 mM) und bei -20°C gelagert. Am Versuchstag wurde eine 0,5 mM Lösung in serumfreiem Medium erstellt.

Gentianaviolett (0,1%): 0,1 g Gentianaviolett wurde in 5 ml absolutem Ethanol gelöst und mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Natriumcitratlösung (0,1 M): 2,9 g Natriumcitrat wurden zu einer Mischung von 50 ml absolutem Ethanol und 50 ml demineralisiertem Wasser gegeben.

### 3.9 Statistik

Die Versuche wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) von  $n$  unabhängigen Experimenten berechnet. Alle Experimente wurden jeweils an Zellen unterschiedlicher Passagen in Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  mittels des t-Tests nach Student für unverbundene Stichproben auf ihre Signifikanz geprüft. Bei einem Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni's multipler Vergleichstest angewendet. Als signifikant angesehen wurden p-Werte für  $\alpha \leq 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

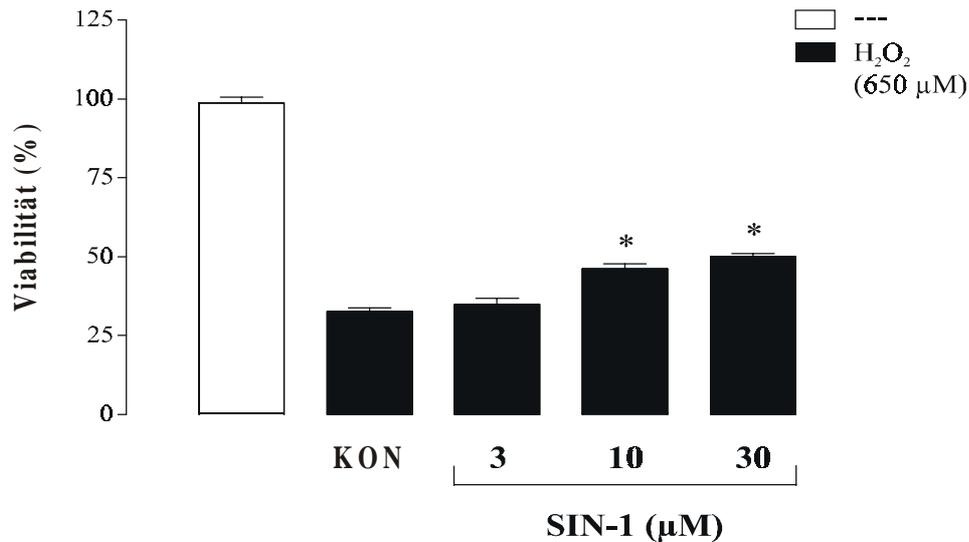
### 4.1 Untersuchungen zur Cytoprotektion

ROS wie das  $H_2O_2$  sind an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. Neben einer direkten Endothelschädigung, z.B. durch Lipidperoxidation, führen sie auch zu einer Inaktivierung cytoprotektiver Proteine und zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO.  $H_2O_2$  führt konzentrations- und zeitabhängig zu einer Endothelschädigung. Dies kann in einem *In-vitro*-Modell quantifiziert werden (Podhaisky *et al.* 1997; Oberle *et al.* 1998). Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde dabei der Kristallviolett-Assay verwendet, der die vitalen Zellen detektiert. Zunächst wurden die cytoprotektiven Effekte verschiedener Substanzen gegenüber  $H_2O_2$ -induzierter Toxizität in Endothelzellen untersucht. Eine maximale Cytoprotektion wurde bei einer Endothelschädigung von ungefähr 50% erzielt. Die  $EC_{50}$  von  $H_2O_2$  unterliegt sehr großen Schwankungen. Daher wurden die Experimente bei unterschiedlichen Konzentrationen (650-1000  $\mu M$ ) und mit verschiedenen Inkubationszeiten (8-24 Stunden) durchgeführt, um einen Schädigungsindex von etwa 50% konstant zu erreichen.

#### 4.1.1 Endothelprotektion durch NO-Donoren

SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin) ist der spontan NO-freisetzende aktive Metabolit des Molsidomin, das in der Angina-pectoris-Prophylaxe als Arzneistoff angewendet wird (Feelisch *et al.* 1989). Für SIN-1 und auch andere spontane NO-Donoren, wie S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) oder SperminNONOat konnte eine Endothelprotektion gegenüber TNF- $\alpha$ -induzierter Toxizität gezeigt werden (Polte *et al.* 1997a).

Um zu untersuchen, ob die Endothelprotektion auch gegenüber  $H_2O_2$ -induzierter Zellschädigung nachgewiesen werden kann, wurden Endothelzellen (CPAE) für 12 Stunden mit SIN-1 (3-30  $\mu M$ ) vorinkubiert, und anschließend wurde für 24 Stunden  $H_2O_2$  (650  $\mu M$ ) zugesetzt. Die Zahl der vitalen Zellen ging nach der Behandlung mit  $H_2O_2$  auf etwa 30 % zurück. Bei einer Konzentration von 30  $\mu M$  verringerte SIN-1 den toxischen Effekt signifikant gegenüber der Kontrolle (Abb. 2). In dem angegebenen Bereich (3-30  $\mu M$ ) besaß SIN-1 keine Eigeneffekte auf die Zellviabilität. Ab einer Konzentration von 100  $\mu M$  wurde ein toxischer Effekt festgestellt (nicht gezeigt).



**Abb. 2:** Protektiver Effekt von SIN-1 auf Endothelschädigung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

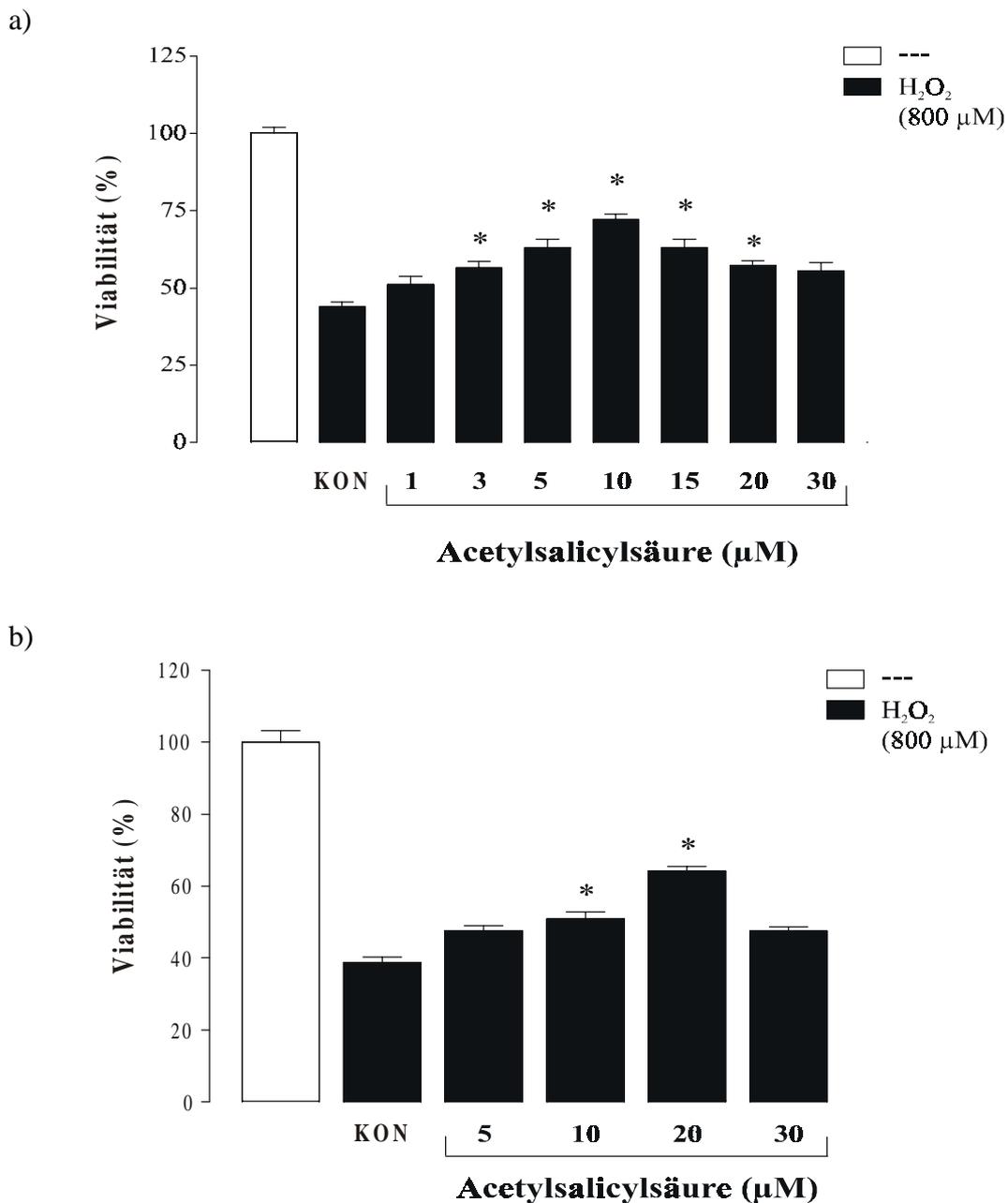
CPAE wurden 12 h mit SIN-1 (3-30 µM) vorinkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (650 µM) wurde die Inkubation für weitere 24 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.1.2 Cytoprotektion durch Acetylsalicylsäure

Zur Bestimmung der Wirkung von ASS auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Endothelschädigung wurden Endothelzellen (CPAE) für 12 Stunden mit ASS inkubiert. Es zeigte sich, dass Konzentrationen von 3-20 µM ASS CPAE signifikant vor oxidativem Stress schützten (Abb. 3a). Um ein zellinienspezifisches Phänomen auszuschließen wurde das Experiment mit einer weiteren Endothelzelllinie wiederholt. Auch in primären Endothelzellen aus Schweinaorten (PAE) zeigte ASS in vergleichbaren Konzentrationen (10-20 µM) eine signifikante Cytoprotektion (Abb. 3b). Mit steigenden Konzentrationen (≥ 30 µM) verminderte sich der protektive Einfluss von ASS, und der Vitalitätsindex sank auf das Ausgangsniveau zurück.

DMSO, das zum Erstellen der Stammlösung von ASS verwendet wurde, zeigte in diesen und in den folgenden Experimenten in den entsprechenden Verdünnungen keinen eigenen Effekt.



**Abb. 3:** Konzentrationsabhängige Endothelprotektion von ASS

a) in CPAE

Die Endothelzellen wurden 12 h mit Acetylsalicylsäure (1-30 µM) vorinkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (800 µM) wurde die Inkubation für weitere 12 h fortgesetzt.

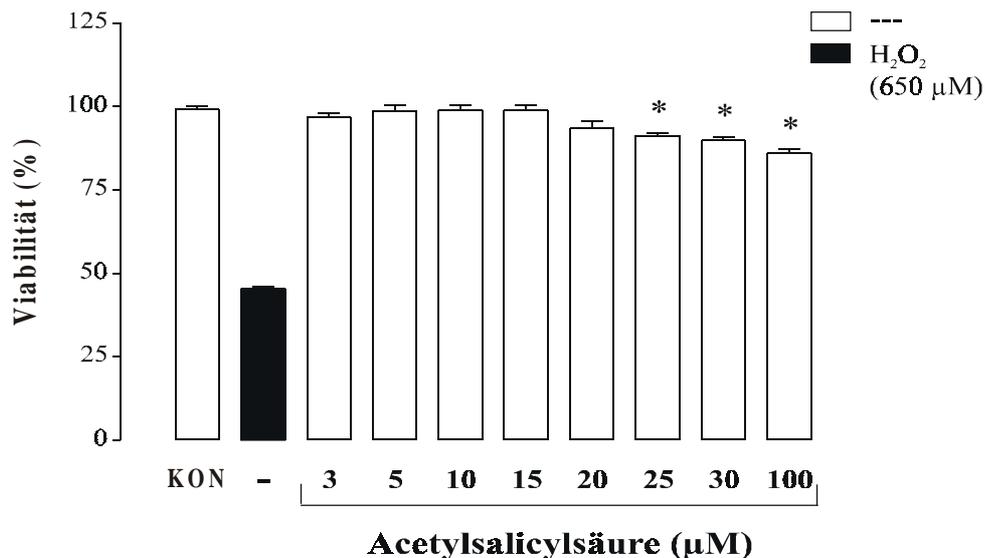
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

b) in PAE.

Die Endothelzellen wurden 12 h mit Acetylsalicylsäure (5-30 µM) vorinkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (850 µM) wurde die Inkubation für weitere 22 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Um die Abnahme des Zellschutzes im höheren Konzentrationsbereich zu untersuchen, wurden Versuche zur Eigentoxizität der ASS durchgeführt. Die Endothelzellen wurden entsprechend der Protektionsversuche für 12 Stunden mit ASS (3-100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert, der Zellüberstand abgesaugt und anschließend wurde für weitere 24 h mit Zellkulturmedium inkubiert. In dem Konzentrationsbereich, der vor  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter Toxizität schützte (3-20  $\mu\text{M}$ ), wurden keine Eigeneffekte von ASS beobachtet. Größere Konzentrationen wirkten signifikant eigentoxisch (Abb. 4).

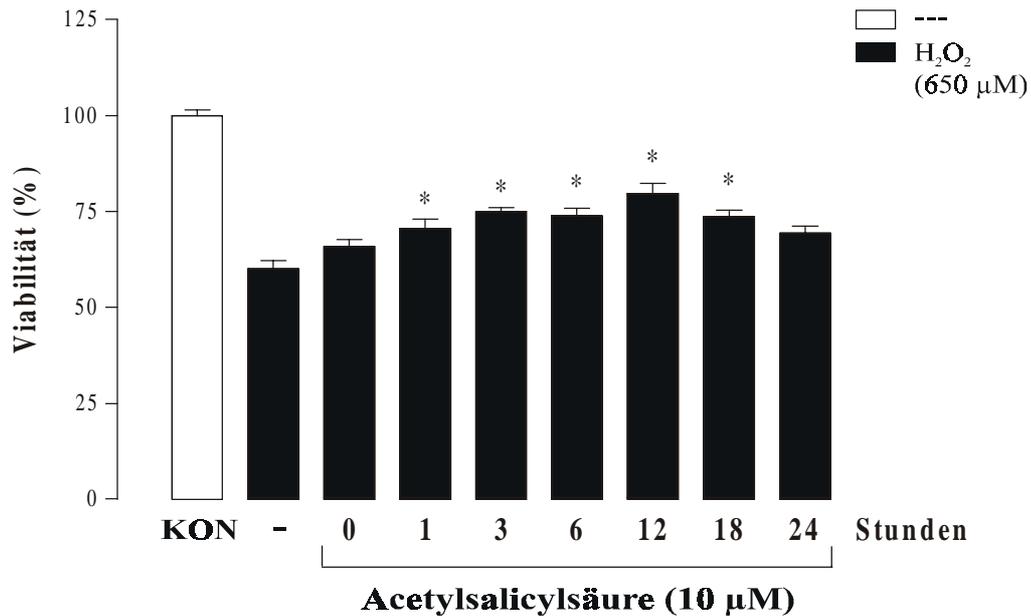


**Abb. 4:** Eigeneffekt von Acetylsalicylsäure auf Endothelzellen.

CPAE wurden 12 h mit Acetylsalicylsäure (3-100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (650  $\mu\text{M}$ ) wurde die Inkubation für weitere 24 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Interessanterweise erhöhte sich die protektive Wirkung von ASS nur, wenn sie bereits 12 Stunden vor Beginn der Exposition mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugesetzt wurde. Bei gleichzeitiger Zugabe von ASS und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in das Inkubationsmedium konnte dagegen kein Schutz durch ASS festgestellt werden (Abb. 5).



**Abb. 5:** Zeitabhängige Endothelprotektion von Acetylsalicylsäure.

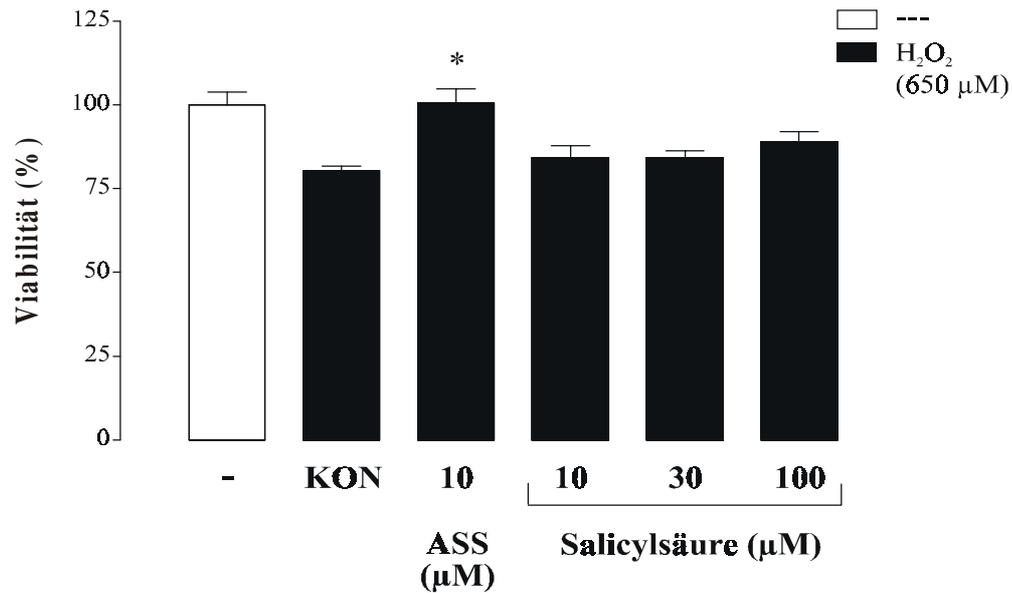
CPAE wurden 0–24 Stunden mit Acetylsalicylsäure (10 µM) vorinkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (650 µM) wurde die Inkubation für weitere 24 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.1.3 Cytoprotektiver Effekt von Acetylsalicylsäure im Vergleich mit anderen Cyclooxygenase-Inhibitoren

Um herauszufinden, ob die beobachtete Cytoprotektion durch Hemmung der COX bedingt war, wurden strukturell unterschiedliche COX-Inhibitoren eingesetzt. Salicylsäure (10-100 µM), ein aktiver Metabolit der ASS, zeigte wie auch das Indolessigsäure-Derivat Indometacin (10-100 µM) und das Phenylelessigsäure-Derivat Diclofenac (10-100 µM) bei vergleichbaren Versuchsbedingungen keine Cytoprotektion (Abb. 6-8). Die Substanzen besaßen bei den angegebenen Konzentrationen keine Eigeneffekte auf die Zellviabilität.

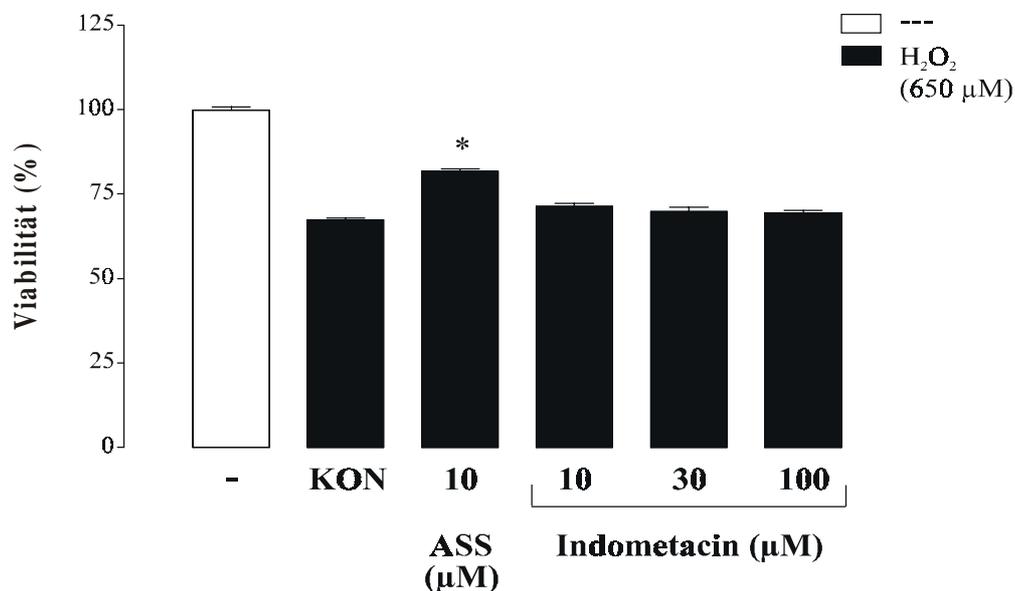
Die Befunde zeigen, dass die durch ASS hervorgerufene Protektion kein Klasseneffekt nichtsteroidaler Antiphlogistika ist und vermutlich nicht auf einer Hemmung der COX beruht.



