

Aus dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Endothelin-System und PAF im Astrozytenzellkulturmodell

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marwan Yazid Manna'a

aus Berlin

Gutachter/in:       1. Prof. Dr. med. Martin Paul  
                          2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Maik Gollasch  
                          3. Prof. Dr. med. Gilbert Schönfelder

Datum der Promotion: .....08.04.2011.....

## Zusammenfassung

Das Endothelin-System besteht aus drei Isopeptiden, Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3, die an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren  $ET_A$  und  $ET_B$  binden. Endothelin-Converting Enzym mit seinen Isoformen (ECE-1 und ECE-2) aktiviert die inaktiven Vorstufen der Endotheline in ihre biologisch aktive Form. Astrozyten *in vivo* exprimieren alle Bestandteile des Endothelin-Systems bis auf ET-2. Durch die morphologische Nähe der zerebralen Blutgefäße zu Astrozyten ist der Einfluss des ET-Systems auf die von den Astrozyten gebildete Blut-Hirn-Schranke ebenso von Interesse wie der Einfluss des astrozytären ET-Systems auf die Blutflussregulation im Gehirn und *vice versa*. Das ET-System spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung des Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung (SAB). Bisherige Therapien des Vasospasmus mit Kalzium-Antagonisten zeigen keine signifikanten Vorteile. Jüngere Untersuchungen lassen hoffen, dass Endothelinrezeptor- und Platelet-Activating Factor (PAF)-Rezeptor-Antagonisten möglicherweise von klinischem Nutzen sind. Hinweise für eine parakrine Interaktion zwischen PAF und dem ET-System ergeben sich durch den Nachweis von PAF in der Intima und Media von vasospastischen Gefäßen nach SAB. Astrozyten wurden als eine Hauptquelle der ET-Produktion nach Okklusion der A. cerebri media beschrieben. Die Wechselwirkungen zwischen vasoaktiven Faktoren im Blut, wie PAF, und dem ET-System in Astrozyten sind nicht ausreichend untersucht. Die Zusammenhänge werden verkompliziert, da Astrozyten ein eigenes PAF-Rezeptorsystem besitzen, das möglicherweise das ET-System genetisch reguliert. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der Astrozyten bei der autokrin-parakrinen Regulation des ET-Systems auf zellulärer Ebene untersucht werden. Daher wurde das Modell der Primärkultur von Astrozyten von neugeborenen Ratten etabliert, um Einblicke in die genetische und zelluläre Regulation von PAF und des ET-Systems direkt in Astrozyten und unabhängig von Einflüssen über die Blut-Hirn-Schranke und anderen Zellsystemen gewinnen zu können. Es wurde der Einfluss von DBcAMP und der vasoaktiven Faktoren PAF und Thrombin auf die Regulation von Komponenten des ET-Systems vor dem Hintergrund ihrer pathophysiologischen Bedeutung bei Vasospasmus nach SAB genauer betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass das etablierte Astrozytenzellkulturmodell wesentliche Komponenten des ET-Systems exprimiert, insbesondere ET-1, ET-3, ECE und  $ET_B$ -Rezeptoren. Die Stimulation der Zellen mit PAF führte zur Erhöhung der ET-1-mRNA-Expression. Das vorliegende Vorhaben trägt zum besseren Verständnis bei, wie PAF und das ET-System auf genetischer und zellulärer Ebene in Astro-

zyten reguliert werden und interagieren. Das Projekt hat möglicherweise Implikationen für die Therapie von zerebraler Ischämie und Vasospasmus nach SAB mit ET-Rezeptor- und PAFR-Antagonisten.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
Abkürzungen.....	VI
Abbildungen und Tabellen.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Endothelin-System.....	1
1.2 Platelet-Activating Factor .....	24
1.3 Zerebrale Ischämie.....	26
1.4 Subarachnoidalblutung .....	29
1.5 Astrozyten .....	33
2. Fragestellung.....	37
3. Methoden .....	39
3.1 Lösungen, Puffer, Medien und Gele .....	39
3.2 Zellkultur.....	41
3.3 Molekularbiologische Methoden .....	46
3.4 Bindungsstudien.....	55
3.5 Statistische Analyse .....	60
4. Ergebnisse .....	61
4.1 Astrozytenzellkultur.....	61
4.2 mRNA-Expression der ET-Komponenten und des PAF-Rezeptors.....	66
4.3 Ergebnisse der Bindungsstudien .....	68
4.4 Generierung von <i>Northern-blot</i> -Sonden .....	71
4.5 Ergebnisse der <i>Northern blots</i> .....	72
5. Diskussion.....	75
5.1 Differenzierung von astrozytären Primärkulturen .....	76
5.2 Expression des ET-Systems in der etablierten astrozytären Primärkultur.....	78
5.3 Regulation des Endothelin-Systems durch PAF .....	80
5.4 Ausblick und klinische Relevanz.....	84
6. Literaturverzeichnis .....	87
7. Danksagung.....	103

# Abkürzungen

<b>A.</b>	Arterie ( <i>lat. arteria</i> )
<b>Aa.</b>	Arterien ( <i>lat. arteriae</i> )
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Adenylatcyclase
<b>ACE</b>	Angiotensin Converting Enzyme - Angiotensin Konvertierendes Enzym
<b>ActD</b>	Actinomycin-D
<b>AT</b>	Angiotensin
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>bpm</b>	beats per minute (= Herzfrequenz)
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>CaRE</b>	Calcium-responsive element ( <i>engl.</i> )
<b>CaM</b>	Calmodulin
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>Cat.No.</b>	Catalog Number ( <i>engl.</i> ) - Katalognummer
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>cpm</b>	Counts per minute ( <i>engl.</i> ) - Radioaktive Zerfälle pro Minute
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DBcAMP</b>	Dibutyl cyclic Adenosinmonophosphate ( <i>engl.</i> )
<b>Δ</b>	Mittelwert
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium ( <i>engl.</i> )
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic acid ( <i>engl.</i> ) - Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<b>engl.</b>	englisch
<b>ET</b>	Endothelin
<b>ET-1</b>	Endothelin-1
<b>ET-2</b>	Endothelin-2
<b>ET-3</b>	Endothelin-3
<b>ET<sub>A</sub></b>	Endothelin-A Rezeptor
<b>ET<sub>B</sub></b>	Endothelin-B Rezeptor
<b>ECE</b>	Endothelin-Converting Enzyme ( <i>engl.</i> ) - Endothelin-konvertierendes Enzym
<b>ECE-1</b>	Endothelin-Converting Enzym Typ-1
<b>ECE-2</b>	Endothelin-Converting Enzym Typ-2
<b>EOH</b>	Ethanol
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FCS</b>	Fetal calf serum ( <i>engl.</i> ) - Fötales Kälberserum
<b>FITC</b>	Flourescin Isothiocyanat
<b>GCS</b>	Glasgow Coma Scale bzw. Glasgow Coma Score ( <i>engl.</i> )
<b>GFAP</b>	Glial fibrillary acidic protein ( <i>engl.</i> ) - Gliales fibrilläres, saures Protein
<b>GI-Trakt</b>	Gastro-Intestinal-Trakt
<b>gr.</b>	griechisch
<b>h</b>	Stunde(n)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HBSS</b>	Hank's Buffered Saline Solution ( <i>engl.</i> )
<b>HDL</b>	High Density Lipoproteine
<b>HLP</b>	Hypotoner Lysierpuffer
<b>I</b>	Jod
<b>IEG</b>	<i>immediate early gene(s)</i> ( <i>engl.</i> )
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-Phosphat
<b>K</b>	Kalium
<b>K<sub>d</sub></b>	Gleichgewichts- oder Dissoziationskonstante im Equilibrium

## Abkürzungen

<b><math>K_{on}</math></b>	Assoziationskonstante
<b><math>K_{off}</math></b>	Dissoziationskonstante der Dissoziationsreaktion
<b>KHK</b>	Koronare Herz Krankheit ( <i>engl.</i> : CAD)
<b>LDL</b>	Low Density Lipoproteine
<b>m</b>	Meter
<b>M</b>	Molar
<b>MAN</b>	Medline Accession Number ( <i>engl.</i> )
<b>MC-PAF</b>	Methylcarbanyl-Platelet-activating factor ( <i>engl.</i> ) (PAF-Analogon)
<b>min</b>	Minute
<b>MLC</b>	Myosin light chain ( <i>engl.</i> )
<b>MLCK</b>	Myosin light chain Kinase
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MOPS</b>	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
<b>ms</b>	Millisekunden
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid ( <i>engl.</i> ) - Botenribonukleinsäure
<b>Na</b>	Natrium
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natronlauge
<b>NaPyr</b>	Natriumpyruvat
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information, USA
<b>NIH</b>	National Institute of Health, USA
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NB</b>	Northern Blot, Northern Blotting
<b>P/S</b>	Penicillin G/Streptomycin
<b>PAF</b>	Platelet-activating factor ( <i>engl.</i> ) - Plättchen-aktivierender Faktor
<b>PAFR</b>	Platelet-activating factor ( <i>engl.</i> ) Rezeptor - PAF-Rezeptor
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline ( <i>engl.</i> ) - Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PGI</b>	Prostaglandin
<b>pH</b>	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>PLA</b>	Phospholipase A
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat, Synonym TPA
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PSL</b>	Photo Stimulated Luminescence ( <i>engl.</i> ) - Licht-stimulierte Lumineszenz
<b>rel. Exp.</b>	relative Expression
<b>Rez.</b>	Rezeptor
<b>RIA</b>	Radioimmunassay
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid ( <i>engl.</i> ) - Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Reverse Transkription
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion
<b>s</b>	Sekunde
<b>SAB</b>	Subarachnoidalblutung
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SEM</b>	Standard error of mean ( <i>engl.</i> ) - Standardfehler
<b>sGC</b>	Soluble guanylate cyclase ( <i>engl.</i> ) - Lösliche Guanylatcyclase
<b>sog.</b>	sogenannte(n)
<b>SSC</b>	Natriumchlorid-Natriumzitat-Puffer
<b>SSPE</b>	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA-Puffer
<b>STEMI</b>	ST segment elevating myocardial infarction ( <i>engl.</i> ) – ST-Hebungsinfarkt
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-Puffer
<b>TBE</b>	Tris-Borat-Puffer
<b>THR</b>	Thrombin
<b>TIS</b>	TPA induced sequence ( <i>engl.</i> )
<b>TPA</b>	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, Synonym PMA
<b>U</b>	Unit(s) ( <i>engl.</i> ) - Einheit(en)
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# Abbildungen und Tabellen

## Abbildungen

1.1	Primärstruktur der Endothelin-Isoformen und Sarafotoxine .....	2
1.2	Endothelinbiosynthese.....	5
1.3	Molekulare Komponenten der Endothelin-Signalwege .....	9
1.4	Regulation des ET-Systems im vaskulären System .....	11
1.5	Endothelin-Signalwege und ihre Bedeutung für die Entwicklung .....	21
1.6	Molekulare Struktur des Platelet-Activating Factor.....	24
3.1	Agarosegel zur Qualitätskontrolle der isolierten Gesamt-RNA. ....	47
3.2	Schematischer Versuchsaufbau eines Northern Blot.....	52
4.1	GFAP-Anfärbung eines einzelnen Astrozyten .....	61
4.2	Übersichtsaufnahme GFAP-markierter Astrozyten.....	62
4.3	Astrozyten-Zellkultur zwei Tage nach Präparation.....	63
4.4	DBcAMP-behandelte Astrozyten .....	63
4.5	Autoradiographie der Astrozyten-Zelllinie DI TNC1 .....	65
4.6	Autoradiographie der Astrozyten-Zelllinie DI TNC1. Graphische Darstellung.....	66
4.7	RT-PCR. PAF-Rezeptor mRNA-Expression in Astrozyten.....	66
4.8	RT-PCR. PAF-Rezeptor mRNA-Expression in Rattengewebe.....	66
4.9	RT-PCR. ET-1 Expression in der Ratte .....	67
4.10	RT-PCR. ET-3 Expression in der Ratte .....	67
4.11	RT-PCR. Expression des ET-Rezeptors Typ A.....	67
4.12	RT-PCR. Expression des ET-Rezeptors Typ B.....	67
4.13	RT-PCR. Expression der ECE-1 Isoformen.....	68
4.14	Ergebnis der Sättigungsbindungsstudien.....	69
4.15	Ergebnisse der Sättigungsbindungsstudien. Logarithmische Skalierung .....	69
4.16	Kompetitionsbindungsstudien mit den Rezeptorantagonisten FR139317 und BQ788. ....	70
4.17	Kompetitionsbindungsversuche mit BQ788 nach Stimulation .....	70
4.18	Linearisierte <i>Northern blot</i> -Sonden.....	71
4.19	<i>Northern blot</i> : Expression von ET-1 nach PAF-Stimulation .....	72
4.20	<i>Northern blot</i> : Expression von ET-1 nach MC-PAF-Stimulation.....	73
4.21	<i>Northern blot</i> : Expression von ECE <sub>gesamt</sub> nach PAF-Stimulation.....	73
4.22	<i>Northern blot</i> : Expression von ECE <sub>gesamt</sub> nach MC-PAF-Stimulation .....	74
5.1	Auswirkungen der PAF-Stimulation auf das ET-System.....	81

## Tabellen

1.1	Relative Konversionsraten der Endothelin-Isoformen .....	6
3.1	Lösungen, Puffer, Medien und Gele .....	39
3.2	Liste der verwendeten Geräte.....	40
3.3	Liste der verwendeten Rezeptorantagonisten und Botenstoffe .....	41
3.4	Verwendete Nährmedien in der Zellkultur.....	41
3.5	Konzentrationen der Zellkulturzusätze und Stimulantien .....	44
3.6	Medline Accession Numbers.....	49
3.7	Primersequenzen .....	49
3.8	Einheiten der Reaktionskonstanten für Ligand-Rezeptor-Bindungsreaktionen .....	57

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Endothelin-System

Das Endothelin-System besteht aus drei Isopeptiden Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3), zwei G-Protein-gekoppelten transmembranösen Rezeptoren Typ A (ET<sub>A</sub>) und Typ B (ET<sub>B</sub>) sowie dem Endothelin-Converting Enzymen (ECE-1, ECE-2, ECE-3). Endotheline teilen eine große strukturelle Ähnlichkeit mit den Sarafotoxinen S6 (SRTs A, B und C), einer Familie von peptidischen Schlangengiften, die aus dem Gift der *Atractaspis engaddensis* isoliert werden konnten (Kochva, Viljoen et al. 1982; Takasaki, Tamiya et al. 1988). Insbesondere die Sarafotoxine S6a und S6b sind sehr wirksam und führen bei Mäusen zu plötzlichem Herztod innerhalb von Minuten nach intravenöser Injektion (Weiser, Wollberg et al. 1984; Lee, Lee et al. 1986; Wollberg, Shabo-Shina et al. 1988). Sarafotoxine führen wie die Endotheline nach hochaffiner Bindung an Rezeptoren zu Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit Bildung von IP<sub>3</sub> und konsekutiver Calciumfreisetzung (Kloog, Ambar et al. 1988).

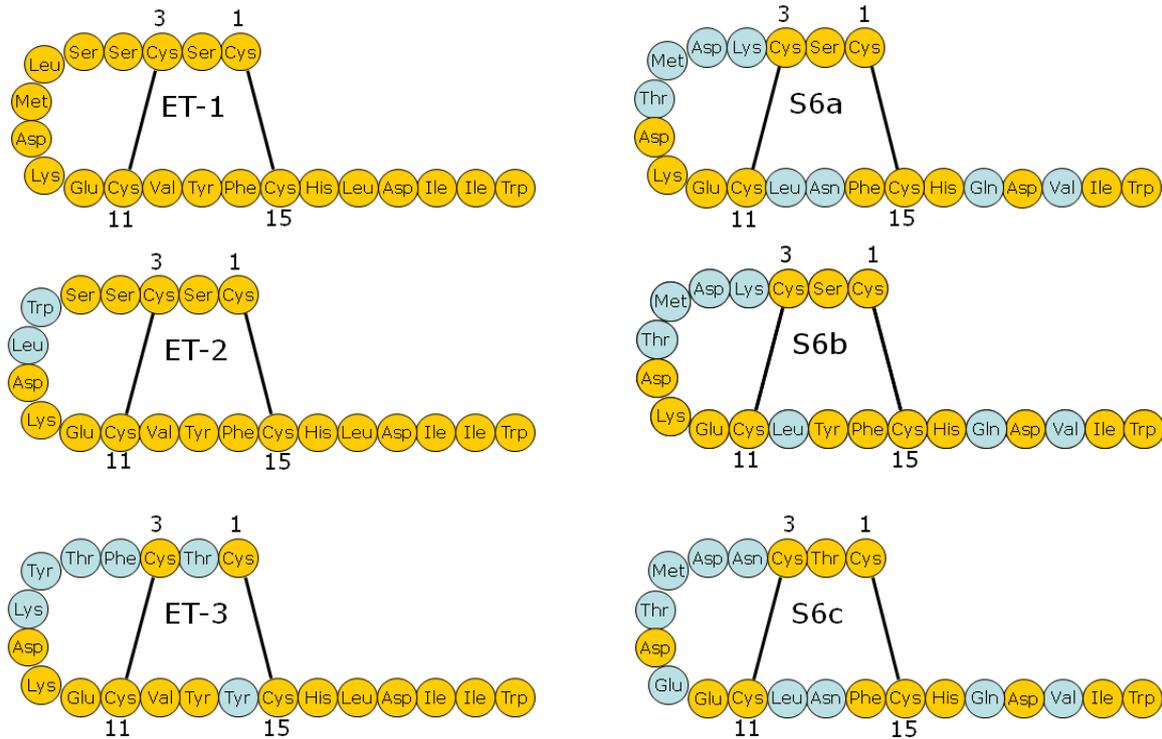
### 1.1.1 Endotheline

Die Endotheline sind Peptide mit einer Länge von 21 Aminosäuren. ET-2 und ET-3 unterscheiden sich von ET-1 in ihrer Aminosäuresequenz in zwei (ET-2) bzw. sechs (ET-3) Aminosäuren. Allen gemeinsam ist das C-terminale Ende sowie zwei intramolekulare Disulfidbrücken (Abb. 1.1). Endotheline haben ein sehr heterogenes Expressionsmuster und werden in einer großen Anzahl von Zelltypen und Geweben exprimiert.

### Endothelin-1

Im Jahre 1988 isolierte die Gruppe um Yanagisawa aus dem Überstand vaskulärer Endothelzellen des Schweins ein neues Peptidhormon (Endothelin-1), das starke vasokonstriktorische Wirkung zeigte (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). ET-1 ist das einzige der drei Endothelin-Isopeptide, das in vaskulären Endothelzellen gebildet wird. Es wird aber auch in glatten Gefäßmuskelzellen, in Neuronen, neurovaskulären Endothelzellen und Astrozyten exprimiert. Weitere Gewebe, in denen eine Expression des

ET-1-Gens nachgewiesen wurde, umfassen Lunge, Niere, Herz, Nebennierenrinde, Uterus, Magen, Milz und Gehirn (Simonson 1993; Rubanyi and Polokoff 1994).



**Abb. 1.1 Die Primärstruktur der Endothelin-Isoformen und der Sarafotoxine S6a-c. Blau dargestellte Aminosäuren kennzeichnen Abweichungen zum Endothelin-1.**

ET-1 wird in Endothelzellen nicht in sekretorischen Granula gespeichert, sondern nach Stimulation der Transkription der ET-1 mRNA durch pathophysiologische Stimuli wie z.B. Hypoxie, Ischämie oder *Shear*-Stress innerhalb von Minuten neu synthetisiert und sezerniert. Die Halbwertszeit der mRNA beträgt 15 - 20 Minuten (Inoue, Yanagisawa et al. 1989b), die Plasmahalbwertszeit des ET-1-Peptids ungefähr 4 - 7 Minuten. Dies ermöglicht vaskulären Zellen die Anpassung der Endothelinproduktion je nach Bedarf zur Regulation des vaskulären Tonus. Der Abbau von ET-1 erfolgt größtenteils (zu 80 - 90%) während der ersten Passage durch die Lunge (de Nucci, Thomas et al. 1988) und findet im Wesentlichen über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor statt. Dreiviertel der Endothelinproduktion von kultivierten Endothelzellen werden abluminal in Richtung der glatten Gefäßmuskelzellen sezerniert (McCarthy and de Vellis 1980), wo Endothelin an spezifische Rezeptoren bindet und Vasokonstriktion vermittelt (vgl. Abb. 1.3). Aufgrund dieser Erkenntnisse und der kurzen Halbwertszeit des Endothelins im Plasma nimmt man an, dass Endothelin hauptsächlich einen auto- und/oder parakrinen Wirkmechanismus besitzt. Dennoch könnte die Bestimmung von Plasmaendothelinspiegeln (vor allem bigET-1-Spiegel)

sinnvoll sein, da es Hinweise auf eine Korrelation des Plasmaspiegels mit der Schwere von Erkrankungen, wie z.B. bei Herzinsuffizienz gibt (Wei, Lerman et al. 1994). ET-1 wird in einer Vielzahl von Zellen gebildet: im vaskulären Endothel, glatten Gefäßmuskelzellen, von den Epithelien der Atemwege, Makrophagen, Fibroblasten, Kardiomyozyten, zerebralen Neuronen, Astrozyten, in den Inselzellen des Pankreas (Ortmann, Nett et al. 2005) und anderen (Luscher and Barton 2000; Kedzierski and Yanagisawa 2001).

### **Endothelin-2 und Endothelin-3**

ET-2 wird im Ovar, im Magen-Darm-Trakt und in der Niere gebildet (Bloch, Hong et al. 1991; Bramall, Han et al. 2007). Kleine Mengen sind aber auch im Myokard, der Plazenta und im Uterus nachweisbar. Jüngere Untersuchungen weisen auf einen Zusammenhang von ET-2 bei Lungenentwicklung, in der Thermoregulation, bei der Ovulation und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Ko, Gieske et al. 2006; Bramall, Han et al. 2007; Chang, Williams et al. 2007; Ko, Na et al. 2007). ET-3 kann ebenso wie ET-1 im Plasma nachgewiesen werden. Die Quelle des zirkulierenden ET-3 ist unklar. Hohe Konzentrationen an ET-3 konnten im Gehirn nachgewiesen werden, wo es wichtige Funktionen zwischen Neuronen und Astrozyten reguliert, so zum Beispiel in der Proliferation und in der Entwicklung und Differenzierung. Ehrenreich et al. konnten Astrozyten als eine wesentliche Quelle für ET-3 identifizieren (Ehrenreich, Kehrl et al. 1991). Interessanterweise scheint ET-3 im Gegensatz zu ET-1 von Astrozyten auch in Vesikeln gespeichert zu werden. Weitere nachgewiesene Synthesorte für ET-3 sind der Gastrointestinaltrakt, die Lunge und Niere (Bloch, Eddy et al. 1989). Die Rolle von ET-3 im Rahmen der Entwicklungsbiologie ist im Abschnitt 1.1.3 dargestellt. ET-3 wird von Endothelzellen, von Epithelien des Gastrointestinaltrakt, in renalen Tubuluszellen, in zerebralen Neuronen und Astrozyten gebildet (Kedzierski and Yanagisawa 2001).

### **Biochemie und Molekularbiologie**

**Die Endothelin-Isopeptide.** Jedes der drei Isopeptide wird durch ein spezifisches Gen kodiert. Beim Menschen liegt das ET-1-Gen auf dem Chromosom 6, ET-2 ist auf Chromosom 1 und ET-3 auf Chromosom 20 zu finden (Inoue, Yanagisawa et al. 1989a). Das ET-1-Gen hat 5 Exone. Die Sequenz des aktiven Peptides befindet sich im zweiten Exon. Die Promoterregion hat eine typische CAAT und eine TATA-Sequenz zur trans-

kriptionellen Regulation sowie weitere zusätzliche putative Konsensussequenzen und cis-aktivierende Elemente, die auf eine ganze Reihe spezifischer Stimuli reagieren. Hier sind vor allem zu nennen: GATA-2-Bindungsstellen (an den Positionen -135 bis -131 und -910 bis -905), die für eine basale, gesteuerte Endothelinproduktion zuständig sind (Wilson, Dorfman et al. 1990; Dorfman, Wilson et al. 1992), und die AP-1-Bindungsstelle (Position -102 bis -109), an der ein Heterodimer bestehend aus den proto-onkogenen Proteinen *c-fos* und *c-jun* bindet (Paul, Zintz et al. 1995). Paul et al. (Paul, Zintz et al. 1995) und Lee et al. (Lee, Dhady et al. 1991) konnten in bovinen aortalen Endothelzellen (BAEC) zeigen, dass die AP-1-Bindungsstelle wichtig für die transkriptionelle Regulation des ET-1-Gens ist. AP-1 wiederum bindet an dasselbe *DNA responsive element* wie der Phorbolster TPA, das auch als *TPA-responsive element* bezeichnet wird. Als *immediate early gene* nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Onkoproteine spielt der AP-1-Komplex bei der Tumorgenese, Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung und der Zelltransformation eine wichtige Rolle (Angel and Karin 1991).

Weitere putative Konsensussequenzen finden sich für die Transkriptionsfaktoren *Calcium-responsive element* (CaRE, Position -599 bis -590) und *growth-hormone factor-1* (GHF-1, Position -1289 bis -1283 bp). Für die Endothel-spezifische Expression beim Menschen ist eine 143-bp lange Promotersequenz ausreichend (Lee, Bloch et al. 1990). Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und anderen vaskulär wirksamen Proteinen modulieren die ET-1-Promoteraktivität durch weitere „*upstream*“-gelegene Bindungsstellen und nehmen so Einfluss auf die Translation der ET-1 mRNA, so z.B. TNF $\alpha$  und NF $\kappa$ B (Wort, Ito et al. 2009), *high-density-Lipoproteine* (HDL) (Hu, Chuang et al. 1994), atriales natriuretisches Peptid (ANP) (Hu, Levin et al. 1992).

Bei der Ratte befindet sich ET-1 auf Chromosom 17 (17p12) (Sakurai, Yanagisawa et al. 1991), ET-2 auf Chromosom 5 (5q36) (Bloch, Hong et al. 1991) und ET-3 auf Chromosom 3 (Bloch, Eddy et al. 1989). Das Gen für den ET<sub>A</sub>-Rezeptor liegt bei der Ratte auf Chromosom 19 (19q11) (Deng, Dene et al. 1994; Cai, Yamada et al. 1995), für den ET<sub>B</sub>-Rezeptor auf Chromosom 15 (15q21-q22) (Sakurai, Yanagisawa et al. 1990; Cai, Yamada et al. 1995). Das Endothelin-System ist ein hoch-konserviertes Peptidsystem und kann in vielen Säugetierspezies (z.B. Mensch, Primaten, Rind, Hund, Schwein, Ratte, Maus) nachgewiesen werden (Inoue, Yanagisawa et al. 1989a).

Präproendothelin-1 ist ein Protein mit einer Länge von 212 Aminosäuren. Noch im Lumen des rauhen ER wird das Signalpeptid abgespalten. Mittels einer Furin-Endopeptidase wird das entstandene Proendothelin-1 zu bigET-1-Lys<sup>91</sup>-Arg<sup>92</sup> gespalten. Die Furin-Endopeptidase gehört zur Gruppe der Kalzium-abhängigen Serinendopeptasen, die vor allem in der trans-Golgimembran lokalisiert sind. Sie ist nicht spezifisch für Proendothelin-1. Eine Carboxypeptidase schneidet die C-terminalen Aminosäuren Lysin (Lys) und Arginin (Arg) ab. Es entsteht das 39 Aminosäure große Prohormon bigET-1 (Denault, Claing et al. 1995). Die Spaltung von bigET-1 zum biologisch aktiven ET-1 erfolgt durch ECE-1 (Xu, Emoto et al. 1994). ECE kommt somit eine entscheidende Rolle im Endothelinsystem zu, so dass es auch als Schlüsselenzym in der Biosynthese der Endotheline bezeichnet werden kann. Die biologische Potenz von bigET-1 im Vergleich zum ET-1 beträgt nur ca. ein Hundertstel. BigET-1 wird sezerniert und zirkuliert im Plasma, wo es auch von nicht spezifischen Peptidasen (Chymasen und nicht-ECE Metalloproteasen) zu ET-1 gespalten werden kann (vgl. Abb. 1.2) (Wypij, Nichols et al. 1992; Kido, Nakano et al. 1998). Die anderen Isoformen ET-2 und ET-3 entstehen in analoger Weise aus ihren Vorläuferproteinen.

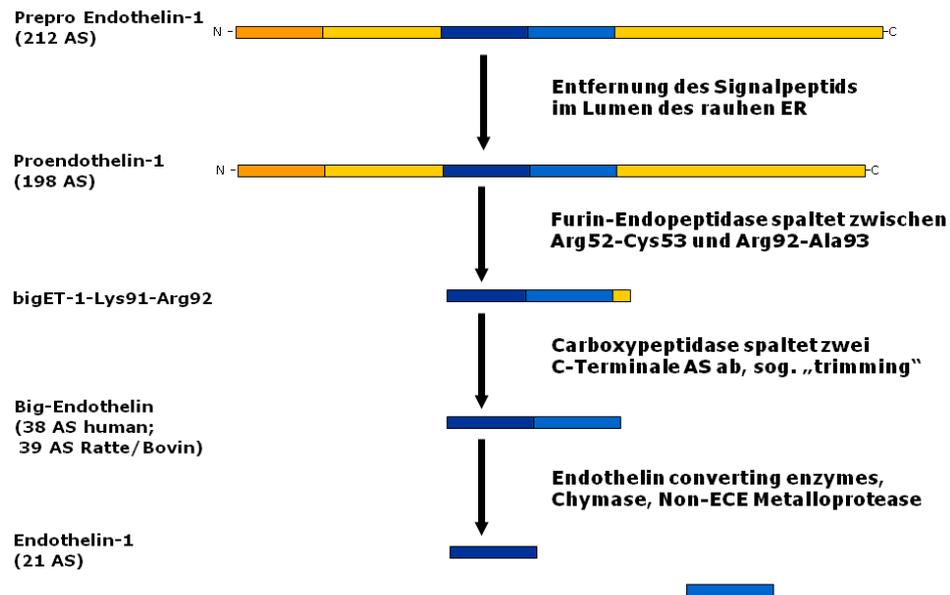


Abb. 1.2 Endothelinbiosynthese am Beispiel des Endothelin-1.

**Endothelin-Converting Enzyme - ECE.** Bisher sind drei ECE-Isoformen beschrieben, ECE-1, -2 und -3 (Xu, Emoto et al. 1994; Emoto and Yanagisawa 1995; Hasegawa, Hiki et al. 1998). Dieses Glykoprotein-Enzym verwendet ET-1 als bevorzugtes Substrat,

bigET-2 und bigET-3 werden ebenfalls gespalten, jedoch mit niedrigerer Spezifität. ECE-1 kann u.a. durch Phosphoramidon inhibiert werden und gehört zur Gruppe der membranständigen Metallopeptidasen mit struktureller Homologie zur neutralen Endopeptidase 24.11 (Enkephalinase). Es schneidet bigET-1 proteolytisch zwischen Position 21 (Tryptophan) und 22 (Valin) zu ET-1. Abhängig von untersuchten Gewebe- bzw. Zellart ergeben sich unterschiedliche relative Konversionsraten der einzelnen ET-Isoformen (Tab. 1.1). Von ECE-1 sind vier Subtypen ECE-1<sub>a-d</sub> beschrieben, die sich vor allem durch ihre verschiedene subzelluläre Lokalisation unterscheiden (Schmidt, Kröger et al. 1994; Shimada, Takahashi et al. 1995; Schweizer, Valdenaire et al. 1997; Valdenaire, Lepailleur-Enouf et al. 1999). ECE-2 ist ebenfalls ein membranständiges Enzym und weist gegenüber ECE-1 eine 59%ige Homologie auf. Es ist ca. 250fach empfindlicher gegenüber einer Inhibition durch Phosphoramidon. Im Gegensatz zum neutralen pH-Optimum der ECE-1-Isoform liegt dieser für ECE-2 bei pH 5,5. Es wird davon ausgegangen, dass ECE-2 im sauren, intrazellulären Milieu des Golgi-Apparats für die Bildung von ET-1 aus endogenem bigET-1 verantwortlich ist (Emoto and Yanagisawa 1995).

**Tab. 1.1 Konversionsraten der Endothelin-Isoformen durch ECE**

Zellart	bigET-1	bigET-2	bigET-3
Aufgereinigtes Enzym aus Rattenlunge	4	1	2
Rekombinantes bovines ECE-1 in CHO-Zellen	ca. 10	3,6	4,2
Rekombinantes humanes ECE-1 in CHO-Zellen	10	1	0
EA.hy926-Zellen	40	2,5	1

## Die Endothelin Rezeptoren

Alle drei Endotheline binden an zwei Membranrezeptoren, die als ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren bezeichnet werden. Beide Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und besitzen eine Größe von 45 bis 50 Kilodalton. Die Aminosäuresequenz zwischen ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptor ist zu ungefähr 50% homolog und ist als hochkonservierte Sequenz bei vielen Säugetieren gleich (85-90%). In *Xenopus laevis* konnte ein ET<sub>C</sub>-Rezeptor nachgewiesen werden (Karne, Jayawickreme et al. 1993), für den bisher noch kein humanes Äquivalent gefunden worden ist.

Verschiedene G-Proteine sind an der Signaltransduktion beteiligt. So ist der ET<sub>A</sub>-Rezeptor häufiger mit der G-Protein-Untereinheit G<sub>13</sub>α gekoppelt während der ET<sub>B</sub>-Rezeptor eher mit der G<sub>i1</sub>G<sub>i2</sub>α-Untereinheit assoziiert ist. Dies ändert sich, sobald eine Ligandenbildung

erfolgt. Hierbei erfolgt je nach Ligand beim  $ET_A$ -Rezeptor eine vermehrte Kopplung zur  $G_qG_{11}\alpha$ -Untereinheit, beim  $ET_B$ -Rezeptor zu  $G_{i3}\alpha$ -Untereinheit. Die Kopplung an die  $G_{i1}$ - und  $G_{i2}\alpha$ -Untereinheit ist für beide Rezeptoren ähnlich (Shraga-Levine and Sokolovsky 2000).

**Endothelin-Rezeptor Typ A.** Der  $ET_A$  Rezeptor bindet ET-1 mit zehn Mal höherer Affinität als ET-3 und wird hauptsächlich und zahlreich auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Hier vermittelt er die durch ET-1 hervorgerufene Vasokonstriktion. Bei der Signaltransduktion nach der Bindung von ET-1 an den  $ET_A$ -Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C mit nachfolgender Bildung von Inositol 1,4,5-Triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (vgl. Abb. 1.3).  $IP_3$  erhöht die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration, die dann die Vasokonstriktion einleitet. Die Vasokonstriktion ist lang anhaltend und bleibt auch dann noch bestehen, wenn kein Endothelin mehr am Rezeptor gebunden ist, wahrscheinlich durch eine weiterhin erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration. Stickstoffmonoxid (NO) verkürzt die Dauer der Kontraktion, indem es die Kalziumionenkonzentration wieder auf basale Werte zurückbringt. Diacylglycerol und Kalzium stimulieren zusätzlich die Proteinkinase C, die die mitogene Wirkung von Endothelin vermittelt (Simonson and Herman 1993). Die Stimulation von Proteinkinase C z.B. durch Phorbolster nimmt Einfluss auf zahlreiche Hormone wie Adrenalin (Hepler, Earp et al. 1988), Angiotensin II (Johnson and Garrison 1987; Caramelo, Tsai et al. 1988; Hepler, Earp et al. 1988; Wahl and Carpenter 1988; Pfeilschifter, Ochsner et al. 1989), Vasopressin (Caramelo, Tsai et al. 1988), Histamine, Thrombin (Brock and Capasso 1988) und *epidermal growth factor* (Johnson and Garrison 1987; Hepler, Earp et al. 1988; Wahl and Carpenter 1988).

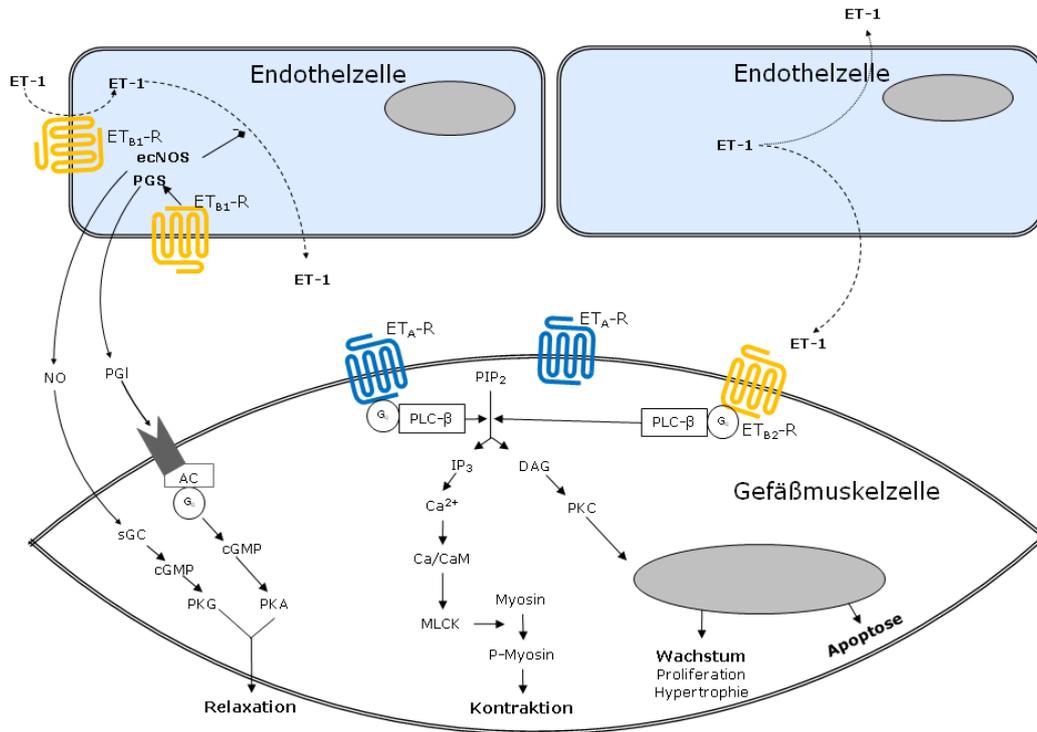
Nach einem Myokardinfarkt werden Katecholamine freigesetzt, die Proteinkinase A assoziierte Chloridkanäle auf den Zellen des geschädigten Myokards aktivieren. Dies führt zu einer Verkürzung des Aktionspotentials und könnte einen Mechanismus darstellen, über den ventrikuläre Arrhythmien ausgelöst werden. An Kardiomyozyten verhindert ET-1 nach Stimulation mit  $\beta$ -Adrenergika, vermittelt durch den  $ET_A$ -Rezeptor und G-Proteine, die Aktivierung des Chloridkanals und supprimiert die proarrhythmischen Effekte der Katecholamine. ET-1 inhibiert darüber hinaus die Aktivierung der Kalziumionenkanäle vom L-Typ und stimuliert Kaliumionenkanäle, welche eine negativ-bathmotrope Wirkung auf das Herz haben (Ono, Tsujimoto et al. 1994). Somit gibt es Hinweise, dass ET-1 an Kardiomyozyten entgegen dem Ergebnis anderer Unter-

suchungen (Ishikawa, Yanagisawa et al. 1988a; Ishikawa, Yanagisawa et al. 1988b) über den  $ET_A$ -Rezeptor auch kardioprotektive Wirkung entfalten kann.

