Aus dem Institut Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Charakterisierung eines transgenen Rattenmodells mit Koexpression des humanen Endothelin-B Rezeptors im glatten Gefäßmuskel

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Merlind Funck

Tierärztin aus Braunschweig

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3611

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. Hans-Dieter Orzechowski
Dritter Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. André Rex

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
receptors, transgenic, animal models, blood pressure, hypertension, radiotelemetry, vasocon-strictor agents, aorta

Tag der Promotion: 30.01.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-436-0
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved
© Mensch und Buch Verlag 2013
Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Das Endothelinsystem ... 1
1.2 Endotheline ... 1
1.3 Biosynthese der Endotheline ... 2
1.4 Endothelin-Converting-Enzyme ... 5
1.5 Endothelin-Rezeptoren ... 6
1.6 Signaltransduktion der ET-Rezeptoren ... 7
1.7 Glatte Gefäßmuskulatur ... 9
1.8 Agonisten und Antagonisten der ET-Rezeptoren ... 11
1.9 Pharmakologische ET-Wirkungen auf den Blutdruck ... 12
1.10 Pathophysiologie des Endothelinsystems ... 13
1.10.1 Plasmakonzentrationen von ET ... 13
1.10.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen ... 14
1.10.2.1 Hypertonie ... 14
1.10.2.2 Herzinsuffizienz ... 16
1.10.3 Gefäßerkrankungen ... 17
1.10.3.1 Atherosklerose ... 17
1.10.3.2 Restenose ... 17
1.10.4 Pulmonale arterielle Hypertonie ... 18
1.11 Transgene Technologie ... 19
1.12 Mikroinjektion ... 20
1.13 Generierung des transgenen DNA-Konstrukts ... 21
1.14 Expression des Transgens ... 22
1.15 Transgene Tiermodelle für das Endothelinsystem ... 24
1.16 Ziel der Arbeit ... 26
2 Material und Methoden ... 27
2.1 Generierung transgener Rattenlinien ... 27
2.2 Genotypisierung ... 27
2.2.1 DNA-Isolierung ... 27
2.2.2 Genomische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 28
2.2.3 Gelelektrophorese ... 29
2.2.4 Material für DNA-Isolierung, PCR, Gelelektrophorese ... 30

2.3 Telemetrische Blutdruckmessung ... 32
2.3.1 Implantation der Telemetriesender ... 32
2.3.2 Aufzeichnung des Blutdrucks mittels Radiotelemetrie ... 33
2.3.3 Material telemetrische Blutdruckmessung ... 35
2.4 Histomorphometrie ... 36
2.4.1 Explantation der Telemetriesender und Entnahme der Aorten ... 36
2.4.2 Herstellung mikroskopischer Schnitte ... 36
2.4.3 Histomorphometrische Messung ... 37
2.4.4 Material Histologie und Histomorphometrie ... 38
2.5 Statistische Auswertungen ... 40
3 Ergebnisse ... 41
3.1 Genotypisierung ... 41
3.2 Blutdruck und Herzfrequenz ... 42
3.2.1 Blutdruck ... 45
3.2.1.1 Systolischer Blutdruck ... 45
3.2.1.2 Mittlerer Blutdruck ... 47
3.2.1.3 Diastolischer Blutdruck ... 49
3.2.2 Herzfrequenz ... 52
3.3 Histomorphometrie ... 55
4 Diskussion ... 57
4.1 Radiotelemetrie ... 57
4.1.1 Stichprobenplanung ... 58
4.1.2 Zeitpunkt der Untersuchung ... 58
4.2 Blutdruckphänotyp transgener Rattenlinien im Basalzeitraum ... 59
4.3 Blutdruckphänotyp der tg ET_BR-Rattenlinien unter Einfluss von L-NAME ... 61
4.4 Histomorphometrie ... 62
4.5 Histomorphometrischer Phänotyp transgener Rattenlinien ... 62
4.6 Schlussfolgerungen ... 64
5 Zusammenfassung ... 65
6 Summary ... 66
7 Anhang ... 67
8 Literaturverzeichnis ... 87
9 Danksagung ... 98
10 Selbstständigkeitserklärung ... 99

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme (Angiotensin-konvertierendes Enzym)
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
bpm	beats per minute (Schläge pro Minute)
cAMP	cyclic AMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cGMP	cyclic GMP (zyklisches Guanosinmonophosphat)
COX-1	Cyclooxygenase-1
DAG	Diacylglycerin
ECE	Endothelin-Converting-Enzyme (Endothelin-Konversionsenzym)
eCG	equines Choriongonadotropin
EDCF	Endothelium-Derived Contraction Factor (endothelialer Kontraktionsfaktor)
eNOS	endotheliale Stickoxidsynthase
ET	Endothelin(e)
ET-R	Endothelin Rezeptor(en)
ET_AR	Endothelin-A Rezeptor(en)
ET_BR	Endothelin-B Rezeptor(en)
EZ	Endothelzelle(n)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
G-Protein	Guaninnukleotidbindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
hCG	humanes Choriongonadotropin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IP_3	Inositoltriphosphat
IP_4	Inositoltetraphosphat
KG	Körpergewicht
L-NAME	n-Nitro-L-Arginine Methyl Ester
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein geringer Dichte)
mRNA	messenger-RNA
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PGI2	Prostazyklin, Prostaglandin I2
PIP_2	Phosphatidylinositoldiphosphat
PL-A2	Phospholipase A_2
PL-C	Phospholipase C
RAS	Renin-Angiontensin-System
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SMCs	smooth muscle cells (glatte Muskelzellen)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
tg	transgen/-en
TGF	Transforming Growth Factor (Transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	Tumornekrosefaktor
VSMCs	vascular smooth muscle cells (glatte Gefäßmuskelzellen)

1 Einleitung

1.1 Das Endothelinsystem

Das Endothelinsystem hat seit seiner Entdeckung eine große Rolle in der biomedizinischen Forschung eingenommen. Die Erkenntnisse über Physiologie und Pathophysiologie der Endotheline resultierten in der Entwicklung von therapeutischen Konzepten.

Hickey et al. (1985) waren die Ersten, die den Kontraktionsfaktor EDCF entdeckten. Durch Yanagisawa et al. (1988) wurde EDCF isoliert und nach seinem Bildungsort dem Endothel - als Endothelin (ET) benannt. Endothelin gilt als der stärkste und langanhaltendste Vasokonstriktor (Maguire und Davenport 2002), 100-mal stärker als Noradrenalin (Yanagisawa et al. 1988; Luscher und Barton 2000).

1.2 Endotheline

Zu den Endothelinen zählen die Isopeptide Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). ET-1 ist das biologisch bedeutsamste und bisher am besten erforschte Endothelin (Yanagisawa und Masaki 1989). Es hat eine auffallende Strukturähnlichkeit zu den Sarafotoxinen. Diese gehören zu den Schlangengiften der *Atractaspididae* Familie (Kloog et al. 1988). Das Gift von *Atractaspis engaddensis* ist der stärkste Vasokonstriktor unter den Sarafotoxinen. Ein Biss der Schlange führt innerhalb kürzester Zeit zum Tode (Kochva et al. 1993).

Alle drei Isopeptide bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren und 2 Disulfidbrücken, die sich am N-Terminus befinden. Am C-Terminus ist ein hydrophober Rest. ET-2 besitzt die größte strukturelle Ähnlichkeit zu ET-1, es unterscheidet sich nur in zwei Aminosäuren, während ET-3 sechs andere Aminosäuren hat. Zwischen den humanen Endothelinen und denen der Ratte differenziert die Aminosäuresequenz nur beim ET-2 an Position 4, wo Serin gegen Asparagin getauscht ist (Inoue et al. 1989; Yanagisawa und Masaki 1989).

Die Bildungsorte des ET unterscheiden sich zwischen den einzelnen Peptiden. ET-1 wird durch das Gefäßendothel, glatte Muskelzellen und Epithelzellen der Atemwege produziert, aber auch von Makrophagen, Fibroblasten, Kardiomyozyten, Neuronen des Gehirns und den Pankreasinseln (Luscher und Barton 2000; Kedzierski und Yanagisawa 2001). Neben der vasokonstriktorischen Wirkung von ET-1 (Yanagisawa et al. 1988) wurde bei in vitro Studien der Anstieg der Expression von Transkriptionsfaktoren (c-fos, -jun, c-myc, VL-30) durch

ET-1 festgestellt. Weiterhin aktiviert das Peptid neutrophile Granulozyten, Mastzellen und die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL-1b, IL-6, IL-8), Tumornekrosefaktor (TNF-α) und Wachstumsfaktoren (TGF-β, FGF, PDGF) (Lee et al. 1991; Browatzki et al. 2000; Amiri et al. 2004). ET-1 stimuliert die Plättchenaggregation und ist chemotaktischer Faktor für Makrophagen (Haller et al. 1991; Knofler et al. 1995).

ET-2 ist das humane Gegenstück zum vasoaktiven intestinalen Konstriktor (VIC), der bei Ratten und Mäusen entdeckt wurde (Bloch et al. 1991). VIC unterscheidet sich von ET-2 nur durch eine Aminosäuresequenz. Die Genexpression von ET-2/VIC (im Folgenden ET-2 genannt) wurde in Organen wie Intestinum, Ovarien, Uterus, Magen, Hoden und Gehirn nachgewiesen (Uchide et al. 1999; Saida et al. 2000; Saida et al. 2002). Zu den biologischen Aktivitäten von ET-2 zählen Vasokonstriktion, glatte Muskelzellkontraktion und Zellwachstum (Fang et al. 1994; Iwashima et al. 1997). Seine spezifische physiologische Bedeutung ist teilweise noch unklar. Eine Beteiligung an der Ovulation wurde aber bereits bestätigt (Ko et al. 2006).

ET-3 kommt in Endothelzellen (EZ), Gehirnnerven, Nierentubuli und dem Verdauungstrakt vor. Es vermittelt die Freisetzung von Vasodilatoren wie Stickoxid (NO) und Prostazyklin (PGI2) (Kedzierski und Yanagisawa 2001).

1.3 Biosynthese der Endotheline

Die Gene, die für die menschlichen Endotheline kodieren, befinden sich auf den Chromosomen 6, 1 und 20 (Arinami et al. 1991). Die aus der Transkription resultierenden messenger-RNAs (mRNA) bilden nach der Translation Vorläufer der zukünftigen ET-Isoformen, die sogenannten Präproendotheline. Diese Vorläufermoleküle bestehen aus 212 Aminosäuren, die durch die Endopeptidase Furin in eine weitere biologisch inaktive Form, das Big-Endothelin, gespalten werden. Die Zwischenform hat eine Größe von 37 bis 41 Aminosäuren und wird durch das Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) und andere Enzyme wie Nicht-ECE-Metalloproteinasen und Chymasen in die aktiven Endotheline umgewandelt (Xu et al. 1994; Kido et al. 1998; Ikeda et al. 1999). Chymasen können eine Sonderform von ET mit 31 statt 21 Aminosäuren entstehen lassen. Für jede ET-Isoform wurde eine Variante mit 31 Aminosäuren entdeckt. Diese längere Form führt ebenfalls zur Kontraktion von glatten Muskelzellen (Nakano et al. 1997).

Reguliert wird ET hauptsächlich auf der Syntheseebene, vor allem während der Transkription. ET-1 mRNA wird hochreguliert und stimuliert so die ET-1 Synthese. Auslöser dieser Stimu-

lation sind vasoaktive Hormone, Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und Lipoproteine wie Angiotensin II (Ang II), Vasopressin, Katecholamine, Thrombin und Insulin. Ebenso können physiochemische Faktoren wie Hypoxie und erhöhte Scherkräfte die ET-Produktion auslösen. Eine Hemmung der Synthese wird durch Stickstoffmonoxid, Prostazykline, Heparin und das atriale natriuretische Peptid (ANP) vermittelt (Boulanger und Luscher 1990; Resink et al. 1990; Gray und Webb 1996). Endothelzellen besitzen sogenannte Weibel-Palade-Körperchen, die als Speicherort für ET-1 dienen. Bei einer Stimulation der EZ fusionieren die Körperchen mit der Plasmamembran und entlassen das ET-1 über Exozytose (van Mourik et al. 2002). Die Plasmahalbwertzeit von ET-1 liegt zwischen 4 und 7 Minuten, während deren mRNA innerhalb von 15-20 Minuten abgebaut wird (Inoue et al. 1989). Entfernt wird ET-1 vor allem über die Lungen (mehr als 50 % beim ersten Passieren), Leber, Niere und Herz durch eine Komplexbildung mit dem Endothelin-B Rezeptor (Fukuroda et al. 1994; Dupuis et al. 1997). Der schnelle Metabolismus ist verantwortlich für die geringe zirkulierende Konzentration von ET-1, die nur im picomolaren Bereich liegt (1-10pmol/l). Diese geringe Menge ist nicht ausreichend für eine vaskuläre Kontraktion (Battistini et al. 1993).

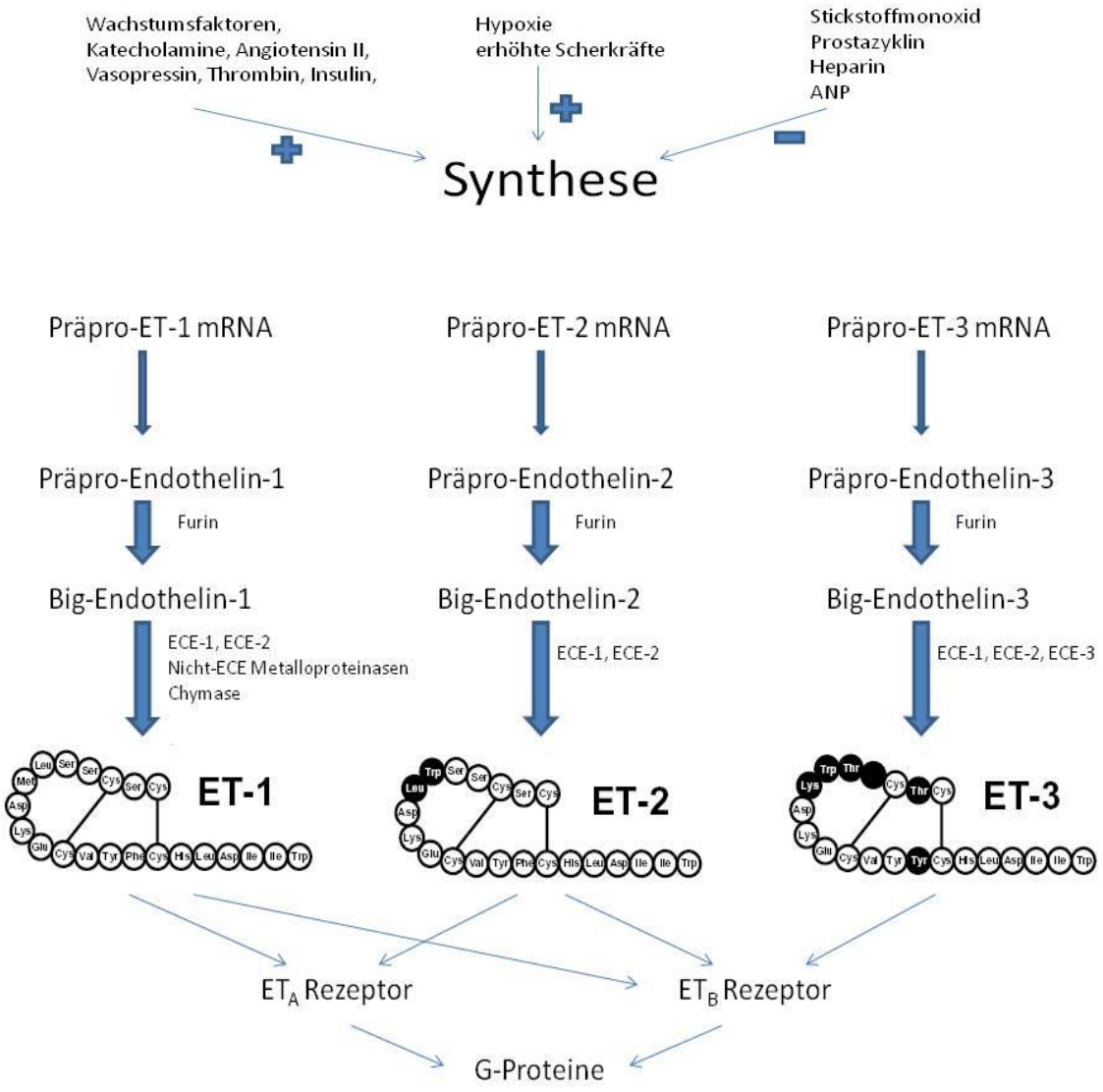

Abbildung 1: Endothelinsynthese. Aus Präproendothelin mRNA werden nach der Translation Präproendotheline gebildet. Daraus werden mit Hilfe von Furin Big-Endotheline gespalten. ECEs, Nicht-ECE Metalloproteinasen und Chymase bilden die aktiven Endotheline, die über G-Protein gekoppelte ET_A und ET_B Rezeptoren ihre Wirkung vermitteln. Die Abbildung zeigt auch, welche Faktoren die Synthese der Endotheline stimulieren oder hemmen. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Endothelinen sind hervorgehoben.

1.4 Endothelin-Converting-Enzyme

Die physiologische Bedeutung der Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) wird nach Spaltung von Big-ET in ET durch einen 140-fachen Anstieg in der Vasokonstriktionsstärke deutlich. Das macht ECE zu einem wichtigen Faktor in der Biosynthese der Endotheline (Yanagisawa et al. 2000).

Bisher wurden drei Formen von ECE (ECE-1, ECE-2, ECE-3) nachgewiesen. Alle gehören zu der Klasse der Typ II zinkabhängigen, membrangebundenen Metalloproteasen aus der Neprilysinfamilie. Somit bestehen die ECEs aus einem kurzen N-terminalen zytoplasmatischen Anteil, dem transmembranen hydrophoben Teil und dem C-terminalen extrazellulären Anteil, der auch für die katalytische Aktivität verantwortlich ist. Eine Inhibition der Metalloproteasen und somit auch die Umwandlung von Big-ET in aktives ET ist durch Phosphoramidon möglich (Ikegawa et al. 1990). ECEs sind nicht spezifisch für die Spaltung der Big-Endotheline. Johnson et al. (1999) fanden heraus, dass z.B. auch Neurotensin, Substanz P und Bradikinin durch ECEs abgebaut werden.

ECE-1 hat vier Isoformen (ECE-1a, 1b, 1c, 1d), die sich nur wenig in der Sequenz des zytoplasmatischen Anteils unterscheiden und unterschiedlich verteilt sind (Valdenaire et al. 1995; Valdenaire et al. 1999; Jafri und Ergul 2003). ECE-1a und ECE-1c befinden sich in der Plasmamembran, während ECE-1b und ECE-1d innerhalb der Zelle nachgewiesen wurden. Die Isoformen haben die Möglichkeit zur Heterodimerisierung, womit deren Verteilung und Aktivität beeinflussbar sind (Muller et al. 2003). Möglicherweise spielt die Verteilung eine zentrale Rolle in der Regulation des ET-Systems. Die Aktivität von ECE-1 ist bei einem pH-Wert von 6,8 am höchsten.

ECE-2 wurde aus der bovinen Nebennierenrinde geklont und stimmt in den strukturellen Eigenschaften mit ECE-1 überein. Der Hauptunterschied zwischen beiden Enzymen liegt in deren pH-Optimum. Bei ECE-2 liegt dies bei einem pH-Wert von 5,6. Dieser Wert deutet darauf hin, dass ECE-2 seine Aktivität zur ET-Synthese vorwiegend innerhalb der Zelle ausübt, da dort ein saurer pH-Wert herrscht (Emoto und Yanagisawa 1995). ECE-2 findet sich in verschiedensten Geweben und Organen wie Gefäßendothelzellen, Uterus, Ovar, Herz, Lunge und Leber. Es existieren mehrere Isoformen (ECE-2a-1, 2a-2, 2b-1, 2b-2) (Ikeda et al. 2002). ECE-1 und ECE-2 haben eine Affinität zu Big-ET-1 und spalten dies zwischen $Tryptophan_{21}$ und $Valin_{22}$ (Inoue et al. 1989; Opgenorth et al. 1992).

Über ECE-3 gibt es bislang wenige Erkenntnisse. Die Spaltung von Big-ET-3 in ET-3 durch ECE-3 ist spezifisch und findet zwischen $Tryptophan_{21}$ und $Isoleucin_{22}$ statt. Der volle Um-

fang seiner physiologischen Rolle ist allerdings unklar (Hasegawa et al. 1998; Lee et al. 2001).

1.5 Endothelin-Rezeptoren

Die Klassifizierung von Rezeptoren wird offiziell von der IUPHAR (The International Union of Pharmacology) vorgenommen. In einem ersten Bericht von 1994 (Masaki et al.), der 2002 (Davenport) aktualisiert wurde, werden zwei Rezeptoren für Endotheline genannt: Endothelin-A Rezeptor (ET_AR) und Endothelin-B Rezeptor (ET_BR). Anfang der 90er Jahre wurden diese Rezeptoren aus Geweben von Ratte und Rind isoliert und geklont (Arai et al. 1990; Lin et al. 1991). Beim Krallenfrosch (Xenopus laevis) wurde ein weiterer Rezeptor entdeckt und mit ET_C benannt. Dieser hat eine hohe Bindungsaffinität zu ET-3, konnte aber bei Säugetieren noch nicht nachgewiesen werden (Karne et al. 1993).

Die ET-Rezeptoren gehören zur G-Protein gekoppelten Rhodopsin-Superfamilie. Charakteristisch für diese Familie sind Rezeptoren mit sieben hydrophoben transmembranen Segmenten, die einen externen Amino-Terminus und einem internen Carboxy-Terminus besitzen. Die transmembranen Segmente sind über extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Humane ET_AR und ET_BR haben eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 59 %. Zwischen Mensch und Ratte bzw. Rind gleicht sich die Sequenz beim ET_AR über 90 %. Für den ET_BR liegt eine ca. 88%ige Homologität bei Mensch und Ratte vor (Pollock et al. 1995; Davenport 2002).

Die Affinität von ET-1 und ET-2 zum ET_AR ist um ein Vielfaches höher als die von ET-3. Im Gegensatz dazu haben die drei Endotheline zum ET_BR eine gleich starke Affinität (Hosoda et al. 1991; Sakamoto et al. 1991).

Die unterschiedliche Verteilung der ET-Rezeptoren im Gewebe ist verantwortlich für die Vielfalt der Reaktion auf ET. Die mRNA für den ET_AR wird vor allem auf glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs), Kardiomyozyten, Fibroblasten und dem Endothel von Gefäßen des Gehirns exprimiert (Hosoda et al. 1991; Molenaar et al. 1993; Spatz et al. 1997). Der ET_AR hat die dominierende Rolle bei der Vermittlung von Vasokonstriktion, inflammatorischen Prozessen und Zellproliferation durch ET (Finsnes et al. 1997; D'Orleans-Juste et al. 2002). ET_BR sind vorwiegend in Endothelzellen zu finden, wo die Aktivierung des Rezeptors zur Produktion der Vasodilatoren Stickoxid und Prostazyklin führt. Bei Vorkommen auf VSMCs vermittelt der ET_BR auch Vasokonstriktion. In Parenchymen von Organen wie Lunge, Leber und Niere wurde der ET_BR ebenso nachgewiesen. Dort haben die Rezeptoren Anteil an der Ent-

fernung von zirkulierendem ET (Fukuroda et al. 1994; Dupuis et al. 1997). Shichiri et al. (1998) wiesen außerdem eine anti-apoptotische Wirkung des ET_BR in Endothelzellen nach. Beide Rezeptoren sind in die Vermittlung von fibrotischen Effekten der ET involviert (Clozel und Salloukh 2005; Shi-Wen et al. 2007).

Ursprünglich wurde angenommen, dass ET_BR nur eine Vasodilatation vermitteln (Warner et al. 1989). Moreland et al. (1992) widerlegten diese Theorie und wiesen eine durch ET_BR vermittelte Konstriktion an Venen nach. Daraufhin wurden zwei Subtypen des ET_BR benannt, unterschieden durch ihre Lokalisation und pharmakologische Wirkung. Der $ET_{B1}R$ befindet sich am Endothel und bewirkt eine Dilatation, während sich der $ET_{B2}R$ am glatten Gefäßmuskel befindet und eine Konstriktion verursacht (Warner et al. 1993; Mizuguchi et al. 1997). Diese Nomenklatur wurde allerdings vom IUPHAR nicht offiziell übernommen, da keine entsprechend kodierenden Gene nachgewiesen werden konnten.

Die Anzahl der vorhandenen Rezeptoren ist variabel und kann situationsbedingt angepasst werden. Hypoxie, Wachstumsfaktoren, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Östrogene können die Expression von ET_AR hochregulieren, während durch ET, Angiotensin II und verschiedene Wachstumsfaktoren das Gegenteil bewirkt wird. ET_BR werden durch C-Typ natriuretisches Peptid und Angiotensin II hochreguliert, cAMP und Catecholamine führen zur Herunterregulation von ET_BR (Levin 1995).

1.6 Signaltransduktion der ET-Rezeptoren

Von EZ produziertes ET wirkt autokrin bzw. parakrin, indem es auf die abluminale Seite zu angrenzenden glatten Muskelzellen geleitet wird (Howard et al. 1992; Wagner et al. 1992). Die Bindung von ET an seinen Rezeptor ist stark und löst eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade (Abbildung 2) aus (Masaki et al. 1991). Phospholipase C (PL-C) wird unter Vermittlung von entsprechenden G-Proteinen aktiviert und spaltet Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP_3). Das neu gebildete IP_3 setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), frei. Zum Ca^{2+}-Anstieg in der Zelle trägt auch ein Einstrom durch Kalziumkanäle aus dem Extrazellularraum bei, der durch Phosphorylierung von IP_3 zu 1,3,4,5,-Inositoltetraphosphat (IP_4) gefördert wird. Die darauf folgende Depolarisation der Zelle öffnet spannungsabhängige Kalziumkanäle (Goto et al. 1989; Highsmith et al. 1989; Marsden et al. 1989; Inoue et al. 1990). Gesteigerte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentrationen führen zu einer Komplexbildung mit Calmodulin. Durch diese Verbindung werden Neurotrans-

mitter abgegeben und die Sekretion und Aktivierung von Enzymen ausgelöst. Ein wichtiges Enzym ist dabei die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase, die nach ihrer Aktivierung Phosphat von ATP auf die Myosinköpfe überträgt (Miller et al. 1993). Diese binden an Aktin und der Querbrückenmechanismus wird in Gang gesetzt. DAG aktiviert den Na^+-H^+-Austauscher, der H^+ im Austausch mit Na^+ aus der Zelle pumpt. Die daraus resultierende Alkalisierung der Zelle fördert die Empfindlichkeit der Myofilamente für Kalzium, was die Kontraktion steigert (Kramer et al. 1991). DAG und Kalzium aktivieren die Proteinkinase C. Diese wiederum phosphoryliert zytosolische Proteine, die an der Proteinsynthese, zellulären Proliferation und Kontraktion beteiligt sind (Bell et al. 1986). Die in der Zellmembran sitzende Phospholipase A_2 (PL-A2) spaltet aus DAG und Triglyceriden die mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure ab, aus der die Eicosanoide gebildet werden. Eicosanoide tragen zur Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und Vasokonstriktion bei (Trevisi et al. 2002). Die Bindung an den ET_BR auf EZ bewirkt auch eine Aktivierung der PL-C, um erhöhte Ca^{2+}-Konzentrationen zu erreichen und resultiert in einer Dilatation. Ca^{2+} bildet mit Calmodulin einen Komplex und aktiviert die NO-Synthase, die aus L-Arginin NO bildet. NO diffundiert in die benachbarten Gefäßmuskelzellen, aktiviert dort die plasmatische Guanylylzyklase, die Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt. Der Anstieg des intrazellulären cGMP führt zu einer Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen, die den intrazellulären Kalziumspiegel herabsetzen und so zu einer Relaxation führen. Möglich ist dies auch durch die Bildung von Prostazyklin (PGI_2) aus Arachidonsäure, katalysiert durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1). PGI_2 bindet an seine spezifischen Rezeptoren auf der Muskelzelloberfläche. Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktivieren die Adenylatcyclase, was zur Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt. Der second messenger cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die wiederum den Kalziumspiegel senkt und zur Dilatation führt (Sokolovsky 1995; Mitchell et al. 2008).

Es wird angenommen, dass die Endothelrezeptoren eine höhere Sensitivität für ET-1 haben, als die Rezeptoren der glatten Muskulatur. Bei der intravenösen Gabe von niedrigen ET-1-Konzentrationen wurde eine Dilatation erzielt. Während ET-1 bei höheren Konzentrationen oder einer Schädigung des Endothels, das Endothel durchdringt und eine Vasokonstriktion auslöst (Mehta et al. 1992; Masaki 1995).

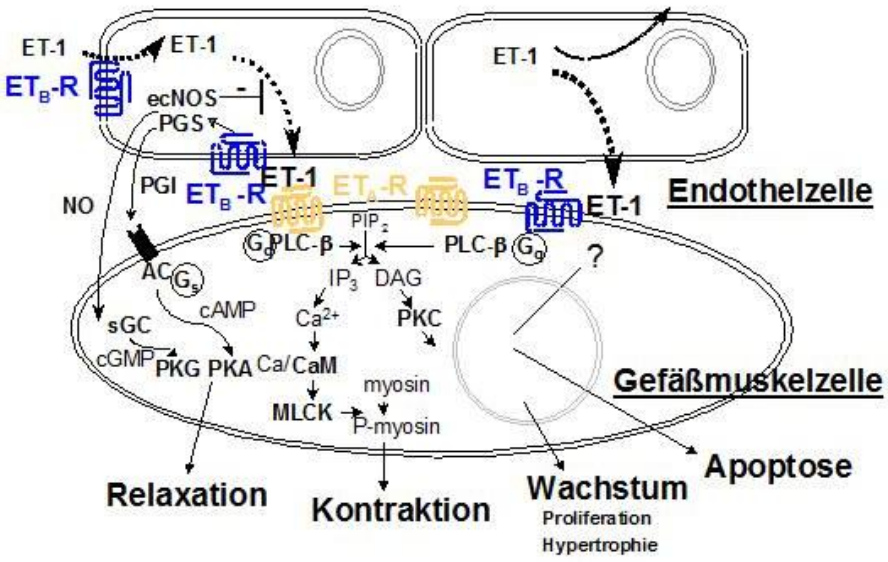

Abbildung 2: Signaltransduktionswege der Endothelinrezeptoren (zur Verfügung gestellt von PD Dr. H.-D. Orzechowski; AC Adenylylcyclase, Ca/CaM Calcium-Calmodulinkomplex, cGMP zyklisches Guanosin 3',5-Monophosphat, DAG Diacylglycerol, ecNOS endotheliale Stickoxidsynthase, Gq G-Protein alpha q, IP_3 Inositoltriphosphat, MLCK Myosinleichtkettenkinase, PGI Prostazyklin, PGS Prostaglandinsynthase, PIP_2 Phosphoinositolbisphosphat, PKA Proteinkinase A, PKC Proteinkinase C, PKG Proteinkinase G, PLC Phospholipase C, NO Stickoxid, sGC plasmatische Guanylylcyclase)

1.7 Glatte Gefäßmuskulatur

Besonders in der Körperperipherie zeichnet sich die Gefäßwandung der Arterien durch einen Reichtum an glatten Muskelzellen (SMCs) aus: Arterien vom muskulären Typ. Der Schichtenaufbau von Gefäßen ist dort besonders klar ausgeprägt. Auf die Tunica interna (Intima) folgt die Tunica media (Media) und schließlich die Tunica externa (Adventitia). Die Media besteht aus 10-60 dicht gefügten, spindelförmigen Myozytenschichten, die das Gefäßrohr zirkulär oder spiralig umziehen. Zwischen den Schichten liegt ein Netz aus kollagenen, retikulären und elastischen Fasern, sowie zur Eigenversorgung Vasa vasorum bzw. Nervi vasorum. Im Stratum subendotheliale der Intima kommen auch vereinzelt glatte Muskelzellen vor.

Die Kontraktion bzw. Relaxation der glatten Muskulatur wird durch die Änderung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ausgelöst. Die Matrix der Muskulatur aus Elastin und Kollagen bestimmt die Kraft-Längen-Beziehung im relaxierten Muskel. Sie widersteht Dehnungskräften und begrenzt die Volumenzunahme in Hohlorganen. Glatte Muskeln können sich, bezogen auf ihre Ausgangslänge, stärker verkürzen als Skelettmuskeln und benötigen weniger

Energie. Sie entwickeln außerdem im Vergleich zum Skelettmuskel eine doppelt so große Kraft pro Muskelquerschnitt (60 N/cm²) (Deetjen und Speckmann 1994; Weyrauch und Smollich 1998).

