

Aus dem  
Institut für Pharmakologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Die eNOS als ein therapeutisches Zielmolekül  
kardiovaskulärer Erkrankungen:  
von molekularen Mechanismen bis zu Tiermodellen**

Habilitationsschrift  
(kumulativ)  
zur Erlangung der *venia legendi*  
für das Fach Pharmakologie

dem Fachbereich Medizin der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz vorgelegt  
von

Dr. med. Huige Li

März 2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Liste der in das Habilitationsverfahren eingebrachten Publikationen .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Zusammenfassung.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
3.1. Das von der eNOS stammende NO ist ein schützendes Molekül im Gefäßsystem. ....	5
3.1.1. <i>Biosynthese von NO</i> .....	5
3.1.2. <i>Biologische Wirkung des endothelialen NO</i> .....	5
3.2. Regulation der eNOS-Aktivität .....	6
3.3. Regulation der eNOS-Expression .....	6
3.3.1. <i>Schubspannung</i> .....	7
3.3.2. <i>Östrogene</i> .....	7
3.3.3. <i>Statine</i> .....	8
3.3.4. <i>Glucocorticoide</i> .....	9
3.3.5. <i>Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)</i> .....	9
<b>4. Methoden .....</b>	<b>11</b>
4.1. Zellkultur.....	11
4.2. Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	11
4.3. Organbadversuche.....	13
4.4. Tierversuche .....	13
<b>5. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>14</b>
5.1 Die Expression der eNOS kann pharmakologisch gesteigert werden. ....	14
5.1.1. <i>PKC-Aktivatoren</i> .....	14
5.1.2. <i>Staurosporinanaloga</i> .....	14
5.1.3. <i>Flavonoide</i> .....	16
5.1.4. <i>Rotwein und Resveratrol</i> .....	17
5.2 Einer Erhöhung der eNOS-Expression ist nicht immer protektiv – das Phänomen der eNOS-Entkopplung.....	17
5.2.1. <i>eNOS-Entkopplung in kultivierten Endothelzellen</i> .....	18
5.2.2. <i>eNOS-Entkopplung in Tiermodellen</i> .....	19
5.2.3. <i>Oxidativer Stress ist eine Ursache der eNOS-Entkopplung</i> .....	19
5.3. Pharmakologische Unterdrückung des vaskulären oxidativen Stresses kann eine eNOS-Entkopplung revertieren.....	20
5.4. Korrektur der eNOS-Entkopplung und Steigerung der eNOS-Expression erscheint als eine praktikable therapeutische Strategie für kardiovaskuläre Erkrankungen .....	22
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>25</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>26</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>31</b>

## 1. Liste der in das Habilitationsverfahren eingebrachten Publikationen:

- (1) **Li H**, Oehrlein SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulschöfer T, Jessen T, Herget T, Förstermann U and Kleinert H (1998) Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 53:630-637.
- (2) **Li H** and Förstermann U (2000) Structure-activity relationship of staurosporine analogs in regulating expression of endothelial nitric-oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 57:427-435.
- (3) Hink U\*, **Li H\***, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Förstermann U and Münzel T (2001) Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ Res* 88:e14-e22 (\*both authors contributed equally).
- (4) **Li H**, Junk P, Huwiler A, Burkhardt C, Wallerath T, Pfeilschifter J and Förstermann U (2002) Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106:2250-2256.
- (5) **Li H**, Burkhardt C, Heinrich U-R, Brausch I, Xia N and Förstermann U (2003) Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. *Circulation* 107:2348-2354.
- (6) **Li H**, Xia N, Brausch I, Yao Y and Förstermann U (2004) Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 310:926-932.
- (7) **Li H**, Hergert SM, Schäfer SC, Brausch I, Yao Y, Huang Q, Mang C, Lehr HA and Förstermann U (2005) Midostaurin upregulates eNOS gene expression and preserves eNOS function in the microcirculation of the mouse. *Nitric Oxide* 12:231-236.
- (8) **Li H**, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Münzel T and Förstermann U (2006) Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 47:2536-2544.

## 2. Zusammenfassung

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) erfüllt – solange sie funktionell ist – vasoprotektive und anti-atherosklerotische Funktionen im kardiovaskulären System. So stellt eine Steigerung der eNOS-Genexpression einen potentiellen Ansatz zur Prävention und/oder Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Wir haben in der Vergangenheit verschiedene molekulare Mechanismen der eNOS-Expressionssteigerung unter physiologischen, pathologischen und pharmakologischen Bedingungen beschrieben und charakterisiert. In vielen Fällen ging eine Erhöhung der eNOS-Expression mit erhöhter NO-Produktion einher, so z.B. nach Behandlung mit Östrogenen, Histamin, Staurosporinanaloga, Flavonoiden aus Artischocke und Polyphenolen aus Rotwein. Aber bei diesen Untersuchungen wurde auch klar, dass eine gesteigerte eNOS-Genexpression nicht immer mit der Produktion bioaktiven NOs einhergeht. So war unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen die eNOS-Expression gesteigert, ging aber mit einer verminderten Freisetzung bioaktiven NOs einher. Beispiele sind: Ceramid-behandelte Endothelzellen sowie Blutgefäße aus spontan-hypertensiven Ratten, Angiotensin II-induzierten hypertensiven Ratten, Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes. In diesen Modellen wurden experimentelle Hinweise auf eine „eNOS-Entkopplung“, d.h. die NOS-katalysierte Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies, gefunden.

Die Entdeckung des Phänomens der Entkopplung von Sauerstoff-Reduktion und NO-Produktion bei der eNOS (eNOS-Entkopplung) hatte zunächst die Hypothese, eine Expressionssteigerung der eNOS als therapeutisches Ziel anzuvisieren, in Frage gestellt. Wir haben jedoch in den letzten Jahren Substanzen gefunden, die die eNOS-Expression steigern, aber auch gleichzeitig die eNOS-Entkopplung revertieren können. Midostaurin z.B. korrigierte einerseits die eNOS-Entkopplung durch Unterdrückung der Expression der vaskulären NADPH-Oxidasen und erhöhte andererseits die eNOS-Expression im Gefäß-Endothel. Kombination dieser beiden Wirkungen führte zur Relaxation der Widerstandsgefäße in atherosklerotischen Mäusen und zur Blutdrucksenkung in spontan-hypertensiven Ratten. So scheint es eine praktikable Strategie für kardiovaskuläre Erkrankungen zu sein, die eNOS-Expression zu steigern und gleichzeitig die eNOS-Entkopplung zu verhindern bzw. eine bereits bestehende eNOS-Entkopplung zu revertieren.

### **3. Einleitung**

#### **3.1. Das von der eNOS stammende NO ist ein schützendes Molekül im Gefäßsystem.**

##### **3.1.1. Biosynthese von NO**

Die Biosynthese von Stickstoffmonoxid (NO) wird in Zellen vom Enzym NO-Synthase (NOS; EC 1.14.13.39) katalysiert, von dem drei Isoenzyme identifiziert und charakterisiert sind: die neuronale nNOS, die induzierbare iNOS und die endotheliale eNOS (Förstermann et al., 1994). Alle drei NOS-Isoenzyme oxidieren den Guanidino-Stickstoff der Aminosäure L-Arginin zu NO und L-Citrullin. Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und molekularer Sauerstoff fungieren als Kosubstrate. Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und Häm dienen in allen drei Isoformen als prosthetische Gruppen. Ein weiterer essentieller Kofaktor ist 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>). Wichtig für die katalytische Aktivität der drei NOS-Isoformen ist die Bildung von Homodimeren, für sie scheint Häm essentiell zu sein (Förstermann et al., 1994; Förstermann & Münzel, 2006).

##### **3.1.2. Biologische Wirkung des endothelialen NO**

Die eNOS erfüllt wichtige protektive Funktionen im kardiovaskulären System. Das von ihr produzierte NO ist ein potenter Vasodilatator, der konstant zur Verminderung des Gefäßtonus und des Blutdrucks beiträgt. Mäuse mit einem deletierten eNOS-Gen entwickeln eine Hypertonie (Huang et al., 1995). Weiter schützt das endotheliale NO vor Plättchenaggregation und -adhäsion. Durch die NO-vermittelte Unterdrückung der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen wird auch die Adhäsion von Leukozyten (und ihre nachfolgende Immigration) gehemmt. Schließlich unterdrückt NO auch die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur (Förstermann et al., 1994; Li & Förstermann, 2000). Zusammengenommen vermittelt das endotheliale NO wichtige vasoprotektive und anti-atherosklerotische Wirkungen. Umgekehrt wird bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen vaskuläres NO vermehrt durch Sauerstoffradikale inaktiviert, was

dann der Progression der Atherosklerose Vorschub leistet (Förstermann et al., 1994; Li & Förstermann, 2000).