**Abb. 6:** Vergleich der Endothelprotektion von Acetylsalicylsäure mit Salicylsäure.

CPAE wurden 12 h mit Acetylsalicylsäure (ASS, 10  $\mu\text{M}$ ) oder Salicylsäure (10-100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (650  $\mu\text{M}$ ) wurde die Inkubation für weitere 24 h fortgesetzt.

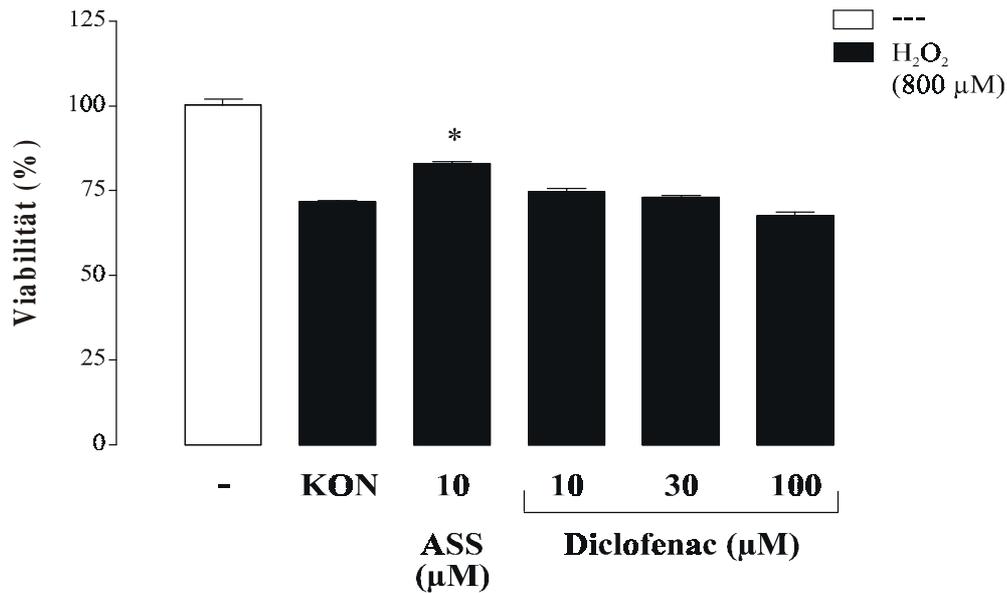
Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.



**Abb. 7:** Vergleich der Endothelprotektion von Acetylsalicylsäure mit Indometacin.

CPAE wurden 12 h mit Acetylsalicylsäure (ASS, 10  $\mu\text{M}$ ) oder Indometacin (10-100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (650  $\mu\text{M}$ ) wurde die Inkubation für weitere 22 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.



**Abb. 8:** Vergleich der Endothelprotektion von Acetylsalicylsäure mit Diclofenac.

CPAE wurden 12 h mit Acetylsalicylsäure (ASS, 10  $\mu\text{M}$ ) oder Diclofenac (10-100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (800  $\mu\text{M}$ ) wurde die Inkubation für weitere 18 h fortgesetzt.

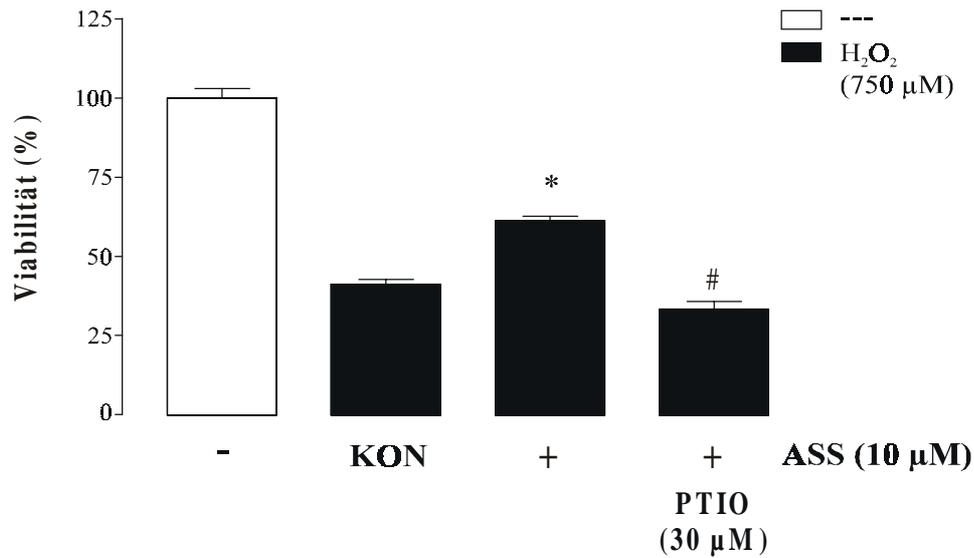
Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.1.4 Modulation der protektiven Effekte von Acetylsalicylsäure (Kristallviolett-Assay)

NO-Donoren wie SIN-1 zeigten unter den gewählten Versuchsbedingungen eine der ASS vergleichbare Cytoprotektion. Daraus ergab sich die Vermutung, dass NO-Donoren und ASS über einen gemeinsamen Mechanismus protektiv wirken könnten. In weiteren Versuchen wurde durch Verwendung von Modulatoren des L-Arginin-NO-Stoffwechsels untersucht, ob der ASS-cytoprotektive Effekt NO-vermittelt ist.

Zunächst wurde mit Hilfe des direkten NO-Radikalfängers 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (PTIO) eine mögliche NO-Abhängigkeit des beobachteten ASS-Effektes untersucht. Durch PTIO wird NO zu Stickstoffdioxid oxidiert, welches sofort mit einem weiteren NO-Radikal zu Dinitrogentrioxid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) reagiert (Akaike und Maeda 1996). Damit wird dem System NO entzogen.

Die Zellen wurden vor der Zugabe der ASS 10 Minuten mit PTIO (30  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Cytoprotektion wurde durch den Radikalfänger vollständig aufgehoben (Abb. 9). PTIO besaß bei der angegebenen Konzentration keine Eigeneffekte auf die Zellviabilität.



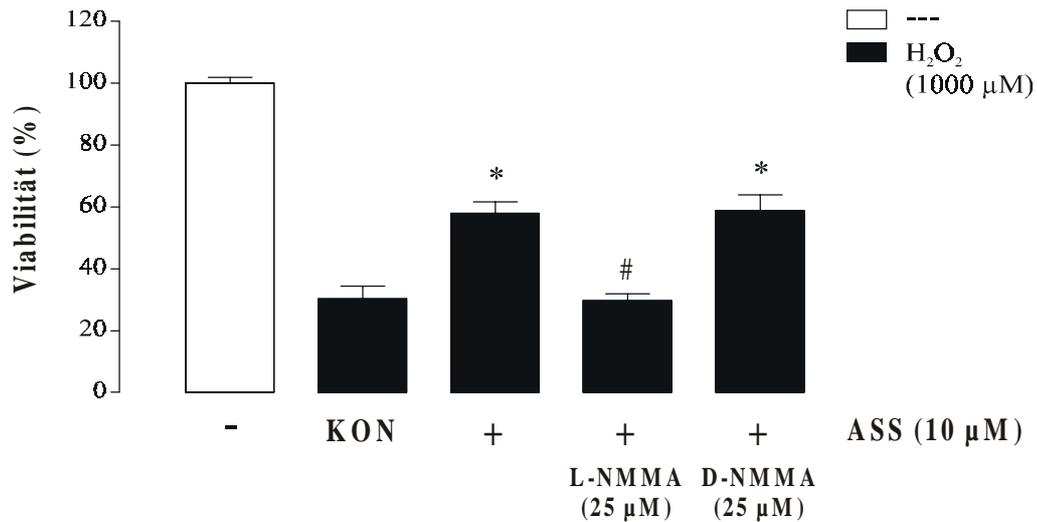
**Abb. 9:** Effekt des NO-Radikalfängers PTIO auf die Endothelprotektion durch ASS.

Nach 10-minütiger Vorbehandlung mit PTIO (30 μM) wurden CPAE 12 h mit Acetylsalicylsäure (ASS 10 μM) inkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (750 μM) wurde die Inkubation für weitere 18 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; #p < 0,05 vs. ASS, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

Um eine Beteiligung von NO-Synthasen an der ASS-induzierten Cytoprotektion zu untersuchen, wurden die Endothelzellen 10 Minuten vor der Zugabe von ASS (10 μM) mit L-NMMA (25 μM) vorinkubiert. Derivate des L-Arginin, die wie das N<sup>ω</sup>-Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) am terminalen Guanidin-Stickstoff substituiert sind, können die NO-Synthasen reversibel oder irreversibel inhibieren (Moncada und Higgs 1993; Knowles und Moncada 1994). Der protektive Effekt von ASS wurde vollständig durch L-NMMA aufgehoben.

Eine unspezifische Hemmung von L-NMMA konnte ausgeschlossen werden, da das D-Enantiomer ohne Einfluss auf die ASS-induzierte Protektion war. Die enantioselektive Inhibition durch L-NMMA spricht für die ursächliche Beteiligung von NO-Synthase an der durch ASS hervorgerufenen endothelprotektiven Wirkung (Abb. 10). Ein Eigeneffekt der Arginin-Analoga auf die Zellviabilität war nicht feststellbar.



**Abb. 10:** Effekt der Arginin-Analoga L- und D-NMMA auf die Cytoprotektion durch Acetylsalicylsäure.

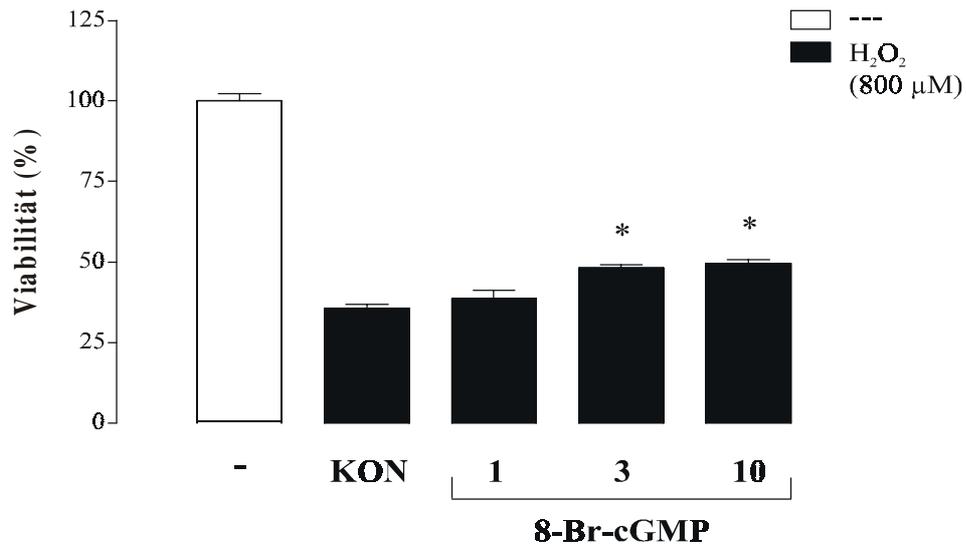
Nach 10-minütiger Vorbehandlung mit L- oder D-NMMA (25 µM) wurden CPAE für 12 h mit Acetylsalicylsäure (ASS, 10 µM) inkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1000 µM) wurde die Inkubation für weitere 8 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; #p < 0,05 vs. ASS, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

Viele biologische NO-Wirkungen beruhen auf der Aktivierung der sGC und sind cGMP-vermittelt. In einer früheren Untersuchung wurde gezeigt, dass stabile cGMP-Analoga Endothelzellen vor oxidativem Stress schützen können (Polte *et al.* 1997b). Dieser Befund wurde in der vorliegenden Untersuchung unter Verwendung des cGMP-Analogons 8-Bromo-cGMP (8-Br-cGMP, 1-10 µM) für die gewählten Versuchsbedingungen bestätigt (Abb. 11). 8-Br-cGMP verringerte konzentrationsabhängig und ohne Eigeneffekte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Toxizität.

Um nun zu untersuchen, ob der Endothelschutz durch ASS über das cyclische Nukleotid cGMP vermittelt wird, wurde ein selektiver Hemmstoff der NO-sensitiven sGC, 1H-(1,2,4)-Oxadiazol(4,3-a)quinoxalin-1-on (ODQ), verwendet (Garthwaite *et al.* 1995; Brunner *et al.* 1996). ODQ ist hochspezifisch für die sGC und inhibiert verwandte, cyclische Nukleotide bildende Enzyme wie die partikuläre Guanylylcyclase bzw. Adenylylcyclase oder NO-Synthasen nicht (Olson *et al.* 1997).

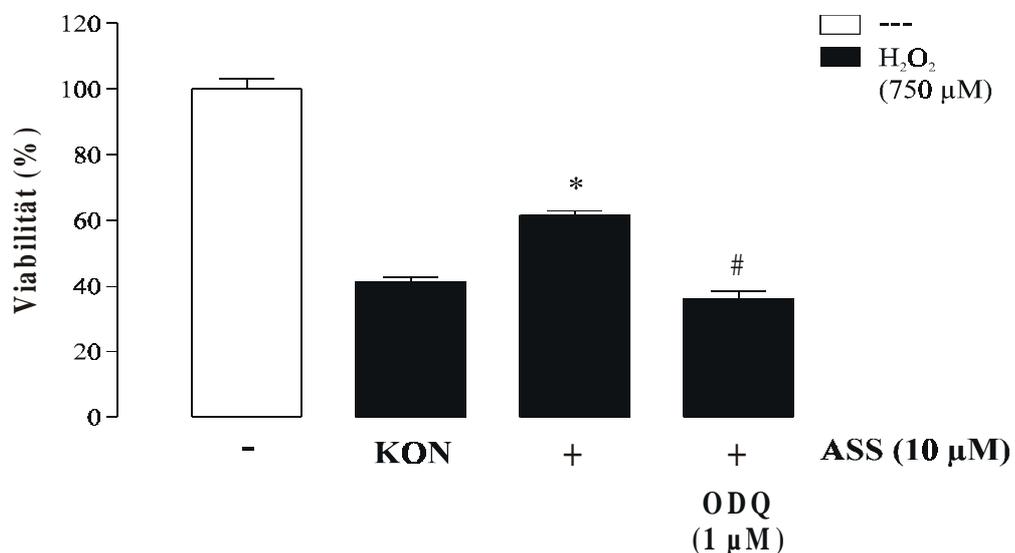
Es wurde der gleiche Ansatz wie für die Untersuchung mit PTIO verwendet. ODQ (1 µM) wurde 10 Minuten vor der 12-stündigen Inkubation mit ASS zu den Zellen gegeben, der Zellüberstand wurde abgesaugt, und eine 18-stündige Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> folgte. Wie vermutet, wurde die Cytoprotektion durch ASS durch Guanylylcyclase-Inaktivierung mit ODQ komplett aufgehoben (Abb. 12). ODQ zeigte in der verwendeten Konzentration keine Eigeneffekte.



**Abb. 11:** Effekt des cGMP-Analogons 8-Br-cGMP auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte Toxizität in Endothelzellen.

CPAE wurden 12 h mit 8-Br-cGMP (1-10 μM) vorinkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (800 μM) wurde die Inkubation für weitere 8 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.



**Abb. 12:** Hemmung der Acetylsalicylsäure-induzierten Endothelprotektion durch Inhibition der löslichen Guanylylcyclase.

Nach 10-minütiger Vorbehandlung mit dem selektiven Guanylylcyclase-Inhibitor ODQ (1 μM) wurden CPAE für 12 h mit Acetylsalicylsäure (ASS, 10 μM) inkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (750 μM) wurde die Inkubation für weitere 18 h fortgesetzt.

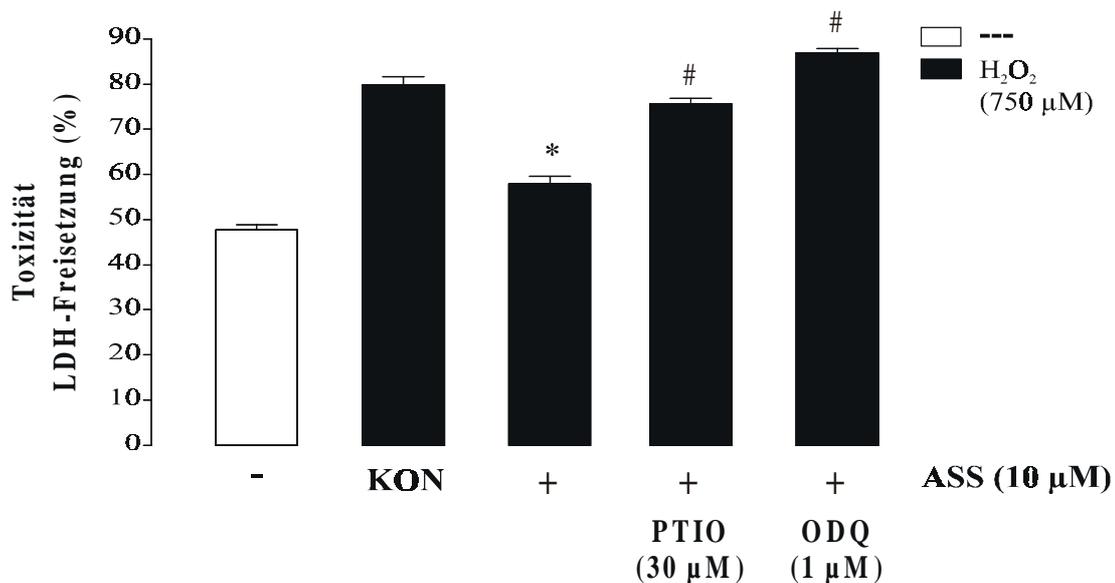
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; #p < 0,05 vs. ASS, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

#### 4.1.5 Modulation der protektiven Effekte von Acetylsalicylsäure (LDH-Freisetzung)

Bei den Versuchen mit PTIO, ODQ und den Arginin-Analoga wurde parallel die Vitalität der Zellen über die LDH-Freisetzung bestimmt. Mit dem Kristallviolett-Assay werden die am Ende der Inkubation verbliebenen lebensfähigen Zellen detektiert. Es lassen sich jedoch keine Aussagen über zelltoxische Mechanismen wie Apoptose oder Nekrose machen. Die LDH-Freisetzung gilt als Marker für den nekrotischen Zelltod (Decker und Lohmann-Matthes 1988).

Die Inkubation der Zellen erfolgte genau nach dem oben beschriebenen Protokoll (Kapitel 3.3.1). Nach der Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde die LDH-Konzentration im Zellüberstand gemessen. Bei der Auswertung diente die LDH-Freisetzung nach Inkubation mit Triton X-100 als Standard (100% Toxizität).

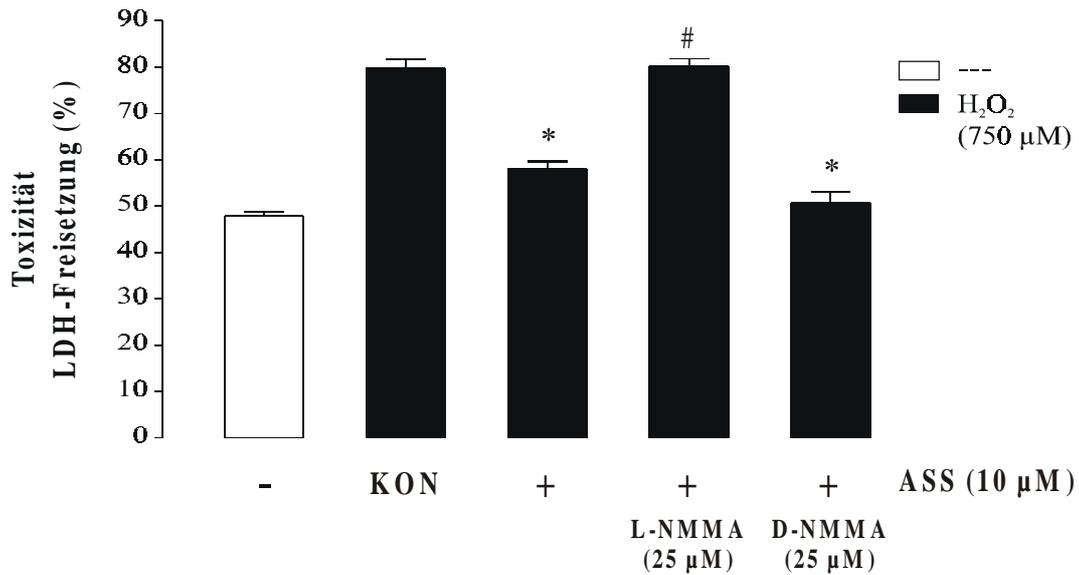
Mit dem LDH-Assay konnte bestätigt werden, dass ASS (10  $\mu\text{M}$ ) eine nahezu komplette Aufhebung der Toxizität zeigt. Die Protektion wurde durch den NO-Radikalfänger PTIO (30  $\mu\text{M}$ ) und den Guanylylcyclase-Inhibitor ODQ (1  $\mu\text{M}$ ) inhibiert (Abb. 13). Der L-Arginin Antagonist L-NMMA, aber nicht sein D-Enantiomer D-NMMA, führte zu einer Hemmung der ASS-abhängigen Cytoprotektion (Abb. 14).