Während der Entwicklung werden verschiedene Phänotypen glatter Muskelzellen unterschieden. Die Hauptaufgabe der ausgebildeten SMCs ist die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, weshalb vom „kontraktilen Phänotyp“ die Rede ist. Die Kontraktion von glatten Muskelzellen begrenzt die Lumengröße in Blutgefäßen und regelt die Perfusion der Organe. In der Embryogenese, sowie auch bei Reparationsprozessen der Gefäßwand wird vom „synthetischen Phänotyp“ gesprochen. Seine Funktion ist vor allem die Proliferation, Migration und Produktion von Matrixkomponenten (Campbell und Campbell 1990; Thyberg et al. 1990). An kultivierten Zellen konnte gezeigt werden, dass Fibronektin als Plasmabestandteil ein Aktivator der Umwandlung vom kontraktilem zum synthetischen Phänotyp ist, der für die Proliferation der SMCs entscheidend ist. Laminin bewirkte das Gegenteil (Hedin et al. 1988).

SMCs können auf veränderte Bedingungen, verschiedene Wachstumsfaktoren und andere Stimuli mit Hyperplasie und/oder Hypertrophie reagieren. Bei Schädigungen des Endothels migrieren SMCs aus der Media in die Intima. Dort werden sie durch PDGF, Zytokine (TNF-α, TGF-β, IL-1, IL-6) und andere Wachstumsfaktoren (IGF-1, EGF, FGF), die aus Makrophagen, Thrombozyten, beschädigtem Endothel und aus Muskelzellen selbst sezerniert werden, zur Proliferation angeregt. In gesunden humanen Arterien kommen die meisten der Mediatoren nur in geringen Mengen vor (Thyberg et al. 1990; Raines und Ross 1993).

Die Gefäßwand ist durch Pulsation und Scherkräfte des Blutflusses ständigen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Akute oder chronische Änderungen des Blutflusses oder –drucks führen zu Anpassungsvorgängen der einzelnen Wandkomponenten (Heistad und Baumbach 1992; Heagerty et al. 1993). Durch Moreau et al. (1997) wurde die Beziehung zwischen systolischem Blutdruck und dem Media/Lumen-Verhältnis bewiesen. Hierbei zeigte sich, dass Angiotensin II in der Lage ist, die ET-1 Gewebekonzentration in vivo zu erhöhen. Dies führte zu Gefäßhypertrophie in Widerstandsgefäßen und ansteigendem Blutdruck. Somit erhöht sich das Media/Lumen-Verhältnis bei erhöhtem Blutdruck, durch eine Zunahme der Mediadicke und eine Abnahme des Lumendurchmessers. Durch ET_AR-Antagonisten konnte eine Normalisierung der Gefäßstruktur erreicht werden.

Auch Schiffrin et al. stellten bei hypertensiven Patienten eine gesteigerte Expression von ET-1 Genen fest, die zur Hypertrophie der glatten Muskulatur und somit zur chronischen Verengung der kleinen Gefäße führen kann (Schiffrin et al. 1997).

1.8 Agonisten und Antagonisten der ET-Rezeptoren

Viele Wirkungen des ET wurden durch die Forschung mit Agonisten und Antagonisten erkannt. Für den ET_BR existiert der spezifische Agonist Sarafotoxin 6c (S6c). Dieser induziert in Widerstandsgefäßen (isoliert aus subkutanem Fett von Menschen und dem Mesenterium von Ratten) eine schwächere Gefäßkontraktion als ET-1. Diese Wirkung bleibt auch bei Einsatz eines ET_AR-Antagonisten bestehen (Zhou et al. 2004). Für den ET_AR gibt es keinen vergleichbar spezifischen Agonisten (Watts 2010).

Kurz nach der Entdeckung des Endothelins wird über den ersten Rezeptorantagonisten berichtet, der relativ unspezifisch einige ET-1 Reaktionen blockiert (Fabregat und Rozengurt 1990). Aus Fermentationsprodukten von *Streptomyces misakiensis* konnte daraufhin ein kompetitiver ET-Antagonist isoliert werden (Ihara et al. 1991). Des Weiteren wurde ein Strukturanalogon zu ET-1 synthetisiert, das die Vasokonstriktion verhindert (Spinella et al. 1991). Möglich ist die selektive Blockade eines Rezeptors (ET_A oder ET_B) oder beider ET-Rezeptoren. Mit der Entwicklung des zyklischen Pentapeptids BQ-123 (Ihara et al. 1992) und dem linearen Peptid FR139317 (Sogabe et al. 1993) wurden zwei hoch selektive ET_AR-Antagonisten geschaffen, die die ET-Forschung vorantrieben. Ihr klinischer Einsatz war allerdings begrenzt, da Peptidasen im Gastrointestinaltrakt und in der systemischen Zirkulation schnell zur Hydrolyse der Blocker führten. So wurden oral verwendbare Nicht-Peptid-Antagonisten entwickelt, die wirksamer, aber nicht mehr so selektiv waren und teilweise auch die Blut-Hirn-Schranke passieren konnten. Auch für den ET_BR wurden selektive Antagonisten entdeckt, Peptide (BQ-788) (Ishikawa et al. 1994) und Nicht-Peptide (A-192621, Ro 468443) (Clozel und Breu 1996; von Geldern et al. 1999). Ihre Wirksamkeit und Selektivität ist schwächer als der Blocker der ET_AR.

Anhand des zirkulierenden ET-1 Gehalts kann in vivo die Empfindlichkeit eines Rezeptors bestimmt werden. Steigt der ET-1 Gehalt nach Gabe eines ET-Antagonisten an, deutet das auf die Blockade des ET_BR hin (Holm und Franco-Cereceda 1999). Selektive ET_BR-Antagonisten und nicht-selektive ET-Rezeptorblocker verhindern die Beseitigung von ET-1 in den Lungen und lassen somit den ET-1 Spiegel ansteigen (Dupuis et al. 1996; Hemsen et al. 1996). Bei Primaten wurde nach Gabe eines ET_BR-Blockers von einem 3,5-fachen Anstieg der ET-1 Konzentration berichtet (Reinhart et al. 2002). Nach Gabe von nicht-selektiven Blockern stieg der ET-1 Gehalt sogar um das 2- bis 11-fache an (Donckier et al. 1995; Weber et al. 1996; Dingemanse und van Giersbergen 2004; Goddard et al. 2004). Spezifische ET_AR-Antagonisten verursachten keinen Anstieg der ET-1 Konzentration (Douglas et al. 1998).

Als Arzneimittel zugelassen sind derzeit der nicht-selektive ET-R-Antagonist Bosentan (pulmonale Hypertonie; Handelsname Tracleer®) und der ET_A-selektive Antagonist Ambrisentan (pulmonale Hypertonie, Handelsname Letairis®). Sitaxentan (pulmonale Hypertonie; Handelsname Thelin®) wurde im Dezember 2010 aus Sicherheitsgründen vom Markt genommen (Galie et al. 2011). Macitentan (Actelion Pharmaceuticals Ltd, Allschwil, Schweiz) ist ein neuer ET-R-Antagonist, der zurzeit in klinischen Studien zur pulmonalen arteriellen Hypertonie erprobt wird (Clozel et al. 2013).

Tabelle 1: In der Therapie eingesetzte Endothelin-Antagonisten

Präparat	Zielrezeptor	Indikation
Ambrisentan (LU-208075/BSF-208075)	ET_A	Pulmonale arterielle Hypertonie
Atrasentan (ABT-627/A-147627)	ET_A	Kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs
Bosentan (RO 47-0203)	ET_A / ET_B	Pulmonale arterielle Hypertonie
Clazosentan (RO 61-7790)	ET_A	Hirninfarkt
Darusentan (LU-135252)	ET_A	Systemische Hypertonie
Edonentan (BMS-207940)	ET_A	Kongestives Herzversagen
Enrasentan (SB-217242)	ET_A / ET_B	Kongestives Herzversagen
Macitentan	ET_A/ET_B	Pulmonale arterielle Hypertonie
Sitaxentan (TBC-11251)	ET_A	Kardiovaskuläre Erkrankungen, Pulmonale arterielle Hypertonie
TBC-3711	ET_A	Kardiovaskuläre Erkrankungen, Pulmonale arterielle Hypertonie
Tezosentan (RO 61-0612)	ET_A / ET_B	Akutes Herzversagen, Hepatorenales Syndrom

1.9 Pharmakologische ET-Wirkungen auf den Blutdruck

Die lang anhaltende und starke Vasokonstriktion von ET wird primär durch den ET_AR vermittelt. Ausgleichend dazu vermitteln der ET_BR und NO die Vasodilatation, so wird der physiologische Vasotonus aufrecht erhalten (Spieker et al. 2001). Beide Rezeptortypen finden sich auf glatten Gefäßmuskelzellen. ET_A dominiert auf allen Gefäßtypen und ist kaum auf EZ zu finden (Davenport et al. 1995).

Die intravenöse Injektion von ET verursacht am Tiermodell zunächst einen kurzzeitigen Abfall des systolischen Blutdrucks, gefolgt von einem über 60 Minuten anhaltendem Anstieg (Masaki 1995). Durch die Sekretion von NO und Prostazyklin wird über den ET_BR auf EZ der kurze Abfall des Blutdrucks vermittelt. Dazu kommt die Entfernung von ET-1 durch den ET_BR aus der Zirkulation. Zu einem geringen Anteil ist der ET_BR auch an der Konstriktion beteiligt, hauptsächlich wird diese aber durch den ET_AR auf den glatten Muskelzellen vermittelt (D'Orleans-Juste et al. 2002).

Eine Kreuzung aus transgenen Mäusen, die ET-1 überexprimieren und endotheliale Stickoxidsynthase (NOS) Knockout-Mäusen, resultierte in einem signifikantem Anstieg des Blutdrucks. Die Überexpression von ET-1 allein, hatte keine Auswirkung. Die ausgleichende Wirkung von NO ist also sehr bedeutend für den physiologischen Gefäßtonus (Quaschning et al. 2007).

Bei Studien an gesunden Menschen wurde BQ-123 und ein nicht-selektiver Antagonist in den Unterarm bzw. systemisch verabreicht. Das Ergebnis glich dem des Tiermodells, es kam zur Vasodilatation und erhöhtem Blutfluss im Unterarm (Haynes und Webb 1994; Haynes et al. 1996). Wird der ET_BR mit BQ-788 blockiert kommt es zum Abfall des Blutflusses im Unterarm. Eine selektive Blockade beider Rezeptoren oder BQ-123 plus NOS-Inhibitor führten zu einer Abschwächung der Dilatation nach ET_AR-Blockade (Verhaar et al. 1998).

Durch Mausmodelle konnte auch die Beteiligung der Niere an der Regulation des Blutdrucks nachgewiesen werden. Nach Überexpression von ET-1 in EZ des Sammelrohrs kam es zur signifikanten Steigerung der Natriumretention und Blutdruckerhöhung (Ahn et al. 2004). Das zeigte sich auch durch genetische Deaktivierung des ET_BR am Sammelrohr. Die Tiere schieden weniger Natrium aus und die Blutdruckwerte waren hypertonisch (Ge et al. 2006). Bei einer generellen Überexpression von ET-1 bzw. der Deaktivierung des ET_BR an EZ konnte keine Hypertonie, keine ansteigenden ET-1 Plasmawerte und keine schwächere Endothel-vermittelte Vasodilatation gemessen werden (Amiri et al. 2004; Bagnall et al. 2006).

1.10 Pathophysiologie des Endothelinsystems

1.10.1 Plasmakonzentrationen von ET

ET ist an verschiedenen Krankheiten beteiligt (Abbildung 3). Um erkennen zu können, welche Rolle ET bei Erkrankungen hat, wurden ET-1 Konzentrationen im Plasma gemessen. Diese Konzentrationen werden beeinflusst durch Produktion, Abbau und Beseitigung von ET-1

aus dem Kreislauf (Patrignani et al. 1991; Jeng und Deng 1993). Der ET-1 Plasmagehalt ist bei Kindern im Gegensatz zu Erwachsenen hoch, zusätzlich gibt es ethnische Unterschiede (Yoshibayashi et al. 1991; Evans et al. 1996). Bei Erkrankungen wie pulmonaler arterieller Hypertonie (Giaid et al. 1993), Atherosklerose (Lerman et al. 1991; Minamino et al. 1997), primäre Hypertonie (Schiffrin 2005), Myokardinfarkt (Stewart et al. 1991), Herz- und Nierenversagen (McMurray et al. 1992; Wesson et al. 2011) ist der Gehalt von ET-1 in Plasma und Gewebe erhöht. Aus der Höhe des ET-1 Gehaltes lässt sich der Schweregrad bzw. eine Prognose für die Krankheit ableiten.

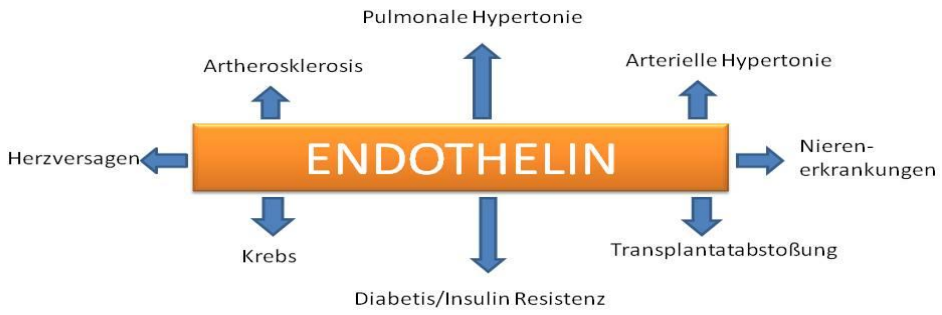

Abbildung 3: Beteiligung von Endothelin an vielfältigen Erkrankungen.

1.10.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

1.10.2.1 Hypertonie

Laut Weltgesundheitsreport 2003 starben weltweit 16,7 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen. Dies wird nicht länger nur in Industrieländern die Todesursache Nummer 1 sein. Für 2010 wird dieses Ergebnis auch in Entwicklungsländern erwartet (World Health Organisation 2003).

Hoher Blutdruck ist einer der wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren. Übergewicht, Alkoholmissbrauch, übermäßige Salzaufnahme und mangelnde Bewegung sind dafür bekannt, den Blutdruck zu steigern (Whelton et al. 2002). Darüber hinaus spielen auch genetische Faktoren eine Rolle. Erst 2009 wurde in einer großangelegten weltweiten Studie mit über 34000 Teilnehmern der genetische Hintergrund der Hypertonie untersucht. Es konnten 8 Gene

identifiziert werden, die im Zusammenhang mit Blutdruck bzw. Bluthochdruck stehen (Newton-Cheh et al. 2009). Hypertonie ist eine multifaktorielle Krankheit, bei der pathologische Veränderungen im neuronalen, renalen, hormonellen und vasalen Kontrollmechanismus des Blutdrucks beteiligt sind. Das Endothel übernimmt dabei eine Hauptkontrollfunktion. Es setzt vasodilatorische Substanzen wie NO, PGI2 und Endothelium-derived hyperpolarizing Factor (EDHF) frei (Ignarro und Kadowitz 1985; Vanhoutte 1998; Gauthier et al. 2002). Ein Fehlen dieser Substanzen würde zu ansteigendem Gefäßwiderstand und erhöhtem Blutdruck führen.

Die Entdeckung von ET als Vasokonstriktor und seiner Bildung in EZ, ließ ebenfalls einen Zusammenhang mit der Entstehung von Hypertonie und Gefäßerkrankungen vermuten (Iwasa et al. 2001). ET-1 wirkt auf Blutgefäße und andere Organe vasoaktiv, mitogen, proinflammatorisch und profibrotisch. Diese Effekte führen zu endothelialer Dysfunktion und Endorganschäden verbunden mit Hypertonie und anderen Fehlfunktionen (Iglarz und Clozel 2007). Die Hypertrophie von glatten Gefäßmuskelzellen kann durch die wachstumsfördernden Eigenschaften von ET-1 hervorgerufen werden. Im Krankheitsbild der Hypertonie zeigen die Arterien eine verdickte Media, vermehrte Kollageneinlagerung und verminderte Elastizität, was zum Anstieg des Blutdruckes führt.

Bei Patienten mit Hämangioendotheliomen, die hohe ET-1 Konzentrationen im Blut und Hypertonie aufwiesen, konnte nach Entfernung des Tumors eine Normalisierung beider Parameter festgestellt werden (Yokokawa et al. 1991). Im Gegensatz dazu ist der Plasma ET-1 Gehalt bei primärer Hypertonie, mit Ausnahme von Afroamerikanern, überwiegend im Normbereich (Ergul et al. 1996; Schiffrin 2001). Afroamerikanische Bluthochdruckpatienten haben einen ET-1 abhängigen Anstieg des Gefäßtonus. Der ET-1 Gehalt im Blut ist höher als bei hellhäutigen Hochdruckpatienten oder gesunden hellhäutigen bzw. afroamerikanischen Menschen (Ergul 2000).

Eine dauerhafte Behandlung mit ET_AR-Blockern führte zu einer vom Endothel abhängigen NO vermittelten Dilatation (Barton 2000). Behandlungen mit dem nicht-selektiven Antagonisten Bosentan oder mit Darusentan, einem ET_A-selektiven Antagonisten, führten bei primärer Hypertonie zu sinkenden Blutdruckwerten (Krum et al. 1998; Nakov et al. 2002; Black et al. 2007). Eine selektive Blockade des ET_BR führte zu einer Verhinderung dieses Effekts und griff in die NO vermittelte Vasodilatation ein (Pollock und Schneider 2006). In einer Studie von Kittikulsuth (2013) werden auch geschlechtliche Unterschiede im Krankheitsbild diskutiert. So führte die ET_BR-Blockade bei weiblichen Ratten, mit einer durch Salzdiät und Angiotensin II induzierten Hypertonie, nicht zu einem so starken Blutdruckanstieg wie bei

den männlichen Versuchstieren. Desweiteren hatten die männlichen Ratten auch eine höhere Proteinexkretion als die weiblichen Tiere. Dem ET_BR wird hier geschlechtsspezifisch eine protektive Rolle in Bezug auf die Begrenzung des Blutdrucks und den Schutz der Nieren zugesprochen.

Chronische Niereninsuffizienz ist in 85 % der Fälle mit Hypertonie verbunden (Foster et al. 2013). Unkontrollierte Hypertonie ist auf der anderen Seite auch ein Risikofaktor zur Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung (Ruggenenti et al. 2001). Die Gabe von selektiven Antagonisten wie Atrasentan führte bei einem transgenen Rattenmodell (salz-sensitiv) zu sinkendem Blutdruck. Bei dem nicht-selektiven Antagonisten Bosentan war das nicht der Fall. Hinzu kamen bei selektiver Blockade noch renoprotektive und kardioprotektive Effekte (Vaneckova et al. 2005). An einem Modell mit nephrektomierten Ratten konnten positive Effekte auf den Blutdruck, die Begrenzung von Endorganschäden und die Steigerung der Überlebensrate der Ratten gezeigt werden. Hierbei wurden jeweils der ET_AR und das RAS-System selektiv blockiert. Die Kombination von RAS-Blockern und selektiven ET_AR-Blockern brachte keinen zusätzlichen Effekt (Vaneckova et al. 2012). Auch mit anderen selektiven Antagonisten, wie BQ-123 und Sitaxentan wurde eine Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks erreicht. Desweiteren verringerte sich die Proteinurie und der negative Einfluss auf die Gefäßelastizität (Goddard et al. 2004; Dhaun et al. 2011).

1.10.2.2 Herzinsuffizienz

Im Herz wird ET-1 von Myozyten und dem Gefäßendothel produziert. Der ET_AR hat einen Anteil von über 90 % in isolierten Kardiomyozyten und dominiert in der Media von intrakardialen Gefäßen. ET_BR befinden sich vorwiegend auf EZ und Fibroblasten (Katwa et al. 1993; Molenaar et al. 1993; Tsukahara et al. 1994; Davenport et al. 1995).

Die wachstumsfördernden Effekte von ET-1 auf Kardiomyozyten stehen in Verbindung mit der Entwicklung der Linksherzhypertrophie, deren Folge die Herzinsuffizienz sein kann. Das Herzwachstum kann auch durch Hypoxie gefördert werden, was bei chronischer Ischämie von Bedeutung ist. Neurohormone wie Angiotensin II, Norepinephrine, Vasopressin und Aldosteron spielen eine wichtige Rolle beim Voranschreiten von Herzversagen und stimulieren die ET-1 Sekretion, sowie auch ET-1 deren Bildung fördert (Goetz et al. 1988; Yamaguchi 1997; Gong et al. 2001). Die Behandlung mit selektiven ET_A-Antagonisten bei Ratten mit Herzinsuffizienz verbesserte die Linksherzfunktion, schränkte den vaskulären Umbau ein und verlängerte die Lebenszeit der Versuchstiere (Sakai et al. 1996).

1.10.3 Gefäßerkrankungen

1.10.3.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose beinhaltet eine Proliferation von SMC. ET-1 stimuliert die Proliferation, Migration und Kontraktion von SMC und wurde deshalb als atherogener Faktor diskutiert. Zusätzlich wird die Expression von pro-atherogenen Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF-β durch ET-1 angeregt. Bei einer bereits bestehenden Erkrankung wird ein erhöhter Gehalt von ET-1 im Plasma gemessen. Glatte Muskelzellen wandern aus der Media in die Intima aus, wo sie durch die genannten Faktoren zur Proliferation angeregt werden und so nach Umbildung in Schaumzellen zur Atherombildung beitragen. Barton et al. (1998) haben am Tiermodell (Apolipoprotein E Knockout-Mäuse) gezeigt, dass eine selektive Blockade des ET_AR zur Verringerung einer Bildung von atherosklerotischen Plaques führt. Zu diesem Ergebnis kam auch ein Modell mit LDL-Rezeptor Knockout-Mäusen (Babaei et al. 2000).

1.10.3.2 Restenose

Die Restenose ist ein Hauptproblem nach der Ballon-Angioplastie. Nach einer experimentellen Gefäßverletzung wird das ET-System für Wochen aktiviert und die Expression von ET-1, ECEs und ET-Rezeptoren ist in dem untersuchten Gefäß erhöht (Wang et al. 1996). Eine Verstärkung der Restenose kann durch zusätzliche Infusion von ET-1 erreicht werden (Douglas und Ohlstein 1993). Bei klinischen Studien wurde durch einen perkutanen Eingriff in die humane Arteria carotis ebenfalls die Expression von ET-1, ECEs und ET-Rezeptoren bei SMCs der Neointima erhöht (Shirai et al. 2006). Dies deutet auf eine Beteiligung des ET-Systems an der Restenose hin. Durch selektive ET_AR bzw. eine Blockade beider ET-Rezeptoren kann die Umbildung der Neointima nach einer Ballon-Angioplastie reduziert werden (Tsujino et al. 1995; McKenna et al. 1998; Sanmartin et al. 2003). Im Fokus der therapeutischen Ansätze steht speziell der ET_AR. Während sich die selektive Blockade des ET_AR positiv auf die Restenose nach Gefäßverletzung auswirkte, verstärkte sie sich bei einer selektiven ET_BR-Blockade. Dem ET_BR werden vasoprotektive Eigenschaften zugesprochen (Sachidanandam et al. 2007).

1.10.4 Pulmonale arterielle Hypertonie

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist ein Syndrom mit Dyspnoe, Müdigkeit, Brustschmerz und Anstieg des pulmonalen arteriellen Blutdrucks. Die Ätiologie ist dabei sehr unterschiedlich. Das Auftreten kann idiopathisch sein oder steht in Verbindung mit der Einnahme von Appetitzüglern, HIV-Infektion, Bindegewebserkrankungen, erblich bedingtem systemisch-pulmonalen Shunt und portaler Hypertonie (Simonneau et al. 2004; Puri et al. 2007).

Bei gesunden Ratten finden sich die ET_AR in der Media der pulmonalen arteriellen und venösen Gefäßen vor allem in deren proximalen Anteilen, in distalen Bereichen nimmt die Dichte ab (Takahashi et al. 2001; Takahashi et al. 2001; Davie et al. 2002). ET_BR befinden sich in der Media und der Intima der Lungengefäße. Das Vorkommen auf der Media in distalen Bereichen überwiegt, während der Besatz auf der Intima in proximalen Gefäßanteilen höher ist (Soma et al. 1999).

Lange wurde angenommen, dass die Ursache der PAH in der Vasokonstriktion zu suchen ist. Andere Studien gehen von einem unkontrollierten Wachstum der medialen und adventitialen Schichten der pulmonalen Arteriolen aus (Humbert et al. 2004; Pietra et al. 2004). Die proliferativen Effekte von ET-1 auf glatte Gefäßmuskelzellen werden in den Lungenarterien durch den ET_AR (Zamora et al. 1993), aber in den distalen Widerstandsgefäßen durch beide ET-Rezeptoren vermittelt (Davie et al. 2002). Die Widerstandsgefäße spielen bei der pulmonalen Hypertonie die größte Rolle.

Die Effektivität von selektiven ET_A-Antagonisten und nicht-selektiven Blockern wie Bosentan zeigte sich durch Reduktion des pulmonal-arteriellen Drucks, verminderte Hypertrophie der rechten Herzkammer und geringeren Umbau der Lungenarterien (Dupuis 2000; Kirchengast und Luz 2005). Selektive ET_B-Antagonisten hingegen führten bei Hunden mit pulmonaler Hypertonie zu ansteigendem Druck und erhöhtem Lungengefäßwiderstand (Kedzierski und Yanagisawa 2001). Die Gabe von ET-Antagonisten als Aerosol scheint nicht nur wirksam, sondern hat auch weniger Nebenwirkungen als die orale Einnahme von ET-Antagonisten (Kalk et al. 2008; Leuchte et al. 2008). Ein neuer nicht-selektiver ET-Antagonist wurde vor kurzem in einer groß angelegten klinischen Studie getestet. Macitentan reduzierte signifikant die Mortalität und Morbidität unter Patienten, die an pulmonaler arterieller Hypertonie litten (Pulido et al. 2013). In einer vorangegangenen Studie an Ratten zeigte sich, dass Macitentan im Vergleich zu Bosentan mit einer 10-fach niedrigeren Dosis die Rechtsherzhypertrophie und Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie verhinderte (Iglarz et al. 2008).

1.11 Transgene Technologie

Grundsätzlich unterscheidet man zwei transgene (tg) Ansätze. Entweder wird ein Gen gezielt ausgeschaltet (Knock-out Modelle) oder es werden zusätzliche Kopien eines Gens in das Genom integriert (Gain-of-function- oder Über-/Koexpressionsmodelle). Die Technik, mit der man fremde DNA-Sequenzen in das Genom von Säugetieren integriert, wurde vor fast 40 Jahren etabliert. Jänisch und Mintz injizierten (1974) durch Mikroinjektion gereinigte Virus-DNA (simian virus 40) in die Blastozysten von Mäusen. Nach DNA-Isolierung aus Gewebeproben der Nachkommen, konnte die erste erfolgreiche Integration von Fremd-DNA durch radioaktiv markierte Gensonden im Mausgenom nachgewiesen werden. Es folgten weitere Modelle, bei denen genetisch veränderte Tiere durch Mikroinjektion erzeugt wurden (Gordon et al. 1980; Brinster et al. 1981; Costantini und Lacy 1981; Harbers et al. 1981; Wagner et al. 1981).

Die erste phänotypische Änderung eines transgenen Tieres gelang durch Palmiter et al. (1982). Hier wurde bei Mäusen das rekombinierte Wachstumshormongen in den Pronukleus von befruchteten Embryos injiziert. Die entstandenen Tiere und deren Nachkommen wurden gegenüber genetisch unveränderten Artgenossen sehr viel größer.

Aufgrund schneller Reproduktion, leichtem Umgang und geringem Kostenaufwand boten sich Mäuse für die transgenen Modelle an. Es war jedoch nicht immer möglich, einen adäquaten Phänotyp für ein Krankheitsmodell mit der Maus zu produzieren (Hammer et al. 1990). Die Spezies der ersten Wahl in der kardiovaskulären Forschung wurde daher die Ratte. Sie bietet gegenüber der Maus durch ihre Größe Vorteile in der Mikrochirurgie, der intravenösen Kannulierung, bei in vivo Funktionsstudien, bei Blutdruckmessung, Gewebe- und Organentnahmen.

Durch Mullins et al. (1990) wurde das erste Hypertoniemodell an der Ratte generiert. Mittels Mikroinjektion wurde das Ren-2 Gen der Maus ins Rattengenom integriert. Die Expression dieses Gens verursachte bei den tg-positiven Tieren Bluthochdruck. So konnte ein Tiermodell geschaffen werden, bei dem die genetische Basis der Erkrankung bekannt ist.

1.12 Mikroinjektion

Die am häufigsten genutzte Technik in der transgenen Technologie ist die Mikroinjektion. Gereinigte doppelsträngige DNA wird in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle injiziert. Es ist entscheidend, dass diese Injektion vor der ersten Zellteilung vorgenommen wird. Andernfalls entsteht ein sogenanntes genetisches Mosaik. Das heißt manche Zellen des transgenen Tieres enthalten die fremde DNA und andere wiederum nicht. Ziel ist es, die genetische Information vor der Blastogenese in eines der Chromosomen zu integrieren, damit die durch Leihmütter ausgetragenen Nachkommen die Erbinformation in jeder Zelle des Körpers tragen. Die erstgeborenen Tiere werden als Founder bezeichnet. Das transgene Konstrukt wird nach den Mendelschen Regeln vererbt, wobei die Founder das Tg nur auf einem der beiden Chromosomen haben. Sie sind hemizygot. Durch Verpaarung von zwei hemizygoten Tieren können homozygote Tiere erzeugt werden.

Popova (2005) sowie auch Murphy (2008) beschreiben die einzelnen Schritte der Mikroinjektion und deren vorausgehende Arbeiten detailliert, wobei die verschiedenen Methoden sowie auch die Wahl des Tieres diskutiert werden. Es folgt eine kurze Übersicht der Methoden der Mikroinjektion. In Abbildung 4 wird diese schematisch dargestellt.

Um für die Mikroinjektion genügend Eizellen zu bekommen, wird bei den Ratten eine Superovulation ausgelöst. Hierzu werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Zum einen kann eine osmotische Minipumpe subkutan implantiert werden, die kontinuierlich Gonadotropin abgibt. Kostengünstiger und einfacher als die Implantation der Minipumpe ist die intraperitoneale (i.p.) Injektion von equinem Choriongonadotropin (eCG) oder follikelstimulierendem Hormon (FSH) mit einer darauffolgenden Injektion (48 Stunden später) von humanem Choriongonadotropin (hCG) (Popova et al. 2005).

Nach der i.p. Injektion von hCG werden die Weibchen mit männlichen Ratten gepaart. Zur Gewinnung der befruchteten Eizellen werden die weiblichen Ratten einen Tag später getötet. Durch ein Mikroinjektionsgerät wird die Fremd-DNA mit Injektionspuffer in den größeren männlichen Pronukleus injiziert. Diese manipulierten Eizellen werden daraufhin in den Eileiter von pseudoschwangeren Weibchen überführt. Die Pseudoschwangerschaft wird durch Paarung mit vasektomierten Männchen erzeugt.

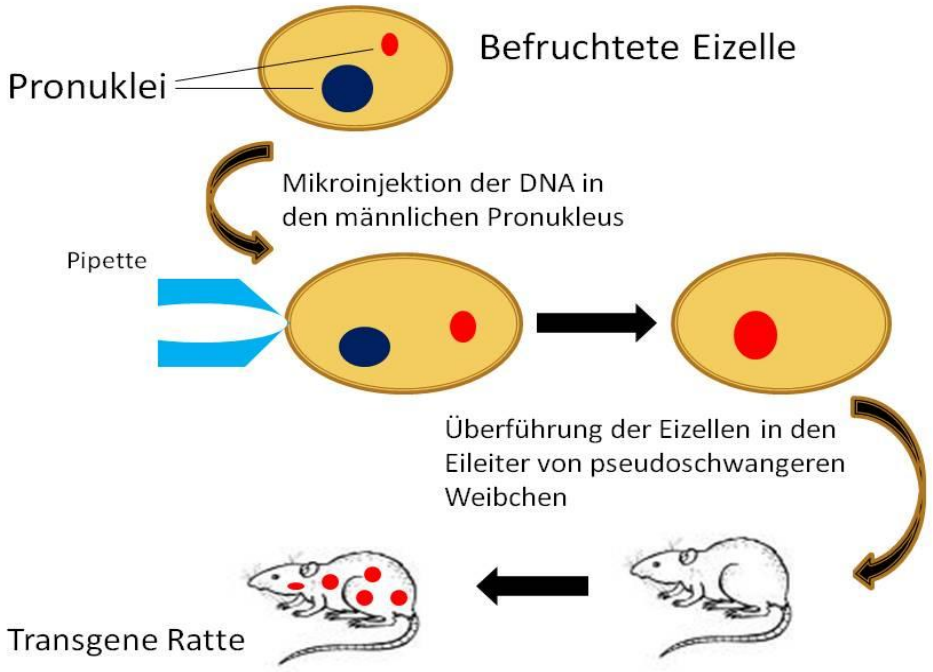

Abbildung 4: Erzeugung eines transgenen Tieres durch Mikroinjektion von manipulierter DNA.