### **3.2. Regulation der eNOS-Aktivität**

Die Aktivität der eNOS wird durch verschiedene Faktoren moduliert, wobei hier die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration den wichtigsten aktivierenden Mechanismus darstellt. Innerhalb der Zelle ist die eNOS über einen Myristoyl- und einen Palmitoyl-Rest in der Plasmamembran verankert, wo sie in Caveolae genannten Mikrodomänen lokalisiert ist (Shaul, 2002). Die ebenfalls in den Caveolae lokalisierten Proteine der Caveolin-Familie inhibieren direkt die Aktivität der eNOS. Durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung und Bildung des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexes kann die Bindung der eNOS an Caveolin gelöst und die eNOS aktiviert werden. Eine weitere Erklärung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der eNOS ist die Verdrängung des sogenannten „selbsthemmenden Elementes“, was durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an die eNOS aufgehoben werden kann (Fleming & Busse, 2003).

Darüber hinaus kann die eNOS-Aktivität durch Phosphorylierung des Enzyms mittels unterschiedlicher Phosphokinasen reguliert werden. So führt die Phosphorylierung des Serin<sup>1177</sup> zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Stimulation der NO-Produktion (Dimmeler et al., 1999), während die Phosphorylierung des Thyrosin<sup>495</sup> die eNOS-Aktivität hemmt (Fleming et al., 2001). Die Enzym-Aktivität der eNOS wird auch durch mehrere Interaktionsproteine, wie z.B. Hsp90 (Garcia-Cardena et al., 1998), NOSIP (Dedio et al., 2001) und NOSTRIN (Zimmermann et al., 2002), reguliert.

### **3.3. Regulation der eNOS-Expression**

Während die eNOS früher als konstitutiv exprimiertes Enzym angesehen wurde, ist heute klar, dass ihre Expression einer komplexen Regulation unterliegt. So zeigt die aktuelle Literatur, dass verschiedene physikalische, biochemische und pharmakologische Einflüsse in der Lage sind, die Expression der eNOS zu regulieren. Hier sind nur ein paar Beispiele erwähnt. Details sind in unseren Übersichtsartikeln der vergangenen Jahre ausgeführt (Li & Förstermann, 2000a; Li et al., 2002b; Li et al., 2002c).

### 3.3.1. Schubspannung

Einer der wichtigsten Stimuli für die eNOS-Expression ist die Schubspannung („laminar shear stress“), die durch das fließende Blut auf die Endothelzellen einwirkt. Schubspannung verstärkt sowohl die Transkription also auch die mRNA-Stabilität der eNOS (Davis et al., 2001); die Tyrosinkinase cSrc ist in beide Ereignisse involviert. Die durch Schubspannung induzierte eNOS-Expression benötigt zusätzlich noch die MAP-Kinasen Ras/Raf/MEK1/2 und die Erk1/2. Die Schubspannungs-bedingte Stabilisierung der eNOS-mRNA ist dagegen von den MAP-Kinasen unabhängig (Davis et al., 2001). Die Aktivierung des eNOS-Promotors wird durch Bindung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an das „shear stress-responsive element“ (5'-GAGACC-3', lokalisiert zwischen -990 und -984) (Davis et al., 2004) verursacht. In einer weiteren Region des eNOS-Promotors, nämlich zwischen -652 und -644, bindet der „Kruppel-like factor“ KLF2 (SenBanerjee et al., 2004). Interessanterweise scheint die Wirkung der beiden Transkriptionsfaktoren, NF- $\kappa$ B und KLF2, koordiniert zu sein. Die Schubspannungs-induzierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B erreicht das Maximum nach 30 min, die maximale Induktion des KLF2 wird nach 6h erzielt (Searles, 2006).

Für die Stabilisierung der eNOS-mRNA scheint 3'-Polyadenylierung wichtig zu sein (Weber et al., 2005). mRNAs mit langem 3'-Poly(A)-Schwanz sind stabiler und haben eine höhere Translationsaktivität (Mazumder et al., 2003). Die der Schubspannung ausgesetzten Endothelzellen zeigen eine erhöhte Expression von eNOS-mRNA mit langem 3'-Poly(A)-Schwanz. Die Halbwertszeit dieser eNOS-mRNA ist deutlich verlängert und weist eine höhere Translationseffizienz auf, als eNOS-mRNA aus statischen Endothelzellen, die nicht der Schubspannung ausgesetzt wurde (Weber et al., 2005).

### 3.3.2. Östrogene

Für Östrogene konnten wir eine signifikante Stimulation der eNOS-Genexpression in menschlichen Endothelzellen demonstrieren. Diese eNOS-Expressionssteigerung ist transkriptionell vermittelt. Die eNOS-mRNA-Stabilität bleibt nach Behandlung mit Östrogenen unverändert. Die Stimulation der eNOS-Expression

ist über Östrogenrezeptoren vermittelt, da sie mit Östrogenrezeptor-Antagonisten hemmbar ist. Der menschliche eNOS-Promotor enthält kein *bona fide* „*estrogen response element*“ (ERE) und die vorhandenen „half-sites“ zeigen im Gelretardationsassay keine vermehrte Bindung nukleärer Proteine nach Östrogenstimulation. Die Transkriptionssteigerung korreliert mit einer vermehrten Bindung des essentiellen Transkriptionsfaktors SP1 (Kleinert et al., 1998).

### 3.3.3. Statine

Statine bewirken über eine kompetitive Hemmung des Schrittmacherenzym HMG-CoA-Reduktase die Inhibition des Mevalonat-Syntheseweges mit nachfolgend verminderter Cholesterinproduktion in Hepatozyten. Darüber hinaus konnten aber auch cholesterinunabhängige, pleiotrope Effekte der Statine nachgewiesen werden (Liao & Laufs, 2005).

In kultivierten Endothelzellen sowie in Versuchstieren führt eine Statin-Behandlung zur Steigerung der eNOS-Expression (Laufs et al., 1998). Isoprenoide sind Intermediate des Mevalonat-Syntheseweges, deren Bildung durch Statine gehemmt wird. Dadurch blockieren Statine die Geranylgeranylierung der Rho-Kinase, die für die Translokation vom Cytosol an die Membran und die Aktivität des Enzyms essentiell ist. Die aktivierte Rho-Kinase ist in die Polymerisation der Aktinfilamente und die Ausbildung von *actin-stress-fibers* involviert. Für die Stabilität und Translation der mRNA ist eine Verankerung im Aktinzytoskelett notwendig. So führt Rho-vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts zur Dissoziation und Destabilisierung der eNOS-mRNA. Hemmung der Rho-Kinase steigert die Halbwertszeit der eNOS-mRNA und damit auch die eNOS-mRNA-Expression (Endres & Laufs, 2004).

Statinbehandlung führt während eines experimentell induzierten Schlaganfalls zur Steigerung des zerebralen Blutflusses mit nachfolgender Neuroprotektion (Endres et al., 1998; Laufs et al., 2000). Diese schützende Wirkung fehlt jedoch in eNOS-Knockout-Mäusen (Endres et al., 1998; Laufs et al., 2000). So lässt sich die neuroprotektive Wirkung der Statine auf die eNOS-Expressionssteigerung zurückführen.



### 3.3.4. Glucocorticoide

Glucocorticoide vermindern die eNOS-RNA- und Protein-Expression in humanen Endothelzellen (Wallerath et al., 1999). Diesem Phänomen liegt eine Kombination aus verminderter Transkription und Destabilisierung der eNOS-mRNA zugrunde. eNOS-mRNA und eNOS-Protein fallen parallel ab, so dass eine Modulation der Translation nicht stattzufinden scheint. Die Hemmung der eNOS-Expression wird über Glucocorticoidrezeptoren vermittelt, da sie mit Glucocorticoidrezeptor-Antagonisten unterdrückbar ist. Allerdings fehlt dem humanen eNOS-Promotor ein vollständiges „*glucocorticoid response element*“ (GRE). Gelretardationsanalysen mit verschiedenen Transkriptionsfaktor-bindenden Oligonucleotiden zeigen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Bindung des essentiellen Transkriptionsfaktors GATA unter Glucocorticoid-Behandlung. Auch *in vivo* führen Glucocorticoide zu einer Herunterregulation der eNOS. Orale Verabreichung von Dexamethason bewirkt in verschiedenen (endothelreichen) Rattenorganen eine Abnahme der eNOS-mRNA. Dies geht einher mit einem Abfall der Plasmaspiegel von  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  um etwa den gleichen Prozentsatz.  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  sind die im Plasma messbaren, stabilen Oxidationsprodukte des NO. In der Mikrozirkulation lässt sich nach Glucocorticoid-Behandlung eine Abschwächung der endothelabhängigen Vasodilatation nachweisen. Die funktionelle Relevanz dieser Glucocorticoid-induzierten Herunterregulation der eNOS (und damit der NO-Produktion) zeigte sich in einem signifikanten, reversiblen Anstieg des Blutdrucks der behandelten Tiere (Wallerath et al., 1999). In Glucocorticoid-behandelten Wildtyp-Mäusen ist eine Abnahme der eNOS-Expression mit einem Anstieg des Blutdrucks gekoppelt. Der Blutdruck in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen bleibt durch Glucocorticoide jedoch unbeeinflusst (Wallerath et al., 2004) (Wallerath et al. 2004). Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass sich der (auch klinisch zu beobachtende) Blutdruckanstieg nach Glucocorticoid-Gabe zumindest zum Teil auf eine Abschwächung der Expression der endothelialen NOS zurückführen lässt.