**Endothelin-Rezeptor Typ B.** Der  $ET_B$ -Rezeptor wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert (Sakurai, Yanagisawa et al. 1990), kann aber auch auf glatten Gefäßmuskelzellen bestimmter Stromgebiete z.B. in zerebralen Gefäßen nachgewiesen werden. Der Rezeptor bindet die drei Endothelin-Isopeptide mit gleicher Affinität und kann so Wirkungen aller drei Peptide vermitteln. Wie der  $ET_A$ -Rezeptor hat bei Bindung von Endothelin an den  $ET_B$ -Rezeptor die Phospholipase C die Bildung von  $IP_3$  und Diacylglycerol und die Mobilisation von Kalzium aus den intrazellulären Kalziumspeichern zur Folge. Doch im Gegensatz zum Typ A-Rezeptor ist der Typ B-Rezeptor an inhibitorische G-Proteine  $G_i$  gekoppelt, die in einigen Zelltypen der Bildung von cAMP entgegenwirken und einen  $Na^+/H^+$ -Antiporter aktivieren (vgl. Abb. 1.3). Man unterscheidet zwischen dem auf Endothelzellen nachweisbaren vasodilatativ wirkenden  $ET_{B1}$ -Rezeptor und auf glatten Gefäßmuskelzellen zu findenden Kontraktion vermittelnden  $ET_{B2}$ -Rezeptor (Teerlink, Breu et al. 1994). Unter physiologischen Verhältnissen bewirkt die Bindung von ET-1 an den  $ET_A$ -Rezeptor eine Vasokonstriktion, wogegen die Bindung an den endothelialen  $ET_{B1}$ -Rezeptor eine Vasodilatation zur Folge hat (Ehrenreich and Schilling 1995; Salom, Torregrosa et al. 1995; Faraci and Heistad 1998). Die  $ET_B$ -Rezeptorsubtypen unterscheiden sich am ehesten in ihrer Lokalisation und Funktion als in ihrem molekularen Aufbau (D'Orléans-Juste, Labonté et al. 2002).

Es gibt Untersuchungen, die die vasokonstriktorische Wirkung des  $ET_{B2}$ -Rezeptors belegen. Er scheint in einigen Gefäßgebieten eine durch ET-1-Bindung hervorgerufene Vasokonstriktion zu vermitteln. Bei der Rezeptor-Liganden-Bindung bildet der  $ET_B$ -Rezeptor im Gegensatz zum  $ET_A$ -Rezeptor einen Rezeptor-Liganden-Komplex. Der  $ET_B$ -Rezeptor der Ratte bildet hierbei die Ausnahme (Takasuka, Sakurai et al. 1994). In einigen peripheren Stromgebieten ergaben sich nach Untersuchungen von D'Orléans-Juste et al. (D'Orléans-Juste, Labonté et al. 2002) ebenfalls Hinweise auf einen konstriktorisch wirkenden  $ET_B$ -Rezeptor. Hansen-Schwartz et al. (Hansen-Schwartz, Hoel et al. 2003) zeigten, dass sich in dem verwendeten Tiermodell für SAB vor allem die Expression des  $ET_B$ -Rezeptors erhöht und mit einer gesteigerten funktionellen Antwort auf Stimulation mit ET-1 einhergeht. Dies bestätigt Befunde von Bindungsstudien an der A. basilaris von Hunden, bei denen durch zweifache Injektion von autologem Blut eine experimentelle SAB hervorgerufen wurde. Die Bindungsstudien weisen auf eine Ver-

änderung der Rezeptorexpression von  $ET_A$ - zum  $ET_B$ -Rezeptor hin (Roux, Löffler et al. 1995).



**Abb. 1.3 Signaltransduktionsmechanismen der Endothelin-Rezeptoren im vaskulären Kontext**

Andere Untersuchungen zeigen im Gegensatz dazu eine Abnahme der  $ET_B$ -Bindungsstellen (Vatter, Konczalla et al. 2007). Die Eliminierung (*clearance*) von ET-1 aus dem Liquor scheint hauptsächlich durch den  $ET_B$ -Rezeptor statt zu finden (Hasselblatt, Lewczuk et al. 2001; Schinelli 2006). Ein weiterer Effekt, der sich bei zerebrovaskulären Ereignissen möglicherweise protektiv auswirken kann, ist die beobachtete antiapoptotische Wirkung bei Aktivierung des  $ET_B$ -Rezeptors (Ehrenreich, Nau et al. 2000; Siren, Lewczuk et al. 2002). Entsprechend kommt es bei  $ET_B$ -Rezeptor-defizienten Ratten (*ET<sub>B</sub>-receptor-deficient spotting lethal (sl / sl) rats*) zu einem größeren Infarktgebiet und vermehrter neuronaler Schädigung (Siren, Lewczuk et al. 2002). Ähnlich verhält es sich bei Gabe eines  $ET_B$ -Rezeptorantagonisten (Chuquet, Benchenane et al. 2002). Somit scheint die Blockade des  $ET_B$ -Rezeptors bei Hypoxie bzw. Ischämie trotz der oben genannten vasokonstriktorischen Wirkung unerwünscht und schädigend zu sein.

Die Bindung von ET-3 an den  $ET_B$ -Rezeptor ist für eine vorübergehende Vasodilatation verantwortlich zu sein, wenn ET-3 intravenös infundiert wird. Die Vasodilatation wird durch die erhöhte Produktion und Freisetzung von Stickstoffmonoxid, Prostacyclin und die Aktivierung von Kaliumkanälen verursacht (Kedzierski and Yanagisawa 2001).

ET-3 und der ET<sub>B</sub>-Rezeptor spielen eine wichtige Rolle für Zellen, die sich von aus der Neuralleiste stammenden Vorläuferzellen ableiten. Epidermale Melanozyten und Ganglienneurone des Intestinums entwickeln sich nicht korrekt, wenn der ET<sub>B</sub>-Rezeptor nicht funktionstüchtig ist oder ein Mangel an ET-3 besteht. Transgene Mäuse ohne funktionellen ET<sub>B</sub>-Rezeptor entwickeln ein Megakolon, wie man ihn bei Morbus Hirschsprung beobachten kann, und ausgedehnte weiße Fleckung sog. *coats*. Es konnte gezeigt werden, dass eine hereditäre Form des M. Hirschsprung beim Menschen mit einer Mutation des Gens für den ET<sub>B</sub>-Rezeptor assoziiert ist (siehe Abschnitt 1.1.3).

**Regulation und Expression der Endothelin-Rezeptoren.** Die Regulation der Endothelin-Rezeptoren gleicht in vielen Aspekten der der Endotheline (siehe Abb. 1.4). Zum Beispiel bewirken Hypoxie oder Cyclosporin A eine schnelle Stimulation der Produktion von ET-1 und des ET<sub>A</sub>-Rezeptors in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen. *Epidermal Growth Factor* (EGF), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Östrogen wirken stimulierend auf die Proteinbiosynthese des ET<sub>A</sub>-Rezeptors in einigen Geweben. Natriuretisches Hormon Typ C, Angiotensin II und wahrscheinlich auch bFGF erhöhen die Expression des ET<sub>B</sub>-Rezeptor. Eine Depletion des ET<sub>A</sub>-Rezeptors folgt der Einwirkung von Endothelin, von Angiotensin II, *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) und *Transforming Growth Factor*  $\beta$ , wohingegen cAMP und Katecholamine den ET<sub>B</sub>-Rezeptor herunterregulieren.

Die Unterschiede der gewebespezifischen Expression der beiden Endothelin-Rezeptoren trägt den verschiedenen Wirkungen der drei Endothelin-Isopeptide Rechnung. Auch innerhalb eines bestimmten Gewebes kann die Rezeptorverteilung und -dichte variieren. In der Niere zum Beispiel findet man in den Vasa recta und den Bogenarterien (Aa. arcuatae) besonders den ET<sub>A</sub>-Rezeptor, den ET<sub>B</sub>-Rezeptor vornehmlich in den Sammelrohren, so dass differierende Rollen der Rezeptoren in der Modulation des Salz und Wasserhaushalts anzunehmen sind. Im Glomerulum sind beide Rezeptoren zu finden (Simonson 1993). ET-1 reduziert den renalen Blutfluss, indem es den Widerstand der renalen Gefäße durch seine vasokonstriktorische Wirkung auf die afferenten und efferenten Arteriolen, aber auch auf die Bogen- und die interlobulären Arterien erhöht. Systemische Administration von ET-1 senkt die glomeruläre Filtrationsrate und kann eine Antinatriurese auslösen (die zum Teil mit einer Stimulation der Aldosteron-Produktion zusammenhängt).

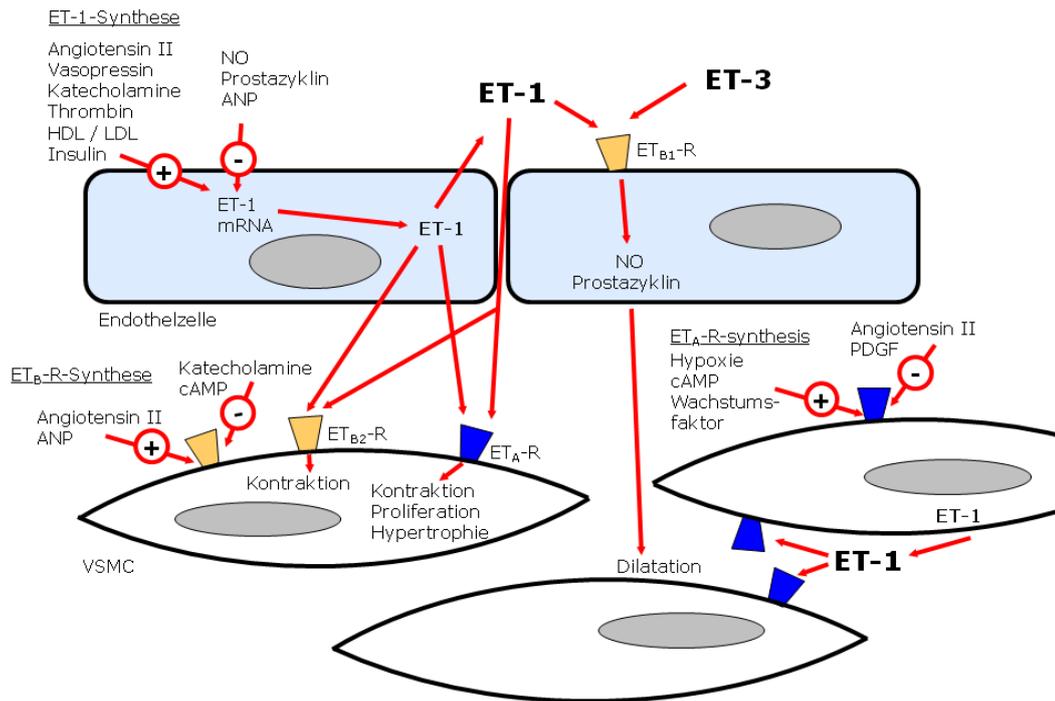


Abb. 1.4 Regulation des ET-System im vaskulären System.

Dieser Effekt wird am wahrscheinlichsten durch ET<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt. Beide Rezeptor-Subtypen werden nach Bindung des Liganden internalisiert (Abe, Nakayama et al. 2000; Oksche, Boese et al. 2000). Eine Desensitisierung erfolgt bereits nach 4 min durch Phosphorylierung der ET-Rezeptoren (Freedman, Ament et al. 1997).

## 1.1.2 Physiologie der Endotheline

### Regulation der Endotheline

Endothelin wird durch eine Vielzahl an Mediatoren reguliert: Angiotensin II, Arginin-Vasopressin, Katecholamine, Thrombin, HDL und LDL sowie Insulin stimulieren die Bildung von ET-1 (Kohno, Murakawa et al. 1989; Schini, Hendrickson et al. 1989; Resink, Hahn et al. 1990; Oliver, de la Rubia et al. 1991; Ehrenreich, Costa et al. 1993; Horio, Kohno et al. 1993; Hu, Chuang et al. 1994; Ong, Jowett et al. 1994; Lepailleur-Enouf, Valdenaire et al. 2000). Auch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , *Insulin-like Growth Factor*, Epidermaler Wachstumsfaktor und bFGF haben eine erhöhte ET-1-Bildung zur Folge (Benatti, Fabbrini et al. 1994).

Die Vasodilatoren NO und Prostazyklin hemmen die Bildung von ET-1 über einen gemeinsamen Mechanismus, der durch zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP)

transduziert wird (Boulanger and Lüscher 1990; Prins, Hu et al. 1994). Atriales Natriuretisches Hormon (ANP) inhibiert sowohl die basale Bildung von ET-1 als auch die durch Angiotensin II und Thrombin stimulierte (Kohno, Yasumari et al. 1991; Fujisaki, Ito et al. 1995). NO und Prostazyklin unterdrücken auch die ET-1 induzierte Vasokonstriktion und Mitogenese. Deshalb liegt es nahe anzunehmen, dass die vasodilatierende und die wachstumshemmende Wirkung von NO, Prostazyklin oder Natriuretischem Hormon im Gefäßsystem zumindest zum Teil mit der Inhibition sowohl der Produktion wie auch der Wirkung von ET-1 zusammenhängt.

ET-3 bewirkt über  $ET_B$ -Rezeptoren die Stimulation der NO-Synthese in Endothelzellen und ist vermutlich Bestandteil eines autokrinen oder parakrinen Regulationsmechanismus dieser vasoaktiven Substanzen (Baynash, Hosoda et al. 1994).

Sowohl ET-1 als auch ET-3 regen die Bildung einiger Prostaglandine an, was unter anderem die Inhibition der Plättchenaggregation (Thiemermann, Lidbury et al. 1989), der transienten Vasodilatation (beide vermittelt durch Prostazyklin) (Miura, Yukimura et al. 1991) und der pulmonalen Bronchokonstriktion (über Thromboxane) (Macquin-Mavier, Levame et al. 1989) erklärt. An der Niere kommt es durch die Stimulation von  $PG_{E_2}$  zur Inhibition der  $Na^+/K^+$ -ATPase-Aktivität (Zeidel, Brady et al. 1989).

Das Endothelin-System steht somit in engen funktionellen Zusammenhang mit lokal wirkenden, teils para- und autokrinen Mediatoren, die den lokalen Blutfluss von Organen und Geweben regulieren. Bei pathophysiologischen Vorgängen wie z.B. bei Arteriosklerose, pulmonaler arterieller Hypertonie oder Vasospasmus gibt es Hinweise auf ein Ungleichgewicht zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren.

### **Effekte von Endothelin auf die vaskuläre Funktion**

ET-1 und dem  $ET_A$ -Rezeptor wird eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des basalen physiologischen Gefäßtonus zugeschrieben. Eine Infusion von BQ-123, einem selektiven  $ET_A$ -Rezeptor-Antagonisten, in die A. brachialis von gesunden Probanden führt nach einer Stunde (Haynes and Webb 1994) zu einer progressiven Vasodilatation und zu einer Zunahme des Blutflusses zum Unterarm um 64%. Obwohl jedes ET-Isopeptid in der Lage ist, eine Vasokonstriktion zu erzeugen, ist ET-1 die potenteste Isoform (Ames, Sarau et al. 1999). Stärker vasokonstriktorisch wirksam ist bisher nur Urotensin (Ashton 2006; Zhu, Zhu et al. 2006), wobei eine Untersuchung an Aorta sowie größeren Arterien und

Venen von Ratte, Meerschwein, Kaninchen, Schwein und vom Menschen bezüglich einer Bedeutung von Urotensin und dem GPR14-Rezeptor als funktionelles System keine überzeugende Relevanz gezeigt hat (Camarda, Rizzi et al. 2002).

Auf molarer Ebene wirkt ET-1 ca. einhundert Mal potenter als Noradrenalin. Wie oben schon erwähnt, ist diese Reaktion durch die Aktivierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf vaskulären glatten Muskelzellen vermittelt. Es gibt Hinweise darauf, dass aber auch der ET<sub>B</sub>-Rezeptor in den Koronarien und auf Gefäßmuskelzellen anderer Stromgebiete zur Vasokonstriktion beiträgt. Eine Übersicht über die Rolle des Endothelin-Systems für die koronare Durchblutung bietet (Nguyen, Thorin-Trescases et al. 2010). ET-1 ist auch in der Lage die durch Noradrenalin ausgelöste Vasokonstriktion zu verstärken, umgekehrt verstärken Katecholamine die Vasokonstriktion der Endotheline.

### **1.1.3 Pathophysiologische Rolle der Endotheline**

#### **Kardiovaskuläres System**

ET-1 ist über die Aktivierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors an der Pathophysiologie der Hypertonie und Arteriosklerose (Schiffrin and Thibault 1991; Barton 2000) beteiligt und beeinflusst die myokardiale Kontraktilität (Maguire and Davenport 2002), die Chronotropie (Kedzierski and Yanagisawa 2001) sowie die Erregungsbildung und –ausbreitung am Herzen (Proven, Roderick et al. 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass ET-1 bei den pathologischen Prozessen, die nach einem vaskulären Insult und der nachfolgenden Reperfusion des Myokards auftreten, eine Rolle spielt. Die Konzentration von ET-1 ist nach einem Myokardinfarkt bei Tieren wie auch beim Menschen erhöht. Bei intravenöser Gabe von ET-1 wird der koronare Blutfluss um mehr als 90% gedrosselt (Kurihara, Yamaoki et al. 1989). Bei der Ratte ist die Plasmakonzentration von ET-1 signifikant stark hinter der Ligationstelle einer Koronararterie erhöht. Werden Antikörper (AK) gegen ET-1 vor der Ligation intrakoronar infundiert, lässt sich eine Reduktion der Myokardschädigung um 45% erzielen (Watanabe, Suzuki et al. 1990; Sakai, Miyauchi et al. 1996). ET-1 scheint neben Vasokonstriktion und Stimulation von vaskulärer Zellproliferation auch für vaskuläre Inflammation und Neointimabildung nach Gefäßschädigung verantwortlich zu sein (Anggrahini, Emoto et al. 2009). Ähnliche Erfahrungen sind auch bei Versuchen mit Hunden gemacht worden. Bei Ratten mit experimentell induziertem Myokardinfarkt findet man stark erhöhte ET-1-Spiegel in der

Reperfusionphase, so dass eine Beteiligung von ET-1 bei der Schädigung nach Reperfusion postuliert wird (Grover, Dzwonczyk et al. 1993). Studien an der Ratte zeigen, dass ET-1 bei der Entwicklung von neointimalen Läsionen nach Ballonangioplastie involviert zu sein scheint. Nach Angioplastie der A. carotis communis können diese Läsionen durch die Gabe von ET-Rezeptor-Antagonisten um 50% reduziert werden (Douglas, Loudon et al. 1994). In einem Rattenmodellen konnte festgestellt werden, dass die Blockade von ET<sub>B</sub>-Rezeptoren mit einem selektiven ET<sub>B</sub>-Antagonisten die neointimale Hyperplasie nach Ballondilatation verstärkt, da die protektive Wirkung von ET-1 am ET<sub>B</sub>-Rezeptor die ET<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte Neointimabildung wegfällt. Derselbe Effekt ist auch bei *Spotting-lethal* Ratten zu beobachten (Kitada, Yui et al. 2009). Eine ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockade kann die Neointimabildung nach Endotheltrauma (Angioplastie) und damit eine Re-Stenose verhindern. Eine prognostische Rolle konnte durch Eitel et al. (Eitel, Nowak et al. 2010) bei Patienten mit akuten STEMI feststellen. Danach stellt die gemessene ET-1-Serumkonzentration bei Aufnahme zur Akutversorgung des Myokardinfarkts ein unabhängiger Prädiktor für die Langzeit-Mortalität dar.

In einem tierexperimentellen Modell der Ratte für Herzversagen, bei dem durch koronare Ligation die Versorgung des Herzen mit Sauerstoff und Nährstoffen reduziert wird, überleben nach zwölf Wochen Therapie mit Gabe des ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten BQ-123 doppelt so viele Tiere (Sakai, Miyauchi et al. 1996). Ein anderer ET-Rezeptorantagonist Tezosentan zeigte protektive Effekte auf das Myokard bei ischämisch-bedingter Herzinsuffizienz (Ryu, Kim et al. 2009). Auch im Hinblick auf den Zusammenbruch der mitochondrialen Transkriptionskaskade nach Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz scheint Endothelin eine Rolle zu spielen (Garnier, Zoll et al. 2009). Diese Studien zeigen auf eine Rolle dieses Peptids in der Pathogenese der Herzmuskelschädigung nach akuter Myokardischämie und führen zur Überlegung, dass Endothelin-Rezeptor-Antagonisten hier einen schützenden Effekt für das Myokard haben können.

Die Konzentration von ET-1 und bigET-1 im Plasma ist bei Menschen mit mittelschwerer bis schwerer Herzinsuffizienz zwei bis vier Mal so hoch und korreliert unabhängig von der Ursache eng mit der Schwere der Erkrankung. Des Weiteren korreliert die Überlebensrate von Patienten, die einen Herzinfarkt erlitten haben, nach einem Jahr stark mit der Plasmakonzentration von ET-1, die drei Tage nach Infarkt ermittelt wurde. Somit könnte es möglich sein, über die ET-1-Plasmakonzentration eine prognostische Aussage

bei Patienten mit Herzversagen zu treffen (Omland, Lie et al. 1994). Infusion von ET-1 erhöht bei Tieren den systemischen Gefäßwiderstand und erniedrigt den kardialen Auswurf signifikant, so dass die Beteiligung von ET-1 an den verschiedenen Manifestationen bei Herzversagen anzunehmen ist. Das Peptid induziert molekulare und zelluläre Veränderungen, die zu einer kardialen Hypertrophie und der Initiation des Wachstumsprogramms mit Beteiligung von *immediate early genes* wie z.B. *c-fos* und *egr-1* und zur Reaktivierung embryonaler Gene und Stimulation zur Bildung von Myosin-Leichtketten in organisierten, kontraktilen Muskeleinheiten führen (Shubeita, McDonough et al. 1990).

Viele kardiovaskuläre Erkrankungen und kardiovaskuläres Risiko basieren zumindest zum Teil auf Störungen der endothelialen Funktion. Dabei lässt sich vielfach ein Missverhältnis zwischen NO und ET-1 feststellen (Nguyen, Thorin-Trescases et al. 2010). Little et al. adressieren die Rolle von ET-1 und des ET<sub>A</sub>-Rezeptors bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques (Little, Ivey et al. 2008). Chronische Hämodialyse geht mit einer vermehrten Serumkonzentration und Expression von ET-1 einher und ist ein unabhängiger Prädiktor für atherosklerotischen Veränderungen der Carotiden (Liu, Peng et al. 2010). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um dahinterstehende Mechanismen und Therapieoptionen wie eine ET-Rezeptor-Blockade zu eruieren. Eine Untersuchung zeigte mit dem neueren ET<sub>A</sub>-selektiven Rezeptorantagonist Avosentan einen alternativen Therapieansatz zur Behandlung der diabetischen Mikro- und Makroangiopathie bei Apolipoprotein E-*knock-out*-Mäusen (Watson, Li et al. 2010).

## **Bluthochdruck**

Aufgrund seiner starken vasokonstriktorischen Wirkung wurde bereits früh eine Rolle von ET-1 in der Pathophysiologie der Hypertonie postuliert. In Tiermodellen führte die Infusion von ET-1 zu einer Erhöhung des vaskulären Tonus mit entsprechendem Blutdruckanstieg (Hinojosa-Laborde, Osborn et al. 1989; Miller, Redfield et al. 1989; Vierhapper, Wagner et al. 1990; Hamilton, Huang et al. 1992). Bei einer Fallbeschreibung eines Patienten mit einem Hämangioendotheliom wurden sowohl Hypertonie als auch erhöhte ET-Spiegel gemessen, die sich aber nach der Entfernung des Tumors wieder auf Normwerte einpendelten (Yokokawa, Tahara et al. 1991) und mit einer Normalisierung des Blutdrucks einhergingen. Bei Patienten mit essentiellm Hypertonus konnte der nicht-selektive Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan die Blutdruckwerte

signifikant senken (Krum, Viskoper et al. 1998). Die Plasmakonzentration von ET-1 ist jedoch bei den meisten Patienten mit essentieller Hypertonie nicht oder nur gering erhöht (Schiffrin and Thibault 1991). Das Fehlen erhöhter Plasmaspiegel wurde damit erklärt, dass Endotheline hauptsächlich abluminal sezerniert werden (Wagner, Christ et al. 1992) und eher lokal auf parakriner und autokriner Ebene ihre Wirkung am Gefäßsystem entfalten. Dabei gibt es viele Hinweise, dass das ET-System bei chronischen Hypertonikern zu den Hypertonie-bedingten Endorganschäden beiträgt (Pinto-Sietsma and Paul 1998; Iwasa, Fan et al. 2001; Barton and Yanagisawa 2008). Untersuchungen mit Bosentan und Darusentan bei Patienten mit essentieller oder therapierefraktärer Hypertonie zeigten, dass eine signifikante Blutdrucksenkung erzielt werden kann (Nakov, Pfarr et al. 2002; Black, Bakris et al. 2007). In der Untersuchung von Dhaun et al. (Dhaun, Macintyre et al. 2009) wurde der blutdrucksenkende und nephroprotektive Effekt der Endothelinrezeptorblockade bei verschiedenen Nierenerkrankungen festgestellt. Ob die beobachteten Effekte jedoch Auswirkungen auf Hypertonie-bedingte Komplikationen, Morbidität und Mortalität haben, bedarf weiterer klinischer Studien (Lee, Chen et al. 2008).

Das ET-2 Gen scheint ein Marker für den Genlocus bei Ratten mit Salz-sensitiver Hypertonie zu sein (Deng, Dene et al. 1994). An ET<sub>B</sub>-defizienten Ratten konnte die wichtige Funktion des ET<sub>B</sub>-Rezeptors bei Salz-sensitiver Hypertonie gezeigt werden (Garipey, Ohuchi et al. 2000; Hocher and Ehrenreich 2002).

Die Plasmakonzentration von ET-1 ist erhöht bei Frauen mit Präeklampsie und beim HELLP-Syndrom (Dekker, Kraayenbrink et al. 1991; Nova, Sibai et al. 1991) und es ist bekannt, dass Amnion- und Endometriumzellen ET-1 bilden können. Zusammen mit der verminderten Bildung von Prosta-zyklinen und NO scheint ET-1 an der Ausbildung des Bluthochdrucks, wie er für Präeklampsie charakteristisch ist, beteiligt sein. Bei plazentärer Ischämie/Hypoxie kommt es durch die vaskuläre Dysfunktion zu Freisetzung von Endothelin und Thromboxan, erhöhter Sensitivität gegenüber Angiotensin II (Granger, Alexander et al. 2001; Gilbert, Ryan et al. 2008; Henao, Saleem et al. 2010).

### **Einfluss auf die Lunge und den Lungenkreislauf**

*In vivo* wirkt ET-1 bronchokonstriktorisch, so dass vermutet wird, dass ET-1 einerseits an der Pathophysiologie des Asthma bronchiale beteiligt ist, andererseits zur Entwicklung

einer pulmonalen Hypertonie und anderen Lungenerkrankungen beiträgt (Rubanyi and Polokoff 1994; Polikepahad, Moore et al. 2006). Man nimmt z.B. an, dass die Bronchokonstriktion durch die Stimulation der Thromboxan-Produktion und die nachfolgende Aktivierung von spezifischen Thromboxan-Rezeptoren auf glatten Muskelzellen des Bronchialsystems hervorgerufen wird. In Zellkultur sezernieren humane bronchiale Endothelzellen ET-1, das an die benachbarten glatten Muskelzellen bindet. Patienten, die unter Asthma bronchiale leiden, zeigen erhöhte ET-1-Konzentrationen in der durch eine Bronchiallavage gewonnenen Flüssigkeit, wohingegen die Plasmakonzentrationen normal sind. Dieser Befund konnte bei Gesunden und bei Patienten mit Bronchitis nicht erhoben werden. In der Remissionszeit eines Asthma bronchiale nach einer Behandlung mit einem oralen Glukokortikoid und inhalativen  $\beta$ -Adrenergikum ist die ET-1-Konzentration in der Bronchiallavage um 75% niedriger (Mattoli, Soloperto et al. 1991).

Hohe Spiegel von ET-1 mRNA und ET-1 selbst finden sich bei Patienten mit kryptogenetischer, fibrosierender Alveolitis und in den vaskulären Endothelzellen von Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie. Eine kleinere Studie konnte zeigen, dass die periphere Plasmakonzentration von ET-1 bei Patienten mit primärer pulmonaler Hypertension bis zu sechsfach über der Norm liegt (Giaid, Yanagisawa et al. 1993). Bosentan, ein unselektiver  $ET_A$ -/ $ET_B$ -Rezeptorantagonist, stellt heute einen wichtigen Pfeiler der medikamentösen Therapie der primären pulmonalen Hypertonie dar (Mucke 2008; Steiropoulos, Trakada et al. 2008).

Die Lunge ist ein wichtiges Organ für die Produktion und die Elimination von ET-1. ET-1 wird in der Lunge von pulmonalen und bronchialen Epithelzellen, von Endothelzellen und von Makrophagen synthetisiert (MacCumber, Ross et al. 1989; Ehrenreich, Anderson et al. 1990). Bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) können erhöhte ET-1-Plasmawerte gemessen werden, so dass entweder eine Störung in der Eliminierung (*clearance*) oder eine vermehrte Bildung vorliegt (Kedzierski and Yanagisawa 2001). Über die vaskulären  $ET_A$ -Rezeptoren vermittelt ET-1 die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, was zu Gefäßveränderungen im Sinne eines „*vascular remodelling*“ führt (Dupuis 2001; Rubin, Hoepfer et al. 2006). Aufgrund des komplexen Wechselspiels von ET-1, seiner vasokonstriktorischen Wirkung über  $ET_A$ -Rezeptoren und seiner vasodilatatorischen Wirkung über  $ET_B$ -Rezeptoren auf VSMC scheint eine unselektive Blockade einer selektiven  $ET_A$ -Rezeptorblockade möglicherweise unterlegen (Kedzierski

and Yanagisawa 2001; Kirchengast and Luz 2005). Seit 2002 ist der nicht-selektive Endothelin-Rezeptorblocker Bosentan für die Therapie der primären pulmonal-arteriellen Hypertonie zugelassen. Weitere Substanzen sind bereits zugelassen, andere sind zur Zulassung angemeldet und/oder in der klinischen Erprobung: Ambrisentan (ETA), Darusentan und Sitaxsentan (Battistini, Berthiaume et al. 2006). In anderen Studien werden Kombinationstherapien von ET-Rezeptorantagonisten und Sildenafil oder Prostazyklin geprüft (Battistini, Berthiaume et al. 2006).

### Nierenerkrankungen

Auch in der Niere scheint ET-1 bei einigen Erkrankungen, die mit Schädigung oder Veränderungen der Nierengefäße einhergehen, eine Rolle zu spielen (Kohan 1997; Kohan 2006). Die renalen Sammelrohre (*collecting duct – CD. Engl.*) stellen die Hauptquelle der ET-1-Bildung dar (Kohan 1997). Rothermund et al. zeigten, dass es unter einer diätischen Natriumbelastung in einem Rattenmodell für Salz-sensitive Hypertonie neben dem erwarteten Blutdruckanstieg zu einer signifikanten Veränderung der Rezeptordichte mit einem erhöhten  $ET_A/ET_B$ -Quotienten kommt (Rothermund, Luckert et al. 2001). Die renalen Natriumkanäle an den Epithelien der Sammelrohre reagieren auf Stimulation des  $ET_B$ -Rezeptors mit ET-1. Es kommt zu einer geringeren Öffnungswahrscheinlichkeit und damit zu einer Natriumretention (Bugaj, Pochynyuk et al. 2008). Über *knock-out* Tiermodelle mit CD-spezifischen ET-1 und  $ET_B$ -*knock-out* konnte der Einfluss von ET-1 auf die Natrium-Exkretion und die Rolle bei Salz-sensitiver Hypertonie bestätigt werden (Ahn, Ge et al. 2004; Ge, Bagnall et al. 2006).

Hoher et al. zeigten prosklerotische Effekte von ET-1 in der Niere transgener, human-ET-1 exprimierender Mäuse. Die beobachtete Glomerulosklerose entsteht trotz fehlender Hypertonie (Hoher, Thone-Reineke et al. 1997). In zahlreichen Untersuchungen konnten die nephroprotektiven Effekte einer ET-Rezeptorblockade beobachtet werden (Benigni, Zoja et al. 1993; Ortmann, Amann et al. 2004; Opocensky, Kramer et al. 2006; Barton 2008). Proteinurie und Albuminurie gelten als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse. (Pisoni, Ruggenti et al. 2001; Bruno, Cattaneo et al. 2005). In weiteren Untersuchungen werden Avosentan, Bosentan und ZD4045 auf ihren Einfluss auf Proteinurie bei chronischen Nierenerkrankungen wie diabetischer Nephropathie getestet (Berthiaume, Carlson et al. 2005; Battistini, Berthiaume et al. 2006).

Bei der Nephrotoxizität von Cyclosporin spielt neben Angiotensin II auch eine vermehrte Freisetzung von ET-1 eine Rolle (Bunchman and Brookshire 1991; Marsen, Weber et al. 2000; Darlametsos and Varonos 2001; Busauschina, Schnuelle et al. 2004; Castello, Sainaghi et al. 2005; Bergamasco, Sainaghi et al. 2008). An isolierten Nierengefäßen der Ratte verhindert die Inhibition von Endothelin die vasokonstriktiven Effekte des Medikaments (Lanese and Conger 1993) und schützt so gegen die Cyclosporin-induzierte nephrotoxische Wirkung *in vivo* (Fogo, Hellings et al. 1992). Ähnlich sind auch postischämisches Nierenversagen mit der Freisetzung und Wirkung von ET-1 (Chan, Chittinandana et al. 1994) und einige experimentelle Formen von induzierten postischämischen Nierenversagen durch eine Vorbehandlung mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zu verhindern (Clozel, Breu et al. 1993).

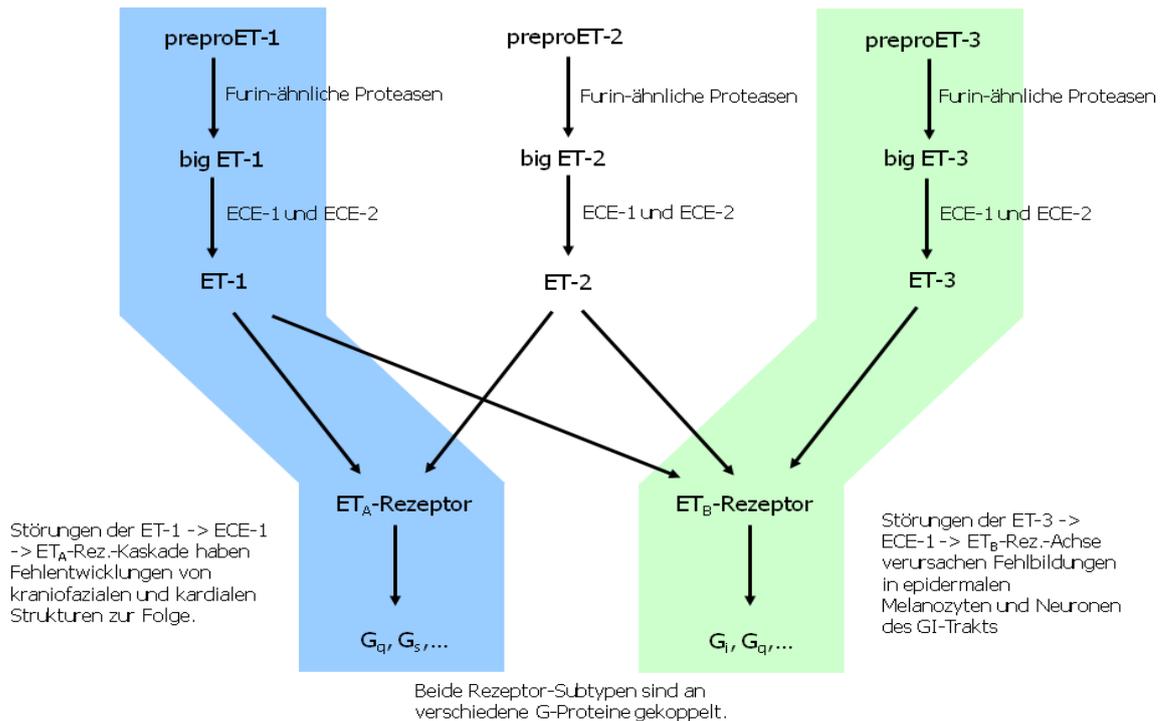
### **Störungen der pränatalen Entwicklung**

Wesentliche Erkenntnisse über die Rolle des Endothelin-Systems in der Entwicklung basieren auf *Knock-Out*-Tiermodellen. Das Zusammenwirken von ET-3, ET<sub>B</sub>-Rezeptor und ECE-1 ist für eine korrekte Entwicklung der aus der Neuralleiste entstehenden epidermalen Melanozyten und von Neuronen der Darmwand unverzichtbar (Baynash, Hosoda et al. 1994; Hosoda, Hammer et al. 1994; Yanagisawa, Yanagisawa et al. 1998). Die Signalkette aus ET-1, ET<sub>A</sub>-Rezeptor und ECE-1 ist für die natürliche Entwicklung der kranio-fazialen und kardialen Anatomie notwendig, die aus dem zephalen bzw. kardialen Vorläufer der Neuralleiste entstehen (Kurihara, Kurihara et al. 1994; Clouthier, Hosoda et al. 1998; Yanagisawa, Yanagisawa et al. 1998). ET-3 und ET<sub>B</sub>-*Knock-Out*-Mäuse sind nach der Geburt zunächst lebensfähig, gedeihen jedoch nicht und versterben schließlich nach drei bis sechs Wochen. Alle Tiere zeigen spastische Colonssegmente bei kompletter Abwesenheit der intramuralen Innervation. Der proximal liegende Gastrointestinaltrakt präsentiert sich stark dilatiert mit teils perforiertem Megacolon unmittelbar proximal der spastischen Anteile. Bei einigen dieser Tiere bestand bereits eine schwere Peritonitis. ET-1 und ET<sub>A</sub>-*Knock-Out*-Mäuse sterben spätestens bei Geburt durch mechanische Asphyxie aufgrund der schweren kraniofazialen Fehlbildungen, die sich im Bereich des ersten Schlundbogens befinden und von diesem ableiten. Man findet einen gespaltenen Gaumen, schwach entwickelten Unterkieferknochen, eine hypoplastische Zunge und eine fehlende Verschmelzung des Os hyoideum mit der Schädelbasis. Auch das Mittelohr kann Fehlbildungen aufweisen. Clouthier et al. konnten zeigen, dass die Interaktion von ET-1 mit

dem ET<sub>A</sub>-Rezeptor am zehnten Embryonaltag für die regelrechte Entwicklung der Zellen der Neuralleiste und den sich ableitenden Mesenchymalzellen erforderlich ist (Clouthier, Williams et al. 2000). Mäuse ohne ET<sub>A</sub>-Rezeptor, ET-1 oder ECE-1 zeigen Entwicklungsstörungen des arteriellen Gefäßsystems, die ein Fehlen der rechten A. subclavia und Atresie der Aorta bei gleichzeitigem Vorhandensein eines rechtsseitigen Aortenbogens umfassen. Auch ventrikuläre Septum-Defekte werden häufiger bei diesen Tieren beobachtet (Kurihara, Kurihara et al. 1995; Clouthier, Hosoda et al. 1998; Yanagisawa, Yanagisawa et al. 1998). ECE-1-defiziente Mäuse zeigen entsprechend der Schlüsselrolle von ECE-1 eine Mischung des Phänotyps von Tieren, denen entweder der ET-1/ET<sub>A</sub>- oder der ET-3/ET<sub>B</sub>-Signalweg fehlt. Ihnen fehlen außerdem epidermale Melanozyten, so dass diese Tiere zwar eine normale Pigmentierung der Retina, jedoch ein weiß geflecktes Fell vorweisen. Aufgrund eines Fehlens von myenterischen Ganglien kommt es im Bereich des Colons sigmoideum und des Rektums zu einer Verengung und funktionalen Obstruktion. Der proximale Colon ist stark dilatiert, so dass die intestinale Dysfunktion schließlich zum Tode führt (Baynash, Hosoda et al. 1994; Hosoda, Hammer et al. 1994). Das pathophysiologische Korrelat bei Menschen ist Morbus Hirschsprung, der als multigenetische Erkrankung als eine mögliche Ursache Mutationen in den Genen für ET-3 und den ET<sub>B</sub>-Rezeptor aufweisen kann (Chakravarti 1996; Edery, Attie et al. 1996; Garipey 2001). Mäuse, die weder ECE-1 noch ECE-2 exprimieren, besitzen noch weitaus schwerere Herzentwicklungsfehler (Yanagisawa, Hammer et al. 2000), wobei sich die Rolle von ECE-2 für die Entwicklung kardialer Strukturen erst beim *Knock-Out* beider Gene zeigt. Fehlt nur ECE-2, sind die Tiere unauffällig. Für eine regelrechte Entwicklung des Herzes ist die Aktivierung von ET<sub>A</sub>-Rezeptoren durch ET-1 Mitte des neunten und Mitte des elften Tages nach der Befruchtung der Eizelle entscheidend (Yanagisawa, Hammer et al. 1998) (Abb. 1.5).