1.13 Generierung des transgenen DNA-Konstrukts

Die zeitliche und gewebespezifische Expression des Transgens wird durch den verwendeten Promotor reguliert. Das Promotorelement befindet sich 5' des zu exprimierenden Gens (Abbildung 5). Das tg Konstrukt, der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Tiere, enthält ein 1,3 kb Fragment des murinen SM22α-Promotors. Hierdurch soll eine möglichst selektive Expression des ET_BR in glatten Gefäßmuskelzellen erreicht werden. Eine genaue Beschreibung des transgenen Konstrukts findet sich bei Zollmann (2003).

Das SM22α Gen kodiert das 22 kDa große Protein Transgelin, das zur Calponin Familie Calcium-bindender Proteine gehört (Lees-Miller et al. 1987). SM22α wurde in mehreren Spezies identifiziert und unterschiedlich beschrieben (p27, WS3-10) (Lawson et al. 1997).

Über die Verteilung von Transgelin im Gewebe besteht Uneinigkeit. Seine Expression ist eine der frühesten Marker zur Differenzierung von glatten Muskelzellen. Bei normalen adulten Vertebraten wird es durchweg in glattem Muskelgewebe nachgewiesen (Lees-Miller et al. 1987). Auch der Gehalt an mRNA ist in Organen wie Uterus, Blase, Magen und Prostata am höchsten. Es wird ebenfalls eine Expression an Organen nachgewiesen, in denen wenig oder keine glatten Muskelzellen vorkommen. Dazu zählen das Rückenmark, die Nebenniere und

das Herz (Lawson et al. 1997; Camoretti-Mercado et al. 1998). Li et al. (1996) und Moessler et al. (1996) beschreiben die Aktivität des SM22α bei tg Mäusen während der Embryonalphase und beim Neugeborenen im Herz und arteriellen System. Danach nimmt die Aktivität ab. Eine Expression in venösen oder viszeralen glatten Muskelzellen konnte nicht nachgewiesen werden. Xu et al. (2003) bestätigen diese Untersuchungen.

Abbildung 5: Typisches transgenes DNA Konstrukt

1.14 Expression des Transgens

Die Expression des transgenen humanen (hET_B) und des endogenen Ratten-ET_B (rET_B) wurden mittels Real-time PCR untersucht und auf die Expression der 18S RNA standardisiert (Orzechowski et al., 2009, unveröffentlichte Daten). Diese Analysen zeigten in den Aorten von einen Monat alten Tieren der Linie 4230 eine etwa 3-fach höhere Expression von rET_B mRNA als in Linie 6707 (Abbildung 6). Die Expression der hET_B mRNA war in Linie 6707 hingegen etwa 10-fach höher als in Linie 4230 (Abbildung 7). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Expression von hET_B und rET_B in verschiedenen Gefäßen und der Niere.

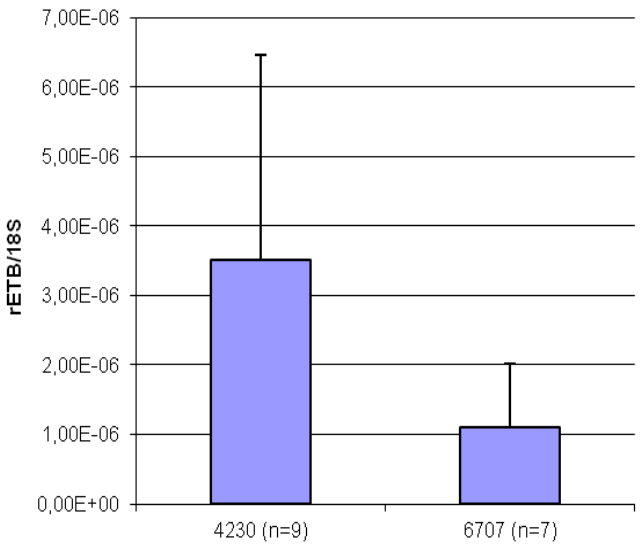

Abbildung 6: Expression der rETB mRNA in der Aorta von einen Monat alten Tieren der Linie 4230 und Linie 6707 (Mittelwerte ± Standardabweichung, Orzechowski et al., 2009 unveröffentlichte Daten).

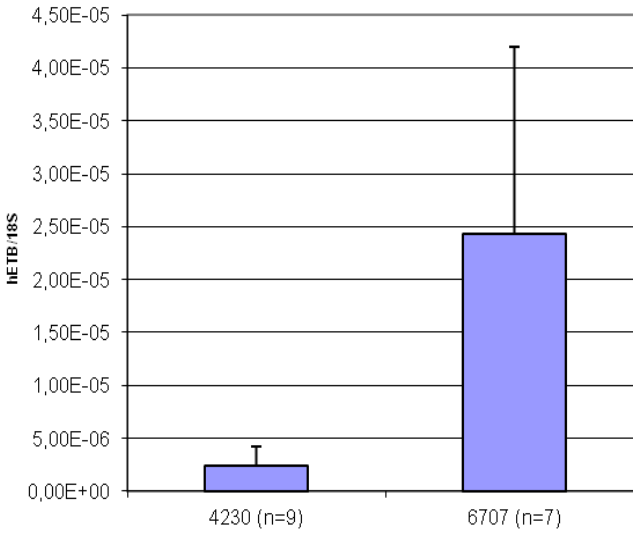

Abbildung 7: Expression der hETB mRNA in der Aorta von einen Monat alten Tieren der Linie 4230 und Linie 6707 (Mittelwerte ± Standardabweichung, Orzechowski et al., 2009, unveröffentlichte Daten).

Tabelle 2: Zusammenfassung der mRNA-Expression des tg (hET_B) und des endogenen ETB (rET_B) in den tg Linien 4230 und 6707. Die Expression wurde mittels konventioneller und Real-time PCR untersucht (Diss. Zollmann, 2003; Orzechowski et al., 2009; unveröffentlichte Daten). n.u. = nicht untersucht

	Linie	1 Monat		4 Monate	
		hETB	rETB	hETB	rETB
Aorta	4230	+	-	n.u.	n.u.
	6707	+	-	-	n.u.
Carotis	4230	+	n.u.	n.u.	n.u.
	6707	+	n.u.	n.u.	n.u.
Mesenterialarterien	4230	-	+	n.u.	n.u.
	6707	+	+	n.u.	n.u.
Niere	4230	-	+	n.u.	n.u.
	6707	-	+	-	+

1.15 Transgene Tiermodelle für das Endothelinsystem

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits verschiedene transgene Tiermodelle für Gene des Endothelinsystems beschrieben worden.

Unabhängig voneinander integrierten zwei Arbeitsgruppen das humane ET-1 Gen mit Hilfe seines natürlichen Promotors in das Genom der Maus. Beide Gruppen kamen zu dem gleichen Ergebnis: Die Überexpression von ET-1 führt zu einem Phänotyp mit altersabhängiger pathologischer Veränderung der Niere, während der Blutdruck unverändert bleibt (Hocher et al. 1997; Shindo et al. 2002). Die erhöhten Plasma- und Gewebewerte von ET-1 verursachten bei älteren Mäusen interstitielle renale Fibrosierung, Nierenzysten und Glomerulosklerose. Dies führte zu einer Verminderung der glomerulären Filtrationsrate. Das eine Überexpression von ET-1 nicht zur Blutdrucksteigerung führte, schien aufgrund seiner starken vasokonstriktorischen Eigenschaften paradox. Durch die Injektion von L-NAME, einem NO-Synthasehemmer, wurde bei ET-1 transgenen Mäusen ein signifikant höherer Anstieg des Blutdrucks im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren erreicht (Hocher et al. 2004). Dies führte zu der Annahme, dass das NO-System als ausgleichender Dilatator involviert ist. Eine

Bestätigung dafür ergab eine Kreuzung von ET-1 transgenen Mäusen und eNOS (endotheliale Stickoxidsynthase) Knockout-Mäusen. Die gezüchteten Tiere zeigten signifikant erhöhten Blutdruck (Quaschning et al. 2007; Quaschning et al. 2008). Überraschend war auch das Ergebnis bei heterozygoten ET-1 Knockout-Mäusen (homozygote waren nicht lebensfähig). Sie wiesen zwar einen niedrigeren ET-1 Plasmagehalt auf, hatten aber erhöhten Blutdruck (Kurihara et al. 1994). Endotheliale Überexpression von humanem ET-1 in transgenen Mäusen führte nicht zum Anstieg des Blutdruckes. Trotzdem wurde eine veränderte Gefäßstruktur und -funktion festgestellt. Dies stärkt die Annahme, dass ET-1 blutdruckunabhängige Effekte auf Gefäße hat (Amiri et al. 2004). An einem Rattenmodell mit Überexpression des humanen ET-2 wurde ähnlich wie bei ET-1 eine blutdruckunabhängige Fibrosierung der Niere, die auf die Glomeruli begrenzt war, festgestellt (Hocher et al. 1996). Am gleichen Modell konnten Liefeldt et al. (1999) zeigen, dass nach L-NAME-Infusion der Blutdruck bei tg-positiven Ratten im Vergleich zu den negativen Geschwistertieren signifikant höher war. Wie auch beim ET-1 Überexpressionsmodell wird NO als ausgleichender Faktor erkannt, der den Blutdruck im Normalbereich hält. Aus den Phänotypen der ET-1 bzw. ET_AR Knockout-Mäuse wurde deutlich, dass ET-1 einen wichtigen Anteil an der embryonalen Entwicklung haben muss. Die Tiere waren durch Missbildungen im kraniofacialen und kardiovaskulären System nicht lebensfähig (Kurihara et al. 1994; Kurihara et al. 1995; Slowinski et al. 2007). Die Interaktion von ET-1 und ET_AR scheint essentiell für die Bildung von Schädelknochen, Bindegewebe, Herz- und Gefäßsystem zu sein (Clouthier et al. 1998). ET-3 Knockout-Mäuse bilden ein aganglionäres Megacolon (Hirschsprung´sche Krankheit) und Pigmentstörungen der Haut aus. So wird für ET-3 auch eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung deutlich (Baynash et al. 1994; Rice et al. 2000). Weiterhin zeigt sich auch der Zusammenhang mit dem ET_BR, der bei einem Knockout-Modell den gleichen Phänotyp ausbildete wie das ET-3 Knockout-Modell. Ein natürlicherweise vorkommendes Rattenmodell des beschriebenen Phänotyps ist spotting lethal (sl/sl). Diesen Ratten fehlt das ET_BR Gen.

Ein Knockout-Modell für ECE-1 verursachte bei dem überwiegenden Teil der Tiere embryonalen Tod durch starke Herzanomalien (Yanagisawa et al. 1998). Die überlebenden Mäuse zeigten mit kraniofacialen Anomalien starke Ähnlichkeit zu den Tieren der ET-1 und ET_AR Knockout-Modelle (Kurihara et al. 1994). Zusätzlich glichen sie dem Phänotyp des ET-3 und ET_BR Knockout-Modells, durch Störung der Hautpigmentierung und fehlende Darmganglien (Clouthier et al. 1998).

Im Gegensatz zum ECE-1 Knockout-Modell sind die Nachkommen des ECE-2 Knockout-Modells gesund und haben eine normale Lebenserwartung. Eine Kreuzung der beiden

Knockout-Linien brachte Tiere mit dem Verlust beider Gene hervor (ECE-1 -/-; ECE-2 -/-). Diese zeigten den Phänotyp des ECE-1 Knockout-Modells, trotzdem wurden für ET-1 und ET-2 Werte gemessen, die denen des ECE-1 Knockout-Modells glichen. Dies lässt auf das Vorhandensein von anderen Proteasen zur Bildung von ET schließen (Yanagisawa et al. 2000).

1.16 Ziel der Arbeit

Das Ziel des Promotionsvorhabens ist die weiterführende phänotypische Charakterisierung eines bereits etablierten transgenen Rattenmodels mit glattmuskelspezifischer Expression des humanen ET_BR. Das transgene Rattenmodell besteht aus zwei unabhängig voneinander generierten transgenen Linien (L4230 und L6707) (Zollmann 2003).

Das transgene Modell des ET_BR wurde für die Prüfung folgender Hypothesen entwickelt: Koexpression des humanen ET_BR im glatten Gefäßmuskel führt erstens zu erhöhtem arteriellen Blutdruck und zweitens zu einem Wachstum der Gefäßwandmedia. Dabei richtet sich die Arbeit primär auf die phänotypische Charakterisierung der Rattenlinie L6707, die bisher noch nicht genauer untersucht wurde. Untersuchungen der mRNA-Expression haben gezeigt, dass der transgene ET_BR in der Aorta der Linie L6707 etwa 10-fach stärker exprimiert wird als in Linie L4230.

Folgende Untersuchungen sollten zur Beantwortung der Fragestellung durchgeführt werden: Zunächst Blutdruckmessung an wachen Tieren mittels Radiotelemetrie und in einem zweiten Schritt Messung des relativen Anteils der Mediafläche an der Gesamtfläche der aortalen Gefäßwand mittels Histomorphometrie an mikroskopischen Schnittpräparaten.

2 Material und Methoden

2.1 Generierung transgener Rattenlinien

Die Generierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Michael Bader vom Max-Delbrück-Centrum in Berlin-Buch. Durch pronukleäre Injektion entstanden die transgenen Ratten der Linie 4230 und 6707. Diese Linien wurden bereits 2003 für ein anderes Forschungsvorhaben generiert. Eine genaue Beschreibung dieser Generierung findet sich bei Zollmann (2003). Zum Linienerhalt wurden transgene (= tg-positiv) weibliche Tiere jeweils mit männlichen wildtypischen Tieren des Stammes Sprague-Dawley (SD) Hannover rückgekreuzt. Die daraus entstandene Nachzucht wurde auf die Expression des humanen ET_BR überprüft. Tg-negative Wurfgeschwister wurden bei den Versuchen in dieser Arbeit als Kontrolle für die tg-positiven Tiere mit untersucht.

Die Zucht und Haltung der Ratten erfolgte nach den Richtlinien für Labortiere. Die Versuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde durchgeführt (Versuchsvorhaben G0151/04). Die Tiere wurden bei konstanter Raumtemperatur (21 °C) und Luftfeuchtigkeit (75 %) in kontrolliertem Hell-Dunkel-Zyklus (jeweils 12 Stunden) gehalten. Gefüttert wurde 2018 extruded diet (Harlan Winkelmann GmbH, Borchen) und Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

2.2 Genotypisierung

Zur routinemäßigen Identifizierung transgener Tiere aus der Nachzucht der Linien 4230 und 6707 wurden im Alter von ca. 4 Wochen Schwanzbiopsien genommen und anschließend eine Genotypisierung durchgeführt. Für die Biopsie, wurde den Ratten mit einem Skalpell ein ca. 5 mm großes Stück von der Schwanzspitze abgetrennt.

2.2.1 DNA-Isolierung

Die Schwanzbiopsien wurden in Eppendorfgefäße (1,5 ml) gelegt und bei -20 °C eingefroren. Zur DNA-Isolierung wurden die Biopsien aufgetaut und in jedes Eppendorfgefäß 750 µl Tail Puffer und 50 µl Proteinase K hinzugegeben. Über Nacht wurde das Ganze bei 55 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu jeder Probe 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Roti-Phenol, Roth) pipettiert und mit dem Vortex vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis wurden alle Proben wieder durch den Vortex

vermischt und weitere 5 Minuten auf dem Eis inkubiert. Anschließend wurden alle Proben für 20 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Die obere klare Phase, ca. 700 µl, wurde in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. Dazu wurden 750 µl vorgekühltes 100%iges Ethanol und 75 µl 3 M Natriumazetat (pH 7) gegeben. Die Eppendorfgefäße wurden mehrmals vorsichtig umgeschwenkt. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde auf -20 °C gekühlt und danach nochmals bei 4 °C, 20 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, so dass das Pellet (weißer Faden) am Boden des Eppendorfgefäßes sichtbar wurde. Mit vorgekühltem (8 °C) 80%igem Ethanol (ca. 400 µl) wurde das Pellet gewaschen und danach der Alkohol mit einer Pipette wieder entfernt. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur 8-10 Minuten lang getrocknet und dann in ca. 30 µl destilliertem Wasser gelöst. 1 µl der gelösten DNA wurde mit 9 µl destilliertem Wasser verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurde für den PCR-Ansatz wiederum 1 µl entnommen.

2.2.2 Genomische Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Mastermix für den PCR-Ansatz wurde anhand der jeweils vorhandenen Proben berechnet. Für beispielsweise 18 Tiere musste mit einer Anzahl von 22 Proben (18 Tiere, 3 Kontrollen, 1 Reserve) gerechnet werden. 24 µl des Mastermixes und jeweils 1µl der gelösten DNA ergeben den Gesamtansatz und werden für jede Probe in PCR-Tubes (0,2 ml) pipettiert. Die enthaltenen Komponenten bzw. Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Einzelne Komponenten bzw. Konzentrationen des Mastermixes

Komponenten	***Menge***	***Endkonzentration***
10x PCR Puffer	2,5 µl	1x
$MgCl_2$ (50 mM)	0,75 µl	1,5 mM
H_2O	18,05 µl	
dNTP´s (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
Hot Star Taq (5U/µl)	0,2 µl	0,04 U/µl
Primer: - sense (10 µM)	1,0 µl	0,4 µl
- antisense (10 µM)	1,0 µl	0,4 µl

Für die PCR wurde der Peltier Thermal Cycler (PTC-100) verwendet. In der Initialphase erhitzte der Thermocycler die DNA für 2 Minuten auf 95 °C. Darauf folgten 30 Zyklen mit jeweils 95 °C für 30 Sekunden (Denaturierung), 60 °C für 30 Sekunden (Annealing) und 72 °C für 1 Minute (Polymerisation). Die abschließende Extension erfolgte bei 72 °C für 10 Minuten.

2.2.3 Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose abgewogen und in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml 1x TBE Puffer aufgefüllt. Die Lösung wurde in der Mikrowelle ca. 1,5-2 Minuten bis zum vollständigen Auflösen der Agarose erhitzt und danach mit dem Magnetrührer so lange gerührt, bis sie handwarm war (ca. 10-15 Minuten). Zur Lösung wurde 1 µl Ethidiumbromid gegeben, um später die Banden unter dem UV-Licht sichtbar machen zu können. Um ein Auslaufen der Lösung zu verhindern, wurde der Schlitten mit Leukosilk umklebt. Der Kamm, der später die Probentaschen bildete, wurde auf den Schlitten gesetzt und die warme Lösung hineingegossen. Nach einer halben Stunde bildete sich aus der abgekühlten Lösung das fertige Gel. Klebeband und Kamm wurden entfernt. Die Gelkammer wurde mit 1x TBE Puffer aufgefüllt und der Schlitten hineingestellt.

Nachdem das PCR-Programm durchgelaufen war, wurde in jedes Tube 25 µl Ficoll/Bromphenolblau pipettiert und kurz mit dem Vortex vermischt. In die erste Tasche des Gels wurden 5 µl eines Größenstandards (100 bp DNA Ladder) pipettiert, darauf folgten in Reihenfolge der nummerierten PCR Tubes jeweils 10 µl der zu untersuchenden Proben. Die letzten Taschen wurden mit einer positiven und einer negativen Kontrolle gefüllt, sowie einer Probe, die nur Wasser enthält. Der Deckel wird auf der Gelkammer befestigt und eine Spannung von 90 V angelegt. Nach 20-30 Minuten wurde der Strom abgeschaltet. Das Gel wurde auf einen UV-Licht Projektor gelegt. Eine darüber angebrachte Kamera, die mit einem Rechner verbunden war, stellte das Ergebnis auf dem Bildschirm dar. Das Bild wurde auf einem Datenträger gespeichert und auf Fotofilm ausgedruckt.

2.2.4 Material für DNA-Isolierung, PCR, Gelelektrophorese

Geräte

BIO RAD Powerpac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Centrifuge 5417 R	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Flourescent Tables	Renner GmbH, Dannstadt
PTC-100 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf
Sony Video Graphic Printer UP-811	Sony Deutschland GmbH, Berlin
Sony Type I UPP-110S Fotofilm	Sony Deutschland GmbH, Berlin
Variomag Electronicrührer Mono	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Vortexer VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG- IKA Labortechnik, Staufen
Waage	Sartorius AG, Göttingen

Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterial

100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess.Oldendorf
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
Eppendorfgefäße (0,2/1,5ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid 1 %ige Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ficoll	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Leukosilk	BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid 0,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Primer sense: ATA gTg TCA CCT AAA TgC Tag AgC antisense: TCC gCC TCA gAA gAA gCC ATA gA	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti-Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt

Puffer

Tail Puffer (auf 1 L ddH2O)	
Tris (50 mM, pH 7,5)	6,06 g
EDTA (100 mM, pH 8)	37,22 g
NaCl (100 mM, pH 8)	5,84 g
SDS (1 %)	10 g
TBE (10x, auf 1 L ddH2O)	
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M, pH 8)	40 ml

2.3 Telemetrische Blutdruckmessung

Die Radiotelemetrie macht es durch die Implantation von Sendern möglich, physiologische Parameter ohne Bewegungseinschränkung der Tiere zu messen. In Zusammenarbeit mit dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch (Arbeitsgruppe Professor Bader) wurden Blutdruck und Herzfrequenz bei tg-positiven Ratten der Linie 6707 und 4230 und deren tg-negativen Geschwistertieren gemessen. Jedes Tier wurde in einem Einzelkäfig gehalten. Die Käfige standen jeweils auf einem Empfänger für die implantierten Sender. Der Empfänger wandelte das empfangene Signal in ein digitales Signal um. Die Datenaustauschmatrix (DEM) ist das Bindeglied zwischen allen Empfängern und dem Computersystem, an das die Signale weiterleitet wurden.

2.3.1 Implantation der Telemetriesender

Der Sender (TA11 PA-C40) besteht aus einem Katheter und einem Körper (Abbildung 8). In dem Körper ist die Sensorelektronik enthalten. Vor der Implantation des Senders erfolgte eine Kalibrierung nach Herstellerangaben. Danach wurde der Sender in sterile Kochsalzlösung gelegt und auf 6-10 °C gekühlt. Durch die Abkühlung versteifte der Katheter. Dadurch wurde das Einführen in die Aorta erleichtert.

Die Versuchstiere (Ratten) erhielten 12 Stunden vor der Anästhesie kein Futter mehr. In einer Kammer (Anästhesieeinheit) wurden sie mit Isofluran (700-800 ml/min, 4,5 %) betäubt. Nach der Betäubung wurden die Ratten herausgenommen und über eine Maske mit Isofluran (1,7-2,5 %) weiter in Narkose gehalten.

Die Ratten wurden auf einem Operationstisch an allen Gliedmaßen mit Klebeband fixiert und zur Operationsvorbereitung in der Regio umbilicalis rasiert. Die Eröffnung erfolgte mittels 3-4 cm langer Inzision des Abdomens entlang der Linea alba. Das Darmpaket wurde mit warmer, in steriler Kochsalzlösung getränkter Gaze zur Seite gedrückt. Damit konnte die Aorta descendens freigelegt werden. Die untere abdominale Aorta und die Vena Cava wurden voneinander getrennt. Der Blutfluss wurde für die Implantation des Senders zeitweise unterbrochen. Dazu wurde eine Ligatur um die abdominale Aorta, unterhalb der renalen Arterie, angelegt. Für die Insertion des Katheters wurde 1 cm des distalen Endes einer sterilen 20 G Nadel, im 45° Winkel der angeschliffenen Oberfläche zum Außenradius, gebogen. Nach Gefäßverschluss wurde die gebogene Nadel 1-2 mm unterhalb der Bifurkation zur Punktion des Gefäßes verwendet. Anschließend wurde der dünnwandige Abschnitt des Katheters komplett

ins Gefäß eingeführt. Diese Eintrittsöffnung wurde abgetupft und mit Gewebekleber um den Katheter abgedichtet. Die Gedärme wurden zurückverlagert und der Körper des Senders wurde an der abdominalen Muskulatur befestigt. Dazu wurde ein nicht resorbierbarer Faden (4-0) um die Länge des Körpers gelegt und mit der Muskulatur vernäht. Die Wunde wurde in zwei Schichten, zunächst Bauchdecke dann Haut, mit Einzelheften verschlossen. Nach der Operation wurden die Tiere antibiotisch versorgt (Ampicillin 10 mg/kg s.c.) und in der Aufwachphase unter Rotlicht gehalten (Plehm et al. 2006).

Abbildung 8: Telemetriesender (TA11 PA-C40) zur Blutdruckmessung (zur Verfügung gestellt von Ralph Plehm)

2.3.2 Aufzeichnung des Blutdrucks mittels Radiotelemetrie

Mit dem Radiotelemetriesystem (Dataquest A.R.T. System) werden systolischer, mittlerer und diastolischer Blutdruck sowie auch die Herzfrequenz der Tiere aufgezeichnet. Alle 5 Minuten werden Daten gesendet und gespeichert.

Die Implantation der Sender wurde bei jeweils 9 Ratten der Linie L6707 und 4230 vorgenommen (Gruppeneinteilung siehe statistische Auswertung). Die Aufzeichnung der Daten begann einen Tag später und wurde in verschiedene Abschnitte eingeteilt. Um durch Einflüsse der Operation bedingte Verfälschungen der zu messenden Parameter auszuschließen, wurden die Daten der ersten 9 Tage post operationem nicht zur Auswertung verwendet. Am 13. Tag wurde ab 12:30 Uhr für 4 Tage mit der Gabe des NO-Synthasehemmers L-NAME (20 mg/kg) über das Trinkwasser begonnen. Am 17. Tag wurde den Tieren zur gleichen Zeit nur noch reines Trinkwasser gegeben. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte noch 13 Tage nach dem Absetzen von L-NAME. Nach insgesamt 30 Tagen telemetrischer Blutdruckmessung wurde der Versuch beendet.

Für die Auswertung der Daten sollten zwei vergleichbare Zeiträume geschaffen werden. Basal- und L-NAME-Phase wurden auf 3,5 Tage (83 Stunden) begrenzt. Wobei für die L-NAME-Phase die Daten der Adaptations- und die Auswaschphase von L-NAME nicht berücksichtigt wurden (Abbildung 9). Der Basalzeitraum stellt die gemessenen Werte unter Normalbedingungen dar, während die L-Name-Phase die Werte nach Gabe von L-NAME wiedergibt. Berechnet wurde auch die Differenz der Messwerte aus der L-NAME-Phase abzüglich der Messwerte aus dem Basalzeitraum, um die tg-positiven und tg-negativen Tiere hinsichtlich des Blutdruckanstieges nach Hemmung der NO-Synthase zu vergleichen. Die Elimination von L-NAME aus dem Blut dauert nach dem Absetzen längstens 24 Stunden. Nach der Auswaschphase von L-NAME folgt ein weiterer Vergleichszeitraum mit einer Dauer von 83 Stunden. Hier soll überprüft werden, ob die Messwerte der beobachteten Parameter (Herzfrequenz, systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck) nach dem Auswaschen von L-NAME wieder auf das Ausgangsniveau der Basalwerte zurückgehen. Jeder Tag wurde mit jeweils 12 Stunden in zwei Phasen eingeteilt. Zum einen in die aktive Nachtzeit der Ratten (18:30-6:30 Uhr), zum anderen in die passive Tagzeit (6:30-18:30 Uhr).
Für die vier Parameter Herzfrequenz, systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck wurden über den gesamten Messzeitraum pro Tier der Mittelwert ± Standardabweichung errechnet.

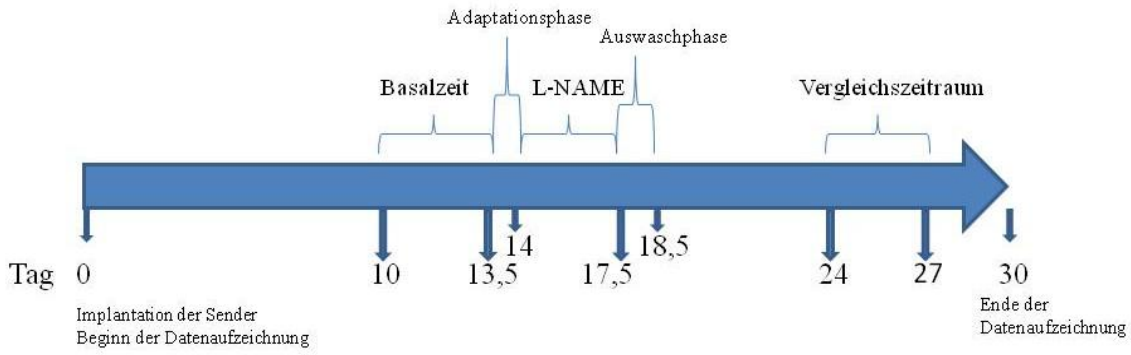

Abbildung 9: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der radiotelemetrischen Messungen

2.3.3 Material telemetrische Blutdruckmessung

Geräte

Anästhesieeinheit: Univentor 400	Univentor High Precision Instruments, Malta
Dataquest A.R.T. radiotelemetry system Bestehend aus: ▪ Ambient pressure reference (APR) ▪ Dataquest PCI-Karte ▪ Empfänger (RPC-1) ▪ Data exchange matrix (DEM) ▪ Computer mit entsprechender Software und Erfassungskarte	DSI Data Sciences International, Niederlande
Tierimplantate TA11 PA-C40	DSI Data Sciences International, Niederlande

Chemikalien, Medikamente

Ampicillin (Binotal)	Bayer AG, Leverkusen
Isofluran	CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe
L-NAME	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.4 Histomorphometrie

2.4.1 Explantation der Telemetriesender und Entnahme der Aorten

Nach Abschluss des Telemetrieversuches sollte die Aorta der verwendeten Ratten histologisch untersucht werden. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere ungefähr ein Alter von 4-5 Monaten. Durch Isofluran wurden sie mit der Anästhesieeinheit betäubt und anschließend auf dem Operationstisch fixiert und über eine Maske weiterhin mit Isofluran unter Narkose gehalten. Paramedian erfolgte ein Schnitt durch die Bauchmuskulatur, um den dort fixierten Sender nicht zu beschädigen. Der Sender wurde als erstes von der Bauchmuskulatur getrennt und dann der Katheter aus der Aorta gezogen. Für die Kontroll-Genotypisierung wurde ein Stück Lebergewebe entnommen und in einem Eppendorfgefäß tiefgefroren. Die Aorta abdominalis wurde kaudal inzidiert, um einen Ablauf der folgenden Perfusionsfixierung zu schaffen. Begonnen wurde mit der Injektion von Heparin (500 I.E.) direkt in die linke Herzkammer, um die Blutgerinnung zu verhindern. Für die anschließende Perfusion wurde eine Lösung vorbereitet. Die Lösung bestand zu gleichen Teilen aus Polyvinylpyrrolidon (PVP 58,7 g/l) und Natriumnitroprussid (30 mg/l) und wurde mit Natriumchlorid (0,9 %) verdünnt (1:1000). Über einen Butterfly-Katheter wurden 20 ml der Perfusionsflüssigkeit langsam (ca. 5 Minuten) ins Herz gegeben. Zuletzt wurde das Gefäßsystem mit 20 ml Formalin (4 % in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 6,9) perfundiert, um ein kollabieren der Aorta zu verhindern. Nach Abschluss der Perfusion, wurde die Aorta thoracalis herausgenommen. Die Adventitia wurde entfernt und das Gefäß wurde in einem mit Formalin gefüllten Eppendorfgefäß konserviert.