### 3.3.5. Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)

Behandlung der Endothelzellen mit Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) führt zur Erhöhung der eNOS-Expression (Drummond et al., 2000). Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte eNOS-Transkription ist abhängig von der Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen

Kinase II (CaMK II) und der Tyrosinkinase JAK2 (Cai et al., 2001).  $H_2O_2$  erhöht auch die Stabilität der eNOS-mRNA durch einen noch unbekanntem Mechanismus (Drummond et al., 2000; Cai et al., 2001).

Erhöhung der eNOS-Expression durch ROS scheint eine Kompensation unter pathologischen Bedingungen zu sein. Bei transgenen Mäusen mit überexprimierter p22phox zeigt sich in glatten Muskelzellen eine exzessive Superoxid- und  $H_2O_2$ -Produktion (Laude et al., 2005). Die eNOS-Expression und NO-Produktion ist in den Blutgefäßen dieser Mäuse stark erhöht. Der Blutdruck sowie die endothelabhängige Vasodilatation sind normal, was auf eine Kompensation durch NO hindeutet. Auch die vaskuläre Expression der extrazellulären Superoxid-Dismutase ist in diesen Mäusen (kompensatorisch) erhöht (Laude et al., 2005).

## **4. Methoden**

### **4.1. Zellkultur**

#### **HUVEC:**

Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) sind primäre Endothelzellen, die endogen die eNOS exprimieren. Sie wurden aus Nabelschnüren per Kollagenase-Verdau isoliert (Li et al., 2003).

#### **EA.hy 926-Zellen:**

Bei EA.hy 926-Zellen handelt es sich um eine humane endotheliale Zelllinie, die durch Fusion der humanen Alveolarepithel-ähnlichen Lungenkarzinomzelllinie A549/8 mit HUVEC hergestellt wurde. Endogen verfügt sie über die eNOS. Die Zellen wurden freundlicherweise von Cora-Jean S. Edgell von der University of North Carolina at Chapel Hill, USA zur Verfügung gestellt (Edgell et al., 1983).

#### **RFL-6-Zellen**

RFL-6-Zellen sind Fibroblasten aus fötalen Rattenlungen. Sie verfügen über eine gut stimulierbare lösliche Guanylatcyclase, haben jedoch keine endogene NOS. Deshalb wurden sie als Reporterzellen zur Messung der NO-Aktivität von endothelialen Zellen eingesetzt (Ishii et al., 1991). Die Zellen wurden von ATCC bezogen.

### **4.2. Molekularbiologische und biochemische Methoden**

Die von dem Habilitanden verwendeten molekularbiologischen und biochemischen Methoden sind nachfolgend gelistet (Tabelle 1).

**Tabelle 1. Liste der verwendeten molekularbiologischen und biochemischen Methoden**

<b>Methode</b>	<b>Beschrieben in folgenden eignen Publikationen</b>
<b>Analyse der eNOS-Transkription</b>	
Klonierung und Subklonierung des eNOS-Promotors	a; b; c
Stabile und transiente Transfektion	a; b; d; e
Luciferase-Reportergen-Assay	a; b; d; e
Gelretentions-Analyse (EMSA)	g
<b>Analyse der eNOS-mRNA-Expression</b>	
RNase-Verdauungsschutzanalysen (RNase protection assay)	a; b; d; e
Quantitative Real-Time-RT-PCR	f; i
<b>Analyse der eNOS-Protein-Expression</b>	
Western-Blot-Analyse	a; b
Immunhistochemie	i
<b>Analyse der eNOS-Aktivität</b>	
[ <sup>14</sup> C]L- Arginin-zu-[ <sup>14</sup> C]L-Citrullin-Assay	a
Elektronen-Spin-Resonanz	h; i
RFL-6-Reporterzell-Assay (cGMP-Radioimmunoassay)	b; d
NO-Analyzer	e; i
<b>Analyse der ROS-Produktion</b>	
Dihydroethidin (DHE)-Färbung in Kryoschnitten	h; i
Lucigenin-Chemilumineszenz-Assay	h
L-012-Chemilumineszenz-Assay	i
CM-H <sub>2</sub> DCFDA-Fluoreszenz-Assay	d; e
<b>Analyse der Protein-Phosphorylierung sowie Kinase-Assay</b>	
PKC-Translokation und -Aktivierung	a; b
PKC $\mu$ -Autophosphorylierung	b
CaMK II-Aktivitätsassay	e

a (Li et al., 1998, Mol Pharmacol 53: 630-637); b (Li & Förstermann, 2000, Mol Pharmacol 57: 427-435); c (Wallerath, Poleo, Li & Förstermann, 2003, J Am Coll Cardiol 41: 471-478); d (Li et al., 2002, Circulation 106: 2250-2256); e (Li et al., 2003, Circulation 107: 2348-2354); f (Li et al., 2004, J Pharmacol Exp Ther 310: 926-32); g (Kleinert, ..., Li & Förstermann, 1998, Hypertension 31: 582-588); h (Hink, Li et al., 2001, Circ Res 88:e14-e22); i (Li et al., 2006, J Am Coll Cardiol 47: 2536-2544).

### 4.3. Organbadversuche

Eine Veränderung der eNOS-Aktivität/-Expression hat Auswirkungen auf die Kontraktions- und Relaxations-Eigenschaften der Blutgefäße. Diese wurden an isolierten Ratten- bzw. Maus-Aorten im Organbad untersucht. Dabei wurden die Aortenringe mit Noradrenalin vorkontrahiert und dann mit Acetylcholin relaxiert. Durch Entfernung des Endothels bzw. Anwendung von NOS-Inhibitoren konnte schlussgefolgert werden, ob die Wirkungen endothelabhängig, bzw. NOS-vermittelt waren (Li et al., 2004; Li et al., 2005; Li et al., 2006).

### 4.4. Tierversuche

Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Landesuntersuchungsamt, Rheinland-Pfalz (AZ:177-07/021-14 und 177-07/031-25). In beiden Tierversuchsvorhaben fungierte der Habilitand als stellvertretender Leiter.

Es wurden folgende **Tiermodelle** verwendet:

- Angiotensin II-induzierte hypertensive Ratten (Mollnau et al., 2002);
- Spontan-hypertensive Ratten (Li et al., 2006);
- Streptozotocin-induzierte Diabetes-Ratten (Hink et al., 2001);
- eNOS-defiziente hypertensive Mäuse (Wallerath et al., 2004);
- ApoE-defiziente atherosklerotische Mäuse (Li et al., 2005).

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Die Expression der eNOS kann pharmakologisch gesteigert werden.

#### 5.1.1. PKC-Aktivatoren

Stimulatoren der Proteinkinase C (PKC), wie z.B. aktive Phorbol-12-myristat-13-acetat und Phorbol-12,13-dibutyrate, steigerten konzentrationsabhängig die Expression der eNOS in humanen Endothelzellen auf bis zu 300% der Kontrolle. Dieser Anstieg ließ sich durch die spezifischen PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I (= GF109203X), Gö 6976, Ro-31-8220 oder Chelerythrin hemmen. Humane EA.hy-926-Endothelzellen exprimieren acht verschiedene PKC-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$ ,  $\lambda$  und  $\mu$ ). Nach Phorbol-12-myristat-13-acetat-Behandlung translozierten PKC $\alpha$  und PKC $\epsilon$  vom Zytosol in die Plasmamembran, was ihre Aktivierung anzeigte. Nach 24-stündiger Phorbol-12-myristat-13-acetat-Stimulation waren diese Isoformen dann deutlich herunterreguliert. Der Zeitverlauf der Aktivierung und späteren Herunterregulation der PKC $\alpha$  und PKC $\epsilon$  korrelierte gut mit der Phorbol-12-myristat-13-acetat-stimulierten Steigerung der eNOS-Expression. Die Stimulation der eNOS-Expression war ein rein transkriptioneller Vorgang; die eNOS-mRNA-Stabilität blieb unverändert (Li et al., 1998).