Mit den sogenannten *piebald* Mäusen existiert eine natürliche Mutante mit einer fehlenden oder verringerten Expression des ET<sub>B</sub>-Rezeptors. Yamada et al. konnten zeigen, dass die Expression und die Promoteraktivität des ET<sub>B</sub>-Rezeptors keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der natürlichen Mutante gibt. Durch frühzeitigen Abbruch und aberrantes *splicing* des ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Transkripts verursacht durch ein Retroposon-ähnliches Element (*retroposon-like element*) im ersten Intron kommt es zu herabgesetzten Bildung des normalen ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Transkripts, was für den Phänotyp dieser Tiere verantwortlich ist (Yamada, Ohtani et al. 2006). Untersuchungen dieser Tiere

haben wesentlich zum Verständnis von Erkrankungen beigetragen, die ihren Ursprung in Zellen der embryonalen Neuralleiste haben. So ist für die Ausbildung eines Morbus Hirschsprung alleine eine Mutation im Gen des  $ET_B$ -Rezeptors ausreichend (Druckenbrod, Powers et al. 2008).



**Abb. 1.5 Endothelin-Signalwege und ihre Bedeutung für die Entwicklung. In Anlehnung an (Kedzierski and Yanagisawa 2001)**

Beim Verschluss des Ductus arteriosus bei Geburt scheint lokal produziertes Endothelin beteiligt zu sein. Die Inhibition der Bildung und Wirkung von ET-1 durch Prostacyclin oder insbesondere Prostaglandin E2 könnte den frühzeitigen Verschluss des Ductus beim Fetus verhindern. Ein persistierender Ductus arteriosus bei Neugeborenen kann sehr effektiv mit Indomethazin behandelt werden. Diese Wirkung beruht möglicherweise darauf, dass Indomethazin die *Down*-Regulation der Endothelin-Synthese oder dessen Wirkung durch endogene Prostanoiden aufhebt.

### 1.1.4 Endotheline im ZNS

Das Endothelin-System wird in vielen Regionen und unterschiedlichen Zelltypen des Gehirns exprimiert.  $ET_A$ ,  $ET_B$ , ET-1 und ET-3 werden im Gehirn in vaskulären, neuronalen und glialen Zellen exprimiert. Immunreaktives Endothelin lässt sich in

Neuronen des zerebralen Cortex, im Striatum, den Amygdala, im Hippocampus, in den paraventriculären und supraoptischen Kernen des Hypothalamus, im Subfornikalorgan, in der Eminentia mediana, in den Nuklei raphe und der Hirnanhangsdrüse nachweisen (Lee, de la Monte et al. 1990; Giaid, Gibson et al. 1991; Takahashi, Ghatei et al. 1991). Obwohl ET-1 zerebral dominiert gegenüber den anderen Endothelin-Isopeptiden, wird in der Hirnanhangsdrüse hauptsächlich ET-3 exprimiert (Matsumoto, Suzuki et al. 1989; Yoshizawa, Shinimi et al. 1990). Der ET<sub>A</sub>-Rezeptor lässt sich immunhistochemisch in noradrenergen Neuronen-Gruppen und Gebieten des supraoptischen und paraventriculären Hypothalamus darstellen (Yamada and Kurokawa 1998). ET<sub>B</sub>-Rezeptoren lassen sich in den Neuronen des diagonalen Broca-Bands, der Eminentia mediana und in hypothalamischen Neuronen darstellen, die auch das *Releasing*-Hormon des Luteinisierenden Hormons bilden (Yamamoto and Uemura 1998). ECE-1 und ECE-2 werden ebenfalls im Gehirn nachgewiesen (Xu, Emoto et al. 1994; Emoto and Yanagisawa 1995; Yanagisawa, Hammer et al. 2000).

Zahlreiche Untersuchungen belegen eine Rolle des ET-Systems im Gehirn. So führt die intrazerebroventrikuläre Injektion von ET-1 zu einem transienten Anstieg des arteriellen Blutdrucks, der Herz- und Atemfrequenz und der Aktivität der sympathischen Nerven an den Nieren. In hohen Dosen kommt es anfangs vorübergehend zu einem Anstieg dieser Parameter, anschließend jedoch zu deren lang anhaltenden Verringerung (Kuwaki, Kurihara et al. 1997). Aus der Möglichkeit, die Veränderungen des arteriellen Blutdrucks durch die Gabe von *alpha*-1 Rezeptorblockern zu unterbinden, lässt sich ableiten, dass dieser Effekt durch eine Aktivierung des Sympathikus hervorgerufen wurde (Yamamoto, Kimura et al. 1992). Über die Aktivierung der oben genannten, zentralen, sympathischen Nervenzentren und die Aktivierung und Induktion von Arginin-Vasopressin nimmt ET-1 Einfluss auf die zentrale Blutdruckregulation. *In vivo* stimuliert Endothelin über ET<sub>B</sub>-Rezeptoren die Freisetzung von Arginin-Vasopressin aus dem Hypothalamus (Rossi, O'Leary et al. 1997; Rossi, Black et al. 2004; Rossi and Maliszewska-Scislo 2008). Auf Astrozyten findet man hauptsächlich ET<sub>B</sub>-Rezeptoren, wo sie, durch Endotheline aktiviert, die DNA-Synthese stimulieren und die Bildung und Aktivierung von *second-messenger*-Molekülen durch andere Neurotransmitter verhindern. Als bisher einzige Peptide können ET-1 und ET-3 den Natrium-Kalium-Chlorid-Transporter auf den Endothelzellen der Hirnkapillaren aktivieren, die Teil der Blut-Hirn-Schranke sind (Vigne, Lopez Farre et al. 1994). Diese wichtige Funktion trägt zur Homöostase des

niedrigen Kaliumspiegels im ZNS bei, die essentiell für die neuronale Depolarisation und die nachfolgende Weiterleitung der elektrischen Impulse von Neuron zu Neuron ist (Walz 1997).

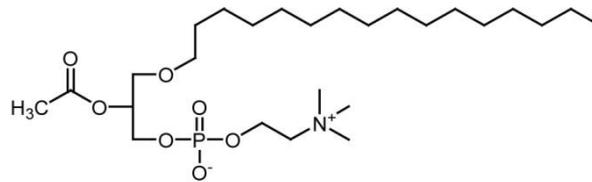
Dreier et al. (Dreier, Kleeberg et al. 2002) fanden heraus, dass ET-1 einer der stärksten Stimulatoren für *spreading depression* ist. Auffällig ist hierbei jedoch, dass dieser Effekt über ET<sub>A</sub>-Rezeptoren und PLC-Aktivierung vermittelt wird (Kleeberg, Petzold et al. 2004). Astrozyten exprimieren zwar ET<sub>A</sub>-mRNA, jedoch lassen sich auf der Zelloberfläche hauptsächlich ET<sub>B</sub>-Rezeptoren nachweisen (siehe auch Abschnitt. 4.3). Hinsichtlich des Rezeptorprofils scheinen deshalb Astrozyten nicht primär bei der ET-1 vermittelten *spreading depression* involviert. Astrozyten können jedoch über interzelluläre *gap junction*-vermittelte Kalzium-abhängige Oszillationswellen (Smith 1994; Giaume and Venance 1998) die angrenzenden Neurone depolarisieren. Sowohl ET-1 als auch Sarafotoxin sind in der Lage, eine Kalziumionen-Freisetzung aus Astrozyten zu beeinflussen (Holzwarth, Glaum et al. 1992). Da ET-1 darüber hinaus Kalzium-abhängigen Oszillationswellen in Astrozyten auslösen kann (Van Harreveld and Fifkova 1973; Blomstrand, Giaume et al. 1999), könnte ET-1 über diesen Zusammenhang *spreading depressions* initiieren und unterhalten. Die Kalziumionen-Freisetzung aus Astrozytenfortsätzen, wie sie auch bei der Blut-Hirn-Schranke zu finden sind, bewirkt über eine Kaliumionen-Freisetzung in niedriger Kalziumionen-Konzentrationen eine Vasodilatation, bei höherer Kalziumionen-Konzentrationen jedoch eine Vasokonstriktion (Girouard, Bonev et al. 2010).

Bei intraventrikulärer Applikation führt Endothelin über Kerngebiete im Hirnstamm und zirkumventrikulär gelegene Zentren zu einer Blutdruckerhöhung. Es wird bei Volumemangel freigesetzt und übt einen antidipsogenen Effekt aus, indem es das durch Angiotensin induzierte Wasser suchende Verhalten antagonisiert (Samson and Murphy 1993). Einige Hormone wie Wachstumshormone, Thyreotropin, Luteinisierendes und Follikelstimulierendes Hormon werden stimuliert, die Sekretion von Prolaktin hingegen zumindest in Zellkulturen inhibiert (Kanyicska, Burris et al. 1991). Die Bedeutung für physiologische oder pathophysiologische Vorgänge dieser Effekte von Endothelin ist noch nicht abschließend geklärt.

## 1.2 Platelet-Activating Factor

### 1.2.1 Aufbau, Synthese, Physiologie und Abbau

Platelet-activating Factor (PAF) ist ein sehr potenter und vielseitiger (pleiotroper) Botenstoff, der ursprünglich als "löslicher Faktor" bei der Leukozyten-abhängigen Histamin- und Serotoninausschüttung aus Blutplättchen beschrieben wurde (Henson 1970; Siraganian and Osler 1971). Die chemische Bezeichnung lautet 1-O-Alkyl-2-Acetyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6 Molekulare Struktur von Platelet-Activating Factor**  
(Quelle: Wikipedia. Bild unter GNU Free Documentation License)

Die Bezeichnung "Plättchen-aktivierender Faktor" wird den vielfältigen Funktionen des Botenstoffs nicht gerecht, soll jedoch im Rahmen dieser Arbeit beibehalten werden. PAF wurde in dieser Arbeit aufgrund seiner regulativen Interaktion mit dem Endothelinsystem untersucht. Die Synthese von Platelet-Activating Factor im Gehirn erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Die *De Novo*-Synthese ist abhängig von der PAF-synthetisierenden Phosphocholintransferase, während hingegen der *remodelling*-Syntheseweg durch die lyso-PAF-Acetyltransferase gesteuert wird. Die PAF-Synthese im Gehirn wird durch viele Stimuli beeinflusst, u.a. Ischämie und Reperfusion (Braquet, Paubert-Braquet et al. 1989). In einem Rückenmark-Infarkt-Modell konnte ein zwanzigfacher Anstieg von PAF beobachtet werden, der zu verminderter Durchblutung und Ödem führt (Lindsberg, Yue et al. 1990). Zusätzlich bewirkt die Freisetzung von PAF eine präsynaptische Ausschüttung von Glutamat aus Neuronen (Bazan, de Turco et al. 1995), dessen Bedeutung im Rahmen der zerebralen Ischämie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben ist. Es gibt eine Reihe von Beispielen für PAF-induzierte Expression von *immediate early genes* (Eddleston and Mucke 1993). Squinto et al. demonstrierte die Stimulation von *c-fos/c-jun* (AP-1) in humanen Neuroblastomzellen (Squinto, Block et al. 1989). Albani et al. konnten zeigen, dass PAF *c-fos*- und den Zinkfinger Transkriptionsfaktor zif/286 in Astrozyten stimuliert (Albani, Condorelli et al. 1993). LeVan et al. (LeVan, Bloom et al. 1998) zeigten in bronchialen Endothelzellen, dass für die Aktivierung des *c-fos/c-jun*-AP-1-Komplexes die

Signaltransduktion über den PAF-Rezeptor erforderlich ist. Eine direkte Wirkung von PAF auf Astrozyten und Oligodendrozyten beinhaltet die Induktion von Caspase-3-abhängiger Apoptose in diesen Zellen (Hostettler, Knapp et al. 2002). Die Wirkung von PAF auf einige andere Zytokine wurden von Braquet, Ruis und Valone gezeigt (Braquet, Hosford et al. 1991; Ruis, Rose et al. 1991; Valone and Ruis 1992). Entzündliche Prozesse im Rahmen von Vasospasmus nach SAB haben PAF als einen möglichen Mediator identifiziert (Kassell, Sasaki et al. 1985; Peterson, Kwun et al. 1990). In Tiermodellen für SAB an Hunden (Abe, Kasuya et al. 2002) und Hasen (Hirashima, Endo et al. 1996) konnte die Rolle von PAF und die protektive Funktion des PAF-Rezeptor-Antagonisten E5880 bei SAB bestätigt werden, wobei der Nachweis von PAF in der Intima und Media der vasospastischen Gefäße nach SAB als Hinweis auf eine parakrine Interaktion mit dem ET-System gewertet werden kann. In einer offenen klinischen Studie (Hirashima, Endo et al. 2001) wurden Patienten mit SAB infolge eines rupturierten Aneurysmas ab dem vierten Tag nach dem Ereignis mit E5880 behandelt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit E5880 einen vielversprechenden Ansatz darstellt, zerebralen Vasospasmus zu verhindern und Ischämie-bedingte klinische Symptome zu reduzieren.

Als wichtiger Entzündungsmediator spielt PAF bei Asthma bronchiale und allergischen Entzündungsreaktionen im Bronchialsystem eine Rolle. Der  $ET_A$ -Rezeptorantagonist BQ-123 ist in der Lage, PAF-induzierte allergische Reaktionen im Tiermodell zu verhindern (Kassuya, Rogerio et al. 2008). In diesem Mausmodell induzierte PAF Ödeme an den entsprechenden Tierpfoten und bewirkte die Einwanderung von Inflammationszellen. Bei fehlender Wirkung von BQ788, einem  $ET_B$ -Rezeptorantagonist, war BQ123 in der Lage sowohl die Ödembildung als auch Entzündungsreaktion zu blockieren. In einem murinen Modell für Asthma bronchiale hingegen bewirkte erst die duale Hemmung beider ET-Rezeptortypen die Einwanderung von Eosinophilen nach Ovalbumin-Exposition. Der genaue Mechanismus, über welche Signaltransduktionswege diese PAF-Endothelin-Interaktion vonstatten läuft, bleibt ungeklärt. So wäre neben einem direkten, PAF-Rezeptor-gekoppelten Signalweg, der zu einer Endothelin-Freisetzung führt, ein indirekter über intermediäre Mediatoren denkbar.

### **1.2.2 Platelet-Activating Factor Rezeptor**

Der *Platelet-activating factor*-Rezeptor ist ein membranständiger, G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranösen Domänen (Honda, Ishii et al. 2002). Initial

isolierten Honda et al. (Honda, Nakamura et al. 1991) einen cDNA-Klon für den PAF-Rezeptor bei Meerschweinchen. Homologe Sequenzen wurden daraufhin im Ratten- und Menschen-Genom entdeckt (Nakamura, Honda et al. 1991; Bito, Honda et al. 1994). Beim Menschen unterscheidet man zwei Subtypen PAFR1 und PAFR2, die durch zwei unterschiedliche Promoter kodiert werden (Mutoh, Bito et al. 1993). Der PAF-Rezeptor ist an verschiedene G-Protein gekoppelt ( $G_{\alpha q/11}$ ,  $G_{\alpha o}$  und  $G_{\alpha i}$ ). So läuft die Aktivierung des Signalweges über PLC vermutlich über  $G_{\alpha q/11}$  und zum Teil auch über  $G_{\alpha o}$ . Welche der vielen möglichen G-Protein-gekoppelten Signalwege aktiviert werden, ist stark vom Zelltyp abhängig. In Fibroblasten ist der PAFR-Erk-Signalweg, über den Proliferation und Genexpression z.B. von inflammatorischen Zytokinen vermittelt wird, PKC-abhängig, jedoch Ras-unabhängig (Honda, Takano et al. 1994; van Biesen, Hawes et al. 1996). In polymorphnukleären Neutrophilen wird der Ras-Erk-Signalweg über die Kopplung mit  $G_q$ -Ras-GRF aktiviert (Marinissen and Gutkind 2001).

Brodie et al. (Brodie 1994) zeigten in Astrozytenprimärkulturen funktionelle PAF-Rezeptoren mit einer Rezeptordichte von  $B_{max} = 136 \pm 15,3$  fmol/mg Protein und einer Dissoziationskonstante  $K_D = 29 \pm 3,2$  nM. Somit exprimieren Astrozyten hochaffine PAF-Rezeptoren mit einer Rezeptordichte, die vergleichbar mit der von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Präparationen des Rattenhirns ist (Ukena, Krogel et al. 1989; Albani, Condorelli et al. 1993; Bito, Kudo et al. 1993). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass PAF-Antagonisten im Gehirn im Rahmen ischämischer bzw. hypoxischer und entzündlicher Prozesse eine protektive Wirkung haben (Frerichs, Lindsberg et al. 1990; Prehn and Kriegelstein 1993; Hirashima, Endo et al. 1996).

## 1.3 Zerebrale Ischämie

### 1.3.1 Epidemiologie

Der zerebrovaskuläre Insult (Schlaganfall) ist eine der Hauptursachen für Morbidität, Invalidität und Mortalität in den westlichen Industrienationen (Murray and Lopez 1997b; Murray and Lopez 1997a). Man unterscheidet zwei ätiologisch differierende Typen, die beide zu einer irreversiblen zerebralen Schädigung führen können. Der thrombembolische Apoplex ist durch einen akuten Verlust der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen der nachgeschalteten Hirnareale charakterisiert. Der blutungsbedingte Apoplex ist durch eine intrakranielle, raumfordernde Blutung innerhalb des geschlossenen Schädels

gekennzeichnet. Beim blutungsbedingten Apoplex können weitere Subtypen, wie z.B. die intrazerebrale Blutung und die subarachnoidale Blutung unterschieden werden.

Basierend auf dem Erlanger Schlaganfall Register wurde für die Bundesrepublik Deutschland eine Inzidenz von 182 pro 100.000 ermittelt. Hochgerechnet auf die Gesamtbevölkerung ereignen sich 150.000 Schlaganfälle pro Jahr zuzüglich 15.000 Rezidivfälle (Kolominsky-Rabas and Heuschmann 2002).

### **1.3.2 Mechanismen der zerebralen Schädigung durch vaskuläre Ereignisse**

Die entscheidenden pathophysiologischen Mechanismen einer verhängnisvollen Kaskade, die zu der schweren Hirnschädigung beim ischämischen Infarkt führt, beinhalten Exzitotoxizität, Perinfarkt-Depolarisation, Entzündung und Apoptose.

Hirngewebe hat einen relativ hohen Verbrauch von Sauerstoff und Glukose und hängt fast ausschließlich von der oxidativen Phosphorylierung für die Energiegewinnung ab. Kommt es zu einer Verminderung des fokalen, zerebralen Blutflusses, sinkt das Angebot von Nährstoffen und Substraten, insbesondere Sauerstoff und Glukose, die als Hauptenergielieferanten für die Aufrechterhaltung des Ionengradienten an der neuronalen Zellmembran benötigt werden. Daraufhin kommt es zu einem Verlust des Membranpotentials und Neuronen und Gliazellen depolarisieren (Katsura, Kristian et al. 1994). Spannungsabhängige Kalziumionenkanäle werden aktiviert und exzitatorisch wirkende Aminosäuren werden in den extrazellulären Raum freigegeben. Gleichzeitig verringert sich die energieabhängige Wiederaufnahme von exzitatorischen Aminosäuren, so dass es zu einer Akkumulation von Glutamat im Extrazellulärraum kommt. Über Phospholipase C und  $IP_3$  werden NMDA- und Glutamat-Rezeptoren aktiviert, wodurch eine weitere Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration hervorgerufen wird. Dies hat zur Folge, dass sich Ionenkanäle für monovalente Ionen wie Natrium und Chlorid öffnen. Freies Wasser folgt diesem Influx, der den Kaliumionen-Efflux um ein Vielfaches überwiegt, und zu einem zellulären Ödem führt, dadurch den intrakraniellen Druck erhöht, das Perfusionsdefizit vergrößert und letztlich zur Herniation führen kann.

Der maßgebliche Parameter für das Überleben eines Patienten nach einem zerebralen Insult ist das Ausmaß des Hirnödems in den ersten Stunden nach dem Ereignis.

Zusätzlich zieht die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration weitere zytoplasmatische und nukleäre Ereignisse nach sich, so z.B. die Aktivierung proteolytischer

Enzyme, die Proteine des Zytoskeletts und extrazelluläre Matrixproteine degradieren und so die strukturelle Integrität des Milieus verändern. Membranschäden und Lipidperoxidation entstehen durch Aktivierung von Phospholipase A2 und Cyclooxygenase, die massiv hochreaktive Freie-Radikale bilden. Die wichtige Rolle freier Sauerstoffradikale bei der Zellschädigung nach einem Insult wird unterstützt durch die Erkenntnisse, dass auch eine späte Applikation von Radikalfängern und eine Überproduktion von Freie-Radikale-abbauenden Enzymen das Ausmaß der Schädigung verringern kann (Zhao, Pahlmark et al. 1994), gleichzeitig aber Tiere, denen diese Enzyme fehlen, stärker anfällig für ischämische Zellschädigung sind. Darüber hinaus sind freie Sauerstoffradikale wichtige Signalmoleküle für Entzündung und Apoptose. Durch die Kalziumionen-abhängige, neuronale NO-Synthase wird NO produziert, das mit den Superoxid-Anionen zu hochreaktiven Peroxynitriten reagiert. Gleichzeitig kann von zerebrovaskulären Endothelzellen freigesetztes NO durch eine Verbesserung der Mikrozirkulation protektiv wirken (Huang, Huang et al. 1994; Dirnagl, Simon et al. 2003).

In den Mitochondrien, die im gesunden Organismus im Rahmen der Atmungskette eine Hauptquelle für freie Sauerstoffradikale sind, kommt es zu Störungen an der inneren Mitochondrienmembran und zur Oxidation von Proteinen, die am Elektronentransport, H<sup>+</sup>-Transport und ATP-Produktion beteiligt sind (Dugan and Choi 1994). Die Mitochondrienmembran wird durchlässig und es kommt zu Mitochondrienschwellung, Einbruch der ATP-Produktion und Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen (Kristian and Siesjo 1998). Das Apoptose-fördernde Cytochrom C wird aus den Mitochondrien freigesetzt (Fujimura, Morita-Fujimura et al. 1998) und aktiviert Caspase-3 über einen Komplex mit Apoptose-aktiverenden Faktor-1 (*apoptosis-activating factor-1*, *APAF1*, *engl.*), Pro-Caspase-9 und ATP (Green and Reed 1998). Diese Prozesse beeinträchtigen die Hämodynamik, den Zellmetabolismus und den Ionenhaushalt der in Mitleidenschaft gezogenen Hirnregionen in unterschiedlichem Ausmaß. Der zerebrale Blutfluss liegt dort ca. 20% unter den Normalwerten (Hossmann 1994). Nur Minuten nach Beginn der Ischämie entwickelt sich eine permanente anoxische Depolarisation. Schnell gehen Zellen durch die einsetzende Lipolyse, Proteolyse, den Zusammenbruch der ATP-Produktion und der damit verbundenen Homöostase der Ionenverteilung zugrunde.

Zwischen dem zentralen, durch die Ischämie betroffenen Kerngebiet und dem gesunden Hirngewebe liegt eine Region, die sich durch eingeschränkten Blutfluss und herabgesetzten Energiemetabolismus kennzeichnet und als Penumbra bezeichnet wird.

Depolarisationswellen, die sich vom Kerngebiet ausgehend über die Penumbra ausbreiten und über eine intrazelluläre Kalziumionenerhöhung und extrazelluläre Zunahme der Glutamatkonzentration die Überlebenschancen der Neurone mindern (Walz 1997). Man spricht von *spreading depression*, die zu einer Verstärkung des Zelluntergangs und damit der Ausdehnung des Infarktgebiets führt (Back, Kohno et al. 1994).

Neurone sind wesentlich empfindlicher gegenüber einer ischämischen Hirnschädigung als Astrozyten. Doch aufgrund ihrer Funktionen wird Astrozyten eine wichtige Rolle im Ablauf der oben beschriebenen Prozesse zugeschrieben. So sind Astrozyten bei Ischämie länger in der Lage, ATP bereit zu stellen, so dass der Zusammenbruch der Ionenkonzentrationen langsamer fortschreitet (Silver, Deas et al. 1997; Xie, Wang et al. 2008). Hierbei scheinen auch die astrozytären Glykogenspeicher eine protektive Rolle zu spielen, so dass Astrozyten eine höhere Ischämietoleranz aufweisen, wenn auch nur für wenige Minuten (Lowry, Passonneau et al. 1964; Dirnagl, Becker et al. 2009). Es ist jedoch ungeklärt, ob die in Abwesenheit eines oxidativen Stoffwechsels zunehmende Laktatazidose die Wirkung der ATP-Bereitstellung durch Astrozyten entgegen gerichtet ist, da ein niedrigerer pH-Wert mit einer größeren Hirnschädigung einhergeht (Li, Shamloo et al. 1995).

## **1.4 Subarachnoidalblutung**

### **1.4.1 Allgemeine Informationen und Definition**

Bei einer Subarachnoidalblutung (SAB) handelt es sich um eine Blutung in den äußeren Liquorraum zwischen dem Gehirn und der Aderhaut (Arachnoidea). Die häufigste Ursache ist eine Ruptur eines zerebralen Aneurysmas. Andere Ursachen sind Trauma, arteriovenöse Malformationen, Vaskulitiden, arterielle Dissektion und Blutungsdiathesen. Zu den Risikofaktoren für eine SAB gehören alle Erkrankungen, die mit der Bildung von Aneurysmen und Schwächung von Gefäßwänden assoziiert sind; u.a. polyzystische Nieren in der Anamnese (ADPKD), fibromuskuläre Dysplasie, andere Erkrankungen aus dem Bereich der Bindegewebserkrankungen (z.B. Marfan-Syndrom), Aneurysmen an anderen Blutgefäßen, Bluthochdruck und Nikotinabusus.

### 1.4.2 Epidemiologie, Klinik, Therapie

**Epidemiologie.** Ca. 3% der zerebralen Insulte sind durch eine SAB bedingt (Sudlow and Warlow 1997). Die Inzidenz der SAB beträgt 6-8 auf 100.000 Einwohner (Linn, Rinkel et al. 1996). Am häufigsten tritt die SAB in der fünften und sechsten Lebensdekade auf. Bei Betroffenen, die jünger als 40 Jahre alt sind, ist die Erkrankung bei Männern häufiger, bei den über 50jährigen sind Frauen häufiger betroffen. Ungefähr 30-50% der Patienten, die eine SAB erleiden, sterben, bevor sie professionelle medizinische Hilfe erhalten. Von den Betroffenen, die das initiale Ereignis überleben, haben 40-50% teils schwere neurologische Störungen. Diese scheinen mit dem Ausmaß der Blutung und damit mit der Größe des sich bildenden Blutgerinnsels zusammenzuhängen (Hijdra, Braakman et al. 1987). Als Risikofaktoren gelten Hypertonie, Nikotin- und Alkoholabusus und eine positive Familienanamnese (Feigin, Rinkel et al. 2005). Die Auswertung der Daten bzgl. Hypercholesterinämie und niedrigem BMI (< 22) als Risikofaktoren für das Auftreten einer SAB ergibt keine statistisch signifikante Aussage, dass diese beiden Faktoren ein erhöhtes Risiko darstellen.

**Klinik.** Die Betroffenen beschreiben das Ereignis oft als “den schlimmsten Kopfschmerz, den sie je hatten“. Die neurologische Symptomatik kann stark variieren und ist ähnlich der eines Schlaganfalls. Wichtige prognostische Faktoren (Hijdra, Braakman et al. 1987) sind neben dem bereits erwähnten Ausmaß der Blutung (inverse Korrelation zur Blutmenge) das Alter des Patienten und der GCS (*Glasgow Coma Score*) bei Einlieferung in das Krankenhaus. Eine schwerwiegende und gefürchtete Komplikation stellt der in 20-30% der Fälle zwischen dem dritten und siebten Tag nach dem Blutungsereignis auftretende Vasospasmus dar.

**Therapie.** Neben symptomatischer und supportiver Therapie unter intensivmedizinischem *Monitoring* steht die Kontrolle des Blutdrucks und damit des intrakraniellen Perfusionsdrucks, Korrektur der Blutgerinnung und die Prävention des Vasospasmus im Vordergrund. Die chirurgischen Optionen beinhalten das *coiling* oder *clipping* des rupturierten Aneurysma und Hämatomausräumung. In zwei Studien zeigte der Einsatz von Urokinase, intrathekal oder intracisternal verabreicht, ein geringeres Auftreten von symptomatischem Vasospasmus bzw. von neurologischen Defiziten (Sasaki, Kodama et al. 2000; Hamada, Kai et al. 2003). Einen Benefit konnte man damit jedoch nicht erreicht werden. Der Vasospasmus ist die Hauptursache für die Mortalität und Morbidität nach

SAB (Kassell, Sasaki et al. 1985). Ziel war es daher bisher, durch Hypervolämie, therapeutische Hypertension und hyperdynamie Kreislaufverhältnisse mit einer leichten Hämodilution (sog. "Triple-H"-Therapie) präventiv tätig zu werden. Doch die Wirksamkeit und Evidenz dieses Ansatzes ist umstritten (Treggiari, Walder et al. 2003; Rinkel, Feigin et al. 2004). Zur Therapie des Vasospasmus können Kalzium-Antagonisten (z.B. Nimodipin) eingesetzt werden (Pickard, Murray et al. 1989); allerdings zeigen Daten, dass die Effekte klinisch nicht signifikant sind (Barker and Ogilvy 1996).

### **Endothelin und Subarachnoidalblutung**

ET-1 wurde als möglicher Mediator des Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung identifiziert. Die BigET-1- und ET-1-Konzentrationen im zerebrospinalen Liquor sind im Verlauf des zerebralen Vasospasmus deutlich erhöht und zeigen eine Assoziation zum intrazysternalen Hämotomvolumen (Ehrenreich, Lange et al. 1992; Seifert, Löffler et al. 1995). ET-1 bewirkt an zerebralen Blutgefäßen eine sehr potente und lang-anhaltende Kontraktion (Ehrenreich and Schilling 1995; Salom, Torregrosa et al. 1995; Zimmermann and Seifert 1998), die mit einer entsprechenden Reduktion des Blutflusses einhergeht. Die ET-1-Plasmakonzentration scheint ebenfalls mit dem Ausmaß des Vasospasmus zu korrelieren. So zeigen Patienten mit klinischen Symptomen oder angiographisch gesichertem Vasospasmus Plasma-Endothelin-Level, die die Stärke der Vasokonstriktion prädiktieren (Juvela 2000). Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen die Wirksamkeit von ET-Rezeptorantagonisten bei Prävention und Therapie des Vasospasmus (Chow, Dumont et al. 2002; Vatter, Zimmermann et al. 2004). Bei Hasen verursacht die intrazerebroventrikuläre Administration von ET-1 subarachnoidale Blutungen, die mit Vasospasmus einhergehen. Cirak et al. (Cirak, Kiyamaz et al. 2004) zeigten an einer Untersuchung mit Hasen indirekt die Rolle von ET-1, indem sie die Tiere nach intrazysternaler Injektion von autologem Blut mit ebenfalls intrazystenal appliziertem BQ610, einem selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist, behandelten. In tierexperimentellen Modellen für Subarachnoidalblutung mit Ratten konnte der Vasospasmus durch Vorbehandlung mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten fast vollständig verhindert werden. Dies ist umso wichtiger, als das Ausmaß der zerebralen Schädigung eng mit der Stärke des Vasospasmus korreliert.

## **Die Rolle von Endothelin bei zerebraler Ischämie**

Die Plasmakonzentrationen von ET-1 nach einem akuten ischämischen Infarkt sind messbar erhöht (Ziv, Fleminger et al. 1992) und topische Applikation von ET-1 auf zerebrale Blutgefäße induziert *in vitro* und in Tiermodellen lang anhaltenden Vasospasmus (Encabo, Ferrer et al. 1992). Es ist vorstellbar, dass Endothelin für die in Flussrichtung auftretende Ischämie nach Freisetzung aus geschädigtem, hypoxischen Endothel der Hirngefäße nach einer zerebralen Thrombose oder einem Infarkt auslösend ist. Dies würde das Hirngewebe im Versorgungsbereich der betroffenen Endstromgebiete ähnlich wie im Herz und der Niere gefährden. In einem Rattenmodell zur Okklusion der A. cerebri media (MCA) wurden Astrozyten neben Mikrogliazellen als eine Hauptquelle für Endothelin identifiziert (Li, Wu et al. 2010). Eine weitere mögliche oder auch zusätzliche Quelle für ET-1 stellt das zerebrovaskuläre Endothel dar (Pluta, Boock et al. 1997).

## **Therapieansätze bei Vasospasmus**

Neben den o.g. präventiven Maßnahmen ist v.a. für Nimodipin, ein Kalziumionen-Kanal-Hemmer, eine Verbesserung der neurologischen Morbidität (Barker and Ogilvy 1996) beschrieben. Die Gesamtmortalität ist unter der Therapie mit Nimodipin zwar reduziert, doch war diese Tendenz nicht statistisch signifikant. Neben Magnesiumsulfat (Veyna, Seyfried et al. 2002; van den Bergh, Algra et al. 2005), Nicardipin (Barth, Capelle et al. 2007) und Statintherapie (Atorvastatin (Chang, Wu et al. 2010), Simvastatin (Lynch, Wang et al. 2005), Pravastatin (Tseng, Czosnyka et al. 2005)) wird dem ET-Rezeptor-Antagonisten Clazosentan große Hoffnung beigemessen (Vajkoczy, Meyer et al. 2005; Vatter, Zimmermann et al. 2005a; Vatter, Zimmermann et al. 2005b). Vajkoczy et al. konnten dabei zeigen, dass Clazosentan die Häufigkeit und den Schweregrad des Vasospasmus nach SAB reduzieren konnten und die Rolle von ET-1 bei der Entstehung des Vasospasmus unterstreicht. Trotz dieses Effekts konnte in der Studie keine adäquate Verbesserung von Mortalität und Morbidität beobachtet werden (Macdonald, Kakarieka et al. 2006; Macdonald, Kassell et al. 2008). Schubert et al. (Schubert, Schilling et al. 2008) untersuchten Clazosentan auf seine Wirkung bei einer frühzeitigen Administration bereits während der SAB im Ratten-Modell während viele Studien sich auf den verspäteten Vasospasmus nach SAB konzentrieren.

## 1.5 Astrozyten

Neben den Neuronen stellen Astrozyten die Hauptpopulation der Zellen im Gehirn dar. Ihr Anteil am Gesamtvolumen des Gehirns beträgt (in Abhängigkeit von der Region) zwischen 20-50%, wobei sie zahlenmäßig die Neuronen übertreffen. Als Gliazellen werden Astrozyten zur Makroglia gezählt. Der von Virchow bereits 1846 geprägte Begriff „Glia“ leitet sich ab vom griechischen Wort für Leim (gr. *γλῖα*). Zur Makroglia zählt man außerdem Oligodendrozyten und Schwann'sche Zellen, die im zentralen bzw. peripheren Nervensystem die Myelinscheiden der neuronalen Axone bilden. Als Mikroglia bezeichnet man immunologische Effektorzellen, die sich von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ableiten und damit nicht neuronalen Ursprungs sind. Den vielfältigen Funktionen wird die Bezeichnung „Glia“ schon lange nicht mehr gerecht, da Astrozyten an den verschiedensten, physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind (Eddleston and Mucke 1993). Astrozyten zeichnen sich durch die zellspezifische Expression von GFAP aus und sind darüber immunhistochemisch leicht identifizierbar (Eng, Ghirnikar et al. 2000). Als weiterer astrozytärer Marker wird das Enzym Glutamin-Synthetase angesehen, das als Differenzierungsmarker Anwendung findet (Norenberg 1979; Loo, Althoen et al. 1995).

Der Übergang von einem ruhenden zu einem reaktiven Astrozyten ist mit der Expression bzw. dem Nachweis zahlreicher Moleküle und Gene verbunden, die im ruhenden Zustand nicht oder nur in geringen Mengen nachweisbar sind. So wird in Astrozyten ET-1 durch Lipopolysaccharide, Noradrenalin, PMA, TNF $\alpha$  und Thrombin stimuliert (Ehrenreich, Anderson et al. 1991; Ehrenreich, Costa et al. 1993). Der Transkriptionsfaktor AP-1, der selbst eine regulatorische Funktion im ET-1-Promoter spielt (Paul, Zintz et al. 1995), wird durch ET-1 und Sarafotoxin S6b, *c-fos* wird durch PMA, TGF- $\beta$ 1, EGF, FG, Gangliosid-GM<sub>1</sub>, DBcAMP, Foskorlin, Carbachol, Isoproterenol, Noradrenalin und Phenylepinephrin reguliert (Arenander, de Vellis et al. 1989; Arenander, Lim et al. 1989a; Arenander, Lim et al. 1989b; Hisanaga, Sagar et al. 1990; Lindholm, Hengerer et al. 1990). Eddleston et. al (Eddleston and Mucke 1993) zeigen eine Übersicht, aus der sich aus den nachgewiesenen Molekülen bei reaktiven Astrozyten eine Vielzahl denkbarer Funktionen bei unterschiedlichen biologischen Prozessen ableiten lassen:

- die Aufrechterhaltung des extrazellulären Milieus zur Gewährleistung einer optimalen neuronalen Funktion (Gee and Keller 2005)

- Speicherung von Energiereserven (Glycogen) (Brown 2004)
- Steuerung der Blut-Hirn-Schranke und Regulation des Stofftransports zwischen Blut und Gehirn
- Modulation und Speicherung extrazellulärer Ionen und Neurotransmitter zur Aufrechterhaltung der neuronalen Erregbarkeit (Magistretti and Pellerin 1996; Verkhratsky and Kettenmann 1996)
- die Steuerung der neuronalen Migration in der embryonalen Entwicklung des ZNS
- die Synthese spezifischer Faktoren, die das neuronale Wachstum beeinflussen
- aktivieren von Reparaturmechanismen nach zerebraler Schädigung
- Immunmodulation im ZNS
- Astrozyten wurde als eine wesentliche Quelle von ET-1 bei Okklusion der MCA beschrieben (Li, Wu et al. 2010)
- Astrozyten sind über ET<sub>B</sub>-Rezeptoren an der Eliminierung von ET-1 aus dem Liquor beteiligt (D'Orléans-Juste, Labonté et al. 2002; D'Orléans-Juste, Plante et al. 2003).

Astrozyten bilden mit ihren zahlreichen Zellausläufern die Blut-Hirn-Schranke, indem sie mit ihren dicht stehenden Prozessus die ortsständigen Blutgefäße umschließen. Darüber sind sie in der Lage, Einfluss auf den zerebralen Blutfluss und die neurovaskuläre Interaktion zu nehmen, sowie immunologische Abwehrmechanismen über die Produktion von verschiedenen Cytokinen zu unterstützen (Benveniste 1992; Anderson and Nedergaard 2003; Iadecola 2004; Haydon and Carmignoto 2006; Kim, Park et al. 2006; Koehler, Gebremedhin et al. 2006). Zonta et al. sprechen von einer neuronal-vaskulären Kopplung, die durch Astrozyten vermittelt wird und deren Ende die Endothelzelle darstellt (Zonta, Angulo et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass neuronales Glutamat eine intrazelluläre Erhöhung der Kalziumkonzentration zu einer PG<sub>E2</sub>-abhängigen Vasodilatation führt (Siehe auch (Bezzi, Carmignoto et al. 1998). Girouard konnten nachweisen, dass die Höhe der Änderung der Kalziumkonzentration entscheidend ist, ob eine Vasodilatation oder eine Vasokonstriktion ausgelöst wird (Girouard, Bonev et al. 2010) (siehe auch *spreading depression*). In Neuronen beeinflusst die Kalziumionen-abhängige Signaltransduktion die Stimulation von *immediate early genes* (Morgan and Curran 1988). In Astrozyten zeigten die Untersuchungen von Yu et al., dass Ischämie ein starker Stimulator der *immediate early genes* wie z.B. *c-fos* ist (Yu, Lee et al. 1995).

Über ihre zahlreichen Glutamat-Transporter sind Astrozyten die entscheidende Zellpopulation zur Regulation der extrazellulären Glutamat-Konzentration. Sie exprimieren Glutamat-Rezeptoren und haben eine Reihe von Mechanismen, um Glutamat freizusetzen. Deshalb spielen sie eine entscheidende Rolle bei zerebraler Ischämie und den oben beschriebenen Pathomechanismen der zerebralen Schädigung bei vaskulären Ereignissen (Siehe auch (Schousboe and Waagepetersen 2005)).