**Abb. 13:** Effekt von PTIO und ODQ auf die protektive Wirkung von Acetylsalicylsäure gemessen über die LDH-Freisetzung.

Nach 10-minütiger Vorbehandlung mit PTIO (30  $\mu\text{M}$ ) oder ODQ (1  $\mu\text{M}$ ) wurden CPAE für 12 h mit Acetylsalicylsäure (ASS, 10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (750  $\mu\text{M}$ ) wurde die Inkubation für weitere 18 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; #p < 0,05 vs. ASS, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.



**Abb. 14:** Effekt von L- und D-NMMA auf die protektive Wirkung von Acetylsalicylsäure gemessen über die LDH-Freisetzung.

Nach 10-minütiger Vorbehandlung mit L- oder D-NMMA (25 µM) wurden CPAE für 12 h mit Acetylsalicylsäure (ASS, 10 µM) inkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium gewechselt. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (750 µM) wurde die Inkubation für weitere 18 h fortgesetzt.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; #p < 0,05 vs. ASS, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

#### 4.1.6 Zusammenfassung

ASS verringerte konzentrationsabhängig die endotheltoxische Wirkung von  $H_2O_2$ . Vergleichbare zellprotektive Effekte wurden nach Inkubation mit dem NO-Donor SIN-1 beobachtet. Andere Hemmstoffe der COX, wie Salicylsäure, Diclofenac und Indometacin waren ohne Einfluss auf die cytotoxische Wirkung von  $H_2O_2$ . Die Untersuchungen mit dem NO-Radikalfänger PTIO und dem NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA weisen darauf hin, dass die Endothelprotektion von ASS über den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg vermittelt wird. Die Aufhebung der ASS-induzierten Endothelprotektion durch den sGC-Inhibitor ODQ demonstriert die Mediatorfunktion des NO-Botenstoffs cGMP.

## 4.2 Messung von intrazellulären cGMP-Spiegeln

Im Folgenden sollte die Beteiligung von cGMP an der ASS-abhängigen Endothelprotektion durch Messung intrazellulärer cGMP-Spiegel erhärtet werden.

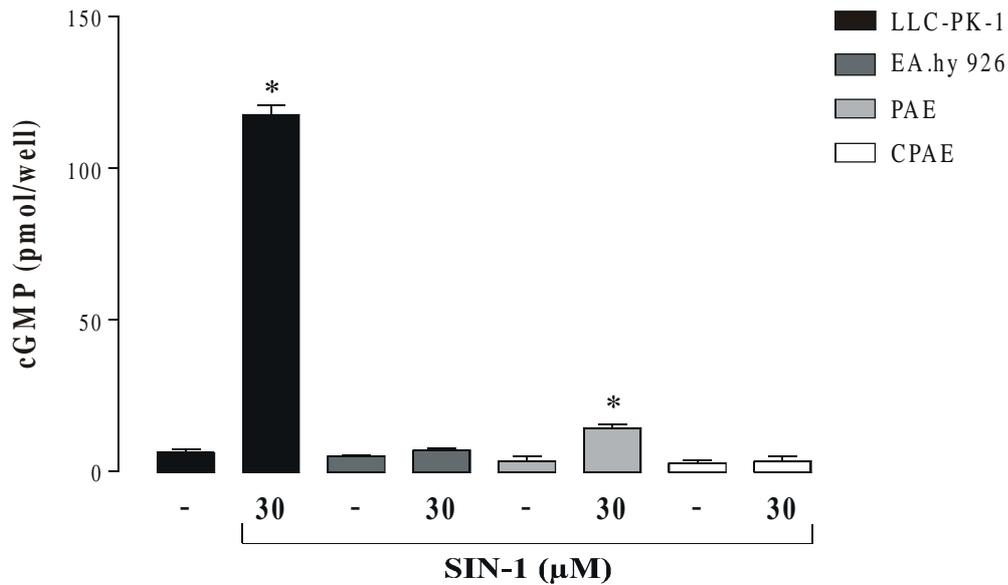
### 4.2.1 Effekt eines NO-Donors auf die cGMP-Bildung in verschiedenen kultivierten Zellen

Zunächst wurde ein System gesucht, in dem mit dem Enzymimmunoassay ausreichende, d.h. modulierbare, cGMP-Spiegel gemessen werden konnten. Dafür wurden verschiedene Zelltypen mit dem spontanen NO-Donor SIN-1 inkubiert.

Die Bildung von cGMP wurde wie unter 3.4 und 3.4.2 beschrieben gemessen. Die Zellen wurden nach 10 Minuten Inkubation in Gegenwart des Phosphodiesterase-Hemmers IBMX (0,5 mM) für weitere 10 Minuten mit SIN-1 (30  $\mu$ M) inkubiert. Die Endothelzelllinien CPAE und EA.hy 926 zeigten nach der Stimulation nur geringe, nicht signifikante Erhöhungen des cGMP-Spiegels. Dies könnte darauf beruhen, dass die beiden Zelllinien nur geringe Mengen an sGC enthalten oder das Enzym nur in einer Form vorliegt, die nicht aktivierbar ist (Bennett *et al.* 1989). Dagegen kam es in den primären Schweineartenzellen (PAE) und vor allem in den Nierenepithelzellen (LLC-PK1) zu einer signifikanten Akkumulation von cGMP (Abb. 15).

LLC-PK1-Zellen sind eine etablierte Zelllinie zur Untersuchung zellulärer Mechanismen der durch verschiedene Agonisten (wie z.B. NO) induzierten cGMP-Bildung. Die Zelllinie enthält nicht nur verhältnismäßig große Mengen an sGC, sondern auch eNOS, die das quantitativ wichtigste Isoenzym im Endothel darstellt (Bennett *et al.* 1989; Schröder und Schrör 1990; Tracey *et al.* 1994). Für diese Zelllinie wurde außerdem das vollständige Fehlen eines Arachidonstoffwechsels beschrieben (Hull *et al.* 1976; Goldring *et al.* 1978; Lifschitz *et al.* 1982; Schröder und Schrör 1993). Dies bedeutet, dass LLC-PK1-Zellen als Modell für COX-unabhängige ASS-Effekte eingesetzt werden können.

Die folgenden Untersuchungen wurden deshalb mit dieser Zelllinie durchgeführt.



**Abb. 15:** Vergleich der cGMP-Bildung in den Zelllinien LLC-PK1, EA.hy 926, PAE und CPAE nach Stimulation mit SIN-1.

Es wurde 10 Minuten mit SIN-1 (30 μM) stimuliert.

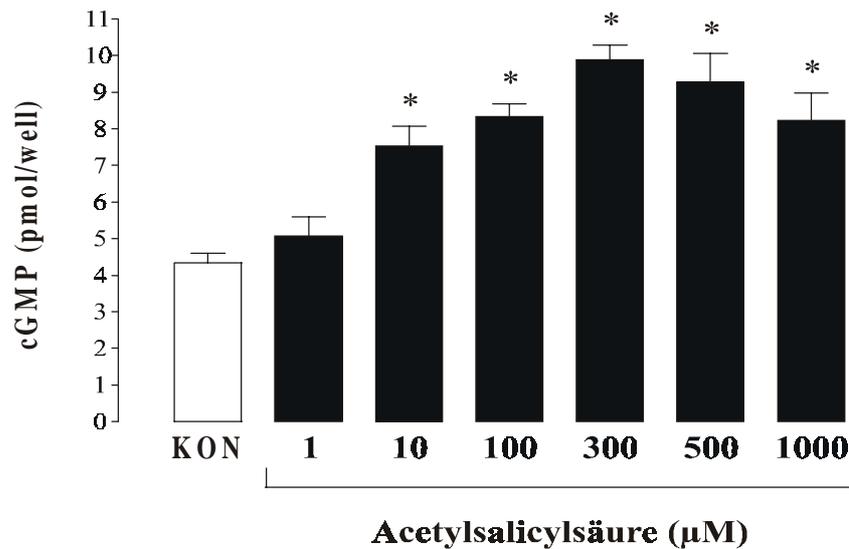
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 3-6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

## 4.2.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Bildung von cGMP

### 4.2.2.1 Messung in LLC-PK1-Zellen

Die Zellen wurden nach Vorbehandlung mit IBMX für 10 Minuten mit ASS (10 – 1000 μM) inkubiert. Eine signifikante cGMP-Stimulation zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 10 μM, die sich in Endothelzellen als cytoprotektiv erwiesen hatte, ohne gleichzeitig eigentoxisch zu wirken.

Die Konzentrations-Wirkungskurve erreichte bei 300 μM ein Maximum mit einer Erhöhung der Basalkonzentration um etwa das 2,5-fache. Bei höheren ASS-Konzentrationen ging die cGMP-Bildung zurück (Abb. 16). Als Lösungsmittel für die ASS wurde DMSO verwendet, das bei Kontrollversuchen in der verwendeten Konzentration jedoch ohne Eigeneffekt blieb (ohne Abbildung).



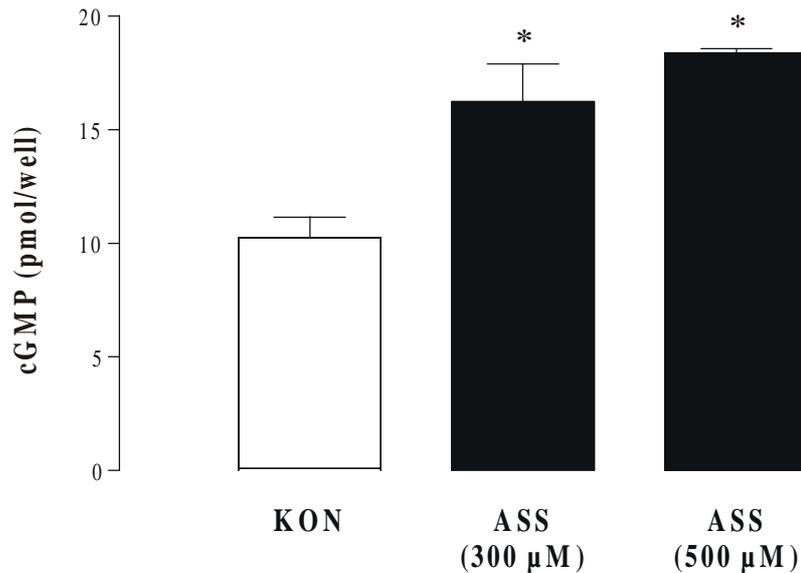
**Abb. 16:** Konzentrationsabhängiger Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Bildung von cGMP in LLC-PK1-Zellen.

LLC-PK1-Zellen wurden 10 Minuten mit Acetylsalicylsäure (1-1000 µM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6-9$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.2.2.2 Messung in vaskulären Schweineaortenzellen

Die primären Endothelzellen aus der Schweineaorta wurden für 10 Minuten mit IBMX vorinkubiert und anschließend für 10 Minuten mit ASS stimuliert. Bei Konzentrationen von 300 µM und 500 µM wurde eine signifikante Erhöhung des basalen cGMP-Spiegels gemessen (Abb. 17).



**Abb. 17:** Effekt von Acetylsalicylsäure auf die Bildung von cGMP in vaskulären Schweineaortenzellen.

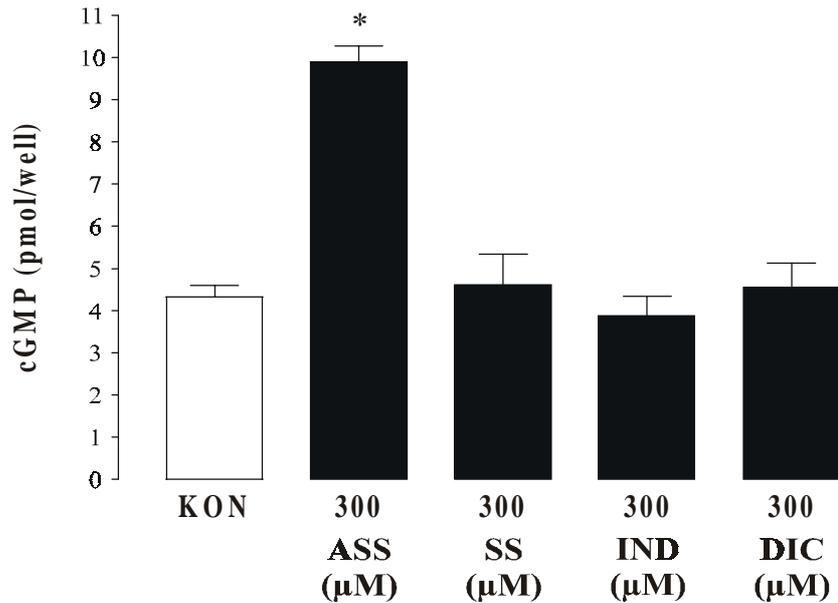
PAE wurden 10 Minuten mit Acetylsalicylsäure (ASS, 300-500 µM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.2.3 cGMP-Stimulation durch Acetylsalicylsäure im Vergleich mit anderen nichtsteroidalen Antiphlogistika

Obwohl bekannt ist, dass die Zelllinie LLC-PK1 keine detektierbare Prostaglandinbildung aufweist (Lifschitz 1982), wurden zusätzlich Experimente mit weiteren NSAIDs durchgeführt, um zu zeigen, dass die cGMP-Stimulation durch ASS tatsächlich unabhängig von deren Wirkung auf den Prostaglandinstoffwechsel ist.

Die Zellen wurden für 10 Minuten mit Salicylsäure, Indometacin oder Diclofenac in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Bei keiner der verwendeten Konzentrationen konnte für die Substanzen eine signifikante Erhöhung des cGMP-Spiegels festgestellt werden. Abbildung 18 zeigt die cGMP-Stimulation von Salicylsäure, Indometacin und Diclofenac bei einer Konzentration von 300 µM im Vergleich zu ASS (300 µM).



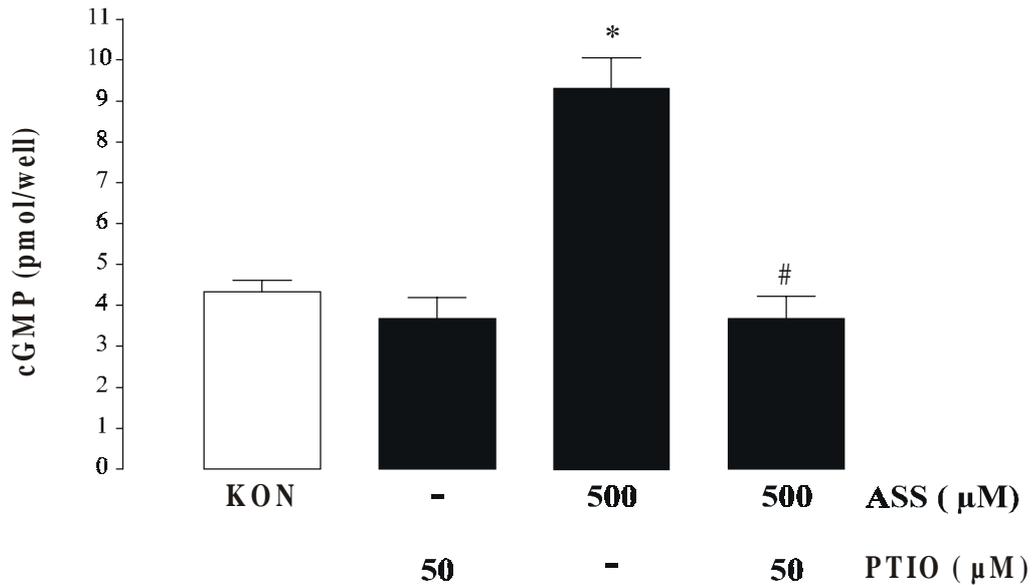
**Abb. 18:** cGMP-Stimulation durch Acetylsalicylsäure (ASS) im Vergleich mit Salicylsäure (SS), Indometacin (IND) und Diclofenac (DIC).

LLC-PK1-Zellen wurden 10 Minuten mit den NSAIDs (300 µM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.2.4 Effekt des NO-Radikalfängers PTIO auf die cGMP-Bildung durch Acetylsalicylsäure

In Versuch 4.1.4 wurde mit Hilfe des NO-Radikalfängers PTIO gezeigt, dass die ASS-abhängige Cytoprotektion durch NO vermittelt wurde. Analog sollte deshalb in diesem Experiment untersucht werden, ob die cGMP-Stimulation durch ASS NO-abhängig bzw. PTIO-hemmbar ist. Nach Vorbehandlung mit IBMX wurden die Zellen für 10 Minuten mit PTIO (50 µM) inkubiert. Danach erfolgte die 10-minütige Inkubation mit ASS (500 µM). Die cGMP-Bildung durch den COX-Inhibitor wurde mit PTIO komplett aufgehoben, dabei blieb PTIO allein ohne Effekt (Abb. 19).



**Abb. 19:** Effekt des NO-Radikalfängers PTIO auf die cGMP-Bildung durch Acetylsalicylsäure.

LLC-PK1-Zellen wurden 10 Minuten mit PTIO (50 µM) vorinkubiert und anschließend 10 Minuten mit Acetylsalicylsäure (ASS, 500 µM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6-9$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; # $p < 0,05$  vs. ASS, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

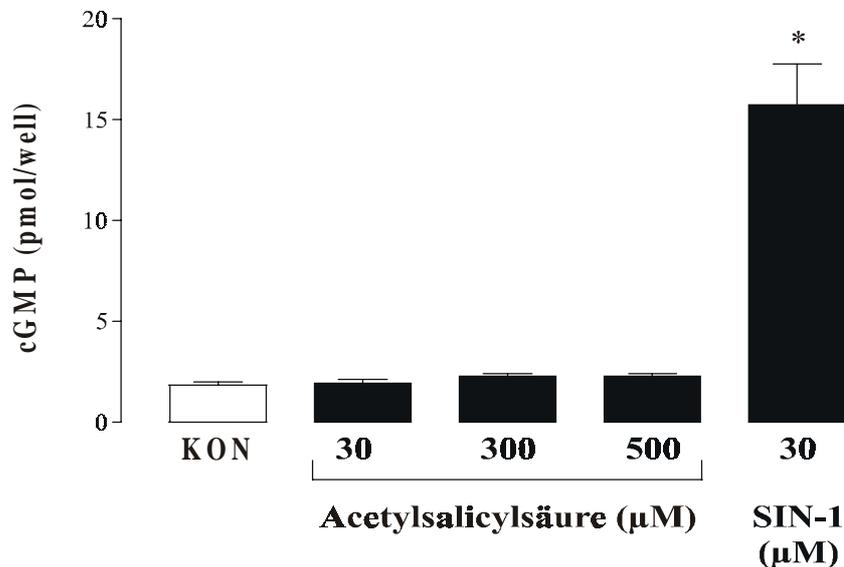
#### 4.2.5 Nachweis der Beteiligung der NO-Synthase an der Acetylsalicylsäure-vermittelten cGMP-Bildung

Durch die Hemmung der ASS-induzierten cGMP-Stimulation mit dem NO-Radikalfänger PTIO konnte nachgewiesen werden, dass in den LLC-PK1-Zellen NO gebildet wird (Abb. 19). Um herauszufinden, ob die NO-Freisetzung über die NO-Synthase vermittelt wird, wurden die folgenden zwei Experimente durchgeführt:

##### 4.2.5.1 Effekt von Acetylsalicylsäure und SIN-1 auf die cGMP-Bildung in RFL-6-Zellen

Kultivierte Fibroblasten aus Rattenlungen (RFL-6) werden als „Reporterzellen“ in einem Bioassay zur Detektion und Quantifizierung von NO verwendet. Sie enthalten eine größere Menge an sGC und können daher nach Inkubation mit exogenem NO aus Zellextrakten oder NO-Donoren cGMP bilden. RFL-6-Zellen sind jedoch wegen fehlender NO-Synthasen nicht in der Lage, endogenes NO zu produzieren (Schröder *et al.* 1988; Murad *et al.* 1990; Ishii *et al.* 1991). Agonisten, die in anderen Zellen oder Geweben NO-Synthase-vermittelte cGMP-Stimulationen hervorrufen, sollten daher in RFL-6-Zellen ohne Einfluss auf die basalen cGMP-Spiegel sein (Negativkontrolle).