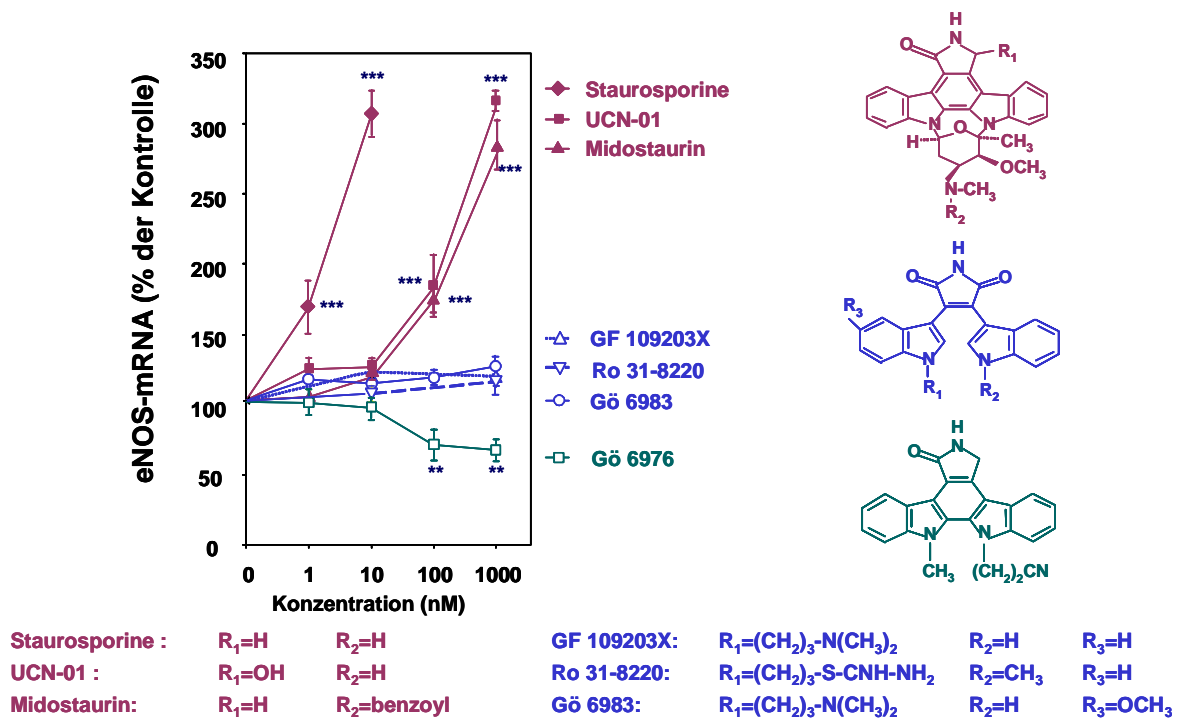
Publikation (1)

#### 5.1.2. Staurosporinanaloga

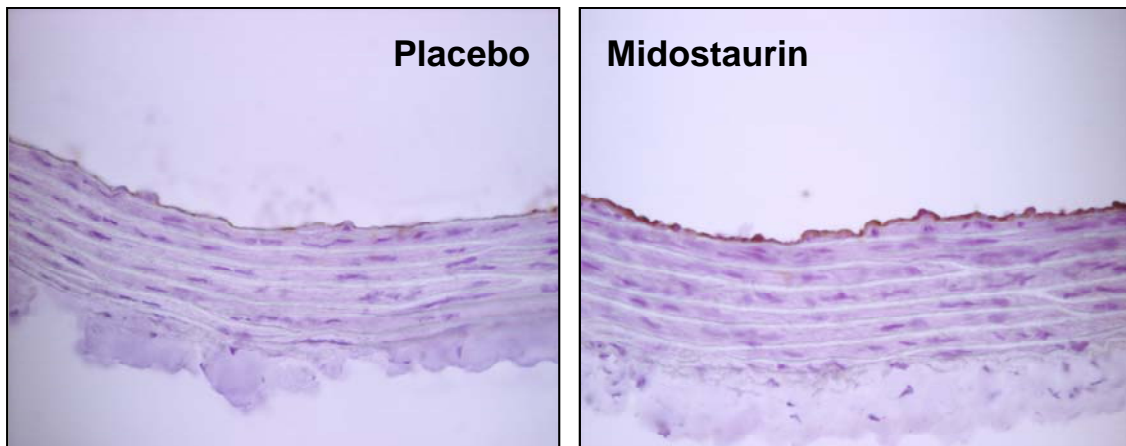
Im Rahmen der o.g. Untersuchungen zur PKC-Aktivierung war aufgefallen, dass der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin selbst die Expression der eNOS auf bis zu 300% steigern konnte. Ähnlich effizient in der Stimulation der eNOS-Expression waren die glykosidischen Staurosporinanaloga 7-Hydroxystaurosporin (UCN-01) und Midostaurin (4'-N-Benzoylstaurosporin, CGP 41251), wogegen die Bisindolylmaleimid-Analoga GF109203X, Ro 31-8220 und Gö 6983 keine stimulatorische Wirkung auf die eNOS-Expression ausübten. Gö 6976, ein Methyl- und Cyanoalkyl-substituiertes, nicht-glykosidisches Indolocarbazolderivat des Staurosporins hemmte sogar die eNOS-Expression. Die Steigerung der eNOS-Expression durch glykosidische Staurosporinanaloga war ein rein transkriptioneller Vorgang; die eNOS-mRNA-

Publikation (2)

Stabilität blieb unverändert (Abbildung 1). Staurosporin ist ein potenter, aber unspezifischer Kinaseinhibitor. Andere Inhibitoren der PKC, PKA, PKG oder von Tyrosinkinase sind jedoch ohne Wirkung auf die eNOS-Expression, was die Beteiligung dieser Kinasen an der Staurosporinwirkung unwahrscheinlich erscheinen lässt (Li & Förstermann, 2000b). Fütterung von Ratten und Mäusen mit Midostaurin führte ebenfalls zur erhöhten eNOS-Expression im vaskulären Endothel (Abbildung 2) (Li et al., 2005; Li et al., 2006). Somit stellen glykosidische Staurosporinanaloga eine neue Klasse von Substanzen dar, die positiv mit der Transkription des eNOS-Gens interagieren. Entsprechende Derivate haben ein Potential als kardiovaskulär protektive Substanzen (siehe 5.3.). Die Anwendung am Menschen scheint möglich; Substanzen wie UCN-01 und Midostaurin befinden sich als potentielle Antitumorthapeutika in klinischen Phase-II-Untersuchungen (Li & Förstermann, 2000b).



**Abbildung 1. Struktur-Wirungsbeziehung der Staurosporinanaloga auf die eNOS-Expression.** Menschliche EA.hy 926 Endothelzellen wurden 18h lang behandelt und die eNOS-mRNA-Expression mit RNase-Verdauungsschutzanalyse untersucht. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  vs. Kontrolle. (Li H & Förstermann U (2000) Mol Pharmacol 57:427-435).



**Abbildung 2. Midostaurin erhöht die eNOS-Protein-Expression im Endothel der Ratte.** Spontanhypertensive Ratten wurden 5 Tage lang mit Midostaurin behandelt (75 mg/kg) und die eNOS in der Aorta immunhistochemisch gefärbt (Li H, et al. (2006) J Am Coll Cardiol 47:2536-2544).