2.4.2 Herstellung mikroskopischer Schnitte

Das Formalin, das zur kurzzeitigen Aufbewahrung der Aorten diente, wurde bis zur weiteren Bearbeitung durch 80%igen Alkohol ersetzt. Die folgende Entwässerung wurde bei Raumtemperatur durch eine Histokinette (Reichert Jung) vorgenommen. Alle 2 Stunden erfolgte der Austausch der Flüssigkeit von 90%- über 95%- bis zu 100%igem Alkohol. Dieser wurde 2-mal durch Propanol (je 1,5 Stunden) und dann 3-mal durch Vulcit (je 2-3 Stunden) ersetzt. Anschließend folgte eine 50/50 Mischung von Paraffin/Vulcit bei 56 °C. Zum Abschluss wurden die Gefäße ungefähr 30 Stunden in Paraffin (60 °C) gelagert. Die Aorta wurde aus dem flüssigen Paraffin genommen und vorsichtig mit dem Skalpell in ca. 5-6 gleich große Stücke geschnitten. Diese wurden dann senkrecht in eine mit flüssigem Paraffin gefüllte Me-

tallschale nebeneinander aufgestellt. Ein Plastikring (Simport Rings), gekennzeichnet mit der Tiernummer, wurde auf die Metallschale gelegt und durch das fest werdende Paraffin fixiert. Die Präparate wurden auf -20 °C gekühlt. Die Metallschälchen konnten nach der Kühlung abgenommen werden. Der fertige Paraffinblock, der durch den Plastikring gehalten wurde, wurde mit einem Messer zugeschnitten, so dass parallele Kanten entstanden. Mithilfe des Mikrotoms wurden Schnitte mit einer Stärke von 4 µm angefertigt. Von diesen Schnitten wurden 8-10 auf einen Objektträger gezogen und getrocknet. Pro Tier wurden etwa 6-7 Objektträger hergestellt. Für die histologische Analyse wurden alle Schnitte nach dem Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.4.3 Histomorphometrische Messung

Um mögliche Unterschiede zwischen ET_B-positiven bzw. -negativen Tieren hinsichtlich des Anteils der Media am Gesamtgefäßquerschnitt festzustellen, wurden mittels Photomikroskop (AxioCam MRc) und dem Programm Axio Vision Relesae 4.7.2 von jedem Gefäß 60 Anschnitte dargestellt und fotografiert.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ2x. Der prozentuale Anteil der Media am Gesamtgefäßquerschnitt wurde durch Messung zweier Flächen berechnet. Gemessen wurde zunächst Fläche A, der Gefäßquerschnitt der Aorten, der durch die äußere Begrenzung der Media (Lamina elastica externa) beschrieben wurde. Das Lumen der Aorten bildete die Fläche B und wurde durch die Lamina elastica interna der Media begrenzt (Abbildung 10). Bei der Berechnung der Werte wird keine Einheit angegeben, da es sich hier um ein vom System vorgegebenes Maß handelt.

$$\text{Media-Lumen-Verhältnis} = \frac{\text{Fläche A - Fläche B}}{\text{Fläche A}}$$

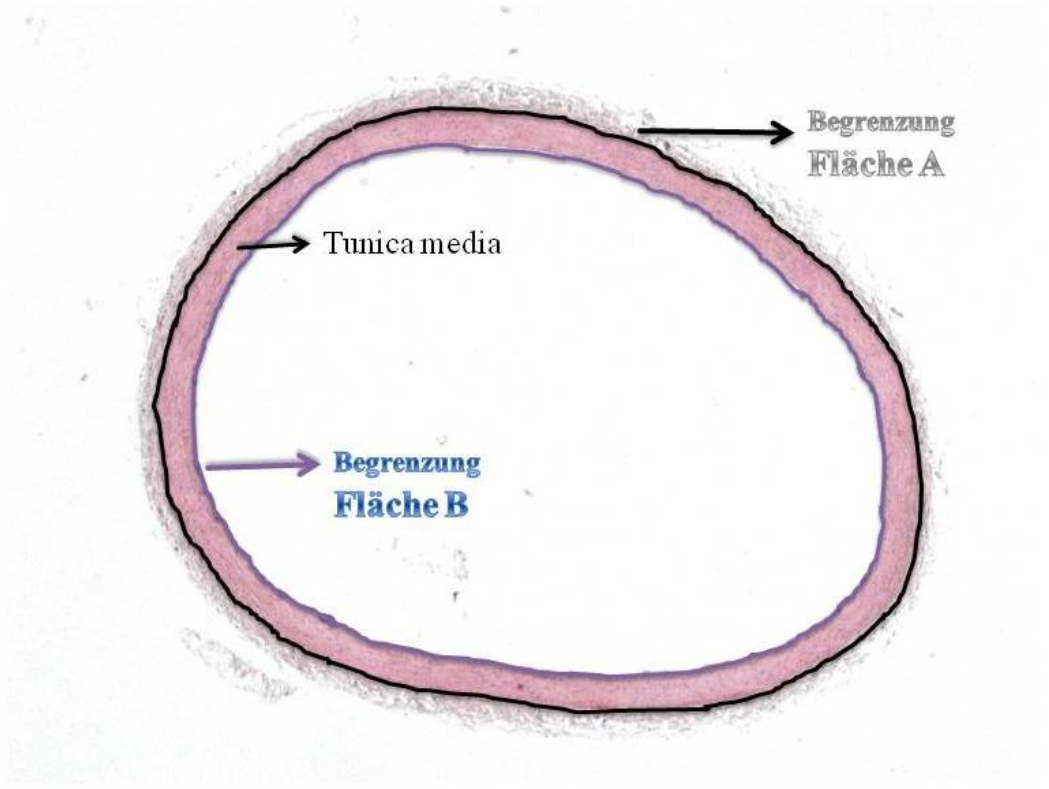

Abbildung 10: HE-gefärbter Anschnitt der Aorta thoracalis im Photomikroskop. Die Begrenzung der Fläche A ist gleich der Lamina elastica externa. Fläche B umgrenzt das Lumen.

2.4.4 Material Histologie und Histomorphometrie

Geräte

Histokinette	Reichert Jung GmbH, Nussloch
Mikrotom	Microm GmbH, Walldorf
Photomikroskop, AxioCam MRc	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena

Chemikalien

Alkohol 80-100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Heparin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isofluran	CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe
Paraffinöl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Vulcite M	Fina Industrieöle, Karlsruhe

Lösungen

Formalin 4 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid 0,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon (PVP) 58,7 g/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 6,9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sodium Nitroprusside (SNP) 30 mg/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Programme

Axio Vision Releases 4.7.2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
ImageJ2x	Rawak Software, Inc.

2.5 Statistische Auswertungen

Alle Auswertungen erfolgten mit dem Programm SPSS Statistics 18.0 (IBM Corporation, USA). Bei normalverteilten Werten wird der Mittelwert berechnet und der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet, um die Unterschiede zwischen zwei Gruppen jeweils auf statistische Signifikanz zu prüfen. In der Telemetrie wurde zum Vergleich der Basalphase, der L-NAME-Phase und dem Vergleichszeitraum post L-NAME die univariate Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Als abhängige Variable wurden systolischer, mittlerer, diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz eingesetzt. Fester Faktor war der Untersuchungszeitraum und zufälliger Faktor war das Tier.

Um eine repräsentative Aussage zu erhalten, gehen für die histologische Auswertung pro Tier 60 Messwerte in die Berechnung ein. Der t-Test für unabhängige Stichproben wurde verwendet, um Unterschiede zwischen den tg-positiven Tieren untereinander und jeweils im Vergleich zu den tg-negativen Tieren darzustellen. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 5\ \%$ ($p < 0{,}05$) festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung

Durch die Genotypisierung konnten alle Tiere zwischen tg-positiv und tg-negativ unterschieden werden. Die Ergebnisse wurden durch Gelfotos dargestellt und dokumentiert (Abbildung 11).

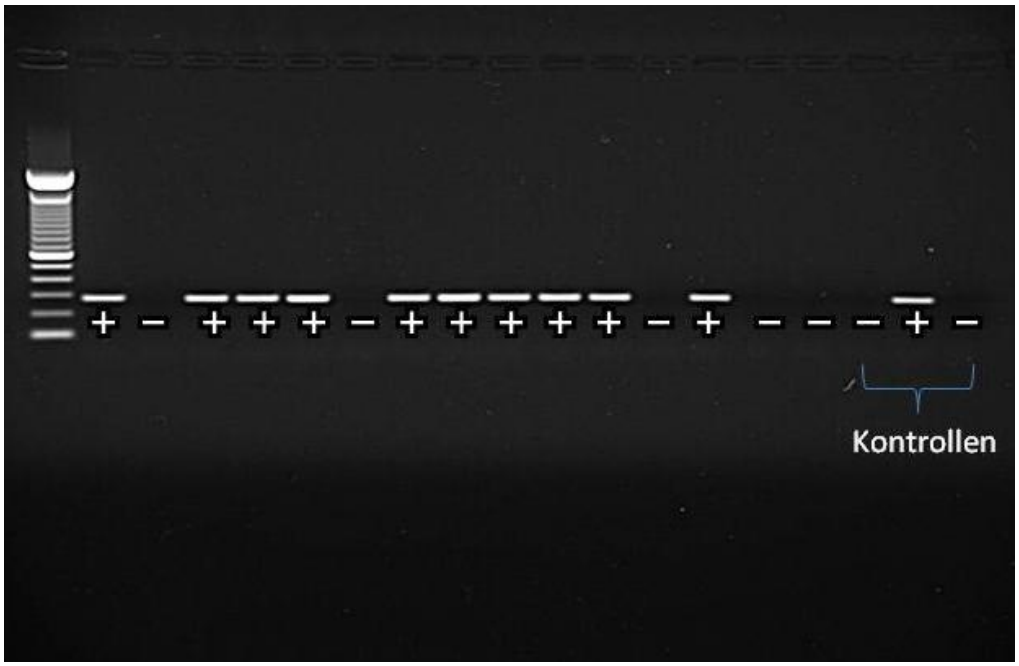

Abbildung 11: Genotypisierung der Linie 6707 durch genomische PCR. Die erste Bandenreihe ist der Größenstandard (100 bp DNA Ladder). Darauf folgende sichtbare Banden stellen ein tg-positives Tier der L6707 dar und sind mit einem + gekennzeichnet. Fehlende Banden, gekennzeichnet durch ein - sind tg-negative Tiere. Die Kontrollen sind jeweils ein tg-negatives und ein tg-positives Tier der L6707, sowie eine Kontrollprobe, die nur Wasser enthält.

Die erfolgreiche Genotypisierung ermöglichte die Auswahl der benötigten Tiere für die telemetrischen Messungen. Die folgende Übersicht (Tabelle 4) zeigt die Anzahl der Tiere, die pro Linie und Gruppe (tg-positiv/ tg-negativ) verwendet wurden.

Tabelle 4: Anzahl der verwendeten Tiere pro Linie und Gruppe

Linie	tg	Anzahl der Tiere
4230	positiv	6
6707	positiv	5
4230/6707	negativ	7

Ein Tier der Linie 6707, das der tg-positiven Gruppe angehörte, wurde von der Auswertung der telemetrischen Daten ausgeschlossen. Nicht sinnvolle Messwerte ließen einen technischen Defekt des implantierten Senders oder von Teilen der DSI-Messeinrichtung vermuten. Im Anschluss wurde das Tier jedoch auch histomorphometrisch untersucht.

3.2 Blutdruck und Herzfrequenz

Es galt zu untersuchen, ob zwischen den tg-positiven Tieren der Linien 4230 und 6707 bzw. zwischen tg-positiven und tg-negativen Tieren ein Unterschied bei den Parametern Blutdruck und Herzfrequenz besteht.

Tag 10-13 nach dem Einsetzen der Sender wurde als Zeitraum für die Messung der basalen hämodynamischen Werte festgelegt. Am 13. Tag post operationem wurde allen Ratten für 4 Tage der NO-Synthase-Hemmer L-NAME über das Trinkwasser verabreicht (20 mg/kg KG). Am 17. Tag wurde L-NAME nicht mehr dem Trinkwasser zugefügt. Es ist davon auszugehen, dass L-NAME nach 24 Stunden vollständig aus dem Blut eliminiert ist. Im Anschluss an die Auswaschung sollte mit einem Vergleichszeitraum für die Basalphase überprüft werden, ob die Blutdruckwerte nach dem Absetzen von L-NAME wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückfallen. Alle Zeiträume wurden getrennt betrachtet, wobei der einzelne Tag in eine Tag- und Nachtphase eingeteilt wurde. Die Nachtphase stellt den aktiveren Zeitraum der Ratten da, während die Tagphase die Ruhephase der Tiere ist.

Die einzelnen Ergebnisse für alle untersuchten Parameter wurden für Linie 4230 in Tabelle 5 und für Linie 6707 in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 5: Herzfrequenz, systolischer, mittlerer und diastolischer Blutdruck (Mittelwert ± Standardabweichung) der Linie 4230 (L4230+ =tg-positiv, n=6; Gesamt- = tg-negativ Gesamtgruppe, n=7); *=p<0,01 gegen Basalwert, °= p<0,01 gegen L-NAME-Wert.

Untersuchungs-zeitraum	Linie	Systolischer Blutdruck (mmHg)	Mittlerer Blutdruck (mmHg)	Diastolischer Blutdruck (mmHg)	Herzfrequenz (bpm)
Basal (Tag passiv)	L4230 +	124 ± 7	101 ± 6	83 ± 6	319 ± 15
	Gesamt -	121 ± 8	103 ± 8	89 ± 8	320 ± 13
Basal (Nacht aktiv)	L4230 +	129 ± 6	106 ± 5	88 ± 5	387 ± 16
	Gesamt -	129 ± 8	111 ± 8	96 ± 8	388 ± 13
L-NAME (Tag passiv)	L4230 +	145 ± 8*	119 ± 5*	99 ± 4*	290 ± 13*
	Gesamt -	144 ± 9*	123 ± 9*	106 ± 9*	292 ± 14*
L-NAME (Nacht aktiv)	L4230 +	151 ± 8*	124 ± 6*	104 ± 5*	349 ± 13*
	Gesamt -	149 ± 9*	128 ± 9*	112 ± 9*	353 ± 16*
Δ L-NAME und Basal (Tag passiv)	L4230 +	21 ± 4	18 ± 4	16 ± 4	-29 ± 5
	Gesamt -	22 ± 5	20 ± 5	18 ± 5	-28 ± 5
Δ L-NAME und Basal (Nacht aktiv)	L4230 +	22 ± 3	18 ± 3	15 ± 3	-39 ± 3
	Gesamt -	20 ± 6	18 ± 6	16 ± 6	-36 ± 8
Vergleichszeit-raum (Tag passiv)	L4230 +	122 ± 9°	98 ± 7°	80 ± 7°	309 ± 18°
	Gesamt -	120 ± 10°	100 ± 9°	84 ± 8°	311 ± 10°
Vergleichszeit-raum (Nacht aktiv)	L4230 +	127 ± 9°	104 ± 7°	86 ± 7°	376 ± 17°
	Gesamt -	126 ± 12°	106 ± 10°	90 ± 9°	381 ± 14°

Tabelle 6: Herzfrequenz, systolischer, mittlerer und diastolischer Blutdruck (Mittelwert ± Standardabweichung) der Linie 6707 (L6707+ = tg-positiv, n=4; Gesamt- = tg-negativ Gesamtgruppe, n=7); *= p<0,01 gegen Basalwert, °= p<0,01 gegen L-NAME-Wert.

Untersuchungs-zeitraum	Linie	Systolischer Blutdruck (mmHg)	Mittlerer Blutdruck (mmHg)	Diastolischer Blutdruck (mmHg)	Herzfrequenz (bpm)
Basal (Tag passiv)	L6707 +	120 ± 14	100 ± 14	85 ± 13	318 ± 7
	Gesamt -	121 ± 8	103 ± 8	89 ± 8	320 ± 13
Basal (Nacht aktiv)	L6707 +	127 ± 14	108 ± 13	92 ± 12	392 ± 19
	Gesamt -	129 ± 8	111 ± 8	96 ± 8	388 ± 13
L-NAME (Tag passiv)	L6707 +	143 ± 10*	121 ± 11*	104 ± 11*	298 ± 18*
	Gesamt -	144 ± 9*	123 ± 9*	106 ± 9*	292 ± 14*
L-NAME (Nacht aktiv)	L6707 +	149 ± 11*	127 ± 12*	110 ± 12*	361 ± 25*
	Gesamt -	149 ± 9*	128 ± 9*	112 ± 9*	353 ± 16*
Δ L-NAME und Basal (Tag passiv)	L6707 +	23 ± 4	21 ± 3	19 ± 2	-20 ± 16
	Gesamt -	22 ± 5	20 ± 5	18 ± 5	-28 ± 5
Δ L-NAME und Basal (Nacht aktiv)	L6707 +	22 ± 3	19 ± 2	18 ± 2	-31 ± 10
	Gesamt -	20 ± 6	18 ± 6	16 ± 6	-36 ± 8
Vergleichszeit-raum (Tag passiv)	L6707 +	120 ± 14°	100 ± 14°	84 ± 14°	309 ± 11°
	Gesamt -	120 ± 10°	100 ± 9°	84 ± 8°	311 ± 10°
Vergleichszeit-raum (Nacht aktiv)	L6707 +	127 ± 13°	107 ± 14°	90 ± 13°	379 ± 16°
	Gesamt -	126 ± 12°	106 ± 10°	90 ± 9°	381 ± 14°

3.2.1 Blutdruck

3.2.1.1 Systolischer Blutdruck

In der Ruhephase des Basalzeitraums war der mittlere systolische Blutdruck bei den tg-positiven Tieren der Linie 4230 124±7 mmHg (MW±SD) und steigerte sich in der L-NAME-Phase auf 145±8 mmHg. Nach dem Absetzen von L-NAME fiel der Blutdruck auf 122±9 mmHg zurück. Im Vergleich dazu wurde in der Tagphase für die tg-positiven Tiere der Linie 6707 ein mittlerer Basalwert von 120±14 mmHg gemessen. Dieser Wert steigerte sich in der L-NAME-Phase auf 143±10 mmHg und sank post L-NAME auf 120±14 mmHg herab. Die tg-negativen Kontrolltiere hatten im entsprechenden Zeitraum einen mittleren Basalwert von 121±8 mmHg. Durch den Einfluss von L-NAME stieg der Wert auf 144±9 mmHg an und fiel nach der Auswaschung auf 120±10 mmHg herab (Abbildung 12).

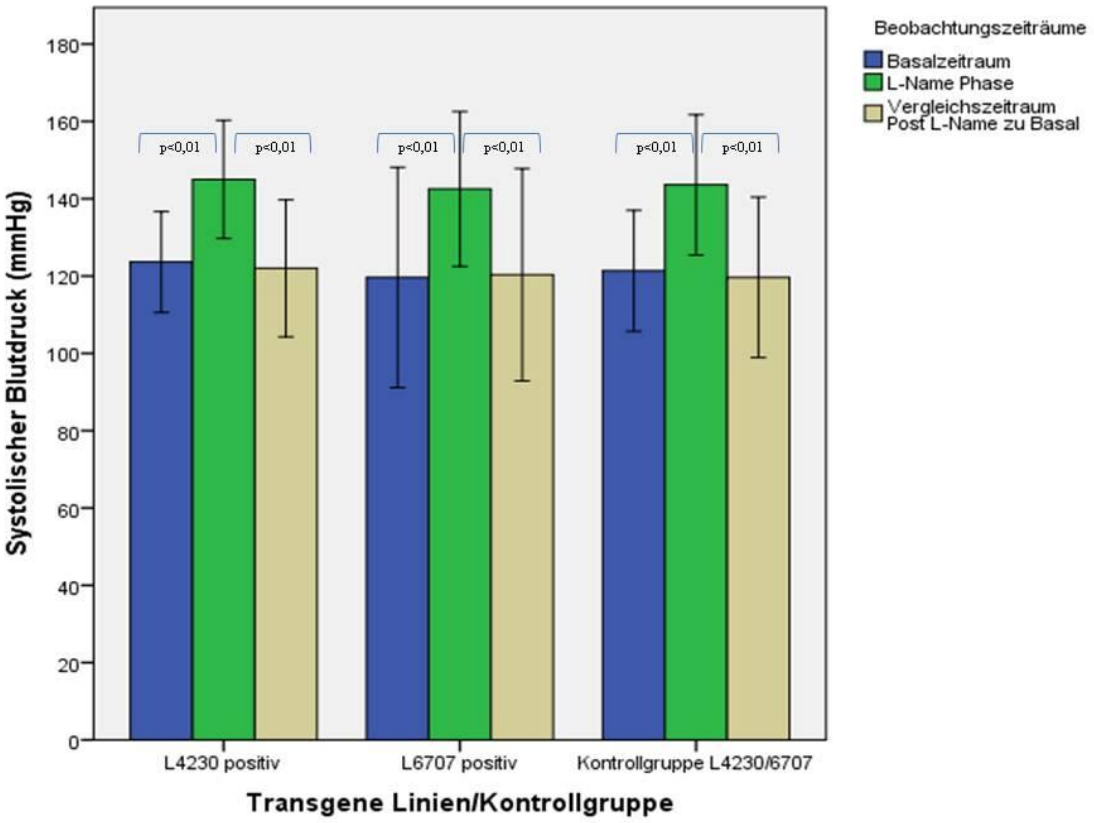

Abbildung 12: Systolischer Blutdruck (mmHg) für Linie 4230 und 6707 in der Tagphase. Die Säulen zeigen die Werte während der Basal-und L-NAME-Phase bzw. des Vergleichszeitraums post L-NAME (Mittelwerte ± zweifache Standardabweichung; L4230+, n=6; L6707+, n=4; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=7).

In der aktiven Nachtphase war der mittlere systolische Blutdruck der tg-positiven Linie 4230 im Basalzeitraum 129±6 mmHg und stieg in der L-NAME-Phase auf 151±8 mmHg an. Nach Auswaschen von L-NAME fiel der Wert auf 127±9 mmHg zurück. Für die tg-positive Linie 6707 wurde im Basalzeitraum ein Wert von 127±14 mmHg gemessen, der nach der L-NAME-Gabe auf 149±11 mmHg anstieg und im Vergleichszeitraum auf 127±13 mmHg abfiel. Die Kontrollgruppe für die tg-positiven Linien hatte im Basalzeitraum der Nachtphase einen Wert von 129±8 mmHg. In der L-NAME-Phase stieg dieser Wert auf 149±9 mmHg an und fiel nach der Auswaschphase auf 126±12 mmHg herab (Abbildung 13). Der Anstieg des mittleren systolischen Blutdrucks nach der L-NAME-Gabe war bei allen Tieren unabhängig von der Linie, dem Tg oder der Tag-/Nachtaktivität statistisch signifikant. Das galt auch für den Abfall des Blutdrucks, nachdem L-NAME wieder abgesetzt wurde. Zwischen den tg-positiven Tieren der Linie 6707 und 4230 und den tg-negativen Kontrolltieren waren die beschriebenen Messwerte in der Ruhephase am Tag und in der aktiven Nachtphase statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Das galt auch für den Vergleich der tg-positiven Tiere der Linie 6707 und Linie 4230. Die gemessenen Werte unterschieden sich nicht signifikant.

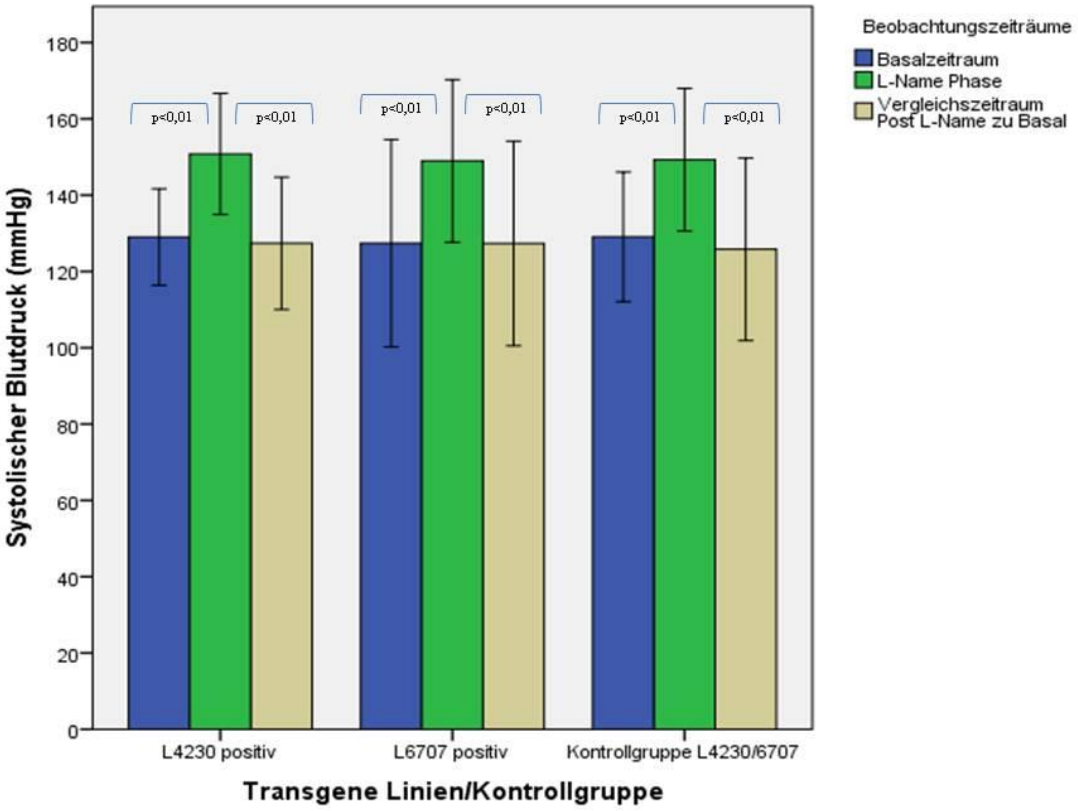

Abbildung 13: Systolischer Blutdruck (mmHg) für Linie 4230 und 6707 in der Nachtphase. Die Säulen zeigen die Werte während der Basal-und L-NAME-Phase bzw. dem Vergleichszeitraum post L-NAME (Mittelwerte ± zweifache Standardabweichung; L4230+, n=6; L6707+, n=4; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=7).

3.2.1.2 Mittlerer Blutdruck

Für die tg-positiven Tiere der Linie 4230 wurde im Ruhezeitraum der Basalphase ein mittlerer Blutdruck von 101±6 mmHg gemessen. Nach der L-NAME-Gabe steigerte sich dieser Wert auf 119±5 mmHg. Im Vergleichszeitraum lag der Wert für den mittleren Blutdruck bei 98±7 mmHg. Der mittlere Basalwert für die tg-positiven Tiere der Linie 6707 war in der Ruhephase 100±14 mmHg und stieg durch L-NAME auf 121±11 mmHg an. Nach dem Absetzten von L-NAME ergab sich ein Wert von 100±14 mmHg. Vergleichend dazu wurde für die tg-negativen Kontrollratten im Basalzeitraum der Wert von 103±8 mmHg gemessen. Dieser stieg in der L-NAME-Phase auf 123±8 mmHg an und fiel nach der Auswaschung auf 98±7 mmHg zurück (Abbildung 14).

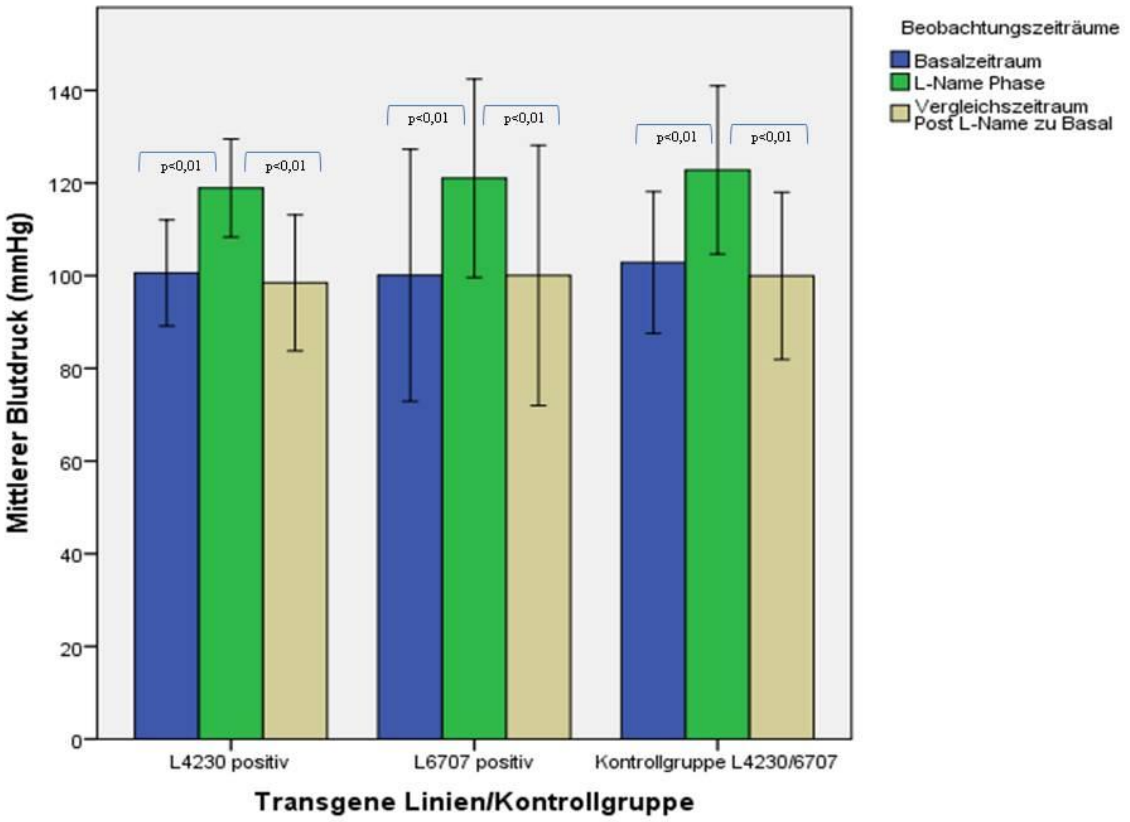

Abbildung 14: Mittlerer Blutdruck (mmHg) für Linie 4230 und 6707 in der Tagphase. Die Säulen zeigen die Werte während der Basal-und L-NAME-Phase bzw. dem Vergleichszeitraum post L-NAME zu Basal (Mittelwerte ± zweifache Standardabweichung; L4230+, n=6; L6707+, n=4; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=7).

Die tg-positiven Tiere der Linie 4230 hatten im Basalzeitraum der aktiven Nachtphase einen mittleren Blutdruck von 106±5 mmHg. In der L-NAME-Phase stieg der Wert auf 124±6 mmHg an und fiel nach Auswaschung von L-NAME auf 104±7 mmHg ab. Die zu vergleichende tg-positive Gruppe der Linie 6707 hatte einen mittleren Basalwert von 108±13 mmHg. Dieser stieg in der L-NAME-Phase auf 127±12 mmHg an und fiel im Vergleichszeitraum für die Basalwerte auf 107±14 mmHg herab. Die tg-negativen Kontrolltiere hatten einen mittleren Basalwert von 111±8 mmHg. Dieser stieg nach der L-NAME-Gabe auf einen Wert von 128±9 mmHg an und fiel nach der Auswaschung auf einen mittleren Blutdruck von 106±10 mmHg zurück. Abbildung 15 zeigt den mittleren Blutdruck der drei untersuchten Gruppen während der drei Untersuchungsphasen. Statistisch signifikante Unterschiede in der Tag- bzw. der Nachtphase gab es weder zwischen den tg-positiven Tieren der L6707 und L4230 und den nicht-transgenen Kontrolltieren noch zwischen den tg-positiven Tieren

der Linien 6707 und 4230. Jedoch waren der Anstieg und Abfall des mittleren Blutdrucks, verursacht durch L-NAME, bei allen tg-positiven und tg-negativen Tieren beider Linien während der Tag- und Nachtphase statistisch signifikant.