Erwartungsgemäß stieg nach einer 10-minütigen Inkubation mit dem spontanen NO-Donor SIN-1 (30  $\mu\text{M}$ ) der cGMP-Spiegel in den Fibroblasten etwa um das 8-fache des Basalwertes an, während die Inkubation mit ASS (30-300  $\mu\text{M}$ ) keine signifikanten Effekte zeigte (Abb. 20).



**Abb. 20:** Effekt von Acetylsalicylsäure und SIN-1 auf die cGMP-Bildung in RFL-6-Zellen.

RFL-6-Zellen wurden 10 Minuten mit Acetylsalicylsäure (30-300  $\mu\text{M}$ ) oder SIN-1 (30  $\mu\text{M}$ ) stimuliert.

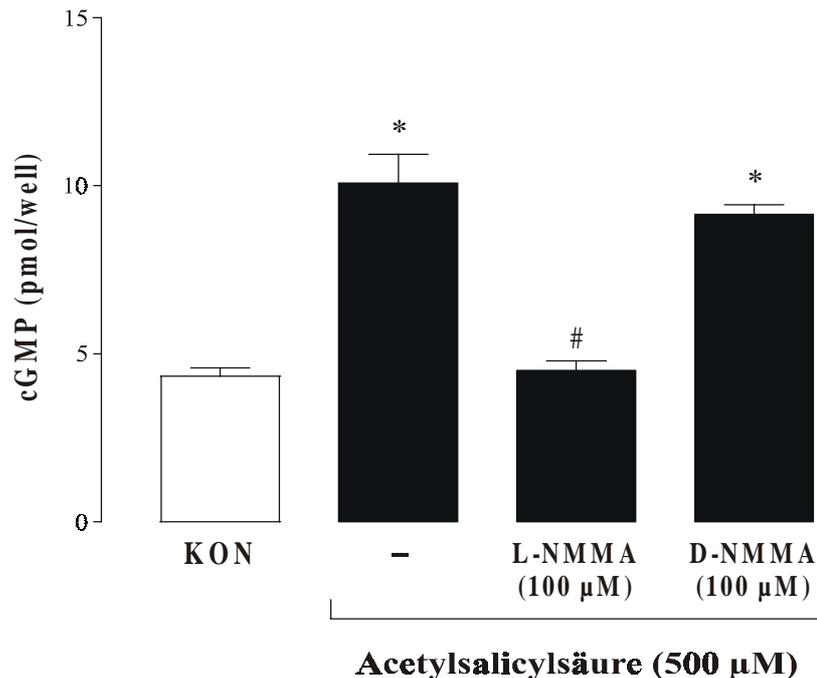
Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.2.5.2 Hemmung der Acetylsalicylsäure-abhängigen cGMP-Akkumulation durch NO-Synthase-Inhibitoren

Der vorhergehende Versuch in RFL-6-Zellen zeigt, dass die cGMP-Bildung nach Inkubation mit ASS an das Vorhandensein einer NO-Synthase gebunden ist.

Im nächsten Experiment wurde nun untersucht, ob die cGMP-Stimulation in den Nierenepithelzellen durch spezifische Hemmstoffe der NO-Synthase aufgehoben werden kann. Wiederum wurde das Arginin-Derivat L-NMMA verwendet, das ohne Präferenzen alle drei Isoformen der NO-Synthase und die Arginin-Aufnahme in die Zelle irreversibel hemmt (Olken und Marletta 1993; Reif und McCredy 1995).

LLC-PK1-Zellen wurden nach Blockade der Phosphodiesterase mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA (25  $\mu\text{M}$ ) oder dem unwirksamen D-Enantiomer als Kontrolle vorinkubiert. Anschließend folgte die 10-minütige Stimulation mit ASS (500  $\mu\text{M}$ ). L-NMMA inhibierte die ASS-abhängige cGMP-Akkumulation vollständig, während das D-Enantiomer aufgrund der Enantioselektivität der NO-Synthasen ohne Effekt blieb (Abb. 21).



**Abb. 21:** Hemmung der Acetylsalicylsäure-abhängigen cGMP-Akkumulation durch NO-Synthase-Inhibitoren.

LLC-PK1-Zellen wurden 10 Minuten mit L- oder D-NMMA (100 µM) vorinkubiert und anschließend 10 Minuten mit Acetylsalicylsäure (500 µM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6-9$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; # $p < 0,05$  vs. ASS, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

#### 4.2.6 Intrazelluläre cGMP-Bildung durch Stimulation der löslichen Guanylylcyclase

In den bisherigen Versuchen wurde demonstriert, dass ASS in Nierenepithelzellen und Endothelzellen die NO-Synthase steigert, die durch Stimulation sGC zur cGMP-Bildung führt.

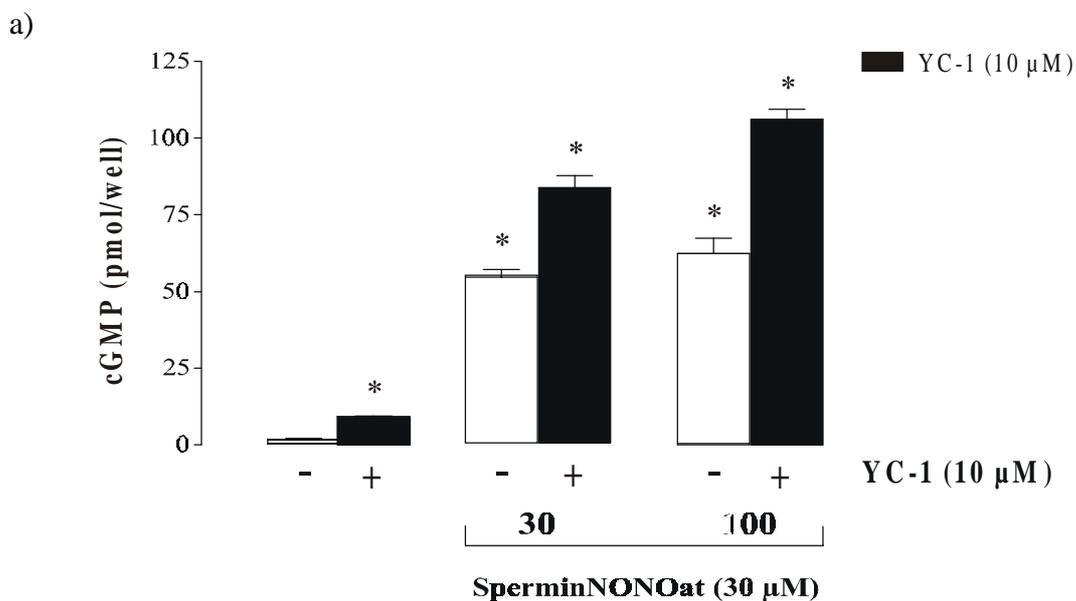
YC-1 ist ein NO-unabhängiger direkter Aktivator der sGC (Ko *et al.* 1994). YC-1 führt in Kombination mit NO oder CO zu einer synergistischen Aktivierung der sGC, die durch ODQ hemmbar ist (Friebe *et al.* 1996; Mülsch *et al.* 1997; Hoenicka *et al.* 1999).

In den folgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob analog zu NO-Donoren auch die ASS-abhängige cGMP-Bildung durch YC-1 potenziierbar ist.

##### 4.2.6.1 Intrazellulärer cGMP-Anstieg durch YC-1 und NO-Donoren

Zunächst wurde jedoch getestet, ob die Kombination von YC-1 mit einem NO-Donor auch in den hier verwendeten Modellsystemen einen synergistischen Effekt auf die cGMP-Bildung ausübt.

Sowohl Nierenepithelzellen (LLC-PK1) (Abb. 22a) als auch primäre vaskuläre Endothelzellen vom Schwein (PAE) (Abb. 22b) wurden in An- und Abwesenheit von YC-1 (10  $\mu$ M) für 10 Minuten mit dem spontanen NO-Donor SperminNONOat (30  $\mu$ M) inkubiert. In beiden Zellsystemen wurde die cGMP-Bildung durch YC-1 allein signifikant gegenüber dem Basalwert stimuliert. SperminNONOat allein erhöhte den cGMP-Spiegel in den Nierenepithelzellen um etwa das 36fache, während der Anstieg in den Endothelzellen nur gering war (etwa 3,6-fach). Die Kombination von YC-1 mit SperminNONOat zeigte in beiden Zelllinien einen synergistischen Effekt. Die gleichzeitige Inkubation mit YC-1 führte in LLC-PK1- und in Endothelzellen zu einer zwei- bzw. siebenfachen Steigerung der cGMP-Stimulation durch SperminNONOat. Das Lösungsmittel DMSO hatte in den verwendeten Konzentrationen auf die cGMP-Bildung in beiden Zellsystemen keine Wirkung.

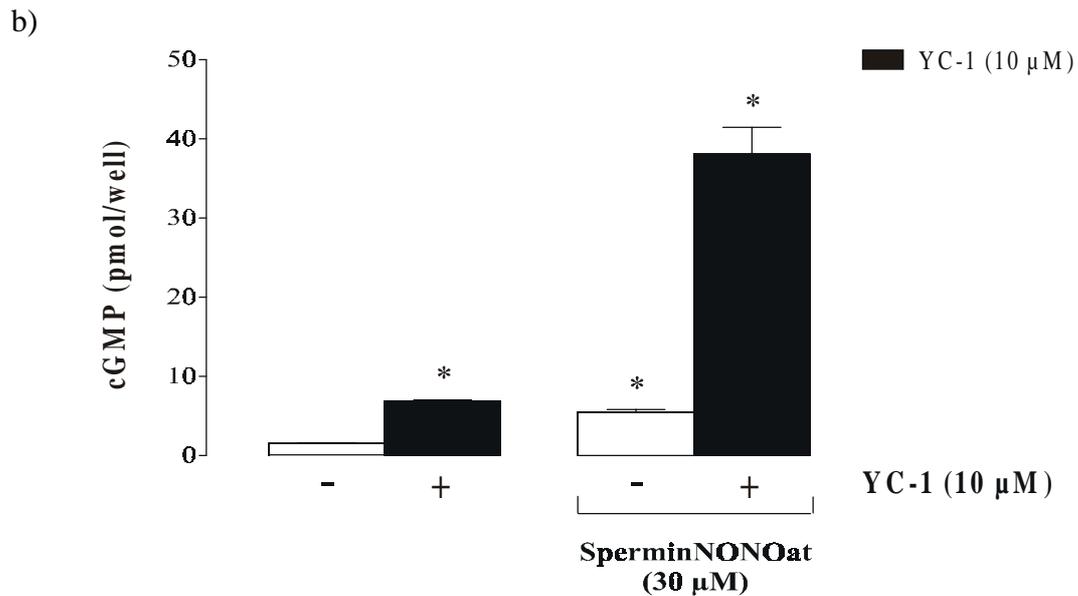


**Abb. 22:** Effekt von SperminNONOat in An- und Abwesenheit von YC-1 auf intrazelluläres cGMP:

a) in LLC-PK1-Nierenepithelzellen.

LLC-PK1-Zellen wurden 10 Minuten mit YC-1 (10  $\mu$ M) und SperminNONOat (30-100  $\mu$ M) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.



**Abb. 22:** Effekt von SperminNONOat in An- und Abwesenheit von YC-1 auf intrazelluläres cGMP:

b) in primären vaskulären Endothelzellen (PAE).

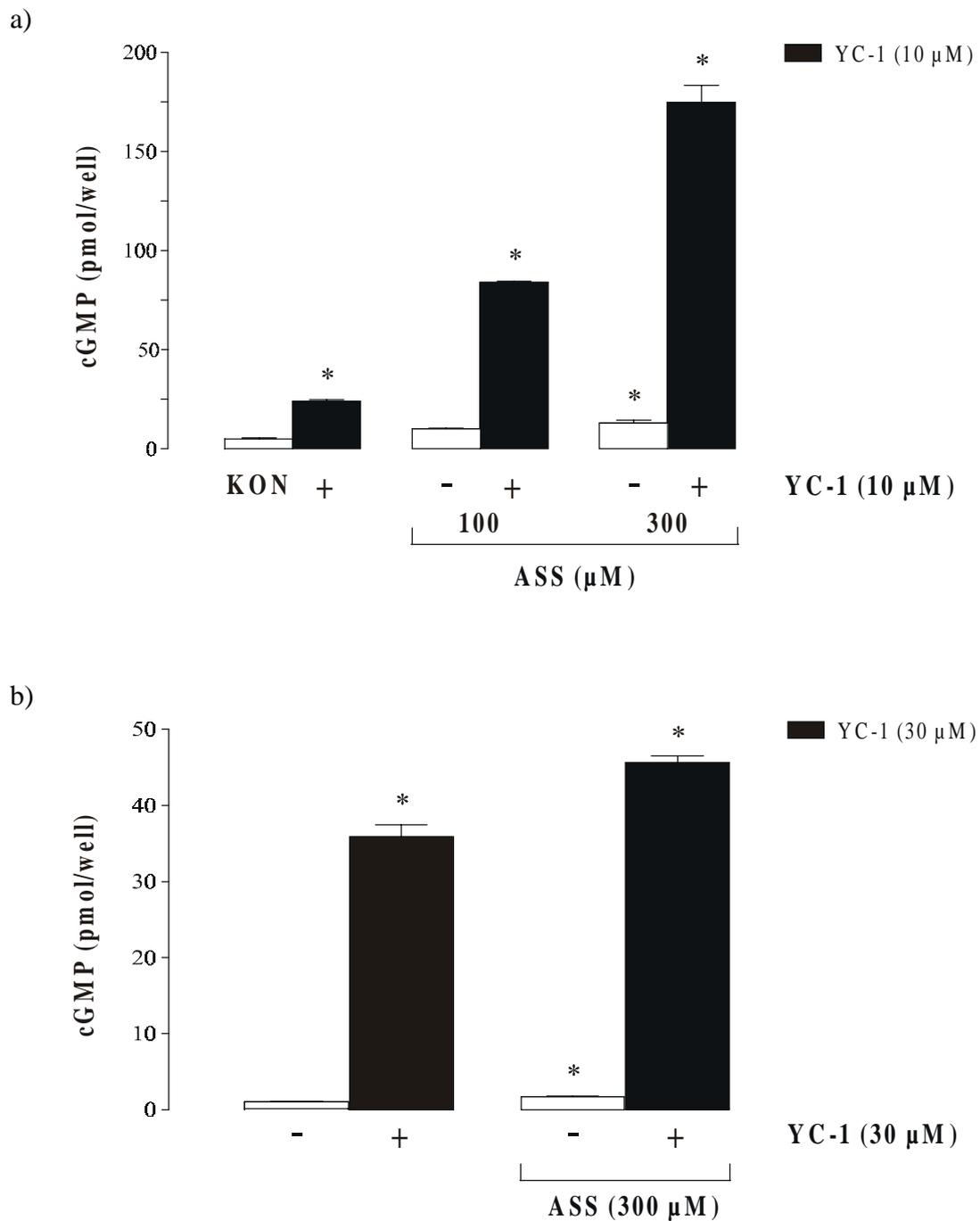
PAE wurden 10 Minuten mit YC-1 (10 μM) und SperminNONOat (30 μM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 3 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.2.6.2 Stimulation der cGMP-Bildung durch YC-1 und Acetylsalicylsäure

Im Folgenden wurde der Effekt einer Kombination von ASS und YC-1 auf die intrazelluläre cGMP-Bildung in LLC-PK1-Zellen und in Endothelzellen untersucht.

Beide Zelllinien wurden in An- und Abwesenheit von YC-1 (30 μM) mit ASS (100 und 300 μM) inkubiert. Wie erwartet, führte auch die Kombination des sGC-Aktivators mit ASS in LLC-PK1-Zellen (Abb. 23a) und in Endothelzellen (Abb. 23b) zu einer überadditiven Erhöhung der cGMP-Spiegel.



**Abb. 23:** Synergistische Effekte von Acetylsalicylsäure und YC-1 auf die cGMP-Bildung:  
a) in LLC-PK1-Nierenepithelzellen.

LLC-PK-1 wurden 10 Minuten mit YC-1 (30 μM) und Acetylsalicylsäure (100-300 μM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

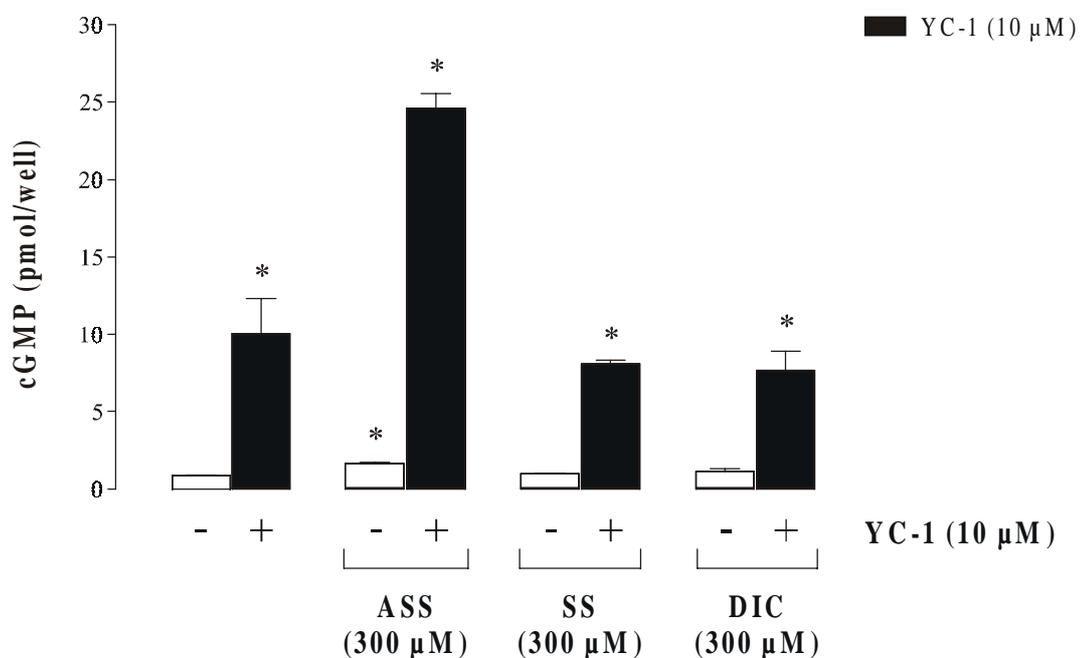
b) in primären vaskulären Endothelzellen (PAE).

PAE wurden 10 Minuten mit YC-1 (30 μM) und Acetylsalicylsäure (300 μM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 3 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.2.6.3 Effekte anderer NSAIDs auf die YC-1-induzierte cGMP-Biosynthese

Mit YC-1 steht ein Hilfsmittel zur Verfügung, um bisher kaum detektierbare Mengen an NO durch Bestimmung seines „second messenger“ cGMP messbar zu machen (Schmidt *et al.* 2001). In den vorhergehenden Experimenten konnte nur durch ASS eine cGMP-Bildung detektiert werden, während andere COX-Inhibitoren diese Wirkung nicht hatten. Eine Beteiligung des Prostaglandinstoffwechsels erschien deshalb unwahrscheinlich. Um dies völlig auszuschließen, wurden Nierenepithelzellen mit ASS, Salicylsäure oder Indometacin allein (jeweils 300  $\mu$ M) und in Kombination mit YC-1 (10  $\mu$ M) inkubiert. Wiederum zeigte sich nur mit ASS eine Potenzierung der cGMP-Akkumulation durch YC-1. Selbst Salicylsäure, die als deacetylierter ASS-Metabolit nur einen geringen strukturellen Unterschied zur Muttersubstanz aufweist, war unter diesen Bedingungen wirkungslos (Abb. 24).