### 5.1.3. Flavonoide

Es ist bekannt, dass Extrakte aus Artischockenblättern (*Cynara scolymus* L.) einen choleretischen Effekt und eine Hemmwirkung auf die Cholesterin-Biosynthese besitzen. Zusätzlich dazu konnten wir in unseren Untersuchungen zeigen, dass Artischockenextrakte die eNOS-Genexpression in humanen Endothelzellen steigerten (Li et al., 2004). Die Transkriptionsrate des eNOS-Gens wurde erhöht und war von einer gesteigerten eNOS-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene begleitet. Die eNOS-mRNA-Stabilität blieb durch Artischockenextrakt-Behandlung jedoch unbeeinflusst. Unter pathophysiologischen Bedingungen kann die eNOS-Genexpression ebenfalls gesteigert sein, das Enzym kann jedoch dysfunktional werden („entkoppeln“), so dass es anstelle von NO reaktive Sauerstoffspezies erzeugt (siehe 5.2.). In mit Artischockenextrakten behandelten Endothelzellen blieb die eNOS jedoch funktionell, da die Produktion von bioaktivem NO erhöht war. Die antioxidative Wirkung der in Artischockenextrakten enthaltenen Polyphenole könnte dazu beitragen haben. Mit Artischockenextrakten *ex vivo* behandelte Rattenaorten zeigten eine



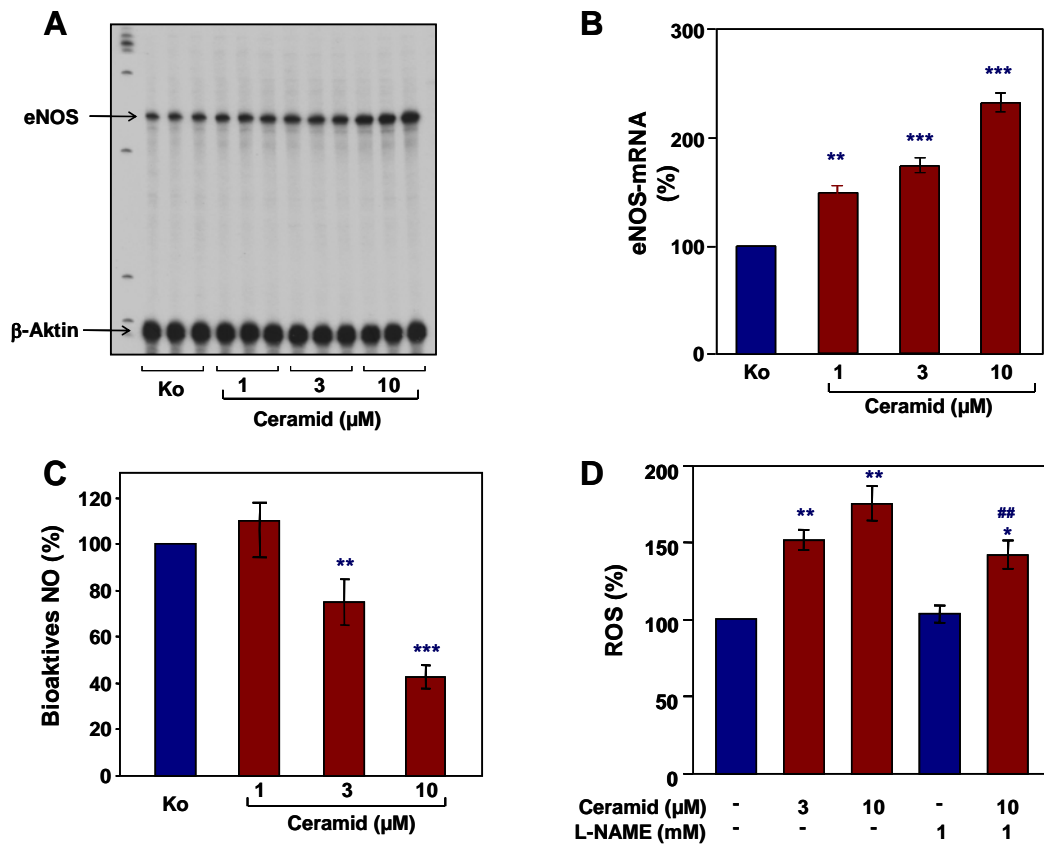
verstärkte NO-vermittelte Vasodilatation. Für die eNOS-expressionssteigernde Wirkung waren u.a. die Artischocken-Flavonoide Luteolin und Cynarosid verantwortlich (Li et al., 2004).

#### **5.1.4. Rotwein und Resveratrol**

Rotwein und die in Rotwein vorhandenen Polyphenole (z. B. Resveratrol und Cyanidin), sowie Zimtsäure und Hydroxymzimtsäure erhöhten die eNOS-Expression. Hierfür waren sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Mechanismen verantwortlich. Resveratrol und auch Rotwein selbst steigerten sowohl die eNOS-Promotoraktivität als auch die eNOS-mRNA-Stabilität. Unter diesen Bedingungen fand sich ebenfalls vermehrt bioaktives NO, welches möglicherweise zu den kardiovaskulär-protectiven Wirkungen von Resveratrol und Rotwein beitrug (Wallerath et al., 2002; Wallerath et al., 2003; Wallerath et al., 2005).

### **5.2 Eine Erhöhung der eNOS-Expression ist nicht immer protektiv – das Phänomen der eNOS-Entkopplung**

In den letzten Jahren wurde klar, dass die eNOS nicht immer vasoprotektiv ist. Zunächst wurde für das isolierte eNOS-Enzym beschrieben, dass es bei unzureichenden L-Arginin-Spiegeln und/oder bei ungenügender Versorgung mit BH<sub>4</sub> Häm-katalysiert Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) produzieren kann. Bei grenzwertiger L-Arginin/BH<sub>4</sub>-Versorgung kann das Enzym auch zwischen NO- und O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion hin und her wechseln, so dass Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) entsteht (Vasquez-Vivar et al., 1998; Xia et al., 1998). Bei L-Arginin-Mangel, aber suffizienten Konzentrationen von BH<sub>4</sub> kann das Enzym schließlich auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generieren (Stuehr et al., 2001). Die Elektronenübertragung auf Sauerstoff statt auf Stickstoff wird als „NOS-Entkopplung“ bezeichnet (Förstermann & Münzel, 2006).



**Abbildung 3. eNOS-Entkopplung am Beispiel des proarteriosklerotischen Sphingolipides Ceramid.** Eine 9-stündige Behandlung humaner EA.hy 926 Endothelzellen mit Ceramid führt zur Erhöhung der eNOS-mRNA-Expression (A und B, RNase-Verdauungsschutzanalysen). Die Produktion bioaktiven NOs ist jedoch vermindert (C, RFL-6-Reporterzell-Assay). Die mit Ceramid behandelten Zellen zeigen erhöhte ROS-Produktion, die durch den NOS-Inhibitor L-NAME hemmbar ist (D, CM-H<sub>2</sub>DCFDA-Fluoreszenz-Assay). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs. Kontrolle; ## $P < 0,01$  vs. Ceramid 10  $\mu$ M (Li H, et al. (2002) Circulation 106:2250-2256).

### 5.2.1. eNOS-Entkopplung in kultivierten Endothelzellen

Das Sphingolipid Ceramid ist ein Signalmolekül, das mit proatherosklerotischen Wirkungen assoziiert wird. In isolierten Endothelzellen steigerte Ceramid jedoch die eNOS-Genexpression (Li et al., 2002a). Diese Hochregulation der eNOS war mit Inhibitoren der Proteinphosphatase 2A (PP2A) unterdrückbar, ein Hinweis auf die Beteiligung der PP2A an der Signaltransduktion. Die Bildung bioaktiven NOs war unter Ceramid vermindert, die ROS-Produktion hingegen erhöht. Die erhöhte ROS-

Produktion konnte zum Teil mit dem NOS-Inhibitor L-NAME blockiert werden, was auf eine eNOS-Entkopplung hindeutet (Abbildung 3). Die eNOS-Entkopplung ließ sich durch Zugabe des NOS-Cofaktors BH<sub>4</sub> teilweise korrigieren (Li et al., 2002a).

Das biogene Amin Histamin ist ein seit langem bekannter Stimulator der eNOS-Enzymaktivität. Wir entdeckten eine Langzeitwirkung des Histamins auf die eNOS-Genexpression (Li et al., 2003). In kultivierten humanen Endothelzellen erhöhte Histamin die eNOS-Transkription. Diese Wirkung wurde über den H<sub>1</sub>-Rezeptor und eine Aktivierung der CaMK II vermittelt. Unter normalen Kultur-Bedingungen ging die gesteigerte eNOS-Genexpression durch Histamin mit der Produktion bioaktiven NOs einher. Wurden die Endothelzellen aber oxidativem Stress ausgesetzt, so z.B. unter Inkubation mit Xanthin/Xanthin-Oxidase, wandelte sich die eNOS zu einem ROS-produzierenden Enzym. Auch in diesem Fall konnte die durch Histamin-Behandlung erhöhte ROS-Produktion mit dem NOS-Inhibitor L-NAME blockiert werden, was auf eine eNOS-Entkopplung hindeutet (Li et al., 2003).

