

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>11</b>
1.1	Vasoprotektive Wirkungen von Stickstoffmonoxid.....	13
1.2	Kardiovaskuläre Erkrankungen und oxidativer Stress .....	14
1.3	Körperliches Training und eNOS Funktion .....	16
1.4	Effekte von "shear stress" und oxidativem Stress auf die eNOS-Expression.....	17
1.5	Training und oxidativer Stress .....	19
1.6	Wasserstoffperoxid als vaskuläres Signalmolekül.....	21
1.6.1	Vaskuläre Produktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	21
1.6.2	Enzymatischer Abbau von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	22
1.6.2.1	Abbau durch Catalase.....	22
1.6.2.2	Abbau durch Peroxidasen.....	22
1.6.3	Vaskuläre Effekte von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	23
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
3.1	Puffer und Lösungen .....	33
3.2	Allgemeine Methoden.....	36
3.2.1	Versuchstiere .....	36
3.2.2	Funktionelle Untersuchungen an Ratten-und Mausearten .....	36
3.2.2.1	Präparation isolierter Aortensegmente.....	36
3.2.2.2	Untersuchung isolierter Aortenringe im Organbad .....	37
3.2.3	Präparation und Analyse von DNA.....	42
3.2.3.1	Isolierung von genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Maus .....	42
3.2.3.2	Vermehrung von Plasmid-DNA in Escherichia coli-Zellen.....	42
3.2.3.3	Restriktion von DNA.....	44
3.2.3.4	T4-DNA-Polymerasereaktionen .....	44
3.2.3.5	Auftrennung von DNA in nativen Agarosegelen.....	45
3.2.3.6	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	45

---

3.2.3.7	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	46
3.2.3.8	Ligation von DNA .....	46
3.2.3.9	Sequenzierung von DNA.....	47
3.2.3.10	PCR (Polymerasekettenreaktion).....	47
3.2.3.11	Kompetitive PCR.....	48
3.2.3.12	Generierung des internen DNA-Standards: .....	48
3.2.3.13	Southern Blot .....	50
3.2.4	Präparation und Analyse von RNA.....	53
3.2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe .....	53
3.2.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	53
3.2.4.3	RNA-Denaturierungsgel .....	54
3.2.4.4	RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) .....	54
3.2.4.5	Kompetitive RT-PCR.....	54
3.2.4.6	Generierung eines internen RNA-Standards.....	55
3.2.5	Präparation und Analyse von Proteinen .....	57
3.2.5.1	Isolierung von Proteinen aus Tiergeweben .....	57
3.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen .....	57
3.2.5.3	Western Blot .....	58
3.2.6	Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	60
3.2.6.1	Bestimmung der Catalaseaktivität.....	60
3.2.7	Trainingsversuche .....	61
3.2.8	Fütterungsversuche.....	62
3.2.9	Messung von Blutdruck-und Herzfrequenz an der Maus.....	62
3.2.10	Statistik.....	65
3.3	Generierung der transgenen Tierlinie.....	66
3.3.1	Herstellung des Genkonstruktes .....	66
3.3.1.1	Ausgangsplasmide:.....	66
3.3.1.2	Klonierung des Konstruktes .....	68
3.3.2	Mikroinjektion .....	75

---

3.4	Methoden zur Analyse der transgenen Tierlinie .....	75
3.4.1	Genotypisierung .....	75
3.4.2	Kompetitive PCR.....	78
3.4.3	Southern Blot .....	79
3.4.4	Kompetitive RT-PCR.....	80
3.4.4.1	Etablierung einer transgenspezifischen kompetitiven RT-PCR.....	80
3.4.4.2	Etablierung einer kompetitiven RT-PCR zum Nachweis der Gesamt-Catalase-mRNA.....	83
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>87</b>
4.1	Einfluss von Superoxidradikalen auf isolierte Gefäße .....	89
4.1.1	Vasorelaxation .....	89
4.1.2	Expression der Guanylatcyclase .....	90
4.2	Charakterisierung der transgenen Tierlinie.....	92
4.2.1	Charakterisierung der Foundertiere.....	92
4.2.1.1	Genotypisierung .....	92
4.2.1.2	Southern Blot .....	93
4.2.1.3	Kompetitive PCR.....	95
4.2.1.4	Bestimmung der Catalaseaktivität-und-expression in Foundertieren ...	97
4.2.2	Charakterisierung der transgenen Mauslinie auf DNA-Ebene.....	99
4.2.3	Charakterisierung der transgenen Mauslinie auf mRNA-Ebene.....	100
4.2.3.1	Nachweis der Transkription des Transgens .....	100
4.2.3.2	Quantitative Analyse der Transgen mRNA .....	102
4.2.3.3	Quantitative Analyse der gesamten Catalase-mRNA.....	103
4.2.4	Charakterisierung der transgenen Mauslinien auf Proteinebene.....	104
4.2.4.1	Quantitative Analyse des gesamten Catalaseproteins .....	104
4.2.4.2	Bestimmung der Catalaseaktivität.....	106
4.3	Funktionelle Untersuchungen an isolierten Blutgefäßen .....	107
4.3.1	Untersuchungen zum Einfluss der Catalase-Überexpression auf die Funktionalität der Gefäße .....	107
4.3.1.1	Kontraktionstest mit Kaliumchlorid .....	107

---

4.3.1.2	$\alpha_1$ -Rezeptor-vermittelte Kontraktion.....	108
4.3.1.3	Endothelabhängige Relaxation (endogenes NO).....	110
4.3.1.4	Relaxation nach Gabe des NO-Donors DEA-NO (exogenes NO).....	111
4.3.1.5	Relaxation nach Gabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	112
4.3.2	Untersuchungen zum Einfluss der Haltung der Tiere auf die Funktionalität der Gefäße.....	113
4.3.2.1	Kontraktionstest mit Kaliumchlorid .....	113
4.3.2.2	$\alpha_1$ -Rezeptor-vermittelte Kontraktion.....	114
4.3.2.3	Endothelabhängige Relaxation (endogenes NO).....	115
4.3.2.4	Relaxation nach Gabe des NO-Donors SNAP (exogenes NO).....	116
4.4	Messung von Blutdruck-und Herzfrequenz.....	117
4.4.1	Untersuchung von C57BL/6-Mäusen .....	117
4.4.2	Untersuchung von Catalase-überexprimierenden Tiere .....	118
4.4.2.1	Untersuchung der Tierlinien mit schwacher Catalase-Überexpression.....	118
4.4.2.2	Untersuchung der Tierlinie mit starker Überexpression .....	119
4.4.2.3	Einfluss der Aminotriazolbehandlung auf Blutdruck und Herzfrequenz der Mäuse.....	121
4.5	Untersuchungen der Effekte von körperlichem Training.....	124
4.5.1	Einfluß von körperlichem Training auf Körpergewicht und Herzgewicht der Tiere .....	124
4.5.2	Einfluss von körperlichem Training auf die Catalase-Expression.....	125
4.5.3	Einfluss von körperlichem Training auf die eNOS-Expression .....	127
4.5.4	Einfluss der Haltung der Tiere auf die basale eNOS Expression und die Heraufregulation der eNOS durch körperliches Training .....	130
4.6	Einfluß der Catalase-Überexpression auf die eNOS-Expression .....	133
4.6.1	Einfluß der Catalase-Überexpression auf die basale eNOS-Expression.....	133
4.6.2	Einfluss der Catalase-Überexpression auf die trainings-induzierte Heraufregulation der eNOS-Expression .....	135

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>139</b>
5.1	Die Bedeutung von endothelialem oxidativen Stress für die Gefäßfunktion.....	142
5.2	Die Bedeutung von körperlichem Training für die Gefäßfunktion .....	144
5.3	Mechanismen der Regulation der eNOS-Expression durch Training .....	146
5.4	Trangeses Mausmodell mit endothelialer Überexpression von Catalase .....	150
5.5	Beteiligung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> an der Regulation der eNOS-Expression durch Training .....	156
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>159</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>163</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>165</b>
	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>167</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>171</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>173</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>183</b>