**Abb. 24:** Vergleich der cGMP-Akkumulation durch YC-1 in Kombination mit ASS und anderen COX-Inhibitoren.

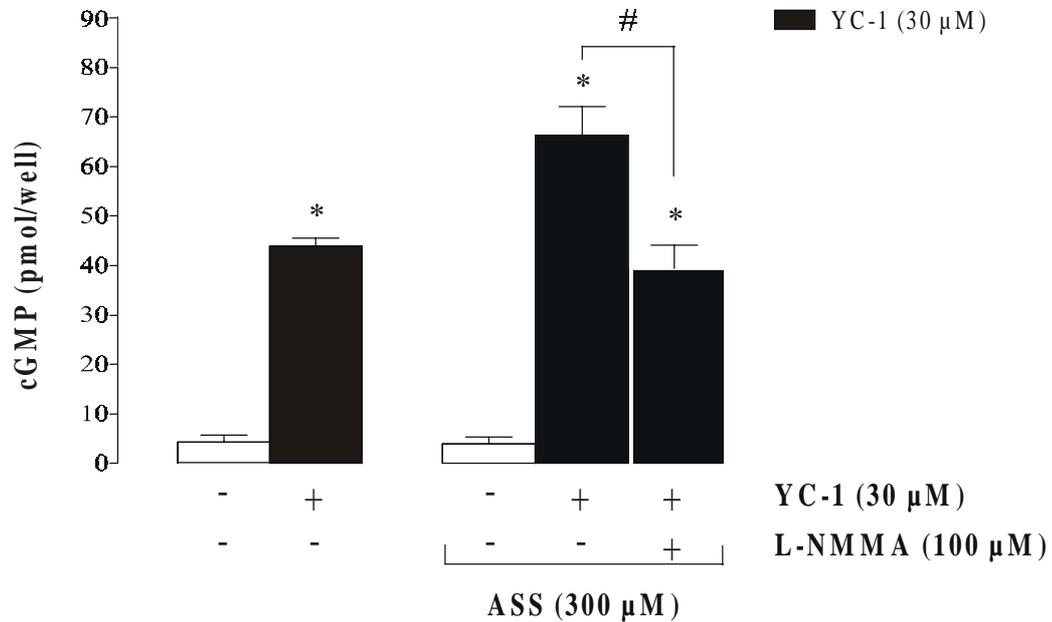
LLC-PK1-Zellen wurden 10 Minuten mit YC-1 (10  $\mu$ M) und den NSAIDs (300  $\mu$ M) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 3-6 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#### 4.2.6.4 Modulation des YC-1- und Acetylsalicylsäure-Synergismus durch NO-Synthase-Inhibitoren

Um festzustellen, ob die Potenzierung der cGMP-Stimulation durch ASS (300  $\mu$ M) in Kombination mit YC-1 (30  $\mu$ M) über den L-Arginin-NO-Weg vermittelt wird, wurden

LLC-PK-1-Zellen mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA (100  $\mu\text{M}$ ) für 10 Minuten vorinkubiert. Die Inhibition der NO-Synthase blockierte den ASS-abhängigen Anteil des cGMP-Anstiegs vollständig. (Abb. 25).



**Abb. 25:** Effekt von L-NMMA auf die cGMP-Akkumulation durch YC-1 und Acetylsalicylsäure.

LLC-PK-1 wurden 10 Minuten mit L- oder D-NMMA (100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend 10 Minuten mit YC-1 (30  $\mu\text{M}$ ) und Acetylsalicylsäure (300  $\mu\text{M}$ ) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 6-9$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; # $p < 0,05$  vs. ASS + YC-1, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

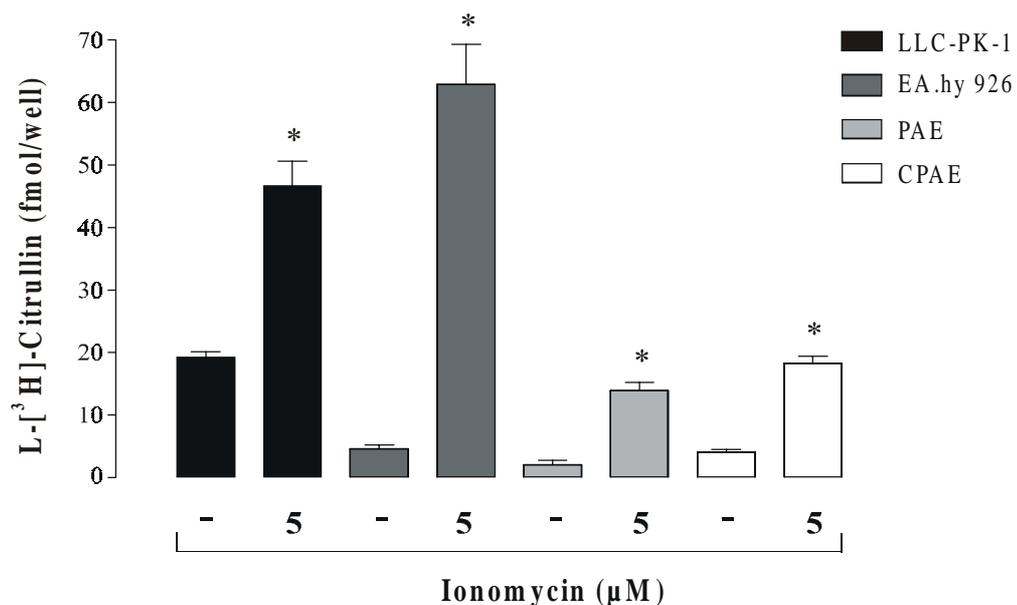
#### **4.2.7 Zusammenfassung**

Sowohl in Nierenepithelzellen (LLC-PK1) als auch in primären Endothelzellen (PAE) führte ASS konzentrationsabhängig zur Bildung des cyclischen Nukleotids cGMP. Da die LLC-PK1-Zellen keinen Arachidonsäure-Stoffwechsel aufweisen, und andere COX-Inhibitoren (Salicylsäure, Indometacin oder Diclofenac) ohne Effekt auf die endotheliale cGMP-Akkumulation blieben, scheint der ASS-Effekt unabhängig von der Hemmung der Prostaglandinbildung zu sein. Versuche mit dem NO-Radikalfänger PTIO, dem NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA und dem direkten Aktivator der sGC, YC-1, demonstrierten, dass die ASS-induzierte cGMP-Stimulation über eine Aktivierung des L-Arginin-NO-Stoffwechselwegs vermittelt wird.

### 4.3 Bestimmung der NO-Synthase-Aktivität

Mit Hilfe der Bestimmung der NO-Synthase-Aktivität sollte untersucht werden, ob eine kurzzeitige Inkubation mit ASS auch zu einer Aktivierung der NO-Synthase in Endothelzellen führen kann.

Zur optimalen Bestimmung der NO-Synthase-Aktivität wurde das Zellsystem mit der höchsten Enzym-Aktivität gesucht. Der Calcium-Ionophor Ionomycin ( $5 \mu\text{M}$ ), ein potenter Aktivator der endothelialen NO-Synthase, diente bei diesen Messungen als Standardsubstanz. Zusätzlich zu den bereits verwendeten Zellsystemen wurden humane immortalisierte Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (EA.hy 926) getestet, von denen bekannt ist, dass sie größere Mengen an endothelialer NO-Synthase enthalten (Schoedon *et al.* 1993; Ziegler *et al.* 1998; Li und Förstermann 2000). Im Vergleich aller eingesetzten Zelllinien zeigte dieser Zelltyp nach Stimulation mit Ionomycin die höchste NO-Synthase-Aktivität, gemessen als Bildung von L-[ $^3\text{H}$ ]-Citruillin (Abb. 26). Daher wurden die folgenden Untersuchungen an dieser Zelllinie durchgeführt.

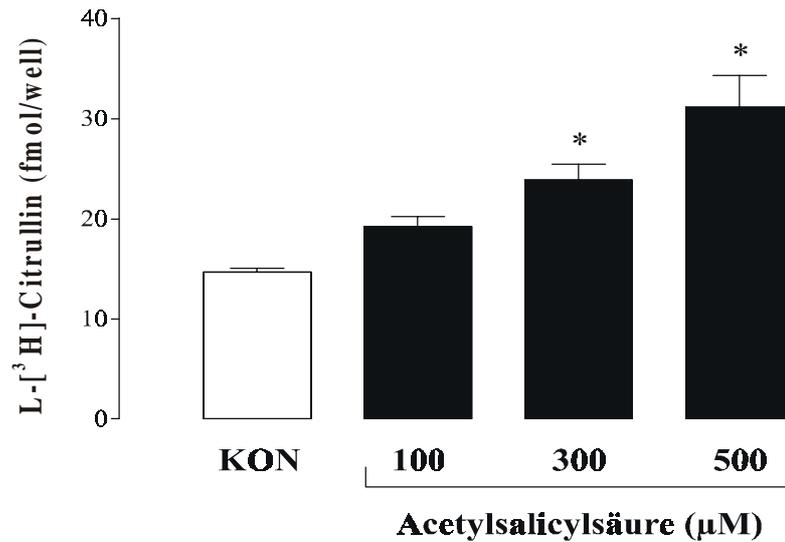


**Abb. 26:** Vergleich der NO-Synthase-Aktivität in verschiedenen Zellsystemen.

Die Zellen wurden 15 Minuten mit Ionomycin ( $5 \mu\text{M}$ ) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  Experimenten; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Steigende Konzentrationen von ASS ( $100\text{-}500 \mu\text{M}$ ) erhöhten die Bildung von L-[ $^3\text{H}$ ]-Citruillin signifikant (Abb. 27). Als Positivkontrolle des Systems wurde bei jeder Aktivitätsbestimmung auch das Calcium-Ionophor Ionomycin ( $5 \mu\text{M}$ ) getestet (Ergebnisse nicht dargestellt). Das verwendete Lösungsmittel DMSO zeigte unter den gleichen Versuchsbedingungen keinen Effekt.

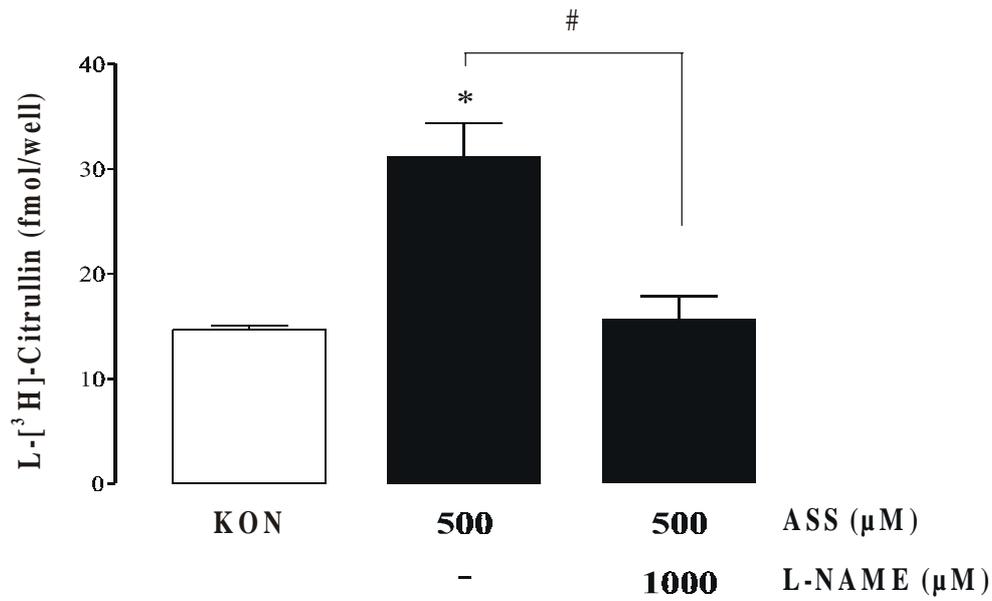


**Abb. 27:** Konzentrationsabhängige Stimulation der NO-Synthase-Aktivität durch Acetylsalicylsäure.

Humane Endothelzellen (EA.hy 926) wurden 15 Minuten mit Acetylsalicylsäure (100-500 μM) stimuliert.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 3 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Um zu prüfen, ob die ASS-induzierte Erhöhung des L-[<sup>3</sup>H]-Citruillin-Spiegels tatsächlich durch die NO-Synthase vermittelt wird, wurden die EA.hy-Zellen vor der Inkubation mit ASS (500 μM) und dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME (1 mM) vorbehandelt. Wie erwartet, wurde der ASS-Effekt durch L-NAME gehemmt (Abb. 28).



**Abb. 28:** Hemmung der Acetylsalicylsäure-abhängigen NO-Synthase-Aktivierung durch L-NAME

Humane Endothelzellen wurden 15 Minuten mit Acetylsalicylsäure (500 μM) in An- und Abwesenheit von L-NAME (1 mM) stimuliert.

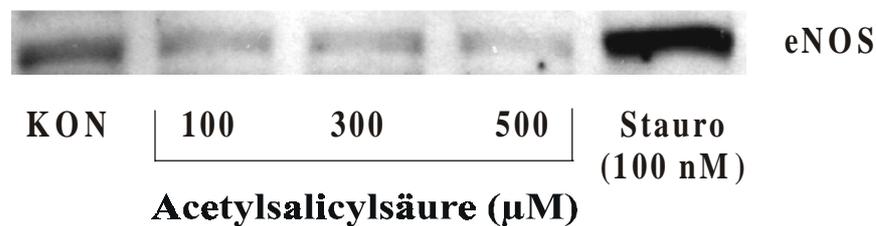
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 3 Experimenten; \*p < 0,05 vs. Kontrolle (KON), einseitige ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest; #p < 0,05 vs. ASS, t-Test nach Student für unverbundene Stichproben.

### **4.3.1 Zusammenfassung**

ASS führt in Endothelzellen zu einer Steigerung der NO-Synthase-Aktivität. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und konnte durch den NO-Synthase-Inhibitor L-NAME inhibiert werden. Aufgrund der kurzen Inkubationszeiten kann angenommen werden, dass es sich nicht um eine Neusynthese des NO-Synthase-Proteins gehandelt hat, sondern um eine Aktivierung exprimierter NO-Synthasen.

#### 4.4 Effekt von Acetylsalicylsäure auf die eNOS-Proteinexpression

Obwohl die eNOS konstitutiv exprimiert ist, konnte gezeigt werden, dass sie auch auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (Sessa 1994). Neben der NO-Synthase-Aktivierung wurde daher zusätzlich untersucht, ob ASS auch die Proteinexpression der eNOS beeinflusst. Humane Endothelzellen (EA.hy 926) wurden für 8 Stunden mit ASS (100-500  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Anschließend wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Abbildung 29 zeigt, dass ASS unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Induktion des eNOS-Proteins hat. Als Positivkontrolle diente der Proteinkinase C Inhibitor Staurosporin (100 nM), der die eNOS-Expression signifikant erhöhte (Ohara 1995; Li und Förstermann 2000).



**Abb. 29:** Einfluss von Acetylsalicylsäure und Staurosporin auf die eNOS-Proteinexpression.

Humane Endothelzellen wurden 8 Stunden mit Acetylsalicylsäure (100-500  $\mu\text{M}$ ) und Staurosporin (100 nM) inkubiert.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot.

## 5 Diskussion

Oxidativer Stress wird heute als einer der kritischen Faktoren für chronische Schädigung des Endothels und Entstehung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen angesehen (Halliwell 1993; Harrison 1997; Cai und Harrison 2000; Zalba *et al.* 2000). Zahlreiche Risikofaktoren (z.B. Diabetes oder Bluthochdruck) sind mit einer vermehrten Bildung von ROS assoziiert (Vogel 1997). Deshalb besteht neben der Reduktion der Risikofaktoren auch großes Interesse an antioxidativen Interventionen zur Therapie atherosklerotischer Erkrankungen (Stephens *et al.* 1996; Yusuf *et al.* 2000; Meagher und Rader 2001).

NO-Donoren können Endothelzellen vor oxidativem Stress schützen (Oberle und Schröder 1997; Polte *et al.* 1997a) und endotheliale Dysfunktion *in vivo* günstig beeinflussen (Maier *et al.* 2000; Kurowska 2002). Angesichts analoger Befunde für ASS (Podhaisky *et al.* 1997; Husain *et al.* 1998) sollte in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beteiligung von NO an der endothelprotektiven Funktion dieser Substanz untersucht werden.

Das Ausmaß der Cytoprotektion wurde mit Hilfe von Viabilitätsassays bestimmt. Mit zwei methodisch verschiedenen Viabilitätsassays (Kristallviolett- und LDH-Assay) wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Als cytotoxisches Agens wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet, das in biologischen Systemen unter anderem zu reaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt wird. Dieses Radikal ist für Zellschäden verantwortlich, die schließlich über nekrotische Prozesse, wie Lipidperoxidation, Inaktivierung von Enzymen und DNA-Strangbrüchen zum Zelltod führen (Ward 1991; Richter *et al.* 1995). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ASS analog zu dem spontanen NO-Donor SIN-1 Endothelzellen vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Cytotoxizität schützt. Diese Befunde erwiesen sich als nicht zelllinienspezifisch, da ASS in vergleichbaren niedrigen Konzentrationen sowohl in Endothelzellen aus Rinderpulmonalarterien als auch in Schweineaortenzellen cytoprotektiv war. Sie stehen außerdem in Einklang mit früheren Studien, nach denen ASS das Auftreten von Zellschädigungen reduziert (Podhaisky *et al.* 1997; Saini *et al.* 1998; Wahn und Hammerschmidt 1998; Shi *et al.* 1999; Mattie und Freedman 2001) und die Oxidation von Plasmaproteinen, wie Fibrinogen und oxLDL *in vivo* und *in vitro*, verhindert (Boerboom *et al.* 1987; Steer *et al.* 1997; Upchurch Jr *et al.* 1998).

Es gibt Hinweise darauf, dass ASS über bislang ungeklärte Mechanismen die Bildung von NO in nicht-endothelialen Zellen induzieren kann (Lopez-Farre *et al.* 1995; Lopez-Farre *et al.* 1996; Monobe *et al.* 2001). Da NO u.a. Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen vor oxidativen Schädigungen schützen kann (Yates *et al.* 1992; Wink, Cook *et al.* 1996; Polte *et al.* 1997a), stellte sich die Frage, ob auch die ASS-abhängige Cytoprotektion durch NO vermittelt ist. In der vorliegenden Arbeit deuten Experimente mit dem direkten NO-Radikalfänger PTIO (Akaike und Maeda 1996) auf die Beteiligung von NO-Radikalen an der Endothelprotektion durch ASS hin. Unterstützt werden diese Befunde durch Versuche mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA. L-NMMA ist ein am terminalen Guanidin-Stickstoff substituiertes Derivat des L-Arginin ohne NO-Synthase Isoformselektivität, das auch in klinischen Studien Anwendung findet (Cotter *et al.* 2000).

Es wurden nur geringe Konzentrationen dieses kompetitiven Inhibitors benötigt, um die ASS-Protektion vollständig aufzuheben. Die spezifische Wirkung von L-NMMA als Hemmstoff der L-Arginin-abhängigen NO-Synthese wurde durch Kontrollexperimente mit dem D-Enantiomer D-NMMA belegt. D-NMMA zeigte unter den gleichen Bedingungen keinen Einfluss auf die zellprotektiven Effekte von ASS.

Die Familie der NO-Synthasen katalysiert die oxidative Metabolisierung von L-Arginin zu L-Citrullin unter Abspaltung von NO. Neben einer induzierbaren NO-Synthase existieren die konstitutiv exprimierten Isoenzyme der endothelialen und neuronalen NO-Synthase. (Förstermann *et al.* 1993; Förstermann, Pollock *et al.* 1994).