Publikation (5)

### 5.2.2. eNOS-Entkopplung in Tiermodellen

Auch in Rattenmodellen der experimentellen Hypertonie, des Diabetes mellitus und der Nitrattoleranz wurde die Kombination von gesteigerter eNOS-Genexpression und eNOS-Entkopplung beobachtet; trotz erhöhter eNOS-Genexpression war die Produktion bioaktiven NOs in den Blutgefäßen vermindert. Dagegen war die ROS-Produktion erhöht, wobei eine entkoppelte eNOS einen signifikanten Anteil daran hatte. Die NOS-Inhibitoren N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA) und sein Methylester L-NAME konnten die ROS-Produktion zum Teil unterbinden (Münzel et al., 2000; Hink et al., 2001; Mollnau et al., 2002).

Publikation (3)

### 5.2.3. Oxidativer Stress ist eine Ursache der eNOS-Entkopplung

In vielen Fällen liegt der unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen beobachteten eNOS-Entkopplung ein Mangel des essentiellen NOS-Kofaktors BH<sub>4</sub> zugrunde. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der intrazellulären BH<sub>4</sub>-Konzentration und der NO-Produktion in Endothelzellen (Werner-

Felmayer et al., 1993). In einigen *in vivo*-Modellen kann die endotheliale NO-Produktion durch Zufuhr von BH<sub>4</sub> oder durch Hemmung der BH<sub>4</sub>-Degradation verbessert werden (Vasquez-Vivar et al., 2003).

Die intrazelluläre BH<sub>4</sub>-Konzentration ist einerseits von der *de novo*-Synthese, und andererseits vom Abbau abhängig. Oxidativer Stress kann zur exzessiven Oxidation und Depletion von BH<sub>4</sub> führen (Förstermann & Münzel, 2006). In pathophysiologischen Tiermodellen mit vaskulärem oxidativem Stress, wie z.B. den Insulin-resistenten Ratten (Shinozaki et al., 1999), den spontan-hypertensiven Ratten (Hong et al., 2001; Li et al., 2006), den DOCA-Salz-hypertensiven Ratten (Landmesser et al., 2003), sowie den hypercholesterolemischen ApoE-Knockout Mäusen (Laursen et al., 2001), wurde eine verminderte vaskuläre BH<sub>4</sub>-Konzentration festgestellt. Es wurde gezeigt, dass Peroxynitrit, ein Reaktionsprodukt aus NO und Superoxid, BH<sub>4</sub> oxidieren kann (Laursen et al., 2001; Kuzkaya et al., 2003).

### **5.3. Pharmakologische Unterdrückung des vaskulären oxidativen Stresses kann eine eNOS-Entkopplung revertieren**

In Tiermodellen vaskulärer Erkrankungen werden NADPH-Oxidasen als primäre Quelle gesteigerter ROS-Produktion identifiziert. Expression und Aktivität dieser Enzyme sind in den Modellen gesteigert (Münzel et al., 2000; Hink et al., 2001; Mollnau et al., 2002). Die PKC scheint in dem pathophysiologischen Geschehen eine Schlüsselrolle zu spielen (Xu et al., 2007). Eine Behandlung mit den PKC-Inhibitoren Chelerythrin, Gö 6976 oder Midostaurin verminderte die (pathologisch erhöhte) NADPH-Oxidase-Genexpression und -Aktivität (Münzel et al., 2000; Hink et al., 2001; Mollnau et al., 2002). In spontan-hypertensiven Ratten unterdrückte Midostaurin die Expression der NADPH-Oxidase 1, steigerte die vaskuläre BH<sub>4</sub>-Konzentration und revertierte somit die eNOS-Entkopplung (Abbildung 4) (Li et al., 2006).

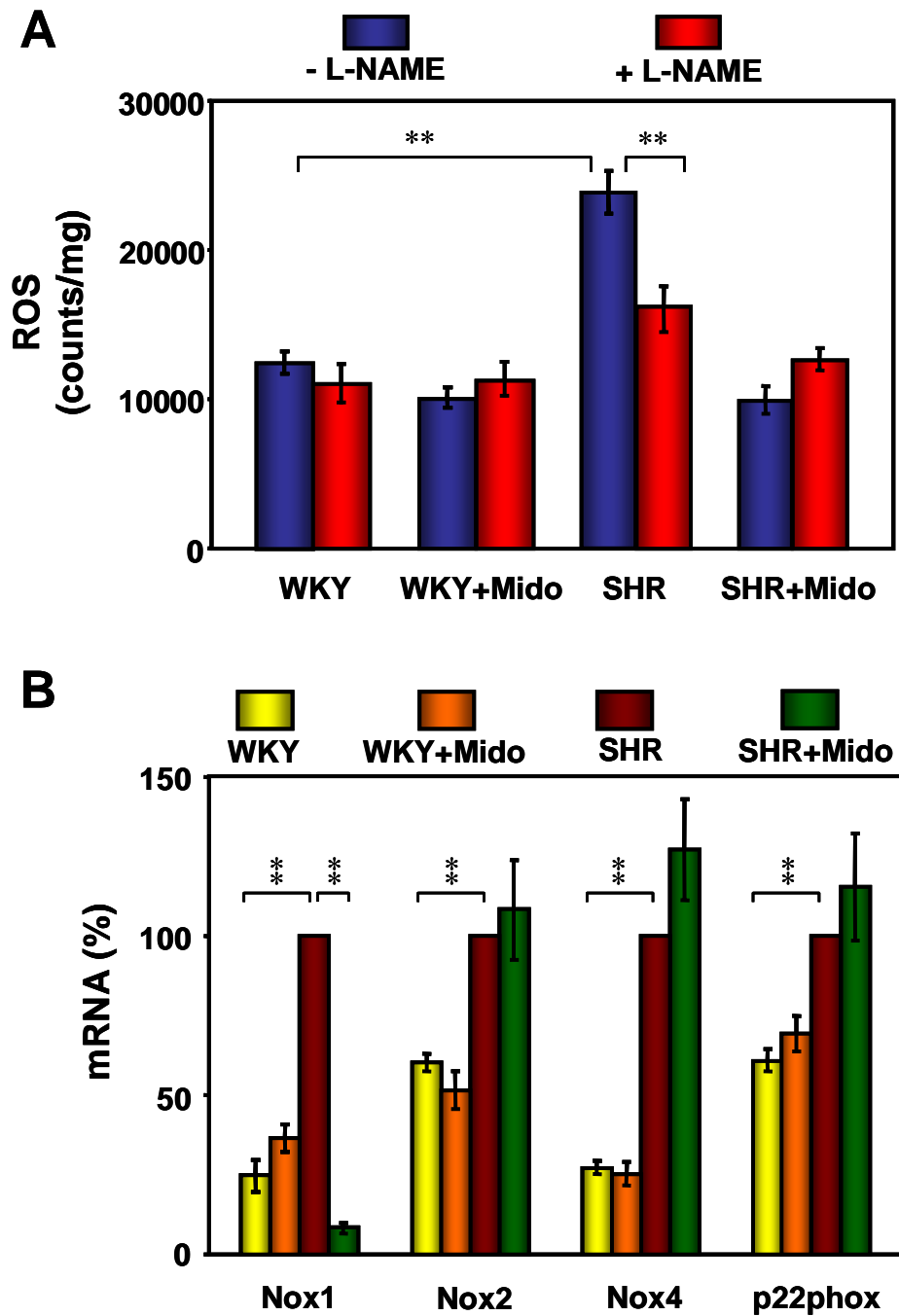


Abbildung 4. Entkopplung der eNOS in spontanhypertensive Ratten (SHR) und pharmakologische Korrektur durch Midostaurin. Im Vergleich zu Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) zeigen Aorten aus SHR erhöhte ROS-Produktion (L-012-Chemilumineszenz-Assay), die durch L-NAME hemmbar ist (A). Midostaurin-Behandlung (75 mg/kg für 5 Tage) vermindert die Nox1-Expression (quantitative Real-Time-RT-PCR, B) und revertiert die eNOS-Entkopplung (A). \*\* $P < 0,01$  (Li H, et al. (2006) J Am Coll Cardiol 47:2536-2544).

#### **5.4. Korrektur der eNOS-Entkopplung und Steigerung der eNOS-Expression erscheint als eine praktikable therapeutische Strategie für kardiovaskuläre Erkrankungen**

Da die eNOS unter pathologischen Bedingungen entkoppelt vorliegt, bzw. eine pharmakologisch-induzierte eNOS entkoppelt werden kann, ist es wichtig, den funktionellen Zustand der eNOS zu erhalten. Dies kann durch Verhinderung der eNOS-Entkopplung bzw. Reversion einer bestehenden Entkopplung erreicht werden.

Ein erfolgreiches Beispiel ist der PKC-Inhibitor Midostaurin. Durch Unterdrückung der vaskulären NADPH-Oxidase-Expression verminderte Midostaurin die BH<sub>4</sub>-Oxidation und hob die eNOS-Entkopplung in spontan-hypertensiven Ratten auf (siehe oben) (Li et al., 2006). Damit wurde die Funktionalität des eNOS-Enzyms wiederhergestellt (d.h. eNOS produzierte wieder NO statt ROS).