Die Hirnhomöostase wird maßgeblich durch die Fähigkeit der Astrozyten, die extrazelluläre Ionenkonzentration, pH-Wert, Glukosekonzentration und das Angebot an metabolischen Substraten in engen Grenzen aufrecht zu erhalten (Gee and Keller 2005). Funktionell und strukturell sind sie ideale Sensor- und Regulatorzellen der zerebralen Mikroumgebung (Nedergaard, Ransom et al. 2003). Weitere Untersuchungen belegen Hinweise für eine Rolle von Astrozyten bei Neurogenese und als neuronale Stammzelle (Wozniak 1999; Heins, Malatesta et al. 2002; Joannides, Gaughwin et al. 2004; Ma, Ming et al. 2005; Givogri, de Planell et al. 2006; Pillai, Scintu et al. 2006; Ihrie and Alvarez-Buylla 2008).



## 2. Fragestellung

Biochemische, tierexperimentelle und klinische Befunde deuten auf eine funktionelle Rolle für Endotheline und PAF bei zerebraler Ischämie, Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung und Entzündungsvorgängen im Gehirn.

Endothelinrezeptor- und PAF-Rezeptor-Antagonisten sind bei diesen Zuständen möglicherweise von klinischem Nutzen. Astrozyten *in vivo* exprimieren alle Bestandteile des Endothelin-Systems, bis auf Endothelin-2, sowie Rezeptoren für vasoaktive Substanzen. Allerdings sind die Wechselwirkungen zwischen vasoaktiven Faktoren im Blut, wie PAF, und dem Endothelin-System in Astrozyten nicht ausreichend bekannt. Die Tatsache wird verkompliziert, da Astrozyten ein eigenes PAF-Rezeptorsystem besitzen, das möglicherweise das ET-System transkriptionell und/oder posttranskriptionell reguliert. In dieser Arbeit wurde das Modell der Primärkultur von Astrozyten von neugeborenen Ratten etabliert, um Einblicke in die genetische und zelluläre Regulation von PAF- und Endothelin-Systemen direkt in Astrozyten und unabhängig von Einflüssen über die Blut-Hirn-Schranke bzw. anderen Zellsystemen gewinnen zu können.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Etablierung eines Zellkulturmodells zur Charakterisierung des ET-Systems in Astrozyten
2. Expressionsanalysen von Komponenten des ET-Systems in den Astrozyten
3. Untersuchung der zelldifferenzierungsabhängigen Expression
4. Untersuchung der Expression der PAF-Rezeptoren auf Astrozyten
5. Einfluss der PAF-Stimulation auf die Expression von ET-1- und ECE in Astrozyten

Die Untersuchungen erfolgten vor dem Hintergrund, dass Astrozyten wichtige Funktionen im Gehirn ausüben, die sie als Ziel therapeutischer Interventionen bei ischämischen Ereignissen prädestinieren (Rossi, Brady et al. 2007). Sie bilden Endotheline und besitzen ET- sowie funktionelle PAF-Rezeptoren, so dass die Untersuchung einer möglichen Interaktion beider Systeme das pathophysiologische Verständnis für die folgenreichen Ereignisse während zerebraler Ischämie und bei Vasospasmus nach SAB erweitert. Das vorliegende Vorhaben trägt zum besseren Verständnis bei, wie PAF und ET-Systeme auf genetischer und zellulärer Ebene in Astrozyten reguliert werden und interagieren. Ein möglicher Zusammenhang könnte als Grundlage für neue medikamentöse Interventionsmög-

lichkeiten und Therapiestrategien dienen. Das Projekt hat somit möglicherweise Implikationen für die Therapie von Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung, zerebraler Ischämie und Entzündungsvorgängen im Gehirn mit Endothelinrezeptor- und PAF-Antagonisten.

### 3. Methoden

#### 3.1 Lösungen, Puffer, Medien und Gele

Tab. 3.1: Lösungen, Puffer, Medien und Gele

Name	Zusammensetzung und Herstellung
DEPC-Wasser	1 ml DEPC (1 mg/l) ad 1 l <i>Aqua bidest.</i> 12 h bei Raumtemperatur inkubieren dann autoklavieren
Hypotoner Lysierpuffer (HLP)	1,58 g Tris-HCl ad 500 ml <i>Aqua bidest.</i> auf pH 7,4 einstellen
10 x MOPS-Puffer	200 mM 3-(N-Morphilino)-Propansulfonsäure (MOPS) 50 mM Na-Azetat 10 mM EDTA in 800 ml DEPC-Wasser lösen mit NaOH auf pH 7,0 einstellen ad 1000 ml mit DEPC-Wasser auffüllen vor Licht geschützt bei Raumtemperatur aufbewahren
20 x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g Na-Zitrat 1 mg DEPC ad 1000 ml <i>Aqua bidest.</i> 12 h bei Raumtemperatur inkubieren anschließend autoklavieren
TBE-Puffer	1 M Tris-Base 0,85 M Borsäure 0,01 M EDTA auf pH 8,3 einstellen
TAE-Puffer	40 mM Tris-Azetat 1 mM EDTA auf pH 8,0 einstellen
LB-Agar-Platten	10 g Casein 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar ad 1000 ml <i>Aqua bidest.</i> auf pH 7,5 einstellen
LB-Medium	10 g Casein 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml <i>Aqua bidest.</i> auf pH 7,5 einstellen anschließend autoklavieren ad 10 mg/ml Ampicillin
Agarose-Gel X%	1 x TBE-Puffer (pH 8,3) X% (w/v) Agarose aufkochen bei ca. 50 °C gießen

Fortsetzung Tab. 3.1: Lösungen, Puffer, Medien und Gele

Name	Zusammensetzung und Herstellung
<b>Proteinase-Inhibitor-Cocktail</b>	187,9 g EDTA 87,71 mg PMSF 500 µg Leupeptin 10 µg Aprotinin ad 100 ml HLP
<b>SDS 10%</b>	10 g SDS in 90 ml sterilem Wasser lösen erhitzen bis 68 °C ad 100 ml steriles Wasser Lagerung bei Raumtemperatur
<b>SSPE 20X</b>	175,3 g NaCl 27,6 g Na-Phosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 7,4 g EDTA (vorher auflösen) ad 1000 ml DEPC-Wasser auf pH 7,4 einstellen anschließend autoklavieren
<b>Denhardt 50X</b>	0,5 g Bovines Serum Albumin (BSA) 0,5 g Polyvinylpyrrolidon (PVP) 0,5 g Ficoll 400 (Ficoll PM400) ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i> steril filtrieren anschließend aliquotieren Lagerung bei -20 °C
<b>Dextransulfat 50%</b>	wässrige Lösung hohe Viskosität: zum Pipettieren auf 60 °C erhitzen Lagerung bei -20 °C
<b>Bromphenolblau in Glycerin</b>	5 ml Glycerin 20 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) 20 mg Bromphenolblau Natriumsalz ad 10 ml DEPC-Wasser

Tab. 3.2: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
ABI Prism 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer
Heraeus Function Line BB 16 CU	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Begasungsbrutschrank Baureihe 6000	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Heraeus T 5042, Heizofen	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Centrifuge 5402 und 5417	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
PTC-100 Programmable Thermal Controller	MJ Research, Inc., Watertown, Mass., USA
1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Fuji Phosphoimager BAS-1500	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Berlin
RC2-B Centrifuge	Sorvall
UV 1202	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
MRX Microplate Reader	Dynex Technologies, Dentendorf
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik
Zellkulturmikroskop CK2	Olympus
Zellkulturkamera	Olympus
Sterile Arbeitsbank Hera Safe Hs 18/2	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Zentrifuge Heraeus Varifuge 3.0R	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Präparationslupe Leica Wild M2Z	Leica

**Tab. 3.3: Liste der verwendeten Rezeptorantagonisten und Botenstoffe**

Name	Beschreibung
FR139317	Peptidischer ET <sub>A</sub> -Rezeptorantagonist
BQ788	Peptidischer ET <sub>B</sub> -Rezeptorantagonist
Actinomycin-D	Inhibitor der RNA-Polymerase durch Interkalation
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor (Phospholipid)
Methylcarbamyl-PAF	stabilisiertes PAF
Thrombin	aktivierter Faktor IIa, spaltet Fibrinogen zu Fibrin
TPA	Aktivator der Protein-Kinase C
DBcAMP	Dibutyl cyclic adenosinmonophosphate (stabiles cAMP-Analogon)

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Zellkulturmedien

Im Rahmen der Zellkultur wurden zur Ernährung der einschichtigen Zellkulturen unterschiedliche Zellkulturmedien verwendet. Als Basis dienten zwei Medien (*Dulbecco's modified eagle medium, DMEM*) der Firma Biochrom, die sich in ihrem Glukosegehalt und in der Menge des hinzugefügten fötalen Kälberserum unterscheiden (Biochrom Art.-Nr. F 0415 und F 0435). Die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien ist in der Tabelle 3.4 zusammengefasst. Zur Präparation der Astrozyten wurde DMEM-4, ansonsten DMEM-3 verwendet. Ein bis zwei Tage vor einem Stimulationsexperiment wurden die Zellen mit dem FCS-reduzierten DMEM-2 versetzt. Während der Stimulationsexperimente kam DMEM-1 ohne FCS und ohne Penicillin-/Streptomycin (P/S) als Zusatz zum Einsatz.

**Tab. 3.4: Verwendete Zellkulturmedien mit Zusätzen**

Biochrom Medium	F 0415 DMEM-1	F 0415 DMEM-2	F 0415 DMEM-3	F 0435 DMEM-4
FCS in %	0	1	10	10
P/S		x	x	x
NaPyr	x	x	x	x
Glc	1 g/l	1 g/l	1 g/l	4,5 g/l

### 3.2.2 Astrozyten-Zelllinie DI TNC1

Die Astrozyten-Zelllinie, die sich von Astrozyten aus Hirnen von Sprague-Dawley-Ratten ableitet, wurde entsprechend den Angaben des Herstellers aufgetaut und in Kultur genommen (ATCC Promochem, Art.-Nr. CRL-2005) (Radany, Brenner et al. 1992). Die Zelllinie wurde durch die stabile Transfektion des T-Antigens des Semian-Virus 40 in

Astrozyten der Ratte etabliert. Morphologisch zeigen sie ein Fibroblasten-ähnliches Aussehen, flach und ohne Zellausläufer wie bei nicht-reaktiven Astrozyten. Immunhistochemisch konnte durch Anfärbung Astrozyten-spezifisches GFAP nachgewiesen werden. Astrozyten zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Aufnahme großer Mengen von  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA) aus. Die Zellen der immortalisierten Astrozyten zeigen eine vergleichbare Aufnahmefähigkeit für GABA. Hinsichtlich der Sekretion Astrozyten-typischer Marker, zeigen die Zellen der Zelllinie ein vergleichbares Verhalten für Transferrin und S-100 $\beta$  mRNA. Zellen wurden in der Routine alle zwei bis drei Tage mit neuem Zellkulturmedium versorgt. Passagieren erfolgte nach optischer Kontrolle bei Subkonfluenz in einem Verhältnis 1:7 bis 1:10.

### **3.2.3 Präparation von Astrozyten aus Großhirnen neugeborener Ratten**

Zur Generierung der Astrozyten-Primärkultur aus Gehirnen neugeborener Sprague-Dawley Ratten wurde eine modifizierte Methode von McCarthy und deVillis (McCarthy and de Vellis 1980) angewendet, die auf die Arbeit von Booher und Sensenbrenner zurückgeht (Booher and Sensenbrenner 1972). Eine Genehmigung lag vor unter der LaGetSi-Nr. T 0063/96.

Neugeborene Ratten wurden dekapitiert und die Gehirne mit Schere und Pinzette entnommen. Die unter dem Operationsmikroskop (Leica WILD M3Z) von Hirnhäuten befreiten Gehirne wurden in 10 ml eiskaltem HBSS+ (HBSS mit Magnesiumsulfat, Konzentration: 200 mg/l) gesammelt. An dieser Stelle erfolgte ein Wechsel unter die sterile Werkbank mit laminarer Belüftung (Heraeus HeraSafe HS 18/2). Nach 5 minütiger Inkubation mit 1 ml DNase wurden die Gehirne mit einer elektrischen Pipette (PipettBoy) dissoziiert und mit 360  $\mu$ l Trypsin 20 min enzymatisch behandelt. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte mit 10 ml DMEM (10% FCS, Penicillin/Streptomycin). 15 ml dieser Zellsuspension wurden aufgenommen und durch einen 100  $\mu$ m-Filter (Falcon Cell Strainer, Produkt Nr. 352360) in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Der verbleibende Rest wurde nochmals mit 1 ml DNase inkubiert und in dasselbe Zentrifugenröhrchen gefiltert. Die trübe Zellsuspension wurde für 10 min bei 800 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet in 6 ml frischen DMEM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut mit 40  $\mu$ m Porenweite gefiltert (Falcon Cell Strainer, Produkt Nr. 352340), weitere 9 ml DMEM

zum Filtrat gegeben und auf einer 80 cm<sup>2</sup> großen mit Poly-D-Lysin (Sigma, Art.-Nr. P7280, 5 mg) beschichteten Kulturflasche ausplattiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem abgestorbene Zellen und Zelltrümmer entfernt wurden. Am siebten Tag nach Präparation wurden die Zellen für zwei Stunden bei 37 °C und 150 U/min geschüttelt, anschließend wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. In der Nacht vor dem Passagieren wurden die Zellen für 16 Stunden bei 37 °C und 225 U/min geschüttelt.

Kontamination der Zellkultur durch Pilzbesiedlung wurde durch das Zusetzen von Fluconazol (Pfizer, Diflucan i.v. 100 mg) mit einer resultierenden Konzentration von 1mM während der Präparation, häufige optische Kontrollen der Zellkulturflaschen auf Kontamination unter dem Mikroskop und durch regelmäßige Behandlung der Zellkulturschränke mit Barrycidal 36 reduziert. Zellkulturüberstände wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet (Firma InvivoGen, Plasmotest, und Minerva Biolabs VenorGeM Mycoplasma PCR Detection Kit, Art.-Nr. VGM-025).

**Selektion von Astrozyten.** Zur Selektion von Astrozyten in dem präparierten Ansatz werden die Zellkulturflaschen auf einem Zellschüttler bewegt. Dabei werden andere Zelltypen, wie z.B. Mikrogliazellen, Oligodendrozyten, Fibroblasten oder Neurone, die weniger gut auf der Poly-D-Lysin beschichteten Oberfläche der Zellkulturflasche haften, durch das Schütteln abgelöst. Zum Schütteln für 2 bis 4 Stunden werden die Zellkulturflaschen mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Beim längeren Schütteln über Nacht (16 Stunden) wird der Schüttler mit den Zellen in den Inkubator gestellt.

**Beschichten der Zellkulturflaschen mit Poly-D-Lysin.** Poly-D-Lysin ist als Polymer des D-Enantiomere des Lysins biologisch inert. Es wird von Zellen weder verstoffwechselt noch abgebaut. Als Beschichtung diente es als Haftungsgrundlage für Astrozyten. Unter der sterilen Arbeitsbank wird das lyophilisiert gelieferte Poly-D-Lysin in 50 ml sterilem PBS gelöst. Die Zellkulturflaschen wurden mit 4 ml pro Flasche benetzt und für zwei Stunden inkubiert. Mit der Absaugpipette wurde das Poly-D-Lysin entfernt. Die Flaschen wurden mit 5 ml PBS nachgespült.

**Mediumwechsel.** Unter der sterilen Arbeitsbank wurde das gebrauchte Zellkulturmedium mit einer Glaspipette abgesaugt. Mit einer elektrischen Pipette wurden fünfzehn Milliliter

pro Flasche (Größe: 75 cm<sup>2</sup>) hinzugegeben. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

**Vorbehandlung der Zellen.** Wenn die Zellen Subkonfluenz erreicht haben, wurde 24 - 72 Stunden vor den Stimulationsexperimenten das Zellkulturmedium gegen ein Nährstoff-reduziertes Medium mit und ohne DBcAMP gewechselt.

**Stimulationsexperimente** Drei Stunden vor einem Stimulationsexperiment werden die Zellen auf DMEM-1 (Tab. 3.4) umgesetzt. Tabelle 3.5 zeigt die Konzentrationen der verwendeten Stimulantien und Zusätze.

**Tab. 3.5: Übersicht über die verwendeten Konzentrationen in der Zellkultur und bei den Stimulationsversuchen**

Name	Konzentration	Hersteller
PAF	100 nM	Cayman Chem, Cat.No. 60900
MC-PAF	100 nM	Cayman Chem, Cat.No. 60908
DBcAMP	1 mM	Roche, Cat.No. 104 388
Actinomycin D	5 µg/ml	Sigma, Cat.No. A 1410
PMA	50 nM	Sigma, Cat.No. P 1585

### 3.2.4 Immunhistochemie

Um den Reinheitsgrad der Astrozytenzellkultur zu überprüfen, wird eine immunhistochemische Doppelfärbung mit *anti-gliale fibrilläre saure Protein*-Antikörpern (GFAP-Antikörper) und Propidiumjodid zur Gegenfärbung des Nucleus verwendet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden mehrere repräsentative Sichtfelder beurteilt, in dem die Anzahl der GFAP-positiven Zellen gegen die Zellkerne ohne umgebende GFAP-Anfärbung gezählt werden.

**Gliales Fibrilläres saures Protein (engl. GFAP).** GFAP wird ausschließlich von Astrozyten exprimiert und ist somit determinierend für diesen Zelltyp. GFAP ist ein intermediäres Strukturfilament. Als Bestandteil des Zytoskeletts spielt es u.a. bei der Modulation der astrozytären Motilität und beim Erhalten der strukturellen Stabilität der astrozytären Zellfortsätze eine Rolle.

Im ZNS höherer Vertebraten kommt es nach ZNS-Schädigung als Folge von Trauma, Krankheit, angeborenen Defekten oder chemischen Insulten zu pathophysiologischen und histomorphologischen Veränderungen von Astrozyten. Man spricht von reaktiven Astrozyten, die in typischer Weise auf die Schädigung reagieren. Dies bezeichnet man als

Astrogliosis. Sie ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression von GFAP, die sich immunhistochemisch oder im erhöhten Proteingehalt der Astrozyten nachweisen lässt.

Mit der Klonierung des GFAP-Gens der Maus ist 1985 die Grundlage für eine umfangreiche *in vivo*- und *in vitro*-Forschung gelegt worden (Antisense- und Knockout Modelle, Promotorstudien).

**Färbung.** Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Astrozyten auf Poly-D-Lysin beschichteten 8 Loch-Objektträgern (Roth, Diagnostika-Objektträger, Art.-Nr. L197.1) passagiert. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz in Kultur gehalten, bis sich unter dem Mikroskop noch einzelne Zellen beurteilen ließen. Hatten die Zellen die richtige Konfluenz erreicht, wurden sie sechs Mal in PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Objektträger für fünf bis zehn Minuten in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton inkubiert und anschließend wieder in PBS gewaschen. Das PBS ließ man auf saugfähigem Papier abtropfen, wobei darauf zu achten war, dass die Zellen nicht eintrocknen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit fötalem Kälberserum (FCS) geblockt (ein Tropfen FCS pro Loch für 15 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). War das FCS abgewaschen, wurden die Objektträger für 3 min mit Triton X 100 (Roth, Triton X 100, Art.-Nr. 6683) zur besseren Permeabilisierung der Zellen behandelt, anschließend wurden die Objektträger wieder gespült. Pro Loch wurden  $20\text{ }\mu\text{l}$  des Primärantikörpers, ein *anti-rat* GFAP-Antikörper der Maus, aufgetragen. Die Stammlösung des Primärantikörpers mit einer Konzentration von  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$  war vor Gebrauch im Verhältnis 1:3 zu verdünnen. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei einer Temperatur von  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Objektträger wurden drei Mal je 5 min in einem jeweils frischen PBS-Bad gewaschen. Der Sekundärantikörper, ein mit Fluoreszin konjugierter (FITC) *anti-mice*-Antikörper, musste ebenfalls vor Gebrauch 1:3 verdünnt werden. Die Konzentration betrug  $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ , die Inkubationsbedingungen waren dieselben. Es folgten drei weitere Waschvorgänge (3 x 5 min). Zur anschließenden Färbung des Zellkerns mit Propidiumjodid wurde der Objektträger für einige Sekunden in einer Propidiumjodid-Lösung (Konzentration  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) vollständig eingetaucht. Nach dem Waschen wurden die Objektträger mit Mounting-Medium benetzt und mit Deckgläschen abgedeckt. Unter einem Immunfluoreszenzmikroskop erfolgte eine Doppelbelichtung eines Diafilms. Die optimale Absorptionswellenlänge für FITC betrug 496 nm, für Propidiumjodid 536 nm. Die Emissionsmaxima lagen bei 617 nm bzw. 518 nm.

### **3.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1 RNA-Isolation**

##### **RNA-Isolation aus Astrozyten**

Gesamt-RNA aus einschichtigen Astrozyten-Zellkulturen wird mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Art.-Nr. 74106) entsprechend dem mitgelieferten Protokollheft (Dritte Ausgabe) durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt. Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wurden mit 5 ml 37 °C warmen PBS zweimal gewaschen und mit 600 µl mit Mercaptoethanol (10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml) versetztem Lysis-Puffer RLT lysiert. Das Lysat wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit einer 5 ml Spritze homogenisiert und mit 600 µl 70 %igem Ethanol gemischt. Nach Zentrifugation bei 8000 x g wurde zwei Mal mit 700 µl RW1-Puffer und ein weiteres Mal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, bevor die Gesamt-RNA mit 30-50 µl DEPC-Wasser eluiert wurde.

##### **RNA-Isolation aus Geweben**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Organen wurde die Trizol-Methode (Invitrogen, Art.-Nr. 15596-026) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff gefroren, in einem Mörser zerkleinert und mit Trizol-Lösung homogenisiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform und Zentrifugation bei 12.000 x g für fünfzehn Minuten wurde die wässrige RNA-haltige Phase abgenommen, die RNA mit Isopropanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in DEPC-Wasser gelöst.

##### **Bestimmung der Konzentration, Reinheitsqualität und Integrität der RNA**

Zur Konzentrationsbestimmung wird die Extinktion der RNA-Probe bei 260 nm mit einem UV-Spektrophotometer UV-1202 der Firma Shimadzu Europa GmbH bestimmt. Hierbei entspricht die Absorption  $A_{260}$  von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl. Durch den Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm kann die Reinheit der isolierten RNA abgeschätzt werden. Quotienten unterhalb 1,7 deuten auf eine Proteinkontamination der RNA-Probe hin, Werte zwischen 1,7 und 2,0 gewährleisten

eine ausreichende Reinheit. Für die weiteren Experimente wird RNA mit einem Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 verwendet.

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA werden die Proben routinemäßig in einer Gelelektrophorese untersucht. Dabei werden 1  $\mu\text{g}$  RNA mit Ficoll-Ladungspuffer in einem RNase-freien, 1%igen Agarose/MOPS-Gel mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid aufgetragen, bei einer Spannung von 60 V aufgetrennt und anschließend die Banden unter UV-Durchlicht visualisiert und fotografiert. Beurteilt werden die Abgrenzbarkeit der 18S und 28S RNA-Banden, mögliche Schmierspuren unterhalb der 18S-Bande als Hinweis einer Degradierung der RNA und das Verhältnis der Intensität der 18S und 28S RNA-Banden zueinander, wobei die 28S RNA-Bande eine ungefähr doppelt so hohe Intensität wie die 18S RNA-Bande aufweisen sollte. Messenger-RNA macht ca. 5% der Gesamt-RNA aus und stellt sich auf den Fotos zur Qualitätskontrolle meist als leichter Schleier im Hintergrund auf der Laufstrecke im Gel vor allem zwischen der 18S und 28S Bande dar (Abb. 3.1).

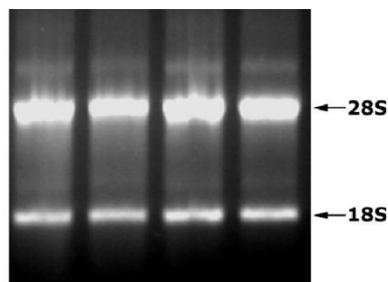


Abb. 3.1: Agarosegel zur Qualitätskontrolle der isolierten Gesamt-RNA.

### 3.3.2 RT-PCR

Bei der reversen Transkription wird durch das Enzym Reverse Transkriptase anhand der isolierten zellulären Boten-RNA (*messenger*-RNA = mRNA) komplementäre DNA (*complementary*-DNA = cDNA) synthetisiert. Die cDNA dient im zweiten Schritt als Vorlage (*template*) in einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR), in der eine DNA-abhängige DNA Polymerase spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert, die durch flankierende Primer-Sequenzen determiniert werden. Hier wurde diese Methode angewendet, um die Expression des Endothelin-Systems und des PAF-Rezeptors in Astrozyten nachzuweisen, sowie, um nach Amplifikation bestimmter

cDNA-Fragmente diese in Vektoren zu klonieren, die im Rahmen des *Northern blots* als Grundlage für die Herstellung radioaktiv markierter Sonden dienen.

### **Reverse Transkription**

Aus Primärkulturen von Ratten-Astrozyten isolierte mRNA wird in einer reversen Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Pro Ansatz werden ca. 200 ng bis 1  $\mu$ g mRNA verwendet. Zuerst werden 1  $\mu$ l dNTPs (je 10 mM), 1  $\mu$ l *random hexamer* (100  $\mu$ M) und RNase-freies Wasser zu 12,0  $\mu$ l Zwischenvolumen pipettiert, 5 min bei 65 °C in einem PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., USA) erhitzt und wieder auf Eis abgekühlt. Nach Hinzugabe von 4  $\mu$ l *first-strand-buffer*, 2  $\mu$ l 0,1 M DTT und 1  $\mu$ l RNasin (40 U/ $\mu$ l) wird kurz mit der Pipette gemischt und schließlich 1  $\mu$ l SuperScript II (200 U/ $\mu$ l zu einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l hinzugegeben. Die Inkubation bei 42 °C für 50 min und bei 70 °C für 10 min zur Enzymdeaktivierung erfolgt wieder im PTC-100.

### **Primer**

Die für die Gene des ET-Systems und des PAF-Rezeptors spezifischen Primer wurden nach den publizierten Sequenzen in der Genbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* entworfen (siehe Tab. 3.6). Ziel war es, Primer mit mehreren Eigenschaften zu entwerfen. Erstens sollten sie aus 20-25 Basenpaaren bestehen und spezifisch für die nachzuweisenden Gene (cDNA) sein, zweitens Intron-überspannend eine Amplifikation genomischer DNA verhindern oder bei Amplifikation ein deutlich längeres PCR-Produkt bedingen. Sie sollten drittens aufgrund ihrer Sequenz die Ausbildung von Dimeren verhindern und keine Möglichkeit zur Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb ihrer eigenen Sequenz haben. Viertens war angestrebt, für die Primerpaare eine möglichst gleich hohe *annealing*-Temperatur zu finden (Grundlage hierfür ist die Formel nach Wu (Wu, Ugozzoli et al. 1991)).

**Tab. 3.6: Medline Accession Numbers der Gene des Endothelin-Systems und des PAF-Rezeptors bei der Ratte**

Gen	MAN	Länge
ET <sub>A</sub> -Rezeptor	M60786	1436 bp
ET <sub>B</sub> -Rezeptor	X57764	1892 bp
ET-1	M64711	1385 bp
ET-3	S39779	334 bp
ECE-1a	D63795	336 bp
ECE-1b	AJ130826	387 bp
ECE-1c	D29683	4469 bp
ECE-1d	AJ130827	385 bp
PAF-Rez.	U04740	1301 bp

Unter Berücksichtigung oben genannter Kriterien werden die in Tabelle 3.7 angegebenen Primerpaare für den Expressionsnachweis mittels PCR der betreffenden Gene, als auch für die Klonierung von cDNA-Sequenzen, als *Northern blot*-Sonden ausgewählt.

**Tab. 3.7: Primersequenzen**

Primernamen	Primerlänge	Sequenz	PCR-Produkt
ratET1s711 ratET1as976	20 bp 20 bp	5' - gCA TCA AgA CCT CCT TTC gA -3' 5' - CAC CTC AAC CTC TCT Tgg AAA -3'	266 bp
ratET3s1 ratET3as339	20 bp 19 bp	5' - ggg CAg CTC gCT CTg AAA gT -3' 5' - gAA gCAA AgT gCA gCg CCg a -3'	339 bp
ratETArec-s(1) ratETArec-as(578)	24 bp 24 bp	5' - gTg AgA CCA ACA TAA CAg gAC gTT -3' 5' - gAg CgC AgA gAT TCA ggA CAg TgA -3'	578 bp
ETBrec-s(1361) ETBrec-as(1804)	20 bp 20 bp	5' - TCg CTC TgT ATT Tgg TgA gC -3' 5' - ATg TAA gTg ggC TgT gAg Tg -3'	443 bp
ratECE1a-s ratECE1b-s ratECE1c-s ratECE1d-s ratECE1-as	19 bp 18 bp 19 bp 19 bp 20 bp	5' - ggT CTC ACg gTC TCg CTg C -3' 5' - gCT ggC CgC TCT ggg gAT -3' 5' - CCT TAg Cgg gAg gTg CAT C -3' 5' - ATg gAg ACg CTg Agg gAg T -3' 5' - gAA gAA gTC CTg gCA ggg gT -3'	293 bp 390 bp 387 bp 397 bp
rPAFs114 rPAFa697	20 bp 20 bp	5' - AgA gCA ATg gAg CAA AAT gg -3' 5' - gAg gTg ATg AAg ATg Tgg AC -3'	583 bp
rβactin-s rβactin-as	19 bp 21 bp	5' - CCC TAA ggC CAA CCg TgA A-3' 5' - CAg Agg CAT ACA ggg ACA ACA-3'	106 bp

### Polymerase Kettenreaktion

Nach einer Temperaturoptimierung zur Bestimmung der optimalen Schmelz- und Primerhybridisierungstemperatur (*Annealing*-Temperatur) wird zur Amplifikation der gewünschten Gensequenzen die aus der reversen Transkription gewonnenen cDNA als *template* für eine PCR-Reaktion mit der DNA-abhängigen DNA-Polymerase HotStarTaq

(Qiagen, Art.-Nr. 203023 und 203205) verwendet. Die HotStarTaq zeichnet sich durch fehlende Enzymaktivität bei Umgebungstemperaturen aus. Dies verhindert die Bildung von unerwünschten Amplifikationsprodukten durch unspezifische Primerbindungen und Primer-Dimeren. In einem einzelnen Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25  $\mu$ l werden 2,5  $\mu$ l Qiagen 10xPCR-Puffer, je 1,0  $\mu$ l eines Primerpaares (Tabelle 3.7), 0,5  $\mu$ l dNTPs (je 10 mM), 5,0  $\mu$ l Qiagen Q-Solution, 3,0  $\mu$ l Template-Mix bestehend aus 1,0  $\mu$ l cDNA-Template und 2,0  $\mu$ l Wasser, 11,875  $\mu$ l Wasser und zuletzt 0,125  $\mu$ l HotStarTaq pipettiert. Die Amplifikation erfolgt wie im Falle der Reversen Transkription im PTC-100 Programmable Thermal Controller der Firma MJ Research Inc., USA. Vor dem Beginn der Vervielfältigungszyklen wird einmalig die HotStarTaq in einer notwendigen Vorlaufphase von 15 min bei 95 °C aktiviert. Der Standardzyklus besteht aus einer Denaturierungsphase von 0:30 min bei 94 °C, einer *annealing*-Phase von 0:45 min bei einer für das Primerpaar idealen Anlagerungstemperatur und der eigentlichen Amplifikations- und Extensionsphase von 0:45 min bei 72 °C. Insgesamt wird dieser Zyklus 40 Mal durchlaufen. Abschließend wird noch ein Extensionsschritt von 6:00 min bei 72 °C durchgeführt. Zur Visualisierung der amplifizierten DNA-Fragmente werden die Proben durch Elektrophorese in einem ethidiumbromidhaltigen 1,0 - 1,5%igen Agarosegel bei 60 V aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Als Größenstandard wird zur Orientierung ein 100-bp-DNA-Marker auf dem Gel aufgetragen. Um Kontaminationen der Reaktion mit unerwünschten DNA-Fragmenten auszuschließen, die zu falsch positiven Banden führen, werden die Kontrollen aus der RT-Reaktion und hochreines Wasser als *template* im Reaktionsansatz mitgeführt.

### 3.3.3 Subklonierung von cDNA-Sequenzen

#### Ligation

Das PCR-Produkt wird mit dem *TA-Cloning Kit* der Firma InvitroGen subkloniert. Als *Cloning*-Vektor dient der im Kit enthaltene pCR 2.1 Vektor.

Das Versuchsprotokoll wird nach den Vorgaben des Herstellers angewendet. In einer Ligationreaktion werden 1,0  $\mu$ l 10x Ligationspuffer, 2,0  $\mu$ l pCR 2.1 Vektor, 1,0  $\mu$ l T4 DNA Ligase, 4,0  $\mu$ l Aqua bidest. und 2,0  $\mu$ l des PCR-Produkts in einem Gesamtvolumen von 10,0  $\mu$ l angesetzt. Inkubation erfolgt für 16 h über Nacht bei 14 °C.

## Transformation

Zur Transformation wird das Standardprotokoll von GibcoBRL für *DH5 $\alpha$  competent cells* verwendet. *DH5 $\alpha$* -Zellen werden auf Eis aufgetaut und 50  $\mu$ l in vorgekühlte Reaktionsgefäße (Eppendorf Reaktionsgefäße, 1,5 ml) aliquotiert. Nach Zugabe von 1-10 ng DNA werden die Zellen für 30 min auf Eis, dann 20 s bei 37 °C auf dem Wärmeblock und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. 950  $\mu$ l LB-Medium werden hinzugefügt und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 225 U/min geschüttelt. Zum Beimpfen einer Agarplatte (100  $\mu$ g/ml Ampicillin; 50  $\mu$ g/ml X-Gal) werden 20  $\mu$ l der Bakterien-Suspension mit 80  $\mu$ l LB-Medium gemischt und mit einem abgeflammt, sterilen Glasspatel auf einer Drehscheibe aufgetragen. Die Inkubation der Agarplatte erfolgt über Nacht.

**Qiagen Miniprep.** Von den Agarplatten wurden mit einer Platinöse einzelne Klone gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37 °C geschüttelt. Die Extraktion und Reinigung der Plasmide mit dem Insert erfolgten mit dem Qiagen Miniprep Kit nach dem Protokoll des Herstellers. Konzentrationbestimmungen der isolierten DNA erfolgte optometrisch.

**Probeverdau des Vektors.** Um festzustellen, welcher der ausgewählten Klone ein *insert* im Vektor erfolgreich integriert hatte, wird dieses in einem Probeverdau mit dem Restriktionsenzym EcoR1 geschnitten und auf einem Agarosegel dargestellt.

## Sequenzierung

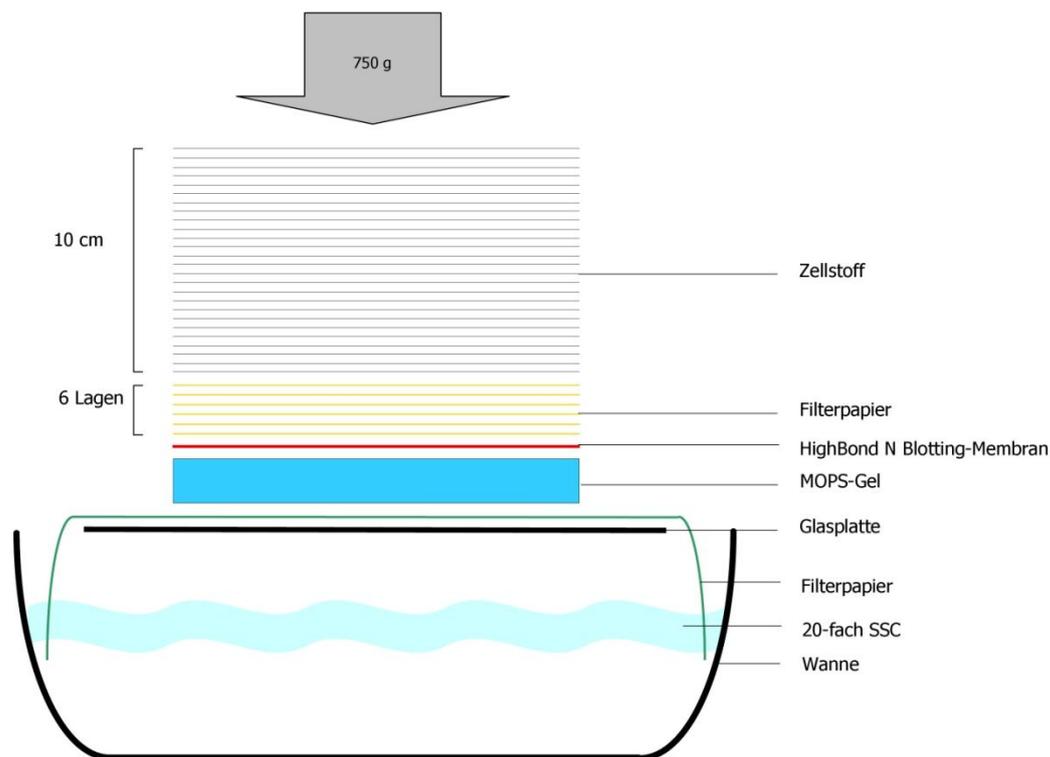
Die Sequenzierung der subklonierten cDNA-Sequenzen erfolgt automatisiert im ABIPRISM 377 DNA Sequencer der Firma Perkin Elmer nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger, Nicklen et al. 1977). Die ermittelten Nukleotid-Sequenzen werden bzgl. ihrer Homologie mit den in der *Genbank* publizierten Gensequenzen der zu untersuchenden Genen verglichen (Blast2.0 und Blast-2-Sequences).

### 3.3.4 Northern blot Analyse

Die Northern blot Analyse stellt eine Methode zur mRNA-Quantifizierung eines spezifischen mRNA-Transkripts dar. Aus Zellen oder Gewebe isolierte Gesamt-RNA wird in einem denaturierendem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gesamt-RNA wird dann auf eine Membran transferiert und mit einer für ein bestimmtes Transkript spezifi-

schen, radioaktiv-markierten cDNA-Sonde hybridisiert. Die Intensität der Bande wird autoradiographisch ausgewertet und ist proportional zum untersuchten mRNA-Transkript.

**Versuchsdurchführung.** 10-15  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA aus Ratten-Astrozyten oder aus Organen isolierte RNA werden für 10 min bei 65 °C in einer Lösung aus deionisiertem Formamid, Formaldehyd und MOPS-Puffer denaturiert, anschließend sofort auf Eis gestellt und mit 0,1  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid und 2,5  $\mu\text{l}$  Bromphenolblau versetzt. Aufgetragen auf einem 1 % Agarose/MOPS-Gel, das 6% Formaldehyd enthält, wird die RNA mit 40-60 V elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer der Proben vom Gel auf eine Hybond-N-Membran erfolgt über den in Abb. 3.2 skizzierten Versuchsaufbau. Zur Dokumentation der Transfereffizienz und zur Beurteilung der RNA-Menge werden die Gele vor sowie die Hybond-N-Membranen nach dem Transfer fotografiert. Um die RNA auf der Membran zu fixieren und kovalent zu binden, werden die Membranen im Ofen bei 80 °C für 2 h erhitzt.



**Abb. 3.2: Northern Blot. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Transfer der RNA-Proben auf eine Hybond-N-Membran.**

### 3.3.5 Herstellung der radioaktiv markierten cDNA-Sonden

Die mit den oben angegebenen Primern amplifizierten und anschließend klonierten cDNA-Fragmente werden durch den Verdau mit einem Restriktionsenzym aus dem Vektor herausgeschnitten und aufgereinigt. Das Amersham Rediprime II Labeling Kit (Amersham; Art.-Nr. RPN1634) wird nach dem empfohlenen Protokoll des Herstellers verwendet, um die klonierten cDNA-Stränge mit radioaktiven [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP zu markieren. Dabei wird durch die Klenow DNA-Polymerase [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP in die cDNA-Sequenz eingebaut. 2,5 - 25 ng cDNA wurden in 45  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) gelöst und für 5 min bei 95-100 °C in kochendem Wasser denaturiert. Nach einer Schockkühlung für 5 min auf Eis und kurzem Zentrifugieren wird die Probe ins Reaktionsgefäß zum *labeling-mix* gegeben, 5  $\mu$ l [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP addiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der *labeling-mix* enthält neben dATP, dGTP, dTTP, Exonuklease-freie Klenow DNA-Polymerase und Hexanukleotide mit einer zufälligen DNA-Sequenz als Primer (*random hexamer primer*). Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur beträgt 60 min. Alternativ kann für 10 min bei 37 °C inkubiert werden. Die Aufreinigung der markierten Sonde von nicht eingebauten, radioaktiven Nukleotiden erfolgt mit Amersham ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham; Art.-Nr. 27-5335-01), die Sephadex G-50 enthielten. Die spezifische Aktivität der Sonde wird in einem LKB/Wallac 1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter bestimmt. Die spezifische Aktivität der hergestellten, radioaktiv markierten Sonden beträgt zwischen  $4 \times 10^5$  und  $1,3 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g DNA. Die unterschiedlich starke spezifische Aktivität erklärt sich durch die verschieden langen cDNA-Fragmente der einzelnen Gene und den unterschiedlichen Gehalt an Cytidin-Triphosphat-Nukleotiden der Sequenzen.

### 3.3.6 Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde werden die Membranen für 60 min bei 42 °C im vorgeheizten Hybridisierungsöfen prähybridisiert. Die Prähybridisierung zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der nachfolgend eingesetzten cDNA-Sonde erfolgt mit 50 - 100  $\mu$ l DNA aus Lachsspermien (*salmon sperm DNA*; Invitrogen; Art.-Nr. 15632-011), die 5 min in kochendem Wasser denaturiert werden. Die ebenfalls durch 5 minütiges Kochen denaturierte, radioaktiv markierte cDNA-Sonde wird nach der Prähybridisierung in die Hybridisierungsflasche pipettiert

und über Nacht im Ofen bei kontinuierlicher Bewegung mit der Membran inkubiert. Schließlich erfolgt das Waschen der Membran zweimal in einem 2 x SSC/0,1 % SDS Waschpuffer bei Raumtemperatur für je 15 min und zweimal mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS Waschpuffer bei 60 °C für ebenfalls je 15 min.

### **3.3.7 Visualisierung und Auswertung der Northern blots**

Die Visualisierung an RNA-gebundener, radioaktiv markierter cDNA-Sonde erfolgt durch Belichtung eines Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm MP, Art.-Nr. RPN6K) oder durch Exposition einer Fujifilm BAS-MS2040 Imaging Plate. Die Belichtung der Röntgenfilme erfolgt zur Verringerung unspezifischen Signalrauschens infolge der natürlichen Radioaktivität bei -20 °C in der Kühlkammer über bis zu 11 Tage. Nach der Entwicklung werden die Röntgenfilme mit einem Durchlichtscanner eingescannt (Hewlett Packard ScanJet 7450C) und mit dem Programm Scion ImageJ analysiert. Die exponierten Phosphoimaging-Bildplatten werden im Fujifilm BAS-1500 eingelesen und mit der Software TINA v2.09g von Raytest analysiert.

Durch die Markierung der RNA nach der von Ogretmen (Ogretmen, Ratajczak et al. 1993) beschriebenen Methode wurde die densitometrische Vermessung der 28S- bzw. 18S-Bande ermöglicht. Die Intensität des spezifischen Signals wurde damit auf die entsprechende RNA-Menge standardisiert. Die Menge an RNA in den Kontrollen wurde auf 100% festgelegt.

Um dieselbe Membran mit einer weiteren Sonde zu hybridisieren, muss die auf der Membran gebundene, radioaktive cDNA abgelöst werden. Dieser Prozess wird *stripping* genannt. Die Membran wurde in eine Schale gelegt und mit kochender 0,1 %iger SDS-Lösung vorsichtig übergossen. Die Membran wird geschüttelt, bis die SDS-Lösung ungefähr Zimmertemperatur erreicht hat. Zur Kontrolle wird die Membran für 2 h auf eine Bildplatte gelegt und auf dem BAS-1500 Scanner ausgewertet. Bis zur nächsten Hybridisierung werden die Membranen in Saran-Folie eingeschlagen und kühl und trocken gelagert.

### 3.4 Bindungsstudien

Als Radioligand bezeichnet man eine radioaktiv markierte Substanz, die an einen Rezeptor, an Transportproteine, Enzyme oder jede andere denkbare Bindungsstelle bindet. Durch Messen der Geschwindigkeit und des Ausmaßes eines Bindungsexperiments erhält man Informationen über die Affinität der Bindungsstellen zum Liganden und die Anzahl an Bindungsstellen.

Mittels der Bindungsexperimente sollte u.a. überprüft werden, ob statt einer Primärkultur eine Zelllinie verwendet werden konnte. Der Nachweis der Endothelin-Rezeptoren auf der Zellmembran lebend fixierter, ganzer Zellen gibt nicht nur darüber Auskunft, welche Rezeptoren oder Subtypen auf der Zellmembran der Astrozyten exprimiert werden, sondern auch grobe Hinweise, in welchem Verhältnis die Subtypen zu finden sind. Je ähnlicher sich Primärkultur und Zelllinie sind, desto eher lassen sich Ergebnisse und Verhalten der Zelllinie auf die Primärkultur übertragen.

Kompetitions- und Sättigungsbindungsstudien und deren Analyse nach Scatchard (Scatchard 1949) ermöglichen es, quantitative Aussagen über die Rezeptordichte auf der Zellmembran und die Affinität der Rezeptoren zum Liganden zu bestimmen. Diese Untersuchungen sollen zum einen Auskunft über das physiologische Vorkommen der  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptoren geben, als auch über mögliche Veränderungen in der Rezeptordichte nach Stimulation mit vasoaktiven Substanzen liefern. Hierfür wurden die Zellen mit der Protease Thrombin, PAF und dem Protein Kinase C stimulierenden Phorbol-ester TPA behandelt und anschließend in einem *competition binding*-Experiment untersucht. Bei allen Bindungsversuchen sind Lebendzellpräparationen verwendet worden, die auf entsprechenden Zellkultur-Trägerflaschen ausgesät wurden.

#### 3.4.1 Theoretische Grundlagen

Für die Bindungsstudien wurden die Astrozyten einmal auf *96-strip-well-plates* ausgesät (*whole-cell-preparation*). Hierzu wurde ein radioaktiv markierter Rezeptorligand auf die Zellen gegeben und danach quantitativ die gebundene Radioaktivität ermittelt. Das Prinzip der „Kalten Sättigung“ ermöglicht es, die eingesetzte Menge radioaktiver Liganden und den Anteil an unspezifischen Bindungen des Liganden in der Probe möglichst niedrig zu halten (Scatchard 1949). Diesem Ansatz folgend wurden die Zellen mit einer

Mischung bestehend aus dem Radioliganden mit konstanter Konzentration und dem nicht radioaktiv markierten Liganden in ansteigender Konzentration koinkubiert. Beide Liganden konkurrieren um die freien Bindungsstellen auf den Zellen. Ein Gleichgewicht der Reaktion hat sich meist nach 2 Stunden eingestellt. Den Anteil unspezifischer Bindung des Radioliganden wird durch Messung der an die Zellen gebundenen Radioaktivität in Gegenwart der 100 bis 1000fachen Konzentration des nicht-radioaktiv markierten Liganden bestimmt. Die Höhe der spezifischen Bindung entspricht der gebundenen Radioaktivität abzüglich der unspezifischen Bindung in den Ansätzen mit nicht im Überschuss hinzugefügten, nicht radioaktiven Liganden. Eine Analyse der gewonnenen Daten nach Scatchard geht von der Annahme einer Bindungsreaktion des Liganden (L) an den freien Rezeptor (R) aus, wie sie die Gleichung



nach dem Massenwirkungsgesetz beschreibt, sofern keine weiteren Reaktionsprodukte durch diese Reaktion entstehen ( $LR = \text{Ligand-Rezeptor-Komplex}$ ). Wenn

$$\frac{\Delta([LR])}{t} = 0 \quad (3.4.II)$$

also die Zunahme an Ligand-Rezeptorkomplex abgeschlossen und damit die Assoziations- gleich der Dissoziationsgeschwindigkeit ist, hat die Reaktion ihr Gleichgewicht erreicht. Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Hin- und die Rückreaktion lauten

$$v_{Hin} = K_{Hin} \cdot [L] \cdot [R] \quad \text{und} \quad v_{Rück} = K_{Rück} \cdot [LR] \quad (3.4.III)$$

Diese Zusammenhänge gelten jedoch nur unter der Voraussetzung, dass weder der Ligand noch der Rezeptor im Rahmen der Reaktion chemisch modifiziert werden. Im Reaktionsgleichgewicht ist die Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes gleich seiner Dissoziationsrate. Der Netto-Umsatz und die Reaktionsgeschwindigkeiten sind gleich Null. Es gilt

$$[L] \cdot [R] \cdot K_{Hin} = [LR] \cdot K_{Rück} \quad (3.4.IV)$$

Durch Umformen der Gleichung erhält man die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_d$ :

$$\frac{[L] \cdot [R]}{[LR]} = \frac{K_{Rück}}{K_{Hin}} = K_d \text{ oder anders dargestellt } K_d = [L] \frac{[R]}{[LR]} \quad (3.4.V)$$

Für die Ligand-Rezeptor-Bindungsreaktion ergeben sich für die Konstanten die in der Tabelle 3.8 angegebenen Einheiten. Dies gilt unter der Annahme, dass die Reaktionsgeschwindigkeit als Zu- oder Abnahme der Konzentration des Produktes die Einheit  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  trägt und die Konzentrationen in  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  angegeben werden.

**Tab. 3.8: Einheiten der Reaktionskonstanten für Ligand-Rezeptor-Bindungsreaktionen**

Konstante	Einheit
$K_{hin}$	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$K_{rück}$	$\text{s}^{-1} \text{s}^{-1}$
$K_d$	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Entspricht in einer Bindungsreaktion die Konzentration des Liganden  $[L]$  der Gleichgewichtskonstanten  $K_d$ , so ergibt sich durch Einsetzen in Gleichung (3.4.V), dass  $[R]/[LR]=1$ . Die Konzentration der freien Rezeptoren  $R$  ist gleich der des Ligand-Rezeptorkomplexes  $LR$ . Da alle Rezeptoren entweder frei oder gebunden sind, bedeutet es, dass die Hälfte der Rezeptoren frei und die andere Hälfte vom Liganden besetzt ist. Rezeptoren, die eine hohe Bindungsaffinität zum Liganden haben, besitzen einen niedrigen  $K_d$ -Wert, da nur eine geringe Konzentration des Liganden erforderlich ist, die Hälfte der Rezeptoren zu besetzen. Die Gesamtzahl der Rezeptoren  $R_{total}$  kann als

$$R_{total} = R + RL \quad (3.4.VI)$$

beschrieben werden. Aus Gleichung (3.4.V) und (3.4.VI) kann eine Gleichung abgeleitet werden, die als lineare Funktion der Art  $y = mx + n$  zum Scatchard-Plot führt:

$$\frac{K_d}{[L]} = \frac{[R]}{[LR]} \Leftrightarrow \frac{[R]}{K_d} = \frac{[LR]}{[L]} \Leftrightarrow \frac{R_{total} - [LR]}{K_d} = \frac{[LR]}{[L]} \Leftrightarrow \frac{[LR]}{[L]} = -\frac{[LR]}{K_d} + \frac{R_{total}}{K_d} \quad (3.4.VII)$$

Bezeichnet man den Ligand-Rezeptor-Komplex als *Bound* ( $B$ ), die Gesamtrezeptorzahl  $R_{total}$  als  $B_{max}$  und den ungebundenen Ligand  $L$  als *Free* ( $F$ ) erhält man

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_d} B + \frac{B_{\max}}{K_d} \quad (3.4.VIII)$$

Zur Berechnung von  $B$ ,  $F$  und  $B/F$  ist es erforderlich, für jeden Ansatz die Menge des radioaktiv markierten und unmarkierten Liganden zu bestimmen. Die Messung erfolgte in *mol*. Die Menge an spezifisch gebundener Radioaktivität wird als Faktor angegeben.  $B$  errechnet sich daraus als Multiplikation der Gesamtmenge des Liganden mit diesem Faktor.  $F$  ergibt sich durch Subtraktion von  $B$  von der Gesamtmenge des Liganden. Der Plot wird als  $B/F$  über  $B$  dargestellt. Daraus lassen sich  $K_d$  und  $B_{\max}$  ableiten. Zur linearen Regressionsanalyse wurde die Methode der kleinsten Abweichungsquadrate nach Gauss verwendet. Als linearer Zusammenhang wurde bei einem  $r^2 > 0,95$  ausgegangen.

### 3.4.2 Orientierende Bindungsexperimente

Die initialen, orientierenden Bindungsexperimente dienten zum qualitativen Nachweis der ET-Rezeptoren sowohl auf den Primärkulturen als auch auf der Astrozytenzelllinie. Der Astrozytenprimärkultur wurde die kommerziell erhältliche Astrozytenzelllinie DI TNC1, die von ATCC (USA) erworben wurde (Art.-Nr. CRL-2005), gegenübergestellt (Radany, Brenner et al. 1992). Astrozyten wurden auf mit einer 0,125%igen Gelatine-Lösung beschichteten Glasobjektträgern in 6-Loch-Platten ausgesät und inkubiert, bis sie Subkonfluenz erreicht hatten. Nach Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit bovinem Serumalbumin geblockt. Die maximale Bindungskapazität (*Totals*) für radioaktives  $^{125}\text{I-ET-1}$  wurde in Abwesenheit nicht markierten ET-1, des  $\text{ET}_B$ -Rezeptor selektiven Antagonists BQ788 oder des  $\text{ET}_A$ -Rezeptor selektiven FR139317 ermittelt. Um die verbleibende unspezifische Bindungskapazität (*non-specific binding, NSB*) zu bestimmen, wurde  $^{125}\text{I-ET-1}$  mit  $1 \mu\text{M}$  ET-1 koinkubiert. FR139317 und BQ788 wurden in Konzentrationen von 100 nM und 10 nM mit  $^{125}\text{I-ET-1}$  koinkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde wurden die Objektträger dreimal mit HEPES-Puffer gewaschen, zur Belichtung eines Röntgenfilms aus den 6-Loch-Platten genommen und in einer Röntgenkassette angeordnet. Der Film wurde für 5 Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  belichtet, das entwickelte Bild eingescannt und mit NIH Image analysiert.

### 3.4.3 Sättigungsbindungsstudien

Sättigungsbindungsexperimente (*saturation binding experiments*) dienen zur Messung der spezifischen Bindung eines Radioliganden in verschiedenen Konzentrationen im Gleichgewicht der Bindungsreaktion (*Equilibrium*). Die Analyse dieser Daten ergibt die Anzahl der Bindungsstellen (ausgedrückt als Dichte der Bindungsstellen  $B_{max}$ ) und deren Affinität (ausgedrückt durch den  $K_d$ -Wert) zum Radioliganden. Voraussetzung ist jedoch, dass eine ausreichend lange Inkubationszeit gewählt wird, so dass sich ein Reaktionsgleichgewicht einstellen kann. Die Inkubationszeit richtet sich nach der niedrigsten Konzentration des Radioliganden, da diese am längsten benötigt, ein Bindungsgleichgewicht zu erreichen. Sie betrug eine Stunde.

### 3.4.4 Kompetitionsbindungsstudien

Bei einem *competition binding experiment* hingegen werden Proben mit einer konstanten Konzentration eines radioaktiv markierten Liganden in Gegenwart von steigenden Konzentrationen eines nicht radioaktiven Liganden inkubiert. Idealerweise umfasst die Konzentrationsspanne sechs Größenordnungen. *competition binding* beschreibt die Fähigkeit eines nicht radioaktiven Liganden mit einem radioaktiv markierten Liganden um die Bindungsstellen an einem Rezeptor zu konkurrieren. Durch sie ermittelt man die Inhibitionskonstante  $IC_{50}$  und die Affinität (Inhibitionskonstante  $K_i$ ) des nicht-markierten Liganden (z.B. ein agonistisches oder antagonistisches Medikament) für diesen Rezeptor. Mit Kompetitionsbindungsstudien lassen sich durch die Auswahl geeigneter Liganden Subtypen eines Rezeptors in einem gegebenen Gewebe oder einer Zellpopulation analysieren.

### 3.4.5 Proteinbestimmung

Die Gesamtzeptordichte, der  $B_{max}$ -Wert, kann zur Menge des eingesetzten Gesamtproteins in Relation gesetzt werden (Anzahl der Bindungsstellen in fmol pro Proteinmenge in pg). Zur Messung des Gesamtproteingehalts wurde ein kolorimetrisches Assay der Firma Bio-Rad nach der Anleitung des Herstellers verwendet (DC Protein Assay, Bio-Rad Art.-Nr. 500-0112), das die Proteinmenge nach der Methode von Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) bestimmt. In der typischen zweistufigen Reaktion wird divalentem Kupfer unter Komplexbildung mit den Peptidbindungen des Proteins zu monovalentem Kupfer

reduziert. Der Komplex reduziert das Folin-Reagenz. Es entsteht Molybdän-Tungsten-Blau. Der Farbumschlag entsteht dabei hauptsächlich durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Bei der Proteinbestimmung wurden für jeden Messpunkt Doppelbestimmungen durchgeführt. In einem Spektrophotometer (MRX Microplate Reader, DYNEX Tech., Chantilly, USA) wurde die Intensität des Farbstoffs bestimmt, die mit der Menge an Protein in der Probe korreliert. Als Standard wurde eine wässrige Lösung aus bovinem Serumalbumin verwendet. Die Standardkurve wurde mit Hilfe des Softwarepakets Revelation ermittelt. Die Standardkurve wurde durch drei Messpunkte pro Konzentration, die Proben wurden durch zwei Messpunkte pro Konzentration bestimmt.

### **3.5 Statistische Analyse**

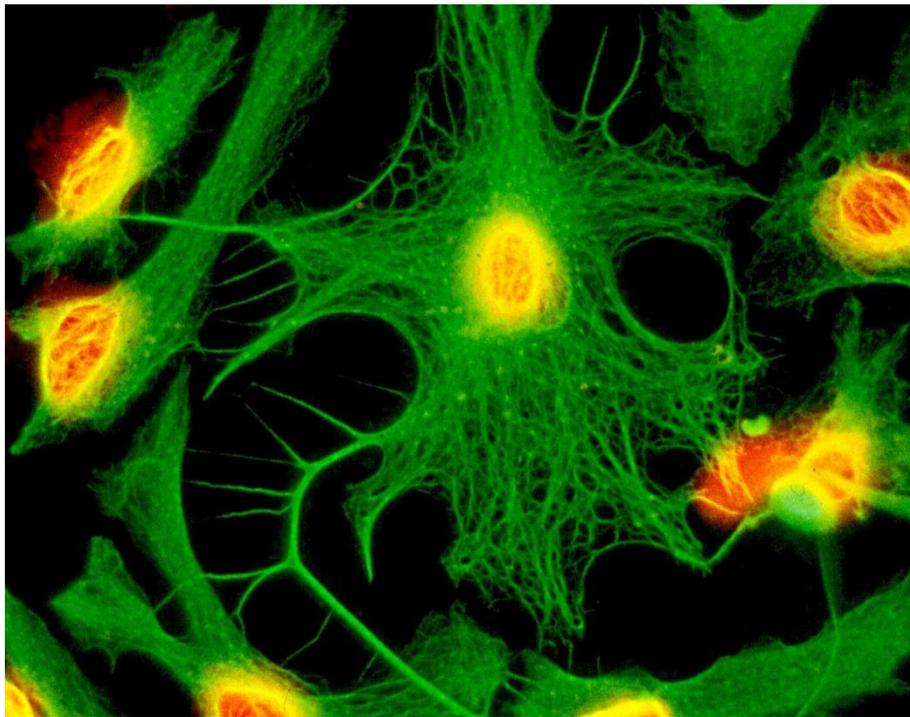
Die statistische Analyse der Daten und Berechnung der p-Werte erfolgte mit einem zweiseitigen Student's t-Test für unverbundene Stichproben auf einem Signifikanzniveau von 5%.

## 4. Ergebnisse

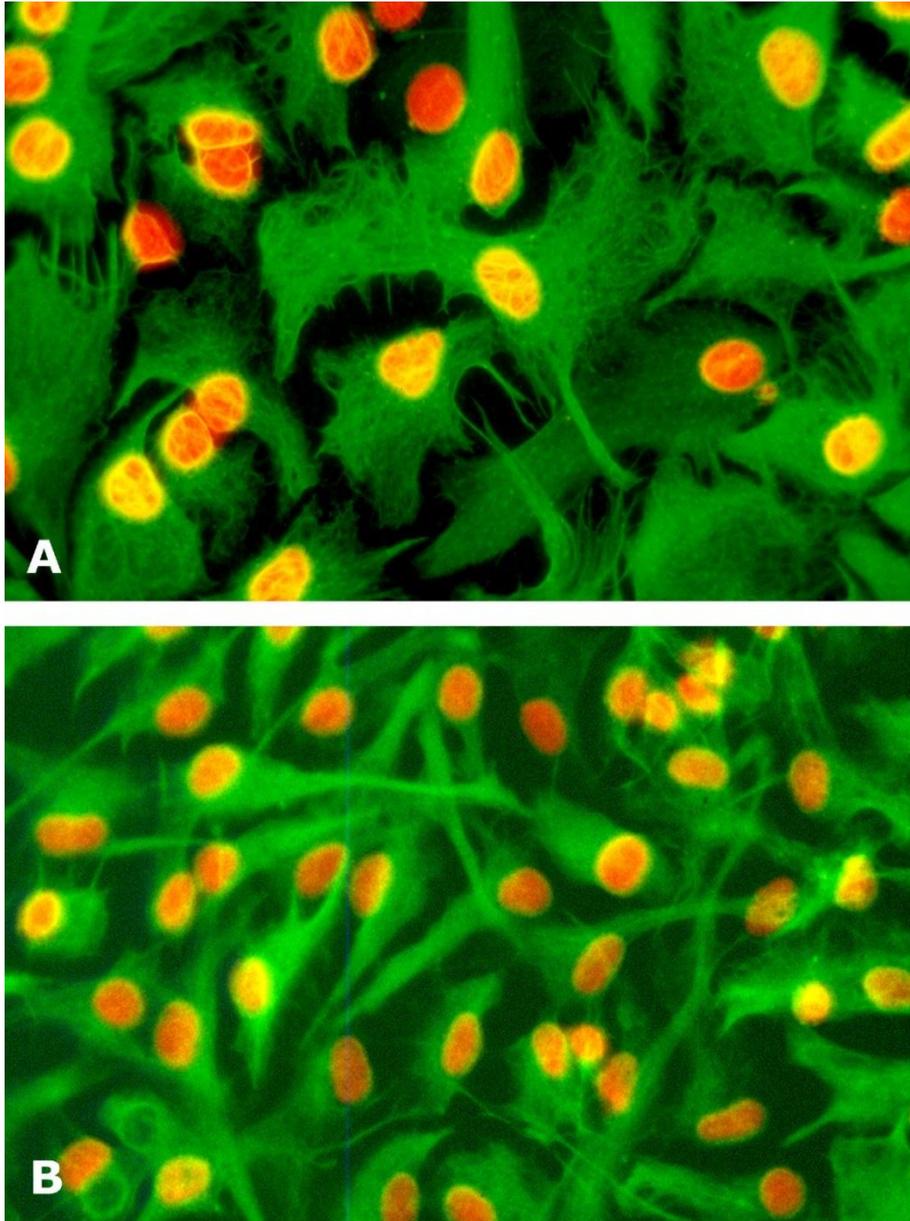
### 4.1 Astrozytenzellkultur

#### 4.1.1 Darstellung der astrozytenspezifischen GFAP-Filamente

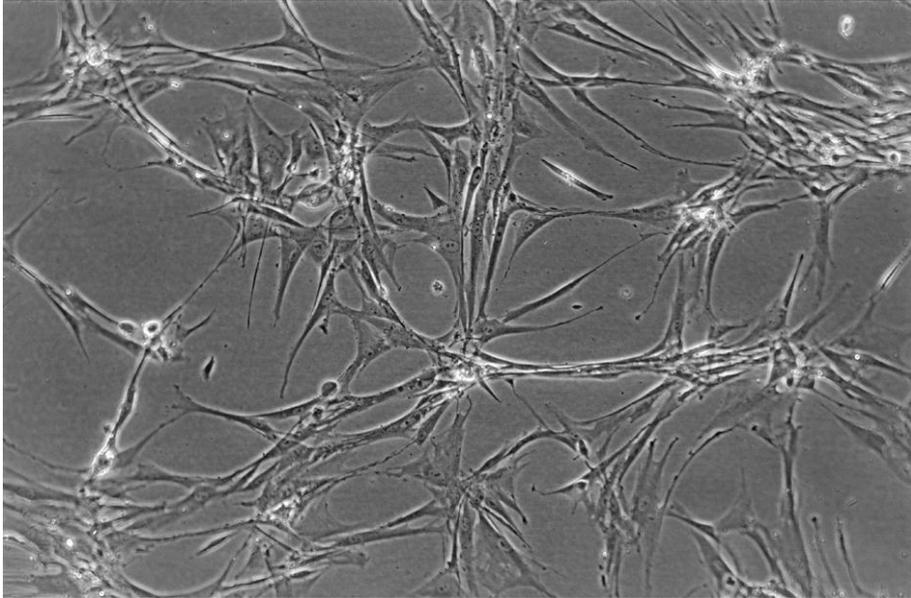
Die Reinheit der Astrozytenkulturen wurde durch Anfärben der Astrozyten-spezifischen GFAP-Filamente des Zytoskeletts bestätigt. Dies zeigte eine über 95%ige Anfärbung von GFAP-positiven Zellen (Abb. 4.1 und Abb. 4.2). Bereits zwei Tage nach Präparation sind in der Wachstumsphase befindliche Fibroblasten-ähnlichen Astrozyten mit ihren sternförmigen Zellausläufern zu erkennen. Bei der Präparation zeigte sich, dass für proliferierendes Wachstum der Astrozyten eine „kritische Zelldichte“ erforderlich ist, die einerseits ausreichend interzelluläre Kontakte der Astrozyten möglich macht und möglicherweise eine Mindestkonzentration autokriner Wachstumsfaktoren gewährleistet (Abb. 4.3).



**Abb. 4.1:** Das Bild zeigt einen einzelnen Astrozyten, dessen Zytoskelett und Zellausläufer durch Anfärben mit einem FITC-konjugiertem GFAP-Antikörper unter dem Floureszenzmikroskop grün dargestellt sind. Der Zellkern hebt sich durch Propidiumjodid rotgelb vom grünen Zytoplasma ab. Rechts erkennt man einen im Rahmen der Färbung rupturierten Zellkern, dessen Karyoplasma sich als rot-gelber Schleier darstellt.



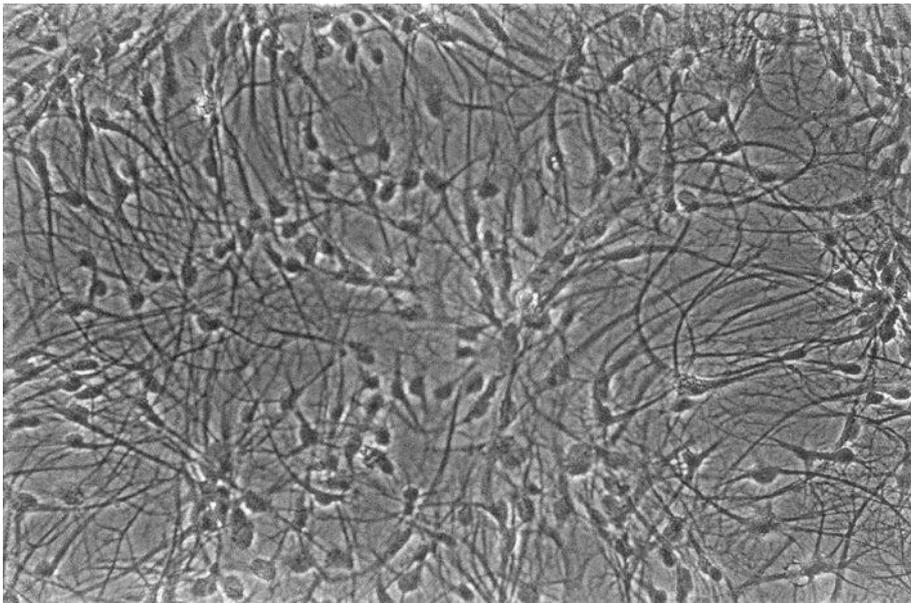
**Abb. 4.2:** Ausschnitt A und B zeigen zwei typische Aufnahmen in unterschiedlichen Ausschnitten und Vergrößerungen der astrozytären *Monolayer*-Zellkultur. (A) In dieser Darstellung sind die abgeflachten, großflächig wachsenden Astrozyten zu erkennen. In (B) zeigt sich der Fibroblasten-ähnliche Charakter wenig differenzierter Astrozyten in DBcAMP-unbehandelter Zellkultur.



**Abb. 4.3: Zwei Tage nach Präparation sieht man Fibroblasten-ähnliche, primäre Ratten-Astrozyten mit zahlreichen Zellausläufern.**

#### **4.1.2 Zelldifferenzierung der Astrozyten**

Durch Zusetzen von DBcAMP zu den präparierten Primärkulturen (Abb. 4.4) zeigt sich im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten (Abb. 4.3) ein kleineres Karyoplasma, mehr und längere zytoplasmatische Fortsätze, die im Falle einer zerebralen Schädigung desintegrieren (Clasmatodendrosis).



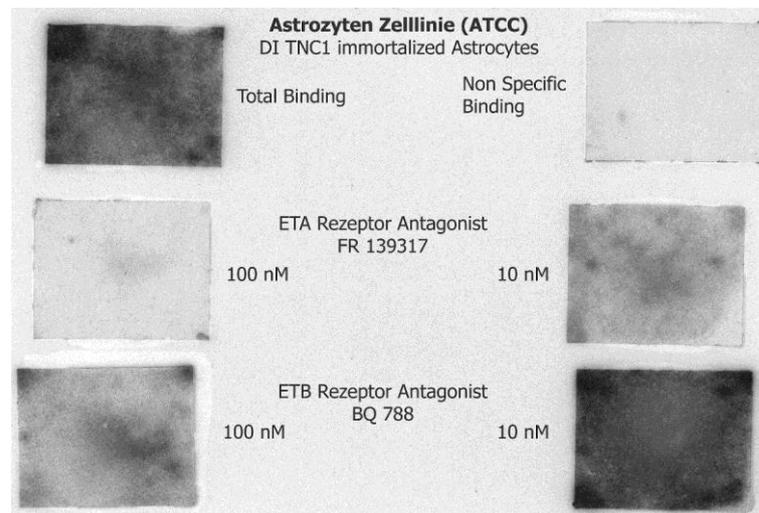
**Abb. 4.4: DBcAMP-behandelte Astrozyten unter dem Zellkulturmikroskop.**

### 4.1.3 Vergleich der astrozytären Zelllinie mit der Primärkultur

Zu Beginn des Projekts stand die Frage nach dem geeigneten Zellkulturmodell. Da die Beschaffung gesunder, menschlicher Astrozyten zur Kultivierung in *Monolayer*-Zellkulturflaschen schwierig ist, sollte das Endothelin-System in Astrozyten der Ratte untersucht werden. Das Ansetzen und Pflegen einer Primärkultur ist mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Primärkulturen sind anfälliger für Pilzkontamination und neigen dazu, ihre zellspezifische Differenzierung von Passage zu Passage zu verändern hin zu einem weniger differenzierten Zelltyp, der sich in einer veränderten Rezeptorpopulation ausdrücken kann. Zelllinien sind in ihrem Differenzierungsgrad stabil und verändern sich kaum. Auch nach 30 Passagen bleibt ihr Differenzierungsgrad konstant. Für das Verwenden der Zelllinie spricht neben der einfacheren Pflege insbesondere, dass keine Versuchstiere zur Organentnahme dekapitiert werden müssen. Im Hinblick auf möglicherweise später durchzuführende Studien in einem Tiermodell eignet sich die Ratte als Versuchstier. Neben der aus primären Astrozyten angesetzten Kultur stand zur Evaluation die immortalisierte Astrozyten-Zelllinie DI TNC1 zur Verfügung. Um später Aussagen aus Experimenten mit interessierenden Stimulantien und den Einfluss von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten auf eine zelluläre Reaktion von der Zellkultur auf eine *in-vivo*-Situation am lebenden Tier möglich zu machen, war es wichtig, dass die kultivierten Zellen der Zellkultur eine möglichst vergleichbare Expression der Endothelin-Rezeptoren ausweisen. Zum Nachweis des ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptor auf der Zelloberfläche wurde die Zelllinie wie in Abschnitt (3.4.2) beschrieben, untersucht. Durch die hier angewendete Autoradiographie soll eine grobe Übersicht gewonnen werden, ob ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren auf den Zelloberflächen der beiden Zelltypen nachzuweisen und inwieweit Unterschiede zwischen der Primärkultur und der Zelllinie zu finden sind. Die Autoradiographie (Abb. 4.5) zeigte sehr deutlich, dass die Zelllinie DI TNC1 eine starke Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors aufweisen muss. Bei einer Konzentration von 100 nM ist der ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist FR139317 in der Lage, radioaktiv markiertes ET-1 fast vollständig von den Bindungsstellen zu verdrängen. Auch bei einer Konzentration von 10 nM kann FR139317 Bindungsstellen besetzen. Der nicht-peptidische ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonist BQ788 kann in dieser Konzentration kein <sup>125</sup>I-ET-1 verdrängen. Die Menge an gebundenem <sup>125</sup>I-ET-1 bewirkt in etwa dieselbe Schwärzung wie die Totale-Bindungskapazität (*total binding*) oben links in der Abbildung 4.5.

In der Astrozytenprimärkultur hingegen war FR139317 selbst in hohen nM-Konzentrationen (100 nM) nicht in der Lage, das radioaktive ET-1 zu verdrängen. BQ788 besetzt signifikant ( $p=0,02$  im Vgl. zur totalen Bindungskapazität,  $p=0,04$  im Vgl. zur unspezifischen Bindungskapazität,  $N=6$ ) rund 32% der Bindungsstellen bei einer Konzentration von 100 nM (vgl. Abb. 4.6).

Daraus lässt sich ableiten, dass durch die Immortalisierung der Astrozyten durch stabile Transfektion der *oncogenic early region* des Simian Virus 40 (SV40), unter der transkriptionellen Kontrolle des humanen GFAP-Promoters in Bezug auf die Expression der ET-Rezeptoren Typ A und Typ B zu einer erhöhten ET<sub>A</sub>-Rezeptordichte führt. Dies hat zur Folge, dass der ET<sub>A</sub>-Rezeptor als vorherrschender Subtyp auf diesen Zellen nachzuweisen ist. Eine Aussage über die Funktionsfähigkeit und beteiligte Transduktionsmechanismen lässt sich daraus natürlich nicht ableiten.



**Abb. 4.5:** In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass der ET<sub>A</sub>-selektive Rezeptorligand FR139317 bei Konzentrationen von 10 nM und insbesondere bei 100 nM (hier fast vollständig im Vergleich zur rechtsoben dargestellten unspezifischen Bindungskapazität) das radioaktiv markierte ET-1 von den Bindungsstellen verdrängt (Zelllinie DI TNC1). Der ET<sub>B</sub>-selektive Rezeptorligand BQ788 ist nur in einer Konzentration von 100 nM in der Lage, mit <sup>125</sup>I-ET-1 um die Bindungsstellen zu kompetieren. Bei 10 nM ist die Schwärzung durch <sup>125</sup>I-ET-1 gleich stark wie die oben links dargestellte totale Bindungskapazität.

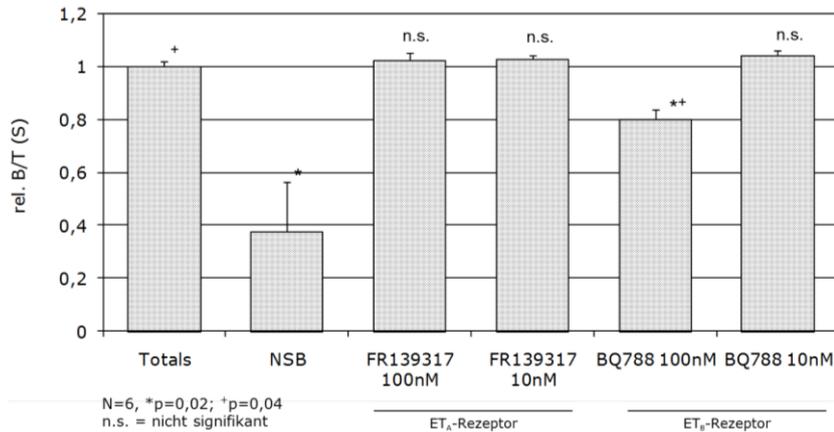


Abb. 4.6: Autoradiographie. Graphische Darstellung der relativen spezifischen Bindungskapazität <sup>125</sup>I-ET-1 in Anwesenheit von 100 nM bzw. 10 nM der Rezeptorantagonisten FR139317 oder BQ788. N = 6, p < 0,05 (Astrozytenprimärkultur).

## 4.2 mRNA-Expression der ET-Komponenten und des PAF-Rezeptors

### 4.2.1 Expression der *Platelet-activating Factor* Rezeptor mRNA

Das Primerpaar zur Detektion der Expression von Platelet-activating Factor (PAF) Rezeptor wurde nach den von H. Bito (Bito, Nakamura et al. 1992; Bito, Kudo et al. 1993; Bito, Honda et al. 1994) veröffentlichten Sequenzen gewählt (Tab. 3.6 und 3.7). Mittels semi-quantitativer RT-PCR konnte die Expression des PAF-Rezeptors in der Astrozytenzellkultur als auch in anderen Organen wie Aorta, Lunge, Niere und Herz (Abb. 4.7 und 4.8) nachgewiesen werden.

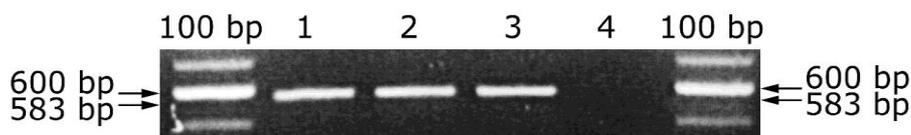


Abb. 4.7: RT-PCR. mRNA-Expression des PAF-Rezeptors in Astrozyten. Die erste und letzte Spur zeigen einen Größenstandard (100 bp), bei Nr. 1 und 2 wurden mRNA-templates aus zwei verschiedenen Präparationen astrozytärer Primärkulturen eingesetzt, Nr. 3 zeigt mRNA aus Rattenlunge als Template (Positivkontrolle, Referenz), die vierte Spur RT-.

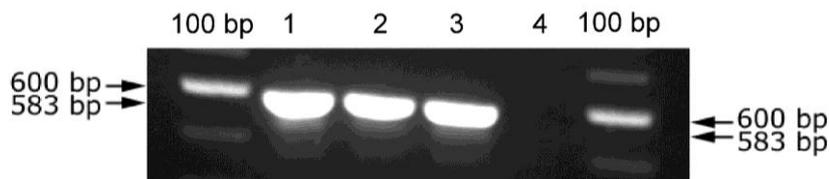
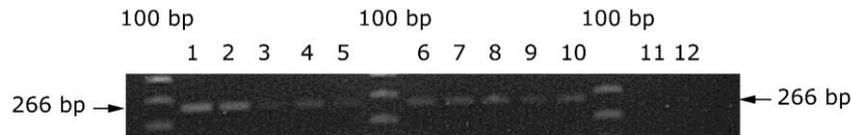


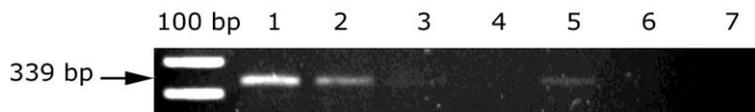
Abb. 4.8: RT-PCR. Expression des PAF-Rezeptors im Herzen (Spur 1), in der Niere (Spur 2) und Aorta (Spur 3) der Ratte (Sprague-Dawley-Stamm). Spur 4 zeigt die Wasserprobe.

#### 4.2.2 Nachweis der Expression von ET-1, ET-3, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> und ECE-1

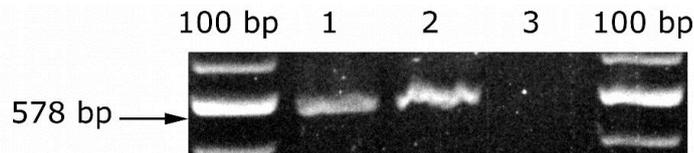
Der Nachweis der Genexpression von ET-1, ET-3, der Endothelin-Rezeptoren und des ECE in Astrozyten und verschiedenen Organen der präparierten Tiere und Zellen ist in den Abbildungen 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 und 4.13 dargestellt und erläutert.



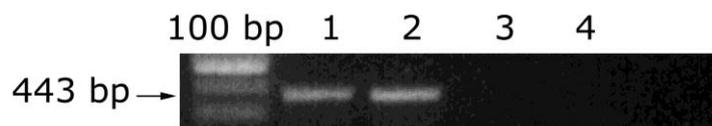
**Abb. 4.9: RT-PCR.** Die Abbildung zeigt die Expression des ET-1 Gens in verschiedenen Geweben und Astrozyten. Spur 1 und 2: Niere, Spur 3: Nebenniere, Spur 4: Aorta, Spur 5 und 6: Hoden, Spur 7: Großhirn, Spur 8: Stamm- und Zwischenhirn, Spur 9 und 10: primäre Rattenastrozyten, Spur 11: -RT, Spur 12: Wasserprobe. Die Länge des zu erwartenden Amplifikats beträgt 266 bp.



**Abb. 4.10: RT-PCR.** Die Abbildung zeigt die Expression des ET-3-Gens. Das erwartete Amplifikationsprodukt lag bei einer Länge von 339 bp. Spur 1: Herz, Spur 2: Niere, Spur 3: Nebenniere, Spur 4: Mesenterium, Spur 5: primäre Rattenastrozyten, Spur 6: -RT, Spur 7: Wasserprobe. Neben einer deutlich sichtbaren Expression von ET-3 im Herzen, der Niere und Astrozyten ist auch eine schwache Expression in der Nebenniere erkennbar.



**Abb. 4.11: RT-PCR.** Die Abbildung zeigt die Expression des ET-Rezeptors Typ A in primären Rattenastrozyten: Astrozyten (Spur 1), Niere (Spur 2) und Wasserprobe (Spur 3). Die Länge des Amplifikationsprodukts beträgt 578 bp.



**Abb. 4.12: RT-PCR.** Die Abbildung zeigt die Expression des ET-Rezeptors Typ B in primären Rattenastrozyten: Astrozyten (Spur 1 und 2), Wasserprobe (Spur 3) und RT- (Spur 4).

Die Expression der ECE-1 Isoformen (Abb. 4.13) wurde in Astrozyten, in Niere sowie der Lunge mittels RT-PCR nachgewiesen. Interessanterweise zeigen sich hinsichtlich der Expression der Isoformen ECE-1b und ECE-1c kaum Unterschiede.

In DBcAMP-stimulierten Astrozyten hingegen wird ECE-1a geringer exprimiert. Bezogen auf den hier verwendeten Standard  $\beta$ -Actin beträgt in DBcAMP-behandelten Astrozyten die Expression nur rund 45% im Vergleich zu unbehandelten.

Zusammengefasst findet sich auch hinsichtlich des ECE ein Unterschied zwischen DBcAMP-stimulierten und -unstimulierten Astrozyten. Lungengewebe und Nieren scheinen die ECE-1 Isoformen in gleichem Ausmaß zu bilden. Hier zeigen sich keine Unterschiede.

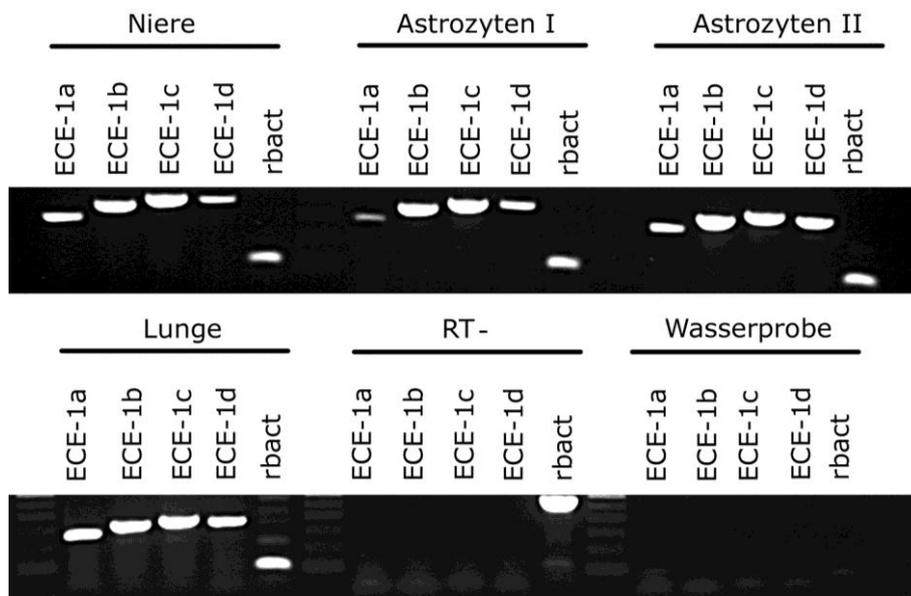


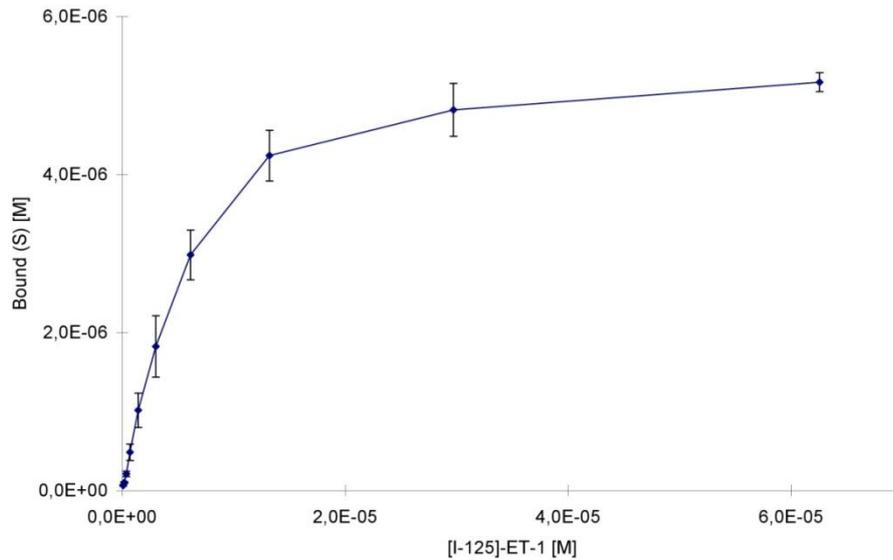
Abb. 4.13: RT-PCR. Das Bild zeigt die Expression der ECE-1 Isoformen A-D in Niere, Lunge und in Astrozyten. Astrozyten I hat als *template* DBcAMP-stimulierte Astrozyten, Astrozyten II ist eine unstimulierte Probe. Als Positivkontrolle diente  $\beta$ -Actin (*ract*), als Negativkontrolle wurden eine Wasserprobe sowie eine RT- verwendet.

## 4.3 Ergebnisse der Bindungsstudien

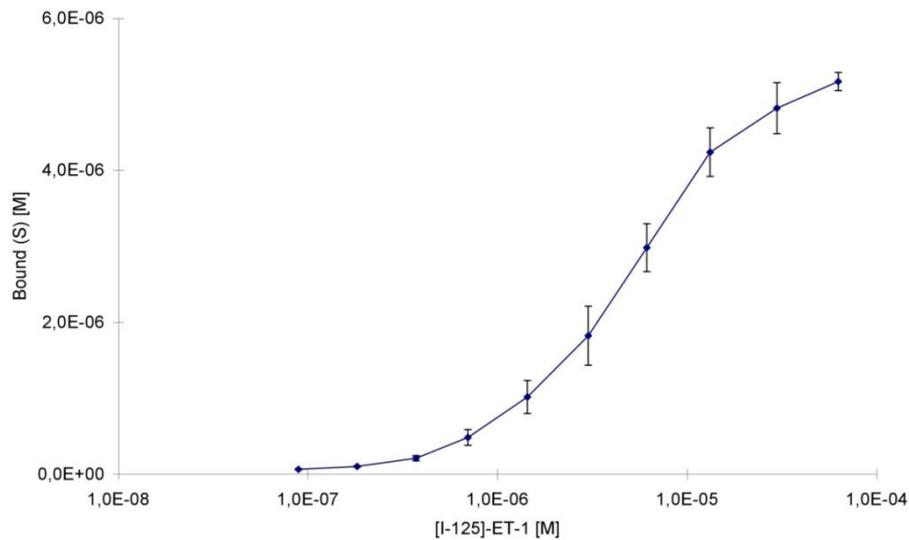
### 4.3.1 Sättigungsbindungsversuche

ET-1 bindet mit einer hohen Affinität an Astrozyten ( $K_d=1,19 \pm 0,15$  nM, N=6). Die Berechnung des Hill-Koeffizienten ergab einen Wert von  $n_H=1,08 \pm 0,13$  (N=6). Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 4.14 und Abb. 4.15 dargestellt.

## Ergebnisse



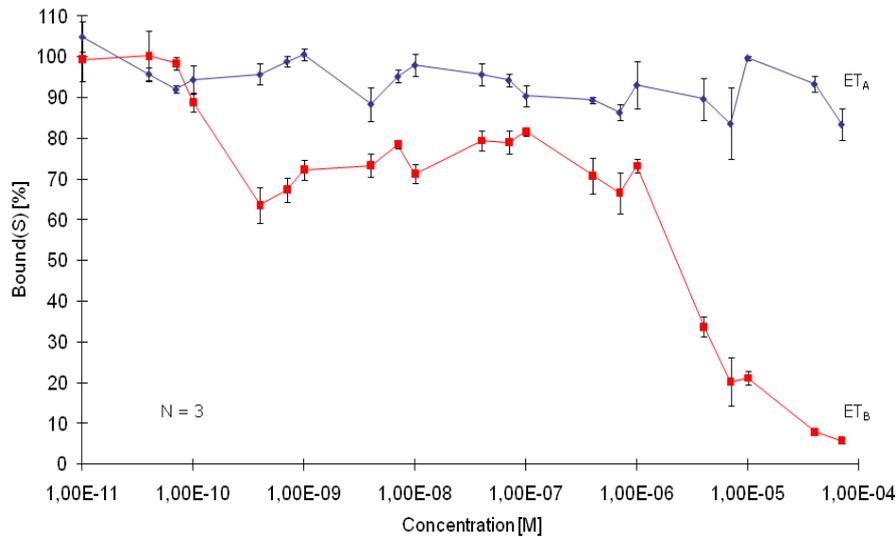
**Abb. 4.14: Saturation Binding Experiments.** Aufgetragen ist die spezifisch gebundene Radioaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Radioliganden  $^{125}\text{I-ET-1}$ .



**Abb. 4.15: Logarithmische Darstellung der Sättigungsbindungskurve.**

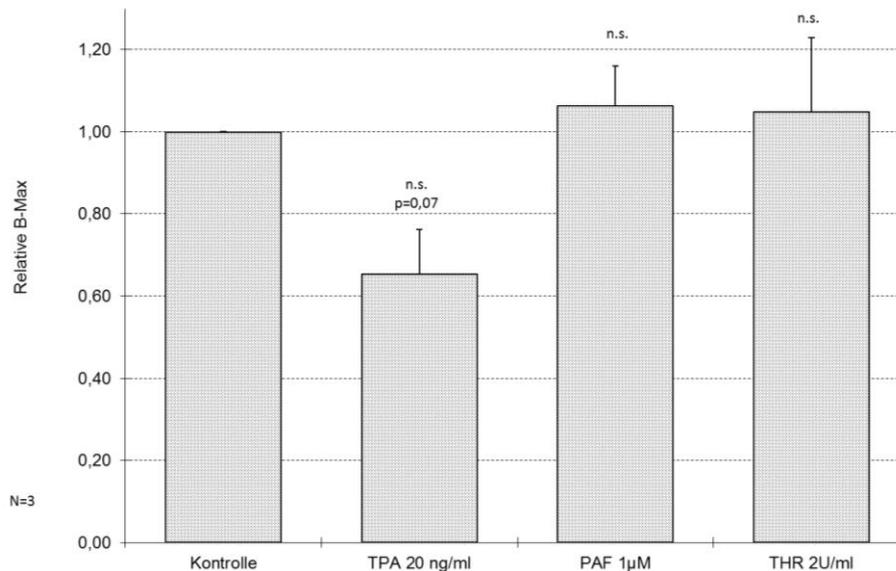
### 4.3.2 Kompetitionsbindungsversuche

Eine konstante Menge radioaktives  $^{125}\text{I-ET-1}$  konkurriert mit dem  $\text{ET}_A$ -selektiven Rezeptorantagonisten FR139317 und dem  $\text{ET}_B$ -selektiven Rezeptorantagonisten BQ788 um die Bindungsstellen auf der Zelloberfläche von Astrozyten. Wie in Abb. 4.16 dargestellt, bindet BQ788 mit einer Inhibitionskonstante  $K_i = 117 \pm 33 \text{ nM}$  nur im hohen nanomolaren Bereich auf Astrozyten. Dagegen ist FR139317 bei keiner Konzentration ( $10^{-11}$  bis  $10^{-4} \text{ M}$ ) in der Lage,  $^{125}\text{I-ET-1}$  zu verdrängen. Die unter BQ788 ermittelte Rezeptordichte  $B_{\text{max}}$  beträgt  $281,19 \pm 44,55 \text{ fmol/mg Protein}$ .



**Abb. 4.16: Kompetitionsbindungsstudien mit den ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-selektiven Rezeptorantagonisten FR139317 (blau) und BQ788 (rot), N=3. FR139317 ist auch in hohen Konzentrationen (10<sup>-4</sup> M) nicht in der Lage, radioaktives ET-1 von Bindungsstellen zu verdrängen, BQ788 hingegen zeigt einen konzentrationsabhängigen Abfall des spezifisch gebundenen, radioaktiven ET-1.**

Um zu überprüfen, inwieweit sich die Rezeptordichte auf Astrozyten unter pathologischen Zuständen z.B. im Rahmen einer Blutung und einer Entzündung verändern könnte, werden Astrozyten zuvor mit PAF, Thrombin oder dem Phorbol ester TPA behandelt. Hierbei interessiert einerseits die Frage, ob die nachgewiesenen ET<sub>B</sub>-Rezeptoren vermehrt oder verringert dargestellt werden können, und andererseits, ob unter den veränderten Bedingungen der Nachweis von ET<sub>A</sub>-Rezeptoren auf der Zelloberfläche gelingt.



**Abb. 4.17: Competition Binding Experiments. Kompetitionsbindungsversuche mit BQ788 nach Stimulation mit PAF, Thrombin und TPA: relative Änderung der Rezeptordichte B<sub>max</sub> im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.**

Bei 20 ng/ml TPA-behandelten Zellen ist eine Tendenz zur Abnahme von  $ET_B$ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu erkennen, die jedoch nicht signifikant im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ist ( $p=0,07$ ,  $N=3$ , Abb. 4.17). Thrombin 2U/l ( $N=4$ ) und PAF 1 $\mu$ M ( $N=4$ ) haben keinen Einfluss auf den Nachweis von  $ET_B$ -Rezeptoren auf Astrozyten.

#### 4.4 Generierung von *Northern-blot*-Sonden

Die bereits etablierte ET-1-Northern-Blot Sonde mit einer gewünschten Kreuzreaktivität für das humane und bovine ET-1 sollte aufgrund seiner Homologie auch für die Ratte geeignet sein. Da trotz Optimierung der Versuchsbedingungen hinsichtlich spezifischer *Labeling*-Effizienz, *Annealing*-Temperaturen, verwendeter Hybridisierungspuffer, Filmexpositionszeit und Menge der aufgetragenen mRNA keine erfolgreiche Hybridisierung gelang (Daten nicht gezeigt), war die Synthese einer neuen, rattenspezifischen ET-1-Sonde erforderlich. Rattenspezifische Sonden für  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptoren und für ET-3 wurden ebenfalls neu etabliert. Abb. 4.18 zeigt den Erfolg dieser Bemühungen und den Nachweis von  $ET_A$ -Rezeptoren, von  $ET_B$ -Rezeptoren, von ET-1 und ET-2. Die entsprechenden Primerpaare wurden gleichzeitig zum Nachweis dieser Gene auf mRNA-Ebene verwendet. Die Länge der Sonden sind Tab. 3.7 zu entnehmen. Es gelang nicht, ECE-Isoform- oder ECE-Subtypen-spezifische Sonden zu etablieren, so dass durch die verwendete Sonde  $ECE_{gesamt}$  keine Isoform- oder Subtypen des Enzyms im Rahmen der *Northern blot*-Analysen unterschieden werden konnten (Daten nicht gezeigt).

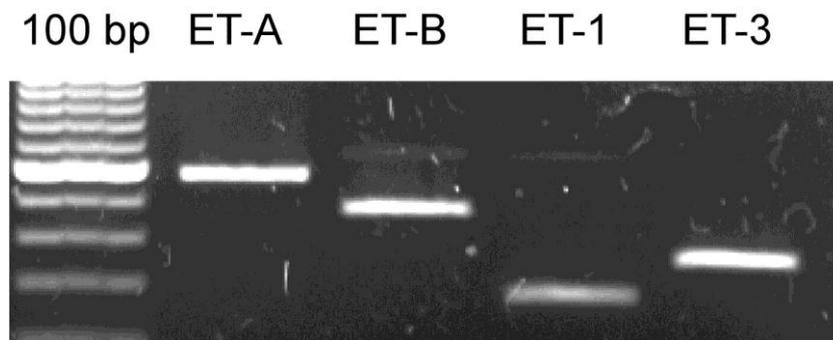
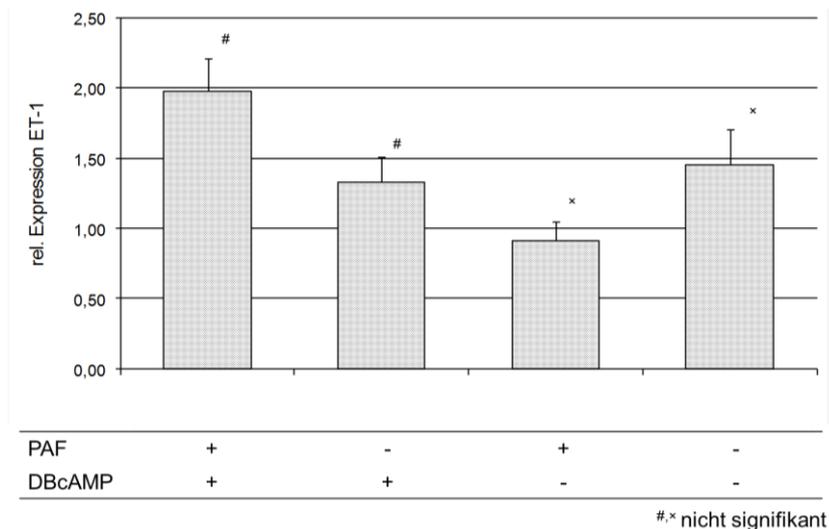


Abb. 4.18: Die Abbildung zeigt die linearisierten *Northern blot*-Sonden von  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptor ET-1 und ET-3 nach einem Restriktionsenzymverdau mit  $ECO-R1$ .

## 4.5 Ergebnisse der Northern blots

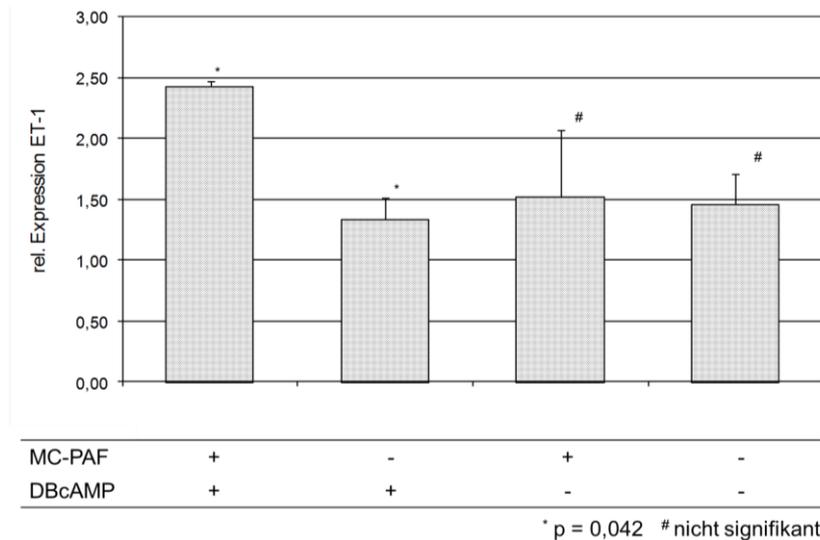
### 4.5.1 Northern blot. Expression von ET-1

Um zu überprüfen, ob PAF und MC-PAF auf transkriptioneller Ebene Komponenten des ET-Systems beeinflusst, wurde die Astrozytenprimärkultur mit diesen Substanzen und einer Inkubationszeit von je 4 Stunden stimuliert. In Abb. 4.19 und Abb. 4.20 ist die photodensitometrisch ermittelte relative Expression von ET-1 dargestellt. Sowohl PAF als auch MC-PAF haben bei DBcAMP-vorbehandelten Astrozyten eine erhöhte Expression des ET-1-Gens zur Folge, die bei MC-PAF mit  $p=0,042$  statistisch signifikant und bei chemisch instabilem PAF grenzwertig ist. Bei DBcAMP-unbehandelten Zellen bewirken PAF und MC-PAF keine signifikante Expression von ET-1. Da davon auszugehen ist, dass PAF und MC-PAF über denselben Mechanismus auf die Zellen einwirken, kann man auch beide Substanzen gemeinsam betrachten und auswerten. Dadurch ergibt sich eine statistische signifikante Erhöhung der ET-1-Expression mit  $p=0,024$  in Astrozyten nach Stimulation mit PAF oder MC-PAF ( $N=6$ , Diagramm nicht gezeigt). Im Vergleich zu Astrozyten, die für eine Stunde mit MC-PAF vorbehandelt wurden, ergibt sich eine erhöhte Expression von ET-1 ( $p<0,05$ ), die durch die Gabe von Actinomycin D tendenziell, aber nicht signifikant blockiert werden kann ( $p=0,095$ ).



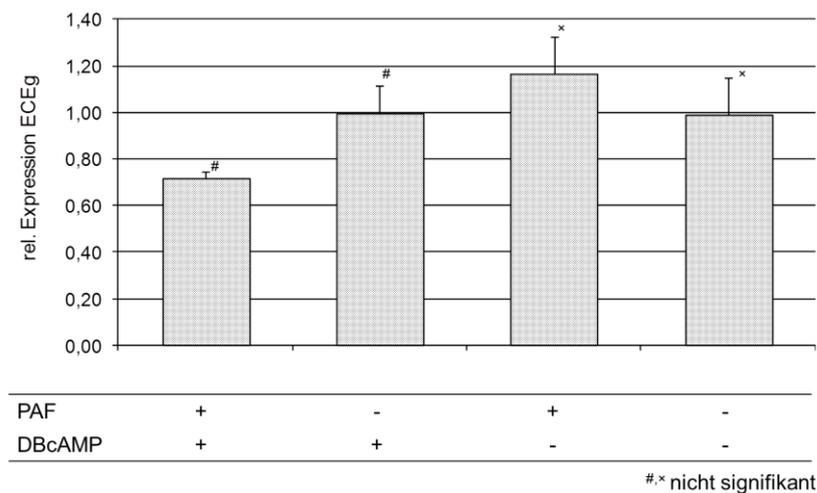
**Abb. 4.19: Northern blot:** Dargestellt ist die relative Expression von ET-1 in Astrozyten nach Stimulation mit PAF,  $N=3$ .  $p>0,05$ ; n.s., nicht signifikant.

## Ergebnisse



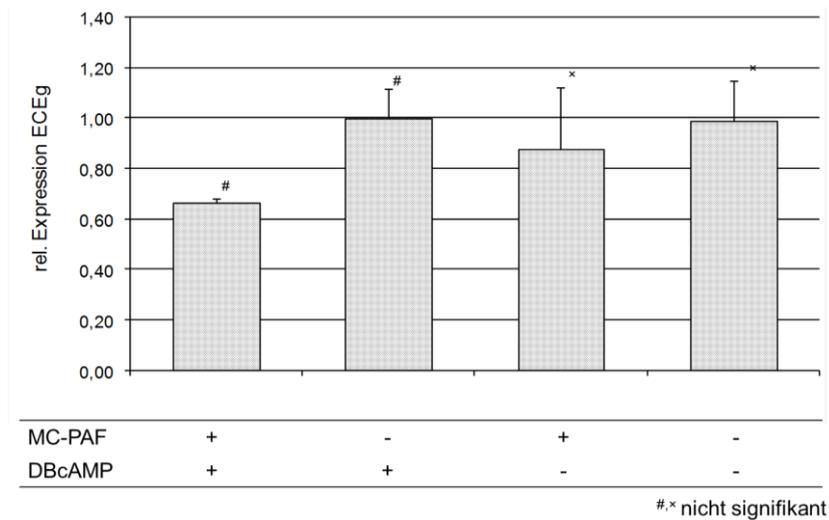
**Abb. 4.20: Northern blot:** Dargestellt ist die relative Expression von ET-1 in Astrozyten nach Stimulation mit MC-PAF, N=3, p=0,042; n.s., nicht signifikant.

### 4.5.2 Northern blot. Expression von $ECE_{gesamt}$



**Abb. 4.21: Northern blot:** Dargestellt ist die relative Expression von  $ECE_{gesamt}$  in Astrozyten nach Stimulation mit PAF, N=3.

Durch die Stimulation mit PAF oder MC-PAF wird die Expression von  $ECE_{gesamt}$  in Astrozyten nicht herabgesetzt. Sowohl PAF als auch MC-PAF bewirken zwar eine tendenzielle Abnahme der Expression im Vgl. zur DBcAMP-behandelten Kontrollzellen (Abb. 4.21 und Abb. 4.22); die Abnahme ist allerdings nicht signifikant ( $p=0,123$  bzw.  $p=0,177$ ). Betrachtet man die Änderung der ECE-Expression durch PAF und MC-PAF zusammen (N=6), verstärkt sich dieser Trend, ist aber nicht signifikant ( $p=0,104$ ). PAF bzw. MC-PAF haben keinen Einfluss auf die Expression von  $ECE_{gesamt}$  in DBcAMP-unbehandelten Astrozyten.



**Abb. 4.22: Northern blot:** Dargestellt ist die relative Expression von  $ECE_{gesamt}$  in Astrozyten nach Stimulation mit MC-PAF, N=3.

#### 4.5.3 Northern blot: $ET_B$ -Rezeptor

Obwohl sich  $ET_B$ -Rezeptoren in den Bindungsstudien funktionell nachweisen ließen (Abb. 4.16) konnte die mRNA der  $ET_B$ -Rezeptoren nicht eindeutig in Hybridisierungen mit der beschriebenen  $ET_B$ -Rezeptorsonde nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise sind geringe Mengen von mRNA der  $ET_B$ -Rezeptoren mit dieser Methode schlecht nachweisbar. Konkordant sprechen die Ergebnisse in Abb. 4.12 für eine geringe Expression von mRNA des  $ET_B$ -Rezeptors bei relativ hoher Rezeptorexpression in den Zellen.

## 5. Diskussion

In dieser Arbeit sollten die Komponenten des ET-System und die Interaktion des ET-Systems mit PAF in einem Astrozytenzellkulturmodell der Ratte untersucht werden. Das Zellkulturmodell wurde etabliert, um neue Einblicke in Wechselwirkungen der genetische Kontrolle des ET/PAF-Systems in Astrozyten gewinnen zu können, die möglicherweise eine Rolle beim Vasospasmus nach SAB und anderen pathophysiologischen Vorgängen im Gehirn spielen könnten.

In dieser Arbeit gelang es, ein Zellkulturmodell aus Astrozyten von neugeborenen Ratten zu entwickeln. Dieses Modell wurde einer Zelllinie immortalisierter Astrozyten gegenüber gestellt. Es wurde eine Charakterisierung des ET-Systems vorgenommen, um die Eignung beider Zellsysteme für die Untersuchung des ET-Systems abzuschätzen.

Astrozyten scheinen wesentlich am Abbau von ET-1 (*Clearance*) aus dem zerebrospinalen Liquorraum beteiligt zu sein (D'Orléans-Juste, Labonté et al. 2002). Veränderungen in der Rezeptorexpression können damit erheblichen Einfluss auf die Stärke des zerebrovasculären Vasospasmus und das Ausmaß der Hirnschädigung nehmen. Aus diesem Grund wurden Veränderungen der Rezeptordichte und der Rezeptorexpression an PAF-stimulierten Astrozyten untersucht. Endothelin vermittelt seine Wirkung über zwei Rezeptoren, die durch unterschiedliche Gene kodiert sind. Neben dem für die Vasokonstriktion bei SAB vermittelnden ET<sub>A</sub>-Rezeptor (auf glatten Gefäßmuskelzellen) unterscheidet man bei den ET<sub>B</sub>-Rezeptoren zwei Subtypen. Damit ET-1 seine vasokonstriktorische Wirkung über ET<sub>A</sub>-Rezeptoren entfalten kann, muss es durch das ECE aus BigET-1 abgespalten werden. Reaktive Astrozyten besitzen ein anderes Expressionsmuster im Vergleich zur undifferenzierten oder ruhenden Astrozytenzelle (Eddleston and Mucke 1993). Die Regulation wird möglicherweise auch durch vasoaktive Faktoren aus dem Blut, wie PAF, und Signale über die Blut-Hirnschranke beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass primär kultivierte Astrozyten von neugeborenen Ratten die wesentlichen Komponenten des ET-Systems und PAF-Rezeptoren exprimieren. Die Komponenten des ET-Systems umfassen: ET-1, ET-3, ECE und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren. Die Untersuchungen zeigen, dass ET<sub>A</sub>-Rezeptoren nicht oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden. Damit wurde ein Zellsystem etabliert, in dem sich Interaktionen von PAF- und ET-1-, ET-3-, ECE- und ET<sub>B</sub>-Rezeptor-vermittelten Signalwe-

gen auf zellulärer und genetischer Ebene in Astrozyten untersuchen lassen. Die Stimulation der Zellen mit PAF führte zur Erhöhung der mRNA Expression von ET-1. Dieser „*proof-of-concept*“-Versuch beweist, dass das Zellsystem geeignet ist, um astrozytäre Interaktionen zwischen PAF- und ET-Signalwegen auf zellulärer und genetischer Ebene abzuklären.

## 5.1 Differenzierung von astrozytären Primärkulturen

Zu Beginn sollte ein einfaches und reproduzierbares Astrozyten-Zellkulturmodell von neugeborenen Sprague-Dawley Ratten an Stelle der von anderen Autoren verwendeten Zellkulturen von adulten Astrozyten und anderen Spezies (Speth, Stockl et al. 2001; Didier, Romero et al. 2003) etabliert werden. Experimentelle Untersuchungen von molekularbiologischen Veränderungen in einer definierten Zellpopulation wie Astrozyten werden durch die Tatsache erschwert, dass die Zellen *in vivo* in einem interagierenden Verband verschiedenster Zelltypen im Gehirn eingebunden sind. Veränderungen in der Morphologie und in ihrem Verhalten auf einen exogenen Stimulus und klare Aussagen über Ursache und Wirkung bzw. Effekte sind so nicht ohne weiteres der einzelnen Zellpopulation zuzuordnen. Die Wirkung eines endo- oder exogenen Botenstoffs oder Ereignisses wie Hypoxie oder einer Blutung kann sich direkt oder indirekt auf die Zellen übertragen. Bei einer direkten Wirkungsvermittlung entsteht der Effekt unabhängig vom organspezifischen Umfeld. Bei einer indirekten Wirkung führen Veränderungen des organspezifischen Umfelds oder auch des gesamten Organismus erst sekundär zu einer zellulären Antwort. Obwohl es mittlerweile etablierte Methoden und Verfahren gibt, eine zellspezifische und zielgerichtete Applikation eines Stimulans durchzuführen, sind sie doch mit einem hohen Aufwand verbunden. Zellkulturmodelle bieten hier den Vorteil, eine gewünschte Zellart losgelöst aus ihrem geweblichen und humoralen Kontext zu untersuchen. Dies ist jedoch gleichzeitig ein Nachteil im Hinblick auf morphologische und molekularbiologische Differenzierung der *in vitro* kultivierten Zellen im Vergleich zum *in vivo*-gewachsenen Zelltyp. Durch das Fehlen humoraler und zellulärer Signale können sich die Zellen nicht im selben Maße differenzieren, wie es *in vivo* möglich ist, wie es z.B. Mearow et al. für Astrozyten zeigen konnten (Mearow, Mill et al. 1990).

Im vorliegenden Vorhaben wurde das Modell der primär kultivierten Astrozyten von neugeborenen Ratten etabliert und im Vergleich mit der Zelllinie DI TNC1 untersucht. Die

Untersuchung der Zelllinie DI TNC1 zeigte, dass die Zellen bzgl. der Expression der Endothelin-Rezeptoren nicht als Modell oder Ersatz für die Primärkultur in Betracht kommen, obwohl in den Zellen eine für Astrozyten typische hoch-affine, durch  $\beta$ -Alanin hemmbare [ $^3\text{H}$ ]-GABA-Aufnahme existiert und die Produktion von Markerproteinen Transferrin und  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Radany, Brenner et al. 1992) nachweisbar ist, sowie die Fähigkeit, genau wie primäre Astrozyten das Neuritenwachstum durch Produktion Neuriten-induzierender Botenstoffe (Rahemtulla, Deschepper et al. 1994) zu fördern.

Wie bereits von Shapiro (Shapiro 1973) und Lim (Lim, Mitsunobu et al. 1973) gezeigt werden konnte, bewirkt die Zugabe von DBcAMP zum Zellkulturmedium sowohl eine Differenzierung der Astrozyten in der Morphologie mit Ausbildung von Zellfortsätzen als auch im Vergleich zu nicht DBcAMP-stimulierten Zellen erhöhte Expression von GFAP und Glutamin-Synthetase (Zielke, Tildon et al. 1990; Le Prince, Fages et al. 1991), die als astrozytäre Differenzierungsmarker gelten (Tardy, Fages et al. 1990; Prada, Quesada et al. 1998) (Übersicht in (Eddleston and Mucke 1993)). Auch das ET-System wird durch den Zusatz von DBcAMP beeinflusst, so dass Astrozyten eine bis sechszehnfach höhere Rezeptordichte ( $B_{max}$ ) aufweisen als unbehandelte (Hama, Sakurai et al. 1992). Brodie et al. (Brodie 1994) zeigten, dass auch die Expression des PAF-Rezeptors in DBcAMP-behandelten Astrozyten höher ist im Vergleich zu unbehandelten. Man geht deshalb davon aus, dass der Zusatz von DBcAMP im Zellkulturmedium Astrozyten in einen differenzierteren Zustand versetzt, der, den bekannten und etablierten morphologischen und molekularbiologischen Differenzierungsmarkern folgend, näher dem *in-vivo*-Zustand entspricht (Schwartz and Mishler 1990; Schmidt-Ott 2002). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden, die für das hier etablierte Zellmodell gezeigt werden. Insbesondere zeigen die Ergebnisse der Autoradiographie, dass das Expressionsmuster der ET-Rezeptoren auf der Zelllinie (Abb. 4.5 und 4.6) nicht dem Expressionsmuster einer Primärkultur entspricht (Ehrenreich, Kehrl et al. 1991; Hama, Sakurai et al. 1992).

Eine potenzielle Einschränkung ist, dass es sich bei der verwendeten Astrozyten-Primärkultur um eine heterogenere Zellpopulation aus verschiedenen glialen Zellgruppen handeln könnte, als dies aus den Immunfluoreszenzfärbungen abzuleiten ist (Vgl. (Hallermayer and Hamprecht 1984) und (Mearow, Mill et al. 1989)). In der vorliegenden Arbeit konnten lichtmikroskopisch keine morphologischen Veränderungen der Zelllinie im Sinne einer Clasmotodendrosis wie bei DBcAMP-behandelten Primärkulturen beobachtet werden. Somit schien das etablierte Primärkulturmodell für weitere

Untersuchungen geeignet zu sein. Da bereits nicht DBcAMP-behandelte Astrozyten bzgl. des Endothelin-Systems ein anderes Expressionsmuster aufweisen als die verwendete Zelllinie, erschien es nicht notwendig im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, inwieweit durch den Zusatz von DBcAMP zur Zelllinie Veränderungen der Expression des Endothelin-Systems zu beobachten sind.

Der Aufbau von Astrozytenprimärkulturen ist schwierig aufgrund möglicher Kontaminationen. Bei der Etablierung der Zellkultur nach der modifizierten Methode von McCarthy und deVillis (McCarthy and de Vellis 1980) und Franke (Franke, Figiel et al. 1998) kam es unter den verfügbaren Laborbedingungen wiederholt zu Kontamination der Zellkulturflaschen mit Pilzen. Die Präparation selbst erfolgte unter reinen, jedoch nicht sterilen Bedingungen bis zum ersten Schritt der enzymatischen Behandlung mit Trypsin. Erst durch die im Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Maßnahmen konnte die Häufigkeit der Kontaminationen massiv gesenkt werden. Für die Ausbeute an Zellen und damit die Effizienz der Präparation war es wichtig, neugeborene Tiere zu präparieren, die nicht älter als 12 Stunden waren. Entgegen der anfänglichen Praxis, auch zwei bis drei Tage alte Tiere zu verwenden, deren Meningen sich während der Präparation schwerer ablösen ließen, gediehen die Astrozyten der maximal 12 Stunden alten Tiere mit einer höheren Zellteilungsrate. Ebenso war die Anzahl der die Präparation überlebenden Zellen höher, wodurch vermutlich eine „kritische Zelldichte“ gewährleistet wurde, die das Wachstum der Zellen begünstigte (Abb. 4.3). Astrozyten bilden eine Reihe von wachstumsfördernden Cytokinen, die nicht nur für das Wachstum von Neuronen wichtig sind, sondern wahrscheinlich auch autokrine Wirkungen entfalten. Für eine ausreichende Zelldichte in einer frisch präparierten Zellkulturflasche ist eine Zellsuspension von zwei, besser jedoch drei Gehirnen neugeborener Ratten erforderlich. Der damit verbundene Aufwand im Rahmen einer Präparation für die in dieser Arbeit notwendige Anzahl an Zellkulturflaschen, die für die Stimulationsexperimente benötigt wurden, ist arbeits- und zeitintensiv.

## **5.2 Expression des ET-Systems in der etablierten astrozytären Primärkultur**

Auf transkriptioneller Ebene lässt sich durch RT-PCR die Expression von ET-1, ET-3, ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptor sowie verschiedene ECE-1-Isoformen in der Astrozytenprimär-

kultur nachweisen (Vgl. Abschnitt 4.2.2). Wie u.a. A. Xu (Xu 1998) in Astrozyten der Maus zeigen konnte, werden auch in Astrozyten der Ratte die Bestandteile des ET-Systems exprimiert. Wie bereits mehrfach beschrieben (Ehrenreich, Kehrl et al. 1991; Hori, Komatsu et al. 1992; Rogers, Peters et al. 2003) ist der ET<sub>B</sub>-Rezeptor der vorherrschende Rezeptortyp in Astrozyten. Der Nachweis von ET<sub>A</sub>-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Proteinebene) mittels Autoradiographie und *competition binding studies* unter den hier etablierten Zellkulturbedingungen von primären Rattenastrozyten und dem verwendeten Protokoll für die Bindungsstudien gelang nicht. Somit sind offensichtlich nur ET<sub>B</sub>-Rezeptoren als funktionell aktive ET-Rezeptoren vorhanden. Eine methodische Alternative wäre der qualitative Nachweis des Rezeptorproteins mittels *Western blot*, die jedoch keine Auskunft über die tatsächlich vorhandenen Bindungsstellen ergeben hätte. Somit ist das hier etablierte und charakterisierte Zellsystem geeignet, dass astrozytäre ET-System in seiner Gesamtheit mit ET<sub>B</sub>-Rezeptoren als vorherrschendem Rezeptortyp gut abzubilden.

Diese Arbeit zeigt klar, dass der ET<sub>B</sub>-Rezeptor für die gezeigten Bindungsstellen auf Astrozyten verantwortlich ist. Gleichzeitig wird jedoch auch der ET<sub>A</sub>-Rezeptor exprimiert (Abb. 4.11). Welche Rolle diese Expression spielt und welche Funktion dem ET<sub>A</sub>-Rezeptor zukommt, konnte zumindest teilweise durch Untersuchungen an Astrozyten erschlossen werden. So z.B. schützt die Gabe eines ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten Astrozyten vor der Folgen von Hypoxie (Danielyan, Gembizki et al. 2005) und kann die ET-1 vermittelte, reduzierte Glutamataufnahmekapazität teilweise rückgängig machen (Leonova, Thorlin et al. 2001). Des Weiteren lassen sich ET<sub>A</sub>-Rezeptoren durch immunhistochemische Methoden in Astrozytomen WHO II nachweisen (Naidoo, Naidoo et al. 2005). Bei der ET-1-abhängigen Inhibition der Permeabilität von astrozytären *gap junctions* führt erst die Koadministration von ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten zu einer vollständigen Blockade des ET-1 induzierten Effekts und des Anstiegs der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Blomstrand, Giaume et al. 1999).

Vergleicht man den in den *Saturation binding* Experimenten ermittelten  $K_d$ -Wert von  $1,19 \pm 0,15$  nM mit den in der Literatur veröffentlichten Werten auf Astrozyten ( $K_d = 39$  pM (Ehrenreich, Kehrl et al. 1991),  $K_d = 161,9$  fM (Hama, Sakurai et al. 1992) und  $K_d = 100$  pM (MacCumber, Ross et al. 1990)], C6 Gliomzellen ( $K_d = 2$  nM (MacCumber, Ross et al. 1990), humanen VSMC ( $K_d = 126$  pM (Clozel, Fischli et al. 1989)), so zeigt sich eine relativ große Variabilität zwischen den Befunden, die messtech-

nisch bedingt sein kann. Die möglichen Ursachen der geringeren Affinität für ET-1 in der hier verwendeten Zellkultur sind weiter oben bereits diskutiert worden. Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass in den eigenen Untersuchungen Lebendzellpräparation (siehe Abschnitt 3.4) im Gegensatz zu Zell- oder Gewebekomponenten verwendet wurden.

Trotz dieser Unterschiede bestätigen die Kompetitionsbindungsexperimente die Abwesenheit von  $ET_A$ -Rezeptor-typischen Bindungsstellen (Abb. 4.16). Im Gegensatz zu FR139317 verdrängt BQ788 mit einer ermittelten Inhibitionskonstante  $K_i = 117 \pm 33$  nM ET-1 von den Bindungsstellen. Die Kompetitionskurve von BQ788 (Abb. 4.16, rote Kurve) könnte eine weitere Bindungsstelle mit einer hohen Affinität nahelegen, doch der ermittelte Hill-Koeffizient spricht für eine einzelne Bindungsstelle (oder auch mehrere mit der gleichen Affinität zum Liganden).

Eine Schwierigkeit in der Untersuchung der ET-Rezeptoren stellt eine mögliche Homo- oder Heterodimerisierung der ET-Rezeptoren dar (Evans and Walker 2007), wie sie bereits bei Effekten von ET-1 auf den renalen Wasser- und Natrium-Transport beschrieben wurde (Kohan 2006). Welche Bedeutung eine Behandlung mit ET-Rezeptorantagonisten an Homo- oder Heterodimeren hat, bleibt offen, da für Astrozyten eine solche Dimerisierung der ET-Rezeptoren bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

### 5.3 Regulation des Endothelin-Systems durch PAF

Das entwickelte Zellsystem ist geeignet, um Interaktionen zwischen PAF- und ET-Signalwegen auf genetischer Ebene abzuklären. Die hier beschriebenen Ergebnisse der *Northern blot*-Experimente zeigen, dass PAF und MC-PAF die Expression von ET-1 in Astrozyten erhöhen. Die eigenen Ergebnisse sind vereinigt mit Daten aus der Literatur schematisch in Abb. 5.1 dargestellt. Das Schema zeigt, dass PAF/MC-PAF auf das astrozytäre ET-System wirkt. PAF erhöht dabei die Expression von ET-1 und ist ein potentieller Regulator für die Expression von ECE-1. Es ist möglich, dass Promoterregionen wie Gata, CaRE und AP-1 beteiligt sind; der direkte Nachweis wurde hier nicht geführt. Eine Schlüsselfunktion bei der Wirkung von PAF spielt Proteinkinase C. Dementsprechend führt Stimulation von Proteinkinase C (z.B. mit Phorbol ester) in Astrozyten zu verringerter Anzahl an  $ET_B$ -Rezeptoren. Die Expression des  $ET_B$ -Rezeptors ist durch den Nachweis mittels PCR und auf Protein-Ebene mittels Bindungsstudien hinreichend



Ob PAF und MC-PAF die erhöhte ET-1-Expression auf transkriptioneller oder posttranslationaler Ebene regulieren oder modulieren, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht (Vgl. Abschnitt 4.5.1). Die Ergebnisse mit Actinomycin D zeigen, dass diese Substanz die vermehrte ET-1-Expression nicht unterbinden konnte. Somit wird die ET-1-Expression nicht transkriptionell, sondern vermutlich auf posttranslationaler Ebene reguliert. In diesem Zusammenhang konnten Calcerrada et al. (Calcerrada, Perez-Alvarez et al. 1999) demonstrieren, dass PAF über seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptor die Expression von Proteinkinase C (insbesondere PKC  $\epsilon$  und  $\gamma$ ) an der Zellmembran erhöht. Da Phorbolester über PKC die Expression von ET-1 stimulieren, wäre diese Signalkaskade ein denkbarer Mechanismus für die Stimulation von ET-1 durch PAF. Zukünftige Stimulationsexperimente könnten diese Daten bestätigen und durch Gabe von selektiven Signaltransduktionsblockern den detaillierten Signalweg eruieren. In einem weiteren Ansatz wäre zu klären, ob die erhöhte Expression auch mit einer vermehrten Freisetzung des ET-1 einhergeht. Die Messung von ET-1 im Zellüberstand der stimulierten Zellen könnte mittels ELISA erfolgen; diese Studien sind allerdings nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und sollten in zukünftigen Untersuchungen abgeklärt werden.

Es wurde untersucht, ob die ECE-Expression durch PAF beeinflusst wird. Sowohl die Stimulation mit PAF als auch MC-PAF zeigen eine Tendenz zu einer Abnahme der Expression. Allerdings war die Anzahl der Versuche und damit verbunden die statistische Schärfe (*Power*) gering ( $p > 0,05$ ). Zusätzliche Experimente könnten bzgl. der Expression von ECE<sub>gesamt</sub> diese Ergebnisse im Sinne einer signifikanten Abnahme verifizieren. Durch die Herstellung Isoform-spezifischer Sonden wäre außerdem eine Differenzierung möglich, ob der beobachtete Effekt ECE-1<sub>*a-d*</sub> oder ECE-2 betrifft. Untersuchungen über die Enzymaktivität des membranständigen und des zytosolischen Kompartiments erlauben eine Aussage, ob der Rückgang in der Expression auch funktionelle Konsequenzen zur Folge hat. So wäre vorstellbar, dass die ECE-Expression im Sinne einer Protektion supprimiert wird, um die Konversion von bigET-1 in ET-1 zu reduzieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PAF unter Hypoxie *nerve growth factor* stimuliert, über dessen Wirkung das Überleben der Neurone verlängert wird (Yoshida, Imaizumi et al. 2005). Das hier entwickelte Zellsystem scheint somit als neues Zellmodell geeignet zu sein, zukünftige mechanistische Untersuchungen zur Regulation der ECE-Expression durch PAF durchführen zu können. Auch ECE selbst kommt als Ziel pharmakologischer Interventionen in Betracht (Lin, Winardi et al. 2006). Zusätzliche interessante Möglichkeiten

zur Charakterisierung des Zusammenspiels zwischen ET-System und PAF würden auch transgene Mausstämme bieten, die den PAF-Rezeptor gar nicht oder überexprimieren (Ishii, Nagase et al. 2002). *In vitro* Untersuchungen ermöglichen die Messung der PAF-Produktion, die Expression des PAF-Rezeptors, Reaktionen einer PAF-Stimulation, Effekte von PAF-Antagonisten und die Nachahmung pathophysiologischer Bedingungen durch die Applikation von PAF. Durch die Etablierung von transgenen Mäusen, die den PAF-Rezeptor überexprimieren und den PAF-Rezeptor *knock-out*-Stamm, lassen sich mögliche Interaktionen *in-vivo* im physiologischen und pathophysiologischen Gesamtkontext in einem Modell für SAB untersuchen. Als weiteres interessantes Tiermodell ist auch ein dualer *knock-out* Rattenstamm, in dem z.B. *sl/sl*-Ratten mit ihrem „natürlichen  $ET_B$ -*knock-out*“ und mit einem PAF-Rezeptor-*knock-out* oder einer transgenen PAF-Rezeptor-Überexpression versehen werden. Neben den Auswirkungen einer dualen Hemmung mit ET- und PAF-Rezeptorantagonisten auf den Vasospasmus und Neuroprotektion ließe sich dabei auch die Rolle der  $ET_B$ -PAF-Interaktion eingehend prüfen. Ob diese Tiere lebensfähig oder als Tiermodell geeignet sind, bleibt zu prüfen. Die Regulation von ECE durch PAF könnte klinisch bedeutsam bei Entzündungsprozessen, bei Morbus Alzheimer (Eckman, Reed et al. 2001; Eckman, Watson et al. 2003; Funalot, Ouimet et al. 2004) und bei Glioblastomerkkrankungen (Egidy, Eberl et al. 2000; Fisk, Nalivaeva et al. 2006) sein, da ECE eine Rolle bei diesen Zuständen und Erkrankungen spielt.

Bei der Regulation des ET-Systems durch PAF spielt Proteinkinase C eine wichtige Rolle. Resink et al. (Resink, Scott-Burden et al. 1990) zeigten, dass die Behandlung mit dem Phorbolster TPA bei humanen VSMC zu einem schnellen und langanhaltenden Abfall von ET-Bindungsstellen führt. Der hier beschriebene Rückgang der ET-Bindungsstellen zeigt, dass auch auf Astrozyten ein Teil der Rezeptoren über eine Proteinkinase C-abhängigen Mechanismus reguliert sein könnte (Abb. 4.17). Weder Thrombin noch PAF zeigen hier eine Tendenz oder nehmen Einfluss auf die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche von Astrozyten. Eine Schwierigkeit, mögliche Unterschiede in der Rezeptordichte zu detektieren, könnte die Verwendung der Ganzzellpräparation in *96well*-Platten sein. Hinsichtlich der Rolle des  $ET_A$ -Rezeptors besteht Unklarheit, da zum einen zwar der mRNA-Nachweis gelingt, jedoch nicht auf Rezeptorbindungsebene. Demgegenüber stehen Untersuchungen, in denen die Gabe von  $ET_A$ -Rezeptorantagonisten z.B. die Erhöhung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration,  $IP_3$  und die PKC-Aktivität blockiert werden kann (Stanimirovic, Ball et al. 1995). In klinischen Untersuchungen

konnte durch die Gabe des selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten Clazosentan durch die Bindung auf zerebralen Gefäßmuskelzellen eine substantielle Abnahme des Vasospasmus erzielt werden (Macdonald, Kassell et al. 2008), was jedoch keinen Einfluss auf Morbidität und Mortalität der Patienten zur Folge hatte.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PAF einzelne Komponenten des Endothelin-Systems (ET-1, ET<sub>B</sub>, ECE) auf verschiedene Weise beeinflusst. So wird die ET-1-Expression durch PAF stimuliert, während PAF hingegen nur tendenziell die ET<sub>B</sub>- und ECE-Expression im untersuchten astrozytären Modellsystem herunterreguliert. Der vasoaktive Faktor PAF ist somit ein wichtiger Kandidat für die Signaltransduktion einzelner Komponenten des ET-Systems in Astrozyten. Diese Interaktion von PAF mit dem ET-System ist bisher nicht in Astrozyten beschrieben worden und könnte im Hinblick die Rolle von Endothelin und PAF bei Entzündungsprozessen, bei Ischämie und beim Vasospasmus nach SAB neue Therapieoptionen eröffnen. So gibt es bisher keine Studien, die eine Ko-Blockade des ET-Systems durch ET-Rezeptorantagonisten und des PAF-Rezeptors durch PAF-Rezeptorantagonisten, genauer untersuchen.

#### **5.4 Ausblick und klinische Relevanz**

Neuere klinische Befunde sprechen dafür, dass der Einsatz von PAF- und/oder Endothelinrezeptorantagonisten ein neuer erfolgsversprechender Ansatz zur Therapie vom Vasospasmus nach SAB sein könnte. Der nicht-selektive ET-Antagonist Bosentan kann das Ausmaß des Vasospasmus um bis zu 70% vermindern (Nogueira, Bodock et al. 2007). Clazosentan ist der erste, ET<sub>A</sub>-selektive, nicht peptidische Antagonist, der in klinischen Studien (NCT00111085, Phase IIa; NCT00558311, Phase III ) auf seine Wirksamkeit zur Verhinderung eines Vasospasmus und auf die Verbesserung der Morbidität und Mortalität nach SAB untersucht wurde (Vajkoczy, Meyer et al. 2005; Macdonald, Kassell et al. 2008). Eine Reihe weiterer Kandidatensubstanzen werden auf ihre Sicherheit und Wirkung in präklinischen und klinischen Untersuchungen geprüft (Remuzzi, Perico et al. 2002). Eine andere Substanz, die in klinischen Versuchen auf ihr Potential zur Verhinderung des Vasospasmus getestet wurde, ist der Platelet-Activating Factor Rezeptor Antagonist E5880 (Hirashima, Endo et al. 1996; Hirashima, Endo et al. 2001). Der neuere Platelet-Activating Factor Rezeptorantagonist LAU-0901, der in tierexperimentellen Untersuchungen an Ratten in einem Modell für Ischämie-Reperfusion neuroprotektiv

wirkt, verbessert den zerebralen Blutfluss (Belayev, Khoutorova et al. 2008) und hat eine deutliche Verbesserung des Infarktareals und der zerebralen Hirnschädigung zur Folge. Dies kann als Hinweis für eine Funktion von PAF bei der zerebralen Blutflussregulation gewertet werden. Unklar ist jedoch, wie diese Wirkung vermittelt wird.

Bei einer Blutung werden zahlreiche Botenstoffe freigesetzt und viele unterschiedliche Signalwege aktiviert. Thrombin und PAF sind zwei Botenstoffe, die an der Gerinnungskaskade, im Rahmen von Entzündungsprozessen und anderen pathophysiologischen Ereignissen beteiligt sind und bei einer Subarachnoidalblutung freigesetzt werden. Erhöhte Mengen PAF lassen sich z.B. bei zerebraler Ischämie und Reperfusion nachweisen (Braquet, Paubert-Braquet et al. 1989; Umemura, Yamada et al. 1997; Belayev, Khoutorova et al. 2008). Die Aktivierung des Platelet-Activating Factor Rezeptors durch PAF bewirkt eine erhöhte Expression von *immediate early genes* wie AP-1 (*c-fos/c-jun*) (Squinto, Block et al. 1989; Albani, Condorelli et al. 1993). Paul et al. (Paul, Zintz et al. 1995) konnten zeigen, dass der Endothelin-Promoter unter anderen eine Konsensussequenz für AP-1 besitzt. Astrozyten exprimieren funktionelle Platelet-Activating Factor Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche (Brodie 1994). Ob PAF Rezeptor-vermittelt über AP-1 in Astrozyten eine ET-1-Freisetzung bewirkt, kann Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Aus Abbildung 5.1 folgt, dass eine PAF-Rezeptoraktivierung zu einer verstärkten Expression von ET-1 und Herunterregulation der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren in Astrozyten führt. Es kann daher spekuliert werden, dass eine Therapie mit einem PAF-Antagonisten zu einer verminderten astrozytären Bildung und Sekretion von ET-1 und höheren Expression oder Stabilität von ET<sub>B</sub>-Rezeptoren in Astrozyten führen könnte. Somit müsste man in zukünftige Betrachtungen einbeziehen, dass eine Therapie der zerebralen Ischämie, des Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung und von Entzündungsvorgängen im Gehirn mit PAF-Antagonisten durch eine verminderte Produktion von astrozytärem ET-1 profitiert, gleichzeitig die protektive Wirkung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors erhalten bleibt. Eine selektive Hemmung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors kann wirkungsvoll die Kontraktion der zerebralen Arterien verhindern (siehe oben). Möglicherweise ergibt sich hieraus der sinnvolle Ansatz einer Kombinationstherapie von PAF-Antagonisten mit ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten bei zerebraler Ischämie, Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung und Entzündungsvorgängen im Gehirn. Diese Folgerungen und Spekulationen sollten in zukünftigen Studien geprüft werden.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit das Modell der Primärkultur von Astrozyten von neugeborenen Ratten etabliert, um Einblicke in die genetische und zelluläre Regulation von PAF- und ET-Systemen direkt in Astrozyten und unabhängig von Einflüssen über die Blut-Hirn-Schranke gewinnen zu können. Es wurde der Einfluss von DBcAMP und der vasoaktiven Faktoren PAF und Thrombin auf die Regulation von Komponenten des ET-System vor dem Hintergrund ihrer pathophysiologischen Bedeutung bei Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung genauer betrachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass PAF und ET-Systeme auf genetischer und zellulärer Ebene in Astrozyten reguliert werden und interagieren. Das Modell eignet sich, um PAF und andere vasoaktive Faktoren auf die ET-Expression auf transkriptioneller oder posttranslationaler Ebene zu untersuchen. Das Zellmodell hat möglicherweise Implikationen für das Verständnis von neuen therapeutischen Ansätzen zur Therapie von Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung, wie z.B. mit einer dualen Therapie bestehend aus Endothelinrezeptor- und PAF-Rezeptorantagonisten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abe, Y., H. Kasuya, et al. (2002). "Effect of a platelet-activating factor antagonist, E5880, on cerebrovasospasm following subarachnoid hemorrhage in a canine double-hemorrhage model." *Eur J Pharmacol* **455**(2-3): 127-133.
- Abe, Y., K. Nakayama, et al. (2000). "Subtype-specific trafficking of endothelin receptors." *J Biol Chem* **275**(12): 8664-8671.
- Ahn, D., Y. Ge, et al. (2004). "Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 causes hypertension and sodium retention." *J Clin Invest* **114**(4): 504-511.
- Albani, P. D., D. F. Condorelli, et al. (1993). "Platelet-activating factor and its methoxy-analogue ET-18-OCH<sub>3</sub> stimulate immediate early gene expression in rat astroglial cultures." *Neurochem Int* **22**(6): 567-574.
- Ames, R. S., H. M. Sarau, et al. (1999). "Human uterostensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14." *Nature* **401**(6750): 344-345.
- Anderson, C. M. and M. Nedergaard (2003). "Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation." *Trends Neurosci* **26**(7): 340-344; author reply 344-345.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." *Biochim Biophys Acta* **1072**(2-3): 129-157.
- Anggrahini, D. W., N. Emoto, et al. (2009). "Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation." *Cardiovasc Res* **82**(1): 143-151.
- Arenander, A. T., J. de Vellis, et al. (1989). "Induction of c-fos and TIS genes in cultured rat astrocytes by neurotransmitters." *J Neurosci Res* **24**(1): 107-114.
- Arenander, A. T., R. W. Lim, et al. (1989a). "TIS gene expression in cultured rat astrocytes: induction by mitogens and stellation agents." *J Neurosci Res* **23**(3): 247-256.
- Arenander, A. T., R. W. Lim, et al. (1989b). "TIS gene expression in cultured rat astrocytes: multiple pathways of induction by mitogens." *J Neurosci Res* **23**(3): 257-265.
- Ashton, N. (2006). "Renal and vascular actions of uterostensin II." *Kidney Int* **70**(4): 624-629.
- Back, T., K. Kohno, et al. (1994). "Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram." *J Cereb Blood Flow Metab* **14**(1): 12-19.
- Barker, F. G. and C. S. Ogilvy (1996). "Efficacy of prophylactic nimodipine for delayed ischemic deficit after subarachnoid hemorrhage: a metaanalysis." *J Neurosurg* **84**(3): 405-414.
- Barth, M., H.-H. Capelle, et al. (2007). "Effect of nicardipine prolonged-release implants on cerebral vasospasm and clinical outcome after severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a prospective, randomized, double-blind phase IIa study." *Stroke* **38**(2): 330-336.
- Barton, M. (2000). "Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics." *Curr Hypertens Rep* **2**(1): 84-91.
- Barton, M. (2008). "Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin." *Nat Clin Pract Nephrol* **4**(9): 490-501.
- Barton, M. and M. Yanagisawa (2008). "Endothelin: 20 years from discovery to therapy." *Can J Physiol Pharmacol* **86**(8): 485-498.
- Battistini, B., N. Berthiaume, et al. (2006). "Profile of past and current clinical trials involving endothelin receptor antagonists: the novel "santan" class of drug." *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(6): 653-695.
- Baynash, A. G., K. Hosoda, et al. (1994). "Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons." *Cell* **79**(7): 1277-1285.
- Bazan, N. G., E. B. R. de Turco, et al. (1995). "Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression." *J Neurotrauma* **12**(5): 791-814.
- Belayev, L., L. Khoutorova, et al. (2008). "LAU-0901, a novel platelet-activating factor antagonist, is highly neuroprotective in cerebral ischemia." *Exp Neurol* **214**(2): 253-258.
- Benatti, L., M. S. Fabbrini, et al. (1994). "Regulation of endothelin-1 biosynthesis." *Ann N Y Acad Sci* **714**: 109-121.

- Benigni, A., C. Zoja, et al. (1993). "A specific endothelin subtype A receptor antagonist protects against injury in renal disease progression." *Kidney Int* **44**(2): 440-444.
- Benveniste, E. N. (1992). "Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action." *Am J Physiol* **263**(1 Pt 1): C1-16.
- Bergamasco, L., P. P. Sainaghi, et al. (2008). "In vitro effect of cyclosporine-A on angiotensin secretion by glomerular cells." *Nephrology (Carlton)* **13**(4): 302-308.
- Berthiaume, N., C. J. Carlson, et al. (2005). "Endothelin antagonism improves hepatic insulin sensitivity associated with insulin signaling in Zucker fatty rats." *Metabolism* **54**(11): 1515-1523.
- Bezzi, P., G. Carmignoto, et al. (1998). "Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes." *Nature* **391**(6664): 281-285.
- Bito, H., Z. I. Honda, et al. (1994). "Cloning, expression and tissue distribution of rat platelet-activating-factor-receptor cDNA." *Eur J Biochem* **221**: 211-218.
- Bito, H., Y. Kudo, et al. (1993). "Characterization of platelet-activating factor (PAF) receptor in rat brain." *J Lipid Mediat* **6**(1-3): 169-174.
- Bito, H., M. Nakamura, et al. (1992). "Platelet activating factor (PAF) receptor in rat brain: PAF mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in hippocampal neurons." *Neuron* **9**(2): 285-294.
- Black, H. R., G. L. Bakris, et al. (2007). "Efficacy and safety of darusentan in patients with resistant hypertension: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study." *J Clin Hypertens (Greenwich)* **9**(10): 760-769.
- Bloch, K. D., R. L. Eddy, et al. (1989). "cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3." *J Biol Chem* **264**(30): 18156-18161.
- Bloch, K. D., C. C. Hong, et al. (1991). "cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2." *Genomics* **10**(1): 236-242.
- Blomstrand, F., C. Giaume, et al. (1999). "Distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling." *Am J Physiol* **277**(4 Pt 1): C616-C627.
- Booher, J. and M. Sensenbrenner (1972). "Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures." *Neurobiology* **2**(3): 97-105.
- Boulanger, C. and T. F. Lüscher (1990). "Release of endothelin from porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." *J Clin Invest* **85**(2): 587-590.
- Bramall, A. N., R. N. Han, et al. (2007). Endothelin-2 (ET-2) plays a critical role in lung alveolarization: novel insight from the ET-2-deficient mouse model. 10th International Conference on Endothelin. *Bergamo, Italy*.
- Braquet, P., D. Hosford, et al. (1991). "Effect of platelet-activating factor on tumor necrosis factor-induced superoxide generation from human neutrophils. Possible involvement of G proteins." *Lipids* **26**(12): 1071-1075.
- Braquet, P., M. Paubert-Braquet, et al. (1989). "Is there a case for PAF antagonist in the treatment of ischemic states." *TIPS* **10**: 23-30.
- Brock, T. A. and E. A. Capasso (1988). "Thrombin and histamine activate phospholipase C in human endothelial cells via a phorbol ester-sensitive pathway." *J Cell Physiol* **136**(1): 54-62.
- Brodie, C. (1994). "Functional PAF receptors in glia cells: binding parameters and regulation of expression." *Int J Dev Neurosci* **12**(7): 631-640.
- Brown, A. M. (2004). "Brain glycogen re-awakened." *J Neurochem* **89**(3): 537-552.
- Bruno, S., D. Cattaneo, et al. (2005). "Emerging drugs for diabetic nephropathy." *Expert Opin Emerg Drugs* **10**(4): 747-771.
- Bugaj, V., O. Pochynyuk, et al. (2008). "Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by endothelin-1 in rat collecting duct." *Am J Physiol Renal Physiol* **295**(4): F1063-1070.
- Bunchman, T. E. and C. A. Brookshire (1991). "Cyclosporine-induced synthesis of endothelin by cultured human endothelial cells." *J Clin Invest* **88**(1): 310-314.
- Busauschina, A., P. Schnuelle, et al. (2004). "Cyclosporine nephrotoxicity." *Transplant Proc* **36**(2 Suppl): 229S-233S.
- Cai, Y., T. Yamada, et al. (1995). "Mapping of the genes for rat endothelin receptor type A (ETAR) and type B (ETBR) to chromosomes 19 and 15 respectively." *Anim Genet.* **26**(1): 39-41.

- Calcerrada, M. C., M. J. Perez-Alvarez, et al. (1999). "Modulation of protein kinase C isoforms by PAF in cerebral cortex." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **58**(1): 19-27.
- Camarda, V., A. Rizzi, et al. (2002). "Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(2): 141-149.
- Caramelo, C., P. Tsai, et al. (1988). "Mechanism of cellular effect of phorbol esters on action of arginine vasopressin and angiotensin II on rat vascular smooth muscle cells in culture." *Biochem J* **254**(3): 625-629.
- Castello, L., P. P. Sainaghi, et al. (2005). "Pathways of glomerular toxicity of cyclosporine-A: an "in vitro" study." *J Physiol Pharmacol* **56**(4): 649-660.
- Chakravarti, A. (1996). "Endothelin receptor-mediated signaling in Hirschsprung disease." *Hum Mol Genet* **5**(3): 303-307.
- Chan, L., A. Chittinandana, et al. (1994). "Effect of an endothelin-receptor antagonist on ischemic acute renal failure." *Am J Physiol* **266**(1 Pt 2): F135-138.
- Chang, C. Z., S. C. Wu, et al. (2010). "Atorvastatin preconditioning attenuates the production of endothelin-1 and prevents experimental vasospasm in rats." *Acta Neurochir (Wien)*.
- Chang, I., C. Williams, et al. (2007). Being starved and cold: the life without endothelin-2. 10th International Conference on Endothelin. *Bergamo, Italy*.
- Chow, M., A. S. Dumont, et al. (2002). "Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update." *Neurosurgery* **51**(6): 1333-1341; discussion 1342.
- Chuquet, J., K. Benchenane, et al. (2002). "Selective blockade of endothelin-B receptors exacerbates ischemic brain damage in the rat." *Stroke* **33**(12): 3019-3025.
- Cirak, B., N. Kiymaz, et al. (2004). "The effects of endothelin antagonist BQ-610 on cerebral vascular wall following experimental subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm." *Clin Auton Res* **14**(3): 197-201.
- Clouthier, D. E., K. Hosoda, et al. (1998). "Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice." *Development* **125**(5): 813-824.
- Clouthier, D. E., S. C. Williams, et al. (2000). "Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice." *Dev Biol* **217**(1): 10-24.
- Clozel, M., V. Breu, et al. (1993). "Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist." *Nature* **365**(6448): 759-761.
- Clozel, M., W. Fischli, et al. (1989). "Specific binding of endothelin on human vascular smooth muscle cells in culture." *J Clin Invest* **83**(5): 1758-1761.
- D'Orléans-Juste, P., J. Labonté, et al. (2002). "Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology." *Pharmacol Ther* **95**(3): 221-238.
- D'Orléans-Juste, P., M. Plante, et al. (2003). "Synthesis and degradation of endothelin-1." *Can J Physiol Pharmacol* **81**(6): 503-510.
- Danielyan, L., O. Gembizki, et al. (2005). "The blockade of endothelin A receptor protects astrocytes against hypoxic injury: common effects of BQ-123 and erythropoietin on the rejuvenation of the astrocyte population." *Eur J Cell Biol* **84**(5): 567-579.
- Darlametsos, I. E. and D. D. Varonos (2001). "Role of prostanoids and endothelins in the prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **64**(4-5): 231-239.
- de Nucci, G., R. Thomas, et al. (1988). "Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor." *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9797-9800.
- Dekker, G. A., A. A. Kraayenbrink, et al. (1991). "Increased plasma levels of the novel vasoconstrictor peptide endothelin in severe pre-eclampsia." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **40**(3): 215-220.
- Denault, J. B., A. Claing, et al. (1995). "Processing of proendothelin-1 by human furin convertase." *FEBS Lett* **362**(3).
- Deng, A. Y., H. Dene, et al. (1994). "Genetic mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping endothelin system genes." *J Clin Invest* **93**(6): 2701-2709.
- Dhaun, N., I. M. Macintyre, et al. (2009). "Effects of endothelin receptor antagonism relate to the degree of renin-angiotensin system blockade in chronic proteinuric kidney disease." *Hypertension* **54**(3): e19-20.

- Didier, N., I. A. Romero, et al. (2003). "Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability." *J Neurochem* **86**(1): 246-254.
- Dirnagl, U., K. Becker, et al. (2009). "Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use." *Lancet Neurol* **8**(4): 398-412.
- Dirnagl, U., R. P. Simon, et al. (2003). "Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection." *Trends Neurosci* **26**(5): 248-254.
- Dorfman, D. M., D. B. Wilson, et al. (1992). "Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells." *J Biol Chem* **267**(2): 1279-1285.
- Douglas, S. A., C. Loudon, et al. (1994). "A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670." *Circ Res* **75**(1): 190-197.
- Dreier, J. P., J. Kleeberg, et al. (2002). "Endothelin-1 potently induces Leao's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura?" *Brain* **125**(Pt 1): 102-112.
- Druckenbrod, N. R., P. A. Powers, et al. (2008). "Targeting of endothelin receptor-B to the neural crest." *Genesis* **46**(8): 396-400.
- Dugan, L. L. and D. W. Choi (1994). "Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes." *Ann Neurol* **35 Suppl**: S17-S21.
- Dupuis, J. (2001). "Endothelin-receptor antagonists in pulmonary hypertension." *Lancet* **358**(9288): 1113-1114.
- Eckman, E. A., D. K. Reed, et al. (2001). "Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme." *J Biol Chem* **276**(27): 24540-24548.
- Eckman, E. A., M. Watson, et al. (2003). "Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme." *J Biol Chem* **278**(4): 2081-2084.
- Eddleston, M. and L. Mucke (1993). "Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease." *Neuroscience* **54**(1): 15-36.
- Ederly, P., T. Attie, et al. (1996). "Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease." *Nature Genetics* **12**(4): 442-444.
- Egidy, G., L. P. Eberl, et al. (2000). "The endothelin system in human glioblastoma." *Lab Invest* **80**(11): 1681-1689.
- Ehrenreich, H., R. W. Anderson, et al. (1990). "Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages." *J Exp Med* **172**(6): 1741-1748.
- Ehrenreich, H., R. W. Anderson, et al. (1991). "Selective autoregulation of endothelins in primary astrocyte cultures: endothelin receptor-mediated potentiation of endothelin-1 secretion." *New Biol* **3**(2): 135-141.
- Ehrenreich, H., T. Costa, et al. (1993). "Thrombin is a regulator of astrocytic endothelin-1." *Brain Res* **600**(2): 201-207.
- Ehrenreich, H., J. H. Kehrl, et al. (1991). "A vasoactive peptide, endothelin-3, is produced by and specifically binds to primary astrocytes." *Brain Res* **538**(1): 54-58.
- Ehrenreich, H., M. Lange, et al. (1992). "Long term monitoring of immunoreactive endothelin-1 and endothelin-3 in ventricular cerebrospinal fluid, plasma, and 24-h urine of patients with subarachnoid hemorrhage." *Res Exp Med (Berl)* **192**(4): 257-268.
- Ehrenreich, H., T. R. Nau, et al. (2000). "Endothelin b receptor deficiency is associated with an increased rate of neuronal apoptosis in the dentate gyrus." *Neuroscience* **95**(4): 993-1001.
- Ehrenreich, H. and L. Schilling (1995). "New developments in the understanding of cerebral vasoregulation and vasospasm: the endothelin-nitric oxide network." *Cleve Clin J Med* **62**(2): 105-116.
- Eitel, I., M. Nowak, et al. (2010). "Endothelin-1 release in acute myocardial infarction as a predictor of long-term prognosis and no-reflow assessed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging." *Am Heart J* **159**(5): 882-890.
- Emoto, N. and M. Yanagisawa (1995). "Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum." *J Biol Chem* **270**(25): 15262-15268.
- Encabo, A., M. Ferrer, et al. (1992). "Vasoconstrictive responses elicited by endothelin in bovine cerebral arteries." *Gen Pharmacol* **23**(2): 263-267.

- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar, et al. (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." *Neurochem Res* **25**(9-10): 1439-1451.
- Evans, N. J. and J. W. Walker (2007). Dimerization of endothelin receptors: evaluation by cCFP/F1AsH FRET and functional consequences. 10th International Conference on Endothelin. *Bergamo, Italy*.
- Faraci, F. M. and D. D. Heistad (1998). "Regulation of the cerebral circulation: Role of endothelium and potassium channels." *Physiol Rev* **78**: 53-97.
- Feigin, V. L., G. J. E. Rinkel, et al. (2005). "Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies." *Stroke* **36**(12): 2773-2780.
- Fisk, L., N. N. Nalivaeva, et al. (2006). "Regulation of endothelin-converting enzyme-1 expression in human neuroblastoma cells." *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(6): 1048-1053.
- Fogo, A., S. E. Hellings, et al. (1992). "Endothelin receptor antagonism is protective in in vivo acute cyclosporine toxicity." *Kidney Int* **42**(3): 770-774.
- Franke, B., M. Figiel, et al. (1998). "CNS glia are targets for GDNF and neurturin." *Histochem Cell Biol* **110**(6): 595-601.
- Freedman, N. J., A. S. Ament, et al. (1997). "Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity." *J Biol Chem* **272**(28): 17734-17743.
- Frerichs, K. U., P. J. Lindsberg, et al. (1990). "Platelet-activating factor and progressive brain damage following focal brain injury." *J Neurosurg* **73**(2): 223-233.
- Fujimura, M., Y. Morita-Fujimura, et al. (1998). "Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats." *J Cereb Blood Flow Metab* **18**(11): 1239-1247.
- Fujisaki, H., H. Ito, et al. (1995). "Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression." *J Clin Invest* **96**(2): 1059-1065.
- Funalot, B., T. Ouimet, et al. (2004). "Endothelin-converting enzyme-1 is expressed in human cerebral cortex and protects against Alzheimer's disease." *Mol Psychiatry* **9**(12): 1122-1128, 1059.
- Garipey, C. E. (2001). "Intestinal motility disorders and development of the enteric nervous system." *Pediatr Res* **49**(5): 605-613.
- Garipey, C. E., T. Ohuchi, et al. (2000). "Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats." *J Clin Invest* **105**(7): 925-933.
- Garnier, A., J. Zoll, et al. (2009). "Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II." *Circ Heart Fail* **2**(4): 342-350.
- Ge, Y., A. Bagnall, et al. (2006). "Collecting duct-specific knockout of the endothelin B receptor causes hypertension and sodium retention." *Am J Physiol Renal Physiol* **291**(6): F1274-1280.
- Gee, J. R. and J. N. Keller (2005). "Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(6): 1145-1150.
- Giaid, A., S. J. Gibson, et al. (1991). "Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurones of the human brain." *Histochemistry* **95**(3): 303-314.
- Giaid, A., M. Yanagisawa, et al. (1993). "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension." *N Engl J Med* **328**(24): 1732-1739.
- Giaume, C. and L. Venance (1998). "Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes." *Glia* **24**(1): 50-64.
- Gilbert, J. S., M. J. Ryan, et al. (2008). "Pathophysiology of hypertension during pre-eclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(2): H541-550.
- Girouard, H., A. D. Bonev, et al. (2010). "Astrocytic endfoot Ca<sup>2+</sup> and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3811-3816.
- Givogri, M. I., M. de Planell, et al. (2006). "Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury." *Dev Neurosci* **28**(1-2): 81-91.
- Granger, J. P., B. T. Alexander, et al. (2001). "Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension." *Am J Hypertens* **14**(6 Pt 2): 178S-185S.

- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* **281**(5381): 1309-1312.
- Grover, G. J., S. Dzwonczyk, et al. (1993). "The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduced infarct size in a canine model of coronary occlusion and reperfusion." *Cardiovasc Res* **27**(9): 1613-1618.
- Hallermayer, K. and B. Hamprecht (1984). "Cellular heterogeneity in primary cultures of brain cells revealed by immunocytochemical localization of glutamine synthetase." *Brain Res* **295**(1): 1-11.
- Hama, H., T. Sakurai, et al. (1992). "Action of endothelin-1 on rat astrocytes through the ETB receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **186**(1): 355-362.
- Hamada, J., Y. Kai, et al. (2003). "Effect on cerebral vasospasm of coil embolization followed by microcatheter intrathecal urokinase infusion into the cisterna magna: a prospective randomized study." *Stroke* **34**(11): 2549-2554.
- Hamilton, C. A., Y. T. Huang, et al. (1992). "Effects of endothelin upon blood pressure in normotensive rabbits and in perinephritis hypertension." *J Hypertens* **10**(8): 787-794.
- Hansen-Schwartz, J., N. L. Hoel, et al. (2003). "Subarachnoid hemorrhage enhances endothelin receptor expression and function in rat cerebral arteries." *Neurosurgery* **52**(5).
- Hasegawa, H., K. Hiki, et al. (1998). "Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3." *FEBS Lett* **428**(3): 304-308.
- Hasselblatt, M., P. Lewczuk, et al. (2001). "Role of the astrocytic ET(B) receptor in the regulation of extracellular endothelin-1 during hypoxia." *Glia* **34**(1): 18-26.
- Haydon, P. G. and G. Carmignoto (2006). "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling." *Physiol Rev* **86**(3): 1009-1031.
- Haynes, W. G. and D. J. Webb (1994). "Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone." *Lancet* **344**: 852-854.
- Heins, N., P. Malatesta, et al. (2002). "Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6." *Nat Neurosci* **5**(4): 308-315.
- Hena, D. E., M. A. Saleem, et al. (2010). "Glomerular disturbances in preeclampsia: disruption between glomerular endothelium and podocyte symbiosis." *Hypertens Pregnancy* **29**(1): 10-20.
- Henson, M. J. (1970). "Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen." *J Exp Med* **131**: 287-306.
- Hepler, J. R., H. S. Earp, et al. (1988). "Long-term phorbol ester treatment down-regulates protein kinase C and sensitizes the phosphoinositide signaling pathway to hormone and growth factor stimulation. Evidence for a role of protein kinase C in agonist-induced desensitization." *J Biol Chem* **263**(16): 7610-7619.
- Hijdra, A., R. Braakman, et al. (1987). "Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Complications and outcome in a hospital population." *Stroke* **18**(6): 1061-1067.
- Hinojosa-Laborde, C., J. W. Osborn, et al. (1989). "Hemodynamic effects of endothelin in conscious rats." *Am J Physiol* **256**(6 Pt 2): H1742-H1746.
- Hirashima, Y., S. Endo, et al. (1996). "Prevention of cerebrovasospasm following subarachnoid hemorrhage in rabbits by the platelet-activating factor antagonist, E5880." *J Neurosurg* **84**(5): 826-830.
- Hirashima, Y., S. Endo, et al. (2001). "Effect of a platelet-activating factor receptor antagonist, E5880, on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage--open clinical trial to investigate efficacy and safety." *Neurol Med Chir (Tokyo)* **41**(4).
- Hisanaga, K., S. M. Sagar, et al. (1990). "c-fos proto-oncogene expression in astrocytes associated with differentiation or proliferation but not depolarization." *Brain Res Mol Brain Res* **8**(1): 69-75.
- Hochoer, B. and H. Ehrenreich (2002). "ETB receptor deficiency causes salt-sensitive hypertension." *J Mol Med* **80**(12): 747-749; author reply 750-742.
- Hochoer, B., C. Thone-Reineke, et al. (1997). "Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension." *J Clin Invest* **99**(6): 1380-1389.
- Holzwarth, J. A., S. R. Glaum, et al. (1992). "Activation of endothelin receptors by sarafotoxin regulates Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cerebellar astrocytes." *Glia* **5**(4): 239-250.
- Honda, Z., S. Ishii, et al. (2002). "Platelet-activating factor receptor." *J Biochem* **131**(6): 773-779.

- Honda, Z., M. Nakamura, et al. (1991). "Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung." *Nature* **349**(6307): 342-346.
- Honda, Z., T. Takano, et al. (1994). "Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* **269**(3): 2307-2315.
- Hori, S., Y. Komatsu, et al. (1992). "Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors." *Endocrinology* **130**(4): 1885-1895.
- Horio, T., M. Kohno, et al. (1993). "Stimulation of endothelin-1 release by low density and very low density lipoproteins in cultured human endothelial cells." *Atherosclerosis* **101**(2): 185-190.
- Hosoda, K., R. E. Hammer, et al. (1994). "Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice." *Cell* **79**(7): 1267-1276.
- Hossmann, K. A. (1994). "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia." *Ann Neurol* **36**(4): 557-565.
- Hostettler, M. E., P. E. Knapp, et al. (2002). "Platelet-activating factor induces cell death in cultured astrocytes and oligodendrocytes: involvement of caspase-3." *Glia* **38**(3): 228-239.
- Hu, R. M., M. Y. Chuang, et al. (1994). "High density lipoproteins stimulate the production and secretion of endothelin-1 from cultured bovine aortic endothelial cells." *J Clin Invest* **93**(3): 1056-1062.
- Hu, R. M., E. R. Levin, et al. (1992). "Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor." *J Biol Chem* **267**(24): 17384-17389.
- Huang, Z., P. L. Huang, et al. (1994). "Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase." *Science* **265**(5180): 1883-1885.
- Iadecola, C. (2004). "Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* **5**(5): 347-360.
- Ihrle, R. A. and A. Alvarez-Buylla (2008). "Cells in the astroglial lineage are neural stem cells." *Cell Tissue Res* **331**(1): 179-191.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989a). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2863-2867.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989b). "The human proendothelin-1 gene." *J Biol Chem* **264**: 14954-14959.
- Ishii, S., T. Nagase, et al. (2002). "Platelet-activating factor receptor." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 599-609.
- Ishikawa, T., M. Yanagisawa, et al. (1988a). "Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide." *Pflugers Arch* **413**(1): 108-110.
- Ishikawa, T., M. Yanagisawa, et al. (1988b). "Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria." *Am J Physiol* **255**(4 Pt 2): H970-H973.
- Iwasa, S., J. Fan, et al. (2001). "Blockade of endothelin receptors reduces diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Pathobiology* **69**(1): 1-10.
- Joannides, A., P. Gaughwin, et al. (2004). "Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells." *Lancet* **364**(9429): 172-178.
- Johnson, R. M. and J. C. Garrison (1987). "Epidermal growth factor and angiotensin II stimulate formation of inositol 1,4,5- and inositol 1,3,4-trisphosphate in hepatocytes. Differential inhibition by pertussis toxin and phorbol 12-myristate 13-acetate." *J Biol Chem* **262**(36): 17285-17293.
- Juvela, S. (2000). "Plasma endothelin concentrations after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." *J Neurosurg* **92**(3): 390-400.
- Kanyicska, B., T. P. Burris, et al. (1991). "Endothelin-3 inhibits prolactin and stimulates LH, FSH and TSH secretion from pituitary cell culture." *Biochem Biophys Res Commun* **174**(1): 338-343.
- Karne, S., C. K. Jayawickreme, et al. (1993). "Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores." *J Biol Chem* **268**(25): 19126-19133.
- Kassell, N. F., T. Sasaki, et al. (1985). "Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage." *Stroke* **16**(4): 562-572.

- Kassuya, C. A. L., A. P. Rogerio, et al. (2008). "The role of ET(A) and ET(B) receptor antagonists in acute and allergic inflammation in mice." *Peptides* **29**(8): 1329-1337.
- Katsura, K., T. Kristian, et al. (1994). "Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain." *Biochem Soc Trans* **22**(4): 991-996.
- Kedzierski, R. M. and M. Yanagisawa (2001). "Endothelin system: the double-edged sword in health and disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 851-876.
- Kido, H., A. Nakano, et al. (1998). "Human chymase, an enzyme forming novel bioactive 31-amino acid length endothelins." *Biol Chem* **379**(7): 885-891.
- Kim, J. H., J. A. Park, et al. (2006). "Blood-neural barrier: intercellular communication at gliovascular interface." *J Biochem Mol Biol* **39**(4): 339-345.
- Kirchengast, M. and M. Luz (2005). "Endothelin receptor antagonists: clinical realities and future directions." *J Cardiovasc Pharmacol* **45**(2): 182-191.
- Kitada, K., N. Yui, et al. (2009). "Inhibition of endothelin ETB receptor system aggravates neointimal hyperplasia after balloon injury of rat carotid artery." *J Pharmacol Exp Ther* **331**(3): 998-1004.
- Kleeberg, J., G. C. Petzold, et al. (2004). "ET-1 induces cortical spreading depression via activation of the ETA receptor/phospholipase C pathway in vivo." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**(4): H1339-1346.
- Kloog, Y., I. Ambar, et al. (1988). "Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain." *Science* **242**(4876): 268-270.
- Ko, C., M. C. Gieske, et al. (2006). "Endothelin-2 in ovarian follicle rupture." *Endocrinology* **147**(4): 1770-1779.
- Ko, C. J., G. Na, et al. (2007). Endothelin-2 (EDN2) in ovarian follicle rupture and oocyte transport. 10th International Conference on Endothelin. *Bergamo, Italy*.
- Kochva, E., C. C. Viljoen, et al. (1982). "A new type of toxin in the venom of snakes of the genus *Atractaspis* (Atractaspidinae)." *Toxicon* **20**(3): 581-592.
- Koehler, R. C., D. Gebremedhin, et al. (2006). "Role of astrocytes in cerebrovascular regulation." *J Appl Physiol* **100**(1): 307-317.
- Kohan, D. E. (1997). "Endothelins in the normal and diseased kidney." *Am J Kidney Dis* **29**(1): 2-26.
- Kohan, D. E. (2006). "The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **15**(1): 34-40.
- Kohno, M., K. Murakawa, et al. (1989). "Production of endothelin by cultured porcine endothelial cells: modulation by adrenaline." *J Hypertens Suppl* **7**(6): S130-S131.
- Kohno, M., K. Yasumari, et al. (1991). "Inhibition by atrial and brain natriuretic peptides of endothelin-1 secretion after stimulation with angiotensin II and thrombin of cultured human endothelial cells." *J Clin Invest* **87**: 1999-2004.
- Kolominsky-Rabas, P. L. and P. U. Heuschmann (2002). "[Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke]." *Fortschr Neurol Psychiatr* **70**(12): 657-662.
- Kristian, T. and B. K. Siesjo (1998). "Calcium in ischemic cell death." *Stroke* **29**(3): 705-718.
- Krum, H., R. J. Viskoper, et al. (1998). "The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators." *N Engl J Med* **338**(12): 784-790.
- Kurihara, H., K. Yamaoki, et al. (1989). "Endothelin: a potent vasoconstrictor associated with coronary vasospasm." *Life Sci* **22**(25): 1937-1943.
- Kurihara, Y., H. Kurihara, et al. (1995). "Aortic arch malformation and ventricular septal defects in mice deficient in endothelin-1." *J Clin Invest* **96**(1): 293-300.
- Kurihara, Y., H. Kurihara, et al. (1994). "Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1." *Nature* **368**(6473): 703-710.
- Kuwaki, T., H. Kurihara, et al. (1997). "Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse." *Prog Neurobiol* **51**(5): 549-579.
- Lanese, D. M. and J. D. Conger (1993). "Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles." *J Clin Invest* **91**(5): 2144-2149.
- Le Prince, G., C. Fages, et al. (1991). "DBcAMP effect on the expression of GFAP and of its

- encoding mRNA in astroglial primary cultures." *Glia* **4**(3): 322-326.
- Lee, M. E., K. D. Bloch, et al. (1990). "Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence." *J Biol Chem* **265**(18): 10446-10450.
- Lee, M. E., S. M. de la Monte, et al. (1990). "Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in human central nervous system." *J Clin Invest* **86**(1): 141-147.
- Lee, M. E., M. S. Dhady, et al. (1991). "Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun." *J Biol Chem* **266**(28): 19034-19039.
- Lee, S. Y., C. Y. Lee, et al. (1986). "Coronary vasospasm as the primary cause of death due to the venom of the burrowing asp, *Atractaspis engaddensis*." *Toxicon* **24**(3): 285-291.
- Lee, T. M., C. C. Chen, et al. (2008). "Effect of endothelin receptor antagonists on ventricular susceptibility in postinfarcted rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(4): H1871-1879.
- Leonova, J., T. Thorlin, et al. (2001). "Endothelin-1 decreases glutamate uptake in primary cultured rat astrocytes." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(5): C1495-1503.
- Lepailleur-Enouf, D., O. Valdenaire, et al. (2000). "Thrombin induces endothelin expression in arterial smooth muscle cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(5): H1606-1612.
- LeVan, T. D., J. W. Bloom, et al. (1998). "Platelet-activating factor induction of activator protein-1 signaling in bronchial epithelial cells." *Mol Pharmacol* **53**(1): 135-140.
- Li, J. J., L. H. Wu, et al. (2010). "Endothelins-1/3 and endothelin-A/B receptors expressing glial cells with special reference to activated microglia in experimentally induced cerebral ischemia in the adult rats." *Neuroscience* **167**(3): 665-677.
- Li, P. A., M. Shamloo, et al. (1995). "Critical values for plasma glucose in aggravating ischaemic brain damage: correlation to extracellular pH." *Neurobiol Dis* **2**(2): 97-108.
- Lim, R., K. Mitsunobu, et al. (1973). "Maturation-stimulation effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on dissociated embryonic brain cells in culture." *Exp Cell Res* **79**(1): 243-246.
- Lin, C.-L., W. Winardi, et al. (2006). "Endothelin-converting enzyme inhibitors for the treatment of subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm." *Neurol Res* **28**(7): 721-729.
- Lindholm, D., B. Hengerer, et al. (1990). "Transforming growth factor-beta 1 stimulates expression of nerve growth factor in the rat CNS." *Neuroreport* **1**(1): 9-12.
- Lindsberg, P. J., T. L. Yue, et al. (1990). "Evidence for platelet-activating factor as a novel mediator in experimental stroke in rabbits." *Stroke* **21**(10): 1452-1457.
- Linn, F. H., G. J. Rinkel, et al. (1996). "Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis." *Stroke* **27**(4): 625-629.
- Little, P. J., M. E. Ivey, et al. (2008). "Endothelin-1 actions on vascular smooth muscle cell functions as a target for the prevention of atherosclerosis." *Curr Vasc Pharmacol* **6**(3): 195-203.
- Liu, H., Y. Peng, et al. (2010). "Correlation between endothelin-1 and atherosclerosis in chronic hemodialysis patients." *J Nephrol*.
- Loo, D. T., M. C. Althoen, et al. (1995). "Differentiation of serum-free mouse embryo cells into astrocytes is accompanied by induction of glutamine synthetase activity." *J Neurosci Res* **42**(2): 184-191.
- Lowry, O. H., J. V. Passonneau, et al. (1964). "Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain." *J Biol Chem* **239**: 18-30.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Luscher, T. F. and M. Barton (2000). "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs." *Circulation* **102**(19): 2434-2440.
- Lynch, J. R., H. Wang, et al. (2005). "Simvastatin reduces vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a pilot randomized clinical trial." *Stroke* **36**(9): 2024-2026.
- Ma, D. K., G. L. Ming, et al. (2005). "Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis." *Curr Opin Neurobiol* **15**(5): 514-520.
- MacCumber, M. W., C. A. Ross, et al. (1989). "Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18): 7285-7289.

- MacCumber, M. W., C. A. Ross, et al. (1990). "Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2359-2363.
- Macdonald, R. L., A. Kakarieka, et al. (2006). Prevention of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage with clazosentan, an endothelin receptor antagonist. 9th International Conference of Cerebral Vasospasm. *Istanbul, Turkey*.
- Macdonald, R. L., N. F. Kassell, et al. (2008). "Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial." *Stroke* **39**(11): 3015-3021.
- Macquin-Mavier, I., M. Leveau, et al. (1989). "Mechanisms of endothelin-mediated bronchoconstriction in the guinea pig." *J Pharmacol Exp Ther* **250**(2): 740-745.
- Magistretti, P. J. and L. Pellerin (1996). "Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes." *Cereb Cortex* **6**(1): 50-61.
- Maguire, J. J. and A. P. Davenport (2002). "Is urotensin-II the new endothelin?" *Br J Pharmacol* **137**(5): 579-588.
- Marinissen, M. J. and J. S. Gutkind (2001). "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms." *Trends Pharmacol Sci* **22**(7): 368-376.
- Marsen, T. A., F. Weber, et al. (2000). "Differential transcriptional regulation of endothelin-1 by immunosuppressants FK506 and cyclosporin A." *Fundam Clin Pharmacol* **14**(4): 401-408.
- Matsumoto, H., N. Suzuki, et al. (1989). "Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain." *Biochem Biophys Res Commun* **164**(1): 74-80.
- Mattoli, S., M. Soloperto, et al. (1991). "Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction." *J Allergy Clin Immunol* **88**(3 Pt 1): 376-384.
- McCarthy, K. D. and J. de Vellis (1980). "Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue." *J Cell Biol* **85**(3): 890-902.
- Mearow, K. M., J. F. Mill, et al. (1990). "Neuronal interactions involved in the regulation of glutamine synthetase." *Glia* **3**(5): 385-392.
- Mearow, K. M., J. F. Mill, et al. (1989). "The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* **6**(4): 223-232.
- Miller, W. L., M. M. Redfield, et al. (1989). "Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin." *J Clin Invest* **83**(1): 317-320.
- Miura, K., T. Yukimura, et al. (1991). "Renal and femoral vascular responses to endothelin-1 in dogs: role of prostaglandins." *J Pharmacol Exp Ther* **256**(1): 11-17.
- Morgan, J. I. and T. Curran (1988). "Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons." *Cell Calcium* **9**(5-6): 303-311.
- Mucke, H. A. (2008). "Pulmonary arterial hypertension: on the way to a manageable disease." *Curr Opin Investig Drugs* **9**(9): 957-962.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1997a). "Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study." *Lancet* **349**(9064): 1498-1504.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1997b). "Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study." *Lancet* **349**(9061): 1269-1276.
- Mutoh, H., H. Bito, et al. (1993). "Two different promoters direct expression of two distinct forms of mRNAs of human platelet-activating factor receptor." *FEBS Lett* **322**(2): 129-134.
- Naidoo, V., S. Naidoo, et al. (2005). "Localization of the endothelin system in human diffuse astrocytomas." *Cancer* **104**(5): 1049-1057.
- Nakamura, M., Z. Honda, et al. (1991). "Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes." *J Biol Chem* **266**(30): 20400-20405.
- Nakov, R., E. Pfarr, et al. (2002). "Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension." *Am J Hypertens* **15**(7 Pt 1): 583-589.
- Nedergaard, M., B. Ransom, et al. (2003). "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." *Trends Neurosci* **26**(10): 523-530.
- Nguyen, A., N. Thorin-Trescases, et al. (2010). "Working under pressure: Coronary arteries and the endothelin system." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.

- Nogueira, R. G., M. J. Bodock, et al. (2007). "High-dose bosentan in the prevention and treatment of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm: an open-label feasibility study." *Neurocrit Care* **7**(3): 194-202.
- Norenberg, M. D. (1979). "Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system." *J Histochem Cytochem* **27**(3): 756-762.
- Nova, A., B. M. Sibai, et al. (1991). "Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* **165**(3): 724-727.
- Ogretmen, B., H. Ratajczak, et al. (1993). "Effects of staining of RNA with ethidium bromide before electrophoresis on performance of northern blots." *Biotechniques* **14**(6): 932-935.
- Oksche, A., G. Boese, et al. (2000). "Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor." *Mol Pharmacol* **57**(6): 1104-1113.
- Oliver, F. J., G. de la Rubia, et al. (1991). "Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells." *J Biol Chem* **266**(34): 23251-23256.
- Omland, T., R. T. Lie, et al. (1994). "Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction." *Circulation* **89**(4): 1573-1579.
- Ong, A. C., T. P. Jowett, et al. (1994). "Human high density lipoproteins stimulate endothelin-1 release by cultured human renal proximal tubular cells." *Kidney Int* **46**(5): 1315-1321.
- Ono, K., G. Tsujimoto, et al. (1994). "Endothelin-A receptor mediates cardiac inhibition by regulating calcium and potassium currents." *Nature* **370**(6487): 301-304.
- Opocensky, M., H. J. Kramer, et al. (2006). "Late-onset endothelin-A receptor blockade reduces podocyte injury in homozygous Ren-2 rats despite severe hypertension." *Hypertension* **48**(5): 965-971.
- Ortmann, J., K. Amann, et al. (2004). "Role of podocytes for reversal of glomerulosclerosis and proteinuria in the aging kidney after endothelin inhibition." *Hypertension* **44**(6): 974-981.
- Ortmann, J., P. C. Nett, et al. (2005). "Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: evidence for endothelin release by pancreatic islet beta-cells." *Biochem Biophys Res Commun* **334**(2): 689-695.
- Paul, M., M. Zintz, et al. (1995). "Characterization and Functional Analysis of the Rat Endothelin-1 Promoter." *Hypertension* **25**: 683-693.
- Peterson, J. W., B. D. Kwun, et al. (1990). "The role of inflammation in experimental cerebral vasospasm." *J Neurosurg* **72**(5): 767-774.
- Pfeilschifter, J., M. Ochsner, et al. (1989). "Down-regulation of protein kinase C potentiates angiotensin II-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis in vascular smooth-muscle cells." *Biochem J* **262**(1): 285-291.
- Pickard, J. D., G. D. Murray, et al. (1989). "Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial." *BMJ* **298**: 636-642.
- Pillai, R., F. Scintu, et al. (2006). "Human astrocytes can be induced to differentiate into cells with neuronal phenotype." *Exp Cell Res* **312**(12): 2336-2346.
- Pinto-Sietsma, S. J. and M. Paul (1998). "A role for endothelin in the pathogenesis of hypertension: fact or fiction?" *Kidney Int Suppl* **67**: S115-S121.
- Pisoni, R., P. Ruggenti, et al. (2001). "Renoprotective therapy in patients with nondiabetic nephropathies." *Drugs* **61**(6): 733-745.
- Pluta, R. M., R. J. Boock, et al. (1997). "Source and cause of endothelin-1 release into cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage." *J Neurosurg* **87**(2): 287-293.
- Polikepahad, S., R. M. Moore, et al. (2006). "Endothelins and airways--a short review." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **119**(1-6): 3-51.
- Prada, F. A., Q. Quesada, et al. (1998). "Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer." *Glia* **22**(3): 221-236.
- Prehn, J. H. and J. Kriegelstein (1993). "Platelet-activating factor antagonists reduce excitotoxic damage in cultured neurons from embryonic chick telencephalon and protect the rat hippocampus and neocortex from ischemic injury in vivo." *J Neurosci Res* **34**(2): 179-188.

- Prins, B. A., R. M. Hu, et al. (1994). "Prostaglandin E2 and Prostacyclin Inhibit the Production and Secretion of Endothelin from Cultured Endothelial Cells." *J Biol Chem* **269**(16): 11938-11944.
- Proven, A., H. L. Roderick, et al. (2006). "Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes." *J Cell Sci* **119**(Pt 16): 3363-3375.
- Radany, E. H., M. Brenner, et al. (1992). "Direct establishment of rat brain cell lines with the phenotypic characteristics of type-1 astrocytes." *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6467-6471.
- Rahemtulla, N., C. F. Deschepper, et al. (1994). "Immunocytochemical and functional characterization of an immortalized type-1 astrocytic cell line." *Brain Res* **642**(1-2): 221-227.
- Remuzzi, G., N. Perico, et al. (2002). "New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations." *Nat Rev Drug Discov* **1**(12): 986-1001.
- Resink, T. J., A. W. Hahn, et al. (1990). "Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* **168**(3): 1303-1310.
- Resink, T. J., T. Scott-Burden, et al. (1990). "Phorbol ester promotes a sustained down-regulation of endothelin receptors and cellular responses to endothelin in human vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* **166**(3): 1213-1219.
- Rinkel, G. J. E., V. L. Feigin, et al. (2004). "Circulatory volume expansion therapy for aneurysmal subarachnoid haemorrhage." *Cochrane Database Syst Rev*(4).
- Rogers, S. D., C. M. Peters, et al. (2003). "Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS." *Glia* **41**(2): 180-190.
- Rossi, D. J., J. D. Brady, et al. (2007). "Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia." *Nat Neurosci* **10**(11): 1377-1386.
- Rossi, N. F., S. M. Black, et al. (2004). "Neuronal nitric oxide synthase activity in the paraventricular nucleus buffers central endothelin-1-induced pressor response and vasopressin secretion." *J Cardiovasc Pharmacol* **44** Suppl 1: S283-288.
- Rossi, N. F. and M. Maliszewska-Scislo (2008). "Role of paraventricular nucleus vasopressin V1A receptors in the response to endothelin 1 activation of the subfornical organ in the rat." *J Physiol Pharmacol* **59** Suppl 8: 47-59.
- Rossi, N. F., D. S. O'Leary, et al. (1997). "Mechanisms of centrally administered ET-1-induced increases in systemic arterial pressure and AVP secretion." *Am J Physiol* **272**(1 Pt 1): E126-132.
- Rothermund, L., S. Luckert, et al. (2001). "Renal endothelin ET(A)/ET(B) receptor imbalance differentiates salt-sensitive from salt-resistant spontaneous hypertension." *Hypertension* **37**(2): 275-280.
- Roux, S., B. M. Löffler, et al. (1995). "The role of endothelin in experimental cerebral vasospasm." *Neurosurgery* **37**(1).
- Rubanyi, G. M. and M. A. Polokoff (1994). "Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology." *Pharmacol Rev* **46**(3): 325-415.
- Rubin, L. J., M. M. Hoepfer, et al. (2006). "Current and future management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from diagnosis to treatment responses." *Proc Am Thorac Soc* **3**(7): 601-607.
- Ruis, N. M., J. K. Rose, et al. (1991). "Tumor necrosis factor release by human monocytes stimulated with platelet-activating factor." *Lipids* **26**(12): 1060-1064.
- Ryu, S. M., H. J. Kim, et al. (2009). "Myocardial protective effect of tezosentan, an endothelin receptor antagonist, for ischemia-reperfusion injury in experimental heart failure models." *J Korean Med Sci* **24**(5): 782-788.
- Sakai, S., T. Miyauchi, et al. (1996). "Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure." *Nature* **384**: 353-355.
- Sakurai, T., M. Yanagisawa, et al. (1991). "cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**(1): 44-47.
- Sakurai, T., M. Yanagisawa, et al. (1990). "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor." *Nature* **348**(6303): 732-735.
- Salom, J. B., G. Torregrosa, et al. (1995). "Endothelins and the cerebral circulation." *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **7**(2): 131-152.

- Samson, W. K. and T. C. Murphy (1993). "Antidipsogenic actions of endothelins are exerted via the endothelin-A receptor in the brain." *Am J Physiol* **265**(5 Pt 2): R1212-1215.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chainterminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci USA* **74**(12): 5463-5467.
- Sasaki, T., N. Kodama, et al. (2000). "Urokinase cisternal irrigation therapy for prevention of symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a study of urokinase concentration and the fibrinolytic system." *Stroke* **31**(6): 1256-1262.
- Scatchard, G. (1949). "The attractions of proteins for small molecules and ions." *Ann NY Acad Sci* **51**: 660-672.
- Schiffrin, E. L. and G. Thibault (1991). "Plasma endothelin in human essential hypertension." *Am J Hypertens* **4**(4 Pt 1): 303-308.
- Schinelli, S. (2006). "Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview." *Curr Med Chem* **13**(6): 627-638.
- Schini, V. B., H. Hendrickson, et al. (1989). "Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells." *Eur J Pharmacol* **165**(2-3): 333-334.
- Schmidt-Ott, K. M. (2002). Endothelinabhängige morphologische Veränderungen hypoxischer Astrozyten. Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Berlin, Freie Universität Berlin.
- Schmidt, M., B. Kröger, et al. (1994). "Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1)." *FEBS Lett* **356**(2-3): 238-243.
- Schousboe, A. and H. S. Waagepetersen (2005). "Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity." *Neurotox Res* **8**(3-4): 221-225.
- Schubert, G. A., L. Schilling, et al. (2008). "Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, prevents early hypoperfusion during the acute phase of massive experimental subarachnoid hemorrhage: a laser Doppler flowmetry study in rats." *J Neurosurg* **109**(6): 1134-1140.
- Schwartz, J. P. and K. Mishler (1990). "Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes." *Cell Mol Neurobiol* **10**(3): 447-457.
- Schweizer, A., O. Valdenaire, et al. (1997). "Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations." *Biochem J* **328** ( Pt 3): 871-877.
- Seifert, V., B. M. Löffler, et al. (1995). "Endothelin concentrations in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Correlation with cerebral vasospasm, delayed ischemic neurological deficits, and volume of hematoma." *J Neurosurg* **82**(1): 55-62.
- Shapiro, D. L. (1973). "Morphological and biochemical alterations in foetal rat brain cells cultured in the presence of monobutyl cyclic AMP." *Nature* **241**(5386): 203-204.
- Shimada, K., M. Takahashi, et al. (1995). "Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1." *FEBS Lett* **371**(2): 140-144.
- Shraga-Levine, Z. and M. Sokolovsky (2000). "Functional coupling of G proteins to endothelin receptors is ligand and receptor subtype specific." *Cell Mol Neurobiol* **20**(3): 305-317.
- Shubeita, H. E., P. M. McDonough, et al. (1990). "Endothelin induction of inositol hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes." *J Biol Chem* **265**(33): 20555-20562.
- Silver, I. A., J. Deas, et al. (1997). "Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells." *Neuroscience* **78**(2): 589-601.
- Simonson, M. S. (1993). "Endothelins: multifunctional renal peptides." *Physiol Rev* **73**(2): 375-411.
- Simonson, M. S. and W. H. Herman (1993). "Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src." *J Biol Chem* **268**(13): 9347-9357.
- Siraganian, R. P. and A. G. Osler (1971). "Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate." *J Immunol* **106**: 1244-1251.
- Siren, A. L., P. Lewczuk, et al. (2002). "Endothelin B receptor deficiency augments neuronal damage upon exposure to hypoxia-ischemia in vivo." *Brain Res* **945**(1): 144-149.

- Smith, S. J. (1994). "Neural signalling. Neuro-modulatory astrocytes." *Curr Biol* **4**(9): 807-810.
- Speth, C., G. Stockl, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 induces expression of complement factors in human astrocytes." *J Virol* **75**(6): 2604-2615.
- Squinto, S. P., A. L. Block, et al. (1989). "Platelet-activating factor stimulates a fos/jun/AP-1 transcriptional signaling system in human neuroblastoma cells." *J Neurosci Res* **24**(4): 558-566.
- Stanimirovic, D. B., R. Ball, et al. (1995). "The role of intracellular calcium and protein kinase C in endothelin-stimulated proliferation of rat type I astrocytes." *Glia* **15**(2): 119-130.
- Steiroopoulos, P., G. Trakada, et al. (2008). "Current pharmacological treatment of pulmonary arterial hypertension." *Curr Clin Pharmacol* **3**(1): 11-19.
- Sudlow, C. L. and C. P. Warlow (1997). "Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration." *Stroke* **28**(3): 491-499.
- Takahashi, K., M. A. Ghatei, et al. (1991). "Endothelin in human brain and pituitary gland: comparison with the rat." *J Cardiovasc Pharmacol* **17**(Suppl. 7): S101-103.
- Takasaki, C., N. Tamiya, et al. (1988). "Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart." *Toxicon* **26**(6): 543-548.
- Takasuka, T., T. Sakurai, et al. (1994). "Human endothelin receptor ETB. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand." *J Biol Chem* **269**(10): 7509-7513.
- Tardy, M., C. Fages, et al. (1990). "Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes." *Adv Exp Med Biol* **265**: 41-52.
- Teerlink, J. R., V. Breu, et al. (1994). "Potent vasoconstriction mediated by endothelin ETB receptors in canine coronary arteries." *Circ Res* **74**(1): 105-114.
- Thiemermann, C., P. S. Lidbury, et al. (1989). "Endothelin-1 releases prostacyclin and inhibits ex vivo platelet aggregation in the anesthetized rabbit." *J Cardiovasc Pharmacol* **13 Suppl 5**: S138-141; discussion S142.
- Treggiari, M. M., B. Walder, et al. (2003). "Systematic review of the prevention of delayed ischemic neurological deficits with hypertension, hypervolemia, and hemodilution therapy following subarachnoid hemorrhage." *J Neurosurg* **98**(5): 978-984.
- Tseng, M.-Y., M. Czosnyka, et al. (2005). "Effects of acute treatment with pravastatin on cerebral vasospasm, autoregulation, and delayed ischemic deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a phase II randomized placebo-controlled trial." *Stroke* **36**(8): 1627-1632.
- Ukena, D., C. Krogel, et al. (1989). "PAF-receptors on eosinophils: identification with a novel ligand, [3H]WEB 2086." *Biochem Pharmacol* **38**(10): 1702-1705.
- Umemura, A., K. Yamada, et al. (1997). "Production of platelet-activating factor during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat." *J Stroke Cerebrovasc Dis* **6**(6): 394-397.
- Vajkoczy, P., B. Meyer, et al. (2005). "Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study." *J Neurosurg* **103**(1): 9-17.
- Valdenaire, O., D. Lepailleur-Enouf, et al. (1999). "A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization." *Eur J Biochem* **264**(2): 341-349.
- Valone, F. H. and N. M. Ruis (1992). "Stimulation of tumour necrosis factor release by cytotoxic analogues of platelet-activating factor." *Immunology* **76**(1): 24-29.
- van Biesen, T., B. E. Hawes, et al. (1996). "G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism." *J Biol Chem* **271**(3): 1266-1269.
- van den Bergh, W. M., A. Algra, et al. (2005). "Magnesium sulfate in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized controlled trial." *Stroke* **36**(5): 1011-1015.
- Van Harreveld, A. and E. Fikova (1973). "Mechanisms involved in spreading depression." *J Neurobiol* **4**(4): 375-387.

- Vatter, H., J. Konczalla, et al. (2007). "Characterization of the endothelin-B receptor expression and vasomotor function during experimental cerebral vasospasm." *Neurosurgery* **60**(6).
- Vatter, H., M. Zimmermann, et al. (2004). "Experimental approaches to evaluate endothelin-A receptor antagonists." *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **26**(4): 277-286.
- Vatter, H., M. Zimmermann, et al. (2005a). "Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part I: inhibitory effect on endothelin(A) receptor-mediated contraction." *J Neurosurg* **102**(6): 1101-1107.
- Vatter, H., M. Zimmermann, et al. (2005b). "Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin(B) receptor-mediated relaxation." *J Neurosurg* **102**(6): 1108-1114.
- Verkhatsky, A. and H. Kettenmann (1996). "Calcium signalling in glial cells." *Trends Neurosci* **19**(8): 346-352.
- Veyna, R. S., D. Seyfried, et al. (2002). "Magnesium sulfate therapy after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." *J Neurosurg* **96**(3): 510-514.
- Vierhapper, H., O. Wagner, et al. (1990). "Effect of endothelin-1 in man." *Circulation* **81**(4): 1415-1418.
- Vigne, P., A. Lopez Farre, et al. (1994). "Na(+)-K(+)-Cl- cotransporter of brain capillary endothelial cells. Properties and regulation by endothelins, hyperosmolar solutions, calyculin A, and interleukin-1." *J Biol Chem* **269**(31): 19925-19930.
- Wagner, O. F., G. Christ, et al. (1992). "Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells." *J Biol Chem* **267**(23): 16066-16068.
- Wahl, M. and G. Carpenter (1988). "Regulation of epidermal growth factor-stimulated formation of inositol phosphates in A-431 cells by calcium and protein kinase C." *J Biol Chem* **263**(16): 7581-7590.
- Walz, W. (1997). "Role of astrocytes in the spreading depression signal between ischemic core and penumbra." *Neurosci Biobehav Rev* **21**(2): 135-142.
- Watanabe, T., N. Suzuki, et al. (1990). "Endothelin in myocardial infarction." *Nature* **244**(6262).
- Watson, A. M., J. Li, et al. (2010). "The endothelin receptor antagonist avosentan ameliorates nephropathy and atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E knockout mice." *Diabetologia* **53**(1): 192-203.
- Wei, C. M., A. Lerman, et al. (1994). "Endothelin in human congestive heart failure." *Circulation* **89**: 1580-1586.
- Weiser, E., Z. Wollberg, et al. (1984). "Cardiotoxic effects of the venom of the burrowing asp, *Atractaspis engaddensis* (Atractaspididae, Ophidia)." *Toxicon* **22**(5): 767-774.
- Wilson, D. B., D. M. Dorfman, et al. (1990). "A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preendothelin-1 promoter in endothelial cells." *Mol Cell Biol* **10**(9): 4854-4862.
- Wollberg, Z., R. Shabo-Shina, et al. (1988). "A novel cardiotoxic polypeptide from the venom of *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp): cardiac effects in mice and isolated rat and human heart preparations." *Toxicon* **26**(6): 525-534.
- Wort, S. J., M. Ito, et al. (2009). "Synergistic induction of endothelin-1 by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma is due to enhanced NF-kappaB binding and histone acetylation at specific kappaB sites." *J Biol Chem* **284**(36): 24297-24305.
- Wozniak, W. (1999). "Ependymal cells and astrocytes generate neurons." *Folia Morphol (Warsz)* **58**(3 Suppl 2): 7-11.
- Wu, D. Y., L. Ugozzoli, et al. (1991). "The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction." *DNA Cell Biol* **10**(3): 233-238.
- Wypij, D. M., J. S. Nichols, et al. (1992). "Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung." *Biochem Pharmacol* **43**(4): 845-853.
- Xie, M., W. Wang, et al. (2008). "Oxygen and glucose deprivation-induced changes in astrocyte membrane potential and their underlying mechanisms in acute rat hippocampal slices." *J Cereb Blood Flow Metab* **28**(3): 456-467.
- Xu, A. (1998). Gene Expression of Endothelin-System Components in Cultured Mouse Astrocytes: Regulation by Hypoxia. Institut

- für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Freien Universität Berlin.
- Xu, D., N. Emoto, et al. (1994). "ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1." *Cell* **78**(3): 473-485.
- Yamada, H. and K. Kurokawa (1998). "Histochemical studies on endothelin and endothelin-A receptor in the hypothalamus." *J Cardiovasc Pharmacol* **31**(Suppl. 1): S215-218.
- Yamada, T., S. Ohtani, et al. (2006). "Reduced expression of the endothelin receptor type B gene in piebald mice caused by insertion of a retroposon-like element in intron 1." *J Biol Chem* **281**(16): 10799-10807.
- Yamamoto, T., T. Kimura, et al. (1992). "Central effect of endothelin-1 on vasopressin release, blood pressure, and renal solute excretion." *Am J Physiol Endocrinol Physiol* **262**(6 Pt 1): E856-E862.
- Yamamoto, T. and H. Uemura (1998). "Distribution of endothelin-B receptor-like immunoreactivity in rat brain, kidney, and pancreas." *J Cardiovasc Pharmacol* **31**(Suppl. 1): S207-211.
- Yanagisawa, H., R. E. Hammer, et al. (2000). "Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development." *J Clin Invest* **105**(10): 1373-1382.
- Yanagisawa, H., R. E. Hammer, et al. (1998). "Role of Endothelin-1/Endothelin-A receptor-mediated signaling pathway in the aortic arch patterning in mice." *J Clin Invest* **102**(1): 22-33.
- Yanagisawa, H., M. Yanagisawa, et al. (1998). "Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene." *Development* **125**(5): 825-836.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* **332**(6163): 411-415.
- Yokokawa, K., H. Tahara, et al. (1991). "Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma." *Ann Intern Med* **114**(3): 213-215.
- Yoshida, H., T. Imaizumi, et al. (2005). "Platelet-activating factor enhances the expression of nerve growth factor in normal human astrocytes under hypoxia." *Brain Res Mol Brain Res* **133**(1): 95-101.
- Yoshizawa, T., O. Shinimi, et al. (1990). "Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system." *Science* **247**(4941): 462-464.
- Yu, A. C., Y. L. Lee, et al. (1995). "Gene expression in astrocytes during and after ischemia." *Prog Brain Res* **105**: 245-253.
- Zeidel, M. L., H. R. Brady, et al. (1989). "Endothelin, a peptide inhibitor of Na(+)-K(+)-ATPase in intact renaltubular epithelial cells." *Am J Physiol* **257**(6 Pt 1): C1101-1107.
- Zhao, Q., K. Pahlmark, et al. (1994). "Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats." *Acta Physiol Scand* **152**(3): 349-350.
- Zhu, Y.-C., Y.-Z. Zhu, et al. (2006). "The role of urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases." *Br J Pharmacol* **148**(7): 884-901.
- Zielke, H. R., J. T. Tildon, et al. (1990). "Effect of 8-bromo-cAMP and dexamethasone on glutamate metabolism in rat astrocytes." *Neurochem Res* **15**(11): 1115-1122.
- Zimmermann, M. and V. Seifert (1998). "Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview." *Neurosurgery* **43**(4).
- Ziv, I., G. Fleminger, et al. (1992). "Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke." *Stroke* **23**(7): 1014-1016.
- Zonta, M., M. C. Angulo, et al. (2003). "Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation." *Nat Neurosci* **6**(1): 43-50.

## 7. Danksagung

Ohne die ständige Unterstützung und Motivation meiner Eltern und meiner Geschwister wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

Meinem Doktorvater, Martin Paul, danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung für diese Arbeit, sein Vertrauen, dieses Projekt gemeinsam abzuschließen, sowie für seine Förderung meiner medizinischen und wissenschaftlichen Laufbahn.

Hans-Dieter Orzechowski danke ich die Betreuung der Arbeit.

Heiko Funke-Kaiser gilt mein Dank für die anregenden und inspirierenden Gespräche, sowie für seine Hilfsbereitschaft in jeder Phase des Projekts.

Frank Zollmann danke ich für unkonventionelle Betrachtungen wissenschaftlicher Fragestellungen und Anregungen.

Wolfgang Böcker danke ich für die Einarbeitung in das Thema und das Begleiten meiner ersten wissenschaftlichen Schritte.

Birgitta Schwaneberg und Christel Meißner für ihre Geduld, ihre Hilfsbereitschaft und Erfahrung, mit der sie mir bei der Bewältigung dieses Projekts weiter geholfen haben.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Kai Schmidt-Ott und Alexander Oksche, deren Rat und Anregungen ich gerne angenommen habe. Außerdem danke ich allen Mit-Doktorandinnen und Doktoranden, allen Kollegen im Labor für die freundschaftliche, konstruktive und immer kooperative Zusammenarbeit: Robert Real, Juliane Bolbrinker, Michael Richter, Lutz Liefeld, Andreas Zimmermann, Anne Weinstrauch, Nico Draheim, Steffen Theiss, Simone Gschwendt, Astrid Günter und Katrin Scheuch.



## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Marwan Manna‘a, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Endothelin-System und PAF im Astrozytenzellkulturmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 10.08.2010



# **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

# Publikationsliste

## **1. Everolimus in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease.**

Walz G, Budde K, Manna M, Nürnberger J, Wanner C, Sommerer C, Kunzendorf U, Banas B, Hörl WH, Obermüller N, Arns W, Pavenstädt H, Gaedeke J, Büchert M, May C, Gschaidmeier H, Kramer S, Eckardt KU.

N Engl J Med 2010;363:830-40.

## **2. Anaemia is an independent predictor of death in patients hospitalized for acute heart failure**

von Haehling S, Schefold JC, Hodoscek LM, Doehner W, Manna M, Anker SD, Lainscak M.

Clin Res Cardiol. 2010 Feb;99(2):107-13.