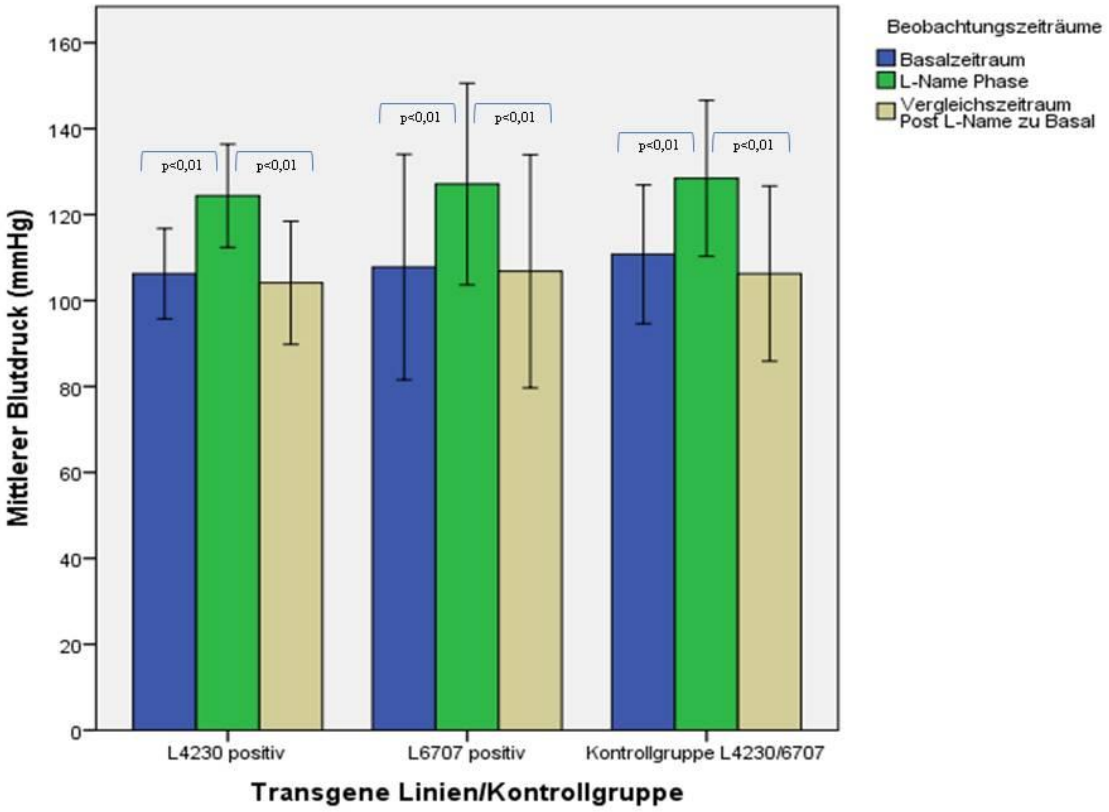

Abbildung 15: Mittlerer Blutdruck (mmHg) für Linie 4230 und 6707 in der Nachtphase. Die Säulen zeigen die Werte während der Basal-und L-NAME-Phase bzw. dem Vergleichszeitraum post L-NAME zu Basal (Mittelwerte ± zweifache Standardabweichung; L4230+, n=6; L6707+, n=4; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=7).

3.2.1.3 Diastolischer Blutdruck

Während der Ruhephase der tg-positiven Ratten der Linie 4230 wurde ein basaler mittlerer diastolischer Blutdruck von 83±6 mmHg gemessen. In der L-NAME-Phase stieg der Blutdruck auf 99±4 mmHg an und fiel durch Absetzen des NO-Synthase-Hemmers auf 80±7 mmHg zurück. Der mittlere diastolische Blutdruck für die tg-positiven Tiere der Linie 6707 hatte einen Basalwert von 85±13 mmHg in der passiven Tagphase. Nach der

L-NAME-Gabe stieg der Wert auf 104±11 mmHg an und fiel im Vergleichszeitraum auf einen mittleren diastolischen Blutdruck von 84±14 mmHg herab. Für die tg-negative Kontrollgruppe ergab sich ein Basalwert von 89±8 mmHg, der unter Einfluss von L-NAME auf 106±9 mmHg stieg und dann nach dem Absetzen auf einen mittleren diastolischen Blutdruck von 84±8 mmHg herabfiel (Abbildung 16).

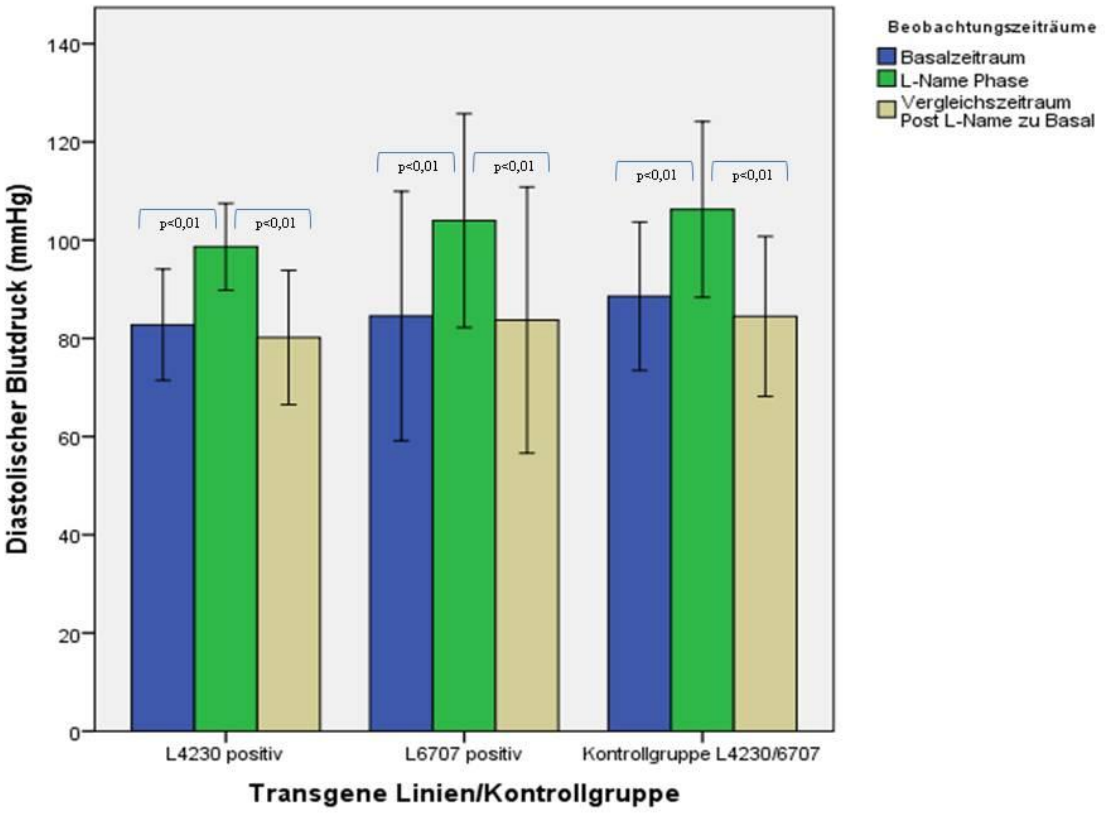

Abbildung 16: Diastolischer Blutdruck (mmHg) für Linie 4230 und 6707 in der Tagphase. Die Säulen zeigen die Werte während der Basal-und L-NAME-Phase bzw. dem Vergleichszeitraum post L-NAME (Mittelwerte ± zweifache Standardabweichung; L4230+, n=6; L6707+, n=4; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=7).

Im aktiven Zeitraum war der mittlere diastolische Blutdruck im Basalzeitraum der tg-positiven Linie 4230 bei 88±5 mmHg und steigerte sich durch die L-NAME-Gabe auf 104±5 mmHg. Post L-NAME fiel der mittlere diastolische Messwert auf 86±7 mmHg ab. Im Vergleich dazu wurde für die tg-positive Linie 6707 ein mittlerer diastolischer Basalwert in der aktiven Nachtphase von 92±12 mmHg gemessen, der in der L-NAME-Phase auf 110±12 mmHg anstieg und im Anschluss an die Auswaschung auf 90±13 mmHg herab fiel.

Die tg-negative Kontrollgruppe hatte im Basalzeitraum einen Wert von 96±8 mmHg. In der L-NAME-Phase stieg der Wert auf 112±9 mmHg, um dann im Vergleichszeitraum post L-NAME auf 90±9 mmHg zu sinken (Abbildung 17). Die statistische Auswertung für die Tag- und Nachtphase ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen tg-positiven Tieren der Linien 6707 und der nicht-transgenen Gesamtkontrollgruppe, sowie zwischen den tg-positiven Tieren der L4230 und der tg-negativen Gesamtgruppe. Zwischen den tg-positiven Tieren beider Linien wurde kein signifikanter Unterschied gemessen. Nach dem Einsatz von L-NAME stiegen die Blutdruckwerte bei allen transgenen und nicht-transgenen Tieren unabhängig von der Linie und der Tages- und Nachtzeit statistisch signifikant an. Das Gleiche galt auch für den Blutdruckabfall, nachdem die Wirkung von L-NAME nicht mehr existierte. Die Werte zwischen L-NAME-Phase und Vergleichszeitraum unterschieden sich statistisch signifikant.

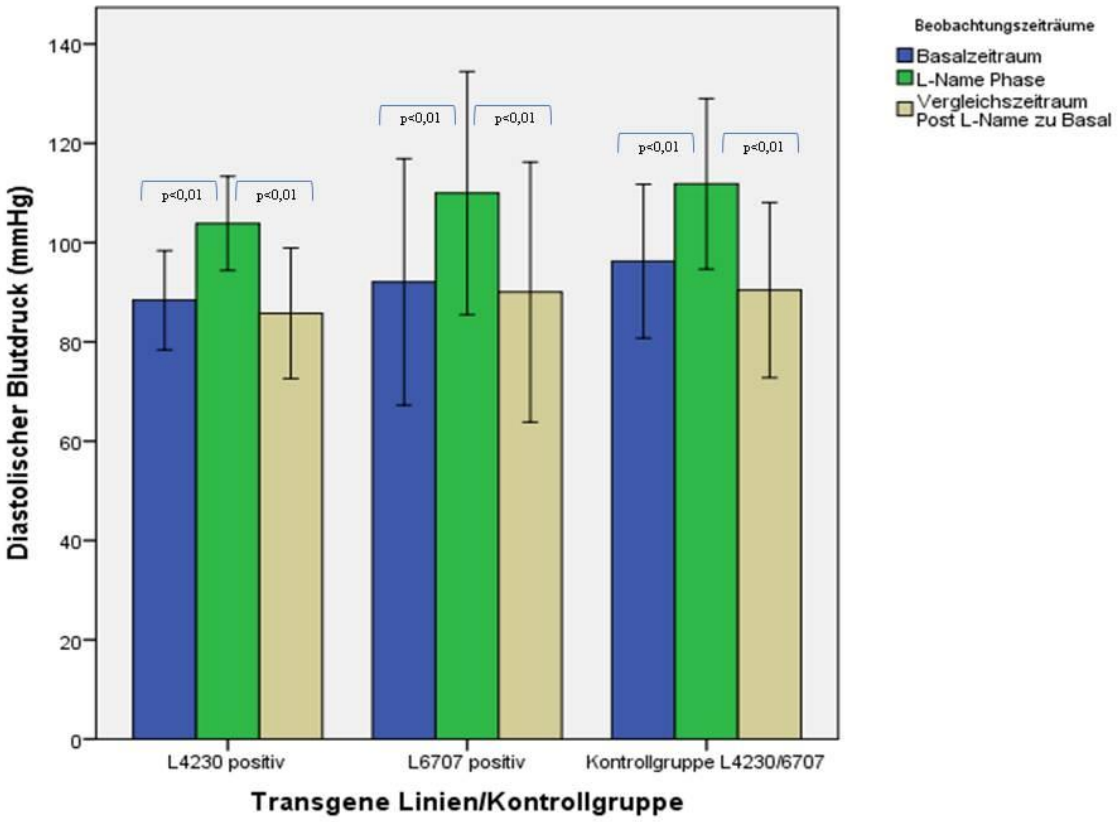

Abbildung 17: Diastolischer Blutdruck (mmHg) für Linie 4230 und 6707 in der Nachtphase. Die Säulen zeigen die Werte während der Basal-und L-NAME-Phase bzw. dem Vergleichszeitraum post L-NAME (Mittelwerte ± zweifache Standardabweichung; L4230+, n=6; L6707+, n=4; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=7).

3.2.2 Herzfrequenz

Die mittlere Herzfrequenz in der passiven Tagphase hatte bei den tg-positiven Ratten der Linie 4230 einen Basalwert von 319±15 bpm. Durch den NO-Synthase-Hemmer fiel der Wert auf 290±13 bpm ab und stieg im Vergleichszeitraum wieder auf eine mittlere Herzfrequenz von 309±18 bpm an. Der Basalwert für die tg-positiven Ratten der Linie 6707 war 318±7 bpm und fiel in der L-NAME-Phase auf 298±18 bpm. Nach dem Absetzen von L-NAME steigerte sich die mittlere Herzfrequenz wieder auf 309±11 mmHg. Vergleichend ergab sich für die Kontrollgruppe im Ruhezeitraum ein Basalwert von 320±13 bpm, der unter L-NAME auf 292±4 bpm herabfiel. Nach der L-NAME-Phase stieg die mittlere Herzfrequenz wieder auf 311±10 bpm an (Abbildung 18).

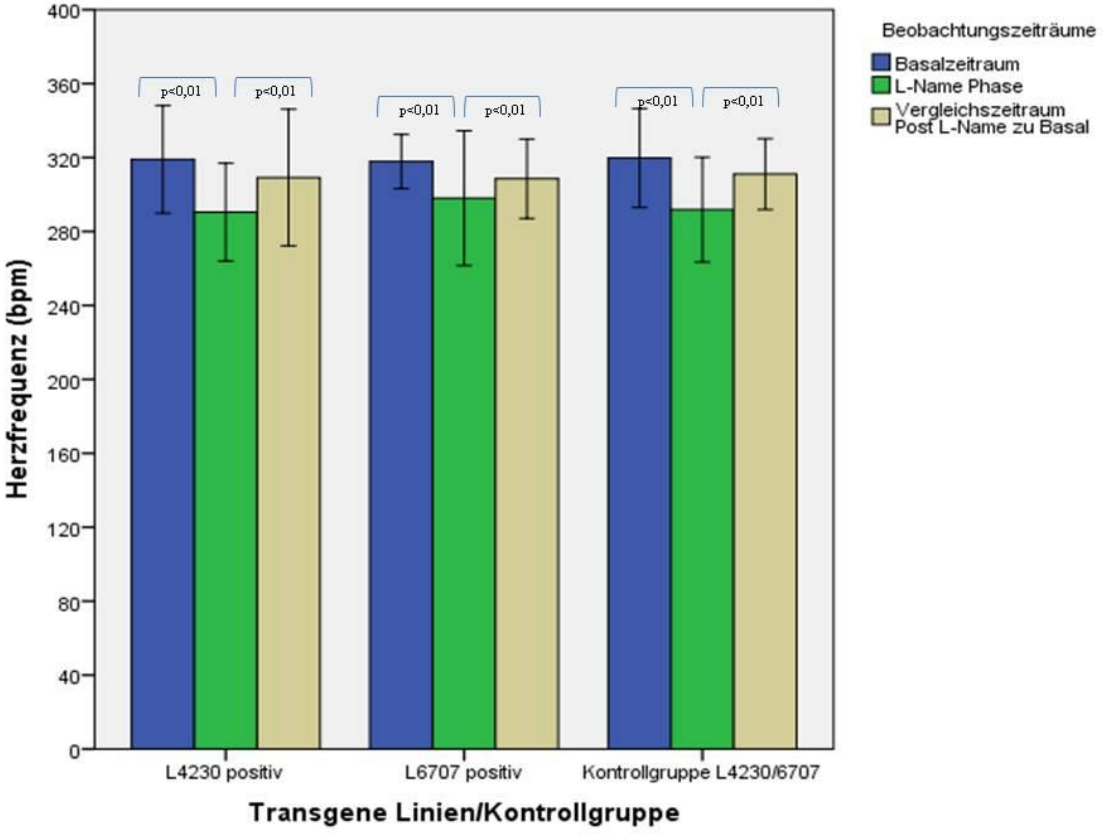

Abbildung 18: Darstellung der Herzfrequenz in der Tagphase. Die Säulen zeigen die Werte während der Basal- und L-NAME-Phase bzw. dem Vergleichszeitraum post L-NAME (Mittelwerte ± zweifache Standardabweichung; L4230+, n=6; L6707+, n=4; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=7); bpm=beats per minute.

In der Nachtphase des Basalzeitraums wurde für die tg-positiven Tiere der Linie 4230 eine mittlere Herzfrequenz von 387±16 bpm gemessen. Dieser Wert sank durch die L-NAME-Gabe auf 349±13 bpm herab und stieg anschließend, nach dem Auswaschen, auf 376±17 bpm an. Für die tg-positive Linie 6707 wurde vergleichend dazu der Basalwert mit 392±19 bpm bestimmt. In der L-NAME-Phase verringerte sich die mittlere Herzfrequenz auf 361±25 bpm und steigerte sich im Vergleichszeitraum post L-NAME auf 379±16 bpm. Die Kontrolltiere hatten eine mittlere basale Herzfrequenz von 388±13 bpm, die sich durch Einfluss von L-NAME auf 353±16 bpm verringerte und durch die Auswaschung wieder auf 381±14 bpm anstieg (Abbildung 19). Die beschriebenen Messwerte für die mittlere Herzfrequenz bei tg-positiven Tieren der Linie 6707 und der Linie 4230 unterschieden sich von der tg-negativen Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant. Auch der Vergleich zwischen den tg-positiven Tieren beider Linien untereinander war statistisch nicht signifikant. Der Abfall und Anstieg der Herzfrequenz, ausgelöst durch die L-NAME-Gabe, war statistisch signifikant, aber bei allen tg-positiven und tg-negativen Tieren beider Linien gleich und unabhängig von der Tages- und Nachtzeit.

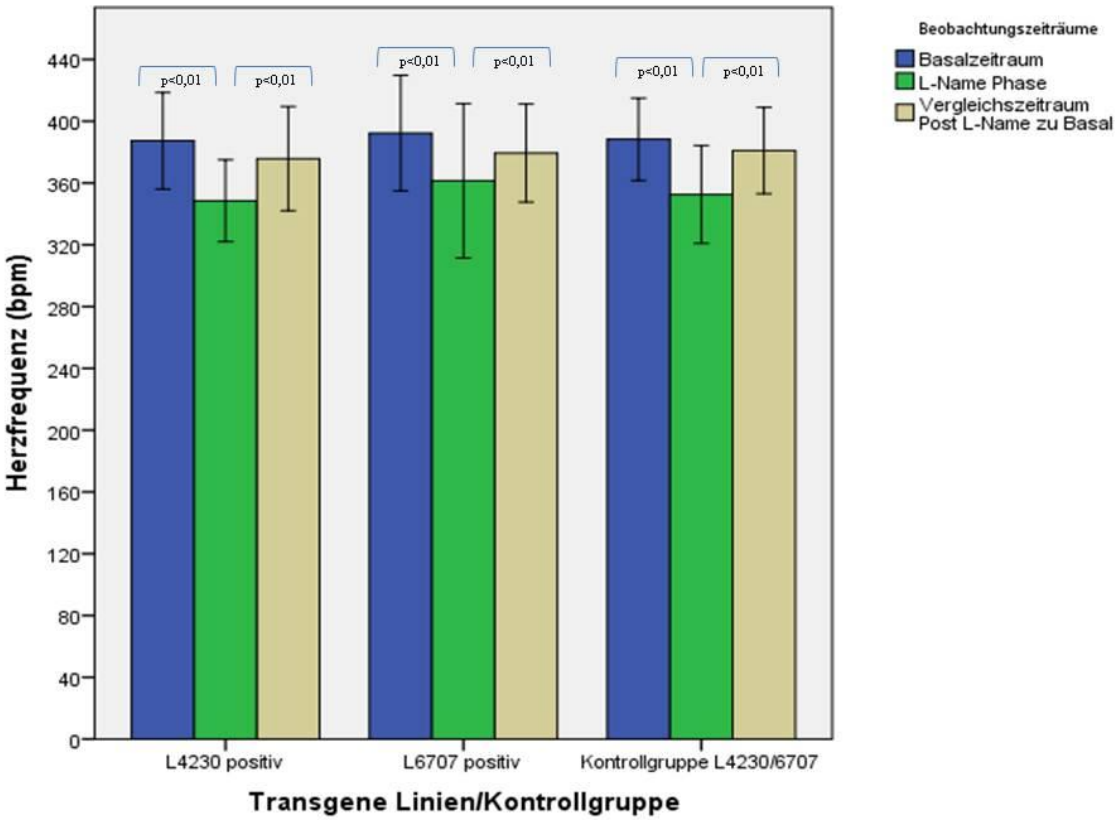

Abbildung 19: Darstellung der Herzfrequenz in der Nachtphase. Die Säulen zeigen die Werte während der Basal- und L-NAME-Phase bzw. dem Vergleichszeitraum post L-NAME (Mittelwerte ± zweifache Standardabweichung; L4230+, n=6; L6707+, n=4; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=7); bpm= beats per minute.

3.3 Histomorphometrie

Nach Abschluss der telemetrischen Messung wurden die Aorten von allen Ratten unter Betäubung durch Perfusion fixiert und zur histomorphometrischen Untersuchung entnommen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tiere der Linien 4230 und 6707 ein Alter von 18 Wochen. Der relative Anteil der Media am Gesamtgefäßquerschnitt war bei den tg-positiven Tieren der Linie 4230 18,4±2 %. Im Vergleich dazu hatten die tg-positiven Ratten der Linie 6707 einen Anteil von 18,9± 2 %. Für die nicht transgenen Kontrolltiere der beiden tg-positiven Gruppen wurde insgesamt ein Wert von 18,7±1 % gemessen (Abbildung 20).

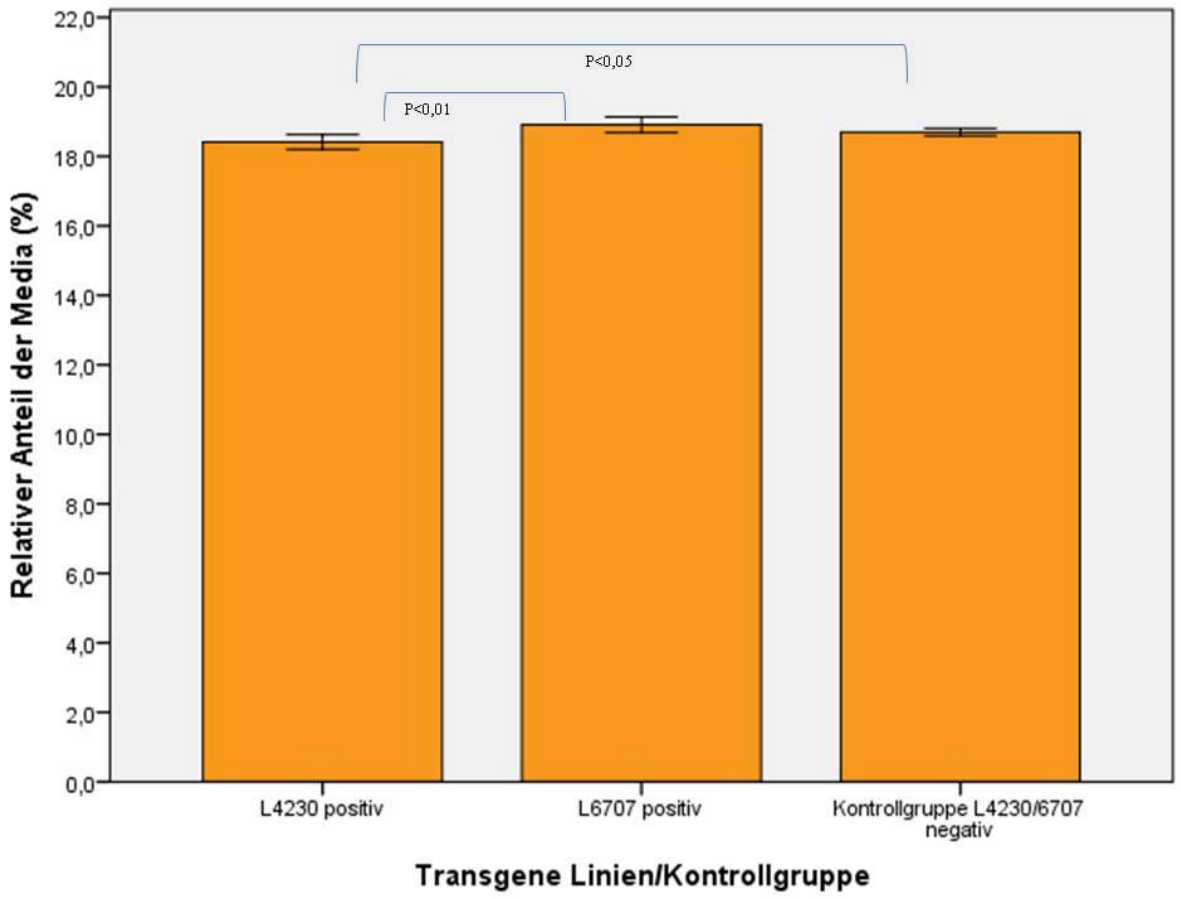

Abbildung 20: Relativer Anteil der Mediafläche an der Gesamtgefäßquerschnittsfläche (in %). Die Säulen stellen die Mittelwerte dar, die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall (95 %) (L4230+, n=360; L6707+, n=300; Kontrollgruppe L4230/6707-, n=420). Die Fallzahl ergibt sich aus 60 Messwerten pro Tier.

Der Unterschied von 0,5 % im relativen Anteil der Media am Gesamtgefäßquerschnitt zwischen den tg-positiven Tieren der Linien 4230 und 6707 ist statistisch signifikant (p= 0,0016). Der Unterschied von -0,3 % zwischen den tg-positiven Tieren der Linie 4230 und den Kontrolltieren ist statistisch signifikant (p= 0,0133). Für den Unterschied zwischen tg-positiven Tieren der Linie 6707 und den Kontrolltieren (+0,2 %) ergab sich ein statistischer Trend (p= 0,0688). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Generische Messwerte (Mittelwerte ± Standardabweichung) von Gesamtquerschnitt, Lumen, Fläche der Media und relativem Anteil der Media am Gesamtgefäßquerschnitt (Mittelwert ± Standardabweichung). Aufgeteilt nach tg-positiven und tg-negativen Tieren beider Linien (L4230+ =tg-positiv, L6707+ =tg-positiv, L4230/6707- = tg-negativ). Die Fallzahl ergibt sich aus 60 Messwerten pro Tier.

Linie	Gesamtquerschnittsfläche	Lumenfläche	Fläche der Media	relativer Anteil Media in %
L4230+ (n=360)	5202986 ± 708049	4246952 ± 594963	956034 ± 155689	18,4 ± 2
L6707+ (n=300)	5455921 ± 665589	4423940 ± 544945	1031981 ± 170538	18,9 ± 2
L4230/6707- (n=420)	5536261 ± 638058	4499753 ± 507691	1036509 ± 146417	18,7 ± 1

4 Diskussion

Endothelin hat in zwei Jahrzehnten nach seiner Entdeckung einen festen Platz in der Erforschung von kardiovaskulären und nicht-kardiovaskulären Erkrankungen eingenommen. Als starker Vasokonstriktor steht ET-1 in direktem Zusammenhang mit Hypertonie, eine der vorherrschenden Krankheiten in Industrieländern. Die Effekte von ET werden durch die ET_A- und ET_B-Rezeptoren, die sich auf EZ, VSMC und anderen Geweben und Zellen befinden, vermittelt. Der ET_AR stand dabei aufgrund seiner starken vasokonstriktorischen Potenz und konstitutiven Expression auf VSMC im Fokus von medizinischen Forschungen. Die Rolle des ET_BR, der auf EZ, nicht aber auf allen VSMC konstitutiv exprimiert wird, war hingegen weniger gut untersucht.

In dieser Arbeit wurden zwei transgene Rattenlinien (bezeichnet als L4230 und L6707) phänotypisch charakterisiert. Die beiden transgenen Linien waren Ergebnis eines Projektes, das die Schaffung eines transgenen Rattenmodells mit Koexpression des humanen ET_BR unter Kontrolle des SM22α–Promotors zum Ziel hatte. Durch diesen Promoter sollte die Expression des humanen ET_BR spezifisch auf den glatten Gefäßmuskel ausgerichtet werden. Die Untersuchung sollte Aufschluss darüber geben, welche phänotypischen Effekte eine Koexpression des ET_BR auf VSMC hat, wobei konkret Effekte auf den Blutdruck und die Morphologie der Gefäßwand (aortale Media) Ziele der Analysen waren.

Mittels konventioneller und Real-time PCR wurde die Expression des tg-Rezeptors (hET_B) in beiden Linien bestätigt (Orzechowski et al. 2009). In beiden tg-Linien wird der tg-Rezeptor (hET_B) sowohl in der Aorta als auch in der A. carotis exprimiert. In Aorten der Linie 6707 wurde mittels Real-time PCR zudem eine deutlich stärkere hET_B-Expression als in Linie 4230 gefunden. In den Mesenterialarterien konnte hingegen nur in Linie 6707 eine hET_B-Expression gezeigt werden. In der Niere wurde eine Expression von hET_B nicht nachgewiesen. Untersuchungen der Transgenexpression im Zeitverlauf (bis zu einem Alter von 4 Monaten) zeigten eine Abregulation der hET_B-Expression in beiden tg-Linien.

4.1 Radiotelemetrie

In der eigenen Untersuchung erfolgte die Blutdruckmessung mittels Radiotelemetrie in der Aorta. Diese Methode ist etabliert und entspricht dem sogenannten Gold-Standard für Messungen an nicht-katheterisierten und nicht-narkotisierten Tieren (Plehm et al. 2006). Physiologische Daten können kontinuierlich über einen längeren Zeitraum aufgezeichnet werden.

Die untersuchten Tiere bewegen sich über den gesamten Messzeitraum frei in ihrer gewohnten Umgebung und die Daten werden nicht durch operative Eingriffe und Narkosemittel beeinflusst (Huetteman und Bogie 2009).

4.1.1 Stichprobenplanung

Die Stichprobenplanung in der eigenen Untersuchung stellte eine Kompromisslösung in der Versuchsplanung dar. Ziel der Untersuchung war es, biologisch relevante Unterschiede in den Versuchsparametern herauszufinden. Hierbei wurden biostatistische Grundsätze und die Vermeidung von unnötig hohen finanziellen Belastungen bzw. Tiereinsatz beachtet. Der mittlere arterielle Ruheblutdruck ist bei Menschen und Labortieren ähnlich (Engelhardt und Breves 2009). Laut WHO wird der Normalwert für den systolischen Blutdruck bei Menschen < 130 mmHg und der diastolische Blutdruck mit Werten < 90 mmHg angegeben. Eine Hypertonie Grad 1 (ohne Endorganschäden) besteht bei systolischen Blutdruckwerten zwischen 140-159 mmHg, für den diastolischen Blutdruck gilt der Bereich von 90-99 mmHg. Die Einteilung erfolgt bis Grad 3, wobei die Hypertonie schwere Organschäden und manifeste kardiovaskuläre Folgeerkrankungen verursacht. Die systolischen Blutdruckwerte liegen dabei über 180 mmHg bzw. diastolisch über 110 mmHg. Um eine Differenz von nur 20 mmHg zwischen den Versuchsgruppen einer normalverteilten Population (z.B. mittlerer Blutdruck (MW±SD) 110±11 mmHg) unter Verwendung des t-Testes herauszufinden, genügt eine Stichprobenzahl von mindestens n=5 Tieren je Versuchsgruppe. Hierbei entspricht der Fehler erster Art (α) 5 % und der Fehler zweiter Art (β) 20 %. Um diesem Anspruch gerecht zu werden und dabei dennoch den Tiereinsatz gering zu halten, wurde die Kontrollgruppe aus beiden tg-negativen Linien zusammengesetzt.

4.1.2 Zeitpunkt der Untersuchung

Die Zielsetzung des Experiments war die Untersuchung des ET_BR am adulten Tier. Unter dieser Prämisse war der frühestmögliche Zeitpunkt für die Implantation der Telemetriesender die 14. Lebenswoche. Die Aufzeichnung der Daten begann einen Tag später. Um eine Verfälschung der Daten durch Einwirkung der Operation zu vermeiden, wurde der Beginn des Auswertungszeitraums der Basalwerte auf 9 Tage nach der Implantation gelegt. Der Messzeitpunkt in diesem Versuch muss aufgrund der durch Zollmann (2003) bereits vermuteten Abregulation des Transgens kritisch betrachtet werden. Bei der Untersuchung von Zollmann

(2003) wurde bei neonatalen Ratten (2. Lebenstag) der L4230 die ET_B-Expression eindeutig in verschiedenen Organen nachgewiesen. Nach einem Monat war die Expression des Transgens in allen untersuchten Organen schon deutlich geringer. In der Aorta und A. carotis wurde ebenfalls die Expression des Transgens bei einen Monat alten Tieren der L4230 nachgewiesen. Die Expressionsdaten für die eigenen untersuchten Linien wurden im Alter von einem Monat und teilweise im Alter von 4 Monaten erhoben. Nach 4 Monaten zeigte sich zum Teil schon keine Expression mehr. Es ist möglich, dass durch die Abregulation des Transgens ein eventueller hypertensiver Effekt des ET_BR bei den hier verwendeten adulten Ratten nicht mehr messbar war.