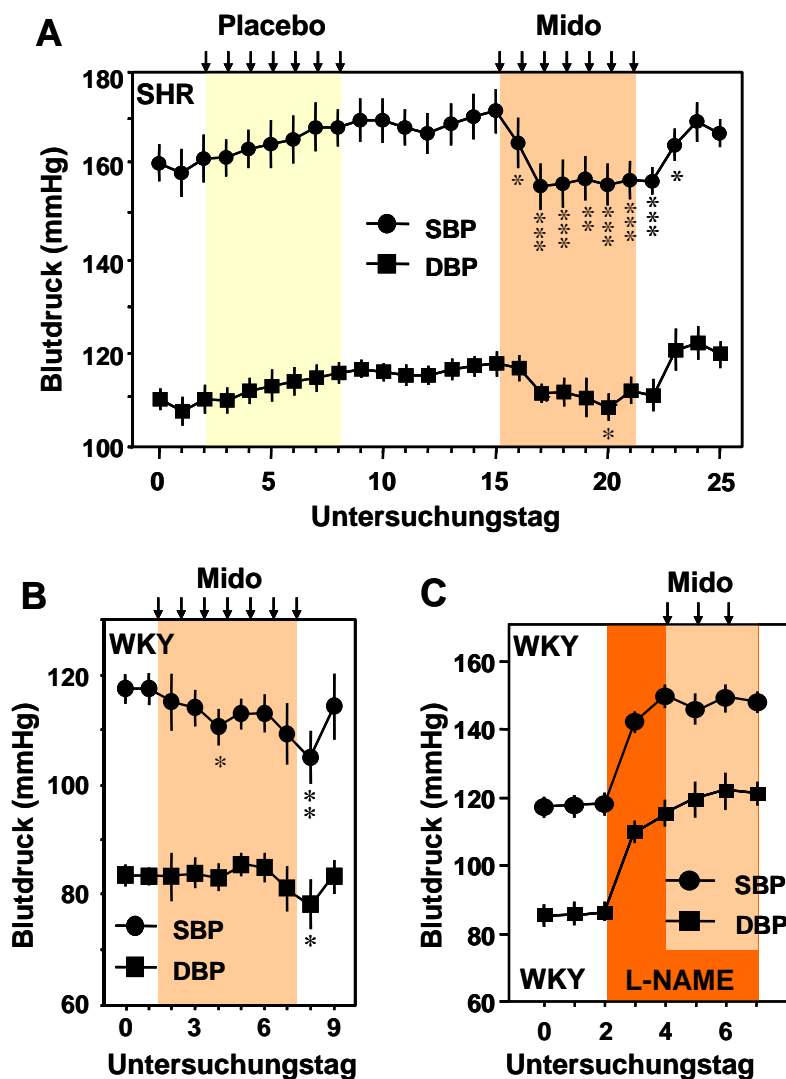
Unabhängig von seiner Wirkung auf die PKC steigerte Midostaurin (und andere glykosidische Staurosporinanaloga) die eNOS-Expression (Li & Forstermann, 2000). Die Kombination der Korrektur der eNOS-Entkopplung einerseits und der Steigerung der eNOS-Expression andererseits bedingte eine erhöhte endotheliale NO-Produktion. Diese ließ sich auch im Tier *in vivo* nachweisen. In zwei unterschiedlichen Tiermodellen ließen sich funktionelle Konsequenzen der gesteigerten NO Produktion zeigen. In Widerstandsgefäßen atherosklerotischer ApoE-Knockout-Mäuse zeigte sich eine Vasodilation der Widerstandsgefäße (Li et al., 2005), und in hypertensiven Ratten konnte eine Blutdrucksenkung beobachtet werden (Abbildung 5) (Li et al., 2006). In Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME fehlte die blutdrucksenkende Wirkung von Midostaurin (Li et al., 2006). So läßt sich schlussfolgern, dass die vasoprotektiven Wirkungen von Midostaurin auf die eNOS-Rückkopplung und die eNOS-Hochregulation zurückzuführen waren.

Auch unser Kooperationspartner, sanofi-aventis Pharm, hat großes Interesse, eNOS-relevante Pharmaka zu entwickeln. Unter Verwendung von uns entwickelter Reporterzellen haben Dr. Wohlfart und seine Kollegen mit einem *Screening*-Verfahren einige „eNOS transcription enhancer“ identifiziert. Einer davon ist die Substanz 4-fluoro-N-indan-2-yl-benzamide (AVE9488, auch C2431). AVE9488 erhöhte die eNOS-Promotoraktivität, eNOS-Expression und die NO-Produktion in menschlichen Endothelzellen. In Mäusen *in vivo* steigerte AVE9488 den vaskulären BH<sub>4</sub>-Gehalt

Publikation (7)

Publikation (8)

durch noch unbekannte Mechanismen. In dem „Cuff“-Maus-Modell hemmte AVE9488 die Neointima-Bildung. Diese anti-atherosklerotische Wirkung scheint Folge der Steigerung der eNOS-Expression und Korrektur der eNOS-Entkopplung zu sein, denn sie war in eNOS-Knockout-Mäusen nicht nachweisbar. Auch im Langzeit-Modell der Atherosklerose, den ApoE-Knockout-Mäusen, hemmte AVE9488 die Atherosklerose-Entwicklung (Wohlfart et al., 2002; Wohlfart et al., 2007).



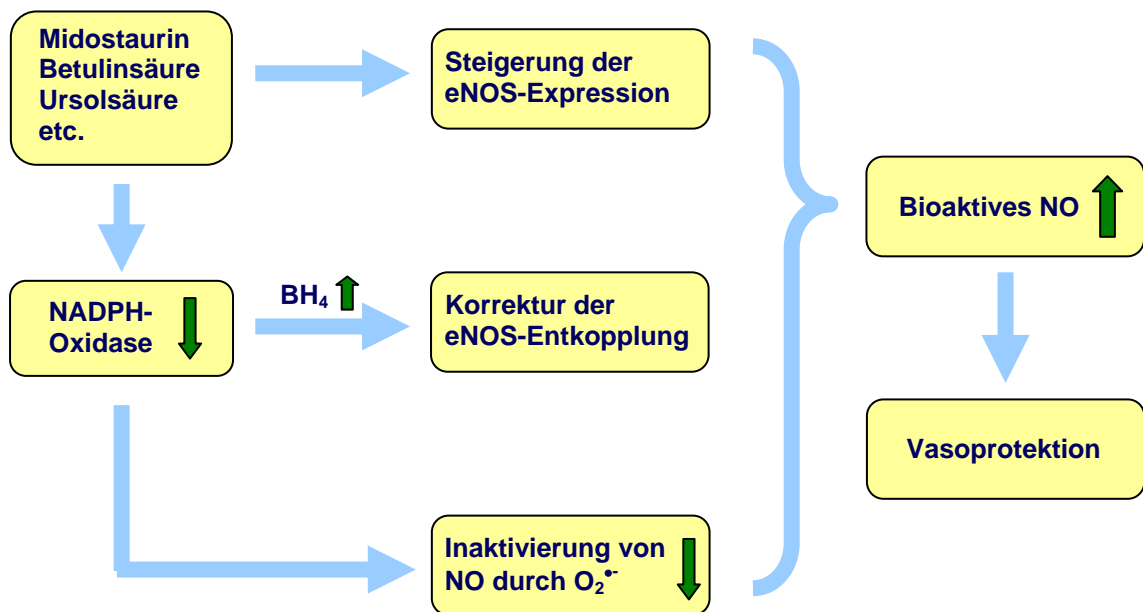
**Abbildung 5. eNOS-abhängige antihypertensive Wirkung von Midostaurin.** Behandlung mit Midostaurin (Mido, 75 mg/kg) führt zu einer reversiblen Blutdruck-Senkung in spontanhypertensiven Ratten (SHR, A, telemetrische Blutdruckmessung). Auch in Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) wird der Blutdruck leicht gesenkt (B). In Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME verändert Midostaurin den Blutdruck nicht (C). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs. Werte vor der Midostaurin-Behandlung (Li H, et al. (2006) J Am Coll Cardiol 47:2536-2544).

Zusammengefaßt zeigen unsere Arbeiten, dass pharmakologische Interventionen, die einerseits die eNOS-Entkopplung revertieren und andererseits die eNOS-Genexpression steigern, ein therapeutisches Potential zur Prävention und/oder Therapie (kardio)vaskulärer Erkrankungen besitzen. Midostaurin und AVE9488 sind solche prototypischen Substanzen, die diese beiden Wirkungen auf unterschiedliche Weise in sich vereinigen.