Interessanterweise zeigten die Arbeiten von Amin (1995), Kepka-Lenhart (1996) und Farivar (1996), dass ASS und seine Derivate in Makrophagen bzw. Fibroblasten die LPS- oder Interleukin-induzierte iNOS-Synthese inhibieren. Im Gegensatz dazu wurde in glatten Gefäßmuskelzellen mit ASS eine erhöhte NO-Bildung und iNOS-Induktion nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  gemessen (Shimpo *et al.* 2000). In diesen früheren Studien wurden hohe ASS-Konzentrationen im millimolaren Bereich verwendet. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit deutlich niedrigere Konzentrationen (< 500  $\mu$ M) eingesetzt, die die iNOS-Induktion nicht beeinflussen (Yamamoto *et al.* 1999). Die Neusynthese der induzierbaren NO-Synthase erfolgt mit einer Latenzzeit von 6-8 Stunden. Über posttranslationale Modifikationen, die die Aktivität der iNOS nach ihrer Induktion verändern könnten, ist bisher nichts bekannt (Förstermann *et al.* 1998). In den hier beschriebenen Versuchen zur Messung intrazellulärer cGMP-Spiegel wurden die Zellen maximal 10 Minuten mit ASS inkubiert. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei der Wirkung von ASS um eine Aktivierung vorhandener NO-Synthasen, und nicht um eine Induktion und Neusynthese handelt. In den in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen wird nur die endotheliale NO-Synthase konstitutiv exprimiert (Förstermann, Closs *et al.* 1994; Hecker *et al.* 1994; Tracey *et al.* 1994), und es ist bereits eine kurze Stimulation (Minuten) ausreichend, um sie zu aktivieren. Dies spricht ebenso wie die Experimente mit L-NMMA dafür, dass die ASS-abhängigen Effekte nicht nur auf einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO beruhen, sondern dass ursächlich NO-Synthasen an diesem Effekt beteiligt sind. Obwohl die eNOS ein konstitutiv vorliegendes Enzym ist, konnte eine transkriptionelle Regulation durch verschiedene Induktoren gezeigt werden (Förstermann *et al.* 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western-Blot-Analysen zeigten jedoch, dass ASS die eNOS-Expression in den verwendeten Konzentrationen nicht beeinflusste.

An der Regulation der NO-Synthasen sind zahlreiche Faktoren beteiligt. Die Substrate für die NO-Synthase-medierte NO-Produktion sind die Aminosäure L-Arginin, molekularer Sauerstoff und NADPH. Kofaktoren, die für die NO-Bildung benötigt werden, sind Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), FAD und FMN. Außerdem besitzt das Enzym Bindungsstellen für Häm und Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin. Als zusätzliche Regulationsmechanismen der NO-Synthasen werden Autoinhibition, Protein-Protein-Interaktionen, Acylierungen (Myristoylisierung und Palmitoylisierung), Enzym-Monomerisierung sowie Phosphorylierungen diskutiert. Die Regulation der eNOS-Aktivität durch

Phosphorylierung von Serin-1177 und Threonin-495 ist ein komplexer Vorgang, an dem mindestens fünf Proteinkinasen beteiligt sind. Eine ganze Reihe von Stimulatoren wie „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „shear stress“, Insulin und Estrogen aktivieren eNOS durch Serin-1177 Phosphorylierung mittels der Proteinkinase B (Akt) (zur Übersicht siehe Fulton *et al.* 2001; Govers und Rabelink 2001).

Ein vergleichbarer Wirkmechanismus wird unter anderem für die Arzneistoffe aus der Gruppe der Statine diskutiert (Kureishi *et al.* 2000). Statine hemmen die Aktivität der 3-Hydroxyl-3-methyl-glutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Cholesterol-Biosynthese katalysiert. Sie werden zur Senkung des Serum-Cholesterolspiegels bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie angewendet um das Risiko einer kardiovaskulären Folgeerkrankung zu senken (Kjekshus und Pedersen 1995). Es zeigte sich *in vivo*, dass Statine vor Schlaganfällen (Endres und Laufs 1998), ischämischen Reperfusionsschäden am Herzen (Lefer *et al.* 1999) und inflammatorischen Prozessen in der Gefäßwand (Pruefer *et al.* 1999) schützen, indem sie die endotheliale NO-Produktion erhöhen. Eine Stimulation der NO-Synthese durch Statine wurde auch in kultivierten Zellen beobachtet (Chen *et al.* 2001; Kalinowski *et al.* 2002). Als ursächliche Mechanismen kommen eine gesteigerte eNOS-Expression (Tannous *et al.* 1999), aber auch posttranslationale Modifikationen des Enzyms in Frage. Kureishi und Mitarbeiter (2000) wiesen nach, dass Simvastatin und Pravastatin vermutlich über Phosphoinositol-3-kinase die Phosphorylierung von Akt induzieren und somit die Proteinkinaseaktivität erhöhen. Akt mediiert anschließend die Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase und dadurch deren Aktivierung.

Dagegen beschrieben Feron und Mitarbeiter (2001) für Atorvastatin eine Erhöhung der NO-Produktion durch Hemmung der Caveolin-1-Expression. Das spezifische Strukturprotein Caveolin-1 befindet sich in großen Mengen in kleinen, cholesterolreichen Einstülpungen des Plasmalemmas, den sogenannten Caveolae, und dient als Bindeglied für zahlreiche an der Signaltransduktion beteiligte Proteine, wie z.B. die eNOS (Anderson 1993; Lisanti *et al.* 1994). Die Caveolin-eNOS-Komplexe unterliegen einem ständigen calciumabhängigen Kreislauf von Dissoziation (Aktivierung der eNOS) und Reassoziaton (Deaktivierung der eNOS). Hemmung der Caveolin-1-Expression führt zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an die eNOS und damit zu deren Aktivierung.

Außer den Statinen können auch andere therapeutisch angewendete Substanzen die NO-Synthase-Aktivität erhöhen. So konnten zwei Arbeitsgruppen (Heller *et al.* 1999; Huang *et al.* 2000) unabhängig voneinander zeigen, dass Ascorbinsäure über chemische Stabilisierung des NO-Synthase-Kofaktors Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) die Aktivität des Enzyms potenziert.  $\text{BH}_4$  ist eines der stärksten natürlich vorkommenden Reduktionsmittel. Es konnte *in vitro* und *in vivo* demonstriert werden, dass oxidativer Stress zu einer massiven Oxidation von  $\text{BH}_4$  und somit zu einem Mangel des Kofaktors führt. Dies könnte eine wesentliche Ursache für die reduzierte NO-Bildung im Verlauf der Atherogenese sein.

Auch Arzneistoffe, die in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eingreifen (ACE-Hemmer und  $\text{AT}_1$ -Blocker) (Hornig *et al.* 1998), und Calciumkanalblocker wie Amlodipin (Zhang *et al.* 1997) erwiesen sich vor allem über einen Bradykinin-vermittelten Mechanismus als Aktivatoren der NO-Synthase. Vasoaktive Substanzen wie Bradykinin,

Acetylcholin und Rezeptor-unabhängige Stimuli wie Calciumionophore (Newby und Henderson 1990) erhöhen den intrazellulären Calciumspiegel und regulieren dadurch die eNOS-Aktivität.

Ob ASS über einen der oben genannten Wege die NO-Synthase-Aktivität erhöht oder ein anderer Mechanismus (z.B. Erhöhung der Arginin-Aufnahme in die Zelle) zugrunde liegt, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Signaltransduzierende Funktionen von NO werden über den „second messenger“ cGMP mediiert. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Beteiligung dieses Botenstoffs an der ASS-Cytoprotektion untersucht.

Das Oxadiazolquinoxalinderivat ODQ ist ein selektiver und potenter Inhibitor der sGC und besitzt keine Effekte auf die partikuläre Guanylylcyclase oder Adenylylcyclase (Garthwaite et al. 1995; Moro et al. 1996). Die Verwendung des sGC-Inhibitors ODQ erlaubt daher die Prüfung von funktionellen NO-Effekten auf ihre cGMP-Abhängigkeit. Als Wirkmechanismus wird eine zu GTP nicht-kompetitive und zu NO kompetitive Bindung an die Hämgruppe der sGC diskutiert (Schrammel *et al.* 1996; Olson *et al.* 1997). In Konzentrationen, die auch von anderen Autoren verwendet wurden (Polte *et al.* 2000), zeigte ODQ keine Eigeneffekte. Die ASS-vermittelte Endothelprotektion wurde jedoch vollständig durch sGC-Inhibition aufgehoben. In Experimenten mit einem membrangängigen cGMP-Derivat (8-Bromo-cGMP) konnte eine direkte zellprotektive Funktion von cGMP demonstriert werden. Diese Befunde stellen ein erstes Indiz für die regulatorische Funktion von cGMP im Rahmen der ASS-abhängigen Endothelprotektion dar. Zum direkten Nachweis eines Effekts von ASS auf das sGC/cGMP-System wurden die intrazellulären cGMP-Spiegel nach Inkubation mit ASS gemessen.

Die Untersuchungen wurden sowohl in primären Endothelzellen (PAE) als auch in Nierenepithelzellen (LLC-PK1) durchgeführt. Die etablierte Zelllinie LLC-PK1 wird aufgrund ihrer hohen Sensitivität in zahlreichen Studien zur Untersuchung von regulatorischen Prozessen der NO-abhängigen sGC-Aktivierung verwendet (Bennett *et al.* 1989; Schröder und Schrör 1990; Grosser und Schröder 2000). LLC-PK1-Zellen enthalten nicht nur große Mengen an sGC, sondern auch eNOS, die das quantitativ wichtigste Isoenzym im Endothel darstellt (Tracey *et al.* 1994). In beiden Zellsystemen führte ASS konzentrationsabhängig zur Akkumulation des cyclischen Nukleotids cGMP. Die cGMP-Erhöhung erwies sich in LLC-PK1-Zellen ab einer ASS-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  als signifikant und erreichte ein Maximum bei 300  $\mu\text{M}$ . In den Versuchen zur Endothelprotektion wurde eine maximale Protektion bei 10  $\mu\text{M}$  (CPAE) bzw. 20  $\mu\text{M}$  (PAE) erzielt. In höheren Konzentrationen überwog der eigentoxische Effekt von ASS. Dadurch war es nicht möglich, Aussagen über die Wirkung von ASS in höheren Konzentrationen (z.B. 300  $\mu\text{M}$ ) auf die Endothelprotektion zu treffen.

Die Beteiligung des L-Arginin-NO-Stoffwechselwegs an der ASS-induzierten cGMP-Stimulation konnte in drei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen verifiziert werden: (1) In LLC-PK1-Zellen wurde der ASS-vermittelte cGMP Anstieg durch den NO-Radikalfänger PTIO vollständig gehemmt. (2) Die Inhibition der L-Arginin-abhängigen NO-Synthase mit L-NMMA führte in LLC-PK1-Zellen ebenfalls zur Aufhebung des

ASS-Effekts auf die cGMP-Akkumulation. (3) In NO-Synthase-defizienten RFL-6-Zellen (Ishii *et al.* 1991) blieb ASS ohne Einfluss auf die basalen cGMP-Spiegel.

Die NO- und sGC-Abhängigkeit stimulatorischer ASS-Effekte auf die intrazelluläre cGMP-Bildung wurde darüber hinaus mit der Modellsubstanz YC-1 untersucht. YC-1 ist ein direkter, NO-unabhängiger sGC-Stimulator. In Kombination mit NO, CO und Protoporphyrin IX, der eisenfreien Vorform von Häm, verursacht YC-1 eine synergistisch gesteigerte sGC-Aktivierung, die durch ODQ hemmbar ist (Friebe *et al.* 1996; Mülsch *et al.* 1997; Hoenicka *et al.* 1999). YC-1 sensibilisiert das isolierte Enzym gegenüber seinen gasförmigen Liganden NO und CO, was sich in einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve beider Stimulatoren in Kombination mit YC-1 zeigt. Es wird postuliert, dass YC-1 über eine allosterische Bindungsstelle die katalytische Aktivität und die Sensibilität der sGC gegenüber ihren Häm-Liganden moduliert. Dabei werden die Dissoziationsraten für NO und CO vom aktivierten Enzym verlangsamt.

Als NO-unabhängiger, direkter sGC-Aktivator führt YC-1 zu einer überadditiven, synergistischen Verstärkung der NO-abhängigen cGMP-Stimulation, aber auch nachgeschalteter funktioneller Effekte wie Vasorelaxation und Plättchenhemmung (Wu *et al.* 1995; Hoenicka *et al.* 1999; Becker *et al.* 2000; Schmidt *et al.* 2001; Stasch *et al.* 2001). In Übereinstimmung damit wurden in der vorliegenden Arbeit überadditive Steigerungen der intrazellulären cGMP-Akkumulation nach einer kombinierten Gabe von YC-1 und dem spontanen NO-Donor SperminNONOat beobachtet. Als zentraler Befund dieser experimentellen Reihe ist aber die überadditive Stimulation der cGMP-Spiegel durch die Kombination von ASS und YC-1 zu werten. Diese Synergieeffekte traten sowohl in Endothelzellen als auch in renalen LLC-PK1-Zellen auf und dokumentieren klar die Mediatorfunktion von NO bei der ASS-vermittelten Aktivierung der cGMP-Synthese. Die Ergebnisse mit YC-1 bestätigen eindeutig die mit anderen Modulatoren des NO/cGMP-Systems (PTIO, L-NMMA, ODQ) erhobenen Befunde. Zusammenfassend ergibt sich daher folgende Aussage: ASS führt durch Aktivierung des NO-Synthase-Stoffwechselwegs zu einem intrazellulären cGMP- Signal.

ASS zeigt auf zellulärer Ebene ein komplexes Wirkungsspektrum. Im Vordergrund steht dabei meistens die Hemmung der COX-abhängigen Prostaglandin- und Thromboxansynthese. Über diesen Mechanismus lassen sich unterschiedliche ASS-Effekte, wie Analgesie, Entzündungshemmung oder Thrombozytenfunktionshemmung, zumindest teilweise erklären (zur Übersicht siehe Schrör 1992). Arachidonsäure-Metabolite interagieren darüber hinaus mit anderen Signalwegen. So wurden bei der Untersuchung inflammatorischer Prozesse Wechselwirkungen zwischen den Prostaglandin- und NO-abhängigen Stoffwechselwegen beschrieben (Salvemini *et al.* 1995). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Prostaglandine die Cytokin- bzw. LPS-induzierte NO-Bildung verringern (Tetsuka *et al.* 1994; Hori *et al.* 2001) und eine Hemmung der COX daher zu einer erhöhten NO-Produktion führt. Diese Befunde legten die Vermutung nahe, dass auch die hier beobachtete NO-stimulatorische Wirkung von ASS eine Folge der COX-Hemmung bzw. verminderten Prostaglandinsynthese ist.

In den Experimenten zur Endothelprotektion blieben jedoch andere, strukturell unterschiedliche Hemmstoffe der COX-Isoenzyme, wie Indometacin, Diclofenac und nicht acetylierte Salicylsäure wirkungslos. Überdies zeigten sie in Endothelzellen keinen Effekt auf das NO/cGMP-System.

Auch in Gegenwart des direkten sGC-Aktivators YC-1, der durch synergistische Verstärkung die Detektion schwacher cGMP-Stimulation erlaubt, blieben die genannten COX-Hemmer wirkungslos. Ein Teil der Experimente wurde zudem in LLC-PK1-Zellen durchgeführt. In früheren Arbeiten konnte eine Bildung von Prostaglandinen in LLC-PK1-Zellen nicht nachgewiesen werden (Hull *et al.* 1976; Goldring *et al.* 1978; Lifschitz *et al.* 1982; Schröder und Schrör 1993). Dass ASS in diesem Prostaglandin-defizienten Zelltyp dennoch zu einer deutlichen NO- bzw. cGMP-Stimulation führt, spricht ebenso wie die fehlende Wirkung anderer NSAIDs für eine Prostaglandin- und COX-unabhängige Signaltransduktion.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, bei denen gezeigt werden konnte, dass die cytoprotektiven Eigenschaften von ASS kein Substanzklasseneffekt der NSAIDs sind (Oberle *et al.* 1998; Wu *et al.* 2002). Die Diskrepanz zwischen ASS und den anderen NSAIDs könnte auf der für ASS selektiven Fähigkeit beruhen, Plasmaproteine, Enzyme sowie DNA zu acetylieren (Pinckard *et al.* 1968). Dies ist keineswegs nur auf die irreversible Acetylierung der COX am Serin 530 beschränkt, dem entscheidenden Wirkort bei der COX-Hemmung durch ASS (Roth und Majerus 1975; DeWitt *et al.* 1990; Funk *et al.* 1991).

Verschiedene Autoren wiesen nach, dass ASS Hydroxylradikale bindet (Aruoma und Halliwell 1988; Shi *et al.* 1999) und möglicherweise reaktiven Sauerstoff direkt neutralisieren kann. Im Gegensatz dazu demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es sich bei der Endothelprotektion durch ASS um einen Effekt handelt, der erst nach mehrstündiger Vorinkubation der Zellen mit ASS nachweisbar ist. Dies deutet darauf hin, dass hier nicht radikalfangende Eigenschaften der ASS im Vordergrund stehen, sondern dass es sich um eine transkriptionelle Regulation handeln könnte. ASS kann z.B. den Transkriptionsfaktor NFκB inhibieren und dadurch die Transkription einer Vielzahl NFκB-abhängiger Gene modulieren (Kopp und Ghosh 1994; Weber *et al.* 1995). Zusätzlich wurde über eine NFκB-unabhängige transkriptionelle Repression durch ASS berichtet (Shackelford *et al.* 1997; Kagawa *et al.* 1999; Tondelier *et al.* 1999). Allerdings wurden bei diesen Untersuchungen sehr hohe Konzentrationen von ASS (2-20 mM) verwendet, die selbst unter einer hochdosierten ASS-Therapie im Plasma nicht erreicht werden. Neben inhibitorischen Effekten kann ASS auch induktive Wirkungen auf die Expression von Genen haben. So zeigten Oberle und Mitarbeiter (1998), dass ASS die Synthese des Ferritinproteins erhöht. Ferritin ist ein ubiquitäres Eisenspeicherprotein, das cytoprotektive und antioxidative Eigenschaften hat (Balla *et al.* 1992; Wai *et al.* 1996; Lin und Girotti 1997). Die Wirkung von Ferritin beruht dabei auf seiner Fähigkeit  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  zu oxidieren und dieses zu speichern. Freies Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) fungiert unter anderem als Katalysator der Haber-Weiss-Reaktion und ist somit an der Bildung von freien Sauerstoffradikalen beteiligt (Harrison und Arosio 1996; Ponka *et al.* 1998).

Die Steigerung der Ferritinsynthese durch ASS und die damit verbundene Bindung freier, potenziell toxischer Eisenionen könnte einen cytoprotektiven Signalweg darstellen.

Außer Ferritin kann ASS auch die Expression des Hitzeschock-Proteins HO-1 induzieren (Abate *et al.* 2001). HO-1 katalysiert den Abbau des roten Blutfarbstoffes Häm zu Biliverdin unter Freisetzung von Eisen und Bildung von Kohlenmonoxid. In Säugern wird Biliverdin anschließend durch das cytosolische Enzym Biliverdinreduktase zu Bilirubin umgewandelt (Abraham *et al.* 1988). Es existieren mindestens zwei Isoformen der Hämoxxygenase, HO-1 und HO-2. Die HO-1 ist durch eine Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Agenzien sowie durch Variation des Zellzustandes, wie z.B. Hitzeschock induzierbar (Cruse und Maines 1988; Yoshida *et al.* 1991). Die HO-2 liegt konstitutiv vor. Verschiedene zell- und gewebeprotective Effekte werden durch die HO-1 vermittelt. So schützt HO-1 gegen Transplantatabstoßung (Nath 1999), wahrscheinlich durch Verhinderung der dabei auftretenden beschleunigten Atherosklerose (Hancock 1997). Außerdem schützt sie Endothelzellen und Inselzellen der Bauchspeicheldrüse vor Cytokin-induzierter Toxizität (Ye und Laychock 1998; Polte *et al.* 2000). Für die protektive Wirkung von HO-1 werden das gebildete Kohlenmonoxid und Bilirubin verantwortlich gemacht (Maines 1997; Platt und Nath 1998; Polte *et al.* 2002).