Die Ursache der postnatalen Abregulation der Expression des Transgens ist nicht abschließend geklärt. Wahrscheinlich ist dies jedoch auf fehlende regulatorischen Elemente im zur Generierung des tg-Modells verwendeten SM22α-Promotorkonstrukts zurückzuführen (Xu et al. 2003). Xu et al. stützten diese Annahme durch Verwendung eines bakteriellen artifiziellen Chromosoms (BAC). Durch BAC hielt eine SM22α-gesteuerte Expression auch im adulten Tier an.

4.2 Blutdruckphänotyp transgener Rattenlinien im Basalzeitraum

Im Basalzeitraum ergaben sich für die untersuchten Parameter (systolischer, mittlerer bzw. diastolischer Blutdruck sowie Herzfrequenz) zwischen beiden tg-positiven Linien und auch im Vergleich zu der tg-negativen Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede. Diese Ergebnisse entsprechen denen der orientierenden Untersuchungen, die von Zollmann (2003) an der Linie 4230 durchgeführt wurden. Hier wurde der Blutdruck jedoch invasiv gemessen und die Tiere waren sehr viel jünger. Bei 3 einen Monat alten Tieren wurden in Narkose (Ketamin/Xylazin) vor und nach intraarterieller Bolusinjektion des selektiven ET_BR-Agonisten BQ-3020 die Blutdruckwerte untersucht. Die Ergebnisse ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den tg-positiven und tg-negativen Tieren. Die Blutdruckantwort war jedoch bei den tg-positiven Tieren mit 15 mmHg Unterschied zu den tg-negativen Tieren deutlich höher, als die Unterschiede zwischen den Gruppen in der eigenen Untersuchung. Es kann auf die sehr kleine Gruppengröße bei Zollmann (2003) zurückzuführen sein, dass keine statistische Signifikanz erkennbar war. Des Weiteren wurden auch Messungen an anästhesierten 8 Wochen alten Ratten der Linie 4230 gemacht. Zwischen tg-positiven Tieren und den Kontrollen bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede (Orzechowski et al., 2003, unveröffentlichte Daten). Vergleichbare Daten für die Linie 6707

liegen nicht vor. Diese und die eigenen Ergebnisse sprechen dafür, dass die transgenen Ratten ab einem Alter von 4 Wochen normotensiv waren. Unterstützt wird diese Annahme noch durch eine Untersuchung in der gleichen Arbeitsgruppe an isolierten Mesenterialsegmenten der L4230. Diese Widerstandsgefäße der tg-positiven Tiere zeigten unter ET_AR-Blockade (BQ-123) keine vermehrte Kontraktilität auf ET-1 (Orzechowski et al., 2003, unveröffentlichte Daten). Ein möglicher hypertensiver Effekt in den ersten 4 Lebenswochen ist nicht auszuschließen, aber aus methodischen Gründen nicht überprüfbar.

Saxena (2007) untersuchte ein ET_AR-Überexpressionsmodell bei Ratten. Zur Messung des Blutdrucks wurden bei den transgenen Tieren auch telemetrische Blutdruckmessungen durchgeführt. Die verwendeten Tiere waren mit einem Alter von 4-8 Wochen im Messzeitraum jünger als jene in dieser Arbeit. Saxena (2007) kam zu dem Ergebnis, dass der systolische Blutdruck bei der transgenen Rattenlinie im Vergleich zu den negativen Geschwistertieren während der Basalzeit nur einen geringen signifikanten Unterschied hatte (Differenz von 4 mmHg). Bei invasiver Blutdruckmessung über die katheterisierte A. carotis an 6 Wochen alten Tieren einer weiteren transgenen ET_AR-Linie wurden signifikant höhere Blutdruckwerte (systolischer Blutdruck +33 mmHg; diastolischer Blutdruck +17 mmHg; mittlerer Blutdruck +25 mmHg) als bei den Kontrolltieren gemessen. Die Unterschiede wurden auf die unterschiedliche Expression des ET_AR in diesen Linien zurückgeführt.

Die Unterschiede zwischen den Untersuchungen am ET_B- und ET_A-Modell bestehen unter anderem im Alter der untersuchten Tiere und in der genaueren Kontrolle der Expressionsdaten. Für die ET_A-Linien wurde bis zu einem Jahr die transgene Expression überprüft und Rezeptorbindungsstudien durchgeführt (Kliesch 2009). Teilweise wurde bei einigen ET_A-Linien noch im Alter von einem Jahr tg-Expression nachgewiesen. So konnten die Versuche anhand des höchsten Expressionslevels der tg-Tiere vorgenommen werden. Vergleichbare Daten liegen für die ET_B-Linien nicht vor. Möglicherweise hat auch die unterschiedliche Funktion der Rezeptoren Einfluss auf die Ergebnisse. Beide Rezeptoren sind auf VSMC lokalisiert und vermitteln vasokonstriktorische Effekte (Rubanyi und Polokoff 1994). Der ET_AR ist jedoch vermehrt auf den VSMC vorhanden und nachweislich stark in die Vasokonstriktion involviert. Der ET_BR ist hingegen stärker auf EZ zu finden und übernimmt mit der Vasodilatation eine duale Rolle in der Regulation des Blutdrucks (Kedzierski und Yanagisawa 2001). Die Koexpression des ET_BR bzw. die ungenügende Ausrichtung der Expression speziell auf den glatten Gefäßmuskel ist eventuell nicht ausreichend für eine Blutdruckänderung unter basalen Bedingungen. Eine mögliche venöse Expression des ET_BR ist nicht ausgeschlossen, wurde bisher aber nicht untersucht. Die unterschiedlich starke Blut-

druckantwort, die Zollmann (2003) bei seinen Untersuchungen auf BQ-3020 erhielt, ist unter Umständen durch die Expression von ET_BR auf Venen zurückzuführen. In diesem Bereich müssten ausführlichere Studien gemacht werden. In Betracht kommen auch physiologische Gegenregulationen gegen die Überexpression des ET_BR, die eine mögliche Blutdruckantwort kompensiert haben.

4.3 Blutdruckphänotyp der tg ET_BR-Rattenlinien unter Einfluss von L-NAME

Die Aktivierung des endothelialen ET_BR führt zur Produktion von Stickoxid und Prostazyklin, die eine Vasodilatation vermitteln. Die ausgleichende Wirkung von NO ist von großer Bedeutung für den Gefäßtonus. Um den dilatierenden NO-Effekt auf den Gefäßmuskeltonus auszuschalten, wurden nach Aufzeichnung der Grunddaten Messungen unter der oralen Gabe von L-NAME durchgeführt. L-NAME ist ein in der Hypertonieforschung üblicherweise eingesetzter NO-Synthase-Hemmer (Gardiner et al. 1990). Bei Ratten äußert sich der Effekt von L-NAME in steigendem Blutdruck und sinkender Herzfrequenz (Scrogin et al. 1998). Dementsprechend verhielten sich unter Gabe von L-NAME auch Blutdruck und Herzfrequenz. Die Blutdruckwerte stiegen im Vergleich zu den Basalwerten signifikant an, während die Herzfrequenz signifikant sank. Jedoch war der Anstieg zwischen den tg-positiven Tieren beider Linien und der tg-negativen Kontrollgruppe statistisch nicht unterschiedlich. Gleiches galt für das Absinken der Herzfrequenz, auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Untersuchung von Saxena (2007). Er führte bei der telemetrischen Messung am ET_AR-Modell der Linie 6351 auch eine dreitägige orale Behandlung der Ratten (L6351) mit L-NAME durch. Zwischen den tg-positiven und tg-negativen Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen, wobei der Anstieg im Vergleich zu den Basalwerten auch hier signifikant war. Die nach der Anpassung an L-NAME gemessenen Werte für die einzelnen Blutdruckparameter sanken nach dem Absetzen von L-NAME wieder auf das basale Ausgangsniveau zurück. Die Werte für die Herzfrequenz stiegen wie erwartet wieder an. Die Ausschaltung der NO-Synthase sollte zeigen, ob diese möglicherweise einen blutdrucksteigernden Effekt der ET_BR-Koexpression ausgeglichen hat. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Zu bemerken ist, dass Prostazyklin als starker gefäßrelaxierender Faktor nicht von L-NAME beeinflusst wird und seine Wirkung weiterhin ausüben kann. Ein möglicher Einfluss von Prostazyklin und anderen gegenregulatorischen Mechanismen ist nicht untersucht worden.

4.4 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie ist eine etablierte Methode, um Gefäße zu untersuchen und Veränderungen an deren Aufbau festzustellen (Makki et al. 1994; Safar et al. 2001; Reddy et al. 2011). In beiden transgenen Linien wurde die Expression des hET_B in der Aorta nachgewiesen. Es wurden aus diesem und aus methodischen Gründen histomorphometrische Untersuchungen an der thorakalen Aorta durchgeführt. Allen Versuchstieren wurde nach Abschluss der telemetrischen Messung im Alter von 18 Wochen die Aorta entnommen.

4.5 Histomorphometrischer Phänotyp transgener Rattenlinien

Die tg-positiven Tieren der Linie 4230 hatten einen signifikant geringeren relativen Anteil der Media am Gesamtgefäßquerschnitt gegenüber der Kontrollgruppe (-0,3 %, $p<0,05$). Die tg-positiven Tieren der Linie 6707 hatten einen tendenziell höheren relativen Anteil der Media am Gesamtgefäßquerschnitt gegenüber der Kontrollgruppe (+0,2 %, $p<0,1$). Um ein repräsentatives Ergebnis pro Tier zu erhalten, sind 60 Messwerte pro Tier in die statistische Berechnung eingegangen. Bei dieser Vorgehensweise wird auch die Gefäßvariation des einzelnen Tieres berücksichtigt.

In der gleichen Arbeitsgruppe wurden Untersuchungen mit der L4230 im Alter von 8 Wochen durchgeführt. Hierbei hatten die tg-positiven Tiere (n=12) einen relativen Anteil der medialen Aorta von 18,2±1,5 %. Die tg-negativen Tiere (n=10) hatten einen Wert von 17,8±1,1 %. Der Unterschied war nicht signifikant (Orzechowski et al., 2003, unveröffentlichte Daten). Vergleichbare Daten für die L6707 liegen nicht vor.

Eine Hypertrophie/-plasie der aortalen Media bei der juvenilen tg-positiven Ratte ist vorstellbar (Zollmann 2003). Der fehlende Unterschied zwischen tg-positiven und tg-negativen Versuchsgruppen in der eigenen Untersuchung kann mit der Abregulation des Transgens beim adulten Tier in Zusammenhang stehen. Ausgeschlossen ist, dass endogene Ratten-Endotheline nicht an den humanen ET_BR binden, da humanes ET-1 und Ratten ET-1 in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind.

In Betracht kommt auch, dass der ET_BR keinen trophischen Effekt vermittelt, sondern vielmehr zur Vasoprotektion beiträgt. In einem Desoxycorticosteronacetat (DOCA) salzsensitiven Hypertoniemodell zeigte Matsumura (1999) bei Ratten eine signifikante Erhöhung der aortalen Hypertrophie durch die Behandlung der Tiere mit einem selektiven ET_BR-Antagonisten (A192621). In den Widerstandsgefäßen von Diabetes-Ratten führte die selektive Blockade von ET_BR zu einem vermehrten vaskulären Umbau (Sachidanandam et al.

2007). Insbesondere bei vaskulären Schädigungsmodellen, sind weitere Belege für eine vasoprotektive Funktion des ET_BR zu finden. Durch die Ausschaltung des ET_BR-Systems bei einem ET_BR-Knockout-Modell bzw. über eine pharmakologische Blockade mit selektiven ET_BR-Antagonisten fanden Murakoshi et al. (2002) heraus, dass sich der vaskuläre Umbau in der untersuchten A. carotis verschlechterte. Die Ausschaltung des ET_BR erwies sich als schädlich für den vaskulären Umbau nach Gefäßverletzung. Dem ET_BR werden somit antiproliferative Effekte zugesprochen. An spotting-lethal Ratten (Mutation ohne ET_BR-Expression) untersuchten Kitada et al. (2009) die pathophysiologische Rolle des ET_BR. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass die Neointimabildung bei ET_B-defizienten Ratten nach Ballonkatheterverletzung verstärkt auftritt. Weiterhin gehen sie davon aus, dass eine chronische ET_BR-Unterdrückung zu einer Überstimulierung des ET_AR führt, wodurch der Gefäßumbau gesteigert wird. Eine neointimale Hyperplasie kann nur durch Blockade des ET_AR verhindert werden, während die ET_BR-Blockade sich nachteilig auswirkt. Gesichert ist aber nicht, auf welchen Zellen der ET_BR lokalisiert ist, der diesen Effekt vermittelt.

Es finden sich in der Literatur ausreichend Belege dafür, dass der trophische Effekt von ET-1 auf die Gefäßwand hauptsächlich durch den ET_AR vermittelt wird (d'Uscio et al. 1997; Hocher et al. 1997; Moreau et al. 1997). Saxena (2007) konnte in dem von ihm untersuchten ET_AR-Überexpressionsmodell bei einen Monat alten Ratten einen signifikant höheren relativen Mediaanteil (+18 % für L6351, +21 % für L6878) gegenüber den Kontrolltieren feststellen. Hocher et al. (1999) zeigten an einem renovaskulären Hypertoniemodell bei Ratten, dass die selektive Blockade (BQ 123) des ET_AR die Hypertrophie der intrakardialen Arterien wieder normalisierte. An einem Modell mit Aldosteron und Salz-induzierter Hypertonie wurde durch die Blockade mit einem ET_AR-Blocker der vaskuläre Umbau verhindert (Pu et al. 2003). In den Widerstandsgefäßen von Diabetes-Ratten führte die selektive Blockade von ET_AR zu einer relativen Abnahme der Media gegenüber dem Lumen (Sachidanandam et al. 2007).

Schlussendlich unterstützen die Ergebnisse der eigenen Untersuchung die Hypothese, dass der ET_BR nicht direkt an der Hypertrophie der aortalen Media beteiligt ist. Demgegenüber gibt es ausreichend wissenschaftliche Evidenz für die vasoprotektive Funktion des ET_BR.

4.6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der telemetrischen Blutdruckmessung sowie der histomorphometrischen Untersuchung zeigten zwischen tg-positiven und tg-negativen Versuchsgruppen keine relevanten Unterschiede.

Im Ganzen genügt das transgene Modell mit Koexpression des ET_BR den hier gestellten Anforderungen nur eingeschränkt, um die Auswirkungen der Koexpression des ET_BR am adulten Tier zu untersuchen. Durch die Herabregulation des Transgens mit zunehmendem Alter der Tiere ist das Modell in seinen experimentellen Möglichkeiten nur begrenzt aussagefähig. Entsprechende Untersuchungen eines tg-Modells mit anhaltender Koexpression des ET_BR wären erforderlich. Hierzu müssten regulatorische Elemente, die eine Aufrechterhaltung der Expression im adulten Tier gewährleisten, in das tg-Konstrukt integriert werden (Xu 2003). Hinzu kommt, dass die Expression des Transgens sich nicht nur auf glatte Gefäßmuskelzellen beschränkt, sondern auch in viszeralen muskulären Organen (z.B. Colon) nachgewiesen wurde (Zollmann 2003; Kliesch 2009).

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die pathophysiologische Rolle des humanen ET_BR auf Blutdruck und Gefäßwandstruktur im Rattenmodell zu untersuchen. Hierzu diente ein bereits etabliertes transgenes Rattenmodell des humanen ET_BR unter Kontrolle des murinen SM22α-Promotors, um eine möglichst spezifische Expression im glatten Gefäßmuskel zu erreichen. Es wurden zwei transgene Rattenlinien (4230 und 6707) dieses Modells untersucht. Für beide Linien konnte in früheren Untersuchungen eine Expression des transgenen ET_BR in Organen und isolierten Blutgefäßen gezeigt werden. Durch radiotelemetrische Blutdruckmessungen über einen Monat wurde ein möglicher Effekt des koexprimierten transgenen Rezeptors auf den Blutdruck untersucht. Zu Beginn der Messungen hatten die Ratten ein Alter von 14 Wochen. Die Basalwerte zeigten zwischen tg-positiven Tieren im Vergleich zu tg-negativen Tieren keine statistisch signifikanten Unterschiede für alle gemessenen Blutdruckparameter (systolischer, mittlerer, diastolischer Blutdruck) und für die Herzfrequenz. Unter Verwendung eines NO-Syntase-Hemmers (L-NAME) wurde die vasodilatierende Wirkung von NO ausgeschaltet. Der durch L-NAME verursachte Anstieg der Blutdruckwerte war bei tg-positiven und tg-negativen Tieren statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Nach dem Absetzen von L-NAME normalisierten sich die Werte bei allen Ratten wieder auf ein nicht unterschiedliches Niveau.

Zur Bestimmung des strukturellen Phänotyps wurden histomorphometrische Untersuchungen der thorakalen Aorten bei den telemetrisch untersuchten Tieren durchgeführt. Dies sollte Aufschluss über mögliche Veränderungen der Media durch die Koexpression des humanen ET_BR geben. Bei Entnahme der Gefäße waren die Tiere 18 Wochen alt. Die mikroskopischen Bilder der Gefäßquerschnitte wurden digital analysiert und der Anteil der Media am Gesamtgefäßquerschnitt mittels eines Computerprogramms gemessen. Die Auswertung ergab eine geringe, aber statistisch signifikante Reduktion des Mediaanteils am Gesamtgefäßquerschnitt bei tg-positiven Tieren der Linie 4230 im Vergleich zu tg-negativen Kontrollen. Im Unterschied dazu zeigten tg-positive Tiere der Linie 6707 einen tendenziell höheren relativen Anteil der Media am Gesamtgefäßquerschnitt gegenüber den tg-negativen Kontrolltieren.

Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Koexpression des humanen ET_BR im tg-Rattenmodell keine relevanten Blutdruckeffekte hat. Der strukturelle Effekt war sehr gering, in den Linien nicht einheitlich und nicht von biologischer Relevanz. Das Modell ist in seiner Aussagekraft durch eine Abregulation des Transgens mit zunehmendem Alter der Tiere und dem geringen Expressionsniveau des transgenen Rezeptors limitiert.

6 Summary

Characterization of a transgenic rat model co-expressing the human endothelin-B-receptor under control of a VSMC specific promotor

The aim of this dissertation was to analyze the pathopysiological role of the human ET_BR in relation to blood pressure and blood vessel wall structure in a rat model. In order to achieve this, an already established transgenic rat model of the human ET_BR receptor under the control of a VSMC specific promoter (derived from the murine SM22α gene) was used. Two transgenic rat lines (4230 and 6707) from this model were further analyzed. Previous experiments showed an expression of the transgenic ET_BR in various organs and isolated blood vessels for both lines. Blood pressure was measured using radio telemetry over a period of one month to establish whether or not the co-expression of ET_B could have a possible effect on the blood pressure. At the commencement of the measurements, the rats were 14 weeks of age. When comparing the baseline blood pressure parameters (systolic, mean, diastolic blood pressure) and heart rates of the transgenic rats and their non-transgenic littermates, no statistical significant differences were found. The treatment with the NO synthase inhibitor L-NAME, prevented the vasodilation effect of NO. This resulted in an elevated blood pressure as well as a decreased heart rate. There were, however, no statistically significant differences between the transgenic and the non-transgenic animals. All parameters normalized to similar values once L-NAME was no longer administered. In order to identify the structural phenotypes, the thoracic aorta of each of the telemetry probed animals was analyzed using histomorphometry. This should have confirmed a possible variation of the media induced by the co-expression of the human ET_BR. Upon removal of the vessels, all animals were 18 weeks old. The histological cross-sections were digitally analyzed and the media-to-lumen ratio was measured by a specific computer program. The analysis resulted in a small but statistically significant reduction in the media-to-lumen ratio in the transgenic animals of L4230 in comparison to the non-transgenic controls. In contrast, the media-to-lumen ratio of the transgenic rats of L6707 was statistically significantly higher by trend in comparison to their non-transgenic controls. From the results, it can be concluded that the co-expression of the human ET_BR in the transgenic rat model has no relevant blood-pressure related effects. The structural effect was very low und not consistent. The model's validity is limited by the downregulation of the transgenic expression with increasing age of the animals as well as the low level of expression of the transgenic receptor.

7 Anhang

Histologische Daten aller Tiere: 60 Messwerte pro Tier

Tiernummer	Linie	LinienPosNeg	Messwert	relMedia
9057	L4230	1	1	0,17357702
9057	L4230	1	2	0,1890327
9057	L4230	1	3	0,18905461
9057	L4230	1	4	0,19345386
9057	L4230	1	5	0,19547258
9057	L4230	1	6	0,19549771
9057	L4230	1	7	0,19580547
9057	L4230	1	8	0,19657838
9057	L4230	1	9	0,19761263
9057	L4230	1	10	0,19823262
9057	L4230	1	11	0,19825511
9057	L4230	1	12	0,198419
9057	L4230	1	13	0,19853955
9057	L4230	1	14	0,1988381
9057	L4230	1	15	0,19893547
9057	L4230	1	16	0,19915899
9057	L4230	1	17	0,19919235
9057	L4230	1	18	0,19961275
9057	L4230	1	19	0,19969124
9057	L4230	1	20	0,20003754
9057	L4230	1	21	0,20058044
9057	L4230	1	22	0,20065912
9057	L4230	1	23	0,20140128
9057	L4230	1	24	0,20168055
9057	L4230	1	25	0,20196591
9057	L4230	1	26	0,20228027
9057	L4230	1	27	0,20232025
9057	L4230	1	28	0,20232522
9057	L4230	1	29	0,20246074
9057	L4230	1	30	0,20295974
9057	L4230	1	31	0,20299637
9057	L4230	1	32	0,20388408
9057	L4230	1	33	0,20433781
9057	L4230	1	34	0,20501068
9057	L4230	1	35	0,20538205
9057	L4230	1	36	0,20559384
9057	L4230	1	37	0,20578059
9057	L4230	1	38	0,20585264
9057	L4230	1	39	0,2058884
9057	L4230	1	40	0,20627252
9057	L4230	1	41	0,20631207
9057	L4230	1	42	0,20721338
9057	L4230	1	43	0,20867388
9057	L4230	1	44	0,2089545
9057	L4230	1	45	0,21033752
9057	L4230	1	46	0,21095559
9057	L4230	1	47	0,21399725

9057	L4230	1	48	0,21490882
9057	L4230	1	49	0,21696733
9057	L4230	1	50	0,21964047
9057	L4230	1	51	0,22183344
9057	L4230	1	52	0,23556275
9057	L4230	1	53	0,23813456
9057	L4230	1	54	0,23851592
9057	L4230	1	55	0,23945987
9057	L4230	1	56	0,24009239
9057	L4230	1	57	0,24015568
9057	L4230	1	58	0,24130795
9057	L4230	1	59	0,2427457
9057	L4230	1	60	0,24460042
9058	L4230	1	1	0,16454002
9058	L4230	1	2	0,16533452
9058	L4230	1	3	0,16603617
9058	L4230	1	4	0,16711571
9058	L4230	1	5	0,16725509
9058	L4230	1	6	0,16742807
9058	L4230	1	7	0,16775744
9058	L4230	1	8	0,16837774
9058	L4230	1	9	0,16844209
9058	L4230	1	10	0,1684625
9058	L4230	1	11	0,16949594
9058	L4230	1	12	0,16951548
9058	L4230	1	13	0,17130188
9058	L4230	1	14	0,17131802
9058	L4230	1	15	0,17282054
9058	L4230	1	16	0,17294861
9058	L4230	1	17	0,17301529
9058	L4230	1	18	0,17323367
9058	L4230	1	19	0,17335878
9058	L4230	1	20	0,17376046
9058	L4230	1	21	0,17383359
9058	L4230	1	22	0,17402283
9058	L4230	1	23	0,17490352
9058	L4230	1	24	0,17519353
9058	L4230	1	25	0,17536059
9058	L4230	1	26	0,17550639
9058	L4230	1	27	0,17626422
9058	L4230	1	28	0,17636231
9058	L4230	1	29	0,17638243
9058	L4230	1	30	0,17677099
9058	L4230	1	31	0,17776815
9058	L4230	1	32	0,17777327
9058	L4230	1	33	0,17864261
9058	L4230	1	34	0,17871973
9058	L4230	1	35	0,17876837
9058	L4230	1	36	0,17905637
9058	L4230	1	37	0,17934775
9058	L4230	1	38	0,1799806
9058	L4230	1	39	0,18141725
9058	L4230	1	40	0,18251222
9058	L4230	1	41	0,1838555
9058	L4230	1	42	0,1885312

9058	L4230	1	43	0,19138351
9058	L4230	1	44	0,19157257
9058	L4230	1	45	0,19213291
9058	L4230	1	46	0,19276901
9058	L4230	1	47	0,19368556
9058	L4230	1	48	0,19489098
9058	L4230	1	49	0,195314
9058	L4230	1	50	0,19573667
9058	L4230	1	51	0,20259102
9058	L4230	1	52	0,20759822
9058	L4230	1	53	0,22426765
9058	L4230	1	54	0,22895012
9058	L4230	1	55	0,23423781
9058	L4230	1	56	0,23440843
9058	L4230	1	57	0,23813969
9058	L4230	1	58	0,24362827
9058	L4230	1	59	0,24673234
9058	L4230	1	60	0,25061817
9061	L4230	1	1	0,17178286
9061	L4230	1	2	0,17180426
9061	L4230	1	3	0,171855
9061	L4230	1	4	0,17256505
9061	L4230	1	5	0,17324024
9061	L4230	1	6	0,17348733
9061	L4230	1	7	0,17387968
9061	L4230	1	8	0,17395559
9061	L4230	1	9	0,17415638
9061	L4230	1	10	0,17446012
9061	L4230	1	11	0,17498205
9061	L4230	1	12	0,17513089
9061	L4230	1	13	0,17514225
9061	L4230	1	14	0,17542011
9061	L4230	1	15	0,1759158
9061	L4230	1	16	0,17598515
9061	L4230	1	17	0,17600926
9061	L4230	1	18	0,17630032
9061	L4230	1	19	0,17645824
9061	L4230	1	20	0,17649508
9061	L4230	1	21	0,17752175
9061	L4230	1	22	0,1777939
9061	L4230	1	23	0,17789807
9061	L4230	1	24	0,17797435
9061	L4230	1	25	0,17823876
9061	L4230	1	26	0,17836883
9061	L4230	1	27	0,1784516
9061	L4230	1	28	0,17848715
9061	L4230	1	29	0,17873597
9061	L4230	1	30	0,17883633
9061	L4230	1	31	0,17909618
9061	L4230	1	32	0,17915026
9061	L4230	1	33	0,17970152
9061	L4230	1	34	0,17973681
9061	L4230	1	35	0,17998416
9061	L4230	1	36	0,18018661
9061	L4230	1	37	0,18051563

9061	L4230	1	38	0,18082559
9061	L4230	1	39	0,18101297
9061	L4230	1	40	0,18102015
9061	L4230	1	41	0,18122841
9061	L4230	1	42	0,18123448
9061	L4230	1	43	0,18193452
9061	L4230	1	44	0,18241428
9061	L4230	1	45	0,18252311
9061	L4230	1	46	0,18255586
9061	L4230	1	47	0,18267299
9061	L4230	1	48	0,18303972
9061	L4230	1	49	0,18318637
9061	L4230	1	50	0,1840316
9061	L4230	1	51	0,18422117
9061	L4230	1	52	0,18449707
9061	L4230	1	53	0,18521618
9061	L4230	1	54	0,18553945
9061	L4230	1	55	0,18602835
9061	L4230	1	56	0,18691338
9061	L4230	1	57	0,18885272
9061	L4230	1	58	0,18917494
9061	L4230	1	59	0,19789523
9061	L4230	1	60	0,20309422
9062	L4230	1	1	0,13859559
9062	L4230	1	2	0,14213439
9062	L4230	1	3	0,14352436
9062	L4230	1	4	0,14401326
9062	L4230	1	5	0,14463157
9062	L4230	1	6	0,14585226
9062	L4230	1	7	0,14622799
9062	L4230	1	8	0,14696232
9062	L4230	1	9	0,14701169
9062	L4230	1	10	0,14723602
9062	L4230	1	11	0,14740512
9062	L4230	1	12	0,14768659
9062	L4230	1	13	0,14917849
9062	L4230	1	14	0,14989296
9062	L4230	1	15	0,15002835
9062	L4230	1	16	0,1501333
9062	L4230	1	17	0,1505312
9062	L4230	1	18	0,15132403
9062	L4230	1	19	0,15148764
9062	L4230	1	20	0,15177715
9062	L4230	1	21	0,15189037
9062	L4230	1	22	0,15215952
9062	L4230	1	23	0,15341334
9062	L4230	1	24	0,15349225
9062	L4230	1	25	0,15350434
9062	L4230	1	26	0,15378614
9062	L4230	1	27	0,15382615
9062	L4230	1	28	0,15418646
9062	L4230	1	29	0,15453995
9062	L4230	1	30	0,15456879
9062	L4230	1	31	0,15462948
9062	L4230	1	32	0,15492194

9062	L4230	1	33	0,15526221
9062	L4230	1	34	0,15593965
9062	L4230	1	35	0,1563292
9062	L4230	1	36	0,15659037
9062	L4230	1	37	0,15703497
9062	L4230	1	38	0,15744931
9062	L4230	1	39	0,15805191
9062	L4230	1	40	0,15898534
9062	L4230	1	41	0,15900027
9062	L4230	1	42	0,15921439
9062	L4230	1	43	0,15974827
9062	L4230	1	44	0,16010019
9062	L4230	1	45	0,16061561
9062	L4230	1	46	0,16100829
9062	L4230	1	47	0,16102245
9062	L4230	1	48	0,16121206
9062	L4230	1	49	0,1614534
9062	L4230	1	50	0,16164894
9062	L4230	1	51	0,16322901
9062	L4230	1	52	0,16325955
9062	L4230	1	53	0,16342404
9062	L4230	1	54	0,16510452
9062	L4230	1	55	0,16580585
9062	L4230	1	56	0,16638858
9062	L4230	1	57	0,16737588
9062	L4230	1	58	0,16945728
9062	L4230	1	59	0,17115204
9062	L4230	1	60	0,22484705
9063	L4230	1	1	0,16959018
9063	L4230	1	2	0,17017716
9063	L4230	1	3	0,17126492
9063	L4230	1	4	0,17636268
9063	L4230	1	5	0,17685677
9063	L4230	1	6	0,17850296
9063	L4230	1	7	0,17856472
9063	L4230	1	8	0,17889221
9063	L4230	1	9	0,17922331
9063	L4230	1	10	0,17922363
9063	L4230	1	11	0,17933823
9063	L4230	1	12	0,17972763
9063	L4230	1	13	0,17999483
9063	L4230	1	14	0,18037101
9063	L4230	1	15	0,18114173
9063	L4230	1	16	0,18139849
9063	L4230	1	17	0,18175235
9063	L4230	1	18	0,18180816
9063	L4230	1	19	0,18215967
9063	L4230	1	20	0,18262736
9063	L4230	1	21	0,18307186
9063	L4230	1	22	0,18360867
9063	L4230	1	23	0,1843822
9063	L4230	1	24	0,18489993
9063	L4230	1	25	0,18500824
9063	L4230	1	26	0,18542089
9063	L4230	1	27	0,18581725

9063	L4230	1	28	0,18592053
9063	L4230	1	29	0,18621673
9063	L4230	1	30	0,18642865
9063	L4230	1	31	0,18656535
9063	L4230	1	32	0,18662663
9063	L4230	1	33	0,18679233
9063	L4230	1	34	0,18696116
9063	L4230	1	35	0,18700716
9063	L4230	1	36	0,18723839
9063	L4230	1	37	0,18730726
9063	L4230	1	38	0,18774221
9063	L4230	1	39	0,18780553
9063	L4230	1	40	0,18806787
9063	L4230	1	41	0,18814872
9063	L4230	1	42	0,18837679
9063	L4230	1	43	0,18852557
9063	L4230	1	44	0,18903225
9063	L4230	1	45	0,18926483
9063	L4230	1	46	0,18930951
9063	L4230	1	47	0,18947804
9063	L4230	1	48	0,18950003
9063	L4230	1	49	0,18952238
9063	L4230	1	50	0,189641
9063	L4230	1	51	0,18966992
9063	L4230	1	52	0,1897656
9063	L4230	1	53	0,19007204
9063	L4230	1	54	0,19047537
9063	L4230	1	55	0,19143228
9063	L4230	1	56	0,19228275
9063	L4230	1	57	0,19385531
9063	L4230	1	58	0,19524718
9063	L4230	1	59	0,19621909
9063	L4230	1	60	0,20475259
9066	L4230	1	1	0,17556809
9066	L4230	1	2	0,17617164
9066	L4230	1	3	0,17725477
9066	L4230	1	4	0,17752557
9066	L4230	1	5	0,17771379
9066	L4230	1	6	0,17786242
9066	L4230	1	7	0,17826253
9066	L4230	1	8	0,17853395
9066	L4230	1	9	0,17888639
9066	L4230	1	10	0,17894104
9066	L4230	1	11	0,17937499
9066	L4230	1	12	0,17942538
9066	L4230	1	13	0,17972457
9066	L4230	1	14	0,18093466
9066	L4230	1	15	0,18123411
9066	L4230	1	16	0,18181908
9066	L4230	1	17	0,18205661
9066	L4230	1	18	0,18225018
9066	L4230	1	19	0,18240995
9066	L4230	1	20	0,1825224
9066	L4230	1	21	0,182754
9066	L4230	1	22	0,18316591

9066	L4230	1	23	0,18351135
9066	L4230	1	24	0,18362451
9066	L4230	1	25	0,18372161
9066	L4230	1	26	0,18379238
9066	L4230	1	27	0,18396462
9066	L4230	1	28	0,1852118
9066	L4230	1	29	0,1852735
9066	L4230	1	30	0,18674729
9066	L4230	1	31	0,18737066
9066	L4230	1	32	0,18848902
9066	L4230	1	33	0,18888214
9066	L4230	1	34	0,18937303
9066	L4230	1	35	0,19261974
9066	L4230	1	36	0,19314694
9066	L4230	1	37	0,19341747
9066	L4230	1	38	0,1936561
9066	L4230	1	39	0,19394469
9066	L4230	1	40	0,19414215
9066	L4230	1	41	0,19512002
9066	L4230	1	42	0,19560552
9066	L4230	1	43	0,19568887
9066	L4230	1	44	0,19618376
9066	L4230	1	45	0,19627159
9066	L4230	1	46	0,19636639
9066	L4230	1	47	0,19661342
9066	L4230	1	48	0,19709105
9066	L4230	1	49	0,19740883
9066	L4230	1	50	0,19802408
9066	L4230	1	51	0,1992454
9066	L4230	1	52	0,20024095
9066	L4230	1	53	0,20036631
9066	L4230	1	54	0,20315874
9066	L4230	1	55	0,20346767
9066	L4230	1	56	0,20389863
9066	L4230	1	57	0,20445802
9066	L4230	1	58	0,20551329
9066	L4230	1	59	0,21278867
9066	L4230	1	60	0,21623011
9055	L4230	2	1	0,16827354
9055	L4230	2	2	0,16855715
9055	L4230	2	3	0,16998909
9055	L4230	2	4	0,16999172
9055	L4230	2	5	0,17028056
9055	L4230	2	6	0,17092047
9055	L4230	2	7	0,17146112
9055	L4230	2	8	0,17172352
9055	L4230	2	9	0,17174634
9055	L4230	2	10	0,17222748
9055	L4230	2	11	0,17247277
9055	L4230	2	12	0,17264151
9055	L4230	2	13	0,17272977
9055	L4230	2	14	0,17296655
9055	L4230	2	15	0,17377886
9055	L4230	2	16	0,17378275
9055	L4230	2	17	0,17392597

9055	L4230	2	18	0,17418222
9055	L4230	2	19	0,17418918
9055	L4230	2	20	0,17440152
9055	L4230	2	21	0,17446998
9055	L4230	2	22	0,17448351
9055	L4230	2	23	0,17449886
9055	L4230	2	24	0,17472662
9055	L4230	2	25	0,17480518
9055	L4230	2	26	0,17514432
9055	L4230	2	27	0,17545312
9055	L4230	2	28	0,17557756
9055	L4230	2	29	0,17601383
9055	L4230	2	30	0,17625721
9055	L4230	2	31	0,17654353
9055	L4230	2	32	0,17697163
9055	L4230	2	33	0,17710627
9055	L4230	2	34	0,17755411
9055	L4230	2	35	0,17783139
9055	L4230	2	36	0,17815249
9055	L4230	2	37	0,1786135
9055	L4230	2	38	0,17882535
9055	L4230	2	39	0,1789215
9055	L4230	2	40	0,17913145
9055	L4230	2	41	0,17923073
9055	L4230	2	42	0,17936068
9055	L4230	2	43	0,17942434
9055	L4230	2	44	0,17956383
9055	L4230	2	45	0,17989175
9055	L4230	2	46	0,18046782
9055	L4230	2	47	0,18065701
9055	L4230	2	48	0,18089628
9055	L4230	2	49	0,18132208
9055	L4230	2	50	0,18243638
9055	L4230	2	51	0,18324732
9055	L4230	2	52	0,18344263
9055	L4230	2	53	0,18349454
9055	L4230	2	54	0,18355972
9055	L4230	2	55	0,18468117
9055	L4230	2	56	0,18592765
9055	L4230	2	57	0,18676832
9055	L4230	2	58	0,18908441
9055	L4230	2	59	0,18984443
9055	L4230	2	60	0,19713302
9060	L4230	2	1	0,18238035
9060	L4230	2	2	0,18371248
9060	L4230	2	3	0,18409986
9060	L4230	2	4	0,18443836
9060	L4230	2	5	0,18500833
9060	L4230	2	6	0,18528234
9060	L4230	2	7	0,18553021
9060	L4230	2	8	0,18620557
9060	L4230	2	9	0,18651843
9060	L4230	2	10	0,18688542
9060	L4230	2	11	0,18730003
9060	L4230	2	12	0,18763284

9060	L4230	2	13	0,18826394
9060	L4230	2	14	0,18866846
9060	L4230	2	15	0,18896644
9060	L4230	2	16	0,18928395
9060	L4230	2	17	0,18932301
9060	L4230	2	18	0,18943083
9060	L4230	2	19	0,18962388
9060	L4230	2	20	0,1899675
9060	L4230	2	21	0,19005424
9060	L4230	2	22	0,19090747
9060	L4230	2	23	0,19096771
9060	L4230	2	24	0,19208377
9060	L4230	2	25	0,19231266
9060	L4230	2	26	0,19235797
9060	L4230	2	27	0,19246334
9060	L4230	2	28	0,19271089
9060	L4230	2	29	0,19292367
9060	L4230	2	30	0,19304067
9060	L4230	2	31	0,19307725
9060	L4230	2	32	0,19320183
9060	L4230	2	33	0,19326285
9060	L4230	2	34	0,19399991
9060	L4230	2	35	0,19450024
9060	L4230	2	36	0,19549379
9060	L4230	2	37	0,19595921
9060	L4230	2	38	0,19615016
9060	L4230	2	39	0,19637338
9060	L4230	2	40	0,19675159
9060	L4230	2	41	0,19709895
9060	L4230	2	42	0,19745644
9060	L4230	2	43	0,19814495
9060	L4230	2	44	0,1988805
9060	L4230	2	45	0,19960062
9060	L4230	2	46	0,20023592
9060	L4230	2	47	0,20029999
9060	L4230	2	48	0,20039376
9060	L4230	2	49	0,2004081
9060	L4230	2	50	0,20090194
9060	L4230	2	51	0,20106531
9060	L4230	2	52	0,20139387
9060	L4230	2	53	0,20149049
9060	L4230	2	54	0,20243005
9060	L4230	2	55	0,20284941
9060	L4230	2	56	0,20432557
9060	L4230	2	57	0,20553101
9060	L4230	2	58	0,20563347
9060	L4230	2	59	0,20768588
9060	L4230	2	60	0,20964792
9064	L4230	2	1	0,1618453
9064	L4230	2	2	0,16487514
9064	L4230	2	3	0,16543971
9064	L4230	2	4	0,16607371
9064	L4230	2	5	0,16826178
9064	L4230	2	6	0,16836099
9064	L4230	2	7	0,16871804

9064	L4230	2	8	0,16874899
9064	L4230	2	9	0,16894836
9064	L4230	2	10	0,16915568
9064	L4230	2	11	0,16985682
9064	L4230	2	12	0,17013388
9064	L4230	2	13	0,17074195
9064	L4230	2	14	0,17080745
9064	L4230	2	15	0,17194428
9064	L4230	2	16	0,17253771
9064	L4230	2	17	0,1727888
9064	L4230	2	18	0,17291109
9064	L4230	2	19	0,17329743
9064	L4230	2	20	0,17340706
9064	L4230	2	21	0,17395499
9064	L4230	2	22	0,17399903
9064	L4230	2	23	0,17402745
9064	L4230	2	24	0,17429144
9064	L4230	2	25	0,1744571
9064	L4230	2	26	0,1749265
9064	L4230	2	27	0,17570455
9064	L4230	2	28	0,17594351
9064	L4230	2	29	0,17602901
9064	L4230	2	30	0,17616115
9064	L4230	2	31	0,17637778
9064	L4230	2	32	0,17748043
9064	L4230	2	33	0,17757064
9064	L4230	2	34	0,177642
9064	L4230	2	35	0,17787813
9064	L4230	2	36	0,17796863
9064	L4230	2	37	0,17823201
9064	L4230	2	38	0,17830404
9064	L4230	2	39	0,17836012
9064	L4230	2	40	0,1787774
9064	L4230	2	41	0,1790208
9064	L4230	2	42	0,17935706
9064	L4230	2	43	0,17966316
9064	L4230	2	44	0,17974565
9064	L4230	2	45	0,17976592
9064	L4230	2	46	0,17998719
9064	L4230	2	47	0,18017542
9064	L4230	2	48	0,18073178
9064	L4230	2	49	0,18088059
9064	L4230	2	50	0,1816717
9064	L4230	2	51	0,1824992
9064	L4230	2	52	0,18257048
9064	L4230	2	53	0,18259024
9064	L4230	2	54	0,18270953
9064	L4230	2	55	0,18302964
9064	L4230	2	56	0,18375859
9064	L4230	2	57	0,18430747
9064	L4230	2	58	0,18718625
9064	L4230	2	59	0,19228816
9064	L4230	2	60	0,22392009
9112	L6707	3	1	0,1525949
9112	L6707	3	2	0,1568473

9112	L6707	3	3	0,15795504
9112	L6707	3	4	0,15845817
9112	L6707	3	5	0,15930491
9112	L6707	3	6	0,160469
9112	L6707	3	7	0,16084774
9112	L6707	3	8	0,16290449
9112	L6707	3	9	0,16482017
9112	L6707	3	10	0,16733349
9112	L6707	3	11	0,16755169
9112	L6707	3	12	0,16907021
9112	L6707	3	13	0,17013214
9112	L6707	3	14	0,17246679
9112	L6707	3	15	0,17386926
9112	L6707	3	16	0,17481934
9112	L6707	3	17	0,17815348
9112	L6707	3	18	0,1791834
9112	L6707	3	19	0,17954189
9112	L6707	3	20	0,17990748
9112	L6707	3	21	0,18151714
9112	L6707	3	22	0,18170946
9112	L6707	3	23	0,18228253
9112	L6707	3	24	0,18272089
9112	L6707	3	25	0,18359208
9112	L6707	3	26	0,18383422
9112	L6707	3	27	0,18418945
9112	L6707	3	28	0,18582951
9112	L6707	3	29	0,18690997
9112	L6707	3	30	0,18830067
9112	L6707	3	31	0,18939462
9112	L6707	3	32	0,1895273
9112	L6707	3	33	0,18954396
9112	L6707	3	34	0,19021909
9112	L6707	3	35	0,19179948
9112	L6707	3	36	0,19316818
9112	L6707	3	37	0,19319284
9112	L6707	3	38	0,19319504
9112	L6707	3	39	0,19337998
9112	L6707	3	40	0,19367498
9112	L6707	3	41	0,19416386
9112	L6707	3	42	0,1942091
9112	L6707	3	43	0,19443521
9112	L6707	3	44	0,19494431
9112	L6707	3	45	0,19507519
9112	L6707	3	46	0,19529793
9112	L6707	3	47	0,19742279
9112	L6707	3	48	0,19850809
9112	L6707	3	49	0,19870333
9112	L6707	3	50	0,19902718
9112	L6707	3	51	0,20036341
9112	L6707	3	52	0,20213341
9112	L6707	3	53	0,20241814
9112	L6707	3	54	0,20292169
9112	L6707	3	55	0,20302723
9112	L6707	3	56	0,20455485
9112	L6707	3	57	0,2057421

9112	L6707	3	58	0,20677373
9112	L6707	3	59	0,21301395
9112	L6707	3	60	0,22089513
9116	L6707	3	1	0,15942893
9116	L6707	3	2	0,16754482
9116	L6707	3	3	0,16759082
9116	L6707	3	4	0,16803315
9116	L6707	3	5	0,16910079
9116	L6707	3	6	0,16971652
9116	L6707	3	7	0,17114619
9116	L6707	3	8	0,17167696
9116	L6707	3	9	0,17231004
9116	L6707	3	10	0,17281595
9116	L6707	3	11	0,17305669
9116	L6707	3	12	0,17341465
9116	L6707	3	13	0,17349967
9116	L6707	3	14	0,17355661
9116	L6707	3	15	0,17451841
9116	L6707	3	16	0,17452426
9116	L6707	3	17	0,17453571
9116	L6707	3	18	0,17531562
9116	L6707	3	19	0,17540879
9116	L6707	3	20	0,17555385
9116	L6707	3	21	0,17624006
9116	L6707	3	22	0,1764135
9116	L6707	3	23	0,17643466
9116	L6707	3	24	0,17645775
9116	L6707	3	25	0,17705787
9116	L6707	3	26	0,17709887
9116	L6707	3	27	0,17774656
9116	L6707	3	28	0,17776897
9116	L6707	3	29	0,17785236
9116	L6707	3	30	0,17814599
9116	L6707	3	31	0,17841638
9116	L6707	3	32	0,17856859
9116	L6707	3	33	0,17917602
9116	L6707	3	34	0,17982144
9116	L6707	3	35	0,18023921
9116	L6707	3	36	0,18060199
9116	L6707	3	37	0,18063898
9116	L6707	3	38	0,18066395
9116	L6707	3	39	0,18077719
9116	L6707	3	40	0,18144123
9116	L6707	3	41	0,1816153
9116	L6707	3	42	0,18223382
9116	L6707	3	43	0,18314929
9116	L6707	3	44	0,18362982
9116	L6707	3	45	0,18369829
9116	L6707	3	46	0,18437029
9116	L6707	3	47	0,18479211
9116	L6707	3	48	0,18495285
9116	L6707	3	49	0,18512429
9116	L6707	3	50	0,1855473
9116	L6707	3	51	0,18569591
9116	L6707	3	52	0,18599016

9116	L6707	3	53	0,18662279
9116	L6707	3	54	0,18904725
9116	L6707	3	55	0,19065523
9116	L6707	3	56	0,191886
9116	L6707	3	57	0,19327816
9116	L6707	3	58	0,19387327
9116	L6707	3	59	0,19598192
9116	L6707	3	60	0,19624738
9117	L6707	3	1	0,1653799
9117	L6707	3	2	0,16702714
9117	L6707	3	3	0,16712146
9117	L6707	3	4	0,16719955
9117	L6707	3	5	0,16734793
9117	L6707	3	6	0,16757388
9117	L6707	3	7	0,16818763
9117	L6707	3	8	0,16991277
9117	L6707	3	9	0,17077015
9117	L6707	3	10	0,17115333
9117	L6707	3	11	0,17164157
9117	L6707	3	12	0,17203762
9117	L6707	3	13	0,17309582
9117	L6707	3	14	0,17315787
9117	L6707	3	15	0,17347786
9117	L6707	3	16	0,17357128
9117	L6707	3	17	0,17372895
9117	L6707	3	18	0,1737593
9117	L6707	3	19	0,17377113
9117	L6707	3	20	0,17384965
9117	L6707	3	21	0,17407219
9117	L6707	3	22	0,17418724
9117	L6707	3	23	0,17419882
9117	L6707	3	24	0,17441589
9117	L6707	3	25	0,17442156
9117	L6707	3	26	0,17531876
9117	L6707	3	27	0,17533662
9117	L6707	3	28	0,17543386
9117	L6707	3	29	0,17548442
9117	L6707	3	30	0,17573378
9117	L6707	3	31	0,17601475
9117	L6707	3	32	0,17627247
9117	L6707	3	33	0,17713912
9117	L6707	3	34	0,17753981
9117	L6707	3	35	0,1775463
9117	L6707	3	36	0,17761082
9117	L6707	3	37	0,17786726
9117	L6707	3	38	0,17797067
9117	L6707	3	39	0,1779721
9117	L6707	3	40	0,17826873
9117	L6707	3	41	0,17857973
9117	L6707	3	42	0,17865181
9117	L6707	3	43	0,17877074
9117	L6707	3	44	0,1791949
9117	L6707	3	45	0,17965655
9117	L6707	3	46	0,17966985
9117	L6707	3	47	0,17980977

9117	L6707	3	48	0,18010566
9117	L6707	3	49	0,18126627
9117	L6707	3	50	0,18160935
9117	L6707	3	51	0,1816371
9117	L6707	3	52	0,18194966
9117	L6707	3	53	0,1824061
9117	L6707	3	54	0,18255791
9117	L6707	3	55	0,18305182
9117	L6707	3	56	0,18323843
9117	L6707	3	57	0,18477716
9117	L6707	3	58	0,18537043
9117	L6707	3	59	0,18972841
9117	L6707	3	60	0,19607882
9122	L6707	3	1	0,19419772
9122	L6707	3	2	0,19958235
9122	L6707	3	3	0,20165227
9122	L6707	3	4	0,20305588
9122	L6707	3	5	0,20425289
9122	L6707	3	6	0,20429719
9122	L6707	3	7	0,20473367
9122	L6707	3	8	0,20642789
9122	L6707	3	9	0,20644228
9122	L6707	3	10	0,20673193
9122	L6707	3	11	0,20679246
9122	L6707	3	12	0,20882346
9122	L6707	3	13	0,20928537
9122	L6707	3	14	0,21019461
9122	L6707	3	15	0,21079846
9122	L6707	3	16	0,21079975
9122	L6707	3	17	0,21097404
9122	L6707	3	18	0,21129662
9122	L6707	3	19	0,21132582
9122	L6707	3	20	0,21149633
9122	L6707	3	21	0,2115122
9122	L6707	3	22	0,21268175
9122	L6707	3	23	0,21355564
9122	L6707	3	24	0,21417996
9122	L6707	3	25	0,21427497
9122	L6707	3	26	0,21452118
9122	L6707	3	27	0,21455445
9122	L6707	3	28	0,21476346
9122	L6707	3	29	0,21541477
9122	L6707	3	30	0,21583173
9122	L6707	3	31	0,21722476
9122	L6707	3	32	0,21736997
9122	L6707	3	33	0,21773037
9122	L6707	3	34	0,21799876
9122	L6707	3	35	0,21892785
9122	L6707	3	36	0,2211779
9122	L6707	3	37	0,22170194
9122	L6707	3	38	0,22209697
9122	L6707	3	39	0,22465156
9122	L6707	3	40	0,22519401
9122	L6707	3	41	0,22561792
9122	L6707	3	42	0,22606121

9122	L6707	3	43	0,22619414
9122	L6707	3	44	0,22748188
9122	L6707	3	45	0,22872727
9122	L6707	3	46	0,2297867
9122	L6707	3	47	0,23016182
9122	L6707	3	48	0,23130482
9122	L6707	3	49	0,2345757
9122	L6707	3	50	0,2376406
9122	L6707	3	51	0,23823068
9122	L6707	3	52	0,23941852
9122	L6707	3	53	0,24075861
9122	L6707	3	54	0,24084539
9122	L6707	3	55	0,24512955
9122	L6707	3	56	0,24847575
9122	L6707	3	57	0,25718685
9122	L6707	3	58	0,25884194
9122	L6707	3	59	0,25888636
9122	L6707	3	60	0,22173116
9123	L6707	3	1	0,16825777
9123	L6707	3	2	0,17042598
9123	L6707	3	3	0,17064847
9123	L6707	3	4	0,17126695
9123	L6707	3	5	0,17164823
9123	L6707	3	6	0,17317915
9123	L6707	3	7	0,17395278
9123	L6707	3	8	0,17401249
9123	L6707	3	9	0,17432305
9123	L6707	3	10	0,17470189
9123	L6707	3	11	0,17506118
9123	L6707	3	12	0,17528592
9123	L6707	3	13	0,17548284
9123	L6707	3	14	0,17553436
9123	L6707	3	15	0,17578468
9123	L6707	3	16	0,17647932
9123	L6707	3	17	0,17659898
9123	L6707	3	18	0,17662825
9123	L6707	3	19	0,17677772
9123	L6707	3	20	0,17690171
9123	L6707	3	21	0,17692384
9123	L6707	3	22	0,17699722
9123	L6707	3	23	0,17723444
9123	L6707	3	24	0,17788682
9123	L6707	3	25	0,17801994
9123	L6707	3	26	0,1787577
9123	L6707	3	27	0,17896711
9123	L6707	3	28	0,17931401
9123	L6707	3	29	0,17937175
9123	L6707	3	30	0,17948342
9123	L6707	3	31	0,1801475
9123	L6707	3	32	0,18151337
9123	L6707	3	33	0,1815679
9123	L6707	3	34	0,18334246
9123	L6707	3	35	0,18381291
9123	L6707	3	36	0,18427305
9123	L6707	3	37	0,1852484

9123	L6707	3	38	0,185413
9123	L6707	3	39	0,18606601
9123	L6707	3	40	0,18668426
9123	L6707	3	41	0,18708863
9123	L6707	3	42	0,18785526
9123	L6707	3	43	0,18853452
9123	L6707	3	44	0,18897505
9123	L6707	3	45	0,18904281
9123	L6707	3	46	0,1904604
9123	L6707	3	47	0,19088522
9123	L6707	3	48	0,19151105
9123	L6707	3	49	0,19450224
9123	L6707	3	50	0,19537186
9123	L6707	3	51	0,19583374
9123	L6707	3	52	0,19595063
9123	L6707	3	53	0,19660038
9123	L6707	3	54	0,19663754
9123	L6707	3	55	0,19760938
9123	L6707	3	56	0,20046167
9123	L6707	3	57	0,20232875
9123	L6707	3	58	0,21033776
9123	L6707	3	59	0,21514511
9123	L6707	3	60	0,21927635
9113	L6707	4	1	0,17213512
9113	L6707	4	2	0,1728376
9113	L6707	4	3	0,17305604
9113	L6707	4	4	0,17314204
9113	L6707	4	5	0,17385886
9113	L6707	4	6	0,17421372
9113	L6707	4	7	0,17468242
9113	L6707	4	8	0,17504909
9113	L6707	4	9	0,17524764
9113	L6707	4	10	0,17540321
9113	L6707	4	11	0,17702075
9113	L6707	4	12	0,1770734
9113	L6707	4	13	0,17717903
9113	L6707	4	14	0,17860148
9113	L6707	4	15	0,17877281
9113	L6707	4	16	0,17884444
9113	L6707	4	17	0,17905731
9113	L6707	4	18	0,18056702
9113	L6707	4	19	0,18062072
9113	L6707	4	20	0,18075051
9113	L6707	4	21	0,18084554
9113	L6707	4	22	0,18098744
9113	L6707	4	23	0,18102353
9113	L6707	4	24	0,18206201
9113	L6707	4	25	0,18252803
9113	L6707	4	26	0,18270763
9113	L6707	4	27	0,18313663
9113	L6707	4	28	0,18326933
9113	L6707	4	29	0,18349285
9113	L6707	4	30	0,18408414
9113	L6707	4	31	0,18659245
9113	L6707	4	32	0,18664321

9113	L6707	4	33	0,1880653
9113	L6707	4	34	0,18806685
9113	L6707	4	35	0,18814045
9113	L6707	4	36	0,18827193
9113	L6707	4	37	0,18843595
9113	L6707	4	38	0,18855431
9113	L6707	4	39	0,18891189
9113	L6707	4	40	0,19046028
9113	L6707	4	41	0,19051687
9113	L6707	4	42	0,19203491
9113	L6707	4	43	0,19285095
9113	L6707	4	44	0,19318274
9113	L6707	4	45	0,19371574
9113	L6707	4	46	0,19444367
9113	L6707	4	47	0,19551695
9113	L6707	4	48	0,19578256
9113	L6707	4	49	0,19582129
9113	L6707	4	50	0,19582599
9113	L6707	4	51	0,19700788
9113	L6707	4	52	0,19728985
9113	L6707	4	53	0,1987274
9113	L6707	4	54	0,19879058
9113	L6707	4	55	0,20145364
9113	L6707	4	56	0,20292672
9113	L6707	4	57	0,20475816
9113	L6707	4	58	0,20849963
9113	L6707	4	59	0,21513398
9113	L6707	4	60	0,22320746
9115	L6707	4	1	0,17766943
9115	L6707	4	2	0,17947452
9115	L6707	4	3	0,18112277
9115	L6707	4	4	0,18254733
9115	L6707	4	5	0,18264436
9115	L6707	4	6	0,18342183
9115	L6707	4	7	0,18378992
9115	L6707	4	8	0,18432055
9115	L6707	4	9	0,18444887
9115	L6707	4	10	0,18500234
9115	L6707	4	11	0,18538644
9115	L6707	4	12	0,1854301
9115	L6707	4	13	0,18637264
9115	L6707	4	14	0,18672401
9115	L6707	4	15	0,18674155
9115	L6707	4	16	0,18708288
9115	L6707	4	17	0,18723227
9115	L6707	4	18	0,18724545
9115	L6707	4	19	0,18729102
9115	L6707	4	20	0,18730885
9115	L6707	4	21	0,18745852
9115	L6707	4	22	0,1877963
9115	L6707	4	23	0,18809602
9115	L6707	4	24	0,1883138
9115	L6707	4	25	0,18842774
9115	L6707	4	26	0,1885416
9115	L6707	4	27	0,18883522

9115	L6707	4	28	0,18887459
9115	L6707	4	29	0,18891166
9115	L6707	4	30	0,18922241
9115	L6707	4	31	0,18945286
9115	L6707	4	32	0,18945518
9115	L6707	4	33	0,18948124
9115	L6707	4	34	0,19075341
9115	L6707	4	35	0,19123588
9115	L6707	4	36	0,19137393
9115	L6707	4	37	0,19139409
9115	L6707	4	38	0,19160634
9115	L6707	4	39	0,19192076
9115	L6707	4	40	0,19199148
9115	L6707	4	41	0,19213603
9115	L6707	4	42	0,19217048
9115	L6707	4	43	0,19225624
9115	L6707	4	44	0,19258305
9115	L6707	4	45	0,19261486
9115	L6707	4	46	0,19262358
9115	L6707	4	47	0,19286547
9115	L6707	4	48	0,19303566
9115	L6707	4	49	0,19337773
9115	L6707	4	50	0,19376529
9115	L6707	4	51	0,19482217
9115	L6707	4	52	0,19496991
9115	L6707	4	53	0,19514144
9115	L6707	4	54	0,19797124
9115	L6707	4	55	0,19813007
9115	L6707	4	56	0,19841303
9115	L6707	4	57	0,19921188
9115	L6707	4	58	0,19997613
9115	L6707	4	59	0,20806802
9115	L6707	4	60	0,21556799
9126	L6707	4	1	0,17380613
9126	L6707	4	2	0,17598232
9126	L6707	4	3	0,1760713
9126	L6707	4	4	0,18260414
9126	L6707	4	5	0,18347257
9126	L6707	4	6	0,18370029
9126	L6707	4	7	0,1851125
9126	L6707	4	8	0,18549087
9126	L6707	4	9	0,18818875
9126	L6707	4	10	0,18957436
9126	L6707	4	11	0,19067997
9126	L6707	4	12	0,19117128
9126	L6707	4	13	0,19144085
9126	L6707	4	14	0,19184883
9126	L6707	4	15	0,19213069
9126	L6707	4	16	0,19412803
9126	L6707	4	17	0,19418126
9126	L6707	4	18	0,1944285
9126	L6707	4	19	0,19512824
9126	L6707	4	20	0,19565729
9126	L6707	4	21	0,19580359
9126	L6707	4	22	0,19591426

9126	L6707	4	23	0,19637471
9126	L6707	4	24	0,19644621
9126	L6707	4	25	0,19686527
9126	L6707	4	26	0,19699841
9126	L6707	4	27	0,19766017
9126	L6707	4	28	0,19807278
9126	L6707	4	29	0,1985124
9126	L6707	4	30	0,19913375
9126	L6707	4	31	0,19943967
9126	L6707	4	32	0,19991136
9126	L6707	4	33	0,20057567
9126	L6707	4	34	0,20147957
9126	L6707	4	35	0,20157552
9126	L6707	4	36	0,20193185
9126	L6707	4	37	0,20217359
9126	L6707	4	38	0,20295612
9126	L6707	4	39	0,20296351
9126	L6707	4	40	0,20329468
9126	L6707	4	41	0,20335874
9126	L6707	4	42	0,20394182
9126	L6707	4	43	0,20401564
9126	L6707	4	44	0,2047273
9126	L6707	4	45	0,20474248
9126	L6707	4	46	0,20520875
9126	L6707	4	47	0,20654919
9126	L6707	4	48	0,20690907
9126	L6707	4	49	0,2072674
9126	L6707	4	50	0,20922087
9126	L6707	4	51	0,20962177
9126	L6707	4	52	0,21152111
9126	L6707	4	53	0,21336568
9126	L6707	4	54	0,21378667
9126	L6707	4	55	0,21383997
9126	L6707	4	56	0,21449252
9126	L6707	4	57	0,21532446
9126	L6707	4	58	0,21889279
9126	L6707	4	59	0,22177169
9126	L6707	4	60	0,22223849
9109	L6707	4	1	0,17114849
9109	L6707	4	2	0,17524884
9109	L6707	4	3	0,17768163
9109	L6707	4	4	0,17799527
9109	L6707	4	5	0,17827708
9109	L6707	4	6	0,17847051
9109	L6707	4	7	0,17847675
9109	L6707	4	8	0,17885419
9109	L6707	4	9	0,17910034
9109	L6707	4	10	0,1791607
9109	L6707	4	11	0,17939544
9109	L6707	4	12	0,17944759
9109	L6707	4	13	0,17945119
9109	L6707	4	14	0,17949956
9109	L6707	4	15	0,1795205
9109	L6707	4	16	0,17956355
9109	L6707	4	17	0,17975343

9109	L6707	4	18	0,18019927
9109	L6707	4	19	0,18050842
9109	L6707	4	20	0,18055833
9109	L6707	4	21	0,18055906
9109	L6707	4	22	0,18103796
9109	L6707	4	23	0,18129389
9109	L6707	4	24	0,1813972
9109	L6707	4	25	0,1817587
9109	L6707	4	26	0,18226917
9109	L6707	4	27	0,1825396
9109	L6707	4	28	0,18263158
9109	L6707	4	29	0,18271349
9109	L6707	4	30	0,18275996
9109	L6707	4	31	0,18329107
9109	L6707	4	32	0,18352146
9109	L6707	4	33	0,18399164
9109	L6707	4	34	0,18401639
9109	L6707	4	35	0,18463389
9109	L6707	4	36	0,18464038
9109	L6707	4	37	0,18466639
9109	L6707	4	38	0,18483437
9109	L6707	4	39	0,1852619
9109	L6707	4	40	0,18561951
9109	L6707	4	41	0,18629191
9109	L6707	4	42	0,18641613
9109	L6707	4	43	0,18680394
9109	L6707	4	44	0,18716735
9109	L6707	4	45	0,18727874
9109	L6707	4	46	0,18765259
9109	L6707	4	47	0,18767296
9109	L6707	4	48	0,18797843
9109	L6707	4	49	0,18897306
9109	L6707	4	50	0,18983934
9109	L6707	4	51	0,19145373
9109	L6707	4	52	0,19145553
9109	L6707	4	53	0,19218657
9109	L6707	4	54	0,1929286
9109	L6707	4	55	0,19341672
9109	L6707	4	56	0,19388955
9109	L6707	4	57	0,19389811
9109	L6707	4	58	0,19622711
9109	L6707	4	59	0,19877923
9109	L6707	4	60	0,20224996

8 Literaturverzeichnis

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.

Amiri, F., A. Virdis, et al. (2004). "Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction." Circulation **110**(15): 2233-2240.

Arai, H., S. Hori, et al. (1990). "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor." Nature **348**(6303): 730-732.

Arinami, T., M. Ishikawa, et al. (1991). "Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3." Am J Hum Genet **48**(5): 990-996.

Babaei, S., P. Picard, et al. (2000). "Blockade of endothelin receptors markedly reduces atherosclerosis in LDL receptor deficient mice: role of endothelin in macrophage foam cell formation." Cardiovasc Res **48**(1): 158-167.

Bagnall, A. J., N. F. Kelland, et al. (2006). "Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt." Hypertension **48**(2): 286-293.

Barton, M. (2000). "Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics." Curr Hypertens Rep **2**(1): 84-91.

Barton, M., C. C. Haudenschild, et al. (1998). "Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14367-14372.

Battistini, B., P. D'Orleans-Juste, et al. (1993). "Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids." Lab Invest **68**(6): 600-628.

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.

Bell, R. M., Y. A. Hannun, et al. (1986). "Mechanism of regulation of protein kinase C by lipid second messengers." Symp Fundam Cancer Res **39**: 145-156.

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., 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.

Boulanger, C. and T. F. Luscher (1990). "Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." J Clin Invest **85**(2): 587-590.

Brinster, R. L., H. Y. Chen, et al. (1981). "Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs." Cell **27**(1 Pt 2): 223-231.

Browatzki, M., J. Schmidt, et al. (2000). "Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells." Basic Res Cardiol **95**(2): 98-105.

Camoretti-Mercado, B., S. M. Forsythe, et al. (1998). "Expression and cytogenetic localization of the human SM22 gene (TAGLN)." Genomics **49**(3): 452-457.

Campbell, G. R. and J. H. Campbell (1990). "The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma." Ann N Y Acad Sci **598**: 143-158.

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.

Clozel, M. and V. Breu (1996). "The role of ETB receptors in normotensive and hypertensive rats as revealed by the non-peptide selective ETB receptor antagonist Ro 46-8443." FEBS Lett **383**(1-2): 42-45.

Clozel, M., A. Maresta, et al. (2013). "Endothelin receptor antagonists." Handb Exp Pharmacol **218**: 199-227.
Clozel, M. and H. Salloukh (2005). "Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan." Ann Med **37**(1): 2-12.
Costantini, F. and E. Lacy (1981). "Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line." Nature **294**(5836): 92-94.
D'Orleans-Juste, P., J. Labonte, et al. (2002). "Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology." Pharmacol Ther **95**(3): 221-238.
d'Uscio, L. V., P. Moreau, et al. (1997). "Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension." Hypertension **29**(1 Pt 2): 435-441.
Davenport, A. P. (2002). "International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature." Pharmacol Rev **54**(2): 219-226.
Davenport, A. P., G. O'Reilly, et al. (1995). "Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA sub-type." Br J Pharmacol **114**(6): 1110-1116.
Davie, N., S. J. Haleen, et al. (2002). "ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells." Am J Respir Crit Care Med **165**(3): 398-405.
Deetjen, P. and E.-J. Speckmann, Eds. (1994). Physiologie.
Dhaun, N., I. M. MacIntyre, et al. (2011). "Selective endothelin-A receptor antagonism reduces proteinuria, blood pressure, and arterial stiffness in chronic proteinuric kidney disease." Hypertension **57**(4): 772-779.
Dingemanse, J. and P. L. van Giersbergen (2004). "Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist." Clin Pharmacokinet **43**(15): 1089-1115.
Donckier, J., L. Stoleru, et al. (1995). "Role of endogenous endothelin-1 in experimental renal hypertension in dogs." Circulation **92**(1): 106-113.
Douglas, S. A., P. Nambi, et al. (1998). "Pharmacologic characterization of the novel, orally available endothelin-A--selective antagonist SB 247083." J Cardiovasc Pharmacol **31 Suppl 1**: S273-276.
Douglas, S. A. and E. H. Ohlstein (1993). "Endothelin-1 promotes neointima formation after balloon angioplasty in the rat." J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 8**: S371-373.
Dupuis, J. (2000). "Endothelin receptor antagonists and their developing role in cardiovascular therapeutics." Can J Cardiol **16**(7): 903-910.
Dupuis, J., C. A. Goresky, et al. (1996). "Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors." J Appl Physiol **81**(4): 1510-1515.
Dupuis, J., C. A. Goresky, et al. (1997). "Endothelin-1 myocardial clearance, production, and effect on capillary permeability in vivo." Am J Physiol **273**(3 Pt 2): H1239-1245.
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.
Engelhardt, W. v. and G. Breves (2009). Physiologie der Haustiere.
Ergul, A. (2000). "Hypertension in black patients: an emerging role of the endothelin system in salt-sensitive hypertension." Hypertension **36**(1): 62-67.
Ergul, S., D. C. Parish, et al. (1996). "Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension." Hypertension **28**(4): 652-655.
Evans, R. R., B. G. Phillips, et al. (1996). "Racial and gender differences in endothelin-1." Am J Cardiol **78**(4): 486-488.
Fabregat, I. and E. Rozengurt (1990). "[D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]substance P, a neuropeptide antagonist, blocks binding, Ca2(+)-mobilizing, and mitogenic effects of endothelin and vasoactive intestinal contractor in mouse 3T3 cells." J Cell Physiol **145**(1): 88-94.
Fang, S., A. Ledlow, et al. (1994). "Vasoactive intestinal contractor: localization in the opossum esophagus and effects on motor functions." Gastroenterology **107**(6): 1621-1626.

Finsnes, F., O. H. Skjonsberg, et al. (1997). "Endothelin production and effects of endothelin antagonism during experimental airway inflammation." Am J Respir Crit Care Med **155**(4): 1404-1412.

Foster, M. C., A. M. Rawlings, et al. (2013). "Cardiovascular risk factor burden, treatment, and control among adults with chronic kidney disease in the United States." Am Heart J **166**(1): 150-156.

Fukuroda, T., T. Fujikawa, et al. (1994). "Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats." Biochem Biophys Res Commun **199**(3): 1461-1465.

Galie, N., M. M. Hoeper, et al. (2011). "Liver toxicity of sitaxentan in pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **37**(2): 475-476.

Gardiner, S. M., A. M. Compton, et al. (1990). "Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats." Br J Pharmacol **101**(1): 10-12.

Gauthier, K. M., C. Deeter, et al. (2002). "14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries." Circ Res **90**(9): 1028-1036.

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.

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.

Goddard, J., N. R. Johnston, et al. (2004). "Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade." Circulation **109**(9): 1186-1193.

Goetz, K. L., B. C. Wang, et al. (1988). "Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs." Am J Physiol **255**(6 Pt 2): R1064-1068.

Gong, S. Z., P. Q. Liu, et al. (2001). "[Effect of aldosterone on the secretion of endothelin by ventricular fibroblasts]." Sheng Li Xue Bao **53**(1): 23-26.

Gordon, J. W., G. A. Scangos, et al. (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7380-7384.

Goto, K., Y. Kasuya, et al. (1989). "Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca2+ channel in vascular smooth muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3915-3918.

Gray, G. A. and D. J. Webb (1996). "The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease." Pharmacol Ther **72**(2): 109-148.

Haller, H., T. Schaberg, et al. (1991). "Endothelin increases [Ca2+]i, protein phosphorylation, and O2-. production in human alveolar macrophages." Am J Physiol **261**(6 Pt 1): L478-484.

Hammer, R. E., S. D. Maika, et al. (1990). "Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders." Cell **63**(5): 1099-1112.

Harbers, K., D. Jahner, et al. (1981). "Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal." Nature **293**(5833): 540-542.

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.

Haynes, W. G., C. J. Ferro, et al. (1996). "Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans." Circulation **93**(10): 1860-1870.

Haynes, W. G. and D. J. Webb (1994). "Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone." Lancet **344**(8926): 852-854.

Heagerty, A. M., C. Aalkjaer, et al. (1993). "Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth." Hypertension **21**(4): 391-397.

Hedin, U., B. A. Bottger, et al. (1988). "Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells." J Cell Biol **107**(1): 307-319.

Heistad, D. D. and G. L. Baumbach (1992). "Cerebral vascular changes during chronic hypertension: good guys and bad guys." J Hypertens Suppl **10**(7): S71-75.

Hemsen, A., A. Modin, et al. (1996). "Effects of Ro 47-0203 and PD155080 on the plasma kinetics, receptor binding and vascular effects of endothelin in the pig." Eur J Pharmacol **318**(2-3): 369-376.

Hickey, K. A., G. Rubanyi, et al. (1985). "Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells." Am J Physiol **248**(5 Pt 1): C550-556.

Highsmith, R. F., D. C. Pang, et al. (1989). "Endothelial cell-derived vasoconstrictors: mechanisms of action in vascular smooth muscle." J Cardiovasc Pharmacol **13 Suppl 5**: S36-44; discussion S45.

Hocher, B., I. George, et al. (1999). "Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension." Hypertension **33**(3): 816-822.

Hocher, B., L. Liefeldt, et al. (1996). "Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene." Hypertension **28**(2): 196-201.

Hocher, B., A. Schwarz, et al. (2004). "In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin." J Hypertens **22**(1): 111-119.

Hocher, B., C. Thone-Reineke, et al. (1997). "The paracrine endothelin system: pathophysiology and implications in clinical medicine." Eur J Clin Chem Clin Biochem **35**(3): 175-189.

Hocher, 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.

Holm, P. and A. Franco-Cereceda (1999). "Haemodynamic influence and endothelin-1 plasma concentrations by selective or non-selective endothelin receptor antagonists in the pig in vivo." Acta Physiol Scand **165**(2): 163-168.

Hosoda, K., K. Nakao, et al. (1991). "Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA." FEBS Lett **287**(1-2): 23-26.

Howard, P. G., C. Plumpton, et al. (1992). "Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue." J Hypertens **10**(11): 1379-1386.

Huetteman, D. A. and H. Bogie (2009). "Direct blood pressure monitoring in laboratory rodents via implantable radio telemetry." Methods Mol Biol **573**: 57-73.

Humbert, M., N. W. Morrell, et al. (2004). "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 13S-24S.

Iglarz, M., C. Binkert, et al. (2008). "Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist." J Pharmacol Exp Ther **327**(3): 736-745.

Iglarz, M. and M. Clozel (2007). "Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction." J Cardiovasc Pharmacol **50**(6): 621-628.

Ignarro, L. J. and P. J. Kadowitz (1985). "The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **25**: 171-191.

Ihara, M., T. Fukuroda, et al. (1991). "An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from Streptomyces misakiensis." Biochem Biophys Res Commun **178**(1): 132-137.

Ihara, M., K. Ishikawa, et al. (1992). "In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor." J Cardiovasc Pharmacol **20 Suppl 12**: S11-14.

Ikeda, K., N. Emoto, et al. (1999). "Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides." J Biol Chem **274**(45): 32469-32477.

Ikeda, S., N. Emoto, et al. (2002). "Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 421-426.

Ikegawa, R., Y. Matsumura, et al. (1990). "Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the secretion of endothelin-1 from cultured endothelial cells by inhibiting a big endothelin-1 converting enzyme." Biochem Biophys Res Commun **171**(2): 669-675.

Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989). "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. (1989). "The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression." J Biol Chem **264**(25): 14954-14959.

Inoue, Y., M. Oike, et al. (1990). "Endothelin augments unitary calcium channel currents on the smooth muscle cell membrane of guinea-pig portal vein." J Physiol **423**: 171-191.

Ishikawa, K., M. Ihara, et al. (1994). "Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4892-4896.

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.

Iwashima, A., M. Kobayashi, et al. (1997). "Contraction and intracellular calcium-ion elevation of cultured human aortic smooth muscle cells by endothelin-1, vasoactive intestinal contractor (VIC) and the derivatives." In Vitro Cell Dev Biol Anim **33**(10): 751-756.

Jaenisch, R. and B. Mintz (1974). "Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1250-1254.

Jafri, F. and A. Ergul (2003). "Nuclear localization of endothelin-converting enzyme-1: subisoform specificity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(12): 2192-2196.

Jeng, A. Y. and Y. Deng (1993). "Rapid inactivation of endothelin-1 by a carboxypeptidase-like enzyme purified from rat kidney." J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 8**: S69-72.

Johnson, G. D., T. Stevenson, et al. (1999). "Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin." J Biol Chem **274**(7): 4053-4058.

Kalk, P., P. Senf, et al. (2008). "Inhalation of an endothelin receptor A antagonist attenuates pulmonary inflammation in experimental acute lung injury." Can J Physiol Pharmacol **86**(8): 511-515.

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.

Katwa, L. C., E. Guarda, et al. (1993). "Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts." Cardiovasc Res **27**(12): 2125-2129.

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.

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.

Kittikulsuth, W., S. W. Looney, et al. (2013). "Endothelin ET(B) receptors contribute to sex differences in blood pressure elevation in angiotensin II hypertensive rats on a high-salt diet." Clin Exp Pharmacol Physiol **40**(6): 362-370.

Kliesch, S. (2009). Expression der Endothelin-Rezeptoren und interagierender vasoaktiver Systeme in einem transgenen Rattenmodell mit glattmuskelspezifischer Expression des humanen Endothelin-A Rezeptors. Medizinische Fakultät der Charité-Universitätsmedizin. Berlin, Freie Universität Berlin.

Kloog, Y., I. Ambar, et al. (1988). "Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain." Science **242**(4876): 268-270.

Knofler, R., T. Urano, et al. (1995). "In vitro effect of endothelin-1 on collagen, and ADP-induced aggregation in human whole blood and platelet rich plasma." Thromb Res **77**(1): 69-78.

Ko, C., M. C. Gieske, et al. (2006). "Endothelin-2 in ovarian follicle rupture." Endocrinology **147**(4): 1770-1779.

Kochva, E., A. Bdolah, et al. (1993). "Sarafotoxins and endothelins: evolution, structure and function." Toxicon **31**(5): 541-568.

Kramer, B. K., T. W. Smith, et al. (1991). "Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H+ exchanger." Circ Res **68**(1): 269-279.

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, Y., H. Kurihara, et al. (1995). "Aortic arch malformations and ventricular septal defect 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.

Lawson, D., M. Harrison, et al. (1997). "Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines." Cell Motil Cytoskeleton **38**(3): 250-257.

Lee, M. E., M. S. Dhadly, et al. (1991). "Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun." J Biol Chem **266**(28): 19034-19039.

Lee, S., D. C. Russo, et al. (2001). "Molecular defects underlying the Kell null phenotype." J Biol Chem **276**(29): 27281-27289.

Lees-Miller, J. P., D. H. Heeley, et al. (1987). "Isolation and characterization of an abundant and novel 22-kDa protein (SM22) from chicken gizzard smooth muscle." J Biol Chem **262**(7): 2988-2993.

Lerman, A., B. S. Edwards, et al. (1991). "Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis." N Engl J Med **325**(14): 997-1001.

Leuchte, H. H., T. Meis, et al. (2008). "Inhalation of endothelin receptor blockers in pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(4): L772-777.

Levin, E. R. (1995). "Endothelins." N Engl J Med **333**(6): 356-363.

Li, L., J. M. Miano, et al. (1996). "Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells." J Cell Biol **132**(5): 849-859.

Liefeldt, L., G. Schonfelder, et al. (1999). "Transgenic rats expressing the human ET-2 gene: a model for the study of endothelin actions in vivo." J Mol Med **77**(7): 565-574.

Lin, H. Y., E. H. Kaji, et al. (1991). "Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3185-3189.

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.

Maguire, J. J. and A. P. Davenport (2002). "Is urotensin-II the new endothelin?" Br J Pharmacol **137**(5): 579-588.

Makki, T., R. T. Talom, et al. (1994). "Increased arterial distensibility induced by the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, in normotensive rats." Br J Pharmacol **111**(2): 555-560.

Marsden, P. A., N. R. Danthuluri, et al. (1989). "Endothelin action on vascular smooth muscle involves inositol trisphosphate and calcium mobilization." Biochem Biophys Res Commun **158**(1): 86-93.

Masaki, T. (1995). "Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 235-255.

Masaki, T., S. Kimura, et al. (1991). "Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function." Circulation **84**(4): 1457-1468.

Masaki, T., J. R. Vane, et al. (1994). "International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors." Pharmacological Reviews **46**(2): 137-142.

Matsumura, Y., N. Hashimoto, et al. (1999). "Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats." Hypertension **33**(2): 759-765.

McKenna, C. J., S. E. Burke, et al. (1998). "Selective ET(A) receptor antagonism reduces neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model." Circulation **97**(25): 2551-2556.

McMurray, J. J., S. G. Ray, et al. (1992). "Plasma endothelin in chronic heart failure." Circulation **85**(4): 1374-1379.

Mehta, J. L., D. L. Lawson, et al. (1992). "Modulation of vascular tone by endothelin-1: role of preload, endothelial integrity and concentration of endothelin-1." Br J Pharmacol **106**(1): 127-132.

Miller, R. C., J. T. Pelton, et al. (1993). "Endothelins--from receptors to medicine." Trends Pharmacol Sci **14**(2): 54-60.

Minamino, T., H. Kurihara, et al. (1997). "Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis." Circulation **95**(1): 221-230.

Mitchell, J. A., F. Ali, et al. (2008). "Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium." Exp Physiol **93**(1): 141-147.

Mizuguchi, T., M. Nishiyama, et al. (1997). "Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse." Br J Pharmacol **120**(8): 1427-1430.

Moessler, H., M. Mericskay, et al. (1996). "The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice." Development **122**(8): 2415-2425.

Molenaar, P., G. O'Reilly, et al. (1993). "Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium." Circ Res **72**(3): 526-538.

Moreau, P., L. V. d'Uscio, et al. (1997). "Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist." Circulation **96**(5): 1593-1597.

Moreland, S., D. M. McMullen, et al. (1992). "Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors." Biochem Biophys Res Commun **184**(1): 100-106.

Muller, L., A. Barret, et al. (2003). "Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease." J Biol Chem **278**(1): 545-555.

Mullins, J. J., J. Peters, et al. (1990). "Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene." Nature **344**(6266): 541-544.

Murakoshi, N., T. Miyauchi, et al. (2002). "Vascular endothelin-B receptor system in vivo plays a favorable inhibitory role in vascular remodeling after injury revealed by endothelin-B receptor-knockout mice." Circulation **106**(15): 1991-1998.

Murphy, D. (2008). "Production of transgenic rodents by the microinjection of cloned DNA into fertilized one-celled eggs." Methods Mol Biol **461**: 71-109.

Nakano, A., F. Kishi, et al. (1997). "Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells." J Immunol **159**(4): 1987-1992.

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.

Newton-Cheh, C., T. Johnson, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure." Nat Genet.

Opgenorth, T. J., J. R. Wu-Wong, et al. (1992). "Endothelin-converting enzymes." FASEB J **6**(9): 2653-2659.

Orzechowski, H.-D., F. Zollmann, et al. (2009). "Functional analysis of the Endothelin B by Cell Specific: Transgenic Overexpression in the Vasculature." Basic Clin Pharmacol Toxicol **104**(6): 523-524.

Palmiter, R. D., R. L. Brinster, et al. (1982). "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes." Nature **300**(5893): 611-615.

Patrignani, P., A. Del Maschio, et al. (1991). "Inactivation of endothelin by polymorphonuclear leukocyte-derived lytic enzymes." Blood **78**(10): 2715-2720.

Pietra, G. G., F. Capron, et al. (2004). "Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 25S-32S.

Plehm, R., M. E. Barbosa, et al. (2006). "Animal models for hypertension/blood pressure recording." Methods Mol Med **129**: 115-126.

Pollock, D. M., T. L. Keith, et al. (1995). "Endothelin receptors and calcium signaling." FASEB J **9**(12): 1196-1204.

Pollock, D. M. and M. P. Schneider (2006). "Clarifying endothelin type B receptor function." Hypertension **48**(2): 211-212.

Popova, E., M. Bader, et al. (2005). "Production of transgenic models in hypertension." Methods Mol Med **108**: 33-50.

Pu, Q., M. F. Neves, et al. (2003). "Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling." Hypertension **42**(1): 49-55.

Pulido, T., I. Adzerikho, et al. (2013). "Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **369**(9): 809-818.

Puri, A., M. D. McGoon, et al. (2007). "Pulmonary arterial hypertension: current therapeutic strategies." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4**(6): 319-329.

Quaschning, T., F. Voss, et al. (2008). "Lack of iNOS impairs endothelial function in endothelin-1 transgenic mice." Kidney Blood Press Res **31**(2): 127-134.

Quaschning, T., F. Voss, et al. (2007). "Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice." J Am Soc Nephrol **18**(3): 730-740.

Raines, E. W. and R. Ross (1993). "Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis." Br Heart J **69**(1 Suppl): S30-37.

Reddy, S., P. Kumar, et al. (2011). "Histomorphometric and sympathetic innervation of the human internal thoracic artery." Clinics (Sao Paulo) **66**(1): 131-136.

Reinhart, G. A., L. C. Preusser, et al. (2002). "Hypertension induced by blockade of ET(B) receptors in conscious nonhuman primates: role of ET(A) receptors." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(4): H1555-1561.

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.

Rice, J., B. Doggett, et al. (2000). "Transgenic rescue of aganglionosis and piebaldism in lethal spotted mice." Dev Dyn **217**(1): 120-132.

Rubanyi, G. M. and M. A. Polokoff (1994). "Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology." Pharmacol Rev **46**(3): 325-415.

Ruggenenti, P., A. Schieppati, et al. (2001). "Progression, remission, regression of chronic renal diseases." Lancet **357**(9268): 1601-1608.

Sachidanandam, K., V. Portik-Dobos, et al. (2007). "Evidence for vasculoprotective effects of ETB receptors in resistance artery remodeling in diabetes." Diabetes **56**(11): 2753-2758.

Safar, M., P. Chamiot-Clerc, et al. (2001). "Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **38**(6): 1416-1421.

Saida, K., M. Hashimoto, et al. (2000). "The prepro vasoactive intestinal contractor (VIC)/endothelin-2 gene (EDN2): structure, evolution, production, and embryonic expression." Genomics **64**(1): 51-61.

Saida, K., N. Kometani, et al. (2002). "Sequence analysis and expression of the mouse full-length vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 gene (EDN2): comparison with the endothelin-1 gene (EDN1)." Clin Sci (Lond) **103 Suppl 48**: 84S-89S.

Sakai, S., T. Miyauchi, et al. (1996). "Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure." Nature **384**(6607): 353-355.
Sakamoto, A., M. Yanagisawa, et al. (1991). "Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor." Biochem Biophys Res Commun **178**(2): 656-663.
Sanmartin, M., A. Fernandez-Ortiz, et al. (2003). "Effects of bosentan on neointimal response following coronary angioplasty." Eur J Clin Invest **33**(9): 762-768.
Saxena, A. (2007). Structural and functional characterization of a transgenic rat model of the human endothelin type A receptor. Medizinische Fakultät der Charité-Universitätsmedizin. Berlin, Freie Universität Berlin
Schiffrin, E. L. (2001). "Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease." Am J Hypertens **14**(6 Pt 2): 83S-89S.
Schiffrin, E. L. (2005). "Vascular endothelin in hypertension." Vascul Pharmacol **43**(1): 19-29.
Schiffrin, E. L., L. Y. Deng, et al. (1997). "Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension." J Hypertens **15**(1): 57-63.
Scrogin, K. E., D. C. Hatton, et al. (1998). "Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system." Am J Physiol **274**(2 Pt 2): R367-374.
Shi-Wen, X., E. A. Renzoni, et al. (2007). "Endogenous endothelin-1 signaling contributes to type I collagen and CCN2 overexpression in fibrotic fibroblasts." Matrix Biol **26**(8): 625-632.
Shichiri, M., F. Marumo, et al. (1998). "Endothelin-B receptor-mediated suppression of endothelial apoptosis." J Cardiovasc Pharmacol **31 Suppl 1**: S138-141.
Shindo, T., H. Kurihara, et al. (2002). "Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1." J Mol Med **80**(2): 105-116.
Shirai, N., T. Naruko, et al. (2006). "Expression of endothelin-converting enzyme, endothelin-1 and endothelin receptors at the site of percutaneous coronary intervention in humans." J Hypertens **24**(4): 711-721.
Simonneau, G., N. Galie, et al. (2004). "Clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 5S-12S.
Slowinski, T., P. Kalk, et al. (2007). "Cell-type specific interaction of endothelin and the nitric oxide system: pattern of prepro-ET-1 expression in kidneys of L-NAME treated prepro-ET-1 promoter-lacZ-transgenic mice." J Physiol **581**(Pt 3): 1173-1181.
Sogabe, K., H. Nirei, et al. (1993). "Pharmacological profile of FR139317, a novel, potent endothelin ETA receptor antagonist." J Pharmacol Exp Ther **264**(3): 1040-1046.
Sokolovsky, M. (1995). "Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms." Pharmacol Ther **68**(3): 435-471.
Soma, S., H. Takahashi, et al. (1999). "Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(4): 620-630.
Spatz, M., N. Kawai, et al. (1997). "Functional properties of cultured endothelial cells derived from large microvessels of human brain." Am J Physiol **272**(1 Pt 1): C231-239.
Spieker, L. E., G. Noll, et al. (2001). "Endothelin receptor antagonists in congestive heart failure: a new therapeutic principle for the future?" J Am Coll Cardiol **37**(6): 1493-1505.
Spinella, M. J., A. B. Malik, et al. (1991). "Design and synthesis of a specific endothelin 1 antagonist: effects on pulmonary vasoconstriction." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7443-7446.
Stewart, D. J., G. Kubac, et al. (1991). "Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **18**(1): 38-43.
Takahashi, H., S. Soma, et al. (2001). "Upregulation of ET-1 and its receptors and remodeling in small pulmonary veins under hypoxic conditions." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(6): L1104-1114.
Takahashi, H., S. Soma, et al. (2001). "Discrepant distribution of big endothelin (ET)-1 and ET receptors in the pulmonary artery." Eur Respir J **18**(1): 5-14.
Thyberg, J., U. Hedin, et al. (1990). "Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells." Arteriosclerosis **10**(6): 966-990.

Trevisi, L., S. Bova, et al. (2002). "Endothelin-1-induced arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 activation in rat vascular smooth muscle via extracellular signal-regulated kinases pathway." Biochem Pharmacol **64**(3): 425-431.

Tsujino, M., Y. Hirata, et al. (1995). "Nonselective ETA/ETB receptor antagonist blocks proliferation of rat vascular smooth muscle cells after balloon angioplasty." Life Sci **56**(25): PL449-454.

Tsukahara, H., H. Ende, et al. (1994). "Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase." J Biol Chem **269**(34): 21778-21785.

Uchide, T., H. Masuda, et al. (1999). "Gene expression of vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 in ovary, uterus and embryo: comprehensive gene expression profiles of the endothelin ligand-receptor system revealed by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis in adult mouse tissues and during late embryonic development." J Mol Endocrinol **22**(2): 161-171.

Valdenaire, O., J. G. Richards, et al. (1999). "XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS." Brain Res Mol Brain Res **64**(2): 211-221.

Valdenaire, O., E. Rohrbacher, et al. (1995). "Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1)." J Biol Chem **270**(50): 29794-29798.

van Mourik, J. A., T. Romani de Wit, et al. (2002). "Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies." Histochem Cell Biol **117**(2): 113-122.

Vaneckova, I., H. J. Kramer, et al. (2005). "Early endothelin-A receptor blockade decreases blood pressure and ameliorates end-organ damage in homozygous Ren-2 rats." Hypertension **46**(4): 969-974.

Vaneckova, I., P. Kujal, et al. (2012). "Effects of combined endothelin A receptor and renin-angiotensin system blockade on the course of end-organ damage in 5/6 nephrectomized Ren-2 hypertensive rats." Kidney Blood Press Res **35**(5): 382-392.

Vanhoutte, P. M. (1998). "Vascular biology. Old-timer makes a comeback." Nature **396**(6708): 213, 215-216.

Verhaar, M. C., F. E. Strachan, et al. (1998). "Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade." Circulation **97**(8): 752-756.

von Geldern, T. W., A. S. Tasker, et al. (1999). "Pyrrolidine-3-carboxylic Acids as Endothelin Antagonists. 4. Side Chain Conformational Restriction Leads to ETB Selectivity." Journal of Medicinal Chemistry **42**(18): 3668-3678.

Wagner, E. F., T. A. Stewart, et al. (1981). "The human beta-globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(8): 5016-5020.

Wagner, O. F., G. Christ, et al. (1992). "Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells." J Biol Chem **267**(23): 16066-16068.

Wang, X., S. A. Douglas, et al. (1996). "Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat." Circ Res **78**(2): 322-328.

Warner, T. D., G. H. Allcock, et al. (1993). "Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF." Br J Pharmacol **110**(2): 777-782.

Warner, T. D., J. A. Mitchell, et al. (1989). "Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit." J Cardiovasc Pharmacol **13 Suppl 5**: S85-88; discussion S102.

Watts, S. W. (2010). "Endothelin receptors: what's new and what do we need to know?" Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **298**(2): R254-260.

Weber, C., R. Schmitt, et al. (1996). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects." Clin Pharmacol Ther **60**(2): 124-137.

Wesson, D. E., J. Simoni, et al. (2011). "Acid retention accompanies reduced GFR in humans and increases plasma levels of endothelin and aldosterone." Am J Physiol Renal Physiol **300**(4): F830-837.

Weyrauch, K. D. and A. Smollich (1998). Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Stuttgart, Enke-Verlag.

Whelton, P. K., J. He, et al. (2002). "Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program." JAMA **288**(15): 1882-1888.

World Health Organisation, W. (2003). The world health report 2003-shaping the future**:** 85.

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.

Xu, R., Y. S. Ho, et al. (2003). "Human SM22 alpha BAC encompasses regulatory sequences for expression in vascular and visceral smooth muscles at fetal and adult stages." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(4): H1398-1407.

Yamaguchi, N. (1997). "Role of ET(A) and ET(B) receptors in endothelin-1-induced adrenal catecholamine secretion in vivo." Am J Physiol **272**(4 Pt 2): R1290-1297.

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., 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.

Yanagisawa, M. and T. Masaki (1989). "Molecular biology and biochemistry of the endothelins." Trends Pharmacol Sci **10**(9): 374-378.

Yokokawa, K., H. Tahara, et al. (1991). "Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma." Ann Intern Med **114**(3): 213-215.

Yoshibayashi, M., K. Nishioka, et al. (1991). "Plasma endothelin levels in healthy children: high values in early infancy." J Cardiovasc Pharmacol **17 Suppl 7**: S404-405.

Zamora, M. A., E. C. Dempsey, et al. (1993). "BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells." Am J Respir Cell Mol Biol **9**(4): 429-433.

Zhou, Y., W. P. Dirksen, et al. (2004). "Endothelin-1-induced responses in isolated mouse vessels: the expression and function of receptor types." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(2): H573-578.

Zollmann, F. (2003). Transgenes Rattenmodell zur Untersuchung der pathophysiologischen Rolle des Endothelin-B Rezeptors in Gefäßmuskelzellen. Medizinische Fakultät der Charité-Universitätsmedizin. Berlin, Freie Universiät Berlin.

9 Danksagung

Vielen Dank an Herrn Priv.-Doz. Dr. Orzechowski für die Überlassung des Themas, seine Geduld und fortwährende Korrektur meiner Entwürfe.

Frau Prof. Dr. Fink möchte ich danken, dass sie die Vertretung meiner Arbeit am Fachbereich übernommen hat.

Ich danke Herrn Zoch aus der Tierhaltung in der Garystraße, der mir an den Versuchstagen immer zur Seite stand und alle Fragen zur Handhabung der Tiere beantworten konnte.

Vielen Dank Frau Schwaneberg für die Einführung in die Laborarbeit und die Beantwortung und Lösung aller daraus resultierenden Fragen und Probleme.

Danke an Herrn Hinz aus der Histologie in der Garystraße, der mir jeden Schritt, vom isolierten Organ bis hin zum fertigen histologischen Schnitt gezeigt hat.

Herrn Plehm und seinem Team danke ich für die Leitung der Radiotelemetrie am Max-Delbrück-Centrum.

Thank you Cinzia.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ohne eure Unterstützung wäre es mir nicht möglich gewesen diesen Weg einzuschlagen. Danke, dass ihr an mich geglaubt habt und mich damit immer wieder gestärkt habt.

Meinen Schwestern möchte ich danken, dass ihr euch einfach mit mir freuen könnt, das hier geschafft zu haben. Danke dir Regina, dass du zwischen Familie und Beruf Zeit gefunden hast, meine Entwürfe zu korrigieren.

Vielen Dank Stefan für das ständige Antreiben, deine kritische Meinung über meine Entwürfe und dass du auch in schwierigen Zeiten an meiner Seite warst.

Schließlich will ich an alle Tiere erinnern, die für meine Arbeit gestorben sind. Ihre Seelen sollen in Frieden ruhen.

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 16.10.2012
Merlind Funck