## 6. Ausblick

In Zukunft sollte weiter überprüft werden, ob eine Kombination von Korrektur der eNOS-Entkopplung und Steigerung der eNOS-Expression als eine pharmakologische Intervention etabliert werden kann (Abbildung 6). Zusätzlich zu Midostaurin und AVE9488 haben wir noch weitere Substanzen gefunden, die reziproke Wirkung auf die eNOS und die NADPH-Oxidase ausüben. Naturstoffe pflanzlicher Herkunft wie z.B. die Betulinsäure und die Ursolsäure erhöhten die Expression der eNOS und unterdrückten die Expression der NADPH-Oxidase in menschlichen Endothelzellen (Steinkamp-Fenske et al., 2007a; Steinkamp-Fenske et al., 2007b). Im Gegensatz zu Midostaurin waren die Wirkungen der beiden Substanzen PKC-unabhängig. Das therapeutische Potential dieser Substanzen wird gegenwärtig in Tiermodellen kardiovaskulärer Erkrankungen getestet.



**Abbildung 6. Schematische Darstellung einer eNOS-relevanten Therapie.** Substanzen wie Midostaurin, Betulinsäure oder Ursolsäure erhöhen die eNOS-Expression im Gefäßendothel. Unabhängig davon unterdrücken sie die Expression der vaskulären NADPH-Oxidasen und korrigieren die eNOS-Entkopplung durch Erhöhung des BH<sub>4</sub>-Spiegels. Die Folge dieser beiden Wirkungen ist eine erhöhte NO-Produktion. Außerdem vermindert die reduzierte Expression der NADPH-Oxidasen die NO-Inaktivierung durch Superoxid. Daraus resultiert insgesamt ein höherer Level an bioaktivem NO, mit der Folge einer Vasoprotektion.

## 7. Literatur

(Autorenschaften des Habilitanden sind durch Fettschrift hervorgehoben)

- Cai H, Davis ME, Drummond GR & Harrison DG (2001) Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1571-6.
- Davis ME, Cai H, Drummond GR & Harrison DG (2001) Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res* 89:1073-80.
- Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A & Harrison DG (2004) Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* 279:163-8.
- Dedio J, König P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W & Müller-Esterl W (2001) NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *Faseb J* 15:79-89.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R & Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-5.
- Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S & Harrison DG (2000) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86:347-54.
- Edgell CJ, McDonald CC & Graham JB (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3734-3737.
- Endres M & Laufs U (2004) Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 35:2708-11.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA & Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8880-5.
- Fleming I & Busse R (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1-12.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE & Busse R (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88:E68-75.
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I & Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-31.
- Förstermann U & Münzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708-14.

- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A & Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392:821-4.
- Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Förstermann U & Münzel T (2001) Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ Res* 88:e14-e22.
- Hong HJ, Hsiao G, Cheng TH & Yen MH (2001) Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38:1044-8.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA & Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-42.
- Ishii K, Sheng H, Warner TD, Förstermann U & Murad F (1991) A simple and sensitive bioassay method for detection of EDRF with RFL-6 rat lung fibroblasts. *Am J Physiol* 261:H598-603.
- Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H & Förstermann U (1998) Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension* 31:582-8.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG & Dikalov S (2003) Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278:22546-54.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE & Harrison DG (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111:1201-9.
- Laude K, Cai H, Fink B, Hoch N, Weber DS, McCann L, Kojda G, Fukai T, Schmidt HH, Dikalov S, Ramasamy S, Gamez G, Griendling KK & Harrison DG (2005) Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H7-12.
- Laufs U, Endres M, Stagliano N, Amin Hanjani S, Chui DS, Yang SX, Simoncini T, Yamada M, Rabkin E, Allen PG, Huang PL, Bohm M, Schoen FJ, Moskowitz MA & Liao JK (2000) Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 106:15-24.
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J & Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129-35.
- Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T & Harrison DG (2001) Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103:1282-8.
- Li H, Burkhardt C, Heinrich U-R, Brausch I, Xia N & Förstermann U (2003) Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. *Circulation* 107:2348-2354.
- Li H & Förstermann U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190:244-54.
- Li H & Förstermann U (2000a) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190:244-54.

- Li H & Förstermann U (2000b)** Structure-activity relationship of staurosporine analogs in regulating expression of endothelial nitric-oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 57:427-35.
- Li H, Hergert SM, Schäfer SC, Brausch I, Yao Y, Huang Q, Mang C, Lehr HA & Förstermann U (2005)** Midostaurin upregulates eNOS gene expression and preserves eNOS function in the microcirculation of the mouse. *Nitric Oxide* 12:231-6.
- Li H, Junk P, Huwiler A, Burkhardt C, Wallerath T, Pfeilschifter J & Förstermann U (2002a)** Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106:2250-6.
- Li H, Oehrlin SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulshöfer T, Jessen T, Herget T, Förstermann U & Kleinert H (1998)** Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 53:630-637.
- Li H, Wallerath T & Förstermann U (2002b)** Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7:132-47.
- Li H, Wallerath T, Münzel T & Förstermann U (2002c)** Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* 7:149-164.
- Li H, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Münzel T & Förstermann U (2006)** Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 47:2536-44.
- Li H, Xia N, Brausch I, Yao Y & Förstermann U (2004)** Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 310:926-32.
- Liao JK & Laufs U (2005)** Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:89-118.
- Mazumder B, Seshadri V & Fox PL (2003)** Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28:91-8.
- Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K & Münzel T (2002)** Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90:e58-65.
- Münzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, Oelze M, Skatchkov M, Warnholtz A, Duncker L, Meinertz T & Förstermann U (2000)** Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res* 86:E7-E12.
- Searles CD (2006)** Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C803-16.
- SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, Chen Z, Simon DI, Luscinskas FW, Michel TM, Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G &**

- Jain MK (2004) KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med* 199:1305-15.
- Shaul PW (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 64:749-74.
- Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, Toda N & Kikkawa R (1999) Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O<sub>2</sub>- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* 48:2437-45.
- Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Völler N, Xu H, Yao Y, Bauer R, Förstermann U & **Li H** (2007a) Ursolic acid from the Chinese herb Danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis* 195 (1): e104-e111.
- Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Xu H, Yao Y, Horke S, Förstermann U & **Li H** (2007b) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase and NADPH oxidase by betulinic acid in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 322:836-842.
- Stuehr D, Pou S & Rosen GM (2001) Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 276:14533-6.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B & Martasek P (2003) The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res* 37:121-7.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P & Pritchard KA, Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9220-5.
- Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, **Li H**, Witte K & Förstermann U (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106:1652-8.
- Wallerath T, Godecke A, Molojavyi A, **Li H**, Schrader J & Förstermann U (2004) Dexamethasone lacks effect on blood pressure in mice with a disrupted endothelial NO synthase gene. *Nitric Oxide* 10:36-41.
- Wallerath T, **Li H**, Godtel-Ambrust U, Schwarz PM & Förstermann U (2005) A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide* 12:97-104.
- Wallerath T, Poleo D, **Li H** & Förstermann U (2003) Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* 41:471-8.
- Wallerath T, Witte K, Schäfer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B & Förstermann U (1999) Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13357-62.
- Weber M, Hagedorn CH, Harrison DG & Searles CD (2005) Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Circ Res* 96:1161-8.
- Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Schmidt K, Weiss G & Wachter H (1993) Pteridine biosynthesis in human endothelial cells.

Impact on nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP. *J Biol Chem* 268:1842-6.

- Wohlfart P, Tiemann M, Strobel H, Suzuki T, Dharanipragada R, **Li H**, Förstermann U & Rütten H (2002) A novel endothelial nitric oxide synthase expression enhancer reduces atherosclerosis in apoE-deficient mice (abstract). *Circulation (Suppl)* 106:II-213.
- Wohlfart P, Xu H, Endlich A, Habermeier A, Closs EI, Mang C, Suzuki T, Kleinert H, Förstermann U, Rütten H & **Li H** (2007) Anti-atherosclerotic effects of small molecular weight compounds enhancing eNOS expression and preventing eNOS uncoupling. submitted.
- Xia Y, Tsai AL, Berka V & Zweier JL (1998) Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 273:25804-8.
- Xu H, Förstermann U & **Li H** (2007) Roles of PKC alpha and epsilon in the regulation of Nox4 expression in human endothelial cells. submitted.
- Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Muller-Esterl W & Oess S (2002) NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17167-72.

## **8. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur vorliegenden Arbeit beigetragen haben oder die meinen wissenschaftlichen Werdegang prägten: