

**Veränderung der neuronalen Vasoregulation im mesenterialen Gefäßbett
bei portaler Hypertension:
mit besonderem Fokus auf die neuronale Stickstoffmonoxyd-Synthase
(nNOS)-vermittelte Vasorelaxation und die Neuropeptid Y (NPY)-
induzierte Vasokonstriktion.**



Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III- Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Lars Jurzik

aus Iserlohn

2004

Promotionsgesuch eingereicht am:

21. Juli 2004

Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. A. Kurtz, Institut für Physiologie

und

Prof. Dr. R.H. Straub, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Prüfungsausschuß:

| | |
|---------------------------|-------------------------|
| 1. Vorsitzender: | Prof. Dr. R. Baumann |
| 1. Gutachter (1. Prüfer): | Prof. Dr. A. Kurtz |
| 2. Gutachter (2. Prüfer) | Prof. Dr. R.H. Straub |
| 3. Prüfer: | Prof. Dr. I. A. Neumann |
| Ersatzperson: | Prof. Dr. R. Warth |

Dissertation

Durchgeführt an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universität Regensburg
unter Anleitung von

Prof. Dr. A. Kurtz
Institut für Physiologie

und

Prof. Dr. R.H. Straub
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| | Abkürzungen | 9 |
| 1. | Einleitung | 10 |
| 1.1 | Das hyperdynamische Zirkulationssyndrom | 10 |
| 1.2 | Pathophysiologie | 13 |
| 1.3 | Klinik | 14 |
| 1.3.1 | Definition der Leberzirrhose | 14 |
| 1.3.2 | Hämodynamik | 14 |
| 1.4 | Stickstoffmonoxid (NO) | 16 |
| 1.4.1 | Die drei Isoformen der NO-Synthase | 16 |
| 1.4.2 | Die neuronale NO-Synthase (nNOS) | 19 |
| 1.4.2.1 | Struktur und Funktion | 19 |
| 1.4.2.2 | Lokalisation | 20 |
| 1.4.2.3 | Gefäßregulation durch die nNOS | 21 |
| 1.4.3 | Guanylylzyklase und der second messenger cGMP | 23 |
| 1.4.3.1 | Die lösliche Guanylylzyklase (sGC) | 23 |
| 1.4.3.2 | Hydrolyse von cGMP | 23 |
| 1.4.4 | Interaktion der nNOS mit anderen Proteinen | 25 |
| 1.5 | NPY | 28 |
| 1.5.1 | Synthese und Struktur von NPY | 28 |
| 1.5.2 | Lokalisation und Funktion | 29 |
| 1.5.3 | NPY-Rezeptoren | 31 |
| 2. | Zielsetzung | 33 |
| 3. | Material und Geräte | 35 |
| 3.1 | Materialien für die Perfusion | 35 |
| 3.1.1 | Substanzen | 35 |

| | | |
|------------|--|----|
| 3.1.2 | Geräte | 35 |
| 3.2 | Materialien für die histologischen Untersuchungen | 36 |
| 3.2.1 | Substanzen | 36 |
| 3.2.2 | Geräte | 37 |
| 3.3 | Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen | 37 |
| 3.3.1 | Substanzen | 37 |
| 3.3.2 | Geräte | 38 |
| 3.4 | Allgemeine Geräte | 38 |
| 4. | Methoden | 39 |
| 4.1 | Tierhaltung und Operation | 39 |
| 4.2 | <i>In vitro</i> Perfusion | 39 |
| 4.2.1 | Präparation und Perfusion | 39 |
| 4.2.2 | Deendothelisierung | 42 |
| 4.3 | Studiendesign | 43 |
| 4.3.1 | Untersuchung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation | 43 |
| 4.3.1.1 | Periarterielle Nervenstimulation | 43 |
| 4.3.1.2 | Hemmung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation durch Neuropeptid Y | 44 |
| 4.3.1.3 | Hemmung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation durch Geldanamycin | 45 |
| 4.3.2 | Untersuchung der Effekte von Neuropeptid Y bei portaler Hypertension | 45 |
| 4.3.2.1 | Perfusionsexperimente | 45 |
| 4.4 | Histologische Methoden | 47 |
| 4.4.1 | Einbetten und Schneiden von Gewebe | 47 |
| 4.4.2 | Färbetechniken | 47 |
| 4.5 | Molekularbiologische Methoden | 51 |
| 4.5.1 | Gewinnung von Gewebe, Herstellen von zytosolischen Fraktionen und Proteinbestimmung | 51 |
| 4.5.2 | Western Blot | 51 |
| 4.5.3 | Co-Immunpräzipitation | 53 |
| 4.6 | Statistische Auswertung | 54 |
| 5. | Ergebnisse | 55 |

| | | |
|------------|--|-----|
| 5.1 | Die Rolle der nNOS bei portaler Hypertension | 55 |
| 5.1.1 | Körper- und Milzgewicht der verwendeten Tiere | 57 |
| 5.1.2 | Hyporeaktivität gegenüber α_1 -adrenerger Vasokonstriktoren | 57 |
| 5.1.3 | Resultat der nNOS-vermittelten Vasorelaxation nach PNS | 60 |
| 5.1.4 | Lokalisation der nNOS positiven Strukturen im mesenterialen Gefäßbett | 67 |
| 5.1.5 | Bestimmung der nNOS Proteinmenge | 71 |
| 5.1.6 | Einfluss von Geldanamycin auf die nNOS-vermittelte Vasorelaxation | 72 |
| 5.1.7 | Nachweis der HSP90/nNOS-Interaktion | 74 |
| 5.2 | Die Bedeutung von Neuropeptid Y für die portale Hypertension | 76 |
| 5.2.1 | Körper- und Milzgewicht der verwendeten Tiere | 76 |
| 5.2.2 | Lokalisation der NPY-positiven Fasern im mesenterialen Gefäßbett | 77 |
| 5.2.3 | Dosis-abhängige Wirkung von NPY auf die α_1 -vermittelte Vasokonstriktion | 78 |
| 5.2.4 | NPY-Effekt auf die α_1 -vermittelte Vasokonstriktion | 80 |
| 5.2.5 | Einfluss von NPY auf die nNOS vermittelte Vasorelaxation | 85 |
| 6. | Diskussion | 88 |
| 6.1 | Die neuronale NO-Synthase | 90 |
| 6.1.1 | Die Rolle der nNOS bei portaler Hypertension | 90 |
| 6.1.2 | <i>In vitro</i> Perfusion des mesenterialen Gefäßbettes | 91 |
| 6.1.3 | Lokalisation und Proteinmenge der nNOS | 93 |
| 6.1.4 | Interaktion von HSP90 mit der nNOS | 94 |
| 6.2 | Neuropeptid Y | 95 |
| 6.2.1 | Lokalisation von NPY | 95 |
| 6.2.2 | NPY potenziert die α_1 -adrenerge Vasokonstriktion | 95 |
| 6.2.3 | Die verschiedenen vaskulären Effekte von NPY | 96 |
| 7. | Zusammenfassung | 101 |
| 8 . | Literatur | 103 |

| | | |
|------------|-----------------------------|-----|
| 9. | Eigene Publikationen | 118 |
| 10. | Danksagung | 119 |

Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| ACh | Acetylcholin |
| ADH | antidiuretisches Hormon, Vasopressin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BH ₄ | Tetrahydrobiopterin |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| CaM | Calcium-Calmodulin Komplex |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CD26 | Dipeptidyl Dipeptidase IV |
| cGMP | cyclisches Guanosinmonophosphat |
| CGRP | <i>calcitonin gene related peptide</i> |
| DG | Diacylglycerin |
| EDRF | <i>endothelium derived relaxing factor</i> |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| GA | Geldanamycin |
| GPCR | <i>G-protein-coupled-receptor</i> |
| HE | Hematoxylin/Eosin |
| HRS | hepatorenales Syndrom |
| HSP90 | <i>heat shock protein 90</i> |
| HZS | hyperdynamies Zirkulationssyndrom |
| IFN _γ | Interferon γ |
| IP ₂ | Inositolbisphosphat |
| IP ₃ | Inositol-4,5-trisphosphat |
| L-NAME | Nitro-L-Arginin-Methylester |
| L-NMMA | N ^G -monomethyl-L-Arginin |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MTx | Methoxamin |
| NADPH | Nikotinamid-Adenin-dinukleotidphosphat |
| NANC | non-adrenerg-non-cholinerg |
| NE | Noradrenalin |
| NO | Stickstoffmonoxyd |
| NOS | Stickstoffmonoxyd Synthase |
| NPY | Neuropeptid Y |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PNS | periarterielle Nervenstimulation |
| PP | pankreatisches Peptid |
| PVL | portalvenöse Ligatur |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| SGC | lösliche Guanylylcyclase |
| SMA | Arteria mesenterica superior |
| SP | Substanz P |
| TBS | <i>tris- buffered- saline</i> |
| TRIM | 1-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazol |
| TTX | Tetrodotoxin |
| VIP | vasoaktives intestinales Peptid |

1. Einleitung

1.1 Das hyperdynamische Zirkulationssyndrom

Die arterielle Vasodilatation und die vaskuläre Dysregulation bilden den auslösenden Faktor für die Entstehung eines hyperdynamischen Zirkulationssyndroms (HZS) bei portaler Hypertension. Entscheidend in der Pathogenese des HZS ist das Auftreten einer peripheren, arteriellen Vasodilatation und einer vaskulären Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren (Benoit and Granger, 1986; Bernardi and Trevisani, 1997). Diese verminderte Reaktion auf Vasokonstriktoren wurde für Noradrenalin, Arginin-Vasopressin, Angiotensin, Endothelin, Methoxamin, etc. nachgewiesen (Sieber et al., 1993; Sieber et al., 1997; Hartleb et al., 1994; Kiel et al., 1985; Groszmann and Francis, 1999).

Auch portal venös ligierte Ratten (PVL), die ca. 10-14 Tagen nach Induktion der portalen Hypertension das Vollbild eines HZS entwickeln, weisen eine identische hämodynamische Dysregulation auf (Sieber and Groszmann, 1992). Durch die periphere Gefäßweitstellung kommt es zu einer relativen Hypovolämie und Hypotonie. Als gegenregulatorische Maßnahmen kommt es *via* Stimulation von arteriellen Barorezeptoren und kardiopulmonalen Volumenrezeptoren zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des sympathischen Nervensystems. Außerdem wird Arginin-Vasopressin aus der Hypophyse ausgeschüttet (Groszmann and Francis, 1999). Mediatoren dieser Systeme vermitteln renal eine Natrium- und Wasserretention, was zur Expansion des Plasmavolumens führt (Groszmann and Francis, 1999). Die arterielle Vasodilatation und die Plasmavolumenexpansion zusammen führen somit zum Vollbild des HZS. Die Splanchnikuszirkulation ist dabei von besonderer Bedeutung, da hämodynamische Veränderungen hier zuerst auftreten, im Verlauf stärker ausgeprägt und ein eigenständiger Faktor hinsichtlich der Progression der portalen Hypertension sind (Groszmann and Francis, 1999).

Daher kommt der mesenterialen Zirkulation und deren Gefäßregulation eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des HZS zu. In Abbildung 1 sind noch einmal die Faktoren und auch die gegenregulatorischen Maßnahmen schematisch dargestellt.

Der ausschlaggebende Faktor für die arterielle Vasodilatation ist die vaskuläre Überproduktion von Stickstoffmonoxyd (NO) (Wiest and Groszmann, 1999; Wiest et al., 1999; Albornoz et al., 2001). Hauptaugenmerk wurde dabei bisher auf die eNOS gerichtet, welche eine wichtige Rolle bei der portalen Hypertension spielt (Wiest et al., 1999; Gadano et

al., 1997; Cahill et al., 1996). Im Gegensatz dazu konnte kein iNOS-Protein nachgewiesen werden (Gyoda et al., 1995). Die bloße Anwesenheit von nNOS-enhaltenden Nervenfasern wurde in mehreren Gefäßen und mehreren Spezies nachgewiesen (Toda and Okamura, 1991; Toda et al., 1997; Leckstrom et al., 1993; Ignacio et al., 1997; Iadecola et al., 1993; Gyoda et al., 1995). Untersuchungen hinsichtlich der Rolle der nNOS für die bekannte vaskuläre NO-Überproduktion und Vasodilatation bei portaler Hypertension liegen bisher nicht vor.

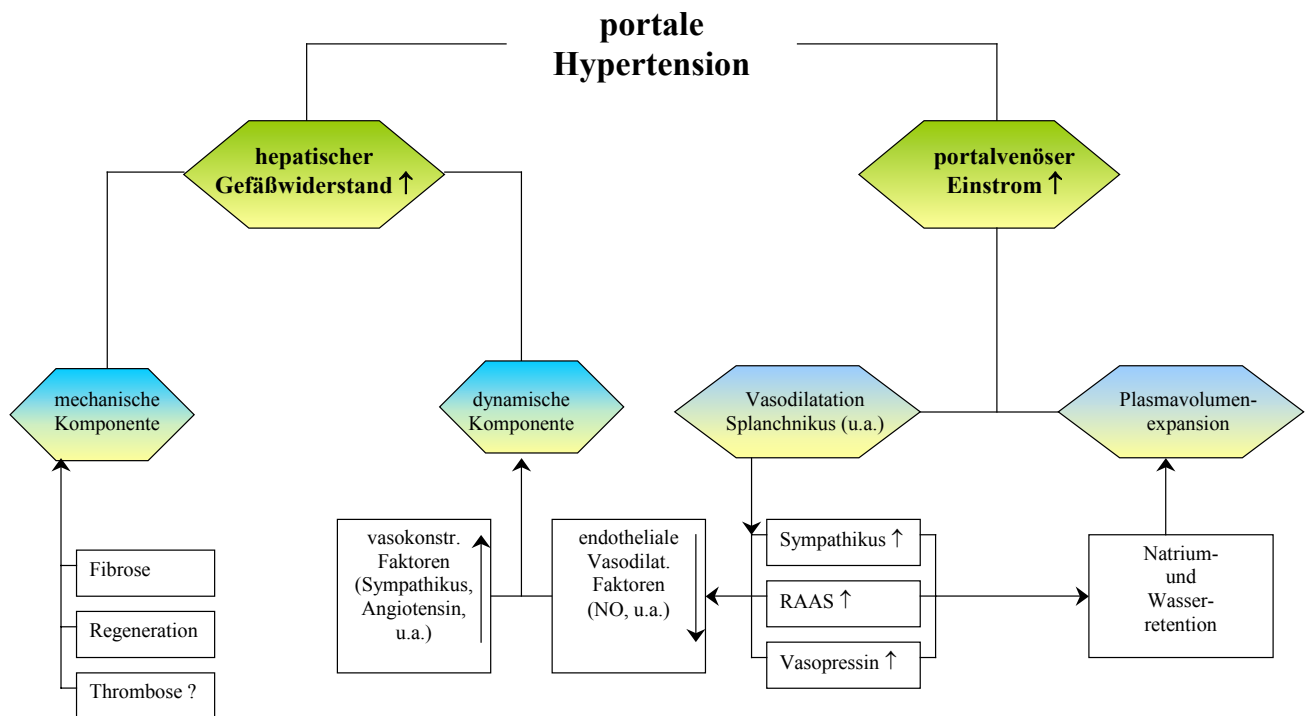


Abb. 1: Pathophysiologie des HZS. Ein erhöhter hepatischer Gefäßwiderstand und ein erhöhter portalvenöser Einstrom vermitteln die Steigerung des portalvenösen Druckes. Ein entscheidender Faktor bei der Steigerung des portalvenösen Druckes ist die splanchnische Vasodilatation.

Die Vasodilatation in Kombination mit einem erhöhten Blut- und Plasmavolumen ist rein makroskopisch schon an den beiden verwendeten Tiergruppen zu erkennen (Abb. 2). Während bei den Sham-Ratten eine normale Blutversorgung des Magen-Darm-Traktes vorliegt, zeigen sich schon makroskopisch bei den PVL-Tieren im Splanchnikusgebiet deutlich stärker durchblutete Gefäße (Abb. 2).

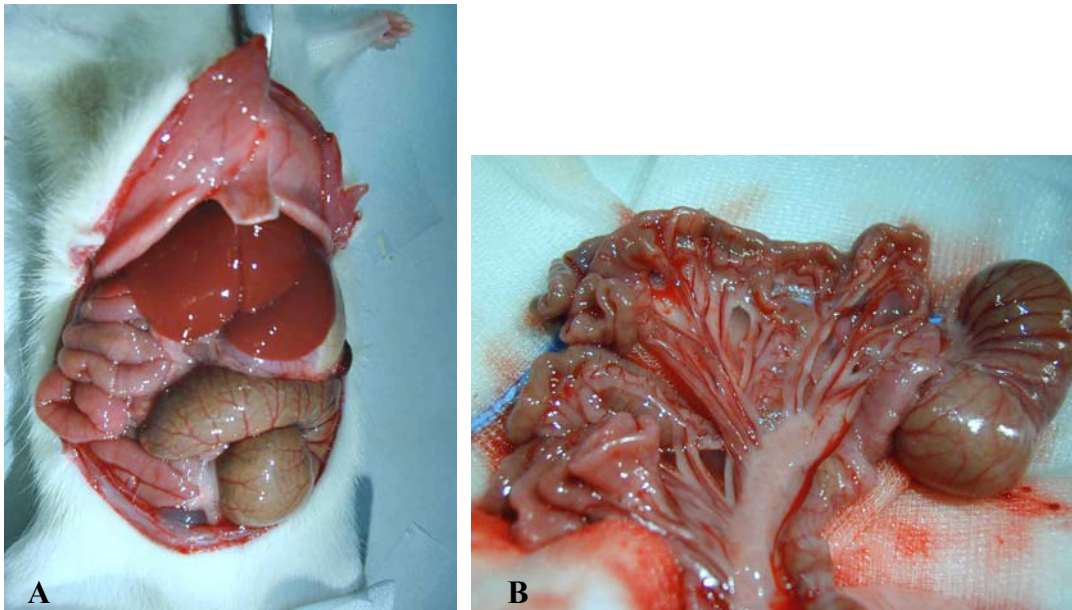


Abb. 2: Darstellung der Splanchnikusregion bei Sham- bzw. PVL-Ratten. **Abb. 2A:** Gezeigt ist die normotensive, kontrolloperierte Ratte. In **Abbildung 2B** ist das mesenteriale Gefäßbett einer hypertensiven PVL-Ratte abgebildet. Man kann erkennen, dass die mesenterialen Gefäße erweitert und von daher stark mit Blut gefüllt sind. Auch der Darm ist aufgrund der erhöhten Durchblutung und der venösen Kongestion dunkler gefärbt als bei den Sham-Ratten.

Die bei der portalen Hypertension in Verbindung mit der relativen Hypovolämie gesteigerte Sympathikusaktivität konnte durch eine erhöhte Plasmakonzentration an Noradrenalin (Henriksen et al., 1984) und anhand von muskulären Sympathikusaktivitätsmessungen gezeigt werden (Pozzi et al., 2001; Floras et al., 1991). NPY ist mit Noradrenalin in präsynaptischen Vesikeln co-lokalisiert und potenziert dessen vasokonstriktive Wirkung über den postsynaptisch gelegenen Y1-Rezeptor. Ferner konnte bei vielen pathophysiologischen Situationen des Menschen, bei denen der Sympathikustonus erhöht ist, eine gesteigerte NPY Konzentration gemessen werden. Zu solchen Zuständen gehören u. a. der Myokardinfarkt, ein erhöhtes Alter, sportliche Tätigkeit und Rauchen (Hulting et al., 1990; Morris et al., 1986; Rudehill et al., 1989; Ullman et al., 1990; Winther et al., 1992; Ahlborg et al., 1992; Maisel et al., 1989).

Dabei fehlen bisher Untersuchungen, inwiefern die Wirkung von NPY auf eine sympathoadrenerge Vasokonstriktion oder NO-vermittelte Vasodilatation bei portaler Hypertension im mesenterialen Gefäßbett verändert ist.

1.2. Pathophysiologie

Die portale Hypertension und das HZS bleiben nicht auf die splanchnische Region begrenzt, sondern betreffen viele Organe im Körper. Die Auswirkungen auf zwei wichtige betroffene Organe soll nachfolgend kurz skizziert werden.

Als erstes wäre die hepatische Enzephalopathie anzuführen. Zwei Faktoren sind hier wichtig: Zum einen sind die Leberfunktionsstörung mit eingeschränkter Leberzellmasse zu nennen und zum anderen sind die Umgehungskreisläufe, die das splanchnische Blut ohne Einbeziehung der Leber in den großen Kreislauf leiten, von Bedeutung. Die Folge ist ein Anströmen toxischer Substanzen und eine reduzierte Bewusstseinslage. Auch das Verhalten, der Intellekt, die Persönlichkeit und die neuromuskulären Aktivitäten sind verändert.

Eine der größten Komplikationen ist jedoch das hepatorenale Syndrom (HRS). Eine als Folge der zunehmenden arteriellen Vasodilatation im Endstadium einer Leberzirrhose/portalen Hypertension auftretende exzessive Stimulation der vasokonstriktiven Systeme (s.o.) vermittelt schließlich eine renale Vasokonstriktion und damit eine Verminderung der Nierenperfusion und -funktion. So ist das HRS mit einer hohen Mortalität verbunden: Es sterben bei einem Serumkreatinwert von $>2\text{mg/dl}$ mehr als 90 % der Erkrankten innerhalb von zehn Wochen.

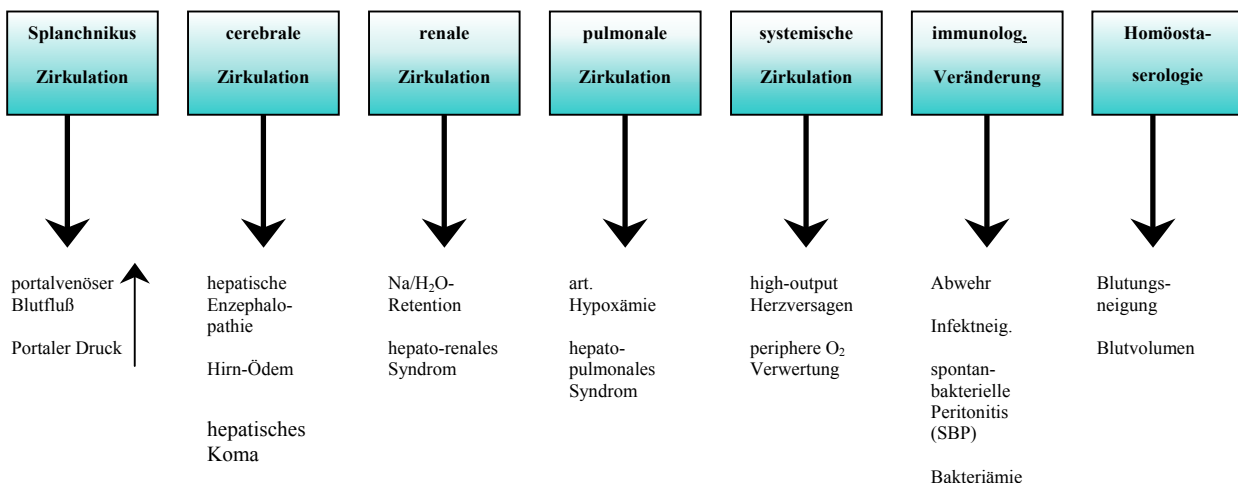


Abb. 3: Multiorganversagen bei portaler Hypertension. In dieser Grafik ist noch einmal dargestellt, auf welche Organsysteme das HZS Einfluss hat.

1.3 Klinik

1.3.1 Definition der Leberzirrhose

Das Erscheinungsbild der Leberzirrhose wurde das erste Mal im Jahre 1828 von Laennec beschrieben, und bis heute orientiert man sich vornehmlich an der Definition der WHO (*World Human Organisation*). Diese Begriffsbestimmung geht hauptsächlich auf die morphologischen Veränderungen der Leber zurück. Die Zirrhose wird demnach als ein diffuser Prozess beschrieben, der durch Fibrose und die Umwandlung der normalen Leberläppchenarchitektur sowie die Ausbildung strukturell abnormer nodulärer Regeneratknotten gekennzeichnet ist. Von der Zirrhose muss man die Fibrose, bei der sich das Bindegewebe innerhalb der Leber vermehrt, deutlich abgrenzen. Die Läppchenarchitektur und die Gefäßversorgung sind hierbei nicht betroffen. Eine Leberfibrose kann jedoch ein Vorstadium zur Leberzirrhose sein. Die Entwicklung zur Zirrhose ist aber nicht zwangsläufig. Die häufigsten Ursachen der Leberzirrhose sind vor allem in folgenden Faktoren zu sehen:

- Alkohol
- Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
- Autoimmunerkrankung (Autoimmunhepatitis)
- Chronische Cholestase mit Cholangitis
- Arzneimittel, Toxine und andere Fremdstoffe

Jede Leberzirrhose bedingt in Abhängigkeit vom Schweregrad die Ausbildung einer portalen Hypertonie. Diese ist die häufigste, und damit auch die mit der höchsten Letalität behaftete, Störung. Ein Großteil der Begleiterscheinungen wie z. B. gastroösophageale Varizenblutung, Aszites oder das hepatorenale Syndrom sind auf das Vorliegen einer portalen Hypertension zurückzuführen (s. u.).

1.3.2 Hämodynamik

Die Durchblutung der Leber macht ca. 25 % des Herzminutenvolumens aus. Davon stammen $\frac{2}{3}$ aus der Pfortader. Letztere führt das venöse Blut aus Magen, Darm, Pankreas und Milz zur Leber. Etwa $\frac{1}{3}$ des Blutes stammt aus der Arteria hepatica.

Um die Problematik und die Folgen der portalen Hypertension genau zu schildern, sind im Folgenden zwei physikalische Gesetze aufgeführt, die Druck, Blutfluss, Gefäßwiderstand und Durchmesser in Zusammenhang bringen.

1. Ohmsches Gesetz: $P = Q \times R$
2. Hagen-Poiseuillesches Gesetz II: $R = (8 \times \eta \times L) / (p \times r^4)$

Dabei ist : P- Pfortaderdruck ; Q=Blutfluss; R=Gefäßwiderstand; η =Viskosität;
L=Gefäßlänge; r=Gefäßradius; p=Gefäßdruck

Was diese beiden Gesetze zum Ausdruck bringen sollen, ist die Tatsache, dass zum einen der Pfortaderdruck P direkt vom Gefäßwiderstand R und zum anderen der Gefäßwiderstand R vom Gefäßradius r in der vierten Potenz abhängt. Da die Leber selbst den Blutfluss nicht kontrollieren kann, übernehmen diese Aufgabe die Widerstandsgefäße im Splanchnikusgebiet. Das bedeutet für eine gesunde Leber, dass sie sich dem portalvenösen Druck anpasst, und dieser über einen weiten Bereich des venösen Einstromes konstant bleibt. Bei einer zirrhotischen Leber ist das jedoch anders. Bedingt durch den zirrhotischen Umbau, kann die Steigerung des portalvenösen Blutstromes nur bedingt oder gar nicht kompensiert werden.

Für die chirurgisch bedingte Stenose der Portalvene, wie es bei den in dieser Arbeit verwendeten portalvenös ligierten (PVL) Ratten der Fall ist, bedeutet das Hagen-Poiseuillesche Gesetz, dass eine Verengung der Vene um die Hälfte mit einer Steigerung des Gefäßwiderstandes und damit auch des Pfortaderdruckes um das 16fache einhergeht.

1.4 Stickstoffmonoxyd (NO)

Stickstoffmonoxyd, das insbesondere durch die vermehrt auftretenden Autoabgase und durch Industrie-Emissionen in die Atmosphäre gelangt, wurde lange Zeit als zytotoxisch eingestuft. Später fand man heraus, dass es bei vielen Regulationsprozessen im menschlichen Körper eine wichtige Rolle spielt (Furchgott, 1980).

1980 wurde im Gefäßsystem eine Substanz entdeckt, die als EDRF (*endothelium derived relaxing factor*) bezeichnet wurde. Sie hatte eine relaxierende Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur. Sieben Jahre später vermutete man, dass es sich bei dem EDRF um Stickstoffmonoxyd (NO) handelt. Diese Hypothese wurde durch folgende Untersuchungen bestätigt: Einerseits konnte in Endothelzellen gebildetes NO nach Reaktion mit Ozon mittels einer Chemilumineszenz-Methode quantifiziert und mit dem Ausmaß der Relaxation von Gefäßstreifen korreliert werden (Palmer et al., 1987). Andererseits wurde das NO nach Zersetzung zu Nitrat und Nitrit spektralphotometrisch bestimmt und mit der biologischen Wirkung, in diesem Fall war es die Hemmung der Thrombozytenaggregation, verglichen (Ignarro et al., 1988). In der Abbildung 4 ist der NO-Produktions- und Signalweg aufgezeigt. Bei den zellulären Effekten spielt vor allem der *second messenger* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) eine wichtige Rolle .

1.4.1 Die drei Isoformen der NO-Synthase

Mitte der 90er Jahre begann eine intensive Forschungsarbeit über die NOS-Isoformen (Ignarro et al., 1988; Moncada et al., 1988), über die NO-abbauenden Enzyme, die Phosphodiesterasen, und über die Inhibitoren dieser Enzyme (Palmer et al., 1988). Insgesamt sind mittlerweile drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) bekannt, die endotheliale (eNOS), die induzierbare (iNOS) und die neuronale NOS (nNOS), die alle zwischen 1991 und 1994 kloniert und aufgereinigt werden konnten. Die Regulation und Lokalisation sind wichtige Unterscheidungsmerkmale dieser Isoenzyme.

Die nNOS wird konstitutiv exprimiert und durch die Bindung eines Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes stimuliert, und ist daher in ihrer Aktivität abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Anfang der 90er Jahre konnte die nNOS isoliert (Bredt and Snyder, 1990) und somit ein spezifisches Antiserum gewonnen werden. Mittels immunhistochemischer Methoden wurde gezeigt, dass die neuronale nNOS in vielen Gefäßen und in unterschiedlichsten Spezies vorkommt (Toda and Okamura, 1991; Toda et al., 1997a; Leckstrom et al., 1993; Ignacio et al., 1997; Iadecola et al., 1993; Gyoda et al., 1995).

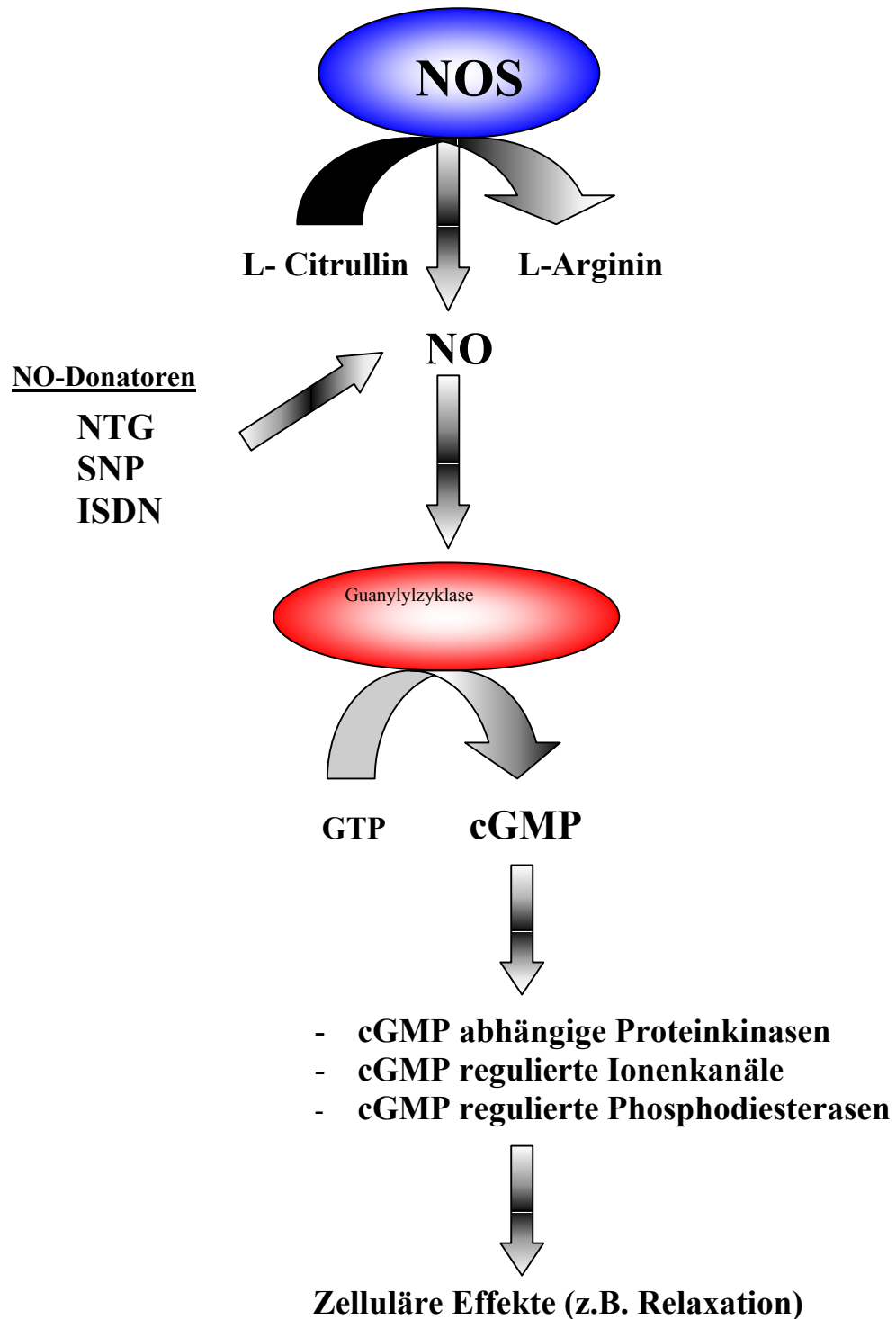


Abb. 4: NO/cGMP vermittelte Signaltransduktion. Das Stickstoffmonoxyd (NO) wird von NO-Synthasen (eNOS, iNOS, nNOS) gebildet oder von NO-Donatoren freigesetzt. Es stimuliert die NO-sensitive Guanylylzyklase, was zu einer gesteigerten cGMP Synthese führt. Dieser *second messenger* wird entweder von Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut, oder er stimuliert Proteinkinasen und Ionenkanäle, wonach es zu den jeweiligen zellulären Effekten kommt. Abkürzungen: NTG = Nitroglycerin, SNP = Sodianitroprussid, ISDN = Isosorbitnitrat.

Mittels eines Perfusion-Bioassays wurde nachgewiesen, dass NO (von der nNOS synthetisiert) ein Transmitter der NANC (non-adrenerg-non-cholinerg)-Neurone ist, und somit die Vasorelaxation von Blutgefäßen bedingt (Bult et al., 1990) (Abschnitt 1.4.2.3). Als NANC-Transmitter der Gefäße existiert neben NO auch *calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP), Substanz P und ATP, welche ebenfalls eine Vasodilatation vermitteln (Lundberg, 1996). Abgesehen von den Blutgefäßen versorgen die NANC-Neurone auch den Gastrointestinaltrakt, wo Adenosintriphosphat (ATP) und vasoaktives intestinales Peptid (VIP) als Mediatoren eine Rolle spielen (Burnstock, 1972).

Die eNOS ist, wie der Name schon sagt, im Endothel nachzuweisen. Sie wird vor allem durch Scherkräfte aber auch durch Hormone, wie z. B. Bradykinin, Histamin und Serotonin aktiviert (Ignarro, 1986). Letztere binden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, was ebenso wie die Scherkräfte einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt. Genau wie bei der nNOS ist auch für die Aktivität der eNOS eine Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes essentiell (Gadano et al., 1997; Hayashi et al., 1999). Diese NOS-Isoform ist vor allem bei der Blutdruckregulation im Gefäßsystem und bei der Thrombozytenaggregation von Bedeutung.

Diesen beiden NOS-Isoformen (eNOS/nNOS) ist eine transiente, kurzfristige NO-Freisetzung gemeinsam, die vor allem in der glatten Muskulatur der Gefäße eine relaxierende Wirkung hat.

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird erst nach Kontakt von Makrophagen mit proinflammatorischen Zytokinen bzw. mit bakteriellen Toxinen, z. B. Lipopolysaccharid (LPS), *de novo* synthetisiert (MacMicking et al., 1995; Thiemann, 2004; Moncada et al., 1991). Die Aktivierung der iNOS hat eine langanhaltende Synthese großer Mengen NO zur Folge, das zusammen mit Sauerstoffradikalen eine toxische Wirkung entfaltet (Henry, 1993). Bei *knock out* Mäusen, in denen das iNOS-Gen ausgeschaltet wurde, konnte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber intrazellulären Pathogenen festgestellt werden. Durch dieses Experiment wurde gezeigt, dass NO ein wichtiger Bestandteil der zellulären Immunabwehr ist. Außer in Makrophagen wird die iNOS u. a. noch in glatten Muskelzellen, in der Leber und im Myokard gebildet.

Da für die Fragestellung in dieser Arbeit vor allem die neuronale NO-Synthase von Bedeutung war, wird im Folgenden zum größten Teil diese Isoform behandelt.

1.4.2 Die neuronale NO-Synthase (nNOS)

1.4.2.1 Struktur und Funktion

Die nNO-Synthase gehört zu der Familie der Cytochrom P450 Enzyme. Sie liegen in ihrer aktiven Form als Dimer vor, das verschiedene Kofaktoren wie (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Haem bindet. Diese Kofaktoren sind für die Umwandlung von L-Arginin zu Citrullin über die Zwischenstufe des L-Hydroxyarginins von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Reaktion entsteht NO und NADPH (Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat), welches im Verlauf der Reaktion zu NADP reduziert wird (Klatt et al., 1992; Mayer et al., 1990). Die molekulare Struktur (Abb. 5) lässt sich in zwei Bereiche unterteilen. Zum einen existiert eine Oxygenase-Domäne, die die Bindungsstellen für das Haem, BH₄ und L-Arginin besitzt, und zum anderen kommt eine Reduktase-Domäne mit den Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH vor. An dem C-terminalen Ende der Oxygenase-Domäne befindet sich die Calcium-Calmodulin (CaM) bindende Sequenz.

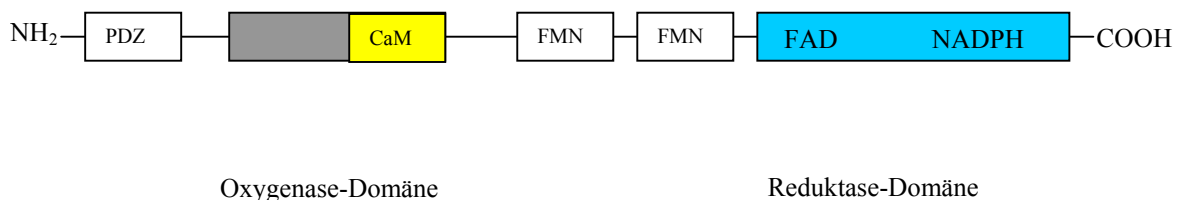


Abb. 5: Struktur der Domäne von humaner nNOS. Die nNOS beinhaltet zum einen die Oxygenase-Domäne (503 Aminosäuren) und zum anderen die Reduktase-Domäne (435 Aminosäuren). Das Gesamtprotein enthält 1434 Aminosäuren und ist ~160 kDa schwer. Abkürzungen: PDZ=PDZ-Domäne; CaM=Bindungsstelle für Ca²⁺/Calmodulin; FMN=Flavinmononukleotid; FAD= Flavinadenindinukleotid; NADPH=Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (nach Toda and Okamura, 2003)

Die Bindung von CaM an die nNOS wird als entscheidender Faktor für die Regulation der Enzymaktivität angesehen. Diese hängt somit vor allem von dem intrazellulären Ca²⁺-Spiegel ab. Die nNOS wird zudem posttranskriptional reguliert und hat einige *splice* Varianten (Alderton et al., 2001; Wang et al., 1999a). Untersuchungen an Mäusegehirnen zeigten, dass sich die alternativen 5'-mRNA *splice* Varianten in drei NH₂-*splice* Varianten auf Proteinebene äußern (Eliasson et al., 1997). Sie werden mit nNOS α , nNOS β und nNOS γ bezeichnet (Abb. 6) und haben folgende Charakteristika: nNOS α hat eine ganz normale

Enzymaktivität, und das Protein weist eine PDZ-Domäne (kodiert in Exon 2) auf, was u. a. eine Assoziation dieses Proteins mit der Membran möglich macht. Den *splice* Varianten nNOS β und nNOS γ fehlt diese PDZ-Domäne, weswegen sie cytosolisch lokalisiert sind. Der Grund ist das fehlende Exon 2. Die Verteilung der exprimierten nNOS-*splice* Varianten kann sich abhängig von der Entwicklung, von physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen ändern (Huber et al., 1998).

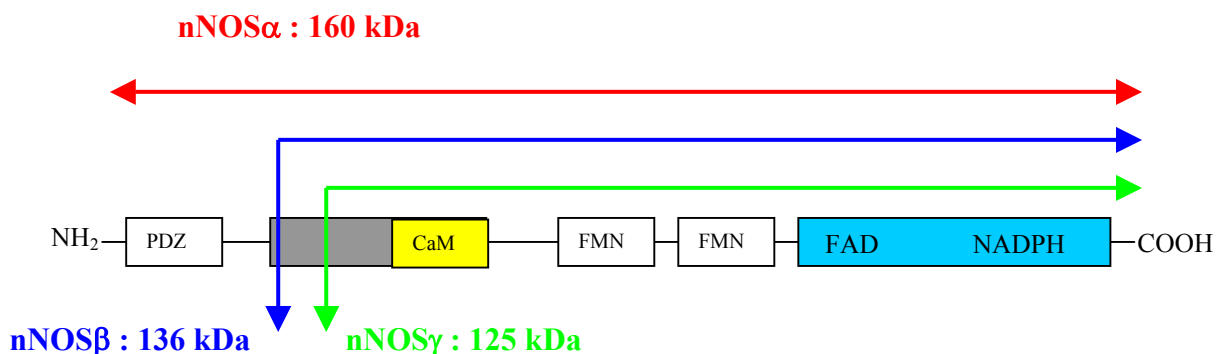


Abb. 6: *Splice* Varianten der nNOS in der Ratte. Insgesamt gibt es drei *splice* Varianten, die sich in ihrer Größe und ihrer intrazellulären Lokalisation unterscheiden. Während die nNOS α membrangebunden ist, kommen die beiden anderen Isoformen nNOS β und nNOS γ im Zytosol vor.

Rot: nNOS α Aminosäuren 1-1433; blau: nNOS β Aminosäuren 236-1433; grün: nNOS γ Aminosäuren 336-1433
Abkürzungen: PDZ=PDZ-Domäne; CaM=Bindungsstelle für Ca²⁺/Calmodulin; FMN=Flavinmononukleotid; FAD= Flavinadeninukleotid; NADPH=Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat

(nach: Wang et al., 1999b; Alderton et al., 2001)

1.4.2.2 Lokalisation

Die Lokalisation der nNOS wurde vor allem durch immunhistochemische Verfahren mit einem nNOS-spezifischen Antikörper untersucht. Bei mesenterialen Arterien konnten periarterielle Fasern, die nNOS enthalten, gefunden werden (Beesley, 1995). Sie waren vor allem in der Adventitia und an der Grenze von Adventitia zur Media lokalisiert und konnten bereits in verschiedenen Tiergruppen nachgewiesen werden (Beesley, 1995; Blottner et al., 1995). Auch bei den Blutgefäßen im Gehirn zeigte sich, dass die perivaskulären nNOS-positiven Fasern vor allem in der Adventitia lokalisiert sind (Stanarius et al., 1998). Daneben finden sich nNOS-positive Nervenfasern in zahlreichen peripheren autonomen Nerven, wie z. B. in der Adventitia retinaler, lingualer, uteriner und kutaner Blutgefäße (Merhi et al., 1998; Toda et al., 1994a; Toda et al., 1997b; Toda et al., 1994b), sowie in der Adventitia der Arteria iliaca, femorales und renales (Davisson et al., 1997; Vials et al., 1997). Ferner konnte

Anfang 1990 gezeigt werden, dass die Cholinesterase-/Cholintransferase-, die Thyrosinhydroxylase- (Owman, 1990) und die NOS-positiven Nervenfasern (Nozaki et al., 1993) kolokalisiert sind. Dies dürfte vor allem bei der Regulation der Gefäßweite wichtig sein.

Interessant ist auch, dass die Anzahl der nNOS-positiv gefärbten Nervenfasern abhängig vom Alter der untersuchten Tiere ist. So zeigten sich bei 24 Monate alten Ratten signifikant weniger NOS-positive Fasern als bei acht bzw. zwei Monate alten Ratten (Carrier et al., 1997). Die durch die nNOS freigesetzte NO-Menge scheint ebenfalls vom Alter abhängig zu sein (Ferrer and Balfagon, 2001; Sieber and Groszmann, 1992).

1.4.2.3 Gefäßregulation durch die nNOS

Der systemische Blutdruck wird über die Veränderung des Durchmessers von Arterien und Arteriolen reguliert, wobei die nitrogen- und auch die adrenergen-Nervenfasern, welche die peripheren Arterien innervieren, relevant sind (Abb. 7). Das bedeutet, dass sowohl die relaxierenden/nitrogenen, als auch die konstriktierenden/adrenergen Nervenfasern für die Gefäßregulation und damit auch für die Regulation des systemischen Blutdruckes eine wichtige Rolle spielen.

In vivo Versuche haben gezeigt, dass die Gabe von NOS-Inhibitoren, wie z. B. Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) oder N^G-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), den Blutdruck bei Ratten deutlich erhöhen (Fozard and Part, 1991; Lacolley et al., 1991). Dieser Effekt war nach Gabe von L-Arginin reversibel. Die Versuche ließen eine Beteiligung von NO-Synthasen, wie z. B. der nNOS oder auch der eNOS, bei der Gefäßregulation vermuten. Versuche an Hunden (Toda et al., 1993) zeigten, dass durch die Gabe von *ganglion blocking agents* auch die nNOS im Zusammenspiel mit der eNOS die Gefäßweite reguliert. In der Tat ließ sich durch die Verwendung von spezifischen nNOS Blockern zeigen, dass die nNOS für die Blutdruckregulation wichtig ist (Ollerstam et al., 1997). Weitere Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung der nNOS für die Gefäßregulation (Toda and Okamura, 1990; Toda and Okamura, 1991). Die Funktion der konstitutiv exprimierten NO-Synthasen wurde auch anhand von *knock out* Mäusen untersucht. Ihnen fehlte entweder das Gen für die nNOS oder aber die genetische Information für die eNOS. Während die nNOS *knock out* Mäuse normotensiv blieben (Nelson et al., 1995), kam es bei den eNOS *knock out* Mäusen zur Ausbildung einer systemischen und pulmonalen Hypertension (Huang et al., 1995; Shesely et

al., 1996). Das belegt eine dominante Bedeutung der eNOS für die Regulation des Blutdruckes. Eine Rolle der nNOS ist jedoch nicht ausgeschlossen.

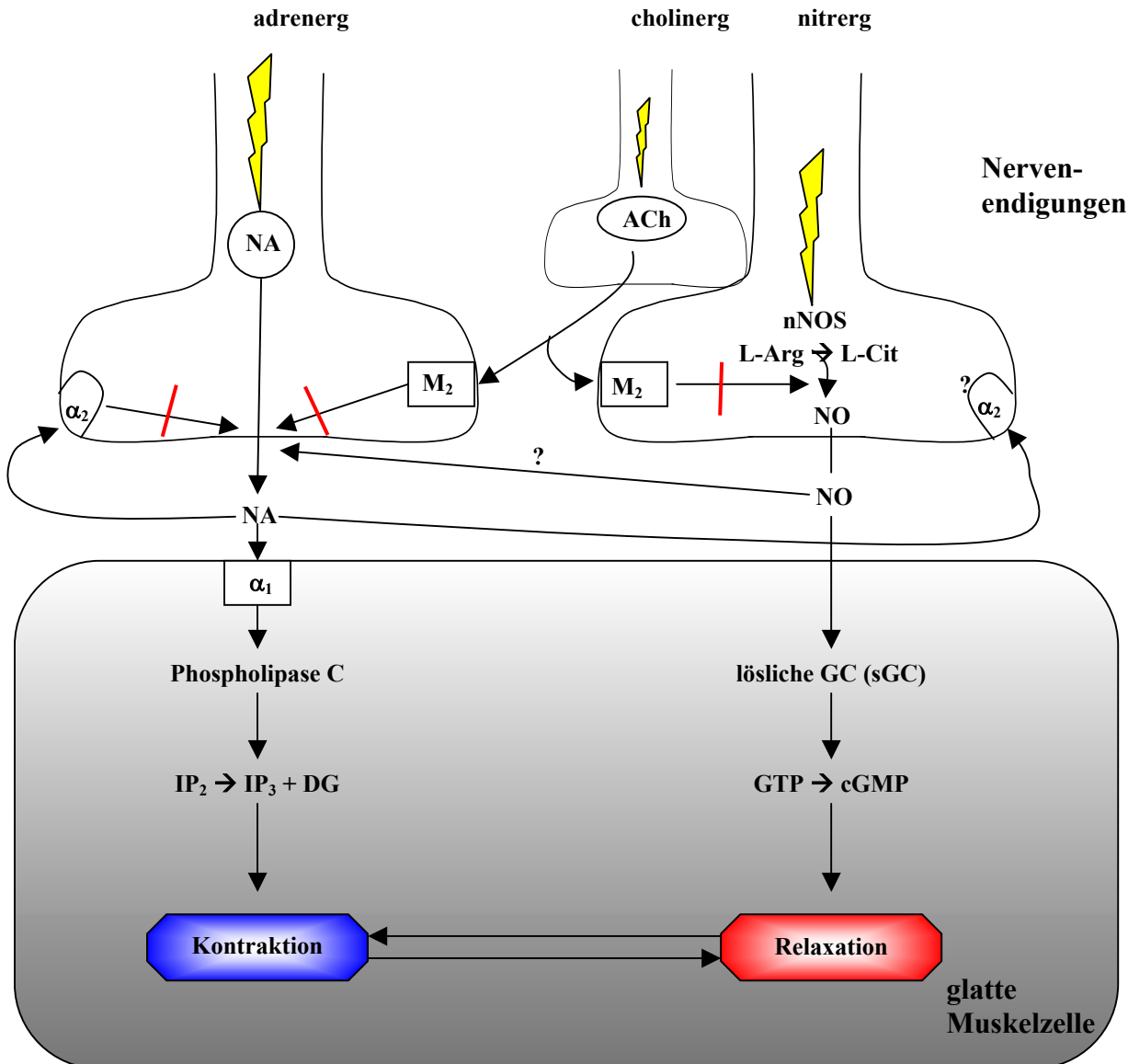


Abb. 7: Schematische Darstellung der Interaktion verschiedener Nervenfasern an der glatten Gefäßmuskulatur. Dargestellt ist die prä- und postsynaptische Seite von nitregergen-, cholinergen und adrenergen Nervenfasern, deren Interaktion einen wichtigen Einfluss auf die Regulation der Kontraktion bzw. Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur hat.

Abkürzungen: | = Hemmung; α_1 und α_2 =adrenerge Rezeptoren; ACh=Acetylcholin; cGMP=zyklisches Guanosinmonophosphat DG=Diacylglycerol; IP_2 =Inositolbisphosphat; IP_3 =Inositol-1,4,5-trisphosphat; L-Arg =L-Arginin; L-Cit=L-Citrullin; M_2 =muskarinerge Rezeptoren Typ 2; NA=Noradrenalin; sGC=lösliche Guanylylzyklase

(nach: Toda and Okamura, 2003)

1.4.3 Guanylylzyklase und der second messenger cGMP

1.4.3.1 Die lösliche Guanylylzyklase (sGC)

Bereits 1969 konnte gezeigt werden, dass die Guanylylzyklase eine cGMP-bildende Aktivität besitzt (Schultz, 1969; Hardman, 1969). Es dauerte jedoch bis Mitte der 70er Jahre, dass verschiedene Subtypen charakterisiert wurden. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrer zellulären Lokalisation (zytosolisch vs. membranständig), sondern auch in ihrer Struktur und Regulation. Zwar sind die membranständigen Guanylylzyklasen (m/p GC) (sie gehören zu den rezeptorgebundenen transmembranären Enzymen) den löslichen Guanylylzyklasen (sGC) strukturell sehr ähnlich, dennoch lassen sie sich aber nicht durch NO stimulieren. Die sGC ist der intrazelluläre Effektor für NO. Sie ist ein Heterodimer und besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, von denen jeweils zwei weitere Untereinheiten entdeckt wurden: α_1 , α_2 , β_1 , und β_2 . Es konnten jedoch bisher nur zwei enzymatisch aktive Isoformen auf Proteinebene identifiziert werden. Die Kombination von $\alpha_1\beta_1$ ist am weitesten verbreitet, wohingegen die Isoform $\alpha_2\beta_1$ bisher nur in der humanen Plazenta gefunden wurde (Russwurm et al., 1998). Zwar konnten in Sf9-Zellen auch Homodimere nachgewiesen werden, z. B. $\alpha_1\alpha_1$ und $\beta_1\beta_1$, jedoch wurde keine enzymatische Aktivität gemessen (Zabel et al., 1999). In Abbildung 8 ist die Struktur der sGC schematisch dargestellt. Schon hier sei erwähnt, dass HSP90 ein Aktivator der sGC ist (Abschnitt 1.4.4.).

1.4.3.2 Hydrolyse von cGMP

Der *second messenger* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) wird von Phosphodiesterasen zu 5'-GMP abgebaut. Das allgemeine Reaktionsschema lautet:



Zur Familie der Phosphodiesterasen gehören zehn verschiedene Subtypen, die Unterschiede in Gewebeverteilung, Regulation, subzellulärer Lokalisation, Reaktionskinetik und Substratspezifität für cGMP bzw. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aufweisen. Zu den Phosphodiesterasen mit hoher Spezifität für die Hydrolyse von cGMP (cG-PDE) gehören die Typen PDE 5, PDE 6, PDE 8 und PDE 9. (Corbin and Francis, 1999).

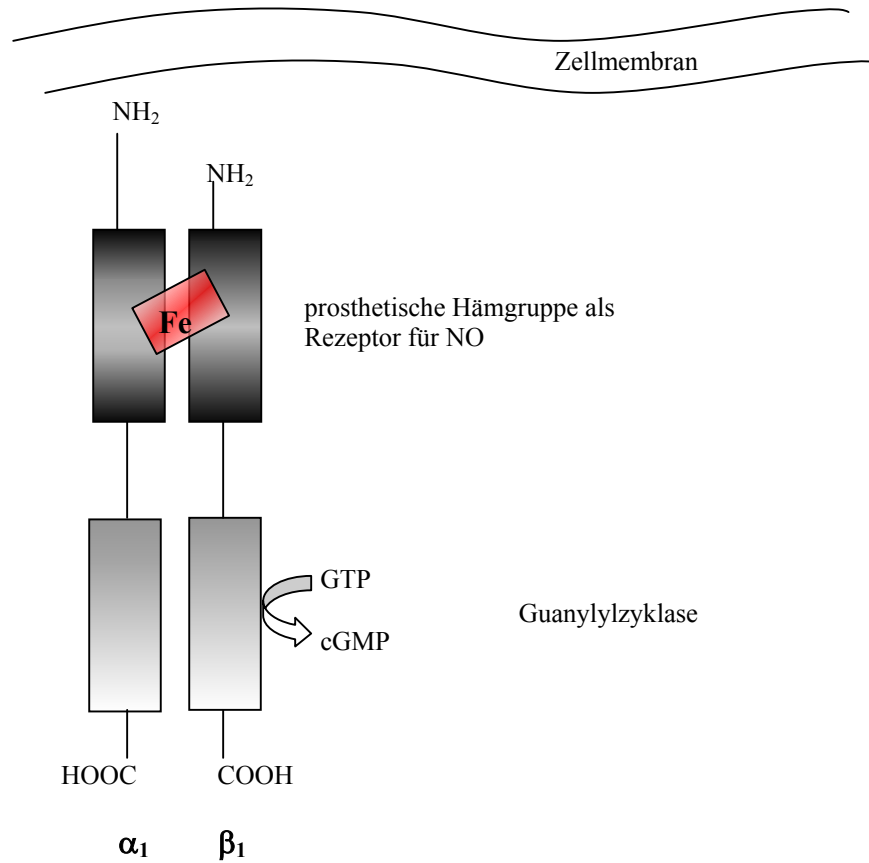


Abb. 8: Schematische Darstellung der löslichen Guanylylzyklase (sGC). Gezeigt ist ein Heterodimer aus einer $\alpha_1\beta_1$ -Untereinheit. Das NO bindet an die prothetische Hämgruppe und aktiviert so die Guanylylzyklase (sGC), worauf der *second messenger* cGMP produziert wird. Vor allem die C-terminalen Bereiche sind bei den Isoformen der Guanylylzyklase zwischen den verschiedenen Spezies hoch konserviert.

Die PDE 5 ist ein Homodimer und wird in vielen Geweben von Säugetieren, in glatter Gefäßmuskulatur (Hanasato et al., 1999; Kotera et al., 2000; Silver et al., 1998) und Zerebralarterien (Kruuse et al., 2001) exprimiert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die PDE 5 in fünf *splice* Varianten (PDE 5 1-5) vorkommt, die sich funktionell nicht voneinander unterscheiden (Lin et al., 2000). Die PDE 5 ist zum einen in der Lage das cGMP an einer regulatorischen Domäne zu binden, und zum anderen hydrolysiert sie es an einer katalytischen Domäne (Corbin and Francis, 1999). Daher ging man lange Zeit davon aus, dass es sich um eine cGMP-spezifische PDE handelt. Mittlerweile konnte jedoch nachgewiesen werden, dass sowohl die katalytische, als auch die regulatorische Domäne ebenfalls eine hohe Spezifität gegenüber cAMP aufweisen (Francis et al., 2001). Auch medizinisch gesehen ist die PDE 5 von Bedeutung, da eine Hemmung z. B. durch Sildenafil (Viagra) vor allem bei der Therapie der erektilen Dysfunktion, Herzerkrankungen und pulmonaler Hypertension eine Rolle spielt.

Bei der Untersuchung des NO/cGMP-Signalweges in Thrombozyten wurde herausgefunden, dass es bei Vorinkubationen und anschließender Stimulation mit NO zu einer Abnahme der cGMP-Bildung kommt (Mullershausen et al., 2001). Diese sogenannte Desensitisierung ließ sich nach weiteren Versuchen nicht auf eine geringere Aktivität der sGC, sondern auf eine gesteigerte PDE-Aktivität zurückführen, die über 60 min hinweg aktiv bleibt. Weitere Experimente zeigten, dass es auf diesem Weg innerhalb der NO/cGMP-Kaskade nicht nur zur Signalweiterleitung, sondern auch zur Signalverarbeitung kommt (Mullershausen et al., 2001).

1.4.4 Interaktion der nNOS mit anderen Proteinen

Bei der neuronalen NO-Synthase (nNOS) konnten Interaktionen mit verschiedenen Proteinen nachgewiesen werden. In der folgenden Tabelle sind für alle drei NOS-Isoformen einige der interagierenden Proteine mit ihrer Wirkung (sofern bereits bekannt) aufgeführt.

| nNOS | eNOS | iNOS |
|--|---|----------------|
| Calmodulin (↑) PDZ Domänenproteine : PSD-95, PSD-93, α_1 -Syntrophin, CAPON, Phosphofruktokinase-M, Caveolin-3 HSP90(↑) | Calmodulin (↑), Bradykinin B2 Rezeptor (↓?) AT ₁ -Rezeptor (↑) Caveolin-1/3 (↓) HSP90(↑) | Calmodulin (↑) |

Tab. 1: Wo es bekannt ist, sind die Effekte auf die NOS-Aktivität als Pfeile (↑ = aktivierend; ↓ = hemmend) angegeben. Abkürzungen: AT₁-Rezeptor=Angiotensin 1-Rezeptor

(nach : Kone et al., 2003)

Die essentielle Bedeutung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes für die Aktivierung der einzelnen NOS-Isoformen ist 1997 aufgeklärt worden (Stuehr, 1997). Im Gegensatz zur iNOS sind die beiden Isoformen eNOS und nNOS Ca²⁺-abhängig. Caveolin-1, das integrale Membranprotein der Caveolae, hemmt die eNOS *in vitro*. Ebenfalls konnte ein hemmender Effekt in Endothelzellen *in vivo* gezeigt werden (Garcia-Cardena et al., 1996; Garcia-Cardena et al., 1997; Ju et al., 1997).

HSP90, so konnte von Shah et al. im Jahr 1999 mittels Immunpräzipitation belegt werden, bindet als ein wichtiger Regulator der eNOS an diese Isoform. Ferner zeigten sie mittels Immunhistochemie, dass der eNOS/HSP90-Komplex im Endothel von mesenterialen Gefäßen vorkommt (Shah et al., 1999). Diese Daten wurden mittels *in vitro* Perfusionsexperimenten am mesenterialem Gefäßbett untermauert. Dabei wurde ein mit Methoxamin präkonstriktiertes mesenteriales Gefäßbett mittels Acetylcholin (ACh) relaxiert, was eine eNOS-induzierte NO-Freisetzung bewirkte. Nach Gabe von Geldanamycin, ein Inhibitor der eNOS/HSP90-Bindung, war die Relaxation deutlich vermindert (Shah et al., 1999). Durch Experimente mit COS-Zellen, die mit eNOS Vektor (+/-) und einem eNOS/HSP90 Vektor (+/-) transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass HSP90 ein allosterischer Aktivator der eNOS ist. Vermutlich führt die Bindung von HSP90 zu einer Konformationsänderung des Enzyms (Garcia-Cardena et al., 1998). In der folgenden Abbildung ist ein Modell skizziert, wie man sich die Bindung von HSP90 an die eNOS derzeit vorstellt.

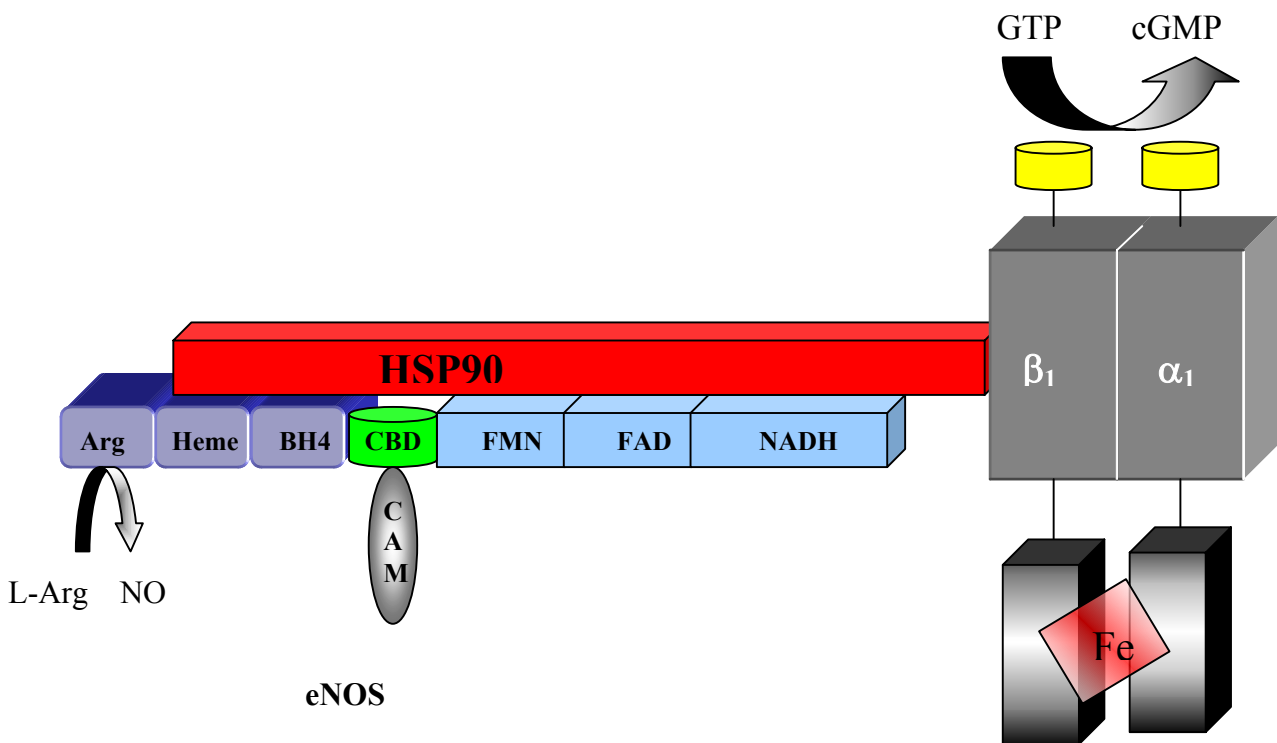


Abb. 9: Schematische Darstellung der eNOS/HSP90-Interaktion. Experimente mit einklonierten Fusionsproteinen sGC β_1 +HSP90+eNOS zeigten, dass es in der Zelle zu einem Multiproteinkomplex aus der β_1 -Untereinheit der löslichen Guanylylzyklase (sGC), dem HSP90 und der eNOS kommt.

Abkürzungen: L-Arg=L-Arginin, BH₄=Tetrahydrobiopterin, CBD=*calmodulin binding domain*, CAM=Calmodulin, FMN=Flavinmononukleotid, FAD=Favinadenindinukleotid, NADH=Nicotinamid-adenindinukleotid.
(nach Venema et al., 2003)

Bezüglich der nNOS konnte gezeigt werden, dass HSP90 offenbar auch die Funktion eines allosterischen Aktivators ausübt. Weiterhin scheint HSP90 die Ca²⁺/Calmodulin-(CaM) Bindung an die nNOS zu erleichtern (Song et al., 2001). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass HSP90 eine ATP-abhängige Umbildung der ligandenbindenden Domäne bewirkt. Das bedeutet, dass HSP90 die Haem-Bindung an die nNOS erleichtert, sodass ein funktionsfähiges Enzym entsteht (Bender et al., 1999).

1.5 NPY

Im Jahre 1980 wurden von Tatemoto und Mutt aus Schweinegehirn und -darm große Mengen eines Peptides isoliert, welches sie pankreatisches Peptid (PP) nannten. Das PP-ähnliche Peptid aus dem Darm wurde PYY genannt. Zuerst nahm man an, dass das PYY in Darm und Gehirn identisch sei. Später stellte sich jedoch heraus, dass sie sich strukturell voneinander unterscheiden, und so wurde das aus dem Gehirn isolierte PYY Neuropeptid Y (NPY) genannt (Tatemoto, 1982b; Tatemoto et al., 1982). Der Name NPY setzt sich zum einen aus seiner Lokalisation („Neuropeptid“ = vor allem in Neuronen vorkommend) und aus den strukturellen Besonderheiten des Peptids („Y“ steht für die Aminosäure Tyrosin) zusammen. Die komplette Sequenz von PYY und NPY wurde ungefähr zur gleichen Zeit veröffentlicht (Tatemoto, 1982b; Tatemoto, 1982a). Als die ersten Antiseren gegen NPY erhältlich waren, zeigte sich, dass NPY nicht nur im Gehirn, sondern auch in der Peripherie vorhanden war. Eine sehr hohe Anzahl an NPY-positiven Strukturen wurde vor allem in den Blutgefäßen, sowie im Herz, Darm und im Pankreas gefunden. Bereits Anfang der 90er Jahre konnte man zeigen, dass viele Nervenzellen NPY-positiv sind, und es sich dabei um sympathische Nervenfasern handelt (Lundberg et al., 1982b).

1.5.1 Synthese und Struktur von NPY

Während die Vorläuferform des Proteins Neuropeptid Y (NPY) 97 Aminosäuren lang ist (Minth et al., 1984), besteht die Primärstruktur bei allen Säugetieren aus 36 Aminosäuren. Es ist eines der konserviertesten Peptide im Tierreich. Zwischen den Säugetieren unterscheidet sich die Aminosäuresequenz maximal an zwei Stellen. Mittels röntgenchystallographischer Untersuchungen konnte man die dreidimensionale Struktur von NPY näher beschreiben und so ein Modell für die Tertiärstruktur entwickeln (MacKerell, Jr., 1991; Allen et al., 1987). In Abbildung 10 ist neben der Primärstruktur auch die aus diesen Daten gewonnene Tertiärstruktur beschrieben. Struktur-Aktivitätsuntersuchungen zeigten, dass vor allem die Aminosäuren 33-36 für die Rezeptorerkennung von großer Bedeutung sind (Beck-Sickinger et al., 1990). Für eine Erkennung an dem entsprechenden Rezeptor reichen diese drei Aminosäuren alleine jedoch nicht aus. Dafür ist der N-terminale Bereich, der die Tertiärstruktur stabilisiert, ebenso wichtig (Gordon et al., 1990).

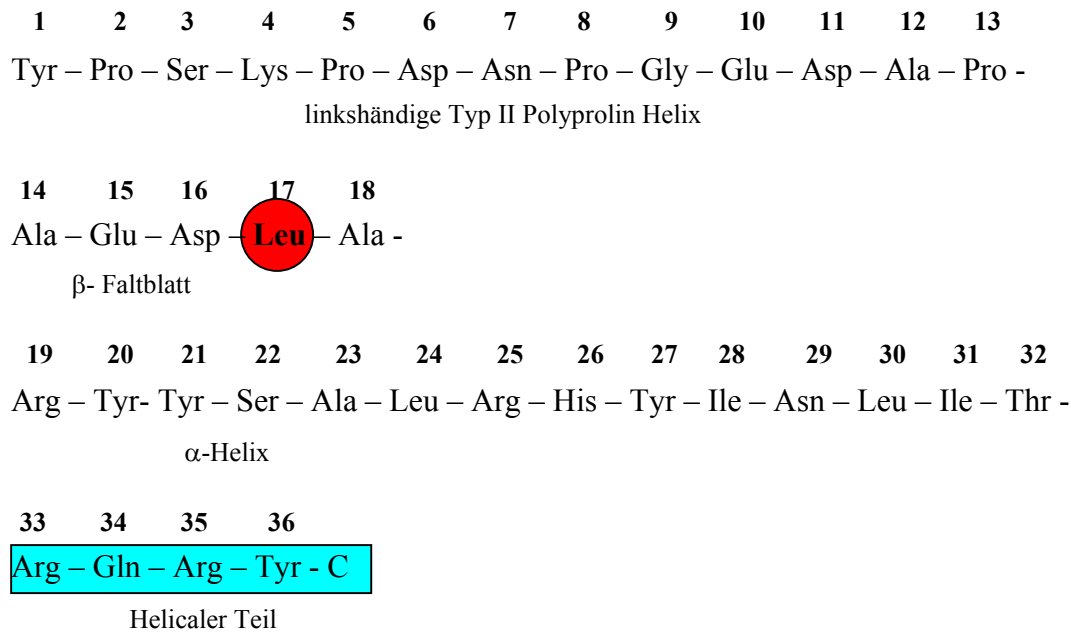


Abb. 10: Struktur von NPY. In dieser Abbildung ist die Primärstruktur von NPY schematisch dargestellt. Die räumliche Ordnung des Peptids ist anhand der entsprechenden Begriffe kurz skizziert. Die Sequenz von Rind und Schwein beinhalten an Position 17 ein Leucin, wohingegen bei Mensch, Ratte und Kaninchen an Position 17 ein Methionin eingebaut ist. Dies verdeutlicht noch einmal die hohe Konservierung des NPY. Die blau unterlegten Aminosäuren sind für die Rezeptorerkennung ebenso wichtig wie der bindende N-terminale Bereich. (nach McDermott et al., 1993)

Die Degradation von NPY wird u.a. von dem 1966 entdeckten Enzym Dipeptidyl Dipeptidase IV (CD26) katalysiert (Hopsu-Havu and Glenner, 1966). Es werden außer dem NPY noch folgende Peptide inaktiviert: Endorphine, PYY, GHRH (*growth hormone-releasing hormone*), GLP-1 und -2 (*glucagon-like peptides*) und RANTES (*regulated on activation normal T cell expressed and secreted*) (Mentlein, 1999). Vor allem der hohe Prolingehalt im N-terminalen Teil dieser Peptide wird von gewöhnlichen Peptidasen nicht lysiert (Mentlein et al., 1993).

1.5.2 Lokalisation und Funktion

NPY wird in den Somata von Nervenzellen synthetisiert, in Vesikeln verpackt und dann durch axonalen Transport in die Nervenendigungen befördert. Messungen des Noradrenalin-/NPY-Verhältnisses im Soma und in den Nervenendigungen ergaben für das Soma ein Verhältnis von 1:10 und für die Nervenendigungen ein Verhältnis von 1:150 (Fried et al., 1985). Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte in den Arterien des mesenterialen

Gefäßbettes ein dichtes Netzwerk an NPY-Fasern, ähnlich dem bei der Anfärbung von Katecholaminen, gezeigt werden. Die Fasern finden sich ausschließlich in der Adventitia, nicht aber in der Media oder Interna (Kawasaki et al., 1991). Des Weiteren war vor allem in den Nerven, die die Aorta und die Koronararterien innervieren, eine große Menge NPY nachweisbar (Sternini and Brecha, 1985; Gu et al., 1983). Weiterhin fand man NPY-positive Fasern im Gastrointestinaltrakt (Lee et al., 1985), in den Arterien und Arteriolen der Lunge (Lundberg et al., 1982a; Uddman et al., 1984) und in den Thrombozyten von Ratten. Letztere bilden das größte Potential von frei im Blut zirkulierendem NPY (Myers et al., 1990).

Die Funktion von Neuropeptid Y wurde in den 80er Jahren näher studiert, und es wurde postuliert, dass es ein sympathoadrenerger Co-Transmitter ist (Burnstock, 1976). Physiologische Untersuchungen ergaben noch eine Vielzahl weiterer Effekte, wie z. B. eine Steigerung der Bereitschaft zur Essensaufnahme und eine erhöhte Hormonfreisetzung. Auch auf das kardiovaskuläre System und auf das Gedächtnis nimmt NPY Einfluss. In Bezug auf ersteres konnte man zeigen, dass sich die postsynaptischen Effekte von NPY je nach Lokalisation der Blutgefäße unterscheiden. Die möglichen Auswirkungen von NPY auf die Gefäße können eine direkte Kontraktion, eine Potenzierung eines Vasokonstriktors oder eine Inhibition der Transmitterfreisetzung aus den vaskulären Nerven sein (Wahlstedt, 1987). Bei mesenterialen Arterien potenziert NPY die noradrenerge Konstriktion, aber auch die Effekte anderer Konstriktoren, wie z. B. Histamin, Angiotensin II, 5-Hydroxytryptamin, Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Endothelin (Edvinsson et al., 1984). NPY alleine zeigte jedoch keine vasokonstriktiven Effekte auf die mesenterialen Gefäße (Andriantsitohaina and Stoclet, 1988). Zudem inhibiert NPY die Relaxation der Arterien nach periarterieller Stimulation (PNS), jedoch zeigte sich nach Gabe von *calcitonin gene related peptide* (CGRP) keine Hemmung durch NPY. Dabei ist es nicht von Bedeutung, ob das Endothel vorhanden ist (Gustafsson and Nilsson, 1990). Ein endothelabhängiger Effekt konnte jedoch in den Ohrarterien von Kaninchen gezeigt werden (Hieble et al., 1989). Bei den Koronararterien von Kaninchen wurde, im Gegensatz zu den Ohrarterien, nach Gabe von Histamin oder Noradrenalin ebenfalls ein potenzierender Effekt von NPY beobachtet. Ferner zeigte sich auch eine Inhibition der Vasodilatation. Diese wird u.a. von Adenosin, vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Substanz P (SP) und Acetylcholin (ACh) induziert (Han and Abel, 1987; Edvinsson et al., 1990).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den meisten Arterien NPY *per se* keinen Effekt hat, es jedoch die Vasokonstriktion vieler Substanzen steigert. Dazu gehören u. a. Agonisten von α -adrenergen Rezeptoren, Histamin, Angiotensin II, 5-Hydroxytryptamin, Prostaglandin

F_{2α} und Endothelin (Edvinsson et al., 1984). Diese Potenzierung scheint in einigen Fällen vom Endothel abhängig, in anderen Fällen jedoch nicht abhängig zu sein.

1.5.3 NPY-Rezeptoren

Bei dieser Rezeptorfamilie handelt es sich um so genannte GPCRs (*G-protein-coupled-receptors*), welche zu der sehr heterologen Superfamilie der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren gehören. Charakteristisch für diese Rezeptorfamilie sind die zwei extrazellulär liegenden Cysteine, die eine Disulfidbrücke zwischen den ebenfalls extrazellulär vorliegenden Loops bilden. Dies konnte auch für den PP-Rezeptor durch röntgenkristallographische Versuche gezeigt werden (Palczewski et al., 2000). Der Y1-Rezeptor hat ebenfalls Cysteine, die möglicherweise auch solch eine Disulfidbrücke bilden können. Wie jeder der GPCRs, hat auch der Y1-Rezeptor sieben transmembranäre Durchgänge. Insgesamt konnten fünf NPY bindende Rezeptor-Isotypen identifiziert werden: Y1, Y2, Y4, Y5 und Y6. Für den Y1-Rezeptor konnte mittels Liganden-Bindungsstudien folgende Reihenfolge bei der Peptidbindung erstellt werden:

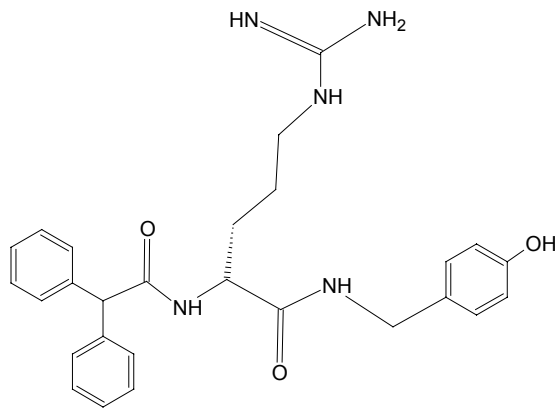


(Eva et al., 1990; Krause et al., 1992)

Den Y1-Rezeptor, der als erster von allen Rezeptor-Isotypen in der Ratte gefunden wurde, beschrieb man zunächst als einen Ratten-Orphan Rezeptor (Eva et al., 1990). Später konnte er als ein humaner Y1-Rezeptor mit 384 Aminosäuren und gleichen Bindungscharakteristika identifiziert werden (Herzog et al., 1992; Larhammar et al., 1992). Mittlerweile ist bekannt, dass die meisten vaskulären Effekte von NPY über diesen Rezeptor vermittelt werden (Keire et al., 2000; Grundemar and Ekelund, 1996; Malmstrom et al., 1998; Capurro and Huidobro-Toro, 1999). Nach Bindung an den vornehmlich postsynaptisch lokalisierten Y1-Rezeptors erfolgt der weitere intrazelluläre Signalweg über eine Erhöhung von cAMP, das seinerseits wiederum die Phospholipase-C aktiviert. Letztlich kommt es zum Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, was eine Kontraktion der Muskulatur auslöst bzw. verstärkt.

Der Y2-Rezeptor ist vor allem präsynaptisch lokalisiert und an ein inhibitorisches G-Protein (G_i) gekoppelt, was zur Inhibition der cAMP-Bildung führt (Larhammar et al., 1992; Herzog et al., 1992; Lundell et al., 1995; Gerald et al., 1996; Mullins et al., 2000).

Durch die Synthese von non-Peptid Y1-Analoga war es möglich, die Rezeptor vermittelten Effekte weiter zu untersuchen. Vor allem das BIBP3226 (Doods et al., 1996; Rudolf et al., 1994) ist ein weit verbreiteter und sehr effektiver Hemmstoff. Die Untersuchung der Bindungsaffinität dieses Hemmstoffes für den Y1-Rezeptor ergab eine Affinität von 5-7 nM.



Ferner stellte sich heraus, dass dieser Hemmstoff nicht an den Y2-Rezeptor bindet, was bedeutet, dass ausschließlich die postsynaptisch vermittelten Effekte von NPY gehemmt werden. Durch Experimente mit dieser Substanz konnte die Relevanz von NPY für den Blutdruck und die Herzfrequenz untersucht werden (Morton et al., 1999).

Abb. 11: BIBP3226, Y1 IC_{50} = 5,1 nM. Dargestellt ist die Strukturformel des Y1-Rezeptor-Inhibitors BIBP3226, der für Untersuchungen der postsynaptisch vermittelten Effekte von NPY essentiell war.

NPY hat jedoch nicht nur einen potenzierenden Einfluss auf die Gefäße, sondern ist auch bei der Immunmodulation von Bedeutung. Die in den lymphatischen Organen vorkommenden Makrophagen stehen in engem Kontakt zu den Nervenendigungen des Sympathikus. Es konnte durch Migrationsversuche gezeigt werden, dass alle Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems die Wanderung von Monozyten bewirken (Straub et al., 2000a). Hinsichtlich der IL-6 Produktion hat NPY eine duale Wirkung. So kommt es in Anwesenheit von NPY und nach Stimulation des α_2 -Rezeptors zu einer verminderten IL-6-Freisetzung, wohingegen die Aktivierung der β -Rezeptoren unter Einfluss von NPY eine gesteigerte IL-6-Produktion bewirkt (Straub et al., 2000b). Den Zusammenhang zwischen Immunsystem und sympathischen Nervensystem konnte auch durch *in vivo* Versuche mit NPY belegt werden. Die Experimente zeigten, daß eine i.v. Gabe von NPY kombiniert mit Adrenalin zu einer Leukozytose führt. Vermittelt wird der NPY-Effekt durch die Rezeptorsubtypen Y1 und Y5 (Bedoui et al., 2002).

2. Zielsetzung

Das hyperdynamische Zirkulationssyndrom (HZS) bei portaler Hypertension ist durch eine Gefäßdysregulation gekennzeichnet, welche sich als a) periphere arterielle Vasodilatation (Benoit and Granger, 1986; Bernardi and Trevisani, 1997) und b) als vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren manifestiert. Daher kommt der Evaluation der zugrundeliegenden Mechanismen dieser hämodynamischen Alteration große pathophysiologische Bedeutung zu. Ferner ist jede pharmakologische Einflussnahme, welche die arterielle Vasodilatation hemmt oder die vaskuläre Reaktivität wiederherstellt von potenziell großer therapeutischer Bedeutung. Es konnte bereits vor einiger Zeit eine entscheidende Beteiligung des Stickstoffmonoxyds (NO) an dieser Gefäßdysregulation nachgewiesen werden. Fokus bisheriger Untersuchungen waren dabei die eNOS und iNOS, wobei sich eine Beteiligung der eNOS, nicht aber die der iNOS herausstellte.

In Bezug auf die neuronale NO-Synthese ist bislang nur publiziert worden, dass das gebildete NO ein Transmitter in den sogenannten NANC-Neuronen (*non-adrenerg-non-cholinerg*) ist, und daher in Blutgefäßen eine Dilatation bewirken kann (Bult et al., 1990; Lundberg, 1996; Toda and Okamura, 2003; Toda et al., 1990). Gezielte Untersuchungen zur Rolle der nNOS hinsichtlich der arteriellen Vasodilatation bei portaler Hypertension liegen jedoch bisher nicht vor.

Das Neuropeptid Y (NPY) ist als Co-Transmitter des sympathischen Nervensystems ebenfalls für die Regulation der Gefäßkonstriktion von Bedeutung. Es potenziert die vasokonstriktiven Effekte von Sympathikusmediatoren, wie z. B. Noradrenalin. Ferner wurde in verschiedenen Gefäßarealen eine inhibitorische Wirkung von NPY auf NO-vermittelte Vasorelaxationen beobachtet.

Im Einzelnen wurden daher folgende Fragestellungen bezüglich der Veränderungen im mesenterialen Gefäßbett bei portaler Hypertension bearbeitet:

1. Arterielle Vasodilatation und Rolle der nNOS:
 - a) Charakterisierung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation bei portal-venösligierten Tieren im Vergleich zu normotensiven Tieren.
 - b) Charakterisierung der nNOS-Proteinmenge und Lokalisation in Abhängigkeit vom Vorliegen einer portalen Hypertension.

- c) Charakterisierung von Regulationsmechanismen der nNOS durch HSP90 anhand der Co-Immunpräzipitation und *in vitro* Perfusion.

2. Vaskuläre Hyporeaktivität und NPY:

- a) Charakterisierung der potenzierenden Wirkung von NPY auf die α_1 -adrenerge Vasokonstriktion bei portaler Hypertension im Vergleich zu normotensiven Tieren.
- b) Evaluation der hemmenden Wirkung von NPY auf die nNOS-vermittelten Vasorelaxation bei portaler Hypertension.

3. Material und Geräte

3.1 Materialien für die Perfusion

3.1.1 Substanzen

| | |
|--|-------------------------------|
| 1-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazol (TRIM) | Sigma, Steinheim |
| 7-Nitroindazol (7-Ni) | Sigma, Steinheim |
| Acetylcholin | Sigma, Steinheim |
| Antisedan | Pfizer, Karlsruhe |
| Arterenol (-) = Noradrenalin | Sigma, Steinheim |
| Atropin | Sigma, Steinheim |
| Calciumchlorid Dihydrat | J.T. Baker, Phillipsburg, USA |
| D(+)-Glucose Monohydrat | J.T. Baker, Phillipsburg, USA |
| Dimethyl-Sulfoxide (DMSO) | Fluka, Steinheim |
| Domitor (0,2 ml=0,05 mg Medetomidin) | Pfizer, Karlsruhe |
| Ethanol (67 %) | J.T. Baker, Phillipsburg, USA |
| Fentanyl | Curamed Pharma |
| Gallensäure (<i>3α,7α,12α-Trihydroxy-5β-cholate-24-oic-acid</i>) | Sigma, Steinheim |
| Geldanamycin | Sigma, Steinheim |
| Guanethidin | Sigma, Steinheim |
| Isoproterenol | Sigma, Steinheim |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kaliumhydrogenphosphat | J.T. Baker, Phillipsburg, USA |
| Magnesiumsulfat-7-Hydrat | J.T. Baker, Phillipsburg, USA |
| Methoxamin | Sigma, Steinheim |
| Midazolam | Curamed Pharma |
| N _ω -Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME) | Sigma, Steinheim |
| NaCl, 0,9 % steril | Braun, Melsungen |
| Natriumchlorid, Pulver | J.T. Baker, Phillipsburg, USA |
| Natriumhydrogencarbonat | J.T. Baker, Phillipsburg, USA |
| Neuropeptid Y (NPY) | Calbiochem (Merck), Darmstadt |
| Noradrenalin (-) | Sigma, Steinheim |
| Sodiumnitroprussid | Sigma, Steinheim |
| Temgesic | Essex Pharma |
| Tetrodotoxin | Sigma, Steinheim |
| Timolol | Sigma, Steinheim |

3.1.2 Geräte

| | |
|---|--|
| 3-Wege Hahn aus Kunststoff | NeoLab, Heidelberg |
| Einhängethermostat DC1 | Haake (Anatomical Pathology, Wien, Österreich) |
| Einmalspritzen, Discardit 2 ml, 5 ml und 10 ml steril | Becton-Dickinson, San Jose, USA |
| Elektrischer Stimulator I-ZQ4v | Hugo Sachs Electronics, Hugstetten |
| Homogenisator (Glas-Glas) nach Tenbroeck | Merck, Darmstadt |
| Intrafix Air, 15 μ M | Braun, Melsungen |

| | |
|--|---|
| Microlance Kanülen, Nr. 1,12 und 20 | Becton-Dickinson, San Jose, USA |
| Nahtmaterial, vicryl, violett, 3-0,1 mm x 1,50 m | Ethicon, Norderstedt |
| Perfusionsanlage | Eigenbau, Dr. med. R. Wiest, Regensburg |
| Perfusionsschlauch, Mikro PE: 0,5 mm x 1,0 mm | Reichelt Chemietechnik, Heidelberg |
| Perfusionsschlauch, 140 cm | Heidelberger Verlängerung |
| Platinelektroden (Platin/Iridium 90/10) | Heraeus, Hanau |
| Platinnetz (Platin/Iridium 90/10; Drahtdurchmesser: 0,25 mm; Maschenweite: 0,75 mm, 100Maschen/cm ³) | Heraeus, Hanau |
| Powerlab 4/20 | Powerlab (ADInstruments), Heidelberg |
| Pumpe IPC 8-Kanal | Ismatec, Wertheim-Mondfeld |
| Pumpenschläuche, Tygon R3607 (purple/black) | Ismatec, Wertheim-Mondfeld |
| Schlauchverbinder, 2-3,5 mm | NeoLab, Heidelberg |
| Telacomp, Tupfer, x-ray, 10 cm x 10 cm | Hartmann, Heidenheim |
| Transducer, BLPR one 05A | World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA |
| T-Stücke, Mikro 2,3-3,5 mm | NeoLab, Heidelberg |
| Verstärker | Powerlab (ADInstruments), Heidelberg |
| Wundklammer nach Michel, 7,5 mm x 1,75 mm | Aesculap, Tuttlingen |

3.2 Materialien für die histologischen Untersuchungen

3.2.1 Substanzen

| | |
|---|---|
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma, Steinheim |
| DAKO Faramount Aqueous Mounting Medium | DAKO Cytomation, Hamburg |
| DAKO Fluorescent Mounting Medium | DAKO Cytomation, Hamburg |
| Diethyl-Pyrocyanat (DEPC) | Sigma, Steinheim |
| Entellan | Merck, Darmstadt |
| Eosin, gelb | Sigma, Steinheim |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Formaldehyd (p.a. 37 %) | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| HCl (37 %, rauchend) | Merck, Darmstadt |
| Mayer's Hematoxylin Färbelösung | Sigma, Steinheim |
| Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), ohne Ca, Mg (Tabletten) | Merck, Darmstadt |
| Saccharose | Sigma, Steinheim |
| Serum (fötale Kälberserum) | Sigma, Steinheim |
| Tissue tek [®] | Sakura-Finetec Europe, Zoeterwoude, Niederlande |
| Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) | Merck, Darmstadt |
| Xylol | Merck, Darmstadt |

Monoklonale Antikörper

| | |
|--|---------------------------|
| mouse-anti-NOS I (nNOS); Klon :16 ;IgG _{2a} | BD Bioscience, Heidelberg |
| mouse-anti-NOS II (iNOS) ; Klon: 6 ; IgG _{2a} | BD Bioscience, Heidelberg |
| mouse-anti-HSP90; Klon S88, IgG ₁ | Abcam, Cambridgeshire, UK |

Polyklonale Antikörper

| | |
|--|---------------------------|
| rabbit-anti NPY | Chemicon, Temecula, USA |
| Sekundärantikörper und Isotypkontrollen | |
| Alkaline- Phosphatase- Anti- Alkaline- Phosphatase (APAAP) | DAKO Cytomation, Hamburg |
| anti-mouse IgG, Alexa 546 | MoBiTec, Göttingen |
| anti-mouse IgG ₁ | Dianova, Hamburg |
| anti-mouse IgG _{2a} | BD Bioscience, Heidelberg |

3.2.2 Geräte

| | |
|---|------------------------------|
| DAKO Cytomation Pen | DAKO Cytomation, Hamburg |
| Deckgläschen (24 mm x 60 mm) | Laborzenter, Nürnberg |
| Digitale Bildverarbeitungsanlage (Spot RT Color) | Visitron, Planegg |
| Kryotom, Frigocut 2800E | Leica, Wetzlar |
| Mikroskop (DM RBE) | Leica, Wetzlar |
| Objektträger, Superfrost Plus, 25 mm x 75 mm x 0,1 mm | Menzel-Glässer, Braunschweig |
| pH-Meter (CG 840) | Beckmann, München |

3.3 Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen

3.3.1 Substanzen

| | |
|---|---------------------------------------|
| Coomassie G-250 | Rockford, USA |
| ECL Plus Western Blotting Detection System | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Milchpulver | Carl Roth, Karlsruhe |
| NaCl | Merck, Darmstadt |
| Nitrocellulose Membran, 0,45 µm pore size | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE Antioxidant | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE Bis-Tris Gel, 4-12 %; 1,0 mm x 10 well | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE Reducing Agent (10x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE SDS Sample Buffer (4x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE Transfer Buffer (20x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat (Tween-20) | Sigma, Steinheim |
| Ponceau | Fluka, Steinheim |
| Proteaseinhibitor (Tablette) | Boehringer, Mannheim |
| Rec. Protein G-Sepharose, expression in <i>E. Coli</i> , MW: 22.000 | Prognost MS Norman Ernst, Ihrlerstein |
| SeeBlue Plus2 (Standard), pre-stained, 191-11 kDa | Invitrogen, Karlsruhe |
| Trichloressigsäure | Fluka, Steinheim |
| Trihydroxymethylaminomethan (TRIS) pH 6,8 | Merck, Darmstadt |

Monoklonale Antikörper

| | |
|--|---------------------------|
| mouse-anti-HSP90; Klon: S88, IgG ₁ | Abcam, Cambridgeshire, UK |
| mouse-anti-NOS I (nNOS); Klon: 16 ; IgG _{2a} | BD Bioscience, Heidelberg |
| mouse-anti-NOS II (iNOS) ; Klon: 6 ; IgG _{2a} | BD Bioscience, Heidelberg |

Sekundärantikörper und Isotypkontrollen

| | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| anti-mouse IgG _{2a} | BD Bioscience, Heidelberg |
| anti-mouse IgG ₁ | Dianova, Hamburg |
| goat-anti-mouse, IgG HRP | Santa Cruz, USA |
| Hypophysenlysate aus Ratten | BD Bioscience, Heidelberg |
| mouse macrophage (+IFN γ +LPS) | BD Bioscience, Heidelberg |

3.3.2 Geräte

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| BiomaxFilm, 20,3 cm x 25,4 cm | Kodak, Stuttgart-Wangen |
| Cell II, SDS und Blot Kammer | Invitrogen, Karlsruhe |
| Electrophoresis power supply EPS 301 | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Entwickler Curix 60 | Agfa, Leverkusen |
| Hypercassette | Abcam, Cambridgeshire, UK |
| Schüttler, REAX 2 | Heidolph, Schwabach |

3.4 Allgemeine Geräte

| | |
|---|--|
| Autoklav (Sanoclav) | Wolf, Geislingen |
| Carbogen | Linde Technische Gase |
| Eismaschine, UBE 125 | Ziegra, Isernhagen |
| Glaswaren (verschiedene) | Schott, Mainz |
| Laborwaage, SC2020 | Ohaus, Giessen |
| Magnetrührer, IKAMag REO | Heidolph, Kehlheim |
| Mikrotiterplatten, 96-well | Costar, Cambridge, USA |
| Parafilm M (250 ft x 4 in) | Pechiney Plastic Packaging Inc., Neeah, USA |
| Pasteurpipetten, 5 ml und 10 ml | Brand, Wertheim |
| Pipetten (bis 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l) | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l) | Eppendorf, Hamburg |
| Präparationsbesteck | Aesculap, Tuttlingen |
| Reaktionsgefäße, 1 ml und 2 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml | Falcon, Heidelberg |
| Reinstwasseranlage, Milli-Q-Plus | Ultra Pure Water Systems, Billerica, USA |
| Schüttler REAX 2 | Heidolph, Schwabach |
| Stickstoff, flüssig | Linde, Technische Gase |
| Thermomixer, HTM 130 | HLC (HEAP Laborconsult), Göttingen |
| Vortex Mixer, Genie 2 | Heidolph, Kehlheim |
| Zentrifuge Heraeus fresco | Kendro, Langenselbold |

4. Methoden

4.1 Tierhaltung und Operation

Die männlichen Ratten des Typs Sprague Dawley mit einem Gewicht von 300-350 g wurden bei konstanten Temperaturverhältnissen von 21°C in einem zwölfstündigen Tages- und Nachtrhythmus bei freiem Zugang zu Nahrung und Wasser gehalten. Alle Tierexperimente wurden gemäß den Vorschriften der Deutschen Gesellschaft für Physiologie für die Haltung und Gebrauch von Labortieren (Nummer: 621-2531.1-23/00, Regierung der Oberpfalz) durchgeführt. Das Tiermodell für prähepatische portale Hypertension ist etabliert und schon in vielen Studien angewandt worden (Wiest and Groszmann, 1999; Shah et al., 1999; Sieber and Groszmann, 1992; Chojkier and Groszmann, 1981). Die Operation selbst wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Tiere wurden mit einem OP-Cocktail (2ml Fentanyl + 4 ml Midazolam + 3 ml Domitor + 1 ml 0,9 % NaCl), der in einer Dosis von 0,1 ml / 100g Körpergewicht intramuskulär gespritzt wurde, narkotisiert. Nach Laparotomie wurde die Portalvene von umgebendem Gewebe freipräpariert und eine Microlance Kanüle Nr. 1 ($\varnothing = 0,9$ mm) entlang der Vena porta platziert. Um diese wurde mit einem geflochtenen nicht-resorbierbaren Faden (vicryl, violett, 3-0,1 mm x 1,50 m) eine Ligatur gelegt. Die nachfolgende Entfernung der Kanüle hinterließ eine standardisierte Stenose der Pfortader, und es kam zur Ausbildung einer portalen Hypertension. Bei den Kontrolltieren (Sham) wurde die gleiche Operation, jedoch ohne Ligatur, durchgeführt. Die Muskelschicht wurde mit Nahtmaterial (vicryl, violett, 3-0,1 mm x 1,50 m, mit Nadel) vernäht, wohingegen die Oberhaut mit Klammern der Größe 7,5 mm x 1,75 mm verschlossen wurde. Nach zehn bis zwölf Tagen postoperativ war das HZS voll entwickelt, und die Tiere konnten im Experiment eingesetzt werden.

4.2 *In vitro* Perfusion

4.2.1 Präparation und Perfusion

Bei der hier durchgeführten Perfusion handelt es sich um eine weiterentwickelte Methode zur Perfusion des mesenterialen Gefäßbettes (nach: McGregor, 1965). Diese Technik bringt viele Vorteile mit sich:

- 1) Über die Arteria mesenterica superior werden ca. 90 % des splanchnischen Gefäßbettes der Ratte perfundiert.
- 2) Es wird das gesamte Gefäßbett mit allen anatomischen Verzweigungen in seiner natürlichen Geometrie perfundiert.
- 3) Außerdem passt sich der Perfusionsdruck der gewählten Flussrate an und ähnelt damit der Durchblutungssituation *in vivo*.
- 4) Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass infolge fehlender Rezirkulation die ausgeschiedenen Substanzen nach Erstpassege des Gewebes keine weiteren störenden Einflüsse ausüben können.

Nach Narkotisierung der Ratten (Abschnitt 4.1) wurden die Tiere laparotomiert und der Dün- und Dickdarm ausgeräumt. Die Arteria mesenterica superior wurde von anhängendem Bindegewebe befreit und kurz nach dem aortalen Abgang durch eine Ligatur verschlossen. Nach einem kleinen Einschnitt in die Arteria mesenterica superior wurde eine Kanüle, bestehend aus einer Microlance Kanüle Nr. 12 und einem Mikroschlauch aus Polyethylen (0,5 mm x 1,0 mm), in das Gefäß geschoben und mit Nahtmaterial (vicryl, violett, 3-0,1mm x 1,50 m) fixiert.

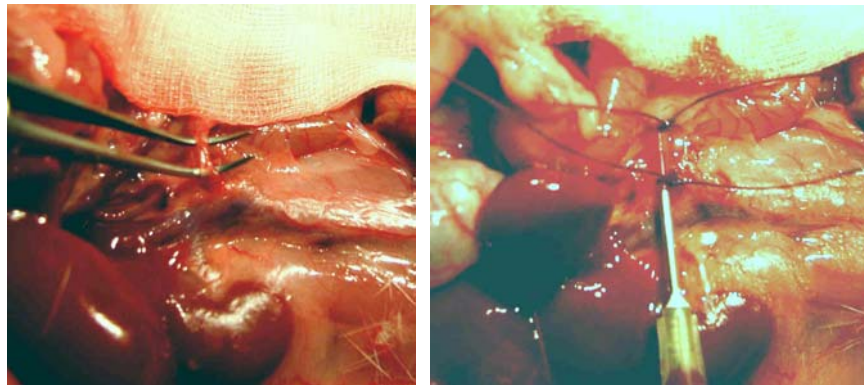


Abb. 12: Kanülierung der Arteria mesenterica superior. In dem linken Foto ist die isolierte und von Bindegewebsresten befreite A. mesenterica gezeigt, die dann wie im Text beschrieben kanüliert wurde. Im rechten Bild ist die bereits kanülierte Arteria mesenterica superior gezeigt. Im Fall der elektrischen Stimulation des mesenterialen Gefäßbettes wurde auf diese Kanüle eine Platinelektrode aufgebunden (Abb. 14).

Je nach durchgeführtem Versuch wurde das Gefäßbett elektrisch stimuliert. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Platinelektrode zwischen Kanülierungsnadel und Perfusionssystem in das Präparat vorgeschoben. Zum Entbluten des Tieres wurde die Aorta abdominalis durchtrennt und das Gewebe mit insgesamt 20 ml 37°C warmer Krebs-Henseleit-Lösung (Angaben in mM: NaCl: 118; KCl: 4.7; KH₂PO₄: 1.2; MgSO₄: 1.2; CaCl₂: 2.5; NaHCO₃: 25; EDTA disodium: 0.026; und Glucose: 11.0; pH 7.4; dauerhaft mit Carbogen begast) durchspült. Das Gefäßbett

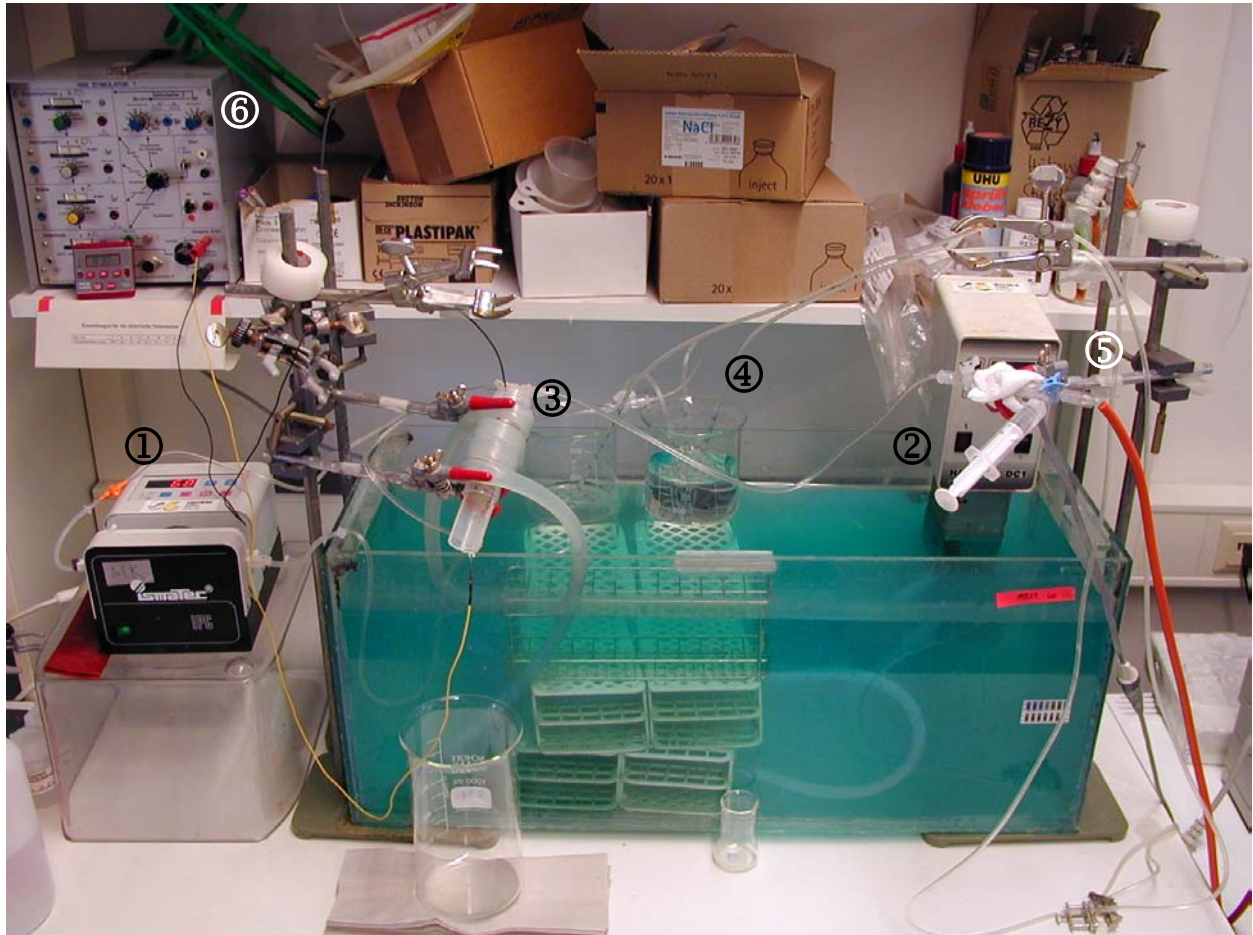


Abb. 13: Perfusionsanlage. Das Wasserbad wurde auf 37 °C erwärmt, sodass sowohl alle Lösungen als auch die durch das Wasser erwärmte Perfusionskammer eine Temperatur von 37 °C hatten. Somit waren die Bedingungen für das mesenteriale Gefäßbett bestmöglich an die *in vivo* Verhältnisse angepasst. Die Krebs-Henseleit-Lösung wurde über das Schlauchsystem mit einer Flussrate von 4 ml/min in das Gefäßbett geleitet. Von der Abzweigung zum Gewebe war ein weiterer wassergefüllter Schlauch angebracht, der mit dem Transducer verbunden war.

Zahlen in der Abbildung: 1=Ismatec Pumpe; 2=Thermostat; 3=Perfusionskammer; 4=physiologische Lösungen 5=Transducer: Dieser wandelte den Druck, der für die Perfusion des Gewebes benötigt wurde, in elektrische Spannung um, die dann über den Powerlab Verstärker und den Powerlab 4/20 am Computer sichtbar gemacht wurde. 6=Elektrischer Stimulator: Mit diesem Gerät von Hugo Sachs konnte das Gefäßbett über die beiden Platinelektroden mit variierenden Frequenzen elektrisch stimuliert werden.

wurde vom Darm getrennt und kontinuierlich mit 37 °C warmer Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Dabei wurde das Gefäßbett durch Parafilm vor dem Austrocknen geschützt. Sollte das Gefäßbett elektrisch stimuliert werden, so wurde es auf ein Platinnetz, welches die zweite Elektrode für die elektrische Stimulation bildete (Abb. 14), gelegt und mit 37 °C warmer Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Die Flussrate betrug 4 ml pro Minute und wurde durch eine Pumpe (Ismatec, IPC 4-Kanal) für die Dauer des Experimentes aufrecht gehalten. Das Perfusat wurde vom Gewebe abgeleitet. Der Druck, der im Gefäßbett herrschte, wurde mittels eines Transducers (BLPR one 05A, World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) über den Verstärker Powerlab Quadbridge und einen PowerLab 4/20 (ADInstruments) an den Computer übermittelt und aufgezeichnet.

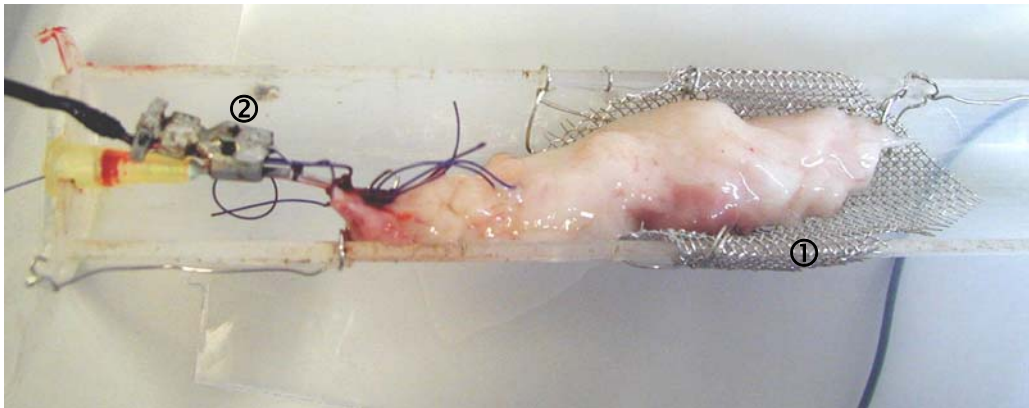


Abb. 14: Perfusionskammer. Nach Abtrennung des Gefäßbettes entlang des Darmes wurde es in diese Kammer gelegt und mit Parafilm umwickelt, um es vor dem Austrocknen zu schützen. Das Gewebe wurde für die Dauer der Perfusion in einer weiteren, auf 37 °C temperierten Röhre aufbewahrt. Das Platinnetz (1) diente ebenso wie die auf der Arteria mesenterica superior aufgebundene Platinelektrode (2) der elektrischen Stimulation.

4.2.2 Deendothelisierung

In einigen Versuchen war es wichtig, dass das Gefäßbett vollständig deendothelisiert war. Dazu wurde eine kombinierte Gabe aus Gallensäure und Aqua dest. verwendet. Nach Kanülierung der Arteria mesenterica superior und Auswaschen des Blutes mit 20 ml Krebs-Henseleit-Lösung wurden 1,5 ml 0,5 % Gallensäure über 10s hinweg injiziert. Anschließend wurde erneut mit 20 ml Krebs-Henseleit-Lösung gespült. Nachdem das Gewebe an die Perfusionsanlage angeschlossen war, erfolgte eine Äquilibration mit 37°C warmer Krebs-Henseleit-Lösung für die Dauer von 10 min, an die sich eine wiederum zehnminütige Perfusionsphase mit Aqua dest. anschloss. Dadurch wurden letzte Endothelreste zerstört und ausgespült. Am Ende jedes Versuches wurde durch Gabe von Acetylcholin (ACh), es handelt sich hierbei um einen endothelabhängigen Vasodilatator, getestet, ob das Endothel vollständig zerstört worden war.

Dazu wurde ein Bolus von 0,1 ml in den Konzentrationen 5×10^{-4} M; 5×10^{-5} M und 5×10^{-6} M ACh über den *injection port* appliziert. In allen nachfolgend beschriebenen Experimenten, welche deendothelialisiertes Gefäßbett untersuchen, wurden nur Versuche mit ACh-induzierter Vasorelaxation von weniger als 15 % ausgewertet. Die Unversehrtheit der glatten Gefäßmuskulatur wurde durch die Gabe von 0,1 ml Natrium-nitroprussid (SNP), ein endothelunabhängiger Vasodilatator, in den Konzentrationen von 3×10^{-4} M und 3×10^{-6} M getestet. Nur bei einer erreichten muskulären Relaxation von >50 % wurde von einer suffizienten intakten Gefäßmuskelschicht ausgegangen.

4.3 Studiendesign

4.3.1 Untersuchung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation

4.3.1.1 Periarterielle Nervenstimulation

Mittels periarterieller Nervenstimulation (PNS) wurden Veränderung der nNOS-vermittelten NO-Freisetzung und -Vasorelaxation bei portaler Hypertension untersucht. Dazu wurde das mesenteriale Gefäßbett deendothelisiert. Dies war entscheidend, da ansonsten jegliche Änderung des Perfusionsdruckes über die unumgängliche Entstehung von Scherkräften (oder im Falle pharmakologischer Stimulation auch *via* Rezeptoren auf Endothelzellen) zu einer endothelialen NO-Freisetzung geführt hätte, und damit die Interpretation jeglicher Ergebnisse hinsichtlich der rein nNOS-vermittelten NO-Synthese unmöglich gemacht worden wäre.

Die elektrische Stimulation erfolgte mit einem Stimulator (I-ZQ4v, Hugo Sachs Electronics) für die Dauer von 30 s mit 45 V, einer Impulsbreite von 2ms und über einem Frequenzspektrum von 2-12 Hz.

Von Beginn des Versuches an wurde mit Atropin (10^{-9} M), Timolol (10^{-9} M) und Guanethidin (5×10^{-5} M) perfundiert, um sowohl cholinerge und nikotinerge Signalwege, als auch die Freisetzung von Noradrenalin zu unterdrücken. Die PNS wurde in non-kumulativer Weise durchgeführt.

Nach der Deendothelisierung (Abschnitt 4.2.2) wurde das Gefäßbett nach einer Äquilibrationszeit von 20-30 min mit 10^{-5} M Noradrenalin (NA) submaximal präkonstriktiert (EC_{80}) und dann mittels PNS mit 2-12 Hz elektrisch stimuliert.

Im Anschluss an die letzte Stimulation wurde das NA ausgewaschen und L-NAME, ein unspezifischer NOS Inhibitor, in einer Konzentration von 10^{-4} M zugegeben. Nach einer

Inkubationszeit von 15 min wurde erneut mit 10^{-5} M NA submaximal stimuliert und ein zweiter Zyklus der PNS schloss sich an (Abb. 15).

Die Deendothelisierung wurde wieder durch die Gabe von ACh überprüft und nur Versuche mit ACh induzierter Vasorelaxation von weniger als 15 % wurden in die Auswertung eingeschlossen. Die Unversehrtheit der glatten Gefäßmuskulatur wurde durch die Gabe von 0,1 ml Natrium-nitroprussid (SNP), ein endothelunabhängiger Vasodilatator, überprüft.

Um zu zeigen, dass hauptsächlich die nNOS für die Dilatation nach PNS verantwortlich ist, wurde in weiteren Kontrollversuchen der nNOS spezifische Hemmstoff 1-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazol (TRIM) (10^{-4} M) verwendet. Ferner wurde durch die Gabe von Tetrodotoxin (TTX) (6×10^{-7} M) (es handelt sich um das Gift des Kugelfisches, und es bewirkt die Hemmung des schnellen neuronalen Natriumkanals) gezeigt, dass der Effekt auf die elektrische und damit neuronale Stimulation zurückzuführen war.

In der nachfolgenden Abbildung ist das Perfusionsschema schematisch dargestellt.

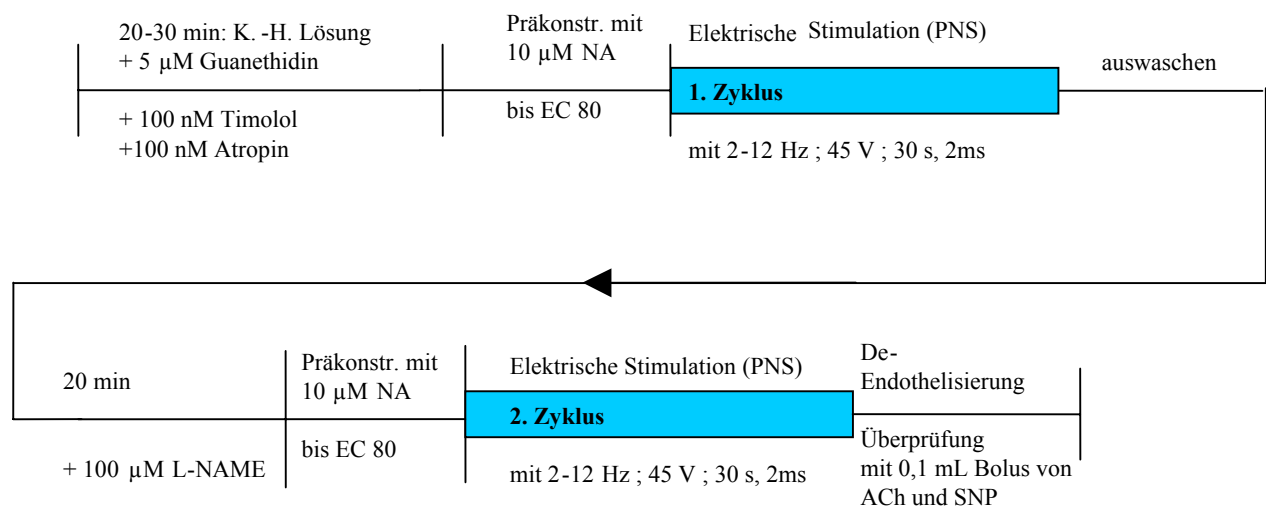


Abb. 15: Perfusionsprotokoll. Dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Perfusion zur Untersuchung der nNOS vermittelten Vasodilatation nach periarterieller Nervenstimulation (PNS).

Abkürzungen: NA= Noradrenalin; ACh=Acetylcholin; K.H.=Krebs-Henseleit-Lösung; L-NAME=N ω -Nitro-L-Arginin Methylester; EC₈₀= NA-Konzentration zum Erreichen von 80 % der Maximalkontraktion; NOS=NO-Synthase; SNP=Sodiumnitroprussid

4.3.1.2 Hemmung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation durch Neuropeptid Y

Wiederum wurde erneut ein deendothelisiertes Gefäßbett (Abschnitt 4.2.2) verwendet. Im ersten Zyklus des Versuches wurde das Gefäßbett mit NA (10^{-5} M) präkonstriktiert und dann mittels

PNS stimuliert. Nach der letzten Stimulation mit 12 Hz wurde das NA ausgewaschen. Nach ca. 15 min wurde zusätzlich mit NPY (5×10^{-8} M) perfundiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde erneut submaximal mit NA konstriktiert und dann das Gefäßbett ein zweites mal mittels PNS stimuliert. Es wurde dasselbe Versuchsprotokoll (Abb. 15) verwendet. Anstelle von L-NAME wurde jedoch NPY zur Inhibition der nNOS-Effekte eingesetzt.

4.3.1.3 Hemmung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation durch Geldanamycin

Geldanamycin hat neben seiner nNOS-inhibierenden Eigenschaft (Song et al., 2001) auch antiproliferative Wirkungen (Stebbins et al., 1997). Die Hemmung des HSP90 durch Geldanamycin verhindert eine Häm-vermittelte Aktivierung der nNOS (Billecke et al., 2002).

Vor diesem Hintergrund sollte in diesen Experimenten am mesenterialen Gefäßbett mittels Perfusion gezeigt werden, wie sich die Gabe von Geldanamycin (GA) auf die nNOS und damit auf den Perfusionsdruck auswirkte. Dabei handelte es sich um das gleiche Versuchsprotokoll wie schon in Abbildung 15 gezeigt wurde. Das kanülierte Gefäßbett wurde deendothelisiert (Abschnitt 4.2.2), mit 10^{-5} M NA präkonstriktiert und dann mittels PNS mit 2-12 Hz stimuliert. Vor dem zweiten Zyklus wurde jedoch Geldanamycin in einer Konzentration von 6×10^{-6} M verabreicht. Es schloss sich ein zweiter Zyklus mit Präkonstriktion und PNS an.

4.3.2 Untersuchung der Effekte von Neuropeptid Y bei portaler Hypertension

4.3.2.1 Perfusionsexperimente

Protokoll I: Hier sollte ein möglicher direkter vasokonstriktiver Effekt von NPY untersucht werden. Dazu wurde das Gefäßbett (Abschnitt 4.2.2) mit einer Kombination aus Gallensäure (0,5 %) und Aqua dest. deendothelisiert, da NPY im mesenterialen Gefäßbett bekanntermaßen endothelunabhängig direkt am Gefäßmuskel wirkt. Anschließend folgte eine Äquilibrationsphase von 30 min mit 37 °C warmer Krebs-Henseleit-Lösung bevor mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden konnte. Zuerst wurde NPY in 2-4minütigen Abständen als Bolus von 0,1 ml in den Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-5} M gegeben (ohne Präkonstriktion des Gefäßbettes). In weiteren Versuchen wurde das Gefäßbett mit dem α_1 -Agonist Methoxamin präkonstriktiert. Nachdem ein stabiles Niveau erreicht worden war, wurde NPY erneut als ein Bolus von 0,1 ml in den Konzentrationen 10^{-10} M bis 10^{-5} M gegeben. Um den Effekt der Vasokonstriktion von NPY in Abhängigkeit von dem Präkonstriktionsniveau zu untersuchen, wurde das Gefäßbett mit Methoxamin in Dosen von 3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M

und 10^{-5} M präkonstriktiert. Anschließend wurde NPY erneut als Bolus von 0,1 ml appliziert (Abb. 16).

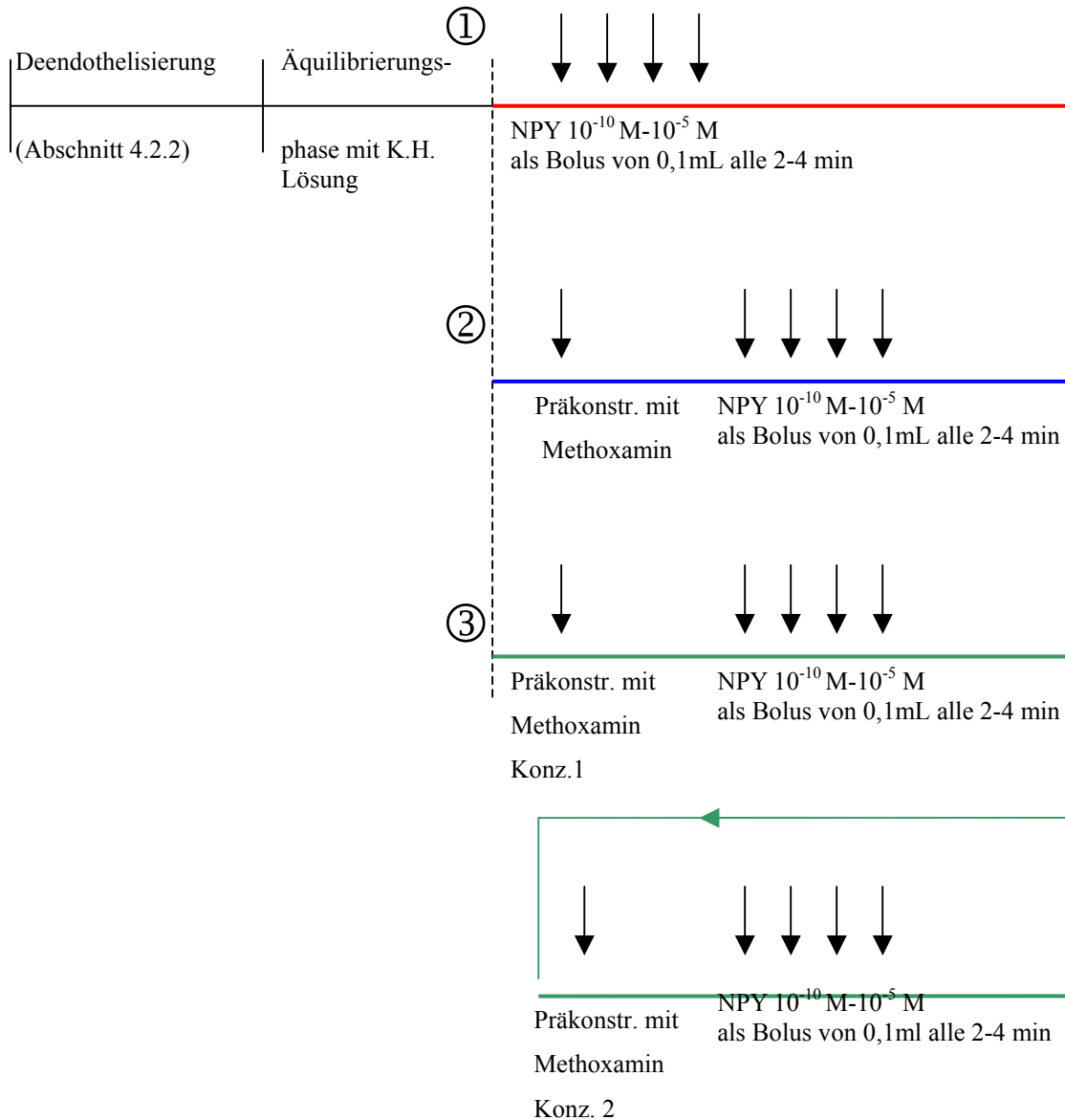


Abb. 16: Untersuchung der Effekte von Neuropeptid Y bei portaler Hypertension. *Protokoll I:* Untersuchung der NPY-induzierten Vasokonstriktion. Die Deendothelisierung und auch die Äquilibrierung waren immer identisch. In Teil (1) wurde der reine NPY-Effekt auf ein nicht-präkonstriktiertes Gefäßbett untersucht. In Teil (2) und (3) wurde mit Methoxamin (Konzentration 1/2) präkonstriktiert und dann NPY in verschiedenen Konzentrationen appliziert. NPY=Neuropeptid Y; K.H.-Lösung=Krebs-Henseleit-Lösung

Protokoll II: Hier sollte der Effekt von NPY auf eine α_1 -adrenerge Vasokonstriktion untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde in diesem Teil das Endothel nicht entfernt, um die Wirkung am intakten Gefäßbett (vergleichbar mit der *in vivo* Situation) zu testen. Im ersten Zyklus der Perfusion wurde eine Dosis-Wirkungskurve für Methoxamin (3×10^{-7} M bis 3×10^{-4} M) aufgenommen. Dazu wurde mit jeder Methoxamin-Konzentration für 2 min perfundiert. Vor Beginn des zweiten Zyklus wurde mit NPY (5×10^{-8} M) für 10 min perfundiert. Erneut wurde eine Dosis-Wirkungskurve für Methoxamin (3×10^{-7} M bis 3×10^{-4} M) in gleicher Art und Weise, in Anwesenheit von NPY, aufgenommen.

4.4 Histologische Methoden

4.4.1 Einbetten und Schneiden von Gewebe

Die Ratten wurden narkotisiert (Abschnitt 4.1) und laparotomiert. Das Organ bzw. Gewebe wurde entnommen und über Nacht in 3,7 % Formaldehyd bei 4°C fixiert. Anschließend wurde es in 20 % Saccharose überführt und ebenfalls bei 4°C für mindestens 12 Stunden aufbewahrt. Erst dann wurde das Gewebe in Tissue Tek[®] eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die zweite Möglichkeit bestand darin, das Gewebe nativ einzufrieren, was bedeutet, dass es nach Entnahme aus dem Tier sofort in Tissue Tek[®] mittels flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. So behandelt konnte das Gewebe mehrere Monate bei -80 °C aufbewahrt werden. Um immunhistologische Färbungen anzufertigen, wurden von den Tissue Tek[®]-Blöcken am Kryotom 5-8 µm dicke Präparate angefertigt und auf einen beschichteten Objektträger (Super Frost Plus[®]) aufgenommen. Die Gefrierschnitte wurden dann für eine Stunde an der Luft getrocknet, um anschließend für 10 min in 0,05 M *tris buffered saline* (TBS) rehydriert zu werden. In TBS stehend konnten die Schnitte für ein bis zwei Tage bei 4 °C aufbewahrt werden. Im Folgenden wird die Vorgehensweise für die Hematoxylin/Eosin Färbung, die Fluoreszenz Färbung und die Detektion mittels Alkaline-Phosphatase-anti-Alkaline-Phosphatase (APAAP) beschrieben.

4.4.2 Färbetechniken

Um allgemeine Unterschiede in der Leber- oder Gefäßarchitektur in PVL- bzw. Sham-Ratten zu zeigen, wurde die Hematoxylin/Eosin Färbetechnik verwendet.

Hematoxylin/Eosin

Hematoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an rauem endoplasmatischen Retikulum sind, blau-violett. Eosin hingegen färbt andere Zytoplasmaanteile sowie viele faserige extrazelluläre Komponenten rot. Die nativen, am Kryotom angefertigten, in 0,05 M TBS rehydrierten Gewebeschnitte wurden für 8 min in *Mayer's Hematoxylin-Solution* gefärbt und dann für 10 min in handwarmem Wasser gebläut. Daran anschließend folgte eine 10 s lange Färbung in 1 % Eosin. In einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit jeweils zweimal 70 % über zweimal 96 %, zweimal 99 % Ethanol und endend mit zweimal Xylol, wurde überschüssiger Farbstoff entfernt und die Schnitte entwässert. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit Deckgläsern und Entellan eingedeckelt. Nach einer Trocknungszeit von ca. 18 Stunden konnten die Schnitte unter dem Lichtmikroskop angeschaut werden.

Um eine Aussage über die nNOS Proteinmenge und auch über die Lokalisation der nNOS gefärbten Bereiche in PVL- bzw. Sham-Ratten treffen zu können, wurden auch Gewebeschnitte mittels Fluoreszenz- und APAAP-Technik angefärbt.

Fluoreszenzfärbung

Bei der Fluoreszenzfärbung kann der fluoreszierende Farbstoff direkt an den spezifischen Antikörper gekoppelt sein. Wesentlich häufiger wird jedoch die indirekte Immunfluoreszenz (Abb. 17) gewählt, bei der fluoreszierende anti-Immunglobuline verwendet werden. Die Farbstoffe lassen sich durch Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen, wodurch Licht im sichtbaren Bereich abgestrahlt wird. Die am häufigsten verwendeten Farbstoffe sind Fluorescein (grün), Texas-Rot und Peridin-Chlorophyllprotein, die beide rotes Licht emittieren. Unter dem Mikroskop kann man, unter Verwendung bestimmter Filter, nur das emittierte Licht der verwendeten Farbstoffe erkennen.

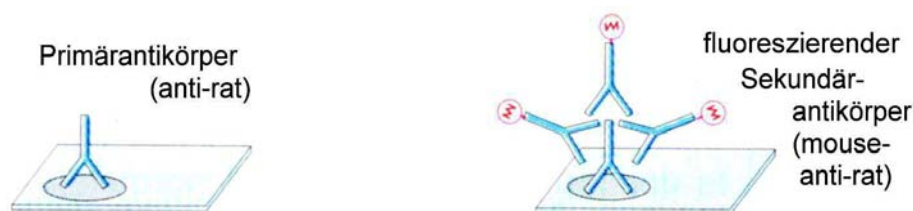


Abb. 17: Die indirekte Immunfluoreszenz. Bei dieser Methode der Immunfluoreszenz wird nach der Bindung eines antigenspezifischen Primärantikörpers in einem zweiten Schritt ein Fluorochrom-markierter Sekundärantikörper verwendet. Vorteil der indirekten Immunfluoreszenz ist die Tatsache, dass schwach exprimierte Antigene besser sichtbar gemacht werden können, da am Primärantikörper gleich mehrere Moleküle des markierten Sekundärantikörpers binden können.

(Taschenatlas der Immunologie; 1998; Burmester, Pezzutto)

Wie schon zuvor beschrieben mussten die Schnitte 10 min in 0,05 M *tris buffered saline* (TBS) rehydrieren. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, um das Auftropfen der Blocklösungen und der Antikörperverdünnungen zu erleichtern. Im nächsten Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mittels einstündiger Inkubation mit 0,05 M TBS + 10 % Normalserum der Spezies, von welcher der jeweilige Antikörper stammte und 1 % bovines Serum Albumin (BSA) bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer abgeblockt. Die Gewebeschnitte wurden für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss folgten zwei 5-minütige Waschschritte in 0,05 M TBS. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit von den Objektträgern abgeschüttelt und der Primärantikörper auf die Gewebeschnitte aufgebracht. Die Immunglobuline wurden in 0,05 M TBS mit 1 % BSA 1/500 bis 1/800 verdünnt (Tabelle 2). Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer. Um im Anschluss daran die Gewebeschnitte für den sekundären Antikörper vorzubereiten, wurden sie zwei mal für 5 min in einem 0,05 M TBS-Pufferbad bewegt, um nicht gebundene überschüssige Primärantikörper abzuwaschen. Als Sekundärantikörper wurde das rot fluoreszierende anti-Maus Immunglobulin G (Alexa 546) verwendet. Wie schon zuvor der Primärantikörper wurde auch der Sekundärantikörper mit 0,05 M TBS + 1 % BSA 1/300 verdünnt und anschließend auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte wieder für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer dunklen Feuchtkammer. Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde durch zwei mal 5 minütiges Waschen in 0,05 M TBS entfernt, und im Anschluss konnten die Gewebeschnitte mit DAKO *fluorescent mounting* Medium eingedeckelt werden.

| Antikörper | Gewebe | Verdünnung |
|--|---|-------------------|
| NNOS <i>Klon :16 ; IgG_{2a}</i> | Arteria mesenterica superior (1.+2. Ordnung) | 1 :800 |
| NPY (polyclonal) | Arteria mesenterica superior (1.+2. Ordnung) | 1 :500 |

Tab. 2: Aufgelistet sind die bei der Immunfluoreszenz und der APAAP-Färbung verwendeten Verdünnungen (mit 0,05 M TBS und 1 % BSA) des jeweiligen Primärantikörpers und die untersuchten Gewebe.

APAAP

Bei der Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Technik (APAAP) wird ein löslicher Immunkomplex verwendet, der aus alkalischer Phosphatase des Kälberdarms und einem gegen die alkalische Phosphatase gerichteten monoklonalen Antikörper aus der Maus besteht. Die APAAP- Enzymreaktion wird mit dem chromogenen Fast Red TR-Chromogen und

Naphtholsubstrat durchgeführt, die das Antigen leuchtend rot anfärben (Universal DAKO-APAAP Kit, Gebrauchsanleitung).

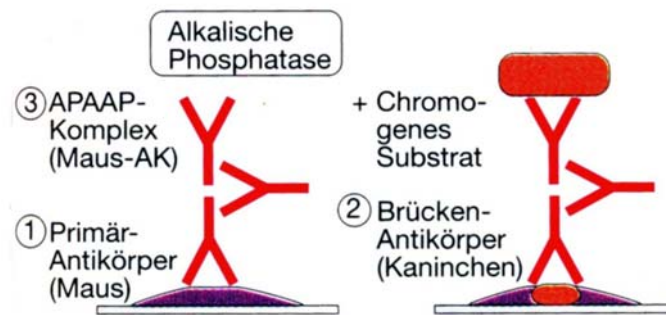


Abb. 18: APAAP Methode. Nach Bindung des Primärantikörpers an das Zielantigen wird zunächst ein anti-Maus IgG („Brückenantikörper“) und anschließend ein Komplex aus dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) und einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen alkalische Phosphatase (anti-AP) addiert. Dieser Komplex bindet über Brücken- und Primärantikörper an das Zielantigen. Die enzymatische Reaktion mit einem chromogenen Substrat führt dann zu einer Antigen-abhängigen Farbstoffpräzipitation im Gewebe.

(Taschenatlas der Immunologie; 1998; Burmester, Pezzutto)

Von den in 0,05 M TBS rehydrierten Gewebeschnitten wurde die überschüssige Flüssigkeit abgeschüttelt. Wie bei der Fluoreszenzfärbung wurde der Primärantikörper entsprechend (Tabelle 2) in 0,05 M TBS/ 1 % BSA verdünnt und auf die Schnitte aufgetropft. Die einstündige Inkubation erfolgte, wie auch alle weiteren Inkubationschritte, bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Anschließend wurde der überschüssige Antikörper während des zweimal 5minütigen Waschens in 0,05 M TBS entfernt, und der Brückenantikörper aufgetropft. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur musste wiederum zwei mal 5 min gewaschen, die überschüssige Flüssigkeit von den Objektträgern abgeschüttelt und dann der APAAP-Komplex auf die Gewebeschnitte gegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde zweimal 5 min in 0,05 M TBS gewaschen und dann die Substratlösung auf die Gewebeschnitte gegeben. Nach nunmehr 20 min wurde die Färbereaktion durch kurzes Eintauchen in Aqua dest. gestoppt. Die Gewebeschnitte konnten so bis zum Eindeckeln mit DAKO *faramount aqueous mounting medium* in 0,05 M TBS aufbewahrt werden.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Gewinnung von Gewebe, Herstellen von zytosolischen Fraktionen und Proteinbestimmung

Das zu untersuchende Gewebe wurde aus narkotisierten Ratten (Sprague Dawley, 300-350 g) (Abschnitt 4.1) entnommen, und Fett-, Bindegewebs- und Blutreste wurden entfernt. Anschließend wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff nativ eingefroren und bei -20 °C gelagert. Die Homogenisierung der Gewebeprobe erfolgte in einem Ripa-Puffer (5 ml 1 N TBS pH 7,4; 3 ml 5 M NaCl; 1 g Deoxycholsäure; 1 ml Triton X 100; 500 µL 20 % SDS; ad 500 ml). Um den Abbau von Proteinen zu hemmen, wurde zum einen die komplette Proteinaufreinigung auf Eis durchgeführt und zum anderen wurde eine Tablette Proteaseinhibitor (Boehringer, Mannheim) auf 1,5 ml Aqua dest. gelöst und mit 10 ml Ripa-Puffer gemischt. Der Aufschluss des Gewebes erfolgte in einem gekühlten Glas-Glas Homogenisator, wobei pro Gewebestück 0,5-1,0 ml Ripa-Puffer benötigt wurden. Daran anschließend wurden die Proben bei 12.000 rpm in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge für 10 min zentrifugiert. Dadurch wurden Zelltrümmer und Organellen sedimentiert, und im Überstand, der im folgenden Schritt abdekantiert wurde, befanden sich noch Proteine, die im SDS-Gel nach ihrer Größe getrennt wurden.

Um bei jeder Probe die gleiche Menge Gesamtprotein im Gel einzusetzen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Das Funktionsprinzip beruht darauf, dass sich bei der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine das Absorptionsmaximum (465 nm ohne Proteine bzw. 595 nm mit Proteine) verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein direktes Maß für die Proteinkonzentration in Lösung. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von 2 mg BSA/ml PBS bis zu einem Minimum von ~30 µg/ml angesetzt. Die Proteinproben wurden je nach Konzentration 1/10 bzw. 1/20 mit 0,1 M PBS vorverdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 20 µl eingesetzt und mit 100 µl Coomassie gemischt. Die Absorption konnte sofort bei einer Wellenlänge von ~600 nm bestimmt werden.

4.5.2 Western Blot

Bei dieser Technik werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Trägerschicht aus Nitrocellulose transferiert und somit immobilisiert. Dadurch wird das hohe Trennungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Möglichkeit kombiniert, die übertragenen Moleküle auf einfache Weise spezifisch, qualitativ und quantitativ zu analysieren. Bei dem hier

durchgeführten Western Blot wurden die fertigen Gele (NuPAGE Bis-Tris Gel, 4-12 %; 1,0 mm*10 well) und auch die fertigen Puffer der Firma Invitrogen eingesetzt. Entsprechend wurde nach dem von der Firma angegebenen Protokoll verfahren.

Das Gesamtprobenvolumen, das pro Geltasche eingesetzt wurde, betrug 40 µl. Die Proteinmenge belief sich auf 50 µg je Probe, wobei die Differenz mit Aqua dest. aufgefüllt wurde. Zusätzlich mit einzurechnen waren 10 µl NuPAGE SDS *Sample Buffer* (4 x) und 4 µl NuPAGE *Reducing Agent* (10 x). Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Neben den Proben wurde auch der Standard (SeeBlue Plus2 pre-stained, 191-11 kDa) mit einem Volumen von 10-15 µl eingesetzt. Der Puffer (NuPAGE MOPS SDS *Running Buffer* (20x)) wurde mit Aqua dest. 1/20 auf insgesamt 1 l verdünnt und in die beiden Kammern der Gelapparatur gegeben, wobei bei der inneren Kammer 500 µl NuPAGE Antioxidant zugesetzt werden musste. Bei einer Stromstärke von 120 mA benötigten die kleinsten Proteine ca. 45-60 min, um den unteren Rand des Gels zu erreichen.

Im Anschluss daran wurde der eigentliche Blot auf die Nitrocellulose vorbereitet. Das jeweilige Pufferkonzentrat (NuPAGE *Transfer Buffer* (20x)) wurde entsprechend auf 1 l verdünnt. Dabei mussten 100 ml Methanol/Gel und 1 ml NuPAGE Antioxidant mit berücksichtigt werden.

Bevor der semi-dry Blot zusammengebaut wurde, mussten die Schwämme, Filter und Membranen mit NuPAGE *Transfer Buffer* getränkt werden. Der Blot wurde anschließend wie folgt zusammengebaut: 2 Schwämme-Filter-Membran-Gel-Filter-2 Schwämme. Die Stromstärke wurde pro Gel auf 110 mA eingestellt. Nach maximal zwei Stunden war der Transfer beendet und, die Kammer konnte auseinandergelöst werden. Der Proteintransfer wurde überprüft, indem die Nitrocellulosemembran mit Ponceaurot (2 % Ponceaurot in 3 % Trichloressigsäure) angefärbt wurde. Nachdem die Membran für 2-3 min mit Ponceaurot überdeckt war, wurde der überschüssige Farbstoff mit Aqua dest. abgewaschen, und es erschienen rote Banden an den Stellen, wo Proteine vom Gel auf die Membran transferiert wurden. Der Vorteil dieser Färbung war, dass sie reversibel war und die spätere Färbung nicht beeinträchtigte. Die Empfindlichkeit dieser Anfärbung liegt bei ca. 50-150 ng Protein pro 0,5 cm Bande. Nach dieser Kontrolle wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 2 % Milchpulver, angesetzt mit Waschpuffer (20 ml 0,5 mM Tris pH 6,8 + 20 ml 5 M NaCl + 1 ml Tween-20 - ad 1 l mit Aqua dest.), geblockt. Danach konnte die Blocklösung durch den Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung mit 2 % Milchpulver ersetzt werden (Tabelle 3). Wieder erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Durch 3 x 10 min Waschen mit dem Waschpuffer wurden nicht gebundene Reste des primären Antikörpers entfernt, bevor der Sekundärantikörper, der *horseradish peroxidase* (HRP) konjugiert war, in

einer 1:20.000 Verdünnung, mit 2 % Milchpulver, auf die Membran gegeben wurde. Erneut wurde die Membran dreimal für 10 min mit dem Waschpuffer gewaschen bevor die Detektion mit dem ECL Plus *Western blotting detection* System erfolgte. Die Inkubationsdauer betrug 5 min. Danach konnte die Membran mittels eines BiomaxFilmes, 20,3 cm x 25,4 cm, und des Entwicklers Curix 60 von Agfa ausgewertet werden.

| Antikörper | Gewebe | Verdünnung |
|--|------------------------------|------------|
| nNOS <i>Klon: 16 ; IgG_{2a}</i> | Arteria mesenterica superior | 1:2000 |
| iNOS <i>Klon: 6 ; IgG_{2a}</i> | Arteria mesenterica superior | 1:2000 |

Tab. 3: Aufgelistet sind die bei dem Western Blot verwendeten Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen (mit 0,05 M TBS und 1 % BSA) des jeweiligen Primärantikörpers und die untersuchten Gewebe.

4.5.3 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation hilft bei der Fragestellung, ob zwei Moleküle aneinander gebunden sind. So wird zuerst ein bestimmtes Antigen aus der Vielzahl der Antigene einer Lösung isoliert. Das im Präzipitat gebundene Protein wird aufgrund des Molekulargewichtes in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Mittels anschließendem Western Blot werden dann Proteine der Größe nach aufgetrennt. Das an das Protein gebundene weitere Protein wird nach dem Transfer auf die Nitrozellulosemembran mittels eines weiteren Antikörpers nachgewiesen. Mittels ECL-Kit können beide Proteine, und deren gebundene Antikörper, nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern binden monoklonale Antikörper häufig recht gut an Protein G-Sepharose. Aus diesem Grund wurde in diesem Versuchsabschnitt auch nur G-Sepharose und monoklonale Antikörper eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden 1-4 µg Antikörper (Tabelle 4) zu 40 µl G-Sepharose und 1 ml 0,1 M PBS gegeben. Während der einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) wurde die Probe immer geschüttelt. So konnte sich der Antikörper an die G-Sepharose binden. Um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen, wurde der Ansatz bei 2.500 rpm für 5 min zentrifugiert. Dadurch setzte sich der G-Sepharose-Antikörper Komplex am Boden des Reaktions-Gefäßes ab, und im Überstand, der abdekantiert wurde, befanden sich ungebundene Primärantikörper. Diese Prozedur wurde insgesamt fünf mal wiederholt. Die im nächsten Schritt eingesetzte zytosolische Fraktion von mesenterialem Gefäßbett wurde, wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben, gewonnen. Insgesamt wurde 0,5 bis 1,0 ml Gewebehomogenisat eingesetzt. Wieder folgte eine Inkubationszeit (unter Schütteln) von mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurde erneut 5 x gewaschen.

Beim letzten Waschvorgang sollte der Überstand so weit wie möglich abgenommen werden. Danach wurden 20 µl NuPAGE SDS *Sample Buffer* (4 x) und 8 µl NuPAGE *Reducing Agent* (10 x) zugegeben. Wie beim Western Blot Protokoll (Abschnitt 4.5.2) wurden die Proben denaturiert, indem sie für 10 min auf 70 °C erhitzt wurden. Dann jedoch wurden sie für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, damit die Sepharose nicht mit auf das sich anschließende SDS Gel aufgetragen wurde, da sie die Taschen des Gels verstopfen und so die Trennung der Proteine behindern würde. Das weitere Protokoll für den Western Blot ist bereits in Abschnitt 4.5.2 aufgeführt. Wenn bei der Präzipitation der Antikörper gegen HSP90 gerichtet war, dann musste der Primäantikörper im Western Blot an die nNOS binden (Verdünnungen in Tabelle 5) und umgekehrt. Zur Kontrolle wurde zum einen mit HSP90- und nNOS-Antikörpern immunpräzipitiert zum anderen wurde aber auch eine Isotypkontrolle, ein IgG_{2a} κ Antikörper, verwendet. Ferner wurde zur Lokalisation der nNOS-Bande ein Lysat der Hirnanhangsdrüse in einer Konzentration von 1 µg/ 20 µl aufgetragen.

| Antikörper | Gewebe | Verdünnung |
|---|---|------------|
| nNOS <i>Klon :16 ;IgG_{2a}</i> | A.mesenterica superior (1.+2. Ordnung) | 1:1000 |
| HSP90 (polyklonal) | A.mesenterica superior (1.+2. Ordnung) | 1:1000 |

Tab. 4: Aufgelistet sind die bei der Co-Immunpräzipitation verwendeten Verdünnungen (mit 0,05 M TBS und 1 % BSA) des jeweiligen, an die G-Sepharose gebundenen Antikörpers und die untersuchten Gewebe.

| Antikörper | Gewebe | Verdünnung |
|---|---|------------|
| nNOS <i>Klon :16 ;IgG_{2a}</i> | A.mesenterica superior (1.+2. Ordnung) | 1 :2000 |
| HSP90 (polyklonal) | A.mesenterica superior (1.+2. Ordnung) | 1:1000 |

Tab. 5: In dieser Tabelle sind die Verdünnungen für die jeweiligen Antikörper, wie sie im Western Blot eingesetzt werden, aufgeführt. Die Verdünnungen wurden jeweils mit 0,05 M TBS und 1 % BSA angesetzt.

4.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden in Mittelwerten ± SEM angegeben. Die Analyse wurde mittels ANOVA (2-way, mit wiederholten Messungen), gepaartem und ungepaartem nicht-parametrischen Test nach Mann-Whitney durchgeführt. Das statistische Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

5. Ergebnisse

5.1 Die Rolle der nNOS bei portaler Hypertension

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die portale Hypertension durch eine Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren gekennzeichnet. Ferner kommt es vor allem im splanchnischen Gefäßbett zu einer arteriellen Vasodilatation, wobei man bisher immer davon ausgegangen ist, dass hier insbesondere die endotheliale NO-Synthase (eNOS) von Bedeutung ist (Albornoz et al., 2001; Cahill et al., 1996; Gadano et al., 1997; Wiest and Groszmann, 1999; Wiest et al., 1999).

In den folgenden Experimenten sollte jedoch der Fokus weniger auf der eNOS, als auf der nNOS liegen. Dazu wurde das Gefäßbett über eine auf die Arteria mesenterica superior aufgebundene Platinelektrode, und über ein als zweite Elektrode dienendes Platinnetz, elektrisch stimuliert. Um die Beteiligung der eNOS auszuschließen, wurde das Gefäßbett durch eine kombinierte Gabe aus Gallensäure (0,5 %) und Aqua dest. deendothelisiert. Als Tiermodell für die portale Hypertension dienten portal venös ligierte Ratten, die bereits nach 12 bis 14 Tagen das klinische Bild einer portalen Hypertension (mit hyperdynamer Zirkulation) entwickelten. Um die Auswirkungen auf die Leber zu verdeutlichen, sind in Abbildung 19A und 19B zwei Hematoxylin/Eosin-(HE)-gefärbte Leberschnitte dargestellt. Die Leber wurde dazu jeweils aus einem gesunden Tier und aus einer PVL-Ratte entnommen. Diese beiden Tiergruppen wurden auch in allen folgenden Experimenten eingesetzt. In Abbildung 19A ist eine gesunde Leberarchitektur zu erkennen. Sowohl der Zentralkanal als auch die Sinusoide sind klar abgegrenzt. Dahingegen ist in Abbildung 19B eine starke Zunahme des Bindegewebes zu sehen. Es gibt nur noch eng begrenzte Areale in denen die normale Anordnung der Sinusoide festzustellen ist.

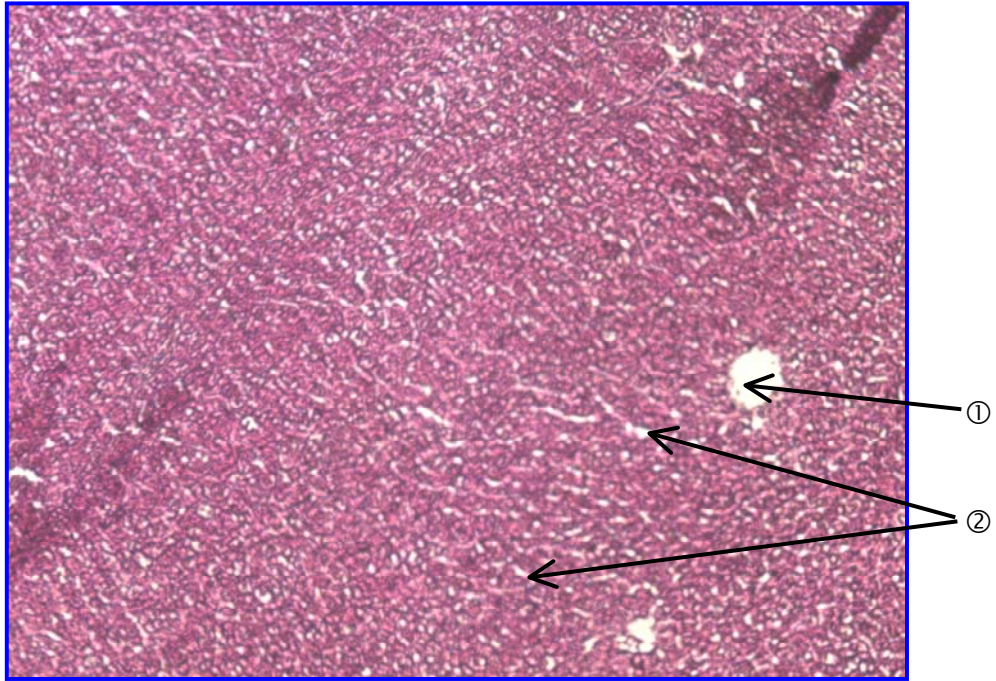


Abb. 19A: Gesunde Leber einer Sham-Ratte. Gezeigt ist ein Querschnitt durch eine Leber einer gesunden Ratte. Nach Fixierung in Formaldehyd und Saccharose wurde die Leber in 10 μM dünne Präparate geschnitten und anschließend HE-gefärbt. HE-Färbung, 20 x Vergrößerung

Legende: (1) Zentralkanal; (2) Sinusoiden

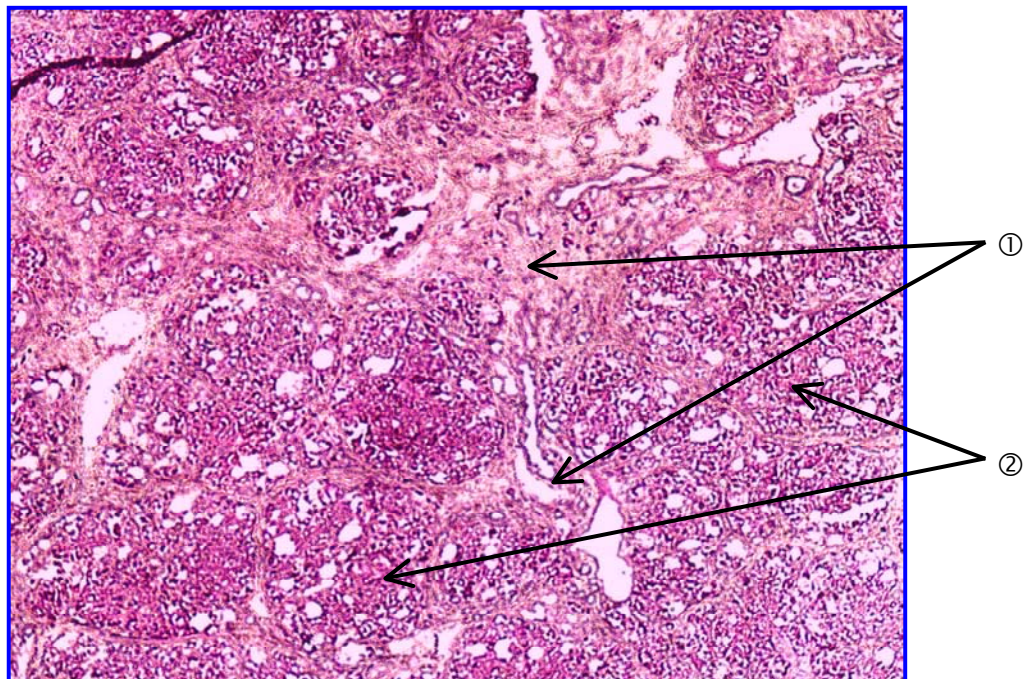


Abb. 19B: Leber einer PVL-Ratte. Die Leber wurde wie oben beschrieben fixiert und in 10 μM dünne Präparate geschnitten und anschließend HE-gefärbt. HE-Färbung; 20 x Vergrößerung

Legende: (1) Bindegewebe; (2) normale Leberarchitektur

5.1.1 Körper- und Milzgewicht der verwendeten Tiere


Um eine möglichst gleiche Ausgangssituation zu schaffen wurde darauf geachtet, dass es zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keinen nennenswerten Unterschied gab: Die Tiere hatten ein Körpergewicht von durchschnittlich $341 \pm 27\text{g}$ für PVL- und bei $339 \pm 25\text{g}$ für Sham-Ratten (n.s.). Aufgrund der portalvenösen Ligatur kam es bei PVL-Ratten zu einem signifikant erhöhten Milzgewicht. Dies betrug bei den operierten Tieren $3,38 \pm 0,32\text{ g/kg}$ Körpergewicht im Vergleich zu Sham-Ratten, die nur ein Milzgewicht von $2,57 \pm 0,58\text{ g/kg}$ Körpergewicht ($p < 0,01$) aufwiesen.

5.1.2 Hyporeaktivität gegenüber α_1 -adrenerger Vasokonstriktoren

Trotz der vermuteten Beteiligung der nNOS bei der Vasodilatation im Splanchnikusgebiet sollte in den anfänglichen Experimenten auch noch einmal die Rolle der eNOS verdeutlicht werden. Dazu wurde ein intaktes Gefäßbett, mit Endothel, verwendet.

Bereits während der Äquilibrationsphase zeigte sich bei den kontrollierten Ratten ein Druck von $24,0 \pm 8,2\text{ mmHg}$. Dahingegen erreichten die PVL-Tiere lediglich einen Druck von $17,1 \pm 8,2\text{ mmHg}$. Um auch die Hyporeaktivität des mesenterialen Gefäßbettes von PVL-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu zeigen, wurden Dosis-Wirkungskurven mit dem α_1 -Agonisten Methoxamin erstellt. Dazu wurde das Gewebe nach einer kurzen Äquilibrationszeit mit Methoxamin in den Konzentrationen von $1\text{ }\mu\text{M}$, $10\text{ }\mu\text{M}$ und $100\text{ }\mu\text{M}$ auf non-kumulative Weise für $2,5\text{ min}$ perfundiert. In Abbildung 20A ist das Ergebnis dieses Versuches graphisch dargestellt. Bei einer Methoxamin-Konzentration von $30\text{ }\mu\text{M}$ geht die Kurve für beide Tiergruppen in ein Plateau über (Abb. 20A). Das Maximum unterscheidet sich jedoch um ca. 40 mmHg voneinander (Abb. 20A). Während der Druck bei den Sham-Ratten auf $141 \pm 5,4\text{ mmHg}$ anstieg, erreichten die PVL-Tiere ihr Maximum bereits bei $100 \pm 6,7\text{ mmHg}$ ($p < 0,01$) (Abb. 20A). Da vor allem das Signalmolekül NO, gebildet durch die verschiedenen NO-Synthasen, für diese Hyporeaktivität gegenüber Methoxamin verantwortlich sein dürfte, wurde im nächsten Versuch die endogene NO-Produktion gehemmt. Dazu wurde der NOS-unspezifische Hemmstoff L-NAME in einer Konzentration von $100\text{ }\mu\text{M}$ zur Perfusionslösung zugegeben (Abb. 20B). Der Effekt, den L-NAME bewirkte, ist in Abbildung 20C dargestellt. Nachstehend sind die entsprechenden EC_{50} -Werte aufgeführt:

- 1) Sham: $8,7 \pm 0,7\text{ }\mu\text{M}$ (ohne L-NAME) vs. $6,1 \pm 3,1\text{ }\mu\text{M}$ (mit L-NAME)
- 2) PVL: $16,3 \pm 2,0\text{ }\mu\text{M}$ (ohne L-NAME) vs. $6,4 \pm 0,7\text{ }\mu\text{M}$ (mit L-NAME)


 $p < 0,01$

Es kam demnach bei den Kurven für beide Tiergruppen zu einer Links-Verschiebung, wobei die Verschiebung bei den PVL-Tieren deutlich größer war.

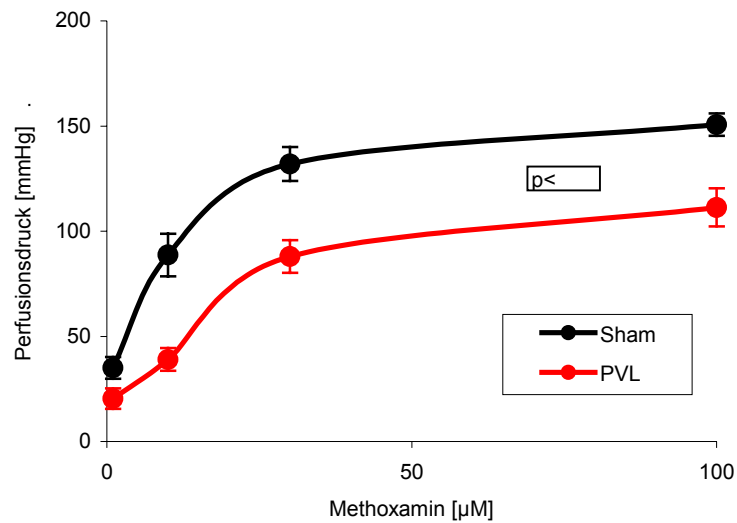


Abb. 20A

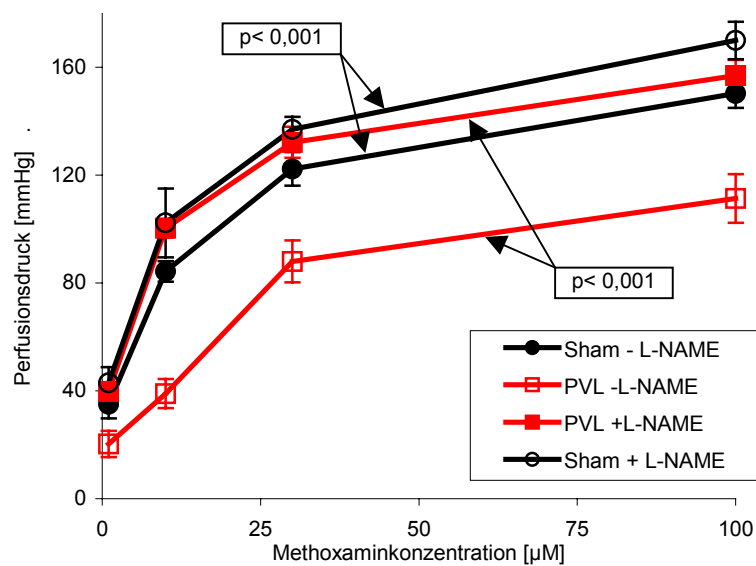


Abb. 20B

Abb. 20A: Dosis-Wirkungskurven mit Methoxamin. **Abb. 20A:** Nach einer Äquilibrationszeit von ca. 20 min wurde das Gefäßbett mit 1 μM , 10 μM , 30 μM und 100 μM Methoxamin (2,5 ml) perfundiert. **Abb. 20B:** Zusätzlich zu Methoxamin wurde ein NOS-unspezifischer Inhibitor in Form von 100 μM L-NAME zugegeben, um die Bedeutung der endogenen NO-Produktion herauszuarbeiten. (Sham: n=6; PVL: n=6) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; L-NAME=NOS-unspezifischer Inhibitor (Nitro-L-Arginin-Methylester)

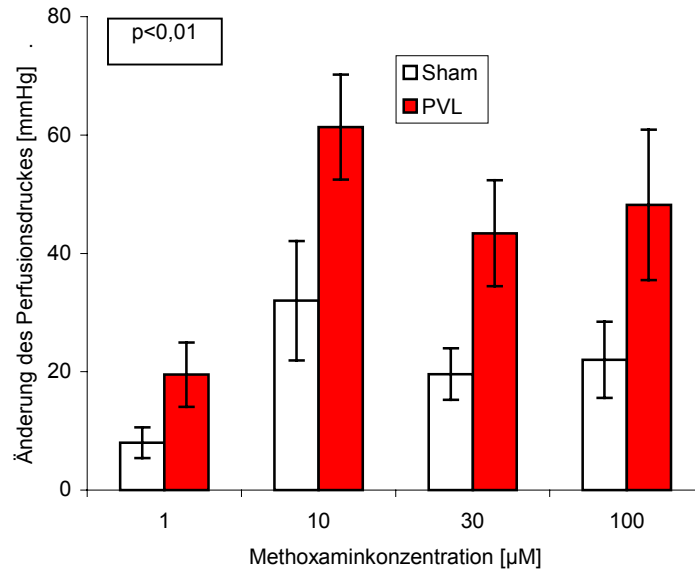


Abb. 20C: Effekt von L-NAME auf die α_1 -adrenerge Stimulation. Aufgetragen ist der Effekt von L-NAME für die beiden Tiergruppen, wobei die Änderung in mmHg angegeben ist. (Sham: n=6; PVL: n=6) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; L-NAME=NOS-unspezifischer Inhibitor (Nitro-L-Arginin-Methylester)

Um den rein eNOS-vermittelten Effekt auszuschließen, wurde das Gefäßbett mittels einer kombinierten Gabe aus 0,5 % Gallensäure und Aqua dest. deendothelisiert und anschließend wie oben beschrieben perfundiert (Abb. 21). Für die Methoxamin-Dosis-Wirkungskurve wurden Konzentrationen von 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM und 100 μM Methoxamin verwendet. Unter allen vier Bedingungen wurde das Maximum bei ca. 30 μM Methoxamin erreicht (Abb. 21).

Bei der Perfusion des mesenterialen Gefäßbettes (mit intaktem Endothel) von Sham- bzw. PVL-Tieren ergaben sich die gleichen Werte wie in Abbildung 20 gezeigt. Nach Entfernung des Endothels zeigten sich die größten Unterschiede im Bereich der submaximalen Stimulation bei den PVL-Tieren. Die entsprechenden EC_{50} -Werte für PVL lauten wie folgt:

PVL: $16,3 \pm 2,0 \mu\text{M}$ (mit Endothel) vs. $6,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$ (ohne Endothel) ($p < 0,01$)

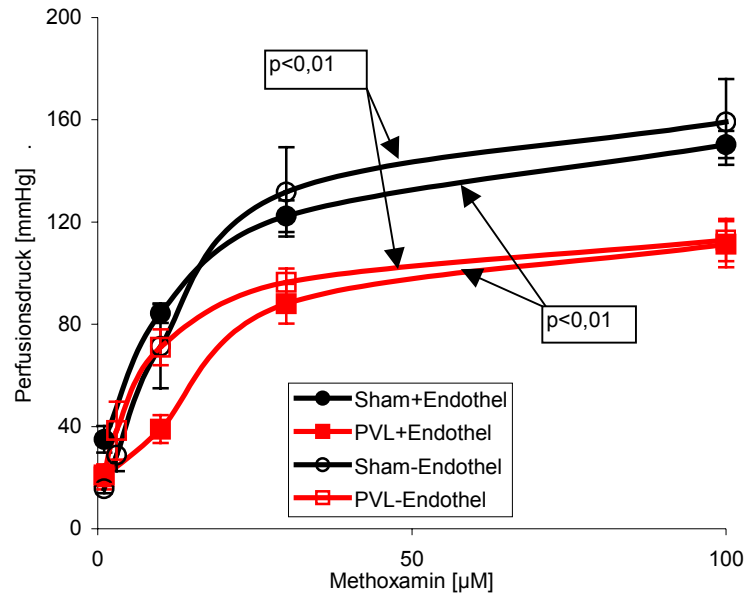


Abb. 21: Dosis-Wirkungskurve mit Methoxamin. Durch die Deendothelisierung konnte in diesem Versuch die Beteiligung der eNOS ausgeschlossen werden. Methoxamin wurde in non-kumulativer Weise in einer Konzentration von 1 µM, 10 µM, 30 µM und 100 µM verabreicht. (Sham: n=6; PVL: n=6) Die Daten werden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

5.1.3 Resultat der nNOS-vermittelten Vasorelaxation nach PNS

Nachdem die Deendothelisierung erfolgreich etabliert worden war, und somit ausgeschlossen werden konnte, dass die eNOS bei nachfolgenden Experimenten eine Rolle spielte, konnte man sich der Untersuchung des nNOS vermittelten Effektes bei portaler Hypertension widmen. Im Gegensatz zu den Geweben mit intaktem Endothel (s. o.), zeigte sich nach der Entfernung des Endothels kein signifikanter Unterschied in den Ausgangsdrücken beider Tiergruppen. Am Ende eines jeden Versuches wurde die Deendothelisierung mittels Acetylcholin (ACh), ein endothelabhängiger Vasodilatator, überprüft. Es ergaben sich Relaxationen von $9.0 \pm 6.1 \%$ und $7.5 \pm 5.7 \%$ in Sham- bzw. PVL-Tieren (n.s.). Die Verabreichung von 0,1 ml Natriumnitroprussid (SNP), ein endothelunabhängiger Vasodilatator, ergab hingegen eine Relaxation von $56.6 \pm 9.0 \%$ und $61.8 \pm 7.6 \%$ für Sham- bzw. für PVL-Ratten (n.s.). Letzteres ist ein Maß für die Unversehrtheit der glatten Gefäßmuskulatur im mesenterialen Gefäßbett. Um die Dilatation der Gefäßmuskulatur, ausgelöst durch die PNS, zu messen, musste das Gefäßbett zunächst präkonstriktiert werden. Die submaximale (EC_{80})-Präkonstriktion konnte durch Verwendung von Noradrenalin-(NA) in einer Konzentration von 8 µM ausgelöst werden. Somit war gewährleistet, dass das Gefäßbett nach der PNS sowohl dilatieren als auch konstriktieren konnte.

Zwischen den Tiergruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Präkonstriktionsniveaus (Sham: $93,0 \pm 5.6$ mmHg vs. PVL: 88.3 ± 5.4 mmHg). Im Laufe der Experimente konnte kein Effekt der verwendeten NO-Inhibitoren *per se* auf den Perfusionsdruck beobachtet werden.

In den folgenden Abbildungen ist exemplarisch eine Perfusionskurve für jeden Versuchsabschnitt gezeigt (Abb. 22A bis 22D). Auf der Ordinate ist der Druck in mmHg aufgetragen, wohingegen die Abszisse die Zeit in Minuten wiedergibt. Die Deendothelisierung zeigte sich nach ca. 10 min (Abb. 22A) als eine Konstriktion bis auf ~ 40 mmHg. Im weiteren Verlauf ist zu erkennen, dass mit der Zunahme der Reizfrequenz die Dilatation proportional bis zu einem Maximum bei 8 Hz zunahm. Um die endogene nicht-endotheliale NO-Produktion zu hemmen, wurde ca. 15 min vor dem zweiten Perfusionszyklus L-NAME in die Krebs-Henseleit-Lösung geben. Unter dem Einfluss dieses NOS-unspezifischen Hemmstoffes zeigte sich, dass die Dilatation deutlich schwächer ausgeprägt war (Abb. 22B). Um zu zeigen, dass der Effekt ausschließlich von der PNS abhing, wurde mit Tetrodotoxin (TTX), über eine Vorlaufzeit von 15 min perfundiert und anschließend elektrisch stimuliert (Abb. 22C). Wie auch mit später verwendeten Inhibitoren, musste das TTX nicht nur intern durch Perfusion, sondern auch extern durch Auftropfen auf das Gefäßbett, verabreicht werden. In der Abbildung 22C ist das Ergebnis beispielhaft gezeigt. Der dilatierende Effekt wurde vollständig aufgehoben. Zum Schluss dieser experimentellen Reihe musste noch der Nachweis angetreten werden, dass die Dilatation auf der Aktivierung der nNOS beruht. Dies wurde mit dem nNOS-spezifischen Hemmstoff 1-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazol (TRIM) gezeigt, der genau wie L-NAME und TTX 15 min vor Beginn des zweiten Zyklus in die Krebs-Henseleit-Lösung gegeben wurde (Abb. 22D). Neben dieser internen Gabe wurde das Gefäßbett mit der gleichen TRIM-Konzentration von außen beträufelt und erneut elektrisch stimuliert. Die Abbildung 22D zeigt, dass der Effekt komplett gehemmt wurde.

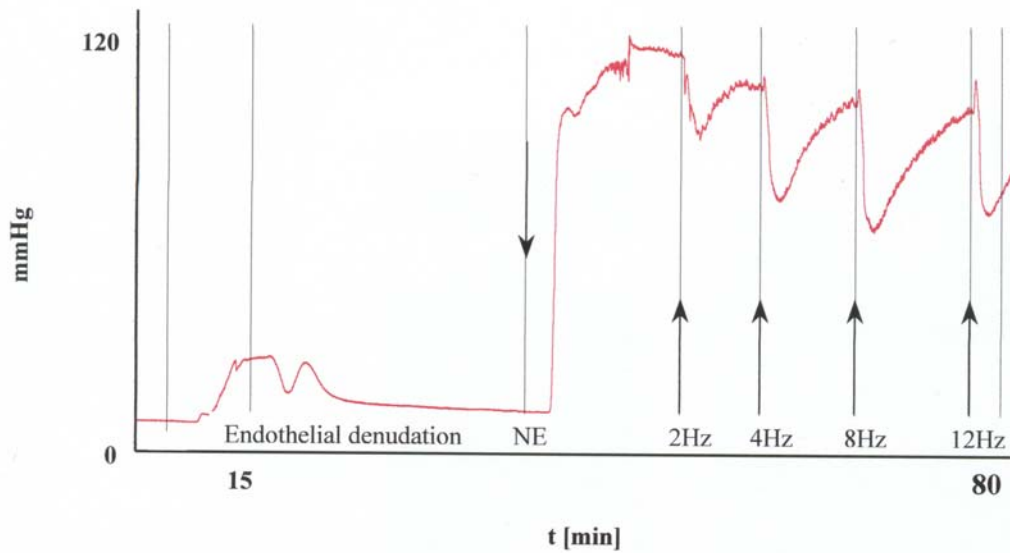


Abb. 22A: Exemplarische Perfusionskurve. Nach Deendothelisierung und Präkonstriktion mit 8 μ M Noradrenalin (NA) und Erreichen eines stabilen Präkonstriktionsniveaus wurde mit 2, 4, 8 und 12 Hz elektrisch stimuliert, was eine frequenzabhängige Vasodilatation zur Folge hatte. Diesbezüglich erwies sich eine Frequenz von 8 Hz als maximaler Stimulus.

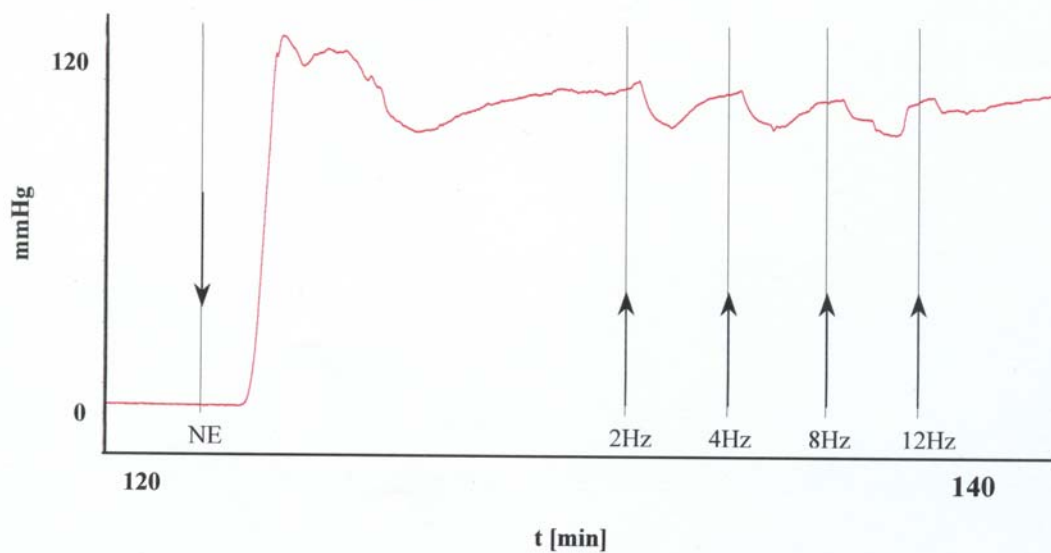


Abb. 22B: Einfluss von L-NAME auf den Perfusionsdruck. Diese Kurve gibt exemplarisch den zweiten Zyklus des Versuches wieder. Hier wurde vor der erneuten Präkonstriktion der NOS-unspezifische Hemmstoff L-NAME (100 μ M) zugegeben. Anschließend wurde mit einer Reizfrequenz von 2, 4, 8 und 12 Hz elektrisch stimuliert.

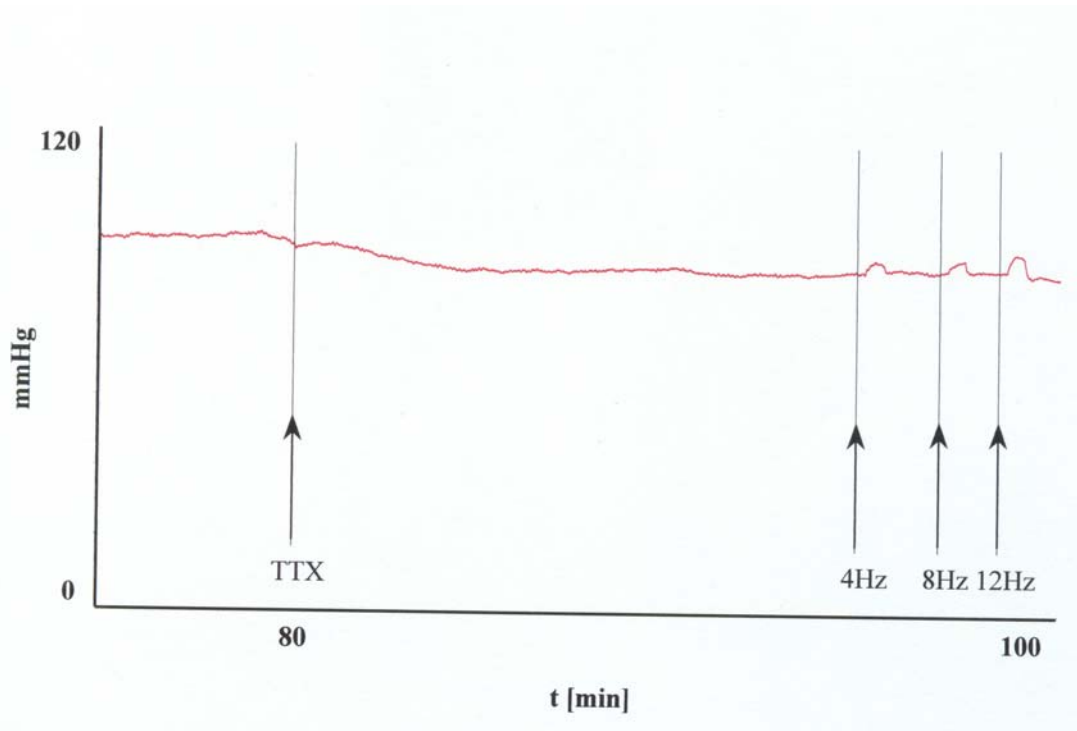


Abb. 22C: Kontrollexperiment mit Tetrodotoxin. Um zu zeigen, dass der durch die PNS ausgelöste Effekt neuronal vermittelt war, wurde Tetrodotoxin (TTX) (600 nM) im zweiten Perfusionszyklus zugeben. Anschließend wurde mit 2, 4, 8 und 12 Hz elektrisch stimuliert und die Druckänderung aufgezeichnet.

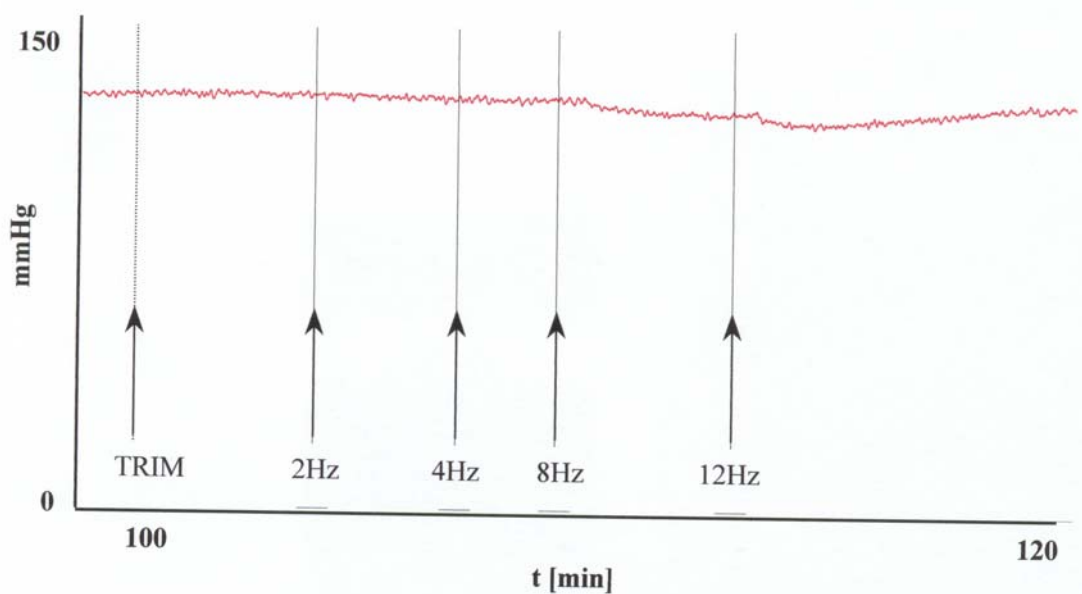


Abb. 22D: Kontrollexperiment mit TRIM. Als weiterer Kontrollversuch wurde der nNOS-spezifische Hemmstoff 1-(2-Trifluoromethylphenyl)imidazol (TRIM) in einer Konzentration von 100 μ M vor dem zweiten Zyklus, bei dem ebenfalls mit 2, 4, 8 und 12 Hz stimuliert wurde, zugegeben.

Die Gesamtheit der in diesem Versuchsabschnitt gewonnenen Ergebnisse ist in Abbildung 23 zusammengefasst. Bei der Stimulation mit 2-12 Hz, ohne jeglichen Inhibitor, zeigten die PVL-Tiere ($-30 \pm 1,6$ mmHg) eine signifikant stärkere Relaxation als die Sham-Tiere ($-21 \pm 2,7$ mmHg) ($p < 0,05$).

Wie auch schon an der Abbildung 22 beschrieben, stieg die Relaxation frequenzabhängig bis eine maximale Dilatation bei 8 Hz erreicht wurde (Abb. 23A+B). Nach Gabe des NOS-unspezifischen Hemmstoffes L-NAME in einer Konzentration von 100 μ M war der Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen nicht mehr signifikant (Abb. 23C).

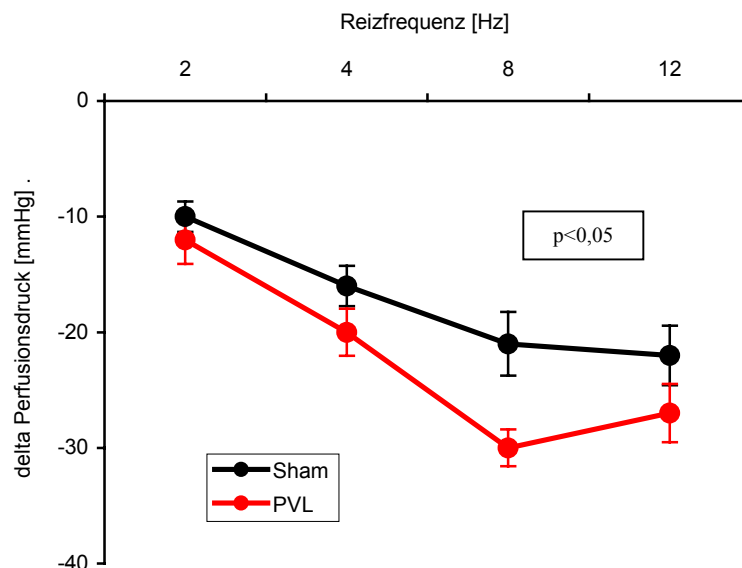


Abb. 23A: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Perfusionen mit der PNS-vermittelten Vasorelaxation. Es ist die Änderung des Perfusionsdruckes in mmHg gegen die PNS in Hz aufgetragen. Nach Präkonstriktion mit Noradrenalin und Erreichen eines stabilen Niveaus wurde mit 2, 4, 8 und 12 Hz elektrisch stimuliert. (Sham: n=14; PVL: n=18) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

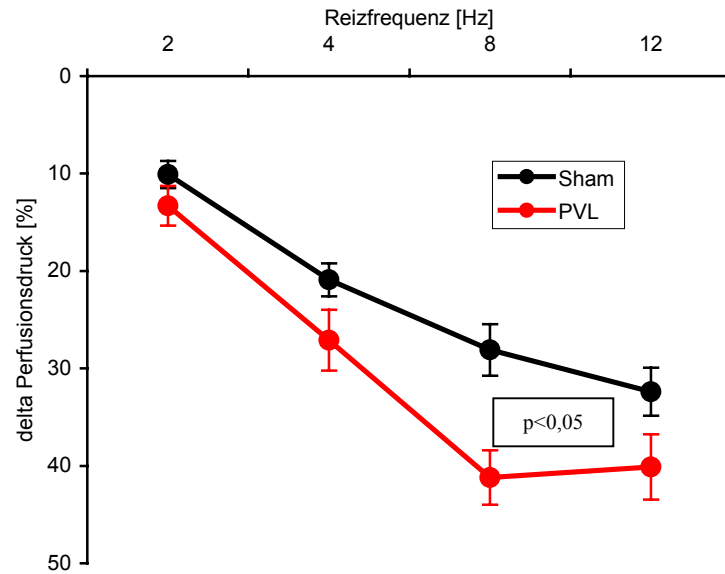


Abb. 23B: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Perfusionen mit der PNS-vermittelten Vasorelaxation. Der Graph stellt die Reizfrequenz in Beziehung zu der prozentualen Änderung des Perfusionsdruckes da. (Sham: n=14; PVL: n=18) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt. Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

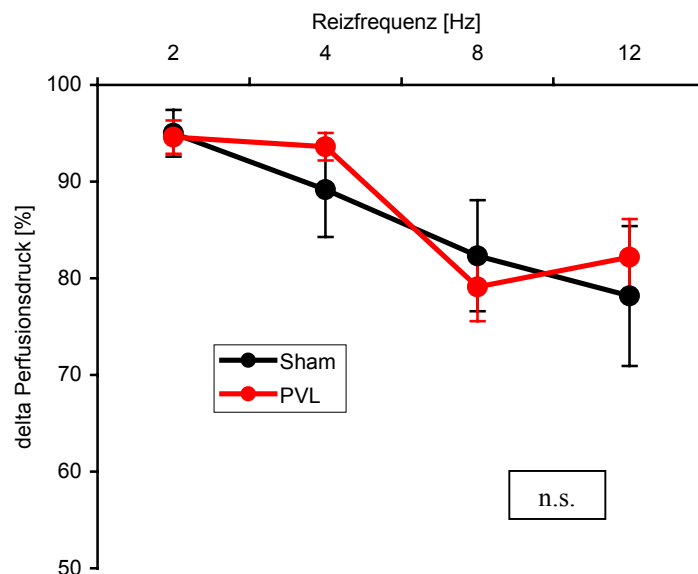


Abb. 23C: Hemmung der PNS-induzierten Vasodilatation nach L-NAME Gabe. Nach der Gabe von L-NAME (100 μ M) im zweiten Perfusionszyklus ließ sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Tiergruppen erkennen. Dabei wurde, wie in der vorherigen Abbildung gezeigt, ebenfalls mit 2, 4, 8 und 12 Hz stimuliert. (Sham: n=12; PVL: n=15) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt. Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; L-NAME=Nitro-L-Arginin-Methylester

Um diesen inhibierenden Effekt von L-NAME hervorzuheben, wurde die Änderung der Relaxation in mmHg bzw. in Prozent vor und nach L-NAME Gabe verglichen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 23D und 23E dargestellt. Es ist festzuhalten, dass die Änderung des Perfusionsdruckes nach L-NAME Gabe bei PVL-Tieren signifikant größer war als bei Sham-Tieren. Die ermittelten Änderungen bei 12 Hz lauten wie folgt: $-23,0 \pm 4,4$ mmHg bei PVL-Ratten und $-15,0 \pm 6,0$ mmHg bei Sham-Ratten.

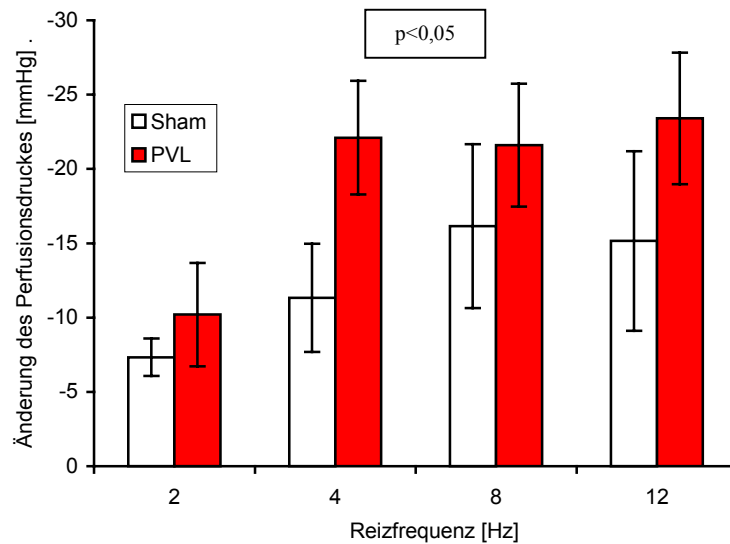


Abb. 23D: Effekt von L-NAME auf die PNS-induzierte Relaxation in mmHg. Auf der Ordinate ist die Änderung des Perfusionsdruckes vor und nach L-NAME Gabe in mmHg dargestellt, wohingegen auf der Abszisse die Reizfrequenz in Hz aufgetragen ist. (Sham: n=6; PVL: n=11) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; L-NAME=Nitro-L-Arginin-Methylester

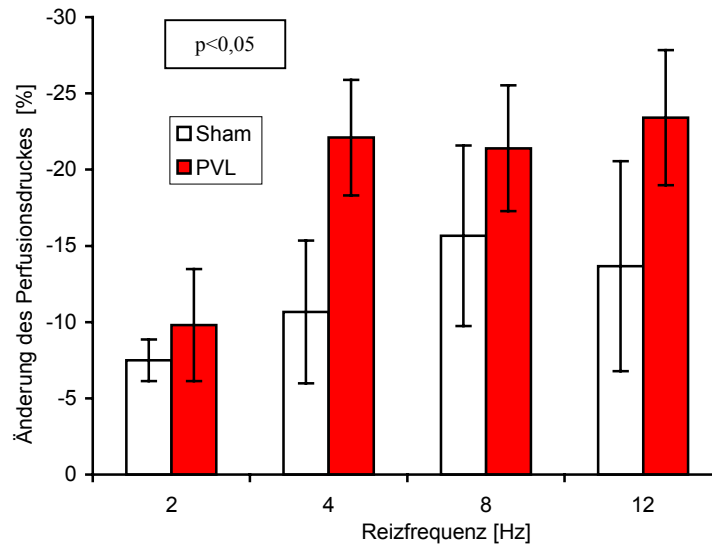


Abb. 23E: Effekt von L-NAME auf die PNS-induzierte Relaxation. Die Änderung des Perfusionsdruckes vor und nach L-NAME Gabe wird in diesem Diagramm in Prozent dargestellt. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. (Sham: n=6; PVL: n=11) Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; L-NAME=Nitro-L-Arginin-Methylester

5.1.4 Lokalisation der nNOS positiven Strukturen im mesenterialen Gefäßbett

Um eine mögliche Erklärung für die gesteigerte PNS-induzierte Vasodilatation und die endothelunabhängige Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren bei PVL-Tieren zu finden, wurde im Folgenden die Proteinmenge der nNOS im mesenterialen Gefäßbett untersucht. Dazu wurde sowohl von PVL- als auch von Sham-Tieren mesenteriales Gefäßbett entnommen, in Formaldehyd und Saccharose fixiert und schließlich in 5-10 μ M dünne Präparate geschnitten. Mittels eines nNOS-spezifischen Antikörpers, der keine Kreuzreaktion mit iNOS oder eNOS zeigte, wurde zum einen die Proteinmenge und zum anderen die Lokalisation der nNOS (Abb. 24A) im mesenterialen Gefäßbett untersucht. Als Indikator für die nNOS-Proteinmenge konnte die Intensität der roten Farbe verwendet werden (Abb. 24B bis 24D).

In Abbildung 24A ist die Lokalisation der Fasern mittels Immunfluoreszenz gegen nNOS exemplarisch dargestellt. Es handelt sich um einen Querschnitt eines mesenterialen Gefäßes. Leuchtend rot und an einigen Stellen mit Pfeilen gekennzeichnet kann man die nNOS-positiven Fasern erkennen. Das Lumen des Gefäßes war noch mit Resten von Erythrozyten gefüllt. Die entsprechende Isotypkontrolle mit einem anti-Maus IgG_{2a} Antikörper war negativ (nicht gezeigt). Vor allem in den äußeren Bereichen der Gefäße, in der Adventitia und an der Grenze von

Adventitia und Media, waren große Fasern positiv angefärbt (Abb. 24A). Wesentlich dünnere und nur schwer darstellbare Fasern wurden auch in der Media identifiziert (Abb. 24A). Hierbei handelt es sich offenbar um die Endigungen der nNOS-positiven Fasern, da keine weiteren Verzweigungen ausgemacht werden konnten.

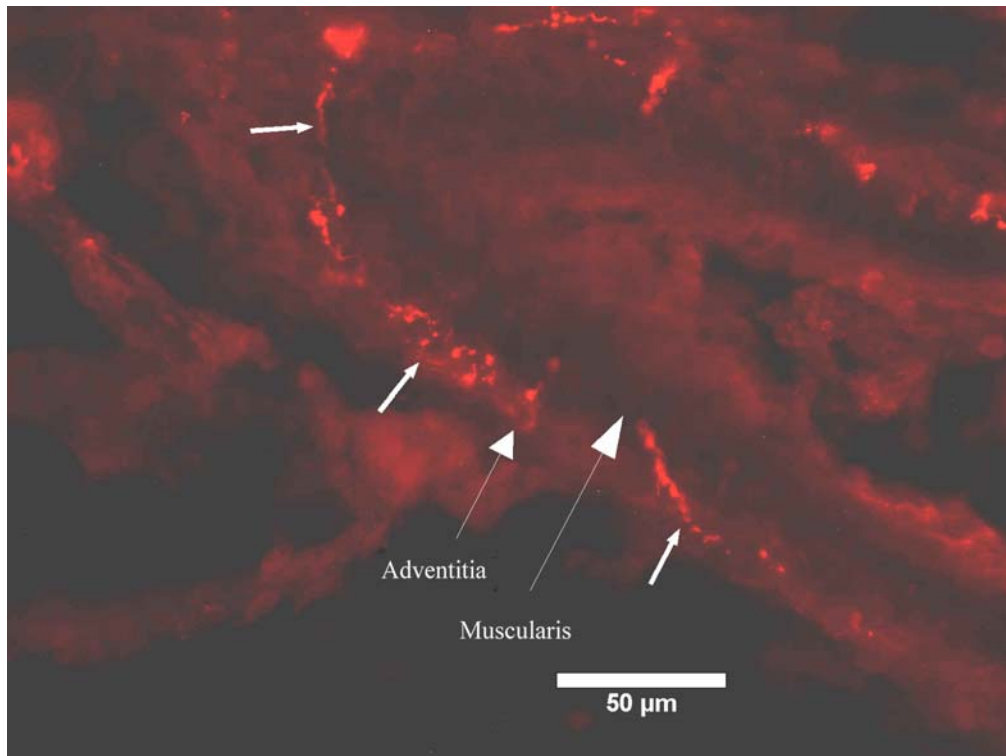


Abb. 24A: Färbung der nNOS mittels Immunfluoreszenz. Das hier in 400-facher Vergrößerung dargestellte Gefäß einer PVL-Ratte ist eine Arterie der zweiten Ordnung im mesenterialen Gefäßbett und wurde mittels nNOS-spezifischen Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Sekundäntikörper angefärbt. Die kleinen, dickeren Pfeile deuten auf nNOS-positive Fasern, die vor allem in der Adventitia lokalisiert sind. Nur schwer zu erkennen sind auf diesem Bild die dünnen Fasern in der Media, die die Endigungen von nNOS-positiven Fasern darstellen.

Für die Untersuchungen der nNOS-Proteinmenge wurde der gleiche nNOS-Antikörper verwendet wie für die Immunfluoreszenz, allerdings wurde jetzt für die Anfärbung das Alkaline-Phosphatase-Anti-Alkaline-Phosphatase Kit (APAAP) von Dako verwendet.

Es zeigte sich, dass sich die Intensität der Färbung zwischen der Arteria mesenterica superior und den Gefäßen der zweiten Ordnung im Gefäßbett nicht unterschied (nicht gezeigt). In den weiter distal gelegenen Gefäßen jedoch nahm die Intensität der Rotfärbung stetig ab, so dass im kapillären Gefäßbett keine nNOS mehr nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Zwischen den Gefäßen der beiden Tiergruppen, PVL und Sham, zeigte sich jedoch ein deutlicher

Unterschied. Die Intensität der Rotfärbung ist bei PVL- deutlich ausgeprägter als bei Sham-Ratten (Abb. 24B und 24C), was auf eine erhöhte nNOS-Proteinmenge bei den PVL-Tieren hindeutet. Die Isotypkontrolle war, abgesehen von wenigen unspezifischen Bindungen, negativ (Abb. 24D).



Abb. 24B: Sham-Tier mit nNOS-spezifischer APAAP Färbung. Es zeigte sich vor allem in der Adventitia dieses 200-fach vergrößerten Gefäßes eine nNOS-spezifische Färbung. Die Media und auch das Endothel waren nNOS-negativ.

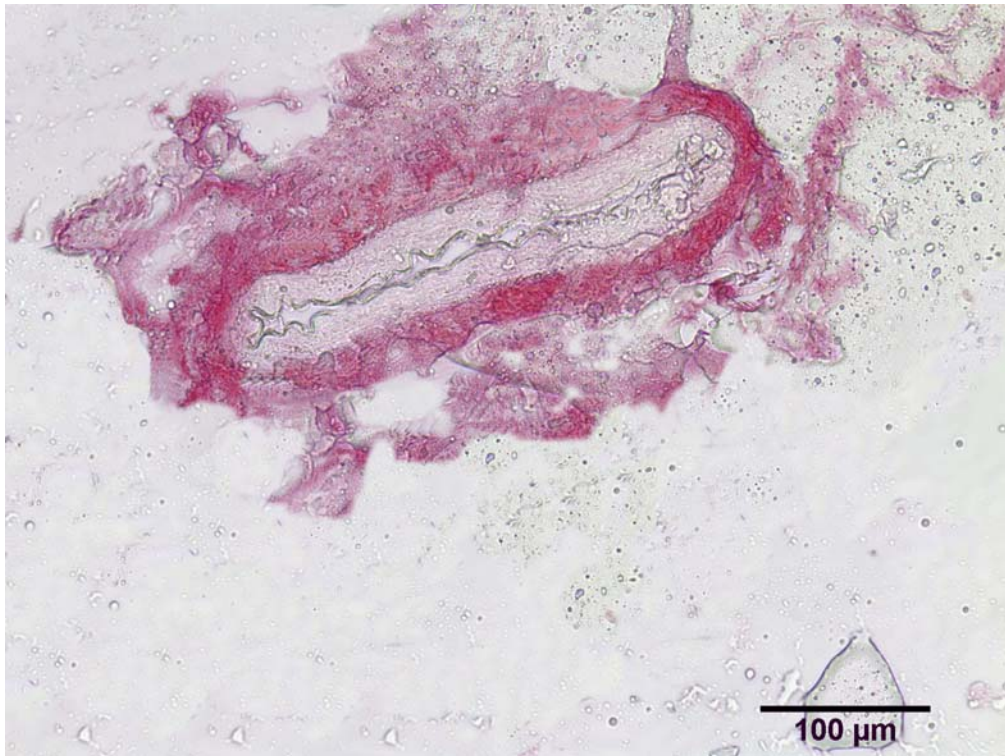


Abb. 24C: Gefäß einer PVL-Ratte. Das hier in 200-facher Vergrößerung gezeigte Gefäß wurde durch einen nNOS-spezifischen Primärantikörper, und durch die Verwendung des APAAP-Kits, rot angefärbt. Im Vergleich zu der Anfärbung in den Kontrolltieren (Abb. 24B) war die rote Farbe insbesondere in der Adventitia deutlich intensiver. In der Media war nur eine schwache Rotfärbung zu erkennen, wohingegen im Endothel keine nNOS nachgewiesen werden konnte.

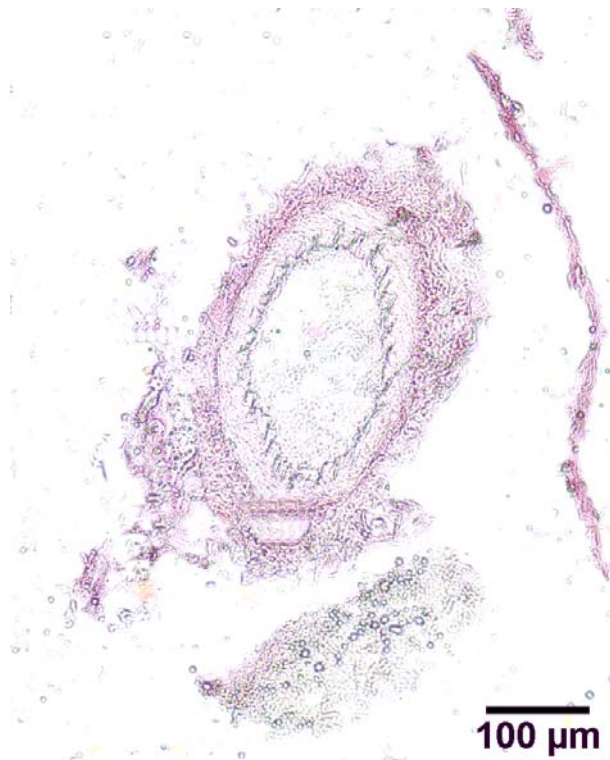


Abb. 24D: Isotypkontrolle. Die 200-fach vergrößerte Isotypkontrolle war, abgesehen von ein paar wenigen unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers, negativ. Als Isotypkontrolle wurde ein anti-Maus IgG_{2a} verwendet.

5.1.5 Bestimmung der nNOS Proteinmenge

Da eine Quantifizierung der nNOS-Proteinmenge durch immunhistochemische Methoden in den verschiedenen Tiergruppen nur schwer zu realisieren war, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurde eine Probe von mesenterialem Gefäßbett entnommen und homogenisiert. Dieses Gewebelysat wurde dann in einer Proteinkonzentration von 50 µg auf ein SDS-Gel aufgetragen und somit die Proteine ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel geblottet und die Banden mittels des schon in der Immunhistologie verwendeten nNOS-Antikörpers, in Kombination mit dem ECL-Kit, detektiert. Um zu zeigen, dass die iNOS keine Rolle bei der NO-Synthese im Gefäßbett spielt, wurde zusätzlich ein Western Blot gegen die iNOS durchgeführt. In Abbildung 25A ist ein exemplarischer Western Blot für nNOS und iNOS dargestellt. Als Positivkontrollen wurden zum einen Hypophysenlysat der Ratte (nNOS-155 kDa) und zum anderen mit LPS und IFN γ stimulierte Mausmakrophagen (iNOS-130 kDa) verwendet.

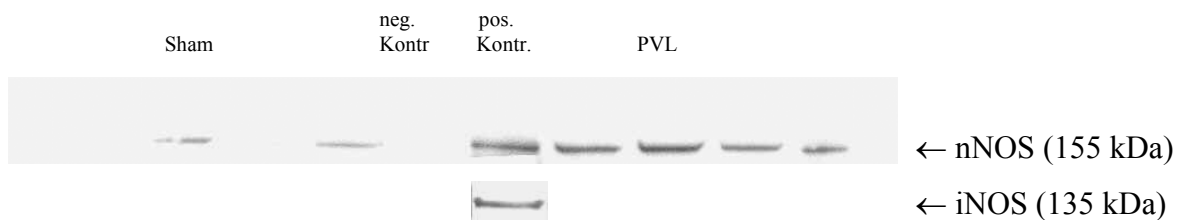


Abb. 25A: n/iNOS Western Blot von mesenterialem Gefäßbett. In dieser Abbildung ist ein exemplarischer nNOS- bzw. iNOS Western Blot dargestellt. Mesenteriales Gefäßbett wurde aus beiden Tiergruppen entnommen, homogenisiert und dann in gleichen Proteinkonzentrationen auf das Gel aufgetragen. Die Detektion der n/iNOS Proteine erfolgte mit einem spezifischen Antikörper in Kombination mit einem ECL-Kit.

Als Positivkontrolle wurde für nNOS ein Hypophysenlysat aus Ratten verwendet und für iNOS wurden mit IFN γ +LPS stimulierte Mausmakrophagen eingesetzt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

Um schließlich auch eine quantitative Aussage über die nNOS-Proteinmenge machen zu können, wurden die nNOS-Banden von beiden Tiergruppen densitometrisch vermessen. In Abbildung 25B ist dies grafisch dargestellt. Es zeigte sich, dass im mesenterialem Gefäßbett von PVL-Tieren ca. zwölfmal mehr nNOS-Protein vorhanden war als bei den Kontrolltieren (Abb. 25B). Die Werte im Einzelnen: Sham: 144 ± 60 vs. PVL: 1739 ± 341 . ($p < 0,05$).

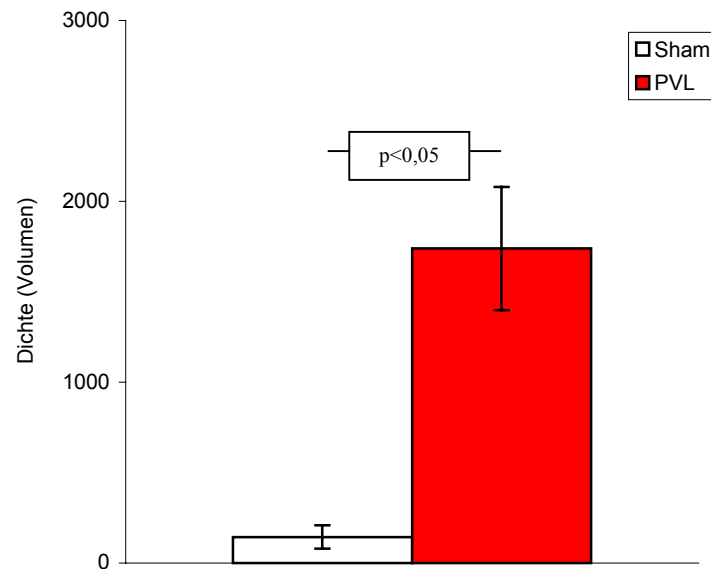


Abb. 25B: Densitometrische Auswertung der Western Blots für n/i NOS. Die Western Blots wurden densitometrisch vermessen. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. (Sham: n=6; PVL: n=7). Die p-Werte wurden mittels Mann-Whitney bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

5.1.6 Einfluss von Geldanamycin auf die nNOS-vermittelte Vasorelaxation

Aus Untersuchungen der eNOS ist bekannt, dass das *heat shock protein 90* (HSP90) ein wichtiger Aktivator dieses Enzyms ist (Abschnitt 1.4.4). Bei diesen Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass Geldanamycin die Bindung von HSP90 an die eNOS inhibiert (Shah et al., 1999). Des weiteren wurde das Zusammenspiel von HSP90 und gereinigter nNOS untersucht, und man stellte fest, dass HSP90 ein allosterischer Aktivator dieses Enzyms ist (Shah et al., 1999; Garcia-Cardena et al., 1996; Garcia-Cardena et al., 1997). Bei physiologischen Untersuchungen vermindert demnach die Substanz Geldanamycin die Aktivität der nNOS bzw. hemmt deren Aktivierung. Wie vermutet, zeigte, in den hier durchgeführten Versuchen, die Verwendung von Geldanamycin eine Hemmung der PNS-vermittelten Vasodilatation (Abb. 26A). In Analogie zu der Verwendung von L-NAME zeigte sich auch nach der Gabe von

Geldanamycin kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Sham- bzw. PVL-Tieren. Die Sham-Ratten relaxierten maximal um $12 \pm 2,6\%$ und die PVL-Ratten um $20 \pm 3,7\%$.

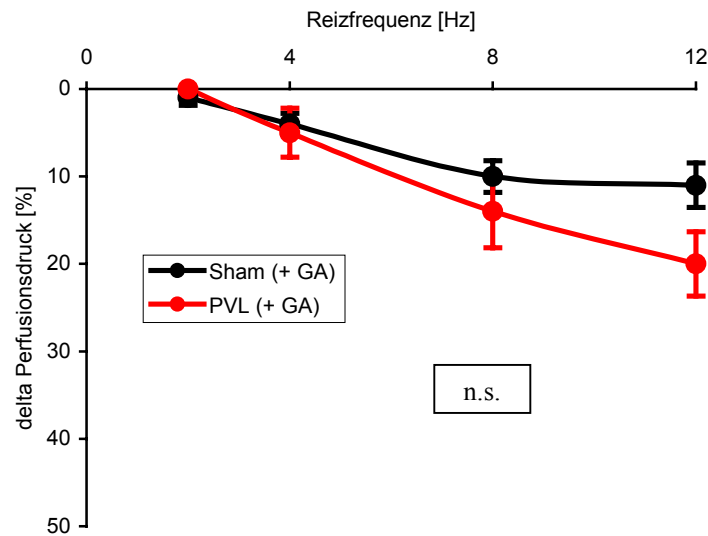


Abb. 26A

Abb. 26: Effekt von Geldanamycin auf die PNS-induzierte Vasorelaxation. In Analogie zu den Versuchen mit L-NAME wurde hier der nNOS-hemmende Effekt von Geldanamycin ausgetestet. Vor dem zweiten Perfusionszyklus wurde 15 min mit Geldanamycin perfundiert und anschließend mit NA präkonstriktiert. Anschließend wurde der PNS-vermittelte Druckabfall gemessen. (Sham: n=7; PVL: n=6) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; NA=Noradrenalin; GA=Geldanamycin

In Abbildung 26B ist der inhibierende Effekt von Geldanamycin herausgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass die PVL-Ratten im ersten Zyklus stärker dilatierten, nach Geldanamycin-Gabe im zweiten Zyklus jedoch die gleichen Effekte wie die Sham-Tiere aufwiesen, ist die Wirkung des Geldanamycins bei PVL-Ratten relativ gesehen stärker (PVL: $-24 \pm 4,2\%$ und Sham: $-15 \pm 3,2\%$ bei 8 Hz) (n.s.). Diese Daten sind aufgrund der geringen Versuchszahl noch nicht signifikant, zeigen aber tendenziell die wichtige regulatorische Bedeutung des HSP90 bei der portalen Hypertension.

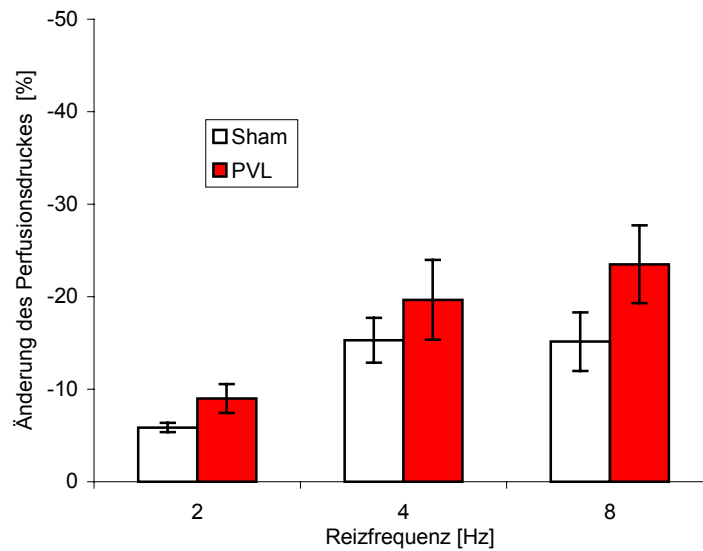


Abb. 26B: Inhibierender Effekt von Geldanamycin. Der Effekt von Geldanamycin auf die beiden Tiergruppen wurde als prozentuale Differenz zwischen dem ersten und zweiten Perfusionszyklus ermittelt. (Sham: n=7; PVL: n=6) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt. Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

5.1.7 Nachweis der HSP90/nNOS-Interaktion

Die Methode der Co-Immunpräzipitation wird dann verwendet, wenn gezeigt werden soll, dass zwei Proteine aneinander gebunden vorliegen. Dies ist auch bei HSP90 und nNOS der Fall: In den physiologischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Geldanamycin, ein Hemmstoff der HSP90/nNOS Interaktion, eine inhibitorische Wirkung auf die PNS-vermittelte Vasodilatation hatte (Abb. 26A und B). Eine Interaktion der beiden Proteine sollte im Folgenden ebenfalls auch auf Proteinebene gezeigt werden. Bei der hier durchgeführten Co-Immunpräzipitation ergab sich die Schwierigkeit, dass HSP90 ein ubiquitäres Protein ist und man deshalb kein Gewebelysat als Kontrolle einsetzen konnte, in dem HSP90 nicht vorkam. Demnach mussten die Versuche wie folgt angesetzt werden:

1. Antikörper gegen HSP90 wurde an die Sepharose gebunden + nNOS-Antikörper im Western Blot

2. Antikörper gegen nNOS wurde an die Sepharose gebunden + HSP90-Antikörper im Western Blot
3. Isotypantikörper (IgG_{2a}) wurde an die Sepharose gebunden + nNOS- oder HSP90-Antikörper im Western Blot

Mittels dieser Kombinationen konnte man davon ausgehen, dass die Banden in Höhe von 155 kDa für das nNOS- und 90 kDa für das HSP90-Protein tatsächlich eine Bindung beider Proteine aneinander bedeutete (Abb. 27). Sowohl bei der Auftragung von HSP90 als auch von nNOS waren Banden in Höhe der nNOS-Positivkontrolle (~ 155 kDa) und bei ~ 90 kDa zu erkennen. Bei Verwendung von IgG-Antikörpern wurden aufgrund fehlender Spezifität viele Proteine an diesen Antikörper gebunden. Somit ist es verständlich, dass nach der Auftragung dieses Versuchsansatzes keine klaren Banden zu erkennen waren. Bei ~ 60 kDa zeigten sich in jedem Ansatz dickere Banden an gebundenem Protein. Es handelte sich hierbei um die *heavy-chain* der verwendeten Antikörper. Die *light-chain* lag noch weiter unterhalb bei ~ 30 kDa. Sie ist hier jedoch nicht mehr abgebildet.

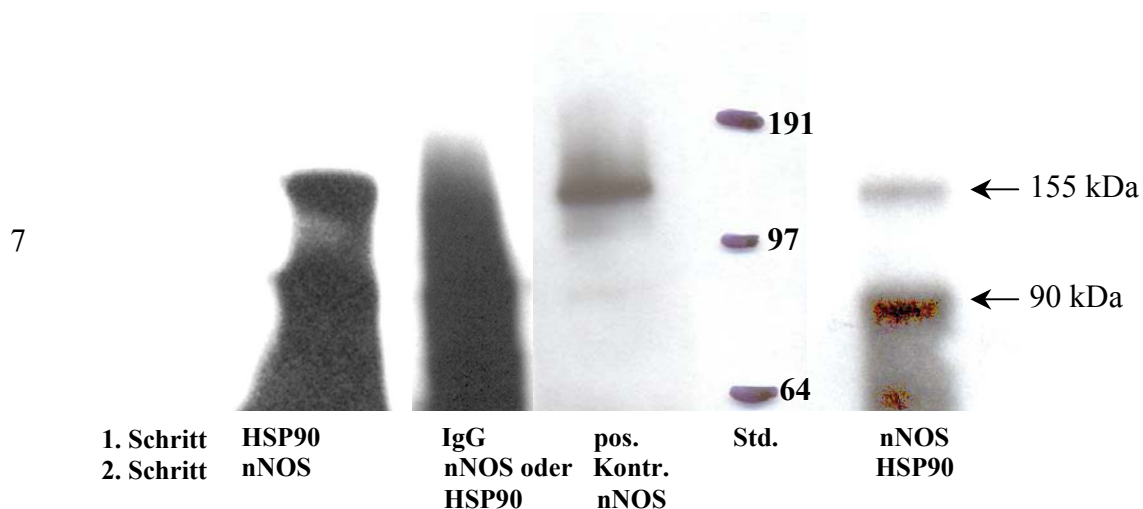


Abb. 27: Co-Immünpräzipitation von HSP90 und nNOS. Bei der Co-Immünpräzipitation wurde die Interaktion von nNOS und HSP90 nachgewiesen. Dazu wurde ein Antikörper an die G-Sepharose gebunden, wohingegen der zweite Antikörper im Western Blot benutzt wurde. Als Kontrolle diente ein IgG-Antikörper und eine nNOS-Positivkontrolle (Hypophysenlysat aus der Ratte).

Beschriftung: HSP90=der Antikörper gegen HSP90 wurde im ersten Schritt an die Sepharose gebunden, und im zweiten Schritt wurde der nNOS-Antikörper für den Blot verwendet; nNOS=der nNOS Antikörper wurde zunächst an die Sepharose gebunden, und dann der HSP90-Antikörper im Blot eingesetzt; pos.Kontr.=als positive Kontrolle wurde, wie beim Western Blot Hypophysenlysat aus der Ratte verwendet; IgG=ein IgG_{2a}-Antikörper wurde an die Sepharose gebunden. Im Blot wurde dann entweder ein HSP90- oder ein nNOS-Antikörper eingesetzt; Std.=Der Standard zeigt Banden im Bereich von 191 kDa, 97 kDa und 64 kDa.

Zusammenfassend kann man sagen, dass L-NAME, TRIM und TTX die Dilatation nach PNS hemmen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die nNOS vor allem in der Adventitia von mesenterialen Gefäßen lokalisiert war, und dass die Proteinmenge in PVL- gegenüber Sham-Tieren deutlich erhöht war.

Funktionell wurden diese Ergebnisse bestätigt. Die nNOS-vermittelte Vasodilatation bei den PVL-Ratten war signifikant größer als bei den Sham-Tieren.

Des Weiteren wurde durch Verwendung von Geldanamycin die Beteiligung des HSP90 an der Regulation der nNOS gezeigt. Zusätzlich konnte mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden, dass das HSP90- und nNOS-Protein aneinander gebunden vorlagen.

5.2 Die Bedeutung von Neuropeptid Y für die portale Hypertension

In den folgenden Experimenten wurden ausschließlich die vaskulären Effekte des NPY untersucht. An den Gefäßen wird das Protein aus den Nervenendigungen, zusammen mit Noradrenalin ausgeschüttet, und vermittelt seine Effekte vor allem über den postsynaptisch gelegenen Y1-Rezeptor. Die Synthese findet in den Somata der Nervenzellen statt, woraufhin das NPY mittels vesikulärem Transport zu den Endigungen befördert wird.

Positive NPY-Fasern wurden bisher im mesenterialen Gefäßbett ausschließlich in der Adventitia der Gefäße, nicht aber in der Media oder Intima, gefunden. Da bisher noch nicht der Effekt von NPY auf die Gefäßregulation bei PVL-Tieren bekannt ist, sollte dies genauer untersucht werden.

5.2.1 Körper- und Milzgewicht der verwendeten Tiere

Das Körpergewicht der beiden Tiergruppen unterschied sich nicht signifikant voneinander (Sham: $349 \pm 8,9$ g, PVL: $345 \pm 7,9$ g). Die PVL-Ratten zeigten jedoch im Vergleich zu den Sham-Ratten ein signifikant höheres Milzgewicht, bezogen auf das Gesamtkörpergewicht (Sham: $2,44 \pm 0,23$ g/ kg Körpergewicht; PVL: $3,90 \pm 0,24$ g/ kg Körpergewicht; $p < 0,001$).

Auch der Perfusionsdruck, ohne inhibierende oder konstriktierende Substanzen, unterschied sich ebenfalls signifikant ($p < 0,001$) zwischen den Sham- ($10,2 \pm 0,7$ mmHg) und PVL- Ratten ($6,7 \pm 0,7$ mmHg). Die Entfernung des Endothels erhöhte den Perfusionsdruck, sowohl bei PVL- als auch bei den Kontrolltieren (Sham: $14,5 \pm 1,1$ mmHg; PVL: $13,4 \pm 0,8$ mmHg, n.s.).

5.2.2 Lokalisation der NPY-positiven Fasern im mesenterialen Gefäßbett

Neben den physiologischen Effekten sollte auch immunhistologisch die Lokalisation von NPY im mesenterialen Gefäßbett gezeigt werden. Dazu wurde mesenteriales Gefäßbett sowohl von PVL- als auch von Sham-Tieren entnommen, fixiert und dann in 5-10 μM dünne Präparate geschnitten. Die Negativkontrolle zeigte, abgesehen von wenigen unspezifischen Bindungen, keine positive Färbungen. Es zeigte sich jedoch, dass NPY bei PVL-Ratten ausschließlich in der Adventitia nicht jedoch in der Media oder Intima der Gefäße zu finden war (Abb. 28).

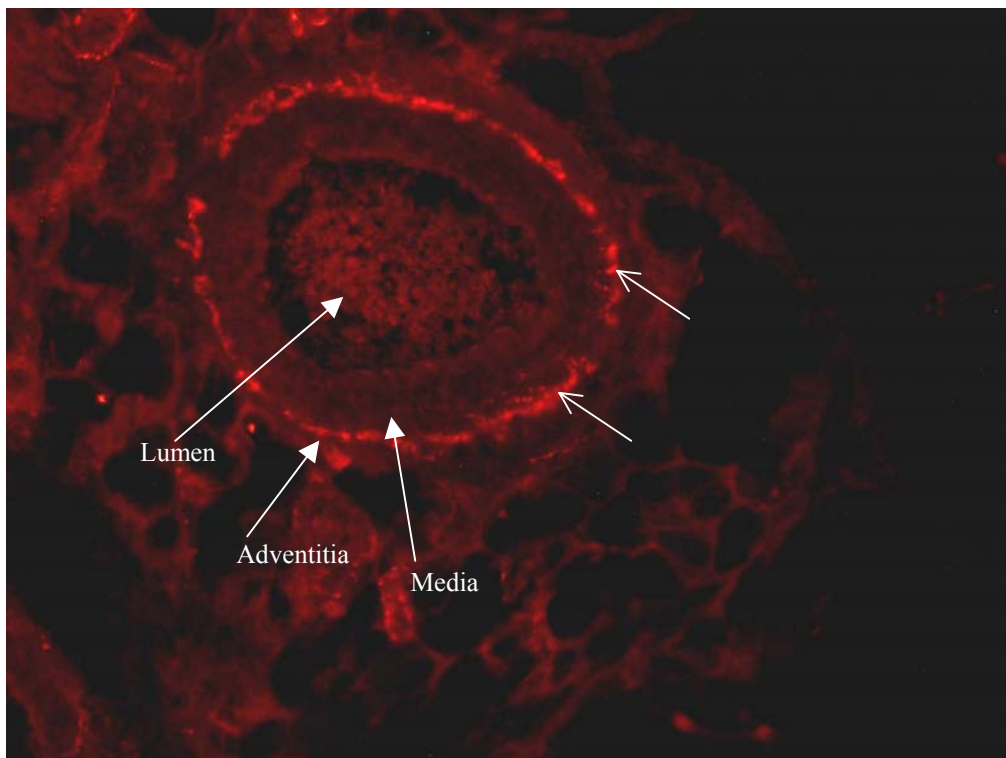


Abb. 28: NPY-positive Fasern im mesenterialen Gefäß. Nach Entnahme wurde das mesenteriale Gefäßbett in Formaldehyd und Saccharose fixiert, geschnitten und mit NPY-spezifischen Antikörpern in Kombination mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper angefärbt. Es zeigten sich ausschließlich in der Adventitia NPY-positive Nervenfasern (Pfeile). Vergrößerung: 20 x

5.2.3 Dosis-abhängige Wirkung von NPY auf die α_1 -vermittelte Vasokonstriktion

In Vorversuchen wurde demonstriert, dass NPY beim mesenterialen Gefäßbett von Ratten, im Gegensatz zu anderen Gefäßen von verschiedenen Spezies, *per se* keinen konstriktierenden Effekt hatte. Daher stellte sich die Frage, welches Konstriktionsniveau der Gefäße vorliegen muss, bevor die Gabe von NPY einen signifikant verstärkenden Effekt bewirkt. Dazu wurden im Folgenden Dosis-Wirkungskurven mit NPY bei einer Präkonstriktion mit Methoxamin (3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M und 10^{-5} M) erstellt. Das entsprach einem niedrigen, mittleren und hohen α_1 -vermittelten konstriktierenden Niveau. Dabei ist zu bemerken, dass sich die Präkonstriktionsniveaus in den verschiedenen Tiergruppen nicht signifikant unterschieden (Tab. 6).

| | niedrig | mittel | | hoch |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| MTx [μ M] | 0,3 | 1 | 3 | 10 |
| PVL [mmHg] | 16,3 \pm 0,9 | 32,0 \pm 1,4 | 54,1 \pm 6,9 | 86,3 \pm 4,4 |
| Sham [mmHg] | 18,3 \pm 5,0 | 45,0 \pm 9,8 | 63,6 \pm 10,7 | 111,3 \pm 10,2 |

Tabelle 6: Aufgelistet sind die Präkonstriktionsniveaus von Sham- bzw. PVL-Ratten. Sie unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Nach Erreichen eines stabilen Präkonstriktionsniveaus, wurden NPY-Konzentrationen von 10^{-10} M bis 10^{-5} M verwendet, wobei das NPY in Boli von 0,1 ml intravasal gegeben wurde (Abb. 29). Zwischen den Methoxaminkonzentration, 0,3 μ M und 1 μ M, ergab sich ein signifikanter Unterschied (Abb. 29A). Eine Methoxaminkonzentration von 3 μ M zeigte eine gesteigerte Vasokonstriktion (Abb. 29B). Bei den bisher verwendeten Konzentrationen konnte zwischen PVL- und Sham-Tieren kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Erst bei der höchsten Methoxamin-Konzentration von 10 μ M ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abb. 29C).

Beim Vergleich aller drei Versuchsergebnisse zeigte sich ferner, dass bei einer Präkonstriktion mit hohen Methoxaminkonzentrationen die NPY-Dosis deutlich geringer sein musste, um erste potenzierende Effekte zu sehen. Während bei 0,3 μ M und 1 μ M Methoxamin eine Dosis von 10^{-6} M NPY benötigt wurde, brauchte man bei 10 μ M Methoxamin nur noch 10^{-8} M NPY, um einen additiven Effekt zu erzielen.

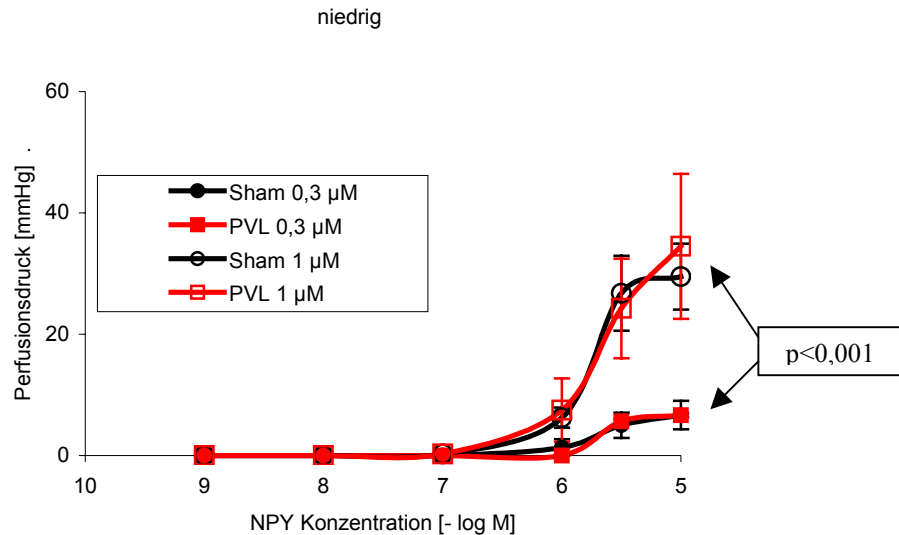


Abb. 29A: Dosis-Wirkungskurven von NPY bei präkonstriktiertem, deendothelisiertem mesenterialen Gefäßbett. Bei den Methoxaminkonzentrationen von: 0,3 µM und 1 µM wurde eine Dosis-Wirkungskurve für NPY aufgenommen. Dazu wurde, nach Vorinkubation des mesenterialen Gefäßbettes mit Methoxamin, NPY in Boli von 0,1 ml intravasal gegeben. (Sham: n=3; PVL: n=3) Die Daten werden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die p-Werte wurden mittels ANOVA bestimmt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

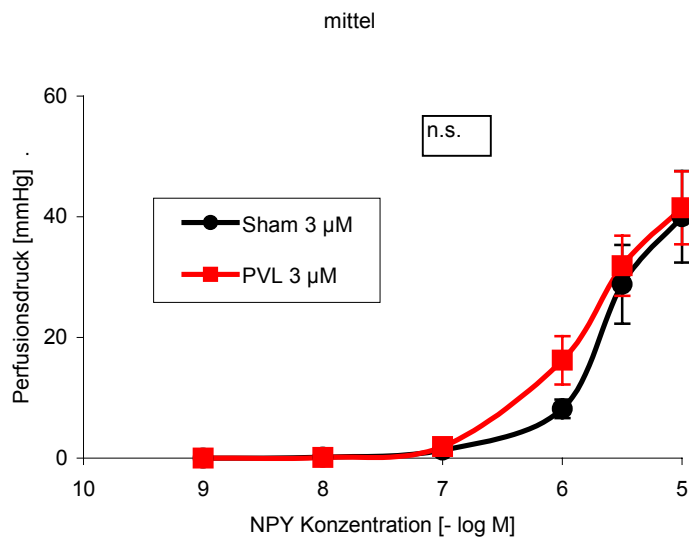


Abb. 29B: Effekt von NPY auf ein präkonstriktiertes, deendothelisiertes mesenteriales Gefäßbett. Mit dem Methoxamin (3 µM) wurde das mesenteriale Gefäßbett präkonstriktiert. NPY wurde in Boli von 0,1 mL intravasal gegeben und der Druck wurde am Computer aufgezeichnet. (Sham: n=3; PVL: n=3) Die Daten werden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

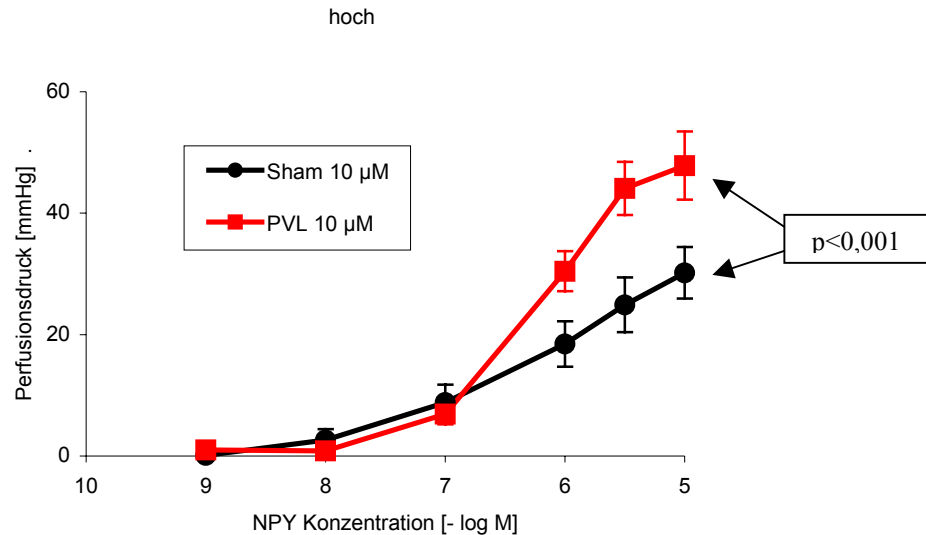


Abb. 29C: Dosis-Wirkungskurven von NPY bei einem präkonstriktierten, deendothelisierten mesenterialen Gefäßbett. Die hier verwendete Methoxamin Konzentration betrug: 10 µM. NPY wurde intravasal in Boli von 0,1 ml appliziert. Sham: n=3; PVL: n=3) Die Daten werden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

5.2.4 NPY-Effekt auf die α_1 -vermittelte Vasokonstriktion

PVL-Ratten zeichnen sich neben einer Dilatation im Splanchnikusgebiet auch durch eine Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren (wie z. B. Methoxamin) aus. In diesen Versuchen sollte der Effekt von NPY auf diese Hyporeaktivität bei PVL-Ratten untersucht werden. Dazu wurde eine Dosis-Wirkungskurve für Methoxamin (3×10^{-7} M bis 3×10^{-4} M) erstellt. In dem ersten Versuchsabschnitt (Abb. 30A) wurde die Dosis-Wirkungskurve ohne NPY, im zweiten Versuchsabschnitt (Abb. 30B) mit NPY (5×10^{-8} M) dargestellt.

Während man in den Versuchen ohne NPY einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Tiergruppen von ~ 75 mmHg nachweisen konnte (Abb. 30A) ($p < 0,001$), wurde im zweiten Perfusionszyklus gezeigt, dass NPY in der verabreichten Konzentration die unterschiedlichen Perfusionsdrücke der beiden Versuchsgruppen egalisierte (Abb. 30B) (n.s.). Die für PVL-Tiere charakteristische Hyporeaktivität wurde aufgehoben, so dass nach der Inkubation mit NPY zwischen PVL- und Sham-Ratten kein signifikanter Unterschied mehr bestand.

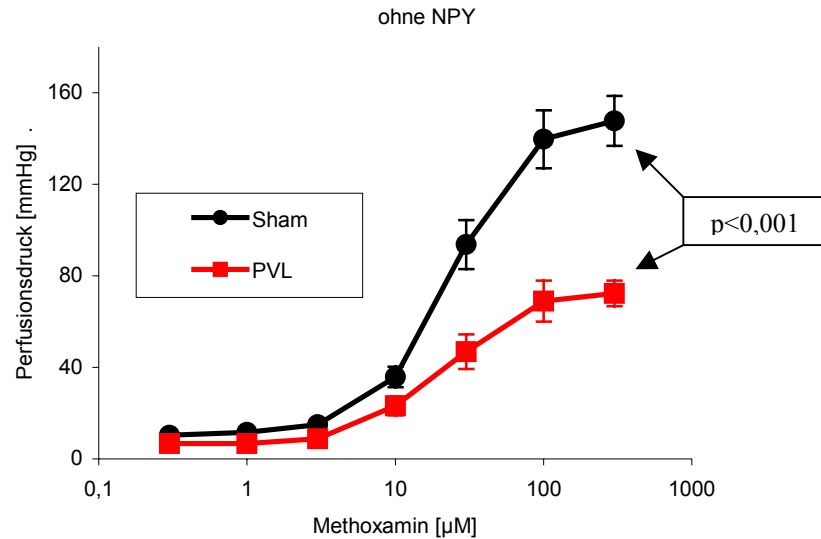


Abb. 30A: Dosis-Wirkungskurve von Sham- und PVL-Tieren mittels Methoxamin ohne NPY. Nach Deendothelisierung wurde das mesenteriale Gefäßbett non-kumulativ mit Methoxamin (3×10^{-7} M bis 3×10^{-4} M) konstriktiert. Es war kein NPY anwesend. (Sham: n=6; PVL: n=6) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

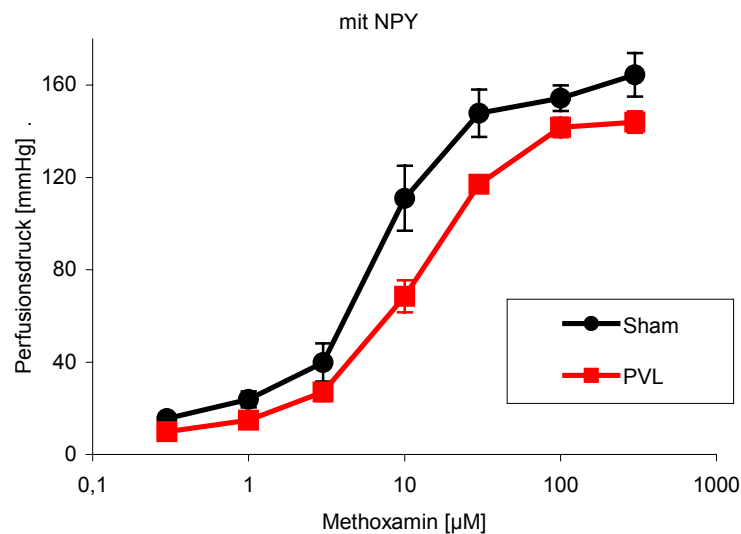


Abb. 30B: Effekt von NPY auf die Hyporeaktivität des mesenterialen Gefäßbettes von Sham- und PVL-Ratten. Es wurde eine Dosis-Wirkungskurve für Methoxamin aufgenommen. Dabei wurde jedoch 10 min mit NPY (5×10^{-8} M) vorinkubiert. (Sham: n=6; PVL: n=6) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

In Abbildung 31A und B sind die Effekte von NPY noch einmal bei PVL- bzw. Sham-Tieren getrennt aufgezeigt. Bei den PVL-Tieren (Abb. 31A) ist sowohl eine Links-Verschiebung der Kurve, als auch eine Erhöhung der maximalen Kontraktion unter NPY-Einfluss gemessen worden. Der Perfusionsdruck bei einer Methoxamin-Konzentration von 300 μM wird um 59 mmHg erhöht; das bedeutet eine verstärkte Vasokonstriktion um den Faktor 2,2 .

Dahingegen zeigte sich bei den Sham-Tieren ausschließlich eine Links-Verschiebung der Kurve, nicht jedoch eine Erhöhung der maximalen Kontraktilität (Abb. 31B).

Die für beide Gruppen gezeigte Links-Verschiebung lässt sich am besten bei der Betrachtung der EC_{50} -Werte beurteilen. Sie betragen:

- 1) Sham: $7,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$ (mit NPY) vs. $25,3 \pm 1,8 \mu\text{M}$ (ohne NPY) ($p < 0,05$)
- 2) PVL: $11,3 \pm 1,9 \mu\text{M}$ (mit NPY) vs. $24,2 \pm 4,5 \mu\text{M}$ (ohne NPY) ($p < 0,05$)

Diese Daten zeigen, dass durch die Perfusion mit NPY bei beiden Tiergruppen die Sensitivität des Gefäßbettes gegenüber Methoxamin erhöht wurde, jedoch nur bei den PVL-Ratten eine Steigerung der maximalen Kontraktilität zu verzeichnen war.

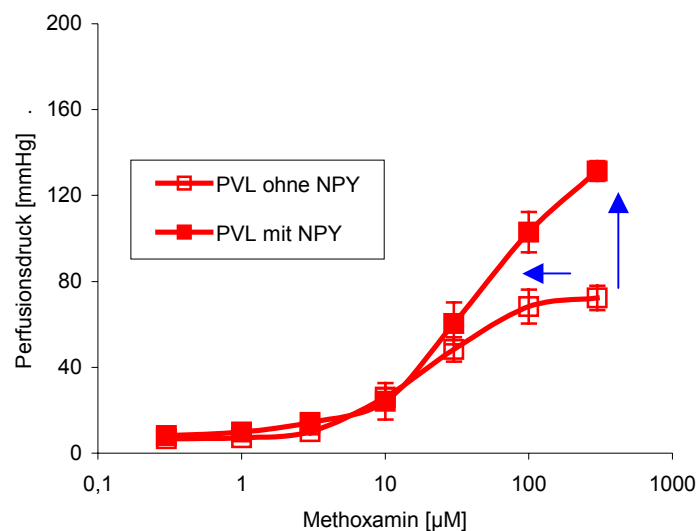


Abb. 31A: Einfluss von NPY auf die α_1 -adrenerg vermittelte Vasokonstriktion. Dargestellt ist die Methoxamin-Dosis-Wirkungskurve für PVL-Tiere und der NPY-Einfluss auf diese α_1 -adrenerg vermittelte Konstriktion. (Sham: $n=3$; PVL: $n=3$) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; NPY=Neuropeptid Y

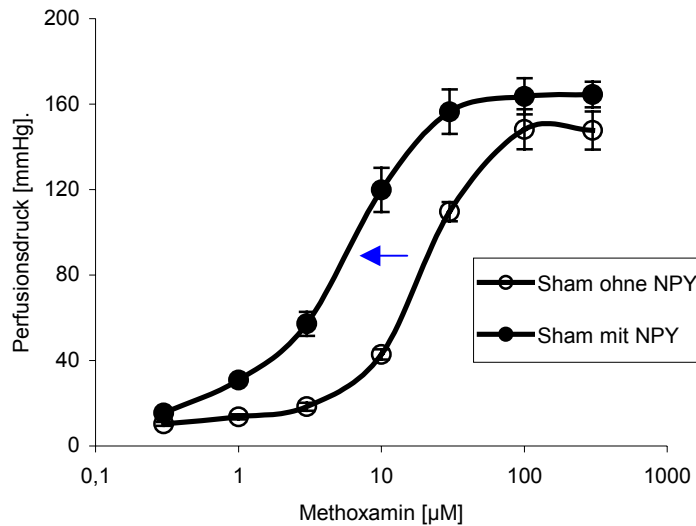


Abb. 31B: Methoxamin-Dosis-Wirkungskurve und der NPY-Effekt bei Sham-Tieren. Es wurden die gleichen Dosen wie bei den PVL-Ratten auch für die Sham-Tiere verwendet. (Sham: n=6; PVL: n=6) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt. Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; NPY= Neuropeptid Y

Abschließend wurde noch die NPY-induzierten Änderungen der Kontraktilität gezeigt (Abb. 32). Vor allem bei den PVL-Tieren bei einer Methoxamin-Konzentration von $>10 \mu\text{M}$ war die Änderung des Perfusionsdruckes zwischen der Perfusion mit und ohne NPY signifikant größer im Vergleich zu den Sham-Ratten. Dargestellt ist dieser Sachverhalt zum einen als Änderung in mmHg (Abb. 32A) und zum anderen als prozentuale Änderung (Abb. 32B).

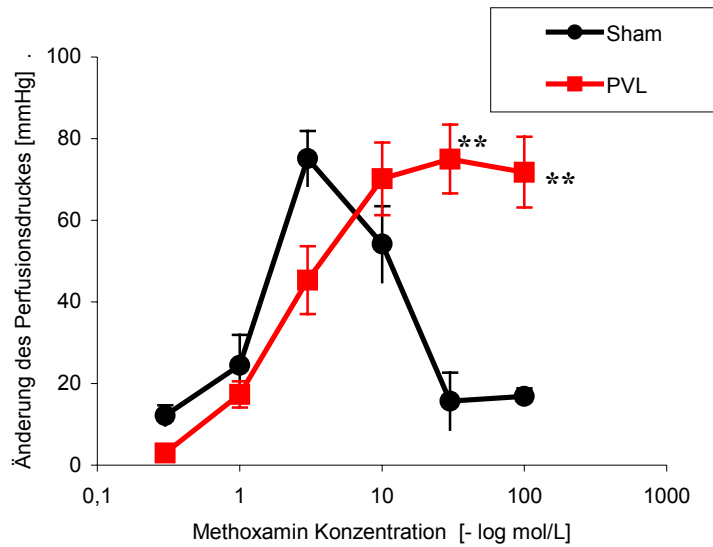


Abb. 32A: Änderung des Perfusionsdruckes vor und nach NPY-Gabe. Dargestellt ist die Änderung des Perfusionsdruckes in mmHg aus dem ersten Zyklus (Dosis-Wirkungskurve nur mit Methoxamin) im Vergleich zum zweiten Zyklus (nach Gabe von NPY). Signifikanz (nach Mann-Whitney): **= $p < 0,01$ (Sham gegen PVL bei 30 und 100 μM Methoxamin) (Sham: $n=6$; PVL: $n=6$) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

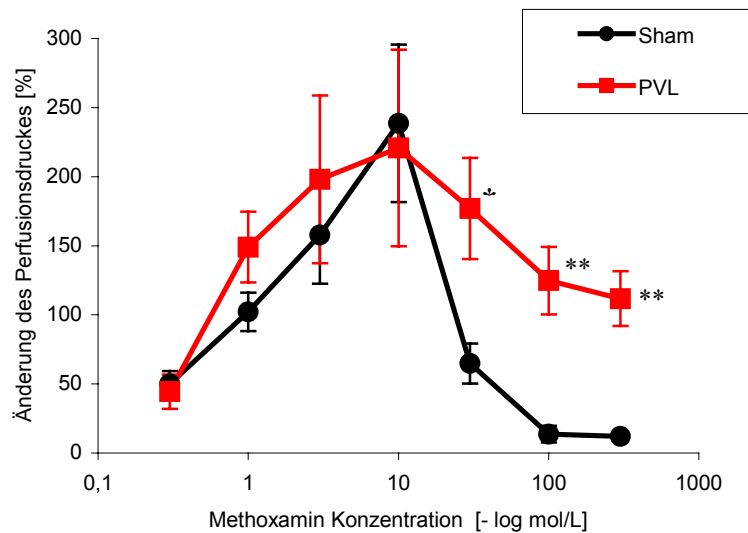


Abb. 32B: Prozentuale Darstellung der Änderung des Perfusionsdruckes vor und nach NPY Gabe. Dargestellt ist die prozentuale Änderung des Perfusionsdruckes aus dem ersten Zyklus (Dosis-Wirkungskurve nur mit Methoxamin) im Vergleich zum zweiten Zyklus (bei Präinkubation mit NPY).

Signifikanz (nach Mann-Whitney): *= $p < 0,01$ (Sham gegen PVL bei 30 μM Methoxamin) **= $p < 0,001$ (Sham gegen PVL bei 100 und 300 μM Methoxamin) (Sham: $n=6$; PVL: $n=6$) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

5.2.5 Einfluss von NPY auf die nNOS-vermittelte Vasorelaxation

Da NPY die α_1 -adrenerg vermittelte Vasokonstriktion verstärkte, stellte sich die Frage, ob dieses Neuropeptid zudem auch den dilatierenden Effekt hemmen kann. Um die Auswirkung einer NPY-Gabe auf die PNS-induzierte Vasorelaxation am mesenterialen Gefäßbett zu testen, wurde das gleiche Setup wie oben beschrieben verwendet: Im ersten Zyklus der Perfusion eines deendothelisierten mesenterialen Gefäßbettes wurde nach Präkonstriktion mit 8 μM Noradrenalin (NA) ausschließlich die PNS vermittelte Dilatation gemessen. Vor dem zweiten Zyklus wurde zunächst für 15 min mit 10^{-8} M NPY perfundiert, bevor sich eine erneute Präkonstriktion durch NA und PNS anschloss. In Abbildung 33 ist die Auswertung dieser Versuche dargestellt. Während im ersten Zyklus die Hyporeaktivität der PVL-Tiere gegenüber Vasokonstriktoren dargestellt wurde (Abb. 23A und B), zeigte sich nach der Zugabe von NPY, dass es, ähnlich wie bei der Verwendung von L-NAME und Geldanamycin, zwischen den beiden Tiergruppen keinen signifikanten Unterschied mehr gab (Abb. 33A). Wie man aus den Grafiken erkennen kann, war der dilatierende Effekt bei Stimulation mit niedrigen Reizfrequenzen durch Zugabe von NPY nahezu komplett aufgehoben. Bei höheren Frequenzen jedoch stellte sich eine geringe, aber dennoch deutliche, Dilatation ein.

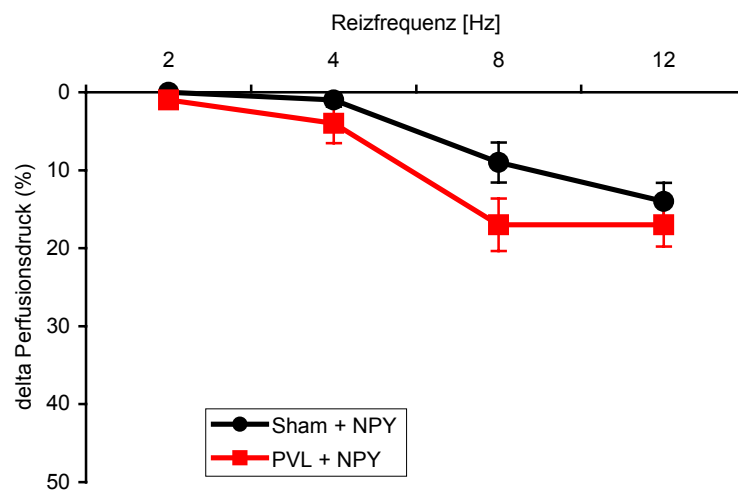


Abb. 33A: Hemmung der PNS-vermittelten Vasodilatation durch Inkubation mit NPY. Der Effekt des NPY auf die PNS-vermittelte Vasorelaxation wurde an deendothelisiertem mesenterialem Gefäßbett untersucht. Dazu wurde es mit einer Vorlaufzeit von zehn Minuten in vor dem zweiten Zyklus in die Perfusionslösung gegeben. (Sham: n=9; PVL: n=8) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere; NPY= Neuropeptid Y

In den Abbildungen 33B und C sind die Änderungen des Perfusionsdruckes in mmHg bzw. Prozent vor und nach der Zugabe von NPY angegeben. So wird der hemmende Effekt von NPY verdeutlicht. Die PVL-Tiere zeigten im Vergleich zu den Sham-Ratten eine stärkere Relaxation vor der NPY-Zugabe und eine gleich starke Relaxation nach NPY-Zugabe. Aufgrund dessen war die Änderung des Perfusionsdruckes bei PVL-Ratten signifikant größer als die bei Sham-Ratten (in Prozent).

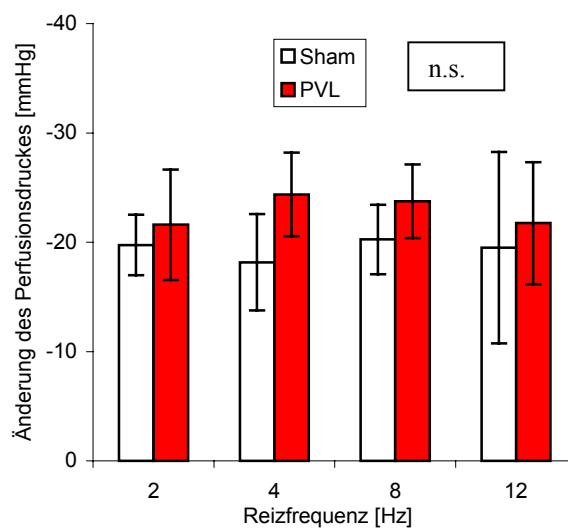


Abb. 33B: Änderung des Perfusionsdruckes in mmHg. Vor dem zweiten Perfusionszyklus wurde das NPY in die Krebs-Henseleit-Lösung gegeben, um den Effekt des Neuropeptids auf die PNS-induzierte Vasorelaxation zu untersuchen. (Sham: n=9; PVL: n=8) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

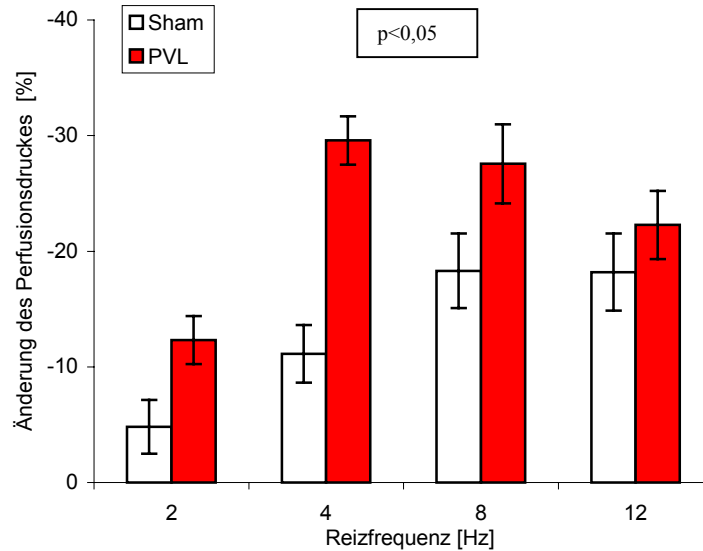


Abb 33C: Prozentuale Änderung des Perfusionsdruckes vor und nach der Zugabe von NPY. Vor dem zweiten Perfusionszyklus wurde NPY mit einer Vorlaufzeit von zehn Minuten in die Krebs-Henseleit-Lösung gegeben. Im Anschluss daran folgte eine erneute Messung der PNS-induzierten Relaxation des deendothelisierten mesenterialen Gefäßbettes. (Sham: n=9; PVL: n=8) Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt.

Abkürzungen: Sham=kontrolloperierte Tiere; PVL=portalvenös ligierte Tiere

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass

1. NPY *per se* keinen konstriktierenden Effekt auf das mesenteriale Gefäßbett von Ratten hatte.
2. nach NPY-Gabe die Reaktion des Gefäßbettes auf α_1 -adrenerge Vasokonstriktoren in beiden Tiergruppen gleich gut war.
3. unter Einfluss von NPY die Gefäße von PVL-Tieren eine erhöhte Sensitivität und Kontraktilität aufwiesen, wohingegen die Gefäße von Sham-Ratten ausschließlich sensitiver gegenüber Vasokonstriktoren wurden.
4. NPY, ähnlich wie L-NAME und Geldanamycin, die PNS-vermittelte Vasorelaxation sowohl bei PVL- als auch bei Sham-Ratten hemmte.

6. Diskussion

Die hämodynamische Dysregulation, welche im Rahmen des portalen Hochdruckes zur Entwicklung und Aggravation des hyperdynamen Zirkulationssyndroms (HZS) führt, basiert auf einer Dysbalance der Wirkung vasokonstriktiver und vasodilatativer Mediatoren. So findet sich eine Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren (Noradrenalin, Arginin-Vasopressin, Angiotensin, Endothelin, Methoxamin) (Sieber et al., 1993; Sieber et al., 1997; Hartleb et al., 1994; Kiel et al., 1985; Groszmann and Francis, 1999) und eine verstärkte Vasodilatation *per se* als auch in Reaktion auf verschiedene vasodilatierende Stimuli (Benoit and Granger, 1986; Bernardi and Trevisani, 1997).

Die verminderte Wirkung der vasokonstriktiven Substanzen ist weder von der Rezeptorklasse noch von der Affinität oder Dichte der Rezeptoren abhängig. Außerdem zeigen die rezeptorunabhängigen vasokonstriktiven Substanzen beim HZS nur eine geringe Wirkung. Zur letzteren Gruppe gehört z. B. Kaliumchlorid. Auch die periphere Nervenstimulation führt zur Konstriktion der Gefäße. In bisherigen Studien wurden weitestgehend NOS-unspezifische Inhibitoren (z. B. L-Arginin Analoga) verwendet. Sie hemmen die endogene NO-Freisetzung. Dabei wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

- 1) Die beim HZS typische verminderte Gefäßreaktivität gegenüber Vasokonstriktoren konnte verbessert werden (Sieber et al., 1993; Sieber et al., 1997; Sieber and Groszmann, 1992; Campillo et al., 1995).
- 2) Die beim HZS veränderte Splanchnikushämodynamik wurde durch Verwendung von NOS-unspezifischen Inhibitoren vollständig wiederhergestellt. (Pizcueta et al., 1992a; Pizcueta et al., 1992b).
- 3) Die Natriuresis und damit verbunden auch ein Anstieg des Urinvolumens konnte induziert werden. (Atucha et al., 1994; Claria et al., 1992; Martin et al., 1998).
- 4) Generell konnte die beim HZS auftretende Dilatation in den peripheren arteriellen Gefäßen korrigiert werden. Dadurch konnte das Auftreten eines HZS verhindert werden. (Pizcueta et al., 1992a; Pizcueta et al., 1992b; Niederberger et al., 1996; Lee et al., 1993; Garcia-Pagan et al., 1994).

In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass durch die Entfernung des Endothels die vaskuläre Reaktivität gesteigert werden konnte, was auf eine wesentliche Beteiligung der eNOS bei der Entstehung des HZS hinwies. Ferner wurde hinsichtlich der eNOS sowohl eine gesteigerte Protein-Expression (Martin et al., 1996; Niederberger et al., 1996; Martin et al., 1998), eine erhöhte Aktivität des Enzyms (Cahill et al., 1996) (Cahill et al., 1995), als auch

eine funktionell gesteigerte NO-Freisetzung, induziert durch Fluss- und Scherkräfte (Hori et al., 1998), gemessen.

In Bezug auf die iNOS fand man, trotz der bei Leberzirrhose häufig auftretenden Endotoxämie (Lin et al., 1995; Lumsden et al., 1988), keine überzeugende Expression des Proteins (Cahill et al., 1995; Niederberger et al., 1996; Martin et al., 1996; Morales-Ruiz et al., 1996). Des Weiteren ließ sich durch die Verwendung von iNOS-Inhibitoren das Auftreten einer hyperdynamen Zirkulation nicht verhindern (Heinemann and Stauber, 1995; Fernandez et al., 1995). Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass durch bisherige Untersuchungen hinsichtlich der beteiligten NOS-Isoenzyme lediglich die Rollen der eNOS und iNOS nicht jedoch der nNOS geklärt worden sind.

Um die hämodynamische Dysregulation zu kompensieren, kommt es zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Dies wurde anhand von erhöhten Noradrenalin-Plasmaspiegeln (Henriksen et al., 1984), einer erhöhten Noradrenalin-Freisetzung an den Nervenendigungen (Nicholls KM, 1985) und einer erhöhten sympathischen Aktivität am Muskel (Floras et al., 1991; Pozzi et al., 2001) nachgewiesen. Dennoch kommt es bei Fortbestehen der Lebererkrankung und der damit verbundenen hohen Konzentration an endogenen Katecholaminen zu einer persistierenden arteriellen Hypotension. Dies konnte auch nicht durch die exogene Gabe von Katecholaminen beeinflusst werden (Henriksen et al., 1984).

Die Mediatoren des sympathischen Nervensystems vermitteln ihre vasokonstriktiven Effekte hauptsächlich über die α 1-Rezeptoren (Piascik et al., 1996). Sowohl beim mesenterialen Gefäßbett des Menschen, als auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Versuchen, wurde vor allem Noradrenalin sezerniert (Toernebrandt et al., 1985; Piascik et al., 1996).

Ein Co-Transmitter des sympathischen Nervensystems, das Neuropeptid Y, wirkt auch in niedrigen Konzentrationen und ist entscheidend an der neuronalen Gefäßregulation beteiligt. Dabei macht es keinen Unterschied, ob das Gefäßbett neuronal stimuliert, oder ob die Konstriktion mittels einer exogenen Gabe von Noradrenalin induziert wird (Linder et al., 1996). Es kommt jedes Mal zu einer Potenzierung der vasokonstriktiven Effekte.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Perfusionsexperimente zur Klärung der Rolle von nNOS und NPY in Bezug auf die Pathophysiologie der portalen Hypertension wurde das mesenteriale Gefäßbett verwendet. Durch Untersuchungen hinsichtlich der sequentiellen Veränderung hämodynamischer Parameter stellte sich am Modell der PVL-Ratte heraus, dass

sich zuerst der splanchnische Gefäßwiderstand und sich dann erst die systemischen Parameter ändern (Vorobioff et al., 1983). In einer weiteren Arbeit wurde der zeitliche Zusammenhang zwischen der Änderung des Plasmavolumens, des Herzindex, des mittleren arteriellen Druckes und des Druckes im mesenterialen Gefäßbett untersucht. Nach portal venöser Ligatur zeigte sich bereits nach zwei bis vier Tagen eine periphere arterielle Vasodilatation und eine splanchnische Hypotonie, wohingegen eine Expansion des Plasmavolumens und eine konsekutive Steigerung des Herzminutenvolumens und des Herzindex erst zeitlich später auftraten (Vorobioff et al., 1983; Colombato et al., 1992).

Die folgenden Argumente sprechen für die Perfusion des mesenterialen Gefäßbettes zur Untersuchung der nNOS- und NPY-vermittelten Effekte im Rahmen der portalen Hypertension:

- 1) Veränderungen in der Gefäßregulation zeigen sich im splanchnischen Gefäßbett sehr früh.
- 2) Im mesenterialen Gefäßbett ist die hämodynamische Dysregulation, welche die portale Hypertension charakterisiert, besonders ausgeprägt.
- 3) Die splanchnische Vasodilatation stellt einen eigenständigen pathophysiologischen Faktor hinsichtlich der portalen Hypertension da.

6.1 Die neuronale NO-Synthase

6.1.1 Die Rolle der nNOS bei portaler Hypertension

In den ersten Versuchen wurde herausgestellt, dass die PVL-Tiere eine starke Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren wie den α_1 -Agonisten Methoxamin zeigten. Für diese verminderte Konstriktion wurde in der Vergangenheit vor allem die eNOS verantwortlich gemacht. Diese im Endothel lokalisierte Isoform wird im Wesentlichen durch Scherkräfte und Hormone (Histamin, Bradykinin, Serotonin) aktiviert. Wäre die Hyporeaktivität ausschließlich eNOS-vermittelt, so hätte der dilatierende Effekt durch Deendothelisierung vollständig inhibiert sein müssen. Es zeigte sich allerdings nach der Deendothelisierung eine weiterhin schwächere Vasokonstriktion der PVL-Ratten im Vergleich zu den kontrolloperierten Tieren. Dieser Effekt war besonders deutlich bei submaximaler adrenerger Stimulation zu sehen. Somit lag die Vermutung nahe, dass noch eine weitere NOS-Isoform NO im mesenterialen Gefäßbett freisetzt. Und dies muss ebenso, wie bei der eNOS, durch die portale Hypertension vermehrt der Fall sein. Die iNOS spielt, wie bereits in Vorarbeiten aber auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, keine Rolle bei dem pathophysiologischen Bild der portalen Hypertension (Gyoda et al., 1995).

In den folgenden Experimenten wurde die Rolle und Bedeutung der nNOS und deren Regulation bei der portalen Hypertension näher charakterisiert. Dazu wurden nicht nur physiologische Experimente sondern auch die Immunhistochemie, der Western Blot und die Co-Immunpräzipitation verwendet.

6.1.2 *In vitro* Perfusion des mesenterialen Gefäßbettes

Vor einigen Jahren zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass es nach periarterieller Nervenstimulation des mesenterialen Gefäßbettes zu einer Vasodilatation kam, die über die NANC-Neurone vermittelt wurde (Moll-Kaufmann et al., 1998; Toda and Okamura, 1990; Toda and Okamura, 1992). Außerdem waren unter gleichem Gesichtspunkt die zerebralen-, lingualen-, retinalen-, uterinen-, femoralen-, nasalen- und Penis-Arterien Mittelpunkt von Studien (Iadecola et al., 1993; Linder et al., 1996; Okamura et al., 1995; Toda and Okamura, 1991; Toda et al., 1997). Bisher noch nicht geklärt wurde die Rolle der nNOS bezüglich der peripheren arteriellen Vasodilatation im Rahmen des portalen Hochdruckes. Da die NANC-Neurone den nitrogenen Effekt vermitteln, wurde das Gefäßbett nach Deendothelisierung und submaximaler Präkonstriktion elektrisch stimuliert, um die Bildung von NO durch die nNOS zu induzieren. Die nachfolgende Dilatation wurde anhand des abfallenden Perfusionsdruckes gemessen.

In den hier beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die PNS-induzierte Vasodilatation bei PVL-Tieren im Vergleich zu Sham-Ratten signifikant stärker ausgeprägt war. Bei dieser gesteigerten Vasodilatation konnte man aufgrund folgender Ergebnisse davon ausgehen, dass der Effekt ausschließlich durch die NANC-Neurone und damit auch über die Aktivierung der nNOS vermittelt wurde:

- 1) Der Nachweis, dass dieser Effekt nur aufgrund der elektrischen Stimulation erfolgte, wurde durch die Verwendung von TTX angetreten. In Anwesenheit dieses Neurotoxins wurde die PNS-stimulierte Vasorelaxation komplett inhibiert.
- 2) Nach Inkubation mit L-NAME war die PNS-induzierte Vasorelaxation in beiden Versuchsgruppen signifikant vermindert. Dieser Effekt spiegelt die nNOS-vermittelte Komponente der neuronalen Vasorelaxation wider. Ferner bestand hinsichtlich der PNS-induzierten Vasodilatation kein Unterschied mehr zwischen den beiden Tiergruppen. Daher ist anzunehmen, dass die verstärkte PNS-bedingte Vasorelaxation in PVL-Tieren auf eine vermehrte nNOS-vermittelte Komponente zurückzuführen ist.

- 3) Letzteres konnte auch durch den nNOS-spezifischen Hemmstoff TRIM gezeigt werden. In Anwesenheit von TRIM zeigte sich (wie auch in den Versuchen mit L-NAME) eine in Ausprägung und Frequenzabhängigkeit gleiche PNS-vermittelte Vasorelaxation in beiden Versuchstiergruppen.
- 4) Das Fehlen einer signifikanten iNOS-vermittelten NO-Synthese in PVL-Tieren spiegelte sich in dem fehlenden Effekt des unspezifischen NO-Inhibitors L-NAME auf den basalen Perfusionsdruck wider. Wäre eine iNOS-Proteinexpression in PVL-Tieren vorhanden, müsste nämlich dieser NOS-Blocker eine Erhöhung des Gefäßtonus induzieren.
- 5) Es wurde nur deendothelisiertes Gefäßbett verwendet, um den möglichen Einfluss durch die eNOS zu verhindern. Die Deendothelisierung selbst wurde durch Verwendung von Acetylcholin (ACh) überprüft. Dieser endothelabhängige Vasodilatator würde bei Resten von intaktem Endothel zu einem Abfall des Gefäßdruckes führen. Auch eine durch die Präparation angegriffene Gefäßmuskulatur, was eine verstärkte Dilatation zur Folge haben könnte, wurde durch die Gabe von Natriumnitroprussid (SNP) ausgeschlossen.

Abschließend kann man sagen, dass in PVL-Tieren eine gegenüber Sham-Tieren signifikant gesteigerte nNOS-vermittelte Vasorelaxation im mesenterialen Gefäßbett zu beobachten war. Dies verdeutlichte die entscheidende Rolle der nNOS-induzierten NO-Freisetzung für die neuronal induzierte Vasorelaxation bei portaler Hypertension.

Wie man anhand der Abbildung 23B erkennen kann, wurde die Dilatation durch die Hemmung der NOS nicht vollständig eliminiert. Eine Erklärung dafür könnte die Anwesenheit von weiteren endogenen neurogenen Dilatatoren wie z. B. CGRP (*calcitonin-gene-related-peptide*) oder VIP (*vasoactive-intestinal-peptide*) sein, welche ebenfalls aus den NANC-Nerven freigesetzt werden könnten (Moll-Kaufmann et al., 1998; Ralevic, 2002; Toda and Okamura, 2003). Diese Mediatoren sind jedoch für die Unterschiede der neuronalen Gefäßregulation zwischen PVL- und Sham-Ratten anscheinend nicht von Bedeutung.

Dahingegen fand die Arbeitsgruppe um Sieber et al. auch eine geringfügig gesteigerte CGRP-vermittelte Vasorelaxation des mesenterialen Gefäßbettes in PVL-Ratten (Moll-Kaufmann et al., 1998). Dabei gilt jedoch zu berücksichtigen, dass bei den Versuchen dieser Arbeitsgruppe Gefäße mit intaktem Endothel verwendet wurden. Es ist jedoch bekannt, dass das Endothel Substanzen sezerniert, die die Freisetzung von CGRP und VIP aus den sensorischen Nerven beeinflussen können (Li et al., 1993; Ralevic, 2002). Zu dieser Substanzgruppe gehört auch

NO, das in diesem Fall von der eNOS gebildet wird. Des Weiteren ist anzumerken, dass das Präkonstriktionsniveau dieser PVL-Tiere, im Vergleich zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten, deutlich niedriger war (Sham: $49,9 \pm 7,6$ mmHg und PVL: $27,0 \pm 4,0$ mmHg). Das erschwert die Interpretation der beobachteten Effekte.

6.1.3 Lokalisation und Proteinmenge der nNOS

nNOS-positive Fasern waren in beiden Tiergruppen perivaskulär lokalisiert. Dies wurde 1995 auch schon von Beesley beobachtet (Beesley, 1995). Die Verteilung der nNOS-positiven Neurone in der Adventitia und an der Grenze von Adventitia zu Media wurde bereits in verschiedenen Tiergruppen evaluiert (Beesley, 1995; Blottner et al., 1995). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die nNOS vor allem in Gefäßen der ersten und zweiten Ordnung des mesenterialen Gefäßbettes vorkam. Weiter distal gelegene Gefäße wiesen nur wenige nNOS-positive Strukturen auf. Da für die Gefäßregulation die kapillären Abschnitte nicht von Bedeutung sind, stimmen diese Erkenntnisse mit der vermuteten wichtigen hämodynamischen Rolle der nNOS für die Gefäßregulation überein (Yoshida et al., 1993; Yoshida et al., 1994).

Erste Hinweise auf eine erhöhte nNOS-Proteinmenge bei PVL-Ratten wurden mittels immunhistochemischer APAPP-Färbung gezeigt. Bei den PVL-Tieren zeigte sich eine deutlich stärkere Rotfärbung in der Adventitia im Vergleich zu den Sham-Ratten. Um die nNOS-Proteinmenge zu quantifizieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. Es ergab sich eine um das 12-fache erhöhte nNOS-Proteinmenge bei PVL- im Vergleich zu Sham-Ratten.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei Untersuchungen im Rahmen der Schwangerschaft. Auch hier konnte eine vermehrte nNOS-Proteinmenge nachgewiesen werden (Weiner et al., 1994). Ausgelöst wird diese gesteigerte nNOS-Bildung durch Östrogene (Estradiol-17 β), welche die nNOS-Expression erhöhen (Rosenfeld et al., 2003). Interessanterweise findet sich auch während der Schwangerschaft ein verminderter systemischer Gefäßwiderstand, ähnlich wie es bei dem hyperdynamen Zirkulationssyndrom bei portaler Hypertension der Fall ist (Xu et al., 1996).

Zur Rolle der nNOS wurde Ende 2000 gezeigt, dass bei zirrhatischen Ratten die Gabe eines nNOS-spezifischen Inhibitors die Normalisierung des systemischen Gefäßwiderstandes bewirkte. Außerdem zeigten diese Autoren, dass sich der arterielle Druck und der Herzindex normalisierten (Xu et al., 2000). Diese *in vivo* Experimente unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse am mesenterialen Gefäßbette zur Rolle der nNOS bei portaler Hypertension.

6.1.4 Interaktion von HSP90 mit der nNOS

Die nNOS-Aktivität in den NANC-Neuronen wird u. a. auch durch Protein-Protein Interaktionen bestimmt. So können Calmodulin und HSP90 die Aktivität erhöhen. In Bezug auf die eNOS wurde 1999 das erste Mal die Enzym aktivierende Bedeutung des Chaperons HSP90 bei portaler Hypertension von Shah et al. demonstriert (Shah et al., 1999). Im gleichen Jahr wurde die Regulation der nNOS durch das HSP90 untersucht (Bender et al., 1999), und zwei Jahre später konnte der direkte Effekt von HSP90 auf die gereinigte nNOS nachgewiesen werden (Song et al., 2001). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass die nNOS-Aktivität nach Gabe von HSP90 auf das 3,5fache des Normalwertes (ohne HSP90) anstieg, was auf eine allosterische Aktivierung der nNOS hinwies. Eine mögliche Einflussnahme von HSP90 auf die beobachtete Erhöhung der nNOS-vermittelten NO-Synthese bei portaler Hypertension wurde jedoch bisher nicht untersucht.

In unserem Modell wurde das mesenteriale Gefäßbett von PVL- und Sham-Ratten *in vitro* perfundiert und durch Gabe von Geldanamycin die nNOS-vermittelte Vasorelaxation gehemmt. Dieser Versuchsansatz ist vergleichbar mit der Wirkung von L-NAME. Durch die Geldanamycin- bzw. L-NAME-Gabe wurde der zuvor bestehende Unterschied bezüglich der PNS-induzierten Vasorelaxation zwischen den Versuchsgruppen aufgehoben. Die Effekte von Geldanamycin bzw. L-NAME waren gleich stark ausgeprägt. Das lässt den Schluss zu, dass ein Großteil der gesteigerten nNOS-bedingten Vasodilatation durch HSP90 vermittelt wurde. Es ist zu vermuten, dass die Bindung von HSP90 an die nNOS den größten Teil der NO-Bildung induziert. Das Funktionsprinzip von Geldanamycin ist, dass es sich an das HSP90 bindet und so die Konformationsänderung des Chaperons hemmt, wodurch es nicht mehr an die nNOS binden kann (Grenert et al., 1997). Dabei ist jedoch nicht die verstärkte nNOS-Expression zu vernachlässigen, die auch ihren Teil zur vermehrten NO-Bildung beiträgt.

Um diese Ergebnisse, dass HSP90 und nNOS aneinander binden, auf Proteinebene zu untermauern wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Es konnte in Analogie zur eNOS (Shah et al., 1999) eine HSP90/nNOS-Interaktion nachgewiesen werden.

Unter Berücksichtigung aller bisher gewonnenen Daten kann man zusammenfassen, dass zum einen die nNOS-Proteinmenge in PVL-Tieren erhöht ist, und zum anderen, dass HSP90 ein wichtiger enzymatischer Regulator der nNOS darstellt, und bei der vermehrten NO-Bildung durch die nNOS in PVL-Ratten von entscheidender Bedeutung ist.

6.2 Neuropeptid Y

6.2.1 Lokalisation von NPY

Zunächst wurde die Lokalisation von NPY in den Gefäßen des mesenterialen Gefäßbettes nachgewiesen, um mögliche Unterschiede zwischen PVL- und Sham-Ratten zu zeigen. Anfang 1990 wurde publiziert, dass NPY-positive Fasern ausschließlich in der Adventitia der Gefäße zu finden sind (Kawasaki et al., 1991).

Da bei PVL-Ratten der Sympathikustonus erhöht ist, stellte sich die Frage, ob dennoch die NPY-positiven Fasern ausschließlich in der Adventitia lokalisiert waren. Dies konnte bestätigt werden. Entgegen der nNOS-Lokalisation wurden weder Fasern an der Grenze von Adventitia zur Media noch in der Media selbst gefunden.

6.2.2 NPY potenziert die α_1 -adrenerge Vasokonstriktion

Das sympathische Nervensystem vermittelt seine vasokonstriktive Wirkung vor allem über die vorhandenen α_1 -Adrenorezeptoren, d. h. auch der periphere Gefäßwiderstand wird auf diesem Weg reguliert (Piascik et al., 1996). Im mesenterialen Gefäßbett vom Menschen, aber auch bei den in unserem Versuch verwendeten Tieren, wird diese sympathische Vasokonstriktion durch Noradrenalin vermittelt (Yamamoto et al., 1984; Toernebrandt et al., 1985; Piascik et al., 1996; Toernebrandt et al., 1985), welches an postsynaptisch gelegene α_1 -Rezeptoren bindet. Sowohl im Tierversuch als auch bei Patienten mit portaler Hypertension zeigte sich eine ausgeprägte vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber einer α_1 -adrenergen Stimulation. D.h. sowohl die endogene deutlich gesteigerte Noradrenalin-Freisetzung (bereits beschrieben) als auch jegliche exogene Gabe von Katecholaminen (z.B. im therapeutischen Sinne) ist in ihrer Wirkung bei diesen Patienten gehemmt. Aus diesem Grund könnte eine Steigerung der Wirksamkeit α_1 -adrenergen Stimulatoren (Vasokonstriktion) für diese Patienten von großer Bedeutung sein. Auf diese Weise würde das Gleichgewicht zwischen arterieller Vasodilatation und -konstriktion wiederhergestellt werden können.

Im mesenterialen Gefäßbett wird die Vasokonstriktion durch Noradrenalin und über die α_1 -Rezeptoren vermittelt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der pharmakologisch selektive und spezifische α_1 -Stimulator, das Methoxamin, verwendet. Für die *in vitro* Perfusion wurde das gleiche Setup, wie bei den Experimenten zur Untersuchung der nNOS-vermittelten Vasodilatation (nach PNS) bei portaler Hypertension verwendet.

6.2.3 Die verschiedenen vaskulären Effekte von NPY

Die Effekte von NPY auf die Kontraktilität unterscheiden sich je nach Spezies, Gefäßart und Durchmesser des Gefäßes. Im Unterarm des Menschen z. B. wirkt das Peptid direkt vasokonstriktiv (Clarke et al., 1991; Pernow et al., 1987). Bei einer Konzentration von 4 nM kommt es bereits zu einer Abnahme der Unterarmdurchblutung um ca. 240%. Im Vergleich zu einer durch Noradrenalin ausgelösten relativ kurzen Vasokonstriktion hält die NPY-induzierte Gefäßverengung ca. 25 min an (Kim et al., 1994), wobei die am besten ansprechenden Gefäße einen Durchmesser von 30-40 μm haben (Baraniuk et al., 1990).

Bei Kaninchen konnte keine potenzierende Wirkung des NPY in der Aorta und in mittelgroßen Venen (z. B. Vena femoralis) nachgewiesen werden (Edvinsson et al., 1984).

In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass NPY *per se* im mesenterialen Gefäßbett keinen Einfluss auf den basalen Perfusionsdruck hat. Es zeigten sich weiterhin potenzierende vasokonstriktive Effekte durch NPY, nachdem das Gefäßbett mit Methoxamin präkonstriktiert wurde. Die Höhe des erzielten additiven Effektes stieg mit der verwendeten Konzentration der α_1 -Agonisten, d. h. je höher der vorgegebene α_1 -adrenerge Gefäßtonus/Sympathikustonius war, desto stärker fiel die Wirkung von NPY aus. Dies spiegelt eine zunehmende hämodynamische Bedeutung von NPY mit steigender Sympathikusaktivität wider. Physiologisch könnte es sich um Situationen handeln, in denen Noradrenalin, obwohl in hoher Konzentration ausgeschüttet, keine suffiziente Wirkung mehr entfaltet und NPY als Co-Transmitter nötig ist, um eine gewünschte adrenerge Vasokonstriktion zu erzielen. Im Falle der portalen Hypertension handelt es sich um eine solche Situation mit deutlich gesteigerten Serumspiegeln an Katecholaminen. Es wäre aber auch denkbar, dass bei einem erhöhten Sympathikustonius die Neusynthese von NPY limitiert ist, so dass die Vasokonstriktion nicht beliebig gesteigert werden kann. In der Tat zeigte sich nach Präkonstriktion mit hohen Methoxaminkonzentrationen, dass NPY in PVL-Tieren einen signifikant stärkeren potenzierenden Effekt erzielte als in Sham-Ratten.

Dieser Unterschied war jedoch bei einer α_1 -Präkonstriktion mit mittleren oder niedrigen Methoxaminkonzentration nicht mehr zu beobachten. Diese Tatsache verdeutlicht auch die pathophysiologische Bedeutung der exzessiven adrenergen Stimulation des mesenterialen Gefäßbettes bei portaler Hypertension. Die folgenden Versuche sollten im Detail die Wirkung von NPY auf die portale Hypertension, die Sensitivität und die Kontraktilität des mesenterialen Gefäßbettes unterstreichen. Bei beiden Versuchsgruppen konnte eine Steigerung der Sensitivität

für eine α_1 -adrenerge Vasokonstriktion nachgewiesen werden. Dabei vermittelte NPY eine Verminderung der EC50 um 17,8 μM (Sham) und 12,9 μM (PVL), welches eine Steigerung der vaskulären Empfindlichkeit um das zwei- bis dreifache bedeutet.

Im Vergleich dazu zeigte sich bei den PVL-Ratten, nicht aber bei Sham-Ratten, eine Erhöhung des maximalen α_1 -adrenergen vermittelten Effektes, was die Bedeutung von NPY hinsichtlich der maximalen vaskulären Kontraktilität bei portaler Hypertension hervorhebt. Der Effekt von NPY wird insbesondere deutlich, wenn man die Änderungen bei maximaler Präkonstriktion betrachtet. Bei den PVL-Tieren wurde unter Gabe von NPY der Druck um ca. 70 mmHg erhöht, was einer Steigerung um 100%, in Relation zur Konstriktion ohne NPY, entspricht.

Nach unseren Kenntnissen ist NPY somit das einzige vasoaktive Agens, das bei portaler Hypertension einen größeren Effekt im Vergleich zu den normotensiven Tieren zeigt. Alle anderen vasokonstriktiven Substanzen, wie z. B. Endothelin-1, Angiotensin-II, Vasopressin, Kaliumchlorid und Prostaglandine, etc. die im mesenterialen Gefäßbett bei portal hypertensiven Tieren getestet worden sind, waren dort weniger potent im Vergleich zu den Kontrolltieren (Groszmann and Francis, 1999).

Interessanterweise führt eine Vorinkubation von Gefäßen mit Vasokonstriktoren zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber NPY (Wahlestedt et al., 1990). Es kann also spekuliert werden, dass die gesteigerte Sympathikusaktivität in PVL-Ratten die Gefäße sensitiver für NPY macht. Der exakte Mechanismus bleibt jedoch unklar.

Bei der Betrachtung des Wirkmechanismus von NPY ist festzuhalten, dass die Gabe von NPY weder die Anzahl der α_1 -/ α_2 -Rezeptoren noch die Affinität dieser Rezeptoren signifikant verändert (Pernow et al., 1986; Linder et al., 1996). Ferner ist weniger die Tatsache der internen Gegenwart von NPY entscheidend, als vielmehr die Dosis und Anwesenheit von adrenergen Substanzen, wie z. B. Noradrenalin (Linder et al., 1996; Pernow et al., 1986). Beim Menschen wurde unter pathologischen Bedingungen NPY-Konzentrationen von 0,05-0,1 pmol/ml gemessen. Ein potenzierenden Effekt von NPY *in vitro* wurde ab einer Konzentration von 10 pM beobachtet (Edvinsson et al., 1984). Der potenzierende Effekt von NPY ist jedoch unspezifisch, sodass nicht nur die Effekte von adrenergen Substanzen, sondern auch die von Histamin, Prostaglandin- $F_{2\alpha}$, 5-hydroxytryptamin, Angiotensin II und Kalium verstärkt werden (Cressier et al., 1995; Wahlestedt et al., 1986). Hinsichtlich der Hypothese zur intrazellulären Vermittlung der NPY-Effekte nimmt man an, dass es nach Aktivierung des Y1-Rezeptors zu einem gesteigerten Natriumeinstrom mit der Folge einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt. Die Bedeutung des vor allem intrazellulär vorliegenden Ca^{2+} bei der Potenzierung durch NPY wurde durch folgende Versuche an der Arteria femoralis verdeutlicht:

- 1) Die Entfernung des Ca^{2+} aus dem Medium vier Minuten vor der Stimulation mit NPY hatte keinen hemmenden Einfluss auf die Konstriktion (Wahlestedt et al., 1985).
- 2) Die Verwendung von Ca^{2+} -freiem Medium dreißig Minuten vor der Gabe von NPY führte zu keiner Veränderung der Konstriktion (Wahlestedt et al., 1985). Der gleiche Wirkmechanismus konnte auch an uterinen Arterien nachgewiesen werden (Fallgren et al., 1993).

Bei dem verstärkenden Effekt von NPY auf die α_1 -adrenerge Rezeptorstimulation muss man intrazellulär zwei Phasen unterscheiden: Die erste Phase (Stimulation der α_1 -Rezeptoren) verläuft innerhalb der ersten 300 s, in denen durch Erhöhung von IP_3 (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und Aktivierung der PKC (Proteinkinase-C) die Konzentration des intrazellulären Ca^{3+} -Spiegels ansteigt. Im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es durch die Stimulation des Y1-Rezeptors ab einer Dauer von ca. 300 s nach der Gabe von NPY über den gleichen Signalweg ebenfalls zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Selbie et al., 1995; Zukowska-Grojec et al., 1986). Es kommt jedoch nicht zur Aktivierung der PKC, wenn NPY alleine gegeben wird, und es damit lediglich zur Stimulation des Y1-Rezeptors kommt (Selbie et al., 1995).

Bereits 1994 konnte gezeigt werden, dass die Gabe von NPY eine neuronal vermittelte Vasodilatation hemmt. Das präkonstriktierte mesenteriale Gefäßbett der normalen Ratte wurde dazu mit 8Hz, 60 V und 0.1 ms stimuliert, wobei eine konzentrationsabhängige Hemmung der Relaxation mit NPY gemessen werden konnte. Bei einer Dosis von 10 nM NPY kam es zu einer um 60% verminderten Relaxation (Ralevic et al., 1994).

In den hier durchgeführten Experimenten wurde der Einfluss von NPY auf die nNOS-vermittelte Vasorelaxation bei portaler Hypertension untersucht. Es zeigte sich auch hier, dass NPY die hämodynamische Wirkung der nNOS hemmt. Allerdings gab es in Anwesenheit von NPY keinen Unterschied mehr zwischen Sham- und PVL-Ratten bezüglich der nitrogen Vasodilatation. Die Änderung des Perfusionsdruckes nach der NPY-Gabe war jedoch, ähnlich wie bei L-NAME und Geldanamycin, bei den PVL-Tieren signifikant stärker ausgeprägt.

Hinsichtlich der portalen Hypertension konnte gezeigt werden, dass NPY einen dualen hämodynamischen Effekt entfaltet. Zum einen wird die vaskuläre Kontraktilität gesteigert und damit die α_1 -adrenerge vasokonstriktive Kapazität wiederhergestellt, und zum anderen wird die gesteigerte nNOS-vermittelte Vasodilatation inhibiert.

In Abbildung 34 sind ein Teil der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse für die vaskuläre Regulation schematisch zusammengefasst.

Bei weiterführenden Experimenten wäre die Klärung folgender Aspekte interessant:

- 1) Da HSP90 nicht nur durch Protein-Protein Interaktionen sondern auch durch die Regulation der DNA-Expression bekannt wurde, wäre noch zu klären, ob das Chaperon auch an der erhöhten eNOS-/nNOS-Proteinexpression in PVL-Ratten beteiligt ist. Den gleichen Mechanismus könnte man eventuell auch bei der Expression der löslichen Guanylylzyklase zu Grunde legen.
- 2) Es konnte gezeigt werden, dass NPY, ebenso wie die nNOS, mit dem HSP90 interagiert (Ishiwatari-Hayasaka et al., 2003). Interessant wäre die Regulation des NPY durch HSP90 bei portaler Hypertension zu klären.
- 3) Es bleibt noch der Mechanismus des verstärkten NPY-Effektes bei der portalen Hypertension des Menschen zu klären. Bisher wurde lange Zeit (auch in der Notfallmedizin) Octreotid eingesetzt, was ebenfalls eine Potenzierung PKC-abhängiger Vasokonstriktoren bewirkt. Nachteile sind jedoch, dass es nur kurz wirksam ist, dass der Effekt transient und gleich stark in Sham- bzw. PVL-Ratten wirkt (Wiest et al., 2001). NPY wäre für einen solchen Einsatz aus den oben beschriebenen Gründen deutlich besser geeignet.

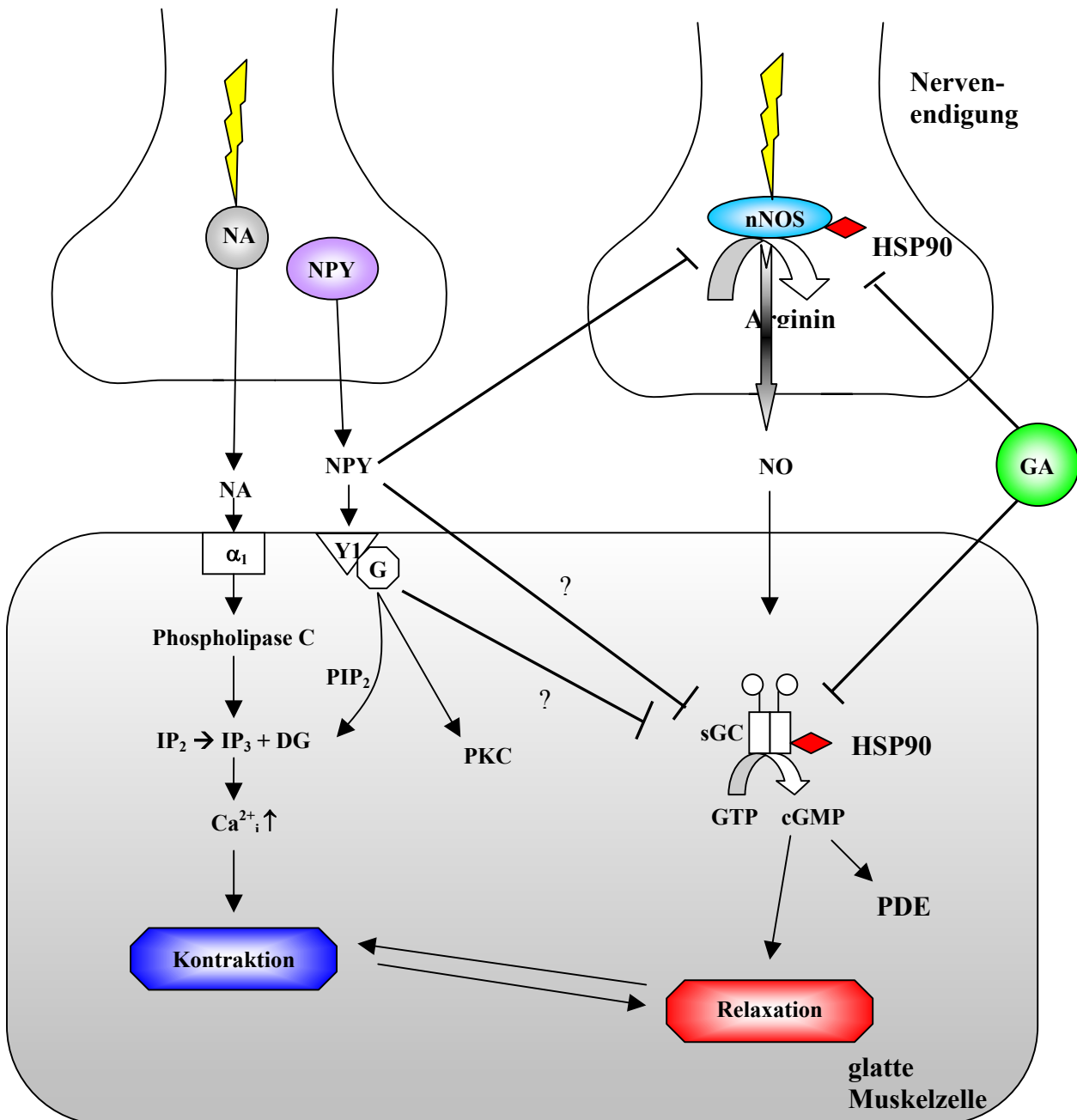


Abb. 34: Wirkungen von NA, NPY und nNOS auf eine glatte Muskelzelle. Für die Verdeutlichung der gegenseitigen Beeinflussung wurden nicht-relevante Interaktionen weggelassen. Das Geldanamycin hemmt neben der nNOS auch die lösliche Guanylylzyklase, was außer einer verminderten NO-Produktion auch eine verminderte cGMP-Bildung zur Folge hat. Das NPY, das an den G-Protein gekoppelten Y1-Rezeptor bindet, führt über das Phosphoinositol-bis-Phosphat (PIP₂) zu einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, was den konstriktierenden Effekt von NA stärkt. Zudem hemmt es die nNOS-vermittelte Vasorelaxation, was die Konstriktion noch weiter verstärkt. Dies geschieht zum einen durch die direkte Hemmung der nNOS aber auch durch die Hemmung der sGC durch NPY könnte die Kontraktion verstärkt werden. Abkürzungen: cGMP=zyklisches Guanosinmonophosphat; DG=Diacylglycerin; G=G Protein; GA=Geldanamycin; GTP=Guanosintriphosphat; HSP90=*heat shock protein 90*; IP₂=Inositol-bis-phosphat; IP₃=Inositol-4,5-trisphosphat; NA=Noradrenalin; nNOS=neuronale NO-Synthase; NPY=Neuropeptid Y; PDE=Phosphodiesterase; PKC=Proteinkinase C; sGC=lösliche (soluble) Guanylylzyklase

7. Zusammenfassung

Durch übermäßigen Alkoholkonsum, Arzneimittel aber auch durch Autoimmunerkrankungen kommt es zum Umbau der Leber, was schließlich zum Vollbild der Leberzirrhose führen kann. Die Grundlage für die meisten klinischen Komplikationen, an denen der Patient verstirbt, wie z. B. gastroösophageale Varizenblutung, Aszites oder das hepatorenale Syndrom, ist die portale Hypertonie. Bei den in unseren Versuchen verwendeten Ratten wurde auf operativem Wege durch eine portalvenöse Ligatur (PVL) eine portale Hypertonie künstlich induziert.

Hämodynamisch ist diese portale Hypertonie durch eine Gefäßdysregulation, welche schließlich zur Entwicklung und Aggravation des hyperdynamen Zirkulationssyndroms führt, charakterisiert. Kennzeichnend für die Dysregulation ist ein Ungleichgewicht in der Wirkung vasokonstriktiver und vasodilatativer Mediatoren. D. h. es besteht eine vaskuläre Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren bei gleichzeitig verstärkter Wirkung vasorelaxierender Substanzen. Pathophysiologisch nimmt diese Gefäßdysregulation ihren Ausgang in einer arteriellen Vasodilatation, welche sehr früh und insbesondere ausgeprägt im mesenterialen Gefäßbett auftritt. Die genannte vaskuläre Hyporeaktivität wie auch eine gesteigerte Vasorelaxation sind zum Großteil NO-vermittelt.

Im Hinblick auf die Expression der nNOS-Isoform im Rahmen der portalen Hypertonie wurde hinsichtlich der Lokalisation eine perivaskulär unveränderte aber gesteigerte nNOS-Proteinexpression im mesenterialen Gefäßbett bei PVL-Tieren gefunden. Damit einhergehend wurde eine im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren verstärkte nNOS-vermittelte Vasorelaxation beobachtet. Diese wurde durch den unspezifischen NOS-Inhibitor L-NAME, wie auch durch den nNOS-spezifischen Inhibitor TRIM, komplett aufgehoben.

Mittels Co-Immünpräzipitation lies sich im Hinblick auf die Regulation der nNOS-Funktion, die Bindung des Chaperons HSP90 an nNOS im mesenterialen Gefäß nachweisen. Durch funktionelle Experimente konnte durch Gabe des HSP90-Inhibitors Geldanamycin eine deutliche Hemmung der nNOS-vermittelten Vasorelaxation beobachtet werden, welche den zuvor beobachteten Unterschied zwischen PVL- und Sham-Tieren aufhob. Quantitativ war der Effekt von Geldanamycin ähnlich stark wie das Ergebnis mittels L-NAME. Dies weist darauf hin, dass ein Großteil der nNOS-vermittelten Vasorelaxation im mesenterialen Gefäßbett durch HSP90 moduliert wird.

In weiteren *in vitro* Versuchen konnte durch Perfusion des mesenterialen Gefäßbettes von PVL-Tiere die bekannte ausgeprägte Hyporeaktivität gegenüber α_1 -adrenerger Stimulation bestätigt werden. Ferner wurde eine NPY-gesteigerte vaskuläre Sensitivität auf α_1 -Rezeptoren bei PVL- und Sham-Tieren nachgewiesen. Die Gefäßkontraktilität konnte durch die Gabe von NPY jedoch ausschließlich bei den PVL-Ratten signifikant gesteigert werden. Der Effekt war vor allem in Anwesenheit einer exzessiven α_1 -adrenergen Stimulation zu beobachten. D.h. NPY korrigiert damit die Hypokontraktilität und Hyporeaktivität gegenüber α_1 -adrenerger Vasokonstriktion bei portaler Hypertonie.

Ferner zeigte NPY *per se* keine direkte vasokonstriktive Wirkung auf das mesenteriale Gefäßbett potenziert jedoch endothelunabhängig und dosisabhängig die α_1 -adrenerge Vasokonstriktion. Diese Wirkung nahm in Ausprägung mit dem Grad der α_1 -adrenergen Stimulation zu, d.h. die relative hämodynamische Wichtigkeit von NPY für eine sympathisch-ausgelöste Vasokonstriktion scheint mit der Höhe der Sympathikusaktivität (α_1 -Stimulation) zuzunehmen.

Schließlich induzierte NPY auch eine hemmende Wirkung auf die nNOS-vermittelte Vasorelaxation. Dabei war auch dieser Effekt bei PVL-Tieren stärker ausgeprägt. Es zeigte sich in Anwesenheit von NPY kein Unterschied mehr hinsichtlich der PNS-induzierten Vasorelaxation zwischen den beiden Versuchsgruppen. Somit vermittelt NPY einen dualen hämodynamischen Effekt. Zum einen wird die vaskuläre Kontraktilität gesteigert und damit die α_1 -adrenerge vasokonstriktive Kapazität wiederhergestellt, und zum anderen wird die gesteigerte nNOS-vermittelte Vasodilatation gehemmt.

NPY könnte aufgrund dieser beiden Wirkmechanismen in der Therapie bei Patienten mit Leberzirrhose eingesetzt werden. Es könnte gegebenenfalls die schwerwiegenden Begleiterscheinungen, wie z. B. das hepatorenale Syndrom oder die hepatische Enzephalopathie, lindern oder sogar verhindern.

8. Literatur

1. Ahlborg,G., Weitzberg,E., and Lundberg,J.M. (1992). Splanchnic and renal vasoconstriction during neuropeptide Y infusion in healthy humans. *Clin. Physiol* 12, 145-153.
2. Albornoz,L., Motta,A., Alvarez,D., Estevez,A., Bandi,J.C., McCormack,L., Matera,J., Bonofiglio,C., Ciardullo,M., De Santibanes,E., Gimeno,M., and Gadan,A. (2001). Nitric oxide synthase activity in the splanchnic vasculature of patients with cirrhosis: relationship with hemodynamic disturbances. *J. Hepatol.* 35, 452-456.
3. Alderton,W.K., Cooper,C.E., and Knowles,R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615.
4. Allen,J., Novotny,J., Martin,J., and Heinrich,G. (1987). Molecular structure of mammalian neuropeptide Y: analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 2532-2536.
5. Andriantsitohaina,R. and Stoclet,J.C. (1988). Potentiation by neuropeptide Y of vasoconstriction in rat resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* 95, 419-428.
6. Atucha,N.M., Garcia-Estan,J., Ramirez,A., Perez,M.C., Quesada,T., and Romero,J.C. (1994). Renal effects of nitric oxide synthesis inhibition in cirrhotic rats. *Am. J. Physiol* 267, R1454-R1460.
7. Baraniuk,J.N., Castellino,S., Lundgren,J.D., Goff,J., Mullol,J., Merida,M., Shelhamer,J.H., and Kaliner,M.A. (1990). Neuropeptide Y (NPY) in human nasal mucosa. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3, 165-173.
8. Beck-Sickinger,A.G., Gaida,W., Schnorrenberg,G., Lang,R., and Jung,G. (1990). Neuropeptide Y: identification of the binding site. *Int. J. Pept. Protein Res.* 36, 522-530.
9. Bedoui,S., Lechner,S., Gebhardt,T., Nave,H., Beck-Sickinger,A., Straub,R.H., Pabst,R., and von Hörsten,S. (2002). NPY modulates epinephrin-induced leukocytosis via Y1 and Y5 receptor activation in vivo: sympathetic co-transmission during leukocyte mobilization. *Journal of Neuroimmunology* 132, 25-33.
10. Beesley,J.E. (1995). Histochemical methods for detecting nitric oxide synthase. *Histochem. J.* 27, 757-769.
11. Bender,A.T., Silverstein,A.M., Demady,D.R., Kanelakis,K.C., Noguchi,S., Pratt,W.B., and Osawa,Y. (1999a). Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 1472-1478.
12. Bender,A.T., Silverstein,A.M., Demady,D.R., Kanelakis,K.C., Noguchi,S., Pratt,W.B., and Osawa,Y. (1999b). Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 1472-1478.
13. Benoit,J.N. and Granger,D.N. (1986). Splanchnic hemodynamics in chronic portal hypertension. *Semin. Liver Dis.* 6, 287-298.

14. Bernardi, M. and Trevisani, F. (1997). Systemic and regional hemodynamics in pre-ascitic cirrhosis. *J. Hepatol.* 27, 588-591.
15. Billecke, S.S., Bender, A.T., Kanelakis, K.C., Murphy, P.J., Lowe, E.R., Kamada, Y., Pratt, W.B., and Osawa, Y. (2002). hsp90 is required for heme binding and activation of apo-neuronal nitric-oxide synthase: geldanamycin-mediated oxidant generation is unrelated to any action of hsp90. *J. Biol. Chem.* 277, 20504-20509.
16. Blottner, D., Grozdanovic, Z., and Gossrau, R. (1995). Histochemistry of nitric oxide synthase in the nervous system. *Histochem. J.* 27, 785-811.
17. Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 682-685.
18. Bult, H., Boeckxstaens, G.E., Pelckmans, P.A., Jordaens, F.H., Van Maercke, Y.M., and Herman, A.G. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345, 346-347.
19. Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509-581.
20. Burnstock, G. (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1, 239-248.
21. Cahill, P.A., Foster, C., Redmond, E.M., Gingalewski, C., Wu, Y., and Sitzmann, J.V. (1995). Enhanced nitric oxide synthase activity in portal hypertensive rabbits. *Hepatology* 22, 598-606.
22. Cahill, P.A., Redmond, E.M., Hodges, R., Zhang, S., and Sitzmann, J.V. (1996). Increased endothelial nitric oxide synthase activity in the hyperemic vessels of portal hypertensive rats. *J. Hepatol.* 25, 370-378.
23. Campillo, B., Chabrier, P.E., Pelle, G., Sediame, S., Atlan, G., Fouet, P., and Adnot, S. (1995). Inhibition of nitric oxide synthesis in the forearm arterial bed of patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 22, 1423-1429.
24. Capurro, D. and Huidobro-Toro, J.P. (1999). The involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIBO 3304. *Eur. J. Pharmacol.* 376, 251-255.
25. Carrier, S., Nagaraju, P., Morgan, D.M., Baba, K., Nunes, L., and Lue, T.F. (1997). Age decreases nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat penis. *J. Urol.* 157, 1088-1092.
26. Chojkier, M. and Groszmann, R.J. (1981). Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am. J. Physiol* 240, G371-G375.
27. Claria, J., Jimenez, W., Ros, J., Asbert, M., Castro, A., Arroyo, V., Rivera, F., and Rodes, J. (1992). Pathogenesis of arterial hypotension in cirrhotic rats with ascites: role of endogenous nitric oxide. *Hepatology* 15, 343-349.
28. Clarke, J., Benjamin, N., Larkin, S., Webb, D., Maseri, A., and Davies, G. (1991). Interaction of neuropeptide Y and the sympathetic nervous system in vascular control in man. *Circulation* 83, 774-777.

29. Colombato, L.A., Albillos, A., and Groszmann, R.J. (1992). Temporal relationship of peripheral vasodilatation, plasma volume expansion and the hyperdynamic circulatory state in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 15, 323-328.
30. Corbin, J.D. and Francis, S.H. (1999). Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J. Biol. Chem.* 274, 13729-13732.
31. Cressier, F., Criscione, L., and Hofbauer, K.G. (1995). Mechanism of interaction between neuropeptide Y and angiotensin II in the rabbit femoral artery. *Eur. J. Pharmacol.* 272, 57-65.
32. Davisson, R.L., Possas, O.S., Murphy, S.P., and Lewis, S.J. (1997). Neurogenically derived nitrosyl factors mediate sympathetic vasodilation in the hindlimb of the rat. *Am. J. Physiol* 272, H2369-H2376.
33. Doods, H.N., Wieland, H.A., Engel, W., Eberlein, W., Willim, K.D., Entzeroth, M., Wiene, W., and Rudolf, K. (1996). BIBP 3226, the first selective neuropeptide Y1 receptor antagonist: a review of its pharmacological properties. *Regul. Pept.* 65, 71-77.
34. Edvinsson, L., Adamsson, M., and Jansen, I. (1990). Neuropeptide Y antagonistic properties of D-myo-inositol-1.2.6-trisphosphate in guinea pig basilar arteries. *Neuropeptides* 17, 99-105.
35. Edvinsson, L., Ekblad, E., Hakanson, R., and Wahlestedt, C. (1984). Neuropeptide Y potentiates the effect of various vasoconstrictor agents on rabbit blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 83, 519-525.
36. Eliasson, M.J., Blackshaw, S., Schell, M.J., and Snyder, S.H. (1997). Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3396-3401.
37. Eva, C., Keinänen, K., Monyer, H., Seeburg, P., and Sprengel, R. (1990). Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. *FEBS Lett.* 271, 81-84.
38. Fallgren, B., Arlock, P., and Edvinsson, L. (1993). Neuropeptide Y potentiates noradrenaline-evoked vasoconstriction by an intracellular calcium-dependent mechanism. *J. Auton. Nerv. Syst.* 44, 151-159.
39. Fernandez, M., Garcia-Pagan, J.C., Casadevall, M., Bernadich, C., Pira, C., Whittle, B.J., Pique, J.M., Bosch, J., and Rodes, J. (1995). Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 108, 1487-1495.
40. Ferrer, M. and Balfagon, G. (2001). Aging alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries: role of presynaptic beta-adrenoceptors. *Clin. Sci. (Lond)* 101, 321-328.
41. Floras, J.S., Legault, L., Morali, G.A., Hara, K., and Blendis, L.M. (1991). Increased sympathetic outflow in cirrhosis and ascites: direct evidence from intraneural recordings. *Ann. Intern. Med.* 114, 373-380.

42. Fozard, J.R. and Part, M.L. (1991). Haemodynamic responses to NG-monomethyl-L-arginine in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br. J. Pharmacol.* *102*, 823-826.
43. Francis, S.H., Turko, I.V., and Corbin, J.D. (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *65:1-52.*, 1-52.
44. Fried, G., Lundberg, J.M., and Theodorsson-Norheim, E. (1985). Subcellular storage and axonal transport of neuropeptide Y (NPY) in relation to catecholamines in the cat. *Acta Physiol Scand.* *125*, 145-154.
45. Furchgott, R.F. and Z. J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* *288*, 373-376.
46. Gadano, A.C., Sogni, P., Yang, S., Cailmail, S., Moreau, R., Nepveux, P., Couturier, D., and Lebrec, D. (1997). Endothelial calcium-calmodulin dependent nitric oxide synthase in the in vitro vascular hyporeactivity of portal hypertensive rats. *J. Hepatol.* *26*, 678-686.
47. Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* *392*, 821-824.
48. Garcia-Cardena, G., Fan, R., Stern, D.F., Liu, J., and Sessa, W.C. (1996). Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* *271*, 27237-27240.
49. Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., Skidd, P.M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M.P., and Sessa, W.C. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* *272*, 25437-25440.
50. Garcia-Pagan, J.C., Fernandez, M., Bernadich, C., Pizcueta, P., Pique, J.M., Bosch, J., and Rodes, J. (1994). Effects of continued NO inhibition on portal hypertensive syndrome after portal vein stenosis in rat. *Am. J. Physiol* *267*, G984-G990.
51. Gerald, C., Walker, M.W., Criscione, L., Gustafson, E.L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K.E., Vaysse, P., Durkin, M.M., Laz, T.M., Linemeyer, D.L., Schaffhauser, A.O., Whitebread, S., Hofbauer, K.G., Taber, R.I., Branchek, T.A., and Weinshank, R.L. (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* *382*, 168-171.
52. Gordon, E.A., Krstenansky, J.L., and Fishman, P.H. (1990). Centrally truncated neuropeptide Y analog acts as an agonist for Y1 receptors on SK-N-MC cells. *Neurosci. Lett.* *119*, 187-190.
53. Grenert, J.P., Sullivan, W.P., Fadden, P., Haystead, T.A., Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H.J., Schulte, T.W., Sausville, E., Neckers, L.M., and Toft, D.O. (1997). The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J. Biol. Chem.* *19;272*, 23843-23850.
54. Groszmann, R.J. and Francis, R. (1999). Chapter: Portal Hypertension. In: Disease of the Liver, 8th Edition Eds. Schiff, E., Madrey, W., Sorel, J. B.

55. Grundemar,L. and Ekelund,M. (1996). Effects of the neuropeptide Y (NPY)-receptor antagonist BIBP3226 on vascular NPY-receptors with different ligand requirements. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 266-269.
56. Gu,J., Polak,J.M., Adrian,T.E., Allen,J.M., Tatemoto,K., and Bloom,S.R. (1983). Neuropeptide tyrosine (NPY)--a major cardiac neuropeptide. *Lancet* 1, 1008-1010.
57. Gustafsson,H. and Nilsson,H. (1990). Endothelium-independent potentiation by neuropeptide Y of vasoconstrictor responses in isolated arteries from rat and rabbit. *Acta Physiol Scand.* 138, 503-507.
58. Gyoda,Y., Tsukada,Y., Saito,A., and Goto,K. (1995). Role of nitric oxide and neuropeptides in neurogenic vasodilatation of the guinea pig mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* 279, 83-92.
59. Han,C. and Abel,P.W. (1987). Neuropeptide Y potentiates contraction and inhibits relaxation of rabbit coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9, 675-681.
60. Hanasato,N., Oka,M., Muramatsu,M., Nishino,M., Adachi,H., and Fukuchi,Y. (1999). E-4010, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Physiol* 277, L225-L232.
61. Hardman,J.G.und Sutherland,E.W. (1969). Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 244, 6363-6370.
62. Hartleb,M., Moreau,R., Cailmail,S., Gaudin,C., and Lebrec,D. (1994). Vascular hyporesponsiveness to endothelin 1 in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 107, 1085-1093.
63. Hayashi,Y., Nishio,M., Naito,Y., Yokokura,H., Nimura,Y., Hidaka,H., and Watanabe,Y. (1999). Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 20597-20602.
64. Heinemann,A. and Stauber,R.E. (1995). The role of inducible nitric oxide synthase in vascular hyporeactivity of endotoxin-treated and portal hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 278, 87-90.
65. Henriksen,J.H., Ring-Larsen,H., Kanstrup,I.L., and Christensen,N.J. (1984). Splanchnic and renal elimination and release of catecholamines in cirrhosis. Evidence of enhanced sympathetic nervous activity in patients with decompensated cirrhosis. *Gut* 25, 1034-1043.
66. Henry,Y.,Lepoivre,M.,Drapier,J.-C.,Ducrocq,C.,Boucher,J.-L.und Guissani,A. (1993). EPR characterisation of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J.* 7, 1124-1134.
67. Herzog,H., Hort,Y.J., Ball,H.J., Hayes,G., Shine,J., and Selbie,L.A. (1992). Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5794-5798.

68. Hieble, J.P., Duesler, J.G., Jr., and Daly, R.N. (1989). Effects of neuropeptide Y on the response of isolated blood vessels to norepinephrine and sympathetic field stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250, 523-528.
69. Hopsu-Havu, V.K. and Glenner, G.G. (1966). A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie.* 7, 197-201.
70. Hori, N., Wiest, R., and Groszmann, R.J. (1998). Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 28, 1467-1473.
71. Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A., and Fishman, M.C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239-242.
72. Huber, A., Saur, D., Kurjak, M., Schusdziarra, V., and Allescher, H.D. (1998). Characterization and splice variants of neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. *Am. J. Physiol* 275, G1146-G1156.
73. Hulting, J., Sollevi, A., Ullman, B., Franco-Cereceda, A., and Lundberg, J.M. (1990). Plasma neuropeptide Y on admission to a coronary care unit: raised levels in patients with left heart failure. *Cardiovasc. Res.* 24, 102-108.
74. Iadecola, C., Zhang, F., and Xu, X. (1993). Role of nitric oxide synthase-containing vascular nerves in cerebrovasodilation elicited from cerebellum. *Am. J. Physiol* 264, R738-R746.
75. Ignacio, C.S., Curling, P.E., Childres, W.F., and Bryan, R.M., Jr. (1997). Nitric oxide-synthesizing perivascular nerves in the rat middle cerebral artery. *Am. J. Physiol* 273, R661-R668.
76. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Byrns, R.E., Wood, K.S., and Chaudhuri, G. (1988). Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246, 218-226.
77. Ignarro, L.J., Buga, R.G., Wood, K.S. und Kadowitz, P.J. (1986). Activation of purified soluble guanylate cyclase by an endothelium derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: Stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237, 900.
78. Ishiwatari-Hayasaka, H., Maruya, M., Sreedhar, A., Nemoto, T., Csermely, P., and Yahara, I. (2003). Interaction of Neuropeptide Y and HSP90 through a novel Peptide Binding Region. *Biochemistry* 42, 12972-12980.
79. Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., and Venema, R.C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 18522-18525.
80. Kawasaki, H., Nuki, C., Saito, A., and Takasaki, K. (1991). NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries. *Am. J. Physiol* 261, H683-H690.

81. Keire,D.A., Kobayashi,M., Solomon,T.E., and Reeve,J.R., Jr. (2000). Solution structure of monomeric peptide YY supports the functional significance of the PP-fold. *Biochemistry* 39, 9935-9942.
82. Kiel,J., Pitts,V., Benoit,J.N., Granger,D.N., and Shepherd,A. (1985). Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats. *Am. J. Physiol* 248:G192.
83. Kim,D., Duran,W.R., Kobayashi,I., Daniels,A.J., and Duran,W.N. (1994). Microcirculatory dynamics of neuropeptide Y. *Microvasc. Res.* 48, 124-134.
84. Klatt,P., Schmidt,K., and Mayer,B. (1992). Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochem. J.* 288, 15-17.
85. Kone,B.C., Kunczewicz,T., Zhang,W., and Yu,Z.Y. (2003). Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 285, F178-F190.
86. Kotera,J., Fujishige,K., Michibata,H., Yuasa,K., Kubo,A., Nakamura,Y., and Omori,K. (2000). Characterization and effects of methyl-2- (4-aminophenyl)-1, 2-dihydro-1-oxo-7-(2-pyridinylmethoxy)-4-(3,4, 5-trimethoxyphenyl)-3-isoquinoline carboxylate sulfate (T-1032), a novel potent inhibitor of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem. Pharmacol.* 60, 1333-1341.
87. Krause,J., Eva,C., Seeburg,P.H., and Sprengel,R. (1992). Neuropeptide Y1 subtype pharmacology of a recombinantly expressed neuropeptide receptor. *Mol. Pharmacol.* 41, 817-821.
88. Kruuse,C., Rybalkin,S.D., Khurana,T.S., Jansen-Olesen,I., Olesen,J., and Edvinsson,L. (2001). The role of cGMP hydrolysing phosphodiesterases 1 and 5 in cerebral artery dilatation. *Eur. J. Pharmacol.* 420, 55-65.
89. Lacolley,P.J., Lewis,S.J., and Brody,M.J. (1991). Role of sympathetic nerve activity in the generation of vascular nitric oxide in urethane-anesthetized rats. *Hypertension* 17, 881-887.
90. Larhammar,D., Blomqvist,A.G., Yee,F., Jazin,E., Yoo,H., and Wahlested,C. (1992). Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *J. Biol. Chem.* 267, 10935-10938.
91. Leckstrom,A., Ahlner,J., Grundstrom,N., and Axelsson,K.L. (1993). Involvement of nitric oxide and peptides in the inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) response in bovine mesenteric artery. *Pharmacol. Toxicol.* 72, 194-198.
92. Lee,F.Y., Colombato,L.A., Albillos,A., and Groszmann,R.J. (1993). N omega-nitro-L-arginine administration corrects peripheral vasodilation and systemic capillary hypotension and ameliorates plasma volume expansion and sodium retention in portal hypertensive rats. *Hepatology* 17, 84-90.
93. Lee,Y., Shiosaka,S., Emson,P.C., Powell,J.F., Smith,A.D., and Tohyama,M. (1985). Neuropeptide Y-like immunoreactive structures in the rat stomach with special reference to the noradrenaline neuron system. *Gastroenterology* 89, 118-126.

94. Li, Y.J., Yu, X.J., and Deng, H.W. (1993). Nitric oxide modulates responses to sensory nerve activation of the perfused rat mesentery. *Eur. J. Pharmacol.* 239, 127-132.
95. Lin, C.S., Lau, A., Tu, R., and Lue, T.F. (2000). Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 628-635.
96. Lin, R.S., Lee, F.Y., Lee, S.D., Tsai, Y.T., Lin, H.C., Lu, R.H., Hsu, W.C., Huang, C.C., Wang, S.S., and Lo, K.J. (1995). Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J. Hepatol.* 22, 165-172.
97. Linder, L., Lautenschlager, B.M., and Haefeli, W.E. (1996). Subconstrictor doses of neuropeptide Y potentiate alpha 1-adrenergic vasoconstriction in vivo. *Hypertension* 28, 483-487.
98. Lumsden, A.B., Henderson, J.M., and Kutner, M.H. (1988). Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 8, 232-236.
99. Lundberg, J.M. (1996). Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.* 48, 113-178.
100. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hokfelt, T., Martling, C.R., Tatemoto, K., Mutt, V., Polak, J., Bloom, S., and Goldstein, M. (1982a). Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand.* 116, 477-480.
101. Lundberg, J.M., Terenius, L., Hokfelt, T., Martling, C.R., Tatemoto, K., Mutt, V., Polak, J., Bloom, S., and Goldstein, M. (1982b). Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand.* 116, 477-480.
102. Lundell, I., Blomqvist, A.G., Berglund, M.M., Schober, D.A., Johnson, D., Statnick, M.A., Gadski, R.A., Gehlert, D.R., and Larhammar, D. (1995). Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J. Biol. Chem.* 270, 29123-29128.
103. MacKerell, A.D., Jr. (1991). Molecular modeling and dynamics of biologically active peptides: application to neuropeptide Y. *Methods Enzymol.* 202:449-70., 449-470.
104. MacMicking, J., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletscher, D., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q., Chen, H., and Mudgett, J. (1995). Altered response to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81, 641-650.
105. Maisel, A.S., Scott, N.A., Motulsky, H.J., Michel, M.C., Boublik, J.H., Rivier, J.E., Ziegler, M., Allen, R.S., and Brown, M.R. (1989). Elevation of plasma neuropeptide Y levels in congestive heart failure. *Am. J. Med.* 86, 43-48.

106. Malmstrom,R.E., Hokfelt,T., Bjorkman,J.A., Nihlen,C., Bystrom,M., Ekstrand,A.J., and Lundberg,J.M. (1998). Characterization and molecular cloning of vascular neuropeptide Y receptor subtypes in pig and dog. *Regul. Pept.* 75-76:55-70., 55-70.
107. Martin,P.Y., Ohara,M., Gines,P., Xu,D.L., St John,J., Niederberger,M., and Schrier,R.W. (1998). Nitric oxide synthase (NOS) inhibition for one week improves renal sodium and water excretion in cirrhotic rats with ascites. *J. Clin. Invest* 101, 235-242.
108. Martin,P.Y., Xu,D.L., Niederberger,M., Weigert,A., Tsai,P., St John,J., Gines,P., and Schrier,R.W. (1996). Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am. J. Physiol* 270, F494-F499.
109. Mayer,B., John,M., and Bohme,E. (1990). Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* 277, 215-219.
110. McDermott,B.J., Millar,B.C., and Piper,H.M. (1993). Cardiovascular effects of neuropeptide Y: receptor interactions and cellular mechanisms. *Cardiovasc. Res.* 27, 893-905.
111. McGregor,D. (1965). The effect of sympathetic nerve stimulation of vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessel of the rat. *J. Physiol* 177:21-30., 21-30.
112. Mentlein,R., Dahm,P., Grandt,D., and Kruger,R. (1993). Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul Pept* 49(2), 133-144.
113. Mentlein,R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* 85, 9-24.
114. Merhi,M., Dusting,G.J., and Khalil,Z. (1998). CGRP and nitric oxide of neuronal origin and their involvement in neurogenic vasodilatation in rat skin microvasculature. *Br. J. Pharmacol.* 123, 863-868.
115. Minth,C.D., Bloom,S.R., Polak,J.M., and Dixon,J.E. (1984). Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 4577-4581.
116. Moll-Kaufmann,C., Sumanovski,L.T., and Sieber,C.C. (1998). Neurally-mediated vasodilatation in normal and portal hypertensive rats: role of nitric oxide and calcitonin gene-related peptide. *J. Hepatol.* 28, 1031-1036.
117. Moncada,S., Palmer,R.M., and Higgs,E.A. (1988). The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12, 365-372.
118. Moncada,S., Palmer,R.M., and Higgs,E.A. (1991). Nitric oxide:Physiology,pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.
119. Morales-Ruiz,M., Jimenez,W., Perez-Sala,D., Ros,J., Leivas,A., Lamas,S., Rivera,F., and Arroyo,V. (1996). Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 24, 1481-1486.

120. Morris,M.J., Russell,A.E., Kapoor,V., Cain,M.D., Elliott,J.M., West,M.J., Wing,L.M., and Chalmers,J.P. (1986). Increases in plasma neuropeptide Y concentrations during sympathetic activation in man. *J. Auton. Nerv. Syst.* *17*, 143-149.
121. Morton,K.D., McCloskey,M.J., and Potter,E.K. (1999). Cardiorespiratory responses to intracerebroventricular injection of neuropeptide Y in anaesthetised dogs. *Regul. Pept.* *81*, 81-88.
122. Mullershausen,F., Russwurm,M., Thompson,W.J., Liu,L., Koesling,D., and Friebe,A. (2001). Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J. Cell Biol.* *155*, 271-278.
123. Mullins,D.E., Guzzi,M., Xia,L., and Parker,E.M. (2000). Pharmacological characterization of the cloned neuropeptide Y y(6) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* *395*, 87-93.
124. Myers,A., Farhat,M., Shen,G., Debinski,W., Wahlestedt,C., and Zukowska-Grojec,Z. (1990). Platelets as a source and site of action for neuropeptid Y. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *611*, 408-411.
125. Nelson,R.J., Demas,G.E., Huang,P.L., Fishman,M.C., Dawson,V.L., Dawson,T.M., and Snyder,S.H. (1995). Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* *378*, 383-386.
126. Nicholls KM,Shapiro MD,Van Putten VJ,Kluge R,Chung HM,Bichet DG (1985). Elevated plasma norepinephrine concentrations in decompensated cirrhosis. Association with increased secretion rates, normal clearance rates, and suppressibility by central blood volume expansion. *Circ. Res.* *56*, 457-461.
127. Niederberger,M., Gines,P., Martin,P.Y., Tsai,P., Morris,K., McMurtry,I., and Schrier,R.W. (1996). Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats. *Hepatology* *24*, 947-951.
128. Nozaki,K., Moskowitz,M.A., Maynard,K.I., Koketsu,N., Dawson,T.M., Bredt,D.S., and Snyder,S.H. (1993). Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab* *13*, 70-79.
129. Okamura,T., Kimura,T., and Toda,N. (1995). Neurogenic vasodilation in canine uterine and iliac arteries. *J. Hypertens.* *13*, 1163-1168.
130. Ollerstam,A., Pittner,J., Persson,A.E., and Thorup,C. (1997). Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest* *99*, 2212-2218.
131. Owman,C. (1990). Peptidergic vasodilator nerves in the peripheral circulation and in the vascular beds of the heart and brain. *Blood Vessels* *27*, 73-93.
132. Palczewski,K., Kumasaka,T., Hori,T., Behnke,C., Motoshima,H., and Fox,B. (2000). Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. Palczewski K. *Science* *2000*;289:739-745. *Am. J. Ophthalmol.* *130*, 865.

133. Palmer,R.M., Ferrige,A.G., and Moncada,S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
134. Palmer,R.M., Rees,D.D., Ashton,D.S., and Moncada,S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1251-1256.
135. Pernow,J., Lundberg,J.M., and Kaijser,L. (1987). Vasoconstrictor effects in vivo and plasma disappearance rate of neuropeptide Y in man. *Life Sci.* 40, 47-54.
136. Pernow,J., Saria,A., and Lundberg,J.M. (1986). Mechanisms underlying pre- and postjunctional effects of neuropeptide Y in sympathetic vascular control. *Acta Physiol Scand.* 126, 239-249.
137. Piascik,M.T., Soltis,E.E., Piascik,M.M., and Macmillan,L.B. (1996). Alpha-adrenoceptors and vascular regulation: molecular, pharmacologic and clinical correlates. *Pharmacol. Ther.* 72, 215-241.
138. Pizcueta,M.P., Pique,J.M., Bosch,J., Whittle,B.J., and Moncada,S. (1992a). Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 105, 184-190.
139. Pizcueta,P., Pique,J.M., Fernandez,M., Bosch,J., Rodes,J., Whittle,B.J., and Moncada,S. (1992b). Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 103, 1909-1915.
140. Pozzi,M., Grassi,G., Redaelli,E., Dell'oro,R., Ratti,L., Redaelli,A., Foglia,G., Di Lelio,A., and Mancina,G. (2001). Patterns of regional sympathetic nerve traffic in preascitic and ascitic cirrhosis. *Hepatology* 34, 1113-1118.
141. Ralevic,V. (2002). Endothelial nitric oxide modulates perivascular sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 137, 19-28.
142. Ralevic,V., Edvinsson,L., and Burnstock,G. (1994). Inhibition of neuropeptide Y-induced augmentation of noradrenaline-induced vasoconstriction by D-myo-inositol 1,2,6-trisphosphate in the rat mesenteric arterial bed. *Acta Physiol Scand.* 151, 309-317.
143. Rosenfeld,C.R., Chen,C., Roy,T., and Liu,X. (2003). Estrogen selectively up-regulates eNOS and nNOS in reproductive arteries by transcriptional mechanisms. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10, 205-215.
144. Rudehill,A., Franco-Cereceda,A., Hemsén,A., Stensdotter,M., Pernow,J., and Lundberg,J.M. (1989). Cigarette smoke-induced elevation of plasma neuropeptide Y levels in man. *Clin. Physiol* 9, 243-248.
145. Rudolf,K., Eberlein,W., Engel,W., Wieland,H.A., Willim,K.D., Entzeroth,M., Wiene,W., Beck-Sickingher,A.G., and Doods,H.N. (1994). The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist: BIBP3226. *Eur. J. Pharmacol.* 271, R11-R13.
146. Russwurm,M., Behrends,S., Harteneck,C., and Koesling,D. (1998). Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. J.* 335, 125-130.

147. Schultz,G.,Böhme,E.und Munske,K. (1969). Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* 8, 1323-1332.
148. Selbie,L.A., Darby,K., Schmitz-Peiffer,C., Browne,C.L., Herzog,H., Shine,J., and Biden,T.J. (1995). Synergistic interaction of Y1-neuropeptide Y and alpha 1b-adrenergic receptors in the regulation of phospholipase C, protein kinase C, and arachidonic acid production. *J. Biol. Chem.* 19;270, 11789-11796.
149. Shah,V., Wiest,R., Garcia-Cardena,G., Cadelina,G., Groszmann,R.J., and Sessa,W.C. (1999). Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *Am. J. Physiol* 277, G463-G468.
150. Shesely,E.G., Maeda,N., Kim,H.S., Desai,K.M., Krege,J.H., Laubach,V.E., Sherman,P.A., Sessa,W.C., and Smithies,O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 13176-13181.
151. Sieber,C.C. and Groszmann,R.J. (1992a). In vitro hyporeactivity to methoxamine in portal hypertensive rats: reversal by nitric oxide blockade. *Am. J. Physiol* 262, G996-1001.
152. Sieber,C.C. and Groszmann,R.J. (1992b). Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 103, 235-239.
153. Sieber,C.C., Lopez-Talavera,J.C., and Groszmann,R.J. (1993). Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 104, 1750-1754.
154. Sieber,C.C., Sumanovski,L.T., Moll-Kaufmann,C., and Stalder,G.A. (1997). Hyposensitivity to nerve stimulation in portal hypertensive rats: role of nitric oxide. *Eur. J. Clin. Invest* 27, 902-907.
155. Silver,P.J., Pagani,E.D., Dundore,R.L., de Garavilla,L., Bode,D.C., and Bacon,E.R. (1998). Cardiovascular activity of WIN 65579, a novel inhibitor of cyclic GMP phosphodiesterase 5. *Eur. J. Pharmacol.* 349, 263-268.
156. Song,Y., Zweier,J.L., and Xia,Y. (2001). Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca²⁺/calmodulin binding. *Biochem. J.* 355, 357-360.
157. Stanarius,A., Seidel,B., and Wolf,G. (1998). Neuronal nitric oxide synthase in the vasculature of the rat brain: an immunocytochemical study using the tyramide signal amplification technique. *J. Neurocytol.* 27, 731-736.
158. Stebbins,C.E., Russo,A.A., Schneider,C., Rosen,N., Hartl,F.U., and Pavletich,N.P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
159. Sternini,C. and Brecha,N. (1985). Distribution and colocalization of neuropeptide Y- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the guinea-pig heart. *Cell Tissue Res.* 241, 93-102.

160. Straub,R., Mayer,M., Kreutz,M., Leeb,S., Schölmerich,J., and Falk,W. (2000). Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 553-558.
161. Stuehr,D.J. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:339-59.
162. Tatemoto,K. (1982a). Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 2514-2518.
163. Tatemoto,K. (1982b). Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 5485-5489.
164. Tatemoto,K., Carlquist,M., and Mutt,V. (1982). Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296, 659-660.
165. Thiemann,C. (2004). The role of the L-Arginine: Nitric oxide pathway in circulatory shock. *Adv. Pharmacol.* 28, 45-79.
166. Toda,N., Ayajiki,K., and Okamura,T. (1993). Endothelial modulation of contractions caused by oxyhemoglobin and NG-nitro-L-arginine in isolated dog and monkey cerebral arteries. *Stroke* 24, 1584-1588.
167. Toda,N., Ayajiki,K., Uchiyama,M., and Okamura,T. (1997b). Nitric oxide-mediated neurogenic vasodilatation in isolated monkey lingual arteries. *Am. J. Physiol* 272, H1582-H1588.
168. Toda,N., Ayajiki,K., Uchiyama,M., and Okamura,T. (1997a). Nitric oxide-mediated neurogenic vasodilatation in isolated monkey lingual arteries. *Am. J. Physiol* 272, H1582-H1588.
169. Toda,N., Baba,H., and Okamura,T. (1990). Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Jpn. J. Pharmacol.* 53, 281-284.
170. Toda,N., Kimura,T., Yoshida,K., Bredt,D.S., Snyder,S.H., Yoshida,Y., and Okamura,T. (1994a). Human uterine arterial relaxation induced by nitroxidergic nerve stimulation. *Am. J. Physiol* 266, H1446-H1450.
171. Toda,N., Kitamura,Y., and Okamura,T. (1994b). Role of nitroxidergic nerve in dog retinal arterioles in vivo and arteries in vitro. *Am. J. Physiol* 266, H1985-H1992.
172. Toda,N. and Okamura,T. (1990). Modification by L-NG-monomethyl arginine (L-NMMA) of the response to nerve stimulation in isolated dog mesenteric and cerebral arteries. *Jpn. J. Pharmacol.* 52, 170-173.
173. Toda,N. and Okamura,T. (1991). Reciprocal regulation by putatively nitroxidergic and adrenergic nerves of monkey and dog temporal arterial tone. *Am. J. Physiol* 261, H1740-H1745.

174. Toda,N. and Okamura,T. (1992). Mechanism of neurally induced monkey mesenteric artery relaxation and contraction. *Hypertension* 19, 161-166.
175. Toda,N. and Okamura,T. (2003). The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol. Rev.* 55, 271-324.
176. Toernebrandt,K., Nobin,A., and Owman,C. (1985). Pharmacological characterization of alpha-adrenergic receptor subtypes mediating contraction in human mesenteric arteries and veins. *Blood Vessels* 22, 179-195.
177. Uddman,R., Sundler,F., and Emson,P. (1984). Occurrence and distribution of neuropeptide-Y-immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res.* 237, 321-327.
178. Ullman,B., Franco-Cereceda,A., Hulting,J., Lundberg,J.M., and Sollevi,A. (1990). Elevation of plasma neuropeptide Y-like immunoreactivity and noradrenaline during myocardial ischaemia in man. *J. Intern. Med.* 228, 583-589.
179. Venema,R.C., Venema,V.J., Ju,H., Harris,M.B., Snead,C., Jilling,T., Dimitropoulou,C., Maragoudakis,M.E., and Catravas,J.D. (2003).Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285, H669-H678.
180. Vials,A.J., Crowe,R., and Burnstock,G. (1997). A neuromodulatory role for neuronal nitric oxide in the rabbit renal artery. *Br. J. Pharmacol.* 121, 213-220.
181. Vorobioff,J., Bredfeldt,J.E., and Groszmann,R.J. (1983). Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am. J. Physiol* 244, G52-G57.
182. Wahlestedt,C., Edvinsson,L., Ekblad,E., and Hakanson,R. (1985). Neuropeptide Y potentiates noradrenaline-evoked vasoconstriction: mode of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234, 735-741.
183. Wahlestedt,C., Hakanson,R., Vaz,C.A., and Zukowska-Grojec,Z. (1990). Norepinephrine and neuropeptide Y: vasoconstrictor cooperation in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol* 258, R736-R742.
184. Wahlestedt,C., Yanaihara,N., and Hakanson,R. (1986). Evidence for different pre-and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.* 13, 307-318.
185. Wang,Y., Newton,D.C., and Marsden,P.A. (1999a). Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev. Neurobiol.* 13, 21-43.
186. Wang,Y., Newton,D.C., and Marsden,P.A. (1999b). Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Crit Rev. Neurobiol.* 13, 21-43.
187. Weiner,C.P., Knowles,R.G., and Moncada,S. (1994). Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171, 838-843.

188. Wiest,R. and Groszmann,R.J. (1999). Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin. Liver Dis.* *19*, 411-426.
189. Wiest,R., Shah,V., Sessa,W.C., and Groszmann,R.J. (1999). NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats. *Am. J. Physiol* *276*, G1043-G1051.
190. Wiest,R., Tsai,M.H., and Groszmann,R.J. (2001). Octreotide potentiates PKC-dependent vasoconstrictors in portal-hypertensive and control rats. *Gastroenterology* *120*, 975-983.
191. Winther,J.E., Espersen,K., Kanstrup,I.L., and Christensen,N.J. (1992). Age-related changes of exercise-induced plasma catecholamines and neuropeptide Y responses in normal human subjects. *Acta Physiol Scand.* *144*, 129-133.
192. Xu,D.L., Martin,P.Y., St John,J., Tsai,P., Summer,S.N., Ohara,M., Kim,J.K., and Schrier,R.W. (1996). Upregulation of endothelial and neuronal constitutive nitric oxide synthase in pregnant rats. *Am. J. Physiol* *271*, R1739-R1745.
193. Xu,L., Carter,E.P., Ohara,M., Martin,P.Y., Rogachev,B., Morris,K., Cadnapaphornchai,M., Knotek,M., and Schrier,R.W. (2000). Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. *Am. J. Physiol Renal Physiol* *279*, F1110-F1115.
194. Yamamoto,R., Kawasaki,H., and Takasaki,K. (1984). Postsynaptic alpha-adrenoreceptor populations in several vascular systems of the anaesthetized rat. *J. Auton. Pharmacol.* *4*, 231-239.
195. Yoshida,K., Okamura,T., Kimura,H., Bredt,D.S., Snyder,S.H., and Toda,N. (1993). Nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibers in dog cerebral and peripheral arteries. *Brain Res.* *629*, 67-72.
196. Yoshida,K., Okamura,T., and Toda,N. (1994). Histological and functional studies on the nitrooxidergic nerve innervating monkey cerebral, mesenteric and temporal arteries. *Jpn. J. Pharmacol.* *65*, 351-359.
197. Zabel,U., Hausler,C., Weeger,M., and Schmidt,H.H. (1999). Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *J. Biol. Chem.* *274*, 18149-18152.
198. Zukowska-Grojec,Z., Haass,M., and Bayorh,M.A. (1986). Neuropeptide Y and peptide YY mediate nonadrenergic vasoconstriction and modulate sympathetic responses in rats. *Regul. Pept.* *15*, 99-110.

9. Eigene Publikationen

1. Jurzik, L., Straub, R.H., Schölmerich, J., Wiest, R.(2004). Up-regulation of nNOS and associated increase in Neurogenic-vasodilation in superior mesenteric arteries in portal hypertension. (eingereicht)
2. Wiest, R., Jurzik, L., Schölmerich, J., Straub, R.H. (2004). Enhanced vasoconstrictive action of neuropeptide Y (NPY) in superior mesenteric arteries in portal hypertension (eingereicht)

10. Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. A. Kurtz für die Überlassung des Themas und für die Bereitschaft, die fakultätsinterne Betreuung und Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. R.H. Straub für die hervorragende und engagierte Betreuung während der Dissertation sowie für die Unterstützung und die vielen wertvollen Anregungen bei zahlreichen Fragestellungen und Problemen.

Herrn Prof. Dr. J. Schölmerich (Direktor der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I) danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. R. Wiest für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, für die gute Zusammenarbeit, für die vielen hilfreichen Diskussionen sowie für die instruktiven Gespräche.

Bei Frau Prof. Dr. R. Baumann, Frau Prof. Dr. I.A. Neumann und Herrn Prof. Dr. R. Warth bedanke ich mich für ihre freundliche Bereitschaft, die Prüfungskommission zu stellen.

Herr Prof. Dr. W. Falk und Frau PD Dr. C. Wagner halfen mir bei den Fragestellungen im Bereich der Molekularbiologie – vielen Dank an dieser Stelle.

Ich möchte mich herzlich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R.H. Straub bedanken, die mich stets hilfreich unterstützt hat. Besondere Anerkennung verdient hier Frau Dipl. oec. troph. C. Weidler, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein Dank gilt ebenfalls der gesamten „FoBau-Mannschaft“ der Klinik und Poliklinik für Inneren Medizin I für das angenehme und produktive Arbeitsklima, die vielen Hilfestellungen in allen Belangen sowie die Bereitschaft zu konstruktiver Kritik.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung und den großen Rückhalt während dieser Arbeit bedanken. Ein großes Dankeschön geht auch an meine Schwester Heike Jurzik, M.A., für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit und für die zahlreichen Anregungen.

Regensburg, 21.07.2004

Lars Jurzik