Interessanterweise wird die Biosynthese der beiden Proteine Ferritin und HO-1 nicht nur durch ASS, sondern auch durch NO induziert. Neben seiner Funktion als signaltransduzierender Botenstoff war NO bisher vor allem als cytotoxisches Effektmolekül bekannt (Moncada *et al.* 1991). Es verstärkten sich jedoch die Hinweise, auf eine antioxidative und cytoprotektive NO-Wirkung. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass NO in verschiedenen Zellsystemen die zelluläre Sensibilität gegenüber oxidativem Stress herabsetzt (Yates *et al.* 1992; Wink *et al.* 1993; Struck *et al.* 1995; Motterlini *et al.* 1996; Oberle und Schröder 1997; Polte *et al.* 1997b). Als cytotoxische Agenzien wurden, wie in dieser Arbeit, der exogene Radikalbildner H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und darüber hinaus oxidiertes LDL und TNF- $\alpha$  verwendet. In der Literatur werden verschiedene Mechanismen für die NO-induzierte Cytoprotektion diskutiert. Neben der direkten Neutralisation von toxischen Sauerstoffradikalen durch NO (Wink *et al.* 1993), wird von mehreren Autoren die Induktion und Aktivierung endogener Schutzproteine postuliert. Zusätzlich zu HO-1 und Ferritin wurden noch weitere Proteine beschrieben, die an den antioxidativen und cytoprotektiven Effekten von NO beteiligt sein könnten. So schützt NO Hepatozyten vor TNF- $\alpha$ -induzierter Toxizität durch Induktion des Hitzeschock-Proteins Hsp 70 (Kim *et al.* 1997) und es induziert das antioxidative Protein Superoxiddismutase in Gefäßmuskelzellen bzw. in glomerulären Mesangialzellen der Ratte (Sano *et al.* 1997; Frank *et al.* 1999). Das vermehrt gebildete Protein ist in der Lage, Zellen vor toxischen Sauerstoffspezies zu schützen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ASS über einen COX-unabhängigen Mechanismus zur Aktivierung des L-Arginin-NO-Stoffwechselwegs und vermehrten intrazellulären Akkumulation von cGMP führt. Diese Effekte sind bereits wenige Minuten nach Zugabe von ASS detektierbar. Die NO-abhängige, endotheliale Protektion tritt jedoch erst mehrere Stunden nach Beginn der Inkubation mit ASS auf. Diese zeitliche

Verzögerung spricht gegen eine direkte antioxidative Wirksamkeit von ASS oder auch des gebildeten NO. Sie wäre aber zu erklären mit einer Aktivierung nachgeschalteter Prozesse wie der erwähnten Induktion zellprotektiver Proteine. Im Einklang mit früheren Befunden zur parallelen NO- und ASS-Sensitivität von Ferritin und HO-1 kann daher vermutet werden, dass diese beiden Stressproteine funktionell relevante Zielstrukturen des hier beschriebenen Signalwegs sind.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass ASS über eine Aktivierung des NO/cGMP-System antioxidative und endothelprotektive Effekte induziert. Dieser neuartige Signalweg könnte sich klinisch als erhöhte Resistenz des Endothels gegenüber deletären Effekten von Sauerstoffradikalen manifestieren und so zur Prävention der Atherogenese und endothelialen Dysfunktion beitragen.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle von NO und cGMP bei der Vermittlung endothelprotektiver und antioxidativer Effekte von ASS untersucht.

ASS wirkt in Endothelzellen nach mehrstündiger Inkubation (> 6 Stunden) protektiv gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Toxizität.

Experimente mit dem NO-Radikalfänger PTIO und dem NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA belegen, dass der L-Arginin-NO-Stoffwechselweg kausal zur endothelprotektiven Wirkung von ASS beiträgt.

Die inhibitorische Wirkung des sGC-Blockers ODQ auf die ASS-abhängige Cytoprotektion sowie der protektive Effekt membrangängiger cGMP-Derivate sprechen für eine Mediatorfunktion des sGC/cGMP-Systems.

Die signaltransduzierende Bedeutung des NO-Botenstoffs cGMP wird auch durch den Befund eines intrazellulären cGMP-Anstiegs nach Gabe von ASS und dessen Potenzierung durch den direkten sGC-Aktivator YC-1 unterstützt. Die ASS-vermittelte cGMP-Akkumulation ist wie die Endothelprotektion durch PTIO bzw. L-NMMA hemmbar und damit NO-abhängig.

ASS führt zu einer Steigerung der endothelialen NO-Synthese, ohne die Expression der endothelialen NO-Synthase zu beeinflussen. Die Stimulation NO/cGMP-abhängiger Signalwege durch ASS lässt sich also mit einem direkten Effekt auf die Aktivität der NO-Synthase erklären.

Andere COX-Hemmer (z. B. Diclofenac, Indometacin) sind unter den gewählten Bedingungen ohne Einfluss auf den NO/cGMP-Signalweg und die endotheliale Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Dieser Befund spricht gegen eine ursächliche Beteiligung COX- bzw. Prostaglandin-abhängiger Mechanismen an den beschriebenen ASS-Effekten.

Die Ergebnisse dokumentieren, dass ASS über eine Aktivierung der L-Arginin/NO/cGMP-Kaskade endothelprotektive Effekte induziert. Dieser neuartige antioxidative Wirkmechanismus von ASS könnte klinisch zur Prävention atherosklerotischer Prozesse und der endothelialen Dysfunktion beitragen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Abate A, Vreman HJ, Dennery PA, Schröder H** (2001). Aspirin induces heme oxygenase-1 protein synthesis and activity in endothelial cells.

**Abraham NG, Lin JH, Schwartzman ML, Levere RD, Shibahara S** (1988). The physiological significance of heme oxygenase. *Int J Biochem* 20(6):543-58.

**Akaike T, Maeda H** (1996). Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO). *Methods Enzymol* 268:211-21.

**Ames BN** (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* 7(3-6):121.

**Amin AR, Vyas P, Attur M, Leszczynska-Piziak J, Patel IR, Weissmann G, Abramson SB** (1995). The mode of action of aspirin-like drugs: effect on inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17):7926-30.

**Anderson RG** (1993). Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23):10909-13.

**Andrew PJ, Mayer B** (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43(3):521-31.

**Arnal JF, Yamin J, Dockery S, Harrison DG** (1994). Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *Am J Physiol* 267(5 Pt 1):C1381-8.

**Aruoma OI, Halliwell B** (1988). The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica* 18(4):459-70.

**Awad JA, Roberts LJ, 2nd, Burk RF, Morrow JD** (1996). Isoprostanes--prostaglandin-like compounds formed in vivo independently of cyclooxygenase: use as clinical indicators of oxidant damage. *Gastroenterol Clin North Am* 25(2):409-27.

**Babior BM** (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109(1):33-44.

**Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM** (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 267(25):18148-53.

**Barnes PJ** (1990). Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 9(3):235-43.

- Becker EM, Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Walter U, Hoenicka M, Gerzer R, Stasch JP** (2000) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 35(3):390-7
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA** (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4):1620-4.
- Beckman JS, Koppenol WH** (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437.
- Bellavite P** (1988). The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radic Biol Med* 4(4):225-61.
- Bennett BM, Leitman DC, Schröder H, Kawamoto JH, Nakatsu K, Murad F** (1989). Relationship between biotransformation of glyceryl trinitrate and cyclic GMP accumulation in various cultured cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 250(1):316-23.
- Bennett BM, McDonald BJ, St James MJ** (1992). Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate. *J Pharmacol Exp Ther* 261(2):716-23
- Berk BC** (1999). Redox signals that regulate the vascular response to injury. *Thromb Haemost* 82(2):810-7.
- Bing RJ, Yamamoto T, Yamamoto M, Kakar R, Cohen A** (1999). New look at myocardial infarction: toward a better aspirin. *Cardiovasc Res* 43(1):25-31.
- Boerboom LE, Olinger GN, Kissebah AH, Montgomery RR** (1987). Low-dose aspirin protects against lipid accumulation in primate vein bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 94(2):251-5.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Frolich JC** (1996). The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis* 127(1):1-11.
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ** (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343(21):1520-8, 2 p following 1528.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Bredt DS, Snyder SH** (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2):682-5.

- Bruckdorfer KR, Dee G, Jacobs M, Rice-Evans CA** (1990). The protective action of nitric oxide against membrane damage induced by myoglobin radicals. *Biochem Soc Trans* 18(2):285-6.
- Brunner F, Schmidt K, Nielsen EB, Mayer B** (1996). Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 277(1):48-53.
- Burnette WN** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112(2):195-203.
- Cai H, Harrison DG** (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10):840-4.
- Chance B, Sies H, Boveris A** (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59(3):527.
- Chen H, Xing Y, Liu R** (2001). Lovastatin increases nitric oxide synthesis in IL-1 beta-stimulated smooth muscle cells. *Chin Med J (Engl)* 114(11):1123-7.
- Cheng Y, Austin S, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Lawson J, Grosser T, FitzGerald GA** (2002). *Science* in press.
- Clancy R, Varenika B, Huang W, Ballou L, Attur M, Amin AR, Abramson SB** (2000). Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J Immunol* 165(3):1582-7.
- Cornwell TL, Lincoln TM** (1989). Regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels in cultured vascular smooth muscle cells. Reduction of Ca<sup>2+</sup> by atriopeptin and 8-bromo-cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 264(2):1146-55.
- Cotter G, Kaluski E, Blatt A, Milovanov O, Moshkovitz Y, Zaidenstein R, Salah A, Alon D, Michovitz Y, Metzger M, Vered Z, Golik A** (2000). L-NMMA (a nitric oxide synthase inhibitor) is effective in the treatment of cardiogenic shock. *Circulation* 101(12):1358-61.
- Craven LL** (1950). Acetylsalicylic acid, possible prevention of coronary thrombosis. *Ann West Med Surg* 4:95
- Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T** (1994). Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 93(3):1095-101.
- Cruse I, Maines MD** (1988). Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem* 263(7):3348-53.

- Davies KJ, Goldberg AL** (1987). Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem* 262(17):8227-34.
- Dawson VL** (1995). Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22(4):305-8.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML** (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115(1):61-9.
- del Rio LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ** (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med* 13(5):557-80.
- DeWitt DL, el-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, Smith WL** (1990). The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem* 265(9):5192-8.
- Dierks EA, Burstyn JN** (1996). Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase. *Biochem Pharmacol* 51(12):1593-600.
- Dimmeler S, Zeiher AM** (1997). Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1(4):275-81.
- Douthwaite AH, Lintott GAM** (1938). Gastroscopic observation of effect of aspirin and certain other substances on stomach. *Lancet* 2:1222-1225.
- Dreher D, Jornot L, Junod AF** (1995). Effects of hypoxanthine-xanthine oxidase on Ca<sup>2+</sup> stores and protein synthesis in human endothelial cells. *Circ Res* 76(3):388-95.
- Dreser H** (1899). Pharmakologisches über Aspirin (Acetylsalicylsäure). *Arch. Physiol.* 76:306.
- Elliott SN, Wallace JL** (1998). Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *J Gastroenterol* 33(6):792-803.
- Endres M, Laufs U** (1998). [HMG-CoA reductase inhibitor and risk of stroke]. *Nervenarzt* 69(8):717-21.
- Farivar RS, Chobanian AV, Brecher P** (1996). Salicylate or aspirin inhibits the induction of the inducible nitric oxide synthase in rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* 78(5):759-68.
- Feelisch M, Ostrowski J, Noack E** (1989). On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 14(Suppl 11):S13-22.

- Feelisch M, Stamler JS** (1996). Donors of nitrogen oxides. In: Feelisch M, Stamler JS, eds. *Methods in Nitric Oxide Research*. Chichester, NY: Wiley & Sons Inc; 71-115
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T** (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271(37):22810-4.
- Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL** (2001). Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 103(1):113-8.
- Finkel T** (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10(2):248-53.
- Finkel T** (1999). Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol* 65(3):337-40.
- Finkel T** (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 476(1-2):52-4.
- Flick DA, Gifford GE** (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68(1-2):167-75.
- Förstermann U** (1994). Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelforschung* 44(3A):402-7.
- Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H** (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb J* 12(10):773-90.
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H** (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-31.
- Förstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H** (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 50(9):1321-32.
- Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS** (1993). Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* 14 Suppl I:10-5.
- Förstermann U, Pollock JS, Tracey WR, Nakane M** (1994). Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation. *Methods Enzymol* 233:258-64.
- Frank S, Zacharowski K, Wray GM, Thiemermann C, Pfeilschifter J** (1999). Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a novel nitric oxide-regulated gene in rat glomerular mesangial cells and kidneys of endotoxemic rats. *Faseb J* 13(8):869-82.
- Fridovich I** (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-57.

- Friebe A, Schultz G, Koesling D** (1996). Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *Embo J* 15(24):6863-8.
- Friedl A, Harmening C, Schuricht B, Hamprecht B** (1985). Rat atrial natriuretic peptide elevates the level of cyclic GMP in astroglia-rich brain cell cultures. *Eur J Pharmacol* 111(1):141-2.
- Fulton D, Gratton JP, Sessa WC** (2001). Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299(3):818-24.
- Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA** (1991). Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *Faseb J* 5(9):2304.
- Furchgott RF, Jothianandan D** (1991). Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels* 28(1-3):52-61.
- Furchgott RF, Zawadzki JV** (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-6.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B** (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48(2):184-8.
- Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L** (1995). Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 95(4):1884-90.
- Goldring SR, Dayer JM, Ausiello DA, Krane SM** (1978). A cell strain cultured from porcine kidney increases cyclic AMP content upon exposure to calcitonin or vasopressin. *Biochem Biophys Res Commun* 83(2):434-40.
- Gomes LF, Cuccovia IM, Chaimovich H, Barbieri DH, Politi MJ** (1993). Permeation of superoxide anion through the bilayer of vesicles of a synthetic amphiphile. *Biochim Biophys Acta* 1152(1):78-82.
- Govers R, Rabelink TJ** (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(2):F193-206.
- Greene EL, Velarde V, Jaffa AA** (2000). Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension* 35(4):942-7.
- Grosser N, Schröder H** (2000). A common pathway for nitric oxide release from NO-aspirin and glyceryl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun* 274(1):255-8.

- Gryglewski RJ, Moncada S, Palmer RM** (1986). Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 87(4):685-94.
- Habib A, Bernard C, Lebret M, Creminon C, Esposito B, Tedgui A, Maclouf J** (1997). Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. *J Immunol* 158(8):3845-51.
- Halliwell B** (1993). The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 23 Suppl 1:118-26.
- Halliwell B, Aruoma OI** (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281(1-2):9-19.
- Halliwell B, Zhao K, Whiteman M** (1999). Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* 31(6):651-69.
- Hancock WW** (1997). Impact of alloimmunity on chronic tissue remodelling: role of cytokines and protective genes in the vessel wall. *Transpl Immunol* 5(4):277-81.
- Harrison DG** (1994). Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 89(Suppl 1):87-102.
- Harrison DG** (1997). Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 20(11 Suppl 2):II-11-7.
- Harrison PM, Arosio P** (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275(3):161-203.
- Hecker M, Mülsch A, Bassenge E, Förstermann U, Busse R** (1994). Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. *Biochem J* 299 ):247.
- Heller R, Munscher-Paulig F, Grabner R, Till U** (1999). L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem* 274(12):8254-60.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA** (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 28(10):1456-62.
- Herbst U, Toborek M, Kaiser S, Mattson MP, Hennig B** (1999). 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 181(2):295-303.
- Hinz B, Brune K** (2002). Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300(2):367-75.

- Hinz B, Schröder H** (1998). Vitamin C attenuates nitrate tolerance independently of its antioxidant effect. *FEBS Lett* 428(1-2):97-9.
- Hla T** (1996). Molecular characterization of the 5.2 KB isoform of the human cyclooxygenase-1 transcript. *Prostaglandins* 51(1):81-5.
- Hoenicka M, Becker EM, Apeler H, Sirichoke T, Schröder H, Gerzer R, Stasch JP** (1999). Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Mol Med* 77(1):14-23.
- Hori M, Kita M, Torihashi S, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, Ozaki H, Karaki H** (2001). Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(5):G930-8.
- Hornig B, Arakawa N, Haussmann D, Drexler H** (1998). Differential effects of quinaprilat and enalaprilat on endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 98(25):2842-8.
- Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney JF, Jr.** (2000). Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 275(23):17399-406.
- Hull RN, Cherry WR, Weaver GW** (1976). The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 12(10):670-7.
- Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA** (1998). Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 97(8):716-20.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS** (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61(6):866-79.
- Ishii K, Sheng H, Warner TD, Förstermann U, Murad F** (1991). A simple and sensitive bioassay method for detection of EDRF with RFL-6 rat lung fibroblasts. *Am J Physiol* 261(2 Pt 2):H598-603.
- Jones PH** (2000). Diet and pharmacologic therapy of obesity to modify atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2(4):314-20.
- Kagawa A, Azuma H, Akaike M, Kanagawa Y, Matsumoto T** (1999). Aspirin reduces apolipoprotein(a) (apo(a)) production in human hepatocytes by suppression of apo(a) gene transcription. *J Biol Chem* 274(48):34111-5.
- Kalinowski L, Dobrucki LW, Brovkovich V, Malinski T** (2002). Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin. *Circulation* 105(8):933-8.

- Kanno K, Hirata Y, Imai T, Iwashina M, Marumo F** (1994). Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in rat vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 267(6 Pt 2):H2318-24.
- Kepka-Lenhart D, Chen LC, Morris SM, Jr.** (1996). Novel actions of aspirin and sodium salicylate: discordant effects on nitric oxide synthesis and induction of nitric oxide synthase mRNA in a murine macrophage cell line. *J Leukoc Biol* 59(6):840-6.
- Kim DN, Lee KT, Schmee J, Thomas WA** (1983). Anti-proliferative effect of pyridinolcarbamate and of aspirin in the early stages of atherogenesis in swine. *Atherosclerosis* 48(1):1-13.
- Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR** (1997). Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 272(2):1402-11.
- Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR** (1998). Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem* 273(47):31437-41.
- Kiowski W** (1999). Endothelial dysfunction in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 21(5-6):635-46.
- Kitagawa H, Takeda F, Kohei H** (1990). Effect of endothelium-derived relaxing factor on the gastric lesion induced by HCl in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 253(3):1133-7.
- Kjekshus J, Pedersen TR** (1995). Reducing the risk of coronary events: evidence from the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Am J Cardiol* 76(9):64C-68C.
- Knowles RG, Moncada S** (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298(Pt 2):249-58.
- Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM** (1994). YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 84(12):4226-33.
- Kobayashi O, Miwa H, Watanabe S, Tsujii M, Dubois RN, Sato N** (2001). Cyclooxygenase-2 downregulates inducible nitric oxide synthase in rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(3):G688-96.
- Koesling D** (1999). Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods* 19(4):485-93.
- Kojda G, Harrison D** (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43(3):562-71.

- Kopp E, Ghosh S** (1994). Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265(5174):956-9.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K** (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6(9):1004-10.
- Kurowska EM** (2002). Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr Pharm Des* 8(3):155-66.
- Lancaster JR, Jr., Hibbs JB, Jr.** (1990). EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(3):1223-7.
- Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA** (1999). Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem* 274(35):24441-4.
- Lefer AM, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Hayward R, Lefer DJ** (1999). Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation* 100(2):178-84.
- Li H, Förstermann U** (2000). Structure-activity relationship of staurosporine analogs in regulating expression of endothelial nitric-oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 57(3):427-35.
- Li PF, Dietz R, von Harsdorf R** (1997). Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 96(10):3602-9.
- Liew FY, Cox FE** (1991). Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today* 12(3):A17.
- Lifschitz MD** (1982). LLC-PK1 Cells derived from pig kidneys have a defect in cyclooxygenase. *J Biol Chem* 257(21):12611-5.
- Lin F, Girotti AW** (1997). Elevated ferritin production, iron containment, and oxidant resistance in hemin-treated leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 346(1):131-41.
- Lincoln TM** (1989). Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther* 41(3):479-502.
- Lincoln TM, Cornwell TL, Rashatwar SS, Johnson RM** (1988). Mechanism of cyclic-GMP-dependent relaxation in vascular smooth muscle. *Biochem Soc Trans* 16(4):497-9.
- Lipsky PE** (1999). Role of cyclooxygenase-1 and -2 in health and disease. *Am J Orthop* 28(3 Suppl):8-12.

- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M** (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126(1):111-26.
- Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, Casado S** (1995). Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 91(7):2080-8.
- Lopez-Farre A, Riesco A, Digioni E, Mosquera JR, Caramelo C, de Miguel LS, Millas I, de Frutos T, Cernadas MR, Monton M, Alonso J, Casado S** (1996). Aspirin-stimulated nitric oxide production by neutrophils after acute myocardial ischemia in rabbits. *Circulation* 94(1):83-7.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH** (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120(3):227-37.
- Lum H, Roebuck KA** (2001). Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(4):C719-41.
- Lüscher TF, Barton M** (1997). Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20(11 Suppl 2):II-3-10.
- Lüscher TF, Noll G** (1995). The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 118 Suppl:S81-90.
- Lusis AJ** (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407(6801):233-41.
- Maier W, Cosentino F, Lutolf RB, Fleisch M, Seiler C, Hess OM, Meier B, Lüscher TF** (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 35(2):173-8.
- Maines MD** (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:517-54.
- Marletta MA** (1989). Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci* 14(12):488-92.
- Marletta MA** (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78(6):927-30.
- Masuda E, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Takei Y, Tsujii M, Oshita M, Michida T, Kobayashi I, Nakama A, et al.** (1995). Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology* 108(1):58-64.
- Masutani H** (2000). Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. *Int J Hematol* 71(1):25-32.

- Mattie MD, Freedman JH** (2001). Protective Effects of Aspirin and Vitamin E (alpha-Tocopherol) against Copper- and Cadmium-Induced Toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 285(4):921-5.
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA** (1999). Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1):272-7.
- McNamara P, FitzGerald GA** (2001). Smoking-induced vascular disease: a new twist on an old theme. *Circ Res* 89(7):563-5.
- Meagher E, Rader DJ** (2001). Antioxidant therapy and atherosclerosis: animal and human studies. *Trends Cardiovasc Med* 11(3-4):162-5.
- Meagher EA, Barry OP, Burke A, Lucey MR, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA** (1999). Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 104(6):805-13.
- Meyer-Kirchrath J, Schrör K** (2000). Cyclooxygenase-2 inhibition and side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the gastrointestinal tract. *Curr Med Chem* 7(11):1121-9.
- Michel T, Li GK, Busconi L** (1993). Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13):6252-6.
- Minamiyama Y, Imaoka S, Takemura S, Okada S, Inoue M, Funae Y** (2001). Escape from tolerance of organic nitrate by induction of cytochrome P450. *Free Radic Biol Med* 31(11):1498-508.
- Minotti G, Aust SD** (1989). The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chem Biol Interact* 71(1):1-19.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM** (1999). Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 31(1):61-74.
- Moncada S, Higgs A** (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27):2002-12.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA** (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109-42.
- Monobe H, Yamanari H, Nakamura K, Ohe T** (2001). Effects of low-dose aspirin on endothelial function in hypertensive patients. *Clin Cardiol* 24(11):705-9.
- Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ, 2nd** (1992). Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10721-5.

- Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM** (1996). NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 270(1 Pt 2):H107-14.
- Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ** (2001). Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama* 286(8):954-9.
- Mülsch A, Bauersachs J, Schafer A, Stasch JP, Kast R, Busse R** (1997). Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br J Pharmacol* 120(4):681-9.
- Murad F, Ishii K, Förstermann U, Gorsky L, Kerwin JF, Jr., Pollock J, Heller M** (1990). EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 24:441-8.
- Murphy EJ, Roberts E, Anderson DK, Horrocks LA** (1993). Cytotoxicity of aluminum silicates in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 57(2):483-90.
- Mylonas C, Kouretas D** (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13(3):295-309.
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM** (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93(2):229-40.
- Nath KA** (1999). Heme oxygenase-1: a redoubtable response that limits reperfusion injury in the transplanted adipose liver. *J Clin Invest* 104(11):1485-6.
- Nathan C** (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 6(12):3051-64.
- Nathan C, Xie QW** (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78(6):915-8.
- Nathan CF, Hibbs JB, Jr.** (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3(1):65-70.
- Neve BP, Fruchart JC, Staels B** (2000). Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 60(8):1245-50.
- Newby AC, Henderson AH** (1990). Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 52:661-74.
- Noon JP, Walker BR, Hand MF, Webb DJ** (1998). Impairment of forearm vasodilatation to acetylcholine in hypercholesterolemia is reversed by aspirin. *Cardiovasc Res* 38(2):480-4.

- Oberle S, Polte T, Abate A, Podhaisky HP, Schröder H** (1998). Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. *Circ Res* 82(9):1016-20.
- Oberle S, Schröder H** (1997). Ferritin may mediate SIN-1-induced protection against oxidative stress. *Nitric Oxide* 1(4):308-14.
- Ohara Y, Sayegh HS, Yamin JJ, Harrison DG** (1995). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. *Hypertension* 25(3):415-20
- Olken NM, Marletta MA** (1993). NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry* 32(37):9677-85.
- Olson LJ, Knych ET, Jr., Herzig TC, Drewett JG** (1997). Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation. *Hypertension* 29(1 Pt 2):254-61.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122):524-6.
- Palmer RM, Moncada S** (1989). A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158(1):348-52.
- Parks DR, Bryan VM, Oi VT, Herzenberg LA** (1979). Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4):1962-6.
- Patel RP, Levonen A, Crawford JH, Darley-Usmar VM** (2000). Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 47(3):465-74.
- Paul A, Calleja L, Camps J, Osada J, Vilella E, Ferre N, Mayayo E, Joven J** (2000). The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci* 68(4):457-65.
- Pick R, Chediak J, Glick G** (1979). Aspirin inhibits development of coronary atherosclerosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) fed an atherogenic diet. *J Clin Invest* 63(1):158-62.
- Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR** (1995). Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *Faseb J* 9(7):552-8.
- Pinckard RN, Hawkins D, Farr RS** (1968). In vitro acetylation of plasma proteins, enzymes and DNA by aspirin. *Nature* 219(149):68-9.
- Platt JL, Nath KA** (1998). Heme oxygenase: protective gene or Trojan horse. *Nat Med* 4(12):1364-5.

**Podhaisky HP, Abate A, Polte T, Oberle S, Schröder H** (1997). Aspirin protects endothelial cells from oxidative stress--possible synergism with vitamin E. *FEBS Lett* 417(3):349-51.

**Polte T, Abate A, Dennery PA, Schröder H** (2000). Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5):1209-15.

**Polte T, Hemmerle A, Berndt G, Grosser N, Abate A, Schroder H** (2002). Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: role of cGMP and heme oxygenase-1. *Free Radic Biol Med* 32(1):56-63.

**Polte T, Oberle S, Schröder H** (1997a). The nitric oxide donor SIN-1 protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible role for cyclic GMP and heme oxygenase. *J Mol Cell Cardiol* 29(12):3305-10.

**Polte T, Oberle S, Schröder H** (1997b). Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor- alpha-mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. *FEBS Lett* 409(1):46-8.

**Polte T, Schröder H** (1998). Cyclic AMP mediates endothelial protection by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 251(2):460-5.

**Ponka P, Beaumont C, Richardson DR** (1998). Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 35(1):35-54.

**Pradelles P, Grassi J, Chabardes D, Guiso N** (1989). Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. *Anal Chem* 61(5):447-53.

**Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM** (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21(12):4183-7.

**Pruefer D, Scalia R, Lefer AM** (1999). Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(12):2894-900.

**Quyyumi AA** (1998). Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 105(1A):32S-39S.

**Ranke C, Hecker H, Creutzig A, Alexander K** (1993). Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis. *Circulation* 87(6):1873-9.

**Rao GN, Berk BC** (1992). Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 70(3):593-9.

- Reif DW, McCreehy SA** (1995). N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch Biochem Biophys* 320(1):170-6.
- Reilly IA, FitzGerald GA** (1988). Aspirin in cardiovascular disease. *Drugs* 35(2):154-76.
- Reilly MP, Pratico D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA** (1998). Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 98(25):2822-8.
- Rice-Evans C, Burdon R** (1993). Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32(1):71-110.
- Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M** (1995). Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271(1):67-74.
- Ross R** (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57:791-804.
- Ross R, Glomset JA** (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180(93):1332-9.
- Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mülsch A, Dimmeler S** (1999). Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem* 274(11):6823-6.
- Roth GJ, Majerus PW** (1975). The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 56(3):624-32.
- Saini T, Bagchi M, Bagchi D, Jaeger S, Hosoyama S, Stohs SJ** (1998). Protective ability of acetylsalicylic acid (aspirin) to scavenge radiation induced free radicals in J774A.1 macrophage cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 101(3):259-68.
- Salvemini D, Masferrer JL** (1996). Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Methods Enzymol* 269:12-25.
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P** (1993). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(15):7240-4.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.
- Sano H, Hirai M, Saito H, Nakashima I, Isobe KI** (1997). A nitric oxide-releasing reagent, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, enhances the expression of superoxide dismutases mRNA in the murine macrophage cell line RAW264-7. *Immunology* 92(1):118-22.

- Schaub RG, Keith JC, Jr., Rawlings CA** (1983). Effect of acetylsalicylic acid on vascular damage and myointimal proliferation in canine pulmonary arteries subjected to chronic injury by *Dirofilaria immitis*. *Am J Vet Res* 44(3):449-54.
- Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Förstermann U, Murad F** (1992). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium* 13(6-7):427-34.
- Schmidt K, Schrammel A, Koesling D, Mayer B** (2001). Molecular mechanisms involved in the synergistic activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 and nitric oxide in endothelial cells. *Mol Pharmacol* 59(2):220-4.
- Schoedon G, Schneemann M, Blau N, Edgell CJ, Schaffner A** (1993). Modulation of human endothelial cell tetrahydrobiopterin synthesis by activating and deactivating cytokines: new perspectives on endothelium-derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 196(3):1343-8.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B** (1996). Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 50(1):1-5.
- Schröder H, Leitman DC, Bennett BM, Waldman SA, Murad F** (1988). Glyceryl trinitrate-induced desensitization of guanylate cyclase in cultured rat lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 245(2):413-8.
- Schröder H, Noack E, Muller R** (1985). Evidence for a correlation between nitric oxide formation by cleavage of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *J Mol Cell Cardiol* 17(9):931-4.
- Schröder H, Schrör K** (1990). Inhibitors of cytochrome P-450 reduce cyclic GMP stimulation by glyceryl trinitrate in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 342(5):616-8.
- Schröder H, Schrör K** (1993). Prostacyclin-dependent cyclic AMP formation in endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347(1):101-4.
- Schrör K** (1992). Acetylsalicylsäure. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Sessa WC** (1994). The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31(3):131-43.
- Shackelford RE, Alford PB, Xue Y, Thai SF, Adams DO, Pizzo S** (1997). Aspirin inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression in murine tissue macrophages. *Mol Pharmacol* 52(3):421-9.
- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS** (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 28(9):1387-404.

- Shacter E, Lopez RL, Pati S** (1991). Inhibition of the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> system of neutrophils by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 41(6-7):975-84.
- Shi X, Ding M, Dong Z, Chen F, Ye J, Wang S, Leonard SS, Castranova V, Vallyathan V** (1999). Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol Cell Biochem* 199(1-2):93
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN** (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23):10771-8.
- Shimokawa H** (1999). Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 31(1):23-37.
- Shimpo M, Ikeda U, Maeda Y, Ohya K, Murakami Y, Shimada K** (2000). Effects of aspirin-like drugs on nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35(5):1085-91.
- Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Konorev E, Kalyanaraman B** (1999). The peroxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors *Arch Biochem Biophys* 361(2):331-9.
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL** (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271(52):33157-60.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M** (2001). NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 410(6825):212-5.
- Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M** (1997). Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart* 77(4):333-7.
- Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM** (1972). Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247(4):1106-13.
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ** (1996). Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347(9004):781-6.
- Stone JR, Marletta MA** (1995). The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry* 34(50):16397-403.

**Struck AT, Hogg N, Thomas JP, Kalyanaraman B** (1995). Nitric oxide donor compounds inhibit the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to endothelial cells. *FEBS Lett* 361(2-3):291-4.

**Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF** (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17):7773-7.

**Suschek CV, Krischel V, Bruch-Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V** (1999). Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J Biol Chem* 274(10):6130-7.

**Szekeres J, Pacsa AS, Pejtsik B** (1981). Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. *J Immunol Methods* 40(2):151-4.

**Tannous M, Cheung R, Vignini A, Mutus B** (1999). Atorvastatin increases ecNOS levels in human platelets of hyperlipidemic subjects. *Thromb Haemost* 82(5):1390-4.

**Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, Baier LD, DuMaine J, Morrison AR** (1994). Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25):12168-72.

**Tondelier D, Brouillard F, Lipecka J, Labarthe R, Bali M, Costa de Beauregard MA, Torossi T, Cougnon M, Edelman A, Baudouin-Legros M** (1999). Aspirin and some other nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein gene expression in T-84 cells. *Mediators Inflamm* 8(4-5):219-27.

**Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM** (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93(2):241-52.

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4.

**Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane M, Förstermann U** (1994). Identification of an endothelial-like type III NO synthase in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *Am J Physiol* 266(1 Pt 1):C22-8.

**Upchurch Jr GR, Ramdev N, Walsh MT, Loscalzo J** (1998). Prothrombotic Consequences of the Oxidation of Fibrinogen and their Inhibition by Aspirin. *J Thromb Thrombolysis* 5(1):9-14.

- Vane JR** (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231(25):232-5.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM** (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120.
- Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T** (2000). Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. *Circulation* 101(11):1261-6.
- Vogel RA** (1997). Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol* 20(5):426-32.
- Volker W, Faber V** (1990). Aspirin reduces the growth of medial and neointimal thickenings in balloon-injured rat carotid arteries. *Stroke* 21(12 Suppl):IV44-5.
- Wahn H, Hammerschmidt S** (1998). Inhibition of PMN- and HOC1-induced vascular injury in isolated rabbit lungs by acetylsalicylic acid: a possible link between neutrophil-derived oxidative stress and eicosanoid metabolism? *Biochim Biophys Acta* 1408(1):55-66.
- Wahn H, Hammerschmidt S** (2001). Influence of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on oxidative stress-induced lung injury. *Crit Care Med* 29(4):802-7.
- Wai SN, Nakayama K, Umene K, Moriya T, Amako K** (1996). Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Mol Microbiol* 20(6):1127-34.
- Waldman SA, Murad F** (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39(3):163-96.
- Ward PA** (1991). Mechanisms of endothelial cell killing by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or products of activated neutrophils. *Am J Med* 91(3C):89S-94S.
- Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC** (1995). Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 91(7):1914-7.
- Wink DA, Cook JA, Pacelli R, DeGraff W, Gamson J, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB** (1996). The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys* 331(2):241-8.
- Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, Cook J, Pacelli R, Liebmann J, Krishna M, Ford PC, Mitchell JB** (1996). Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul* 34:159-87.

- Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB** (1993). Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):9813-7.
- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, et al.** (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254(5034):1001-3.
- Wu CC, Ko FN, Kuo SC, Lee FY, Teng CM** (1995). YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol* 116(3):1973-8.
- Wu R, Lamontagne D, de Champlain J** (2002). Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 105(3):387-92.
- Yamamoto T, Cohen AM, Kakar NR, Yamamoto M, Johnson PE, Cho YK, Bing RJ** (1999). Production of prostanoids and nitric oxide by infarcted heart in situ and the effect of aspirin. *Biochem Biophys Res Commun* 257(2):488-93.
- Yates MT, Lambert LE, Whitten JP, McDonald I, Mano M, Ku G, Mao SJ** (1992). A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of low density lipoproteins by mouse macrophages. *FEBS Lett* 309(2):135-8.
- Ye J, Laychock SG** (1998). A protective role for heme oxygenase expression in pancreatic islets exposed to interleukin-1beta. *Endocrinology* 139(10):4155-63.
- Yee EL, Pitt BR, Billiar TR, Kim YM** (1996). Effect of nitric oxide on heme metabolism in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 271(4 Pt 1):L512-8.
- Yoshida T, Ishikawa K, Sato M** (1991). Degradation of heme by a soluble peptide of heme oxygenase obtained from rat liver microsomes by mild trypsinization. *Eur J Biochem* 199(3):729-33.
- Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P** (2000). Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342(3):154-60.
- Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J** (2000). Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 56(1):57-64.
- Zeiber AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H** (1991). Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 84(5):1984-92.

**Zhang X, Scicli GA, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH** (1997). Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production. *Hypertension* 30(5):1105-11.

**Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, Hayoz D** (1998). Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 32(2):351-5.

**Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K, Weber AA** (1998). Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 54(3):536-40.

## 8 Veröffentlichungen

### a) Originalarbeiten

**Grosser N, Schröder H** (2000). A common pathway for nitric oxide release from NO-aspirin and glyceryl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 255-258.

**Polte T, Hemmerle A, Berndt G, Grosser N, Abate A, Schröder H** (2001). Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: Role of cGMP and heme oxygenase-1. *Free Radical Biology & Medicine* 32:56-6 .

**Oberle S, Abate A, Grosser N, Vreman HJ, Dennery PA, Schneider HT, Stalleicken D, Schröder H** (2002). Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythryl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1539-1544.

### b) In Kurzform publizierte Vorträge und Poster (Abstracts)

**Grosser N, Schröder H** (1999). Nitric oxide release from NO-aspirin (NCX 4016) and glyceryl trinitrate occurs through similar pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359 (Suppl 3): R46.

**Grosser N, Schröder H** (1999). Similar mechanisms underlie bioactivation of NO-aspirin (NCX 4016) and glyceryl trinitrate. *Acta Physiol Scand* 167 (Suppl 645): 69.

**Grosser N, Schröder H** (1999). Similar mechanisms underlie bioactivation of NO-aspirin (NCX 4016) and glyceryl trinitrate. *The Biology of Nitric Oxide*, Part 7, Proceedings of the 6th International Meeting on the Biology of Nitric Oxide, Sweden, Sept. 1999.

**Grosser N, Schröder H** (2000). Aspirin increases cyclic GMP via NO-dependent processes in LLC-PK-1 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361 (Suppl 4): R49.

**Grosser N, Schröder H** (2000). Aspirin activates intracellular cyclic GMP synthesis via NO-dependent pathways. *Nitric Oxide Biol Chem* 4 (Suppl. 3): 214.

**Abate A, Oberle S, Grosser N, Stasch JP, Schröder H** (2001). Differential effects of YC-1 on prostaglandin formation in macrophages and endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl 4): R41.

**Grosser N, Schröder H** (2001). Nitric oxide is a mediator of aspirin-induced endothelial protection against oxidant stress. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl 4): R48.

**Schröder H, Grosser N** (2001). Endothelial protection by nitric oxide donors and aspirin: involvement of heme oxygenase-1 and ferritin. *J Heart Dis* 2:6.

**Grosser N, Schröder H** (2001) . Cellular mechanisms of nitric oxide release from NO-Aspirin - a novel therapeutic agent in inflammation and thrombosis. *Proceedings of the 2nd International Congress on Heart Disease – New Trends in Research, Diagnosis and Treatment*, Washington, July 2001.

**Grosser N, Schröder H** (2001). Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the L-Arginine. *Archiv der Pharmazie* 334 (Suppl. 2): 61.

**Polte T, Hemmerle A, Grosser N, Abate A, Schröder H** (2001). Atrial natriuretic peptide protects renal cells from cyclosporin toxicity via increased bilirubin formation. *Archiv der Pharmazie* 334 (Suppl. 2): 61.

**Grosser N, Schröder H** (2002). Aspirin-induced endothelial protection is mediated via the nitric oxide-cGMP pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl 1): R41.

## 9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Henning Schröder für die exzellente Betreuung bei der Bearbeitung des Themas, für die stete motivierende Unterstützung und die unzähligen anregenden Diskussionen sowie für seine weitreichende wissenschaftliche Förderung.

Frau Dr. rer. nat. Stefanie Oberle-Plümpe, Frau Dr. rer. nat. Aida Abate und Herrn Dr. rer. nat. Tobias Polte danke ich herzlich für die Einweisung in die experimentellen Techniken, für ihre kontinuierliche Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit und für die hervorragende Zusammenarbeit.

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft möchte ich ein großes Dankeschön an meine Kollegen Frau Anke Hemmerle und Herrn Georg Berndt aussprechen.

Frau Petra Schwartz und Frau Kathrin Schipporeit gilt mein Dank für die intensive Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Bei meinem Bruder, Herrn Dr. med. Tilo Großer, bedanke ich mich sehr für die vielen konstruktiven und kritischen Diskussionen und seine stete Gesprächsbereitschaft. Außerdem danke ich ihm und Herrn Dipl. math. Rico Zacher für die geduldige und sehr kritische Durchsicht der Manuskripte dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Ihr Interesse an meiner Arbeit war mir ein stetiger Ansporn.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), 27. Juni 2002

Nina Großer

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Nina Großer  
Geburtsdatum/ -ort: 01. August 1973, Düsseldorf  
Staatsbürgerschaft: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulbildung:

1979 - 1983 Grundschohle in Haan  
1983 - 1992 Städtisches Gymnasium Haan  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulbildung:

Okt. 1992 - Feb.1993 Sprachstudium an der Université Stendhal Grenoble,  
Frankreich  
Abschluss: „Diplome d'Études Françaises“  
April 1993 - April 1997 Studium der Pharmazie an der Rheinischen  
Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn  
April 1995 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
April 1997 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Juli 1998 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Sept. 1998 Erhalt der Approbation als Apothekerin

## Praktisches Jahr:

Mai 1997 - Okt. 1997 Kloster Apotheke, Bonn  
Nov. 1997 - April 1998 Institut für Pharmakologie und Toxikologie,  
Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

## Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit Nov. 1997 Doktorandin am Institut für Pharmazeutische Biologie  
und Pharmakologie, Fachbereich Pharmazie, Martin-  
Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Feb. 2002 Studienaufenthalt am College of Pharmacy,  
University of Florida, Gainesville, USA

Halle, 27. Juni 2002

