

Aus dem Institut für Pharmakologie (Center for Cardiovascular Research)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hämodynamische Charakterisierung und Beschreibung des
kardialen Phänotyps eines Mausmodells mit eNOS-Knockout und
gleichzeitiger Überexpression von human-Endothelin-1

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Krause-Relle

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Berthold Hoher
 2. Prof. Dr. Florian J. Schweigert
 3.

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Endothelin	5
1.1.1 Genetik, Transkription und Bildung der aktiven Form	6
1.1.2 Regulation der Endothelin-Synthese	7
1.1.3 Signaltransduktion durch ETA und ETB-Rezeptoren.....	8
1.2 Stickstoffmonoxid (NO).....	10
1.2.1 NO-Synthese und Regulation.....	10
1.2.2 Signaltransduktion durch NO.....	11
1.3 Endothelin und NO-Interaktion.....	12
1.3.1 Endothelin und NO in Gefäßen	12
1.3.2 Endothelin- und NO-Interaktion im Herzen.....	14
1.3.3 Endothelin- und NO-Interaktion in der Niere	16
1.3.4 Endothelin- und NO-Interaktion in der Lunge	18
1.3.5 Endothelin und NO in der Pathogenese weiterer Erkrankungen.....	19
1.4 Beschreibung der von uns verwendeten Tiermodelle	20
1.4.1 Human-ET-1-transgene Mäuse (ET+/+)	20
1.4.2 eNOS-knockout-Mäuse (eNOS-/-).....	21
1.5 Fragestellung der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1.1 Materialien, Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen.....	23
2.1.2 Lösungs- und Pufferansätze	24
2.1.3 Geräte	25
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Züchtung.....	27
2.2.2 Tierhaltung	28
2.2.3 Blutentnahme zur Genotypisierung.....	28
2.2.4 Blutdruckmessung mittels Schwanzplethysmographie	32
2.2.5 Herzkatheter	33
2.2.6 Organentnahme	37
2.2.7 Einbetten von Organen in Paraffin.....	37
2.2.8 Anfertigen von Dünnschnitten	38
2.2.9 Färbungen, Mikroskopie und histologische Auswertung.....	38
2.2.10 Statistik.....	43
3 Ergebnisse.....	45
3.1 Körpergewicht und Herzgewicht	45
3.1.1 Körpergewicht	45
3.1.2 Aufteilung nach Geschlecht	46
3.1.3 Herzgewicht	46
3.1.4 Aufteilung nach Geschlecht	47
3.1.5 relatives Herzgewicht	49
3.1.6 Aufteilung nach Geschlecht	49
3.2 Histologie	50
3.2.1 Kardiomyozytendurchmesser.....	50
3.2.2 Aufteilung nach Geschlecht	51
3.2.3 Interstitielle Fibrose.....	53
3.2.4 Aufteilung nach Geschlecht	53

3.2.5	Media-Lumen-Ratio, Lumenfläche und Mediafläche	54
3.2.6	Aufteilung nach Geschlecht	56
3.2.7	Perivaskuläre Fibrose	56
3.2.8	Aufteilung nach Geschlecht	57
3.3	Blutdruck und Herzfrequenz	58
3.3.1	Blutdruck 5+9 Monate alte Tiere	58
3.3.2	Blutdruck 9 Monate alte Tiere	66
3.4	Herzkatheter	71
3.4.1	LVP max korrigiert	71
3.4.2	nach Genotyp und Geschlecht	71
3.4.3	LVP min diastolisch	71
3.4.4	nach Genotyp und Geschlecht	72
3.4.5	LVEDP korrigiert	73
3.4.6	nach Genotyp und Geschlecht	74
3.4.7	dPTdt max	76
3.4.8	nach Genotyp und Geschlecht	76
3.4.9	dPdt min	76
3.4.10	Genotyp und Geschlecht	77
3.4.11	Tau	78
3.4.12	nach Genotyp und Geschlecht	79
3.4.13	Herzfrequenz	81
3.4.14	Aufteilung nach Geschlecht	82
4	Diskussion	84
4.1	Blutdrücke der 5+9 Monate alten Tiere	84
4.2	Blutdruck der 9 Monate alten Tiere	85
4.3	Gefäßmorphologie	86
4.4	Herzgewicht, Kardiomyozytendurchmesser und Herzwandmorphologie	86
4.5	Interstitielle Fibrose	87
4.6	Herzkatheter	88
4.7	Herzfrequenz	91
4.8	Körpergewicht	91
4.9	Geschlechtsspezifische Unterschiede	92
4.10	Ergebnisse aus weiterführenden Studien	93
4.11	Schlussfolgerungen und Ausblick	93
5	Zusammenfassung	97
6	Literaturverzeichnis	99
7	Abkürzungsverzeichnis	113
8	Danksagung	117
9	Publikationsliste	118

1. Einleitung

1.1 Endothelin

Endothelin (ET) besteht aus 21 Aminosäuren, enthält einen hydrophoben C-Terminus und darüber hinaus zwei intramolekulare Disulfidbrücken am N-Terminus, welche zu einer charakteristischen Haarnadelform führen¹. Seine relative molekulare Masse beträgt 2,5². Es gibt die drei Isoformen ET-1, ET-2 und ET-3, die sich nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden (siehe Abbildung 1-1)^{1, 2}. Endotheline haben Ähnlichkeit mit dem Erdnattergift Sarafotoxin S6b, welches als Kardiotoxin eine starke Muskelkontraktion in den glatten Gefäßmuskelzellen der Herzkranzgefäße verursacht und dadurch zum Tod führt.^{1, 3}

Endotheline sind autokrine und parakrine Peptid-Hormone, welche hauptsächlich von Endothelzellen aber auch in zahlreichen anderen Geweben und Zelltypen gebildet werden, wie z.B. in Kardiomyozyten, glatter Gefäßmuskulatur, renalen endothelialen Tubuluszellen, glomerulärem Mesangium, Glia-Zellen, Hypophyse, Makrophagen und Mastzellen^{1, 3, 4}. Die Syntheseraten unterscheiden sich allerdings sehr in den unterschiedlichen Geweben. ET-1 wird hauptsächlich vom Endothel der Gefäße gebildet, aber auch von epithelialen Zellen der Lunge, Makrophagen, kardialen Fibroblasten, Kardiomyozyten, Neuronen und anderen Zellen^{1, 5-11}. Endothelin 2 (ET-2) wird in intestinalen Endothelzellen, der Niere, Plazenta, Chorion, Amnion, Endometrium, Myometrium und im linken Ventrikel exprimiert^{1, 12, 13}. Endothelin 3 (ET-3) wird dagegen hauptsächlich im Darm, in der Lunge, im Groß- und Kleinhirn und in der Hypophyse gebildet^{1, 14}.

Endothelin (v.a. ET-1) ist als einer der stärksten bisher bekannten Vasokonstriktoren an der Regelung des vaskulären Tonus in Arterien und Venen beteiligt und wirkt in vielen Geweben mitogen, antiapoptotisch, pro-fibrotisch und inflammatorisch¹. Ferner ist es an der embryonalen Entwicklung craniofacialer, arterieller und enteraler neuronaler Strukturen beteiligt, besonders an der Ausdifferenzierung von Zellen aus der Neuralleiste (v.a. ET-3 und ET-1)^{1, 15-17}.

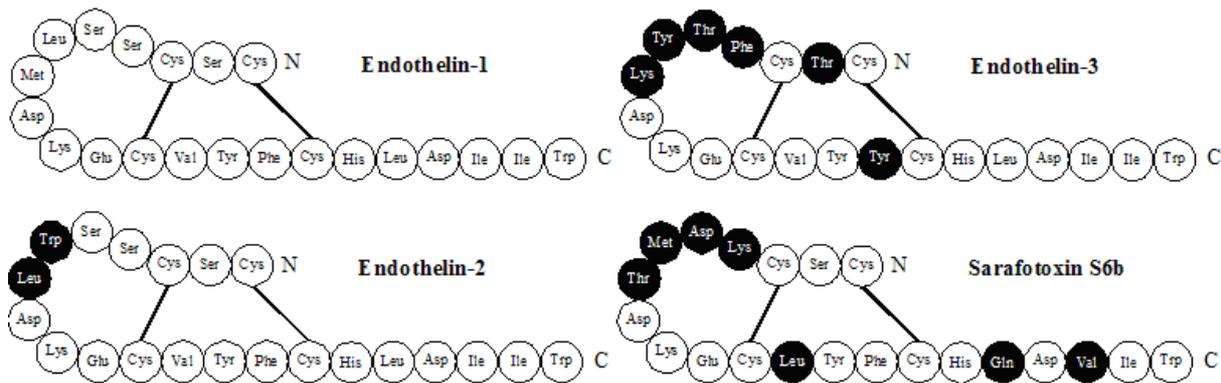


Abbildung 1-1 Struktur von Endothelin 1, 2 und 3 sowie Sarafotoxin S6b²

1.1.1 Genetik, Transkription und Bildung der aktiven Form

Beim Menschen sind das prepro-ET-1-Gen auf Chromosom 6p23-p24, das prepro-ET-2-Gen auf Chromosom 1p34.1 und das prepro-ET-3-Gen auf Chromosom 20q13.2-q13.3 lokalisiert¹⁸.

Das ET-1-Gen enthält fünf Exons, die für prepro-Endothelin-1 kodieren. In der 5'-Region befinden sich mehrere regulatorische Elemente, so die Bindungs-Sequenz für den Transkriptionsfaktor NF- κ B, vier Kopien des regulatorischen Hexanukleotides CTGGA und homologe Sequenzen der Oktanukleotids AP1-Jun-Bindungs-Sequenz. Die Promotorregion des Endothelin-Gens weist außerdem noch GAAT- und TATA-Sequenzen auf, welche durch Bildung einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor GATA-2-Protein die Transkription stimulieren¹⁹.

Aus der prepro-ET-mRNA werden prepro-Endotheline translatiert, welche aus ca. 200 Aminosäureresten bestehen. Diese werden in Vesikeln der Endothelzellen durch Furin-Konvertase in Big-Endotheline gespalten, welche 37-41 Aminosäuren lang sind. Big-Endotheline werden wiederum vom Endothelin-konvertierenden Enzym (ECE) zwischen Tryptophan (Trp) und Valin (Val) bei ET-1 und ET-2 und zwischen Tryptophan und Isoleucin (Ile) bei ET-3 in die aktiven Endotheline mit 21 Aminosäuren gespalten (siehe Abbildung 1-2)¹. Das ECE gehört zu der Matrixmetalloproteinase-13-Familie und unterteilt sich in drei bis heute bekannte Isoformen: Endothelin-konvertierendes Enzym-1 (ECE-1), Endothelin-konvertierendes Enzym-2 (ECE-2) und Endothelin-konvertierendes Enzym-3 (ECE-3). Alternativ können Big-Endotheline außerdem von weiteren Matrix-Metalloproteinasen (MMP2, MMP9) oder Chymasen gespalten werden. Mäuseembryonen mit ECE-1- und ECE-2-knockout wiesen nur eine Reduktion des Endothelins um ein Drittel auf (im Homogenat hergestellt aus dem gesamten Embryo)²⁰. Big-Endotheline werden durch diese Enzyme in 31

Aminosäuren lange Isoformen gespalten, die auch vasoaktiv sind (z.B. ET-1 (1-31), wirkt agonistisch auf ETA-Rezeptoren)²¹.

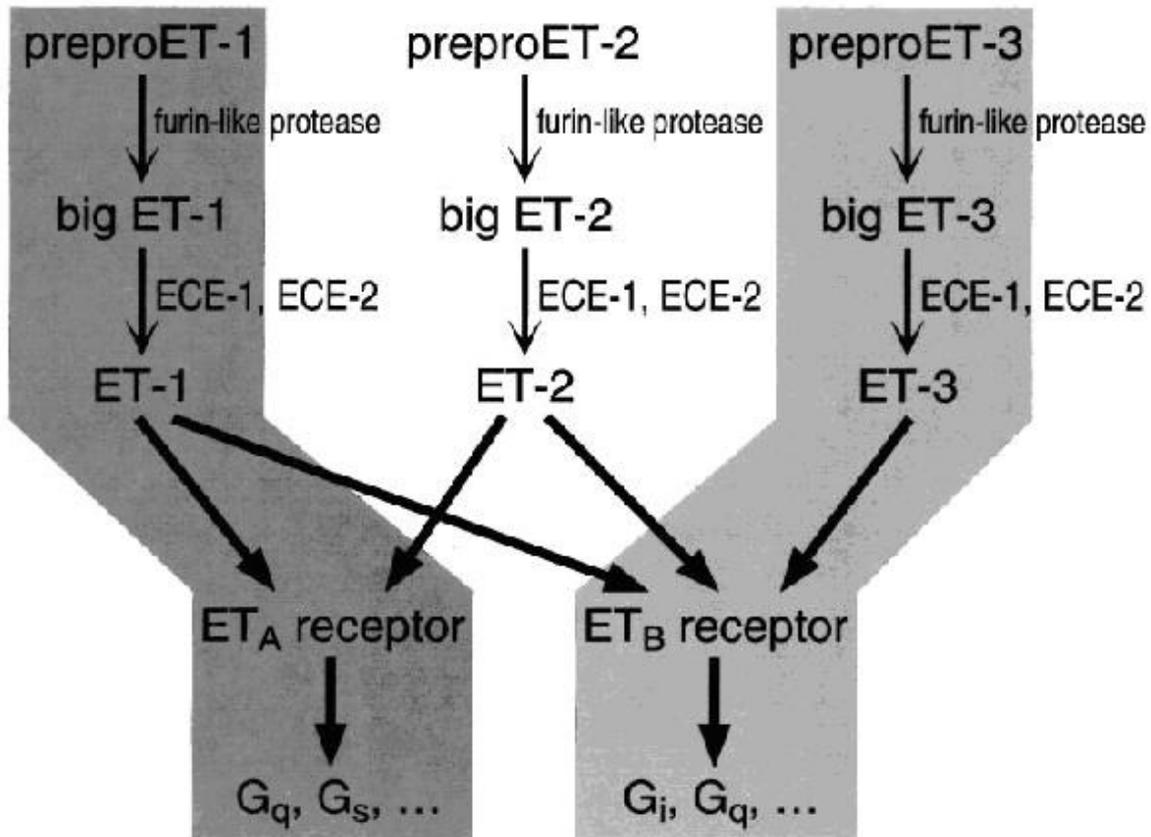


Abbildung 1-2 Endothelin-Synthese¹

1.1.2 Regulation der Endothelin-Synthese

Es gibt zahlreiche verschiedene physikalische und chemische Faktoren, die ET hochregulieren, so z.B. oxidativer Stress, Angiotensin II, Entzündungen, oxidiertes LDL, Insulin, Thrombin, *transforming growth-factor beta* (TGF- β), *tumor-necrosis-factor alpha* (TNF- α), Verotoxin, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Immunglobulin-1, Norepinephrin, Vasopressin und Bradykinin^{1x, 22}. Auch Scherkräfte regulieren die ET-1-mRNA-Transkription über *upstream-cis*-Elemente²². Hoher oder pulsatiler (d.h. schubweiser) Stress steigern kurzfristig die Expression der prepro-ET-1-mRNA, allerdings führen lang anhaltende Scherkräfte zu einer Senkung der prepro-ET-1-mRNA-Expression²³. Niedrige Scherkräfte steigern sie wiederum²². Faktoren, welche die prepro-ET-mRNA-Expression herunterregulieren sind NO und andere Faktoren, die über cGMP als second messenger agieren, Prostacyclin, ANP und Heparin (hemmt Proteinkinase C)²². ET hemmt außerdem

seine eigene Expression. Die Bindung von ET an den ETB-Rezeptor der Endothelzellen bewirkt eine Hemmung der prepro-ET-mRNA-Synthese über zwei Wege, zum einen über NO, zum anderen direkt über Internalisierung der ETB-Rezeptoren in das Zytoplasma der Endothelzellen (gesteuert durch β -Arrestin und Dynamin/Clathrin)²⁴.

1.1.3 Signaltransduktion durch ETA und ETB-Rezeptoren

1.1.3.1 ETA-Rezeptor

ET-1 kann durch zwei Rezeptor-Subtypen gebunden werden: den ETA- und den ETB-Rezeptor. Hierbei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Transmembran-Rezeptoren. ET-1 und ET-2 weisen eine subnanomolare und damit sehr hohe Affinität zu ETA auf, während die Affinität zwischen ET-3 zu ETA etwa halb so groß ist. ETB bindet alle drei ET-Isoformen gleichermaßen stark im subnanomolaren Bereich¹.

In Arterien wird der ETA-Rezeptor hauptsächlich auf den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert, während der ETB-Rezeptor sowohl auf den glatten Gefäßmuskelzellen als auch den Endothelzellen der Intima exprimiert wird. Endothelin wird zu 80 Prozent basal sezerniert (d.h. in Richtung glatte Gefäßmuskulatur) und zu 20 Prozent luminal. Im Cytosol der glatten Gefäßmuskelzellen, die einen Endothelin-Rezeptor tragen, ist an den Rezeptor ein $G_{q/11}$ -Protein-Komplex gebunden. Bindet Endothelin an den ETA-Rezeptor, wird Guanosindiphosphat (GDP) abgespalten und Guanosintriphosphat (GTP) gebunden, wodurch der G-Protein-Komplex in seine $\beta+\gamma$ - und seine α -Untereinheit zerfällt. Die α -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP_3 aktiviert im endoplasmatischen Retikulum die Freisetzung von Ca^{2+} in das Cytosol. Ca^{2+} bindet an eine Calmodulin-Untereinheit der Myosin-Leichtketten-Kinase und aktiviert diese, wodurch sie die Muskelkontraktion in Gang setzt. Dabei bewirkt die Myosin-Leichtketten-Kinase eine Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosins, wodurch es mit den Actinfilamenten binden und die Muskulatur kontrahieren kann²⁵⁻²⁹.

Obwohl der ETA-Rezeptor in glatten Gefäßmuskelzellen nicht an G_s -Proteine gekoppelt zu sein scheint, kann ET-1 dennoch in glatten Gefäßmuskelzellen G_s -Proteine aktivieren, welche wiederum die Adenylatzyklase bildet, die für die Bildung des *second-messengers* cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) verantwortlich ist³⁰⁻³³. cAMP aktiviert wiederum die Proteinkinase A, welche die Myosin-Leichtketten-Kinase phosphoryliert, was zur einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt. In zweiter Linie phosphoryliert die Proteinkinase A allerdings auch Calciumkanäle und aktiviert diese, so dass bei Änderung des

Membranpotentials Ca^{2+} einströmen kann. So wird die Muskelkontraktion der glatten Gefäßmuskulatur wiederum begünstigt³⁴⁻³⁶.

Desweiteren sind ETA-Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen auch an G_{12} - und G_{13} -Rezeptoren gebunden³⁷. Über die Aktivierung der kleinen GTPase Rho und anschließender Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK, *Rho-associated coiled coil containing protein kinase*) kommt es zur Phosphorylierung und damit Inhibition der Myosin-Leichtkettenkinase. Das führt in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer erhöhten Kontraktion und stressinduzierten Fibrosierung der extrazellulären Matrix³⁸. Die Aktivierung der Rho-Kaskade über den ETA-Rezeptor führt *in vitro* auch zu einer Hochregulierung der *connective tissue growth factor*-mRNA (CTGF-mRNA) in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten. CTGF fördert die Bildung der extrazellulären Matrix, so z.B. die Kollagen-I-mRNA-Synthese und die Fibronectin-Protein-Synthese³⁹.

1.1.3.2 ETB-Rezeptor

ETB-Rezeptoren sind in verschiedenen Zelltypen an G_i -, G_o -, $\text{G}_{q/11}$ und G_{13} -Proteine gebunden. Die Funktion des ETB-Rezeptors ist widersprüchlich. Auf glatten Gefäßmuskelzellen vermitteln ETB-Rezeptoren eine Vasokonstriktion genauso wie ETA-Rezeptoren. Auf den Endothelzellen der Gefäße fungiert der ETB-Rezeptor als Mediator für Vasodilatation, indem er die Produktion und Ausscheidung von NO aktiviert. NO bewirkt in glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasodilatation und hemmt in den Endothelzellen die Expression von prepro-ET-mRNA. Es handelt sich hierbei um einen negativ-gekoppelten Feedback-Mechanismus, mit dem sich Endothelin selbst herunterreguliert⁴⁰⁻⁴². ETB-Rezeptoren, die G_i -gekoppelt sind, inhibieren die Adenylatzyklase, wodurch die cAMP-Konzentration in den Zellen sinkt und die Aktivität der Proteinkinase A verringert wird³¹. Dadurch wird u.a. die Phosphorylierung von Calcium-Kanälen gehemmt und damit der Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle³⁴⁻³⁵.

Darüber hinaus sorgen ETB-Rezeptoren für die Eliminierung des Endothelins. Nach Bindung des Endothelins findet eine Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes statt mit einem anschließenden intrazellulären Abbau. Hierzu interagieren ETB-Rezeptoren mit β -Arrestinen über Clathrin als Mediator. Dabei wird β -Arrestin phosphoryliert, wodurch es an den G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden kann und die Aktivität der Untereinheiten hemmt. Außerdem führt das phosphorylierte β -Arrestin über Clathrin zu einer Internalisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in intrazelluläre Endosomen⁴³⁻⁴⁶. Hier wird der ETB-Rezeptor in Lysosomen abgebaut, was vermutlich der Mechanismus ist, mittels dem die

Endothelin-Eliminierung stattfindet²⁴. Dieser Prozess findet vorwiegend in den Pulmonalgefäßen statt, aber ein Teil des Endothelins wird über ETB-Rezeptoren in den Nierengefäßen abgefangen und ausgeschieden⁴⁷⁻⁴⁹. Auch ETA-Rezeptoren können in die Zelle internalisiert werden, allerdings wird der ETA-Rezeptor wieder in seine aktive Form überführt und in die Zellwand zurücktransportiert²⁴.

Hohe physiologische ET-Konzentrationen führen außerdem zu einer Abnahme der Rezeptorsensibilität bei beiden ET-Rezeptor-Subtypen. Nach Bindung des Endothelins phosphorylieren G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) sowohl den ETA als auch den ETB-Rezeptor, wodurch diese die Fähigkeit zur Aktivierung des G-Proteins verlieren⁵⁰.

1.2 Stickstoffmonoxid (NO)

1.2.1 NO-Synthese und Regulation

Stickstoffmonoxid (NO) als vasodilatierendes Hormon wurde erstmals 1986 beschrieben. Davor wusste man nur von einer vasorelaxierenden Substanz, die im Gefäßendothel gebildet wird und als *endothelium-derived relaxing-factor* (EDRF) bezeichnet wurde⁵¹⁻⁵⁴. NO wird durch die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS, *nitric-oxide synthase*) gebildet. Es handelt sich hierbei um Oxygenasen, die unter Umwandlung von Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat (NADPH) zu NADP⁺ L-Arginin in NO und L-Citrullin umwandeln (siehe Abbildung 1-3)⁵⁵⁻⁵⁸.

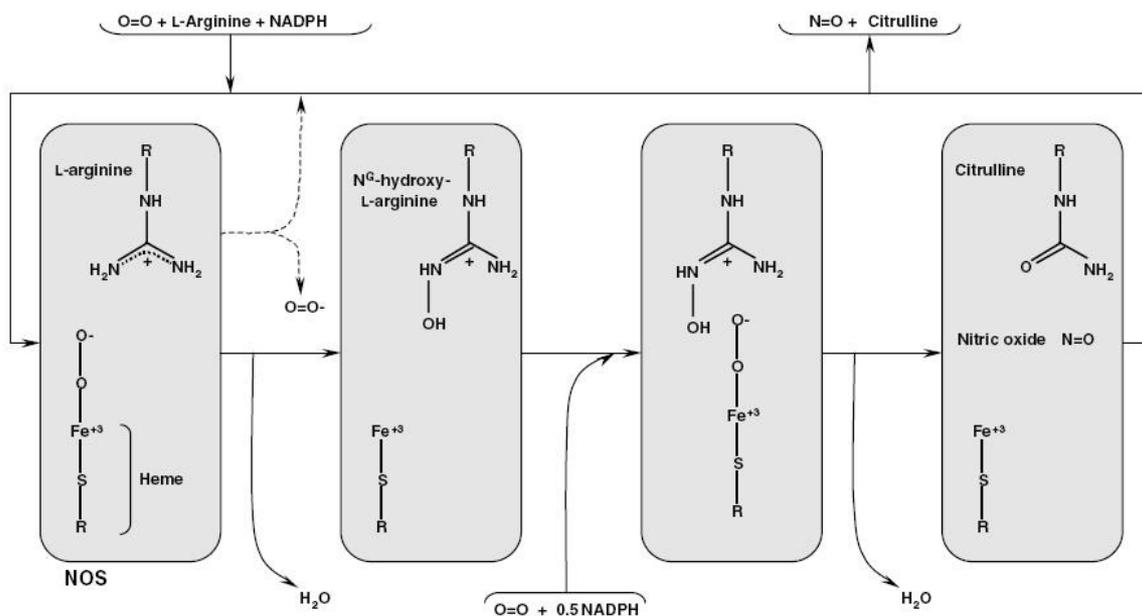


Abbildung 1-3 NO-Synthese aus L-Arginin durch NO-Synthasen⁵⁸

Die NO-Produktion wird hochreguliert durch verschiedene Faktoren, v.a. Acetylcholin, aber auch ATP und ADP, Substanz P, Bradykinin, Histamin, Thrombin, Serotonin, Vasopressin und Scherkräfte⁵¹. Bis heute sind drei Haupt-Isoformen der NOS bekannt, die auf unterschiedlichen Genen codiert werden: die neuronale NOS (nNOS, NOS1-Typ), die endotheliale NOS (eNOS, NOS3-Typ) und die induzierbare NOS (iNOS, Typ2-NOS)^{51, 59, 60}. nNOS, eNOS und iNOS sind im wesentlichen membranständig. eNOS ist hier in den Calveolae lokalisiert und kommt darüber hinaus auch im Golgi-Apparat vor⁶¹. Bei der neuronalen und endothelialen NOS handelt es sich um konstitutiv gebildete NOS, d.h. sie werden immer exprimiert und bilden beständig NO im nanomolaren Bereich. Dabei werden Calmodulin/Ca²⁺-Komplexe als Kofaktoren benötigt⁵¹.

eNOS kommt in der Endothelzellen der Gefäße und anderer Organe/Gewebe vor, aber auch in Neuronen. Sie ist für die Endothelium-abhängige Vasorelaxation verantwortlich, die man früher dem EDRF zugeschrieben hat. nNOS wurde erstmals in Neuronen beschrieben, kommt aber auch in Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen, Granulozyten, Pankreasinseln und dem Endometrium vor⁶². Durch nNOS gebildetes NO fungiert auch als Vasodilator und als Neurotransmitter^{61, 62}. Die iNOS-Expression kann in allen kernhaltigen Zellen auf Transkriptionsebene induziert werden, meistens geschieht dies durch Bakterien oder durch Cytokine und ist Teil der Immunantwort⁶³. Die induzierbare NOS agiert, im Gegensatz zur eNOS und nNOS, Calcium-unabhängig und ist in der Lage, innerhalb kürzester Zeit große Mengen an NO zu bilden (im mikromolaren Bereich)^{64, 65}. NO wirkt toxisch auf Bakterien und andere Zellen und tötet diese ab. Von iNOS gebildetes NO ist an dem massiven Blutdruckabfall bei Sepsis und anaphylaktischen Schock beteiligt⁶⁶.

1.2.2 Signaltransduktion durch NO

NO bindet im Cytosol der Zielzellen an die Hämgruppe der löslichen Guanylatzyklase, wo es die Bildung des second messengers cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) induziert⁵¹. cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase G, welche wiederum die leichte Kette des Myosins phosphoryliert und so seine Bindung an Actinfilamente hemmt. Darüber hinaus phosphoryliert die Proteinkinase G kalziumabhängige Kalium-Kanäle, öffnet diese, und führt so zu einer Hyperpolarisation und damit zu einer Hemmung der Muskelkontraktion. NO kann außerdem eine Apoptose der Endothelzellen vermitteln, es hemmt die Thrombozytenaggregation und die Interaktion und Einwanderung von Leukozyten mit das Endothelium der Gefäße⁶⁴⁻⁷⁰.

1.3 Endothelin und NO-Interaktion

1.3.1 Endothelin und NO in Gefäßen

Es sind bereits mehrere Mausmodelle mit einem Knockout einer der NO-Synthasen entwickelt worden. Bei diesen zeigte sich, dass eNOS-knockout-Mäuse einen höheren Blutdruck aufwiesen als Wildtypen, was bei nNOS- und iNOS-knockout-Mäusen nicht der Fall war⁶². Dies zeigt, dass vor allem von eNOS gebildetes NO den Gefäßtonus reguliert.

Im Endothelium der Gefäße wird vorwiegend ET-1 produziert, welches auch hauptsächlich für die ET-induzierte Vasokonstriktion verantwortlich ist¹. Bei Entzündungsprozessen kann Endothelin auch von den glatten Gefäßmuskelzellen selbst gebildet werden¹. In Zellkulturen aus humanen Aortengefäßmuskelzellen konnte auch die Expression von ET-2-mRNA⁷¹ und in Endothelzellen aus der humanen Umbilikalvene ET-1, ET-2 und ET-3 nachgewiesen werden⁷². Die Endothelin-bedingte Vasokonstriktion wird nicht nur allein durch die Menge an gebildeten Endothelin bestimmt, sondern auch durch die Menge und Verteilung der ETA und ETB-Rezeptoren. Die Bindung von Endothelin an ETA-Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt eine Kontraktion der Gefäße. Die Rolle von ETB ist widersprüchlicher: Zum einen wird über ETB-Rezeptoren auf Endothelzellen die Produktion und Ausscheidung von NO aktiviert. Damit wird sowohl eine Vasodilatation ausgelöst als auch die Synthese der prepro-ET-mRNA herunterreguliert. ETB-Rezeptoren kommen aber auch auf glatten Gefäßmuskelzellen vor, wo sie eine Vasokonstriktion wie ETA-Rezeptoren vermitteln³¹. Die Wirkung von Endothelin kann somit *in vivo* gleichzeitig vasokonstriktorisch und vasodilatatorisch sein. So führte eine Bolus-Injektion bei Ratten in mehreren Studien zu einer kurzzeitigen Vasodilatation, zum Teil durch eine NO-Ausschüttung, gefolgt von einer langanhaltenden Vasokonstriktion (ca. 20 min)^{3, 73}.

Es zeigte sich, dass die Endothelinspiegel im vaskulären Gewebe in einigen hypertensiven Tiermodellen erhöht ist, häufig in Hypertonieformen mit Salzempfindlichkeit z.B. Deoxycorticosteron-Acetat-Salz hypertensiven Ratten (*DOCA-salt hypertensive rats*)⁷⁴. Salzabhängige Bluthochdruckmodelle weisen meistens auch eine veränderte Gefäßgeometrie auf mit Hypertrophie der Media auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Endothelin an der Entstehung bestimmter Hypertonieformen beteiligt sein könnte. Allerdings zeigen human-Endothelin-1-transgene Mäuse mit nachgewiesener Überexpression des Endothelin-1 in verschiedenen Geweben keinen erhöhten Blutdruck^{75, 76}. Auch Mäuse mit endothel-spezifischer Überexpression human-prepro-ET-1, entwickeln keinen erhöhten Blutdruck. Beide Tiermodelle weisen eine hypertrophe Gefäßmorphologie und Inflammation der

Mesenterialarterien auf^{76, 77}. An human-ET-1-transgenen Mäusen konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Injektion mit dem NOS-Inhibitor L-NAME (N ω -Nitro-L-Arginin Methylester) bei human-ET-1-transgenen Mäusen zu einem signifikant höheren Anstieg der mittleren arteriellen Blutdrucks führt als bei Wildtyp-Kontroll-Tieren. Die Entstehung eines ET-1-bedingten Bluthochdrucks wird somit vermutlich durch eine verstärkte Produktion von NO verhindert⁷⁵.

Beim Menschen ist die Frage nur schwer zu beantworten, ob Endothelin bzw. eine Imbalance zwischen Endothelin und NO an der Entstehung von Bluthochdruck beteiligt ist und wenn ja, in welcher Form. Eine klinische Studie mit 1492 Patienten zeigte keine Korrelation zwischen dem immunreaktiven Plasma-Endothelin-Spiegel und dem Blutdruck, allerdings gab es einen signifikanten Zusammenhang zwischen ET-1-Spiegel und Alter, Plasma-Kreatininspiegel und Rauchen⁷⁸. Andere Studien zeigten auch keinen Zusammenhang zwischen Hypertonie und Plasma-Endothelinspiegel^{79, 80}. In einer weiteren klinischen Studie konnte mittels in-situ-Hybridisierung wiederum gezeigt werden, dass bei einigen Patienten mit unbehandelter essentieller Hypertonie im Endothel kleiner Arterien die Expression von prepro-Endothelin-1-mRNA signifikant erhöht war. (Ergänzend muss hier gesagt werden, dass die Studie nur fünf normotensive und je vier Patienten mit milder bis schwerer Hypertonie einschloss)⁸¹. Eine weitere Studie hat die Plasma ET-1-Spiegel von Patienten mit Phaeochromocytom mit und ohne Bluthochdruck, Patienten mit essentieller Hypertonie und normotensiven Patienten verglichen. Hier waren die ET-1-Spiegel erhöht bei Patienten mit Phaeochromocytom und unter diesen vor allem bei denen mit hohem Blutdruck⁸².

Andere Studien haben versucht, über ET-Rezeptor-Antagonisten die Rolle von ET an der Entstehung von Bluthochdruck zu klären. Im Tiermodell zeigte sich bei Mäusen und Ratten, dass eine selektive ETB-Blockade zu Bluthochdruck führt, der in vielen Fällen salzsensitiv ist^{83, 84}. Beim Menschen sind die Ergebnisse diesbezüglich widersprüchlicher: Studien mit ETA- und ETB-Rezeptorantagonisten zeigten, dass die Anzahl und Verteilung von ETA- und ETB-Rezeptoren Einfluss auf die Entstehung von Bluthochdruck nehmen könnten. So zeigte eine Studie mit dem ETA- Rezeptorantagonisten BQ-123 und dem ETB-Rezeptorantagonisten BQ-788 an normotensiven und Patienten mit essentieller Hypertonie, dass die ETA-Rezeptorblockade bei hypertensiven Patienten zu einer größeren Vasodilatation und einer besseren Durchblutung im Unterarm führt als bei normotensiven Patienten^{85, 86}. Der selektive ETB-Rezeptorantagonist BQ-788 führte bei normotensiven Patienten zu einer Vasokonstriktion im Unterarm, während er bei hypertensiven Patienten zu einer Vasodilatation im Unterarm führte^{86, 87}. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zahl der

ETA- und ETB-Rezeptoren auf den glatten Gefäßmuskelzellen erhöht war und zu einer verstärkten Vasokonstriktion geführt hat.

Für die gestörte Vasodilatation bei essentieller Hypertonie scheint eine mangelnde Produktion an NO mit verantwortlich zu sein. So zeigte eine Studie an Patienten mit essentieller Hypertonie, dass die Durchblutung des Unterarms nach intraarterieller Gabe von Acetylcholin (vermittelt Vasodilatation über physiologisch vorhandenes NO) nicht so stark anstieg wie bei normotensiven Patienten. Die Gabe des β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoprotenerol (stimuliert NO-Synthese) bzw. des NO-Donors Nitroprussid (erhöht künstlich den NO-Spiegel) führte bei hypertensiven und normotensiven Patienten zu einem gleich starken Anstieg der Unterarmdurchblutung. Die Gabe des NOS-Inhibitors NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) verringerte bei beiden Patientenkollektiven die Durchblutung im gleicher Stärke. Daraus kann geschlossen werden, dass bei Patienten mit Hypertonie die NO-Synthese gestört ist, bei intaktgebliebener Responsivität der Gefäße auf NO⁸⁸.

Es gab bereits auch Studien, bei denen kombinierte ETA/ETB- und selektive ETA-Rezeptorantagonisten für die Behandlung von Hypertonie eingesetzt wurden. In einer Studie konnte der unselektive ETA/ETB-Rezeptorantagonist Bosentan den diastolischen Blutdruck um 5,7 mmHg senken (500 mg – 2000 mg/Tag, vier Wochen), was in dieser Studie der Wirksamkeit des ACE-Hemmers Enalapril entsprach (20 mg/Tag)⁸⁹.

1.3.2 Endothelin- und NO-Interaktion im Herzen

Im kardialen Gewebe wird Endothelin von Kardiomyozyten, vaskulären und endokardialen Endothelzellen und Fibroblasten gebildet^{1, 80}. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um ET-1. ETA und ETB-Rezeptoren werden auf den Kardiomyozyten, den Fibroblasten und in den glatten Gefäßmuskelzellen sowie den Endothelzellen der Aorta und den Koronargefäßen exprimiert^{1, 3, 90}.

Endothelin wirkt mitogen und proliferativ, so dass es das Fibroblastenwachstum fördert und zur vermehrten Bildung und Einlagerung von Kollagen im Interstitium beiträgt⁹¹. In der Literatur ist eine Beteiligung von Endothelin an der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) beschrieben. So führte die gezielte und sehr starke (10-fache) Überexpression von ET-1 in Kardiomyozyten bei Mäusen zu Hypertrophie und erhöhtem Herzgewicht, die später in eine dilatative Kardiomyopathie überging und nach einigen Wochen letal war. Darüber hinaus wiesen die Herzen eine inflammatorische Makrophageninfiltration und einen erhöhten interstitiellen Kollagengehalt auf⁹². Studien unserer Arbeitsgruppe an transgenen Mäusen mit Überexpression von human-ET-1 haben auch gezeigt, dass diese eine vermehrte Expression von Kollagen III und Laminin im Interstitium aufwiesen⁹³. Andere Studien zeigten *in vitro*,

dass Endothelin positiv inotrop und chronotrop wirkt⁹⁴. Es ist unklar, ob dies auch *in vivo* der Fall ist.

Endothelin kann auch infolge anderer pathologischer Prozesse an der Entstehung eines Endorganschadens beteiligt sein. Bei Ratten mit chronischer Ischämie und daraus resultierender kongestiver Herzinsuffizienz führte die Minderdurchblutung des Herzgewebes zu erhöhten ET-1-Spiegeln im Plasma und im Gewebe des linken Ventrikels, einer erhöhten prepro-ET-1 mRNA-Produktion im linken Ventrikel und zu einer höheren ET-Rezeptordichte im Myokard. Eine ETA-Rezeptor-Blockade mit BQ-123 führte zu einer Reduktion der Herzfrequenz und der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit⁹⁵. Hieraus kann geschlossen werden, dass Endothelin bei einer Schädigung des Myokards durch Ischämie zur Aufrechterhaltung der kardialen Kontraktilität beiträgt, aber aufgrund seiner proinflammatorischen und profibrotischen Wirkung auf Dauer zum Endorganschaden beiträgt.

Inzwischen wurden mehrere große multizentrische Studien mit Endothelin-Rezeptorantagonisten bei chronischer Herzinsuffizienz durchgeführt, wobei die Ergebnisse eher enttäuschend waren. In der REACH-1-Studie (Research on Endothelin Antagonism in Chronic Heart Failure) und der ENABLE-Studie (Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure) wurde getestet, ob der kombinierte ETA/ETB-Rezeptorantagonist Bosentan zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes bei chronischer Herzinsuffizienz beitragen kann. Tatsächlich zeigte sich eine Verbesserung der Morbidität und Mortalität nach sechs Monaten Behandlung. REACH-1 wurde allerdings abgebrochen, weil ernste Nebenwirkungen auftraten (erhöhte ALT- und AST-Werte, Dosis > 500 mg/Tag)⁹⁶. Bei der ENABLE-Studie wurden geringere Dosen verwendet (125 mg/Tag), die aber keinerlei protektive Wirkung bei chronischer Herzinsuffizienz erbrachten. Auch hier kam es zu Nebenwirkungen (z.B. Kopfschmerzen, Ödeme, Übelkeit, Schlaflosigkeit). Weitere Studien lieferten ähnliche Ergebnisse. So zeigten der selektive ETA-Rezeptorantagonisten Enrasentan (100-fach selektiver für ETA als für ETB) und der ETA-Rezeptor selektive Antagonist Darusentan (150-fach selektiver für ETA als für ETB) auch keine positiven Effekte bei chronischer Herzinsuffizienz. Bislang gibt es keine Studie, die direkt ETA-selektive mit unselektiven ET-Rezeptorantagonisten vergleicht^{97, 98}. Somit bleibt weiterhin unklar, inwieweit Endothelin zu der Entstehung eines kardialen Endorganschadens beiträgt und ob ein pharmakologischer Eingriff in dieses System von Nutzen ist.

Ein weiterer Ansatz kann eine ECE-Inhibition sein⁹⁸. Der kombinierte ECE/NEP-Hemmer SLV306 führte bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz zu einer Reduzierung des

Druck in den Pulmonalgefäßen und dem rechten Atrium des Herzens, allerdings zeigten sich keine Änderungen im kardialen Output, der Herzfrequenz und dem Blutdruck⁹⁹.

Die Funktion von NO im Herzen kann zweischneidig sein. Zum einen ist es, wie im restlichen Organismus, an der Regulation des Gefäßtonus der kardialen und koronaren Gefäße als Vasodilator beteiligt, hält die Blutperfusion des Myokards mit aufrecht und inhibiert die ET-Synthese. So konnte in Mäusen mit eNOS-knockout gezeigt werden, dass diese nach Induktion einer myokardialen Ischämie größere Infarktflächen aufwiesen als Wildtypen¹⁰⁰.

Eine übermäßige Produktion von NO kann aber nitrosativen Stress induzieren. NO reagiert mit Superoxid zum hochreaktiven Peroxynitrit. Dieses kann zu oxidativen Proteinschädigungen wie der Bildung von Nitrotyrosin-Resten führen, und damit toxisch auf die meisten Zelltypen wirken¹⁰¹.

Die dauerhafte Inhibition von NOS durch L-Arginin-Analoga führte in verschiedenen Studien zu einer kardialen Hypertrophie¹⁰²⁻¹⁰⁴. In zwei voneinander unabhängigen transgenen Mäusemodellen mit eNOS-knockout zeigte sich zunächst keine kardiale Hypertrophie^{105, 106}, die aber unter Stress, wie Hypoxie oder (künstlich induzierter) Aortenstenose rasch präsent wurde¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. Die anti-hypertrophen Effekte von NO werden vermutlich cGMP-vermittelt^{109, 110}. In neonatalen Ratten-Kardiomyozyten inhibiert NO die Calcineurin-NFAT-Kaskade (NFAT: *nuclear factor of activated T cells*) und die Bildung des Myosin-like-Proteins (MLP, nucleärer Faktor, der die Kardiomyozytenausdifferenzierung reguliert)¹¹⁰⁻¹¹². NO inhibiert außerdem die Fibroblastenproliferation, und verringert damit vermutlich die Matrixproteinexpression^{109, 110}.

1.3.3 Endothelin- und NO-Interaktion in der Niere

Physiologisch beeinflussen sich Niere, Herz und Gefäßsystem gegenseitig sehr stark, und Störungen in einem Organ/System ziehen Schäden an den jeweils anderen Organen/Systemen nach sich. So weiß man heute, dass eine Minderdurchblutung der Niere durch chronische Herzinsuffizienz, morphologischen Veränderungen der Gefäße und/oder Hypertonie häufige Ursachen für ein daraus resultierendes Nierenversagen sind¹¹³. Umgekehrt sind bei Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Hauptursache für Morbidität und Mortalität¹¹³. Bei einer Minderdurchblutung der Niere (z.B. durch verengte, der Niere zuführenden Gefäße) kommt es zu einer massiven Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Durch die verminderte Durchblutung des Vas afferens und des Nierenkörperchens wird im juxtaglomerulären Apparat Renin freigesetzt. Renin spaltet vom in der Leber gebildete Angiotensinogen Angiotensin I ab, welches

wiederum vom *angiotensin-converting-enzyme* (ACE) zu Angiotensin II gespalten wird. Angiotensin II vermittelt im gesamten Organismus eine Vasokonstriktion und führt in der Nebennierenrinde zur Freisetzung von Aldosteron. Dieses erhöht die Natriumreabsorption und damit das Blutvolumen über Osmose. Das erhöhte Plasmavolumen führt zu einer erhöhten Belastung des Herzens (v.a. des linken Ventrikels) und Scherkräften in den Gefäßen. Es kommt zu morphologischen Gefäßschädigungen (Hypertrophie und/oder exzentrisches remodelling) und außerdem zu einer kardialen linksventrikulären Hypertrophie mit Funktionsstörung¹¹³⁻¹¹⁶.

Etwa neun Prozent der Endothelin-1-Clearance findet in der Niere statt⁴⁷⁻⁴⁹. ET bindet an ETB-Rezeptoren, welche anschließend in die Zellen internalisiert und dort in Endosomen/Lysosomen aufgenommen werden, wo das ET abgebaut wird, während der Rezeptor wieder in seine aktive Form überführt und zur Zellmembran zurücktransportiert wird¹¹⁷. Darüber hinaus produziert die Niere selbst ET-1, welches zum Teil im Urin ausgeschieden wird, so dass die ET-Ausscheidung im Urin ein guter Parameter für die renale ET-Produktion ist. Diese Produktion kann relativ autonom zu der ET-1-Produktion im Endothel der Gefäße erfolgen¹¹⁸. In Schweinegeweben gilt die innere renale Medulla als Ort der höchsten ET-1-Konzentration⁴.

Morphologisch bewirkt eine chronische Überexpression des ET-1 die Entstehung von Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose, was zu einem renalen Endorganschaden führen und so indirekt zu einer möglichen kardialen Schädigung beitragen kann⁷⁶.

Endothelin spielt außerdem eine Rolle in der Regulierung der renalen Durchblutung und der Wasser- und Natriumreabsorption sowie der Natriumausscheidung. Endothelin kann in der Niere über ETA und ETB-Rezeptoren auf den glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion bewirken. Geschieht dies in der Arteria renalis und/oder den Vasa afferentia der Glomerula, kann es zu einer Minderdurchblutung kommen, so dass RAAS-System aktiviert wird.

Endothelin greift wahrscheinlich über den Salzhaushalt auch direkt in die Regulierung des Blutdrucks ein. So zeigte sich bei Ratten mit ETB-knockout, dass diese eine salzsensitive Hypertonie entwickeln¹¹⁹. Mäuse mit ETA-knockout im Sammelrohr zeigten keine salzsensitive Hypertonie, während Mäuse mit Sammelrohr-spezifischen ETB-knockout diese Hypertonie entwickelten^{120, 121}. Vermutlich führt die Aktivierung der ETB-Rezeptoren im Sammelrohr zu einer vermehrten Natrium-Ausscheidung, was zu einer Absenkung des Blutdrucks führt.

NO ist an der Regulation der glomerulären Mikrozirkulation beteiligt¹²² und vermindert die vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II. eNOS wird in den afferenten Gefäßen exprimiert und über Scherkräfte aktiviert, während nNOS in der Macula densa exprimiert wird. Die Kontraktion des Vas afferens wird somit vermutlich über die eNOS im Gefäß selber und über die nNOS in der Macula densa reguliert¹²³⁻¹²⁶.

Ein Mangel an NO kann auch morphologische Veränderungen in der Niere bewirken. In einer Studie, die sich mit der Nierenmorphologie von eNOS-knockout-Mäusen befasst hat, wiesen diese gehäuft vergrößerte sklerotische Glomeruli auf, und es kam zu Narbenbildungen, welche zahlreiche kleine Glomeruli enthalten, die an keine intakten Tubuli gekoppelt sind, dafür aber mit einer dichten Kollagenmatrix umgeben sind, die auch durch eine Makrophageninfiltration gekennzeichnet ist. Außerhalb dieser Narbengebiete ist die Kollagenverteilung und Makrophageninfiltration nicht verändert im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren¹²⁷.

1.3.4 Endothelin- und NO-Interaktion in der Lunge

Der hauptsächliche Abbauort für zirkulierendes Endothelin sind, wie bereits beschrieben, ETB-Rezeptoren in der Lunge⁴⁷⁻⁴⁹.

In der Lunge ist ET-1 beteiligt an der Entstehung von pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH), was sekundär u.a. zu einer Rechtsherzinsuffizienz führen kann^{128, 129}. Darüber hinaus wirkt Endothelin als Wachstumsfaktor für bronchiale glatte Gefäßmuskelzellen¹³⁰, führt zu Inflammation und ist an der Entstehung von pulmonaler Fibrose beteiligt¹³¹. Das Endothelin-System ist einer der therapeutischen Angriffspunkte bei der Behandlung der PAH. Bislang sind in Deutschland der kombinierte ETA/ETB-Rezeptorantagonisten Bosentan sowie die ETA-selektiven Rezeptorantagonisten Sitaxentan und Ambrisentan zugelassen¹³².

In der Lunge werden alle drei NOS-Isoformen exprimiert. nNOS wird in Nervenzellen, eNOS in Endothelzellen und in epithelialen Zellen und iNOS in epithelialen Zellen sowie in alveolaren Makrophagen exprimiert⁶⁴. Die normale pulmonale Zirkulation weist beständig einen niedrigen Blutdruck auf, auch bei verstärkter Durchblutung, und das von konstitutiven NO-Synthasen gebildete NO spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung dieses Niedrigdrucks (in Interaktion mit anderen Substanzen wie Prostacyclin)⁶⁴. Nicht nur hohe ET-1-Spiegel, sondern auch zu niedrige NO-Spiegel können zu endothelialer Dysfunktion und infolge dessen zu einer PAH führen (z.B. bei verminderter Expression der konstitutiven NO-Synthasen oder bei oxidativem Stress)^{64, 133, 134}. So zeigen eNOS-knockout-Mäuse nur einen geringen Anstieg des pulmonal-arteriellen Drucks, aber unter Hypoxie steigt er bei ihnen stärker an als in den Wildtyp-Kontrollgruppen¹³⁵. In der Klinik ist die Inhalation von NO

zugelassen bei der Behandlung von persistierenden pulmonalen Bluthochdruck bei Neugeborenen und es gibt weitere Studien zur Behandlung von pulmonal arterieller Hypertonie mit NO bei Erwachsenen, bei denen sich diese Therapieform erfolgreich gezeigt hat¹³⁶⁻¹³⁹.

Die exzessive Synthese von NO spielt wiederum bei anderen pulmonalen Erkrankungen eine Rolle, wie z.B. Asthma oder Atemnot-Syndrom des Erwachsenen (ARDS). Hier trägt vermutlich nitrosativer Stress (durch Bildung von Peroxynitriten) zur Pathogenese bei¹⁴⁰. In Tiermodellen führte die Inhibition von iNOS zu einer Verringerung der Entzündung und der Hyperresponsivität gegenüber einem Allergen, allerdings können auch iNOS-knockout-Modelle allergisches Asthma entwickeln¹³⁷.

1.3.5 Endothelin und NO in der Pathogenese weiterer Erkrankungen

1.3.5.1 Diabetes mellitus

Endothelin ist wahrscheinlich bei der Pathogenese und der Entstehung von Endorganschäden infolge von Diabetes mellitus involviert. In einigen Studien an Patienten mit Diabetes mellitus wurden erhöhte Endothelin-Spiegel gemessen¹⁴¹. Auch in einigen diabetischen Tiermodellen zeigten sich erhöhte Endothelinspiegel. So war in einer Studie an Ratten mit Streptozocin induziertem Diabetes die ET-1-Expression in den Mesenterialarterien erhöht¹⁴². Bei Zucker-Fatty Ratten, einem Tiermodell für Übergewicht und Insulin-Resistenz, zeigte sich, dass die ET-1 Plasma-Spiegel erhöht sind, wenn die Tiere nach einer Ausnüchterungsperiode wieder Futter erhalten (Mahlzeit-Toleranz-Test)¹⁴³. In demselben Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem ETA-Rezeptor Antagonisten Atrasentan in Zucker-Fatty Ratten die Hyperinsulinämie nach sechs Wochen Behandlung um ca. 50 Prozent reduziert. Darüber hinaus zeigte sich in den behandelten Zucker-Fatty Ratten eine deutlich verbesserte Insulinsensitivität¹⁴⁴. Endothelin ist somit in die Entstehung einer gestörten Glukosetoleranz verwickelt und vermittelt darüber hinaus die Diabetes-induzierte Gewebe- und Endorganschäden. Therapeutisch konnte zudem gezeigt werden, dass bei diabetischen Ratten die Gabe eines ETA-Rezeptorantagonisten zu einer verringerten Makrophageninfiltration, einer verminderten Mikroalbuminurie und einer verminderten Ausscheidung von TGF- β und Prostaglandin- E₂-Metaboliten im Urin führt¹⁴⁵.

1.3.5.2 Sklerodermie

Endothelin ist vermutlich an der Entstehung der Sklerodermie beteiligt, einer Erkrankung, die durch Kollagenosen der Haut und bei der systemischen Sklerodermie der inneren Organe,

Inflammation und vaskuläre endotheliale Zellschäden gekennzeichnet ist. Die Ursachen sind bislang wenig geklärt, umfassen aber genetische Faktoren und das Vorliegen von pathologischen Autoimmunprozessen. So zeigte sich, dass ET-1 überexprimiert wird in Blutgefäßen, Lunge, Niere und Haut von Patienten mit systemischer Sklerodermie^{146, 147}. Erhöhte ET-1-Spiegel und eine veränderte ETA- und ETB-Rezeptorexpression wurden in präsklerotischen Hautläsionen beobachtet, wobei die zirkulierenden ET-1-Spiegel mit dem Grad der Hautfibrosierung und bisherigen Erkrankungsdauer korrelierte¹⁴⁸.

1.4 Beschreibung der von uns verwendeten Tiermodelle

1.4.1 Human-ET-1-transgene Mäuse (ET+/+)

Die von uns verwendeten human-ET-1-transgenen Mäuse wurden von Prof. Theuring, Charité Berlin, Center for Cardiovascular Research, hergestellt⁷⁶. Es handelt sich um Mäuse mit NMRI-Stammhintergrund. Über Northern Blot wurde die Expression des human-ET-1 in Gehirn, Lunge und Niere nachgewiesen. Die ET-1-Spiegel waren signifikant erhöht in den Nieren von 3 und 14 Monaten alten human-ET-1-transgenen Mäusen versus Wildtypen und tendenziell im Plasma um 35 Prozent. Die Tiere entwickelten renale Zysten, renale interstitielle Fibrose und Glomerulosklerose mit Verringerung der glomerulären Filtrationsrate⁷⁶. Es zeigte sich auch eine erhöhte NO-Exkretion im Urin und eine Infiltration mit CD4-positiven Lymphozyten und Makrophagen in die Niere. Die Expression von iNOS war erhöht in den intrarenalen Gefäßen, während die Expression der eNOS unverändert war im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren⁷⁵.

Darüber hinaus zeigten die Tiere eine erhöhte interstitielle Fibrose im Herzen. Hier waren Kollagen III und Laminin hochreguliert⁹³. Die Tiere wiesen keinen erhöhten Blutdruck auf, allerdings führte eine Injektion mit dem NOS-Inhibitor L-NAME (N ω -Nitro-L-Arginin Methylester) zu einem signifikant höheren Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks als bei Wildtyp-Kontroll-Tieren⁷⁵.

Relaxations-Kontraktions-Experimente mit isolierten Aortenringen aus human-ET-1-transgenen Mäusen zeigten, dass die Relaxation bei Inkubation der Ringe mit Acetylcholin (induziert NO-Ausschüttung) signifikant höher war gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren. Diese Relaxation konnte bei beiden Gruppen inhibiert werden durch Präinkubation mit L-NAME. Die maximale Kontraktion bei Inkubation mit ET-1 und Big ET-1 war dagegen signifikant niedriger in ET-1-transgenen Mäusen, d.h. die Sensitivität der Aortenringe gegenüber ET-1 war verringert. Hier konnte Präinkubation mit L-NAME die Kontraktilität steigern. Bei den ET-1-transgenen Tieren in diesem Versuch war darüber hinaus die Nitrit- und Nitrat-

Konzentration (NO-Metabolite) im Urin signifikant erhöht. Die Endothelium-unabhängige Relaxation zu Norepinephrin war dagegen gleichermaßen stark in transgenen und nicht-transgenen Tieren.¹⁴⁹ Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieses Tiermodell vermehrt NO bildet um so der Vasokonstriktion durch ET-1-Überexpression entgegenzuwirken.

1.4.2 eNOS-knockout-Mäuse (eNOS-/-)

Die von uns verwendeten eNOS-defizienten Mäuse wurden von Prof. Gödecke, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, hergestellt¹⁰⁵. Es handelt sich um Mäuse mit C57BL/6-Stammhintergrund. Das Fehlen der eNOS in Herz, Leber, Lunge, und Niere der transgenen Tiere wurde mittels Western-Blot und Immunhistologie bestätigt. Die eNOS-Defizienz führte bei diesen Tieren zu erhöhtem Blutdruck (135 ± 15 mmHg versus 107 ± 8 mm Hg in Wildtypen). Die Tiere entwickelten keine kardiale Hypertrophie, aber Versuche an isoliert-perfundierten Herzen zeigten eine 70 prozentige Reduktion der Vasodilatation der Koronargefäße nach Perfusion mit Acetylcholin im Vergleich zu Wildtypen. Der basale koronararterielle Druck war unverändert. Durch Perfusion mit dem Cyclooxygenasehemmer Diclofenac wandelte sich die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation in eine Vasokonstriktion um, wobei dieser Phänotyp stärker bei den eNOS-defizienten Tieren ausgeprägt war. Hier fand vermutlich eine Kompensation über Prostaglandine statt¹⁰⁵.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Obwohl ET-1 ein starker Vasokonstriktor ist, führt die alleinige Überexpression von human-ET-1 (in human-ET-1-transgenen Mäusen) nicht zu Bluthochdruck. Vermutlich liegt eine erhöhte NO-Produktion durch die in den Endothelzellen der Gefäße exprimierte eNOS vor. Um diese Frage zu klären, wurden ET-1-transgene Mäuse mit eNOS-knockout-Mäusen gekreuzt und über Rückzucht homozygote eNOS-knockout-human-ET-1-transgene Mäuse (eNOS-/- ET+/+) gezüchtet. Es wurden weiterhin die entsprechenden Kontrollgruppen mit gleichen Stammhintergrund gezüchtet, d.h. Wildtypen, nur human-ET-1-transgen (ET+/+) und nur eNOS-knockout (eNOS-/-). Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob eine Imbalance zwischen NO und ET-1 für die Entstehung von Bluthochdruck verantwortlich sein kann. Darüber hinaus soll an diesem Tiermodell untersucht werden, ob eine human-ET-1-Überexpression und ein gleichzeitiger NO-Mangel (durch Knockout der eNOS) die Entstehung einer veränderten Herzmorphologie und einem Endorganschadens verstärken kann, und ob dies die Herzfunktion beeinträchtigt. Dazu werden bei den Tieren über einen Herzkatheter die Druckverhältnisse im linken Ventrikel untersucht, und die Herzen histologisch analysiert.

Die folgende Aufzählung fasst die Fragestellungen dieser Arbeit noch einmal kurz zusammen:

1. Führt die Überexpression von human-ET-1 und das gleichzeitige Mangel an NO durch knockout des eNOS zu einer weiteren Erhöhung des Bluthochdrucks (im Vergleich zum eNOS-knockout allein)?
2. Entstehen morphologische Veränderung der Gefäße (am Beispiel der Koronargefäße)?
3. Kommt es zu morphologischen Veränderungen im Herzgewebe, und wenn ja, welcher Art (Fibrose, Inflammation, Hypertrophie, Dilatative Kardiomyopathie), und werden diese durch die Endothelin-NO-Imbalance verstärkt?
4. Führt dies zu einer veränderten Herzfunktion?

2 Material und Methoden

2.1.1 Materialien, Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

- 1,5ml-Reaktionsgefäße, frei von humaner DNA, DNase und RNase, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Agarose, SeaKem® LE Agarose, Cambrex, Rockland, ME, USA
- Borsäure, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Deckgläschen, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- Depex, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA
- Desinfektionsmittel, Sterillium®, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
- dNTPs (100mM), Bioron, Ludwigshafen, Deutschland
- Eisenhämatoxylin nach Weigert, Lösung A + B, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Eisessig, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Eosin, C.I. 45380, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
- Ethidiumbromid, amresco®, 10mg/ml-Lösung, Solon, Ohio, USA
- flüssiger Stickstoff
- Formaldehyd 37%ig, JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA
- Handschuhe, Latex
- HCl 37%ig, rauchend
- Kanülen (27G), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
- KCl, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- KH_2PO_4 , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Meyers Häkalaunlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- MgCl_2 , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Mikro-Haematokrit-Kapillaren, Typ A, Natrium-heparinisiert, Brand, Wertheim, Deutschland
- Na_2HPO_4 , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Na-EDTA, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- NaOH, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Narkotikum: Isofluran, FORENE®, Nr. B506, Abbott, Ludwigshafen, Deutschland
- nicht resorbierbare Nähseide, BBraun Melsungen, Melsungen, Deutschland

- Objektträger, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
- Paraffin 6, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
- Paraffin 9, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
- Pipettenspitzen, steril, PCR-clean, verschiedenen Größen, VWR, Deutschland
- Primer, TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
- Proteinase K, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Resorcin-Fuchsin nach Weigert Waldeck GmbH & CoKG, Division Chroma, Münster, Deutschland
- Sirius Red, F3BA, Chromagesellschaft, Schmidt GmbH + Co, Köngen/N, Deutschland
- Skalpelle, Typ 10, Feather, Osaka, Japan
- sterile 0,9%-ige Kochsalzlösung, BBraun Melsungen, Melsungen, Deutschland
- sterile Tupfer
- Taq DNA Polymerase (5 Units / μ L) + zugehörige Lösungen, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA:
 - o 10 x PCR Puffer
 - o AmpliTaq Gold® DNA Polymerase
 - o $MgCl_2$ -Lösung (25 mM)
- Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan), Pufferan®, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tween
- vanGieson-Färbegemisch, Waldeck GmbH & CoKG, Division Chroma, Münster, Deutschland
- Wasser, Wasser PCR grade + autoklaviert, Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
- wässrige Pikrinsäure (ca. 13 g/l), Fluka, Sigma Aldrich Chemie, Deutschland
- Xylol, JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA

2.1.2 Lösungs- und Pufferansätze

- 0,1 %ige Eosinlösung: (Eosin 0,1 % w/v, 100 μ L Eisessig, abs. Ethanol)
- 0,5 M EDTA-Lösung (0,5 M Na-EDTA, Wasser PCR grade + autoklaviert, Lösung wird nach Mischen nochmals autoklaviert)
- 4% Formalin in PBS (108 ml 37%-ige Formalinlösung + 892 ml PBS-Puffer)
- Blaumarker (0,25% Bromphenolblau, 15% Ficoll Typ 400, in 1x TBE-Puffer lösen)

- Eisenhämatoxylin nach Weigert Lösung A enthält: 1g Hämatoxylin + 100ml 96%iges Ethanol; Lösung B enthält: 1.16g Eisen(III)-chlorid + 99ml Aqua dest. + 1ml 25%ige HCl-Lösung); Lösung A + Lösung B im Verhältnis 1 : 1 mischen)
- Ethidiumbromid-TBE-Puffer (1000 mL TBE-Puffer, 0,625 mg Ethidiumbromid)
- K-Puffer (50 mmol KCl, 10 mmol Tris, 2,5 mmol MgCl, Wasser PCR grade + autoklaviert, pH 8,3, Puffer wird nach Mischen nochmals autoklaviert)
- Lysis-Puffer (10 µL Proteinase-K-Lösung + 5µl Tween + 985 µL K-Puffer)
- PBS-Puffer (123 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 5,8 mM N₂HPO₄, 1,3 mM KH₂PO₄)
- Proteinase-K-Lösung (100µg Proteinase K + 1 ml K-Puffer)
- Sirius Red-Färbelösung (0,1 % w/v Sirius Rot in Pikrinsäurelösung)
- TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 20 mM Na-EDTA, Wasser bidest, pH 8,5)
- TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM Na-EDTA, Wasser)

2.1.3 Geräte

- Blutentnahme und Genotypisierung:
 - Eppendorf-Pipetten (0,1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl) Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Zentrifuge: Biofuge 13, Heraeus, Berlin, Deutschland
 - INTAS Gel-Imager + PC-Arbeitsstation + Software GDS 1.5.0.1, Göttingen, Deutschland
 - Waage 0,1 - 600 g, BCL 600, Sartorius, Göttingen, Deutschland
 - Feinwaage 0,001 - 210g, SBC 22, Scaltec, Göttingen, Deutschland
 - Thermoblock, Thermostat TCR 100, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - T3Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland
 - Wasserbad, Typ 1013, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
 - Elektrophoresekammer, Agagel Midi-Wide, Biometra, Göttingen, Deutschland
 - Power Pack P25, Biometra, Göttingen, Deutschland
- Schwanzplethysmographie:
 - Druck- Pulsmesseinheit, PowerLab / 4 SP, AD Instruments, NSW, 2153 AUSTRALIA

- Power Lab Software, Chart and Scope for Windows, Version 4.4.1., AD Instruments, NSW, 2153 AUSTRALIA
- Druck- Pulsmesseinheit und Software, LE 5007 Automatic Blood Pressure Computer, Letitia Scientific Instruments, Panlab s.I., Barcelona, Spanien
- Wärmeplatte, Präzitherm 28-1, Störk-Tronic, Deutschland
- Fixierereinheit für Mäuse, MLA5018 Rodent Restrainer (bis 50g), NSW, 2153 AUSTRALIA
- Herzkatheter:
 - Millar Micro-Tip-Transducer, 1,4 French, HSE, March, Deutschland
 - Powerlab System 4/25, AD Instruments, FMI (Föhr Medical-GmbH), Seeheim-Ober-Beerbach, Deutschland
 - Pressure control unit, PCU-200, AD Instruments, NSW, 2153 AUSTRALIA
 - Animal Bio Amp, ML136 (EKG), AD Instruments, NSW, 2153 AUSTRALIA
 - Stereolupe, LEICA M651, JungHistoservice, Wetzlar, Deutschland
 - Narkosebox Eigenherstellung
 - Narkosemaske, Eigenherstellung
 - Isofluran Verdampfer, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland
 - 2 Knüpfpinzetten, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
 - 1 Präpariereschere, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
 - 1 Mosquito Klemme, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
 - Wärmeplatte, Präzitherm 28-1, Störk-Tronic, Deutschland
- Organentnahme und Einbetten der Organe:
 - Präpariereschere, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
 - Knüpfpinzetten, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
 - Einbettstation, Shandon Citadel 1000, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
 - Ausbettstation, Microm EC 350, Walldorf, Deutschland
- Färbung und Mikroskopie:
 - Wärmeschrank ST6030, Heraeus, Berlin, Deutschland
 - Mikroskop, BH-2, Olympus, Hamburg, Deutschland
 - Farbkamera, Model CFW-1310 C mit dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application Version 1.0, Scion Corporation, Frederick, MD, USA
 - Programm ImageJ, Version 1.61 (eine Shareware des National Institut of Health, USA)

- Statistik:
 - o SPSS Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Züchtung

Es wurden zwei bereits in der Literatur beschriebene transgene Mäusestämme verwendet: NMRI / human ET-1-transgene Mäuse / Linie 856 wurden gekreuzt mit C57BL/6 eNOS-knockout-Mäusen^{76, 105}. Durch mehrere Rückkreuzungsschritte (siehe Abbildung 2-1) wurde ein homogener genetischer Hintergrund erzeugt und schließlich folgende Gruppen gezüchtet:

eNOS Wildtyp + human ET-1 Wildtyp (im folgenden als WT abgekürzt)

eNOS Wildtyp + human ET-1+/+ (homozygot) (im folgenden als ET+/+ abgekürzt)

eNOS-/- + human ET-1 Wildtyp (homozygot) (im folgenden als eNOS-/- abgekürzt)

eNOS-/- + human ET-1+/+ (homozygot) (im folgenden als eNOS-/- ET+/+ abgekürzt)

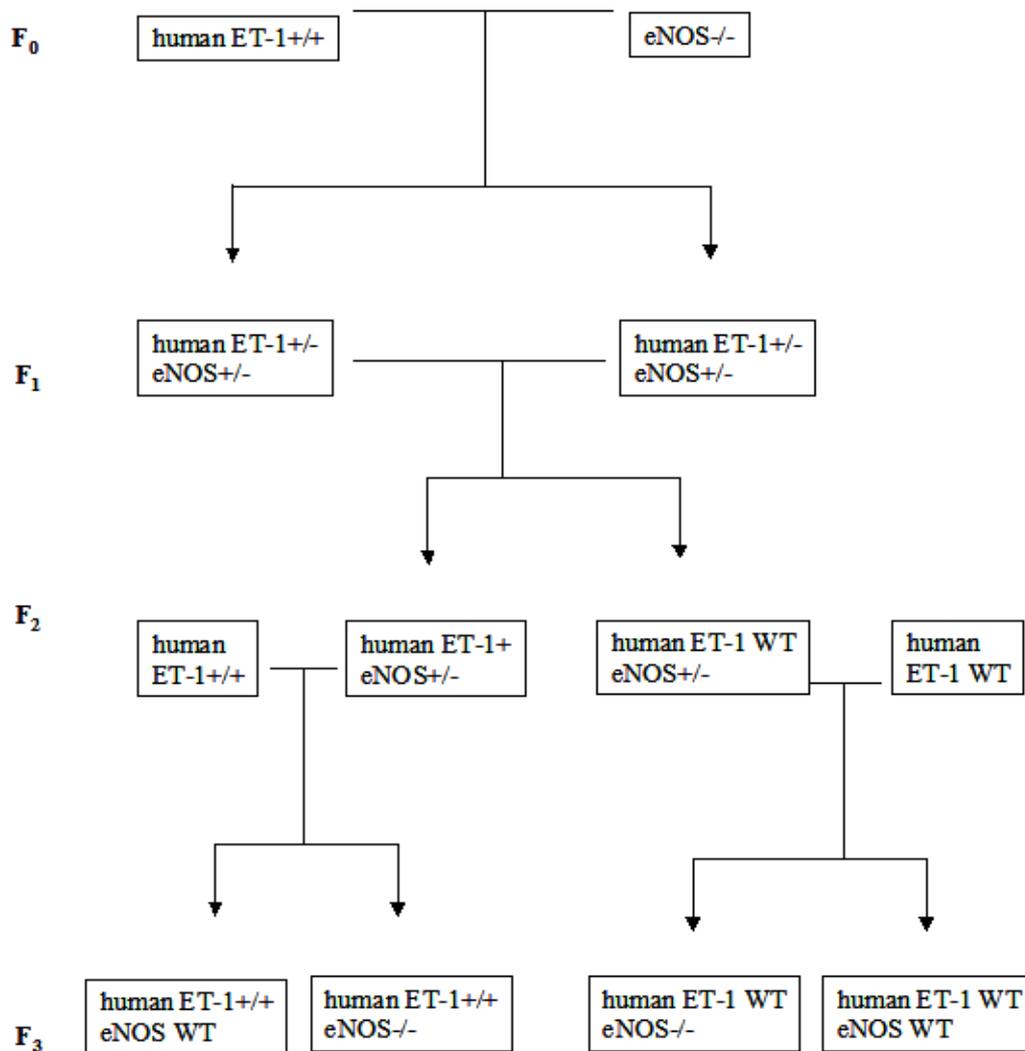


Abbildung 2-1 Zuchtverfahren, vereinfachte Darstellung

Für die folgenden Untersuchungen wurden nur homozygote Tiere verwendet (bzw. WT als Kontrolltiere), die mittels Standard-PCR typisiert wurden.

2.2.2 Tierhaltung

Alle Mäuse wurden unter kontrollierten Umgebungsbedingungen mit 20°C Temperatur, 46% Luftfeuchtigkeit und einer Lichtperiode von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr gehalten. Den Tieren wurden Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt. Bei dem pelletierten Futter handelte es sich um ein standardisiertes Ratten und Mäuse- Alleinfuttermittel (Altromin).

2.2.3 Blutentnahme zur Genotypisierung

Das Blut für die Typisierung wurde frühestens im Alter von sechs Wochen gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte mittels Punktion des retrobulbären Venenplexus unter Inhalationskurznarkose mit Isofluran. Das Blut wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, welche 10 µl 0,5 M EDTA enthielten. Anschließend wurde das Blut 5 Minuten

mit 2000 g zentrifugiert, das Plasma verworfen und die Zellen 1:2 mit isotoner NaCl-Lösung versetzt und gemischt.

2.2.3.1 DNA-Isolierung

50 µl mit NaCl-Lösung versetztes Blut wurde mit 500 µl TE-Puffer gemischt und drei Minuten mit 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500µl TE-Puffer resuspendiert und erneut eine Minute mit 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Das gewonnene Pellet wurde in 100µl Lysis-Puffer resuspendiert und mindestens 90 Minuten im Thermoblock bei 56°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt nach 30 Minuten bei 95°C. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Genotypisierung mittels Standard-PCR + Agarosegelelektrophorese

2.2.3.2.1 PCR

Es wurden jeweils die in Tabelle 2-1 beschriebenen Primer verwendet und die PCR Ansätze wie in Tabelle 2-2 beschrieben angesetzt. Die Amplifikation ist in Tabelle 2-3, Tabelle 2-4 und Tabelle 2-5 beschrieben.

Tabelle 2-1 verwendete Primer

PCR:	Primer	Sequenz	Bandengröße
eNOS-WT	eNOS-WT 3 (DD)	5' Agg ACA TAT gTT TgT CTg Cgg 3'	ca. 900bp
	eNOS-WT 4 (DD)	5' CTg Agg ACT gCA CCT gTT CA 3'	
NeoR-PCR	NeoR2 ase	5' ACA AgA CCg gCT TCC ATC Cg 3'	ca. 275 bp
	NeoR2 se	5' TTg TCA AgA CCg ACC TgT CC 3'	
human-ET-1-PCR	ET-1 9003 se	5' CCC CAT TCT AAg CAT Agg ggC 3'	ca. 503 bp
	ET-1 9507 ase	5' AgC CAg TgA AgA Tgg TTg ggg 3'	

Tabelle 2-2 PCR-Ansatz

Material	Volumen pro Ansatz (22µl)	Ansatz für 50 Proben
Wasser (aqua ad inject.)	13,728	686,4
10 x PCR Puffer	2,2	110,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,76	88,0
dNTPs (Mix) (2,5 mM)	0,44	22,0
Primer 1 (10 nmol/L)	0,88	44,0
Primer 2 (10nmol/L)	0,88	44,0
Taq DNA Polymerase (5 Units /µL)	0,132	6,6
Template (ca. 25-50 µg/mL)	1,98	99,0
Total (Summe)	22	1100,0

Tabelle 2-3 eNOS-WT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkungen
Temperatur Heizdeckel	105°C		
Vorlauftemperatur	94°C		
erste Denaturierung	94°C	6 min	
weitere Denaturierungsschritte	94°C	30 sek	diese 3 Schritte wiederholen sich 39 Mal
Annealing	60°C	30 sek	
Elongation	72°C	2 min	
letzter Elongationsschritt	72°C	10 min	
Lagertemperatur des PCR-Produkts bis zur Entnahme	10°C		

Tabelle 2-4 NeoR-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkungen
Temperatur Heizdeckel	105°C		
Vorlauftemperatur	94°C		
erste Denaturierung	94°C	6 min	
weitere Denaturierungsschritte	94°C	30 sek	diese 3 Schritte wiederholen sich 39 Mal
Annealing	60°C	30 sek	
Elongation	72°C	2 min	
letzter Elongationsschritt	72°C	10 min	
Lagertemperatur des PCR-Produkts bis zur Entnahme	10°C		

Tabelle 2-5 human-ET-1-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkungen
Temperatur Heizdeckel	105°C		
Vorlauftemperatur	94°C		
erste Denaturierung	94°C	6 min	
weitere Denaturierungsschritte	94°C	30 sek	diese 3 Schritte wiederholen sich 39 Mal
Annealing	60°C	30 sek	
Elongation	72°C	2 min	
letzter Elongationsschritt	72°C	10 min	
Lagertemperatur des PCR-Produkts bis zur Entnahme	10°C		

2.2.3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Das jeweilige PCR-Produkt wurde auf ein 1,5 %iges Agarose-Gel aufgetragen, gefolgt von einer Elektrophorese bei 100 V, 250 mA für ca. 20 Minuten. Dann erfolgte eine Anfärbung der amplifizierten DNA-Fragmente mit 0,05% (0,5µg/ml) Ethidiumbromid. Die fragmente wurden sichtbar gemacht durch UV-Licht mittels Transilluminator. Die Produktgröße der ET PCR liegt bei 503 bp, die der eNOS WT PCR bei 900 bp und die der NeoR PCR bei ca. 275 bp. Mit der eNOS-WT-PCR wurde das Vorliegen eines eNOS-Wildtyp-Allels nachgewiesen.

Mit der NeoR-PCR wurde das Vorliegen eines eNOS-Allels mit Insertion einer Neomycin-Kassette nachgewiesen (eNOS-knockout-Allel). Mit der human-ET-1-PCR wurde das Vorliegen eines human-ET-1-Allels nachgewiesen. Es läßt sich jedoch nicht bestimmen, ob es homo-oder heterozygot vorliegt. Dies kann man nur durch Verpaarung mit Wildtypen und Typisierung ihrer Nachkommen bestimmt werden. Sind die Nachkommen alle heterozygot ET-1 transgen, so muss das zu bestimmende Elterntier homozygot sein (Mindestwurfgröße: 6 Jungtiere). Um eine Aussage über eNOS Homo- oder Heterozygotie treffen zu können, kann man die Ergebnisse der NeoR-PCR und der eNOS-WT-PCR heranziehen. Ist nur eine Bande in der eNOS-WT-PCR zu erkennen, liegt ein homozygoter eNOS-Wildtyp vor, ist nur eine Bande in der NeoR-PCR zu sehen, liegt ein homozygoter eNOS-knockout vor, und weisen beide PCR-Produkte Banden auf, liegt ein heterozygoter eNOS-knockout vor.

2.2.4 Blutdruckmessung mittels Schwanzplethysmographie

Die Messung der 9 Monate alten Serie erfolgte mittels einer Druck- Pulsmesseinheit der Firma AD Instruments (PowerLab / 4 SP). Monitoring, Messung sowie Auswertung erfolgten computergestützt (Software: AD Instruments, Power Lab, Software: Chart and Scope for Windows, Version 4.4.1.) Die Messung der 5+9 Monate alten Serie (d.h. Mausserie, in der ein Teil der Tiere 5 Monate alt war und ein Teil der Tiere 9 Monate) erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Quaschnig (Universität Würzburg). Hierzu wurde die Druck-Pulsmesseinheit und Software der Firma Letitia Scientific Instruments (LE 5007 Automatic Blood Pressure Computer) verwendet.

Die Tiere wurden vor der eigentlichen Messung 1 mal trainiert und frühestens am folgenden Tag fand die eigentliche Messung statt. Sie erfolgte immer zur selben Tageszeit, um Schwankungen durch den Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere zu verringern. Der Blutdruck wurde über die Schwanzarterie mittels einer nicht-invasiven „Tail-Cuff“-Plethysmographie gemessen. Die Maus wurde dazu in einer schmalen Plexiglas-Röhre fixiert, die über eine verschiebbare Stirnwand verfügt, um sie der Größe der Maus anzupassen, und eine Öffnung für den Schwanz. Die Maus wurde so auf einer Wärmeplatte bei 37 °C gelagert. An der Schwanzwurzel wurde eine aufblasbare Druckmanschette (verbunden mit Druckmeseinheit) befestigt und direkt dahinter ein piezoelektrischer Pulsaufnehmer. Während die Maus fixiert war, erfolgte computergestützt eine ständige Beobachtung des Pulses. Sobald eine stabile Pulsamplitude zu sehen war, das Tier sich beruhigt hat und sich nicht mehr bewegt, frühestens jedoch nach 10 Minuten Eingewöhnung, wurde der Puls aufgezeichnet, um die Herzfrequenz kontinuierlich durch Mittelwertbildung zu ermitteln. Anschließend wurde der Druckmanschette aufgeblasen bis auf 215 mmHg (hier zeigt die Pulskurve keine Amplitude

Pulmonalklappe), und das Blut wird in die Aorta bzw. die Lungenschlagader (Truncus pulmonalis) gepresst. Am Ende dieser Phase schließen sich die Aorten- und Pulmonalklappe.

Diastole

C → D Entspannungsphase: Die Muskulatur des Herzens entspannt sich, wodurch der Druck wieder fällt. Da die Aorten- und Pulmonalklappe geschlossen sind, kann das Blut nicht in die Herzkammer zurückfließen. Die Vorhöfe füllen sich wieder mit Blut: sauerstoffreiches Blut aus den Lungenvenen fließt in den linken Vorhof, sauerstoffarmes Blut aus den großen Körpervenen fließt in den rechten Vorhof, aber die Segelklappen sind noch geschlossen.

D → A Füllungsphase und atriale Systole: Die Segelklappen (Trikuspidalklappe rechts, Mitralklappe links) öffnen sich, und durch den nun vorhandenen Unterdruck in den Ventrikeln füllen sich diese wieder. Am Ende dieser Phase sind die Kammern zu ungefähr 80 Prozent ihrer Kapazität gefüllt. Kurz vor Ende dieser Phase kontrahieren die Vorhöfe, wodurch weiteres Blut in die Herzkammern gedrückt wird.

2.2.5.2 Erfasste Parameter (siehe auch Abbildung 2-3 und Tabelle 2-6)

2.2.5.2.1 LVP max

(systolic left ventricular pressure bzw. linksventrikulärer maximaler systolischer Druck, (mmHg)):

Mit LVP max korrigiert wurde im linken Ventrikel der maximale Druck erfasst, der vorherrscht, wenn das Herz zu Beginn der Systole noch stark mit Blut gefüllt ist, und bereits kontrahiert. Bei einer Abnahme der Elastizität der Herzwände durch interstitielle Fibrose oder bei einer ausgeprägten Herzhypertrophie mit Verengung der Herzkammer kann er sich erhöhen.

2.2.5.2.2 LVP min

(diastolic left ventricular pressure bzw. linksventrikulärer maximaler diastolischer Druck, (mmHg)):

Bei LVP min diastolisch handelt es sich um den minimalsten Druck in der linken Herzkammer, der vorliegt, wenn zu Beginn der Diastole der Herzmuskel entspannt ist, und die Kammer noch nicht mit Blut gefüllt ist. Bei einer Abnahme der Elastizität der Herzwände durch interstitielle Fibrose oder bei einer ausgeprägten Herzhypertrophie mit Verengung der Herzkammer kann er sich erhöhen.

2.2.5.2.3 LVEDP korrigiert

(left ventricular end diastolic pressure bzw. linksventrikulärer enddiastolischer Druck, (mmHg)).

Hierbei handelt es sich um den Druck, der am Ende der diastolischen Füllphase vorliegt, bevor der Herzmuskel kontrahiert. Er ist ein direkter Parameter für die Elastizität der Herzwände, und kann sich durch interstitielle Fibrose oder bei einer ausgeprägten Herzhypertrophie mit Verengung der Herzkammer erhöhen.

2.2.5.2.4 *dpdt max*

(maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, (mmHg/s)):

Hierbei handelt es sich um die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit während der Systole, wenn der Herzmuskel kontrahiert, die Aortenklappe aber noch geschlossen ist. Eine konzentrische Herzhypertrophie führt zu einer Erhöhung dieses Parameters, während eine eingeschränkte Kontraktilität des Herzmuskels diesen Wert senken kann. Außerdem erhöht er sich, wenn der Widerstand der systemischen Blutzirkulation erhöht ist, und so der Blutaustreibung in der Systole einen Widerstand entgegen setzt.

2.2.5.2.5 *dpdt min*

(minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit (mmHg/s)):

Hierbei handelt es sich um die höchste Abfallgeschwindigkeit des Drucks zu Beginn der Diastole, wenn das Blut aus dem Herzen ausgetrieben wurde und der Herzmuskel sich wieder entspannt. Sie ist herabgesetzt, wenn die Kontraktilität des Herzmuskels eingeschränkt ist.

2.2.5.2.6 *Tau*

(Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls, (s)):

Der Parameter Tau besagt, wie lange die linksventrikuläre Druckabfallsphase dauert. Bei morphologischen Veränderungen der Herzmuskelzellen (z.B. des Anteils/der Zusammensetzung der Myosin/Actinfilamente) oder veränderter Ca^{2+} -Verfügbarkeit in den einzelnen Zellen kann die Relaxationsphase länger andauern und Tau sich erhöhen. Bei Abnahme der Elastizität der Herzwände oder verringerten Widerstand der systemischen Blutzirkulation kann sich Tau verringern.

2.2.5.2.7 *Berechnung korrigierte Werte*

Die Daten für LVP max und LVEDP wurden korrigiert, d.h., es wurde die Differenz zwischen LVP max und LVP min ermittelt und in der Auswertung verwendet:

$$LVP_{\text{max Tier x}} - LVP_{\text{min Tier x}} = LVP_{\text{max korrigiert Tier x}}$$

$$LVEDP_{\text{Tier x}} - LVP_{\text{min Tier x}} = LVEDP_{\text{korrigiert Tier x}}$$

Tabelle 2-6 Erfasste Parameter bei den Messungen mittels linksventrikulären Herzkatheters

Parameter	Abkürzung	Einheit
systolic left ventricular pressure bzw. linksventrikulärer maximaler systolischer Druck	LVP max	mmHg
diastolic left ventricular pressure bzw. linksventrikulärer maximaler diastolischer Druck	LVP min	mmHg
left ventricular end diastolic pressure bzw. linksventrikulärer enddiastolischer Druck	LVEDP	mmHg
maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit	dPdt max	mmHg/s
minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit	dPdt min	mmHg/s
Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls	Tau	s
Herzfrequenz	-	bpm

2.2.5.3 Durchführung Linksventrikulärer Herzkatheter

Die Narkoseeinleitung und Aufrechterhaltung erfolgte mit Isofluran. Dazu wurde die Maus in einen gefluteten Narkosekäfig (5%) für zwei Minuten gesetzt. Nach Erreichen der notwendigen Narkosetiefe (chirurgische Toleranz) wurde das Tier in Rückenlage gelagert, eine Narkosemaske aufgesetzt und die Narkose mit ~2,5%-igem Isofluran (abhängig von Narkosetiefe der Maus) aufrecht erhalten. Nach Scheren und Desinfizieren der ventralen Halspartie wurde die A. carotis dextra zwischen M. sternothyroideus und M. sternomastoideus freipräpariert und vom N. vagus abgetrennt. Drei Unterbindungsschlingen wurden um die A. carotis gelegt, die kranial gelegene Schlinge wurde verknotet, etwas unter Zug gespannt und an der Narkosemaske festgeklebt. Zwei weiteren Schlingen wurden Richtung caudal positioniert und jeweils eine lockere Ligatur vorgelegt. Die letzte Schlinge wurde mit der Klemme festgehalten und das Gefäß so gestaut. Mit einer Kanüle wurde caudal in die A. carotis gestochen und durch die so entstandene Öffnung der Tip-Katheter (Millar Micro-Tip-Transducer, 1,4 French, Firma HSE) in den linken Ventrikel über die Aorta ascendens vorgeschoben. Nach einer Wartezeit von drei Minuten erfolgte dann die eigentliche Aufnahme (2 Minuten). Nach der Aufnahme wurde der Tip-Katheter wieder zurückgezogen und das Gefäß abgebunden. Der Sender des Tip-Katheters wurde wieder ins Wasser geben zum Kalibrieren. Anschließend erfolgte eine Blutentnahme über die V. iliaca communis, wobei das Tier aufgrund des schnellen Blutentzugs starb.

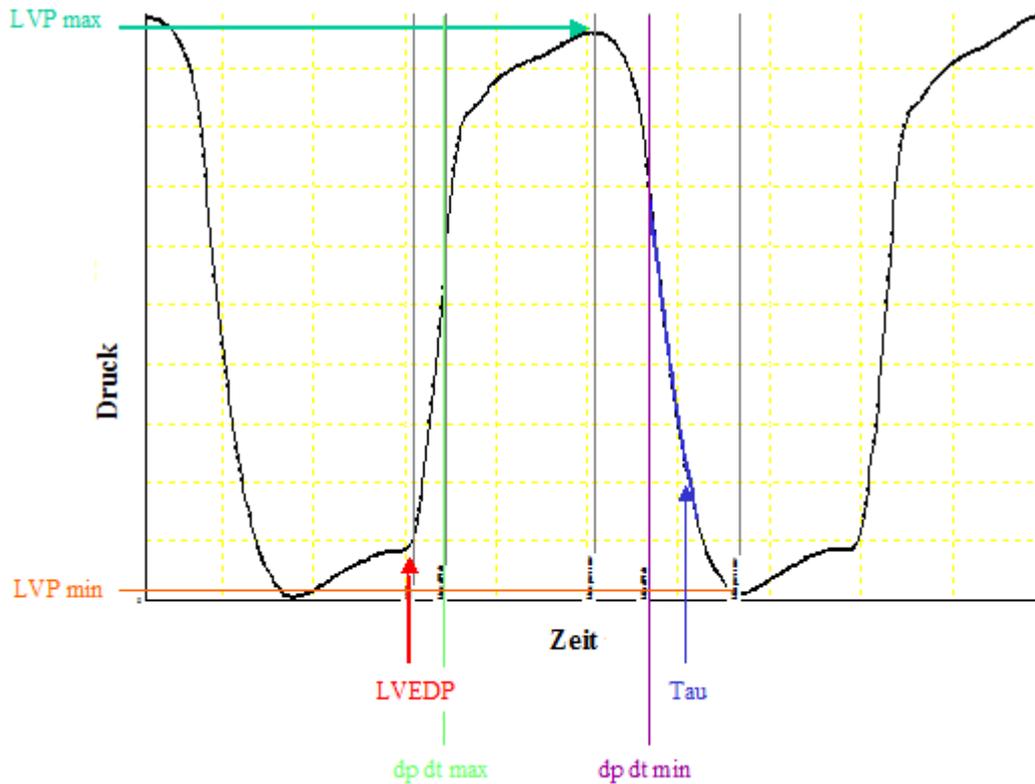


Abbildung 2-3 Druckkurve aus Messungen mit Herzkatheter

2.2.6 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte zwischen 10 und 14 Uhr. Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt bis zum Einsetzen des Atemstillstandes. Anschließend erfolgte ein zusätzliches Strecken. Es wurde der Thorax eröffnet, das Herz entnommen und gewogen. Das Herz wurde transversal auf Höhe der Herzkammern mit einem Skalpell durchgeschnitten, der Apex in eine Biopsiekassette überführt und in 4% Formalin in PBS für 24 Std. fixiert. Anschließend wurden die Organe in 70% Ethanol überführt und bis zum Einbetten in Paraffin eingelagert. Der andere Teil des Herzens (mit Vorhöfen) wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert. Desweiteren wurden Lunge, Niere, Leber, Milz und Aorta entnommen, je ein Teil in Formalin fixiert und der zweite in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.7 Einbetten von Organen in Paraffin

Das Einbetten erfolgte in dem Einbettautomaten Shandon Citadel 1000 (Schritte: siehe Tabelle 2-7).

Tabelle 2-7 Einbettprogramm Shandon Citadel 1000

Schritt	Lösungsmittel	Zeit
1.	70% Ethanol	1 Stunde
2.	96% Ethanol	1 Stunde
3.-5.	3 x 100% Ethanol	je 1 Stunde
6.	Aceton	30 Minuten
7.	Paraffin 6	2 Stunden
8.	Paraffin 9	bis zur Entnahme

Anschließend wurden die Proben in das Paraffinbad der Ausbettstation Microm EC 350 überführt. Die Organe wurden aus den Einbettungskassetten herausgenommen und in Metallformen überführt mit der vorgesehenen Anschnittfläche nach unten. Die Einbettungskassette wurde auf der Metallkassette festgedrückt, mit Paraffin aufgefüllt und anschließend vorsichtig auf eine Kühlplatte gelegt. Nach dem Aushärten des Paraffins wurden die fertigen Blöckchen aus Metallkassette gelöst und bei Raumtemperatur eingelagert.

2.2.8 Anfertigen von Dünnschnitten

Für weitere histologische Analysen wurden Gewebedünnschnitte am Microtom Leica Jung RM 2025 angefertigt. Für die Sirius-Rot-Färbung und die Elastica-vanGieson-Färbung wurden 3 µm dicke Schnitte hergestellt, für die HE-Färbung 1 µm dicke Schnitte.

2.2.9 Färbungen, Mikroskopie und histologische Auswertung

Es wurde an den Dünnschnitten der Herzen jeweils eine Sirius-Rot-, Elastica-vanGiesson- und HE-Färbung durchgeführt. Die Methodik für alle drei genannten Färbungen lassen sich wie folgt zusammenfassen

1. Entparaffinieren und Bewässern:

Die Schnitte wurden zweimal 10 Minuten in Xylol getaucht um das Paraffin zu entfernen, und in absteigender Ethanolreihe (jeweils 5 Minuten in absolutem, 96%igem, 80%igem und 70%igem Ethanol) wurde die Hydrophilität der Schnitte gesteigert.

2. Einsatz der Färbelösungen:

Mit den Färbelösungen wurden zelluläre Strukturen angefärbt (z.B. Zellkerne, Gefäße, Bindegewebe).

3. Entwässern:

Die gefärbten Schnitte wurden dann in der aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 Minuten in 70%igem, 80%igem, 96%igem und absolutem Ethanol) und 2 mal 10 Minuten mittels Xylolbad in ein lipophiles Medium überführt.

5. Eindecken:

Anschließend wurden alle Schnitte DEPEX®-Histokitt und einem Deckglas eingedeckt.

2.2.9.1 Die Sirius-Rot-Färbung

2.2.9.1.1 Prinzip

Sirius-Rot ist ein anionischer Farbstoff, der auf Grund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt.

2.2.9.1.2 Benötigte Färbelösungen

1. Gesättigte wässrige Pikrinsäure
2. Sirius Red- 0,1 %ige Lösung
 - 0,2 g Sirius-Rot in 200 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure lösen, mischen und filtrieren
3. HCL 0,01 M
 - 0,5 ml HCL in 199,5 ml abs. Ethanol

2.2.9.1.3 Färbung

1. Entparaffinieren
2. 60 min in 0,1 %iger Sirius-Rot-Lösung
3. kurz spülen in 0,01 M HCl
4. Entwässern
5. Eindecken

2.2.9.1.4 Auswertung

2.2.9.1.4.1 Analyse der interstitiellen Fibrose am Herzen

Zur digitalen Bildverarbeitung wurde ein PowerMac G4 (Macintosh) und das Programm ImageJ in der Version 1.29d (Shareware des National Institute of Health, NIH, USA) genutzt. Zur morphometrischen Analyse wurden von jedem Präparat 30 Bilder der linken Ventrikelwand und des Septums fotografiert. Dazu wurde ein Olympus BH-2 Mikroskop

mit einer Farbkamera von Scion Corporation Model CFW-1310 C mit dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application Version 1.0 verwendet. Zur Bestimmung des Anteils an kollagener Matrix pro Bildausschnitt wurden die Farbbilder vom Typ RGB color in Bilder 8-bit (grayscale) konvertiert. Es wurde dann eine Hell-/Dunkel-Grenze festgelegt (sog. Threshold), bei der die kollagenhaltigen Flächen als dunkler Kontrast erkannt wurden. Alle Präparate wurden mit derselben Hell-Dunkel-Grenze gemessen. Der Computer ermittelte die Gesamtfläche und die Sirius-Rot-positive dunkle Fläche in Pixel. Die interstitielle Fibrose wurde dann als prozentualer Anteil der Sirius-Rot-positiven Fläche an der Gesamtfläche des Bildausschnitts angegeben.

2.2.9.1.5 Analyse des perivaskulären Fibroseindex der kardialen Arterien

Die Bewertung der perivaskulären Fibrose beruht auf einem Scoring-System. Es wird der Durchmesser des Bindegewebes um die Gefäße herum mit dem Durchmesser der Gefäßmedia verglichen. Dabei gibt es fünf Schweregrade: 1 (0-25%), 2 (25–50%), 3 (50-75%), 4 (75-100%) und 5 (>100%). Ein Score von 2 bedeutet z.B., dass der Durchmesser des Bindegewebes etwa 25-50% des Durchmessers der Gefäßmedia entspricht. Dazu werden unter dem Mikroskop alle Arterien beurteilt, deren Gefäßwände von gleichmäßiger Stärke sind, die also transversal (quer) angeschnitten wurden. Bei der Auswertung des perivaskulären Fibroseindex werden die jeweiligen Scores (1, 2, 3, 4, 5) mit der Anzahl der entsprechenden Gefäße (n_x) multipliziert und durch die Gesamtzahl der gezählten Gefäße geteilt (N), um den mittleren Index für den Dünnschnitt zu errechnen:

$$\text{Perivaskulärer Fibroseindex} = (1 \cdot n_1 + 2 \cdot n_2 + 3 \cdot n_3 + 4 \cdot n_4 + 5 \cdot n_5) / N$$

Da es sich um eine sehr subjektive Methode handelt, wurden alle Gewebeschnitte auf diese Weise von zwei Personen beurteilt, die hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit verblindet waren. Ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen wurde nur dann als solcher anerkannt, wenn er sich aus dem gemessenen Index beider Personen ergab.

2.2.9.2 Die HE Färbung

2.2.9.2.1 Prinzip

Die HE Färbung ist eine sukzessive Lackfärbung mit einem basischen Kernfarbstoff (Hämalaun nach Mayer) und einem sauren Cytoplasmafarbstoff (Eosin).

In dieser Färbung werden saure Moleküle und Strukturen im Schnitt durch das Hämatoxilin blau angefärbt, wie z.B. Kerne, saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk. Kationische/proteinhaltige Strukturen wie das Zytoplasma der Zellen, Kollagen u.a. werden rötlich angefärbt.

2.2.9.2.2 Benötigte Färbelösungen

1. Meyers Hämlaunlösung
2. 0,1 %ige Eosinlösung: 0,1 g Eosin in 100 ml abs. Ethanol lösen und
1 Tropfen Eisessig dazugeben

2.2.9.2.3 Färbung

1. Entparaffinieren
2. kurz spülen in A. dest.
3. 1,5 min in Hämlaun nach Mayer
4. 10 min in fließendem Leitungswasser
5. spülen in A. dest.
6. 30 Sekunden in 0,1%igem Eosin.
7. spülen in A. dest.
8. Entwässern
9. Eindecken

2.2.9.2.4 Auswertung

Zur Analyse des Kardiomyozytendurchmessers wurden 1 µm dicke, HE gefärbte Präparate verwendet. Dazu wurde 30 Fotos mit längs angeschnittenen Kardiomyozyten aus der linken Ventrikelwand und des Septums. Dazu wurde ein Olympus BH-2 Mikroskop mit einer Farbkamera von Scion Corporation Model CFW-1310 C mit dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application Version 1.0 verwendet und die Fotos mit dem Programm ImageJ, Version 1.61 (eine Shareware des National Institut of Health, USA) analysiert. Es wurde der Durchmesser der Kardiomyozyten in Höhe des Kardiomyozytenkernes möglichst im rechten Winkel zum Faserverlauf markiert. Das Programm gibt diesen Durchmesser in Pixel an. Anschließend wurde am Mikroskop eine Neubauer-Zählkammer unter den gleichen Bedingungen mit der gleichen Vergrößerung fotografiert, die Kantenlängen der kleinsten Quadrate vermessen (in Pixel, Länge eines Quadrates entspricht 0,05 mm) und mit Hilfe dieses Wertes ein Umrechnungsfaktor bestimmt.

2.2.9.3 Die Elastica-vanGiesson- Färbung

2.2.9.3.1 Prinzip

Diese Färbung dient der Darstellung von elastischen Fasern. Durch das Resorcin werden die Hüllschichten der Fasern aufgeraut. An dieser derart vergrößerten Oberfläche kann sich nun das Fuchsin über die Grenzflächenadsorption an die Fasern anlagern. Saure Moleküle und Strukturen im Schnitt werden durch das Hämatoxylin blau angefärbt, wie z.B. Kerne, saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk. Bindegewebe und Muskulatur wird durch die vanGieson-Lösung rötlich angefärbt.

2.2.9.3.2 Benötigte Färbelösungen

1. Resorcin-Fuchsin nach Weigert
2. Eisenhämatoxylin nach Weigert
3. vanGieson-Gemisch

2.2.9.3.3 Färbung

1. Entparaffinieren (nur bis 80% Ethanol)
2. kurz spülen in A. dest.
3. 10 min Resorcin-Fuchsin nach Weigert
4. 3 min Leitungswasser, fließend
5. kurzes Spülen in 1% HCl-Ethanol
6. kurzes Spülen in fließendem Leitungswasser
7. spülen in A. dest.
8. 1 min 70% Ethanol.
9. 2 min 80% Ethanol.
- 10.3 min Eisenhämatoxylin nach Weigert
- 11.3 min Leitungswasser, fließend
12. kurzes Spülen in 1% HCl-Ethanol
13. kurzes Spülen in fließendem Leitungswasser
14. 7 min Leitungswasser, fließend
15. spülen in A. dest.
16. vanGieson-Gemisch
17. kurz in 95% Ethanol spülen
18. 1 min abs. Ethanol
19. Entwässern

20. Eindecken

2.2.9.3.4 Auswertung

Zur Analyse der Media-Lumen-Ratio der Arterien wurden 3 µm dicke, Elastika-vanGiesson-gefärbte Präparate verwendet. Dazu wurde 30 Fotos mit quer angeschnittenen Arterien aus der linken Ventrikelwand und des Septums und 10 Fotos aus der rechten Ventrikelwand angefertigt. Dazu wurde ein Olympus BH-2 Mikroskop mit einer Farbkamera von Scion Corporation Model CFW-1310 C mit dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application Version 1.0 verwendet und die Fotos mit dem Programm ImageJ, Version 1.61 analysiert (eine Shareware des National Institut of Health, USA). Die äußere und innere Begrenzung der Media der Arterien wurde mit Hilfe eines Zeichentools des ImageJ-Programms umfahren und der Umfang sowie der Flächeninhalt bestimmt. Aus dem Umfang kann mit der Kreisformel die Flächeninhalte errechnet werden, wenn das Gefäß ideal rund wäre (so werden Verzerrungen rausgerechnet, die sich durch Stauchungen der Gefäße beim Schneiden ergeben haben können).

Es gilt: $A = \pi \cdot r^2$ (A = Flächeninhalt; π = ca. 3,14159; r = Radius)

$U = 2 \cdot \pi \cdot r$ (U = Umfang,)

Daraus ergibt sich durch einsetzen und umstellen folgende Formel:

$$A = \pi \cdot (U / (2 \cdot \pi))^2$$

Anschließend wurden aus diesen Flächeninhalten folgendermaßen die Mediafläche und die Media zu Lumen Ratio berechnet:

$$A_{\text{Mediafläche}} = A_{\text{Gesamtfläche}} - A_{\text{Lumenfläche}}$$

$$\text{Media zu Lumen Ratio} = A_{\text{Mediafläche}} / A_{\text{Lumenfläche}}$$

Um die Lumen- und Mediafläche von Pixel in µm² umzurechnen, wurde am Mikroskop eine Neubauer-Zählkammer unter den gleichen Bedingungen mit der gleichen Vergrößerung fotografiert, die Fläche der kleinsten Quadrate vermessen (in Pixel, Fläche eines Quadrates entspricht 0,0025 mm²), und mit Hilfe dieses Wertes ein Umrechnungsfaktor bestimmt.

2.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 16.0. Mittels eines Boxplots wurden Ausreißer und Extremwerte bestimmt und ausgeschlossen. Anschließend wurden die Daten auf Vorliegen einer Normalverteilung getestet mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Lag diese vor, wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mittels einfaktorier ANOVA und T-Test ermittelt. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die weitere Auswertung mittel Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test.

Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0,05$ festgelegt, und in den Abbildungen und Tabellen mit *, # und § markiert. In den Tabellen und Grafiken sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (1-fach) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht und Herzgewicht

3.1.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht war bei den ET+/+ und den eNOS-/- ET+/+ signifikant niedriger gegenüber den WT und den eNOS-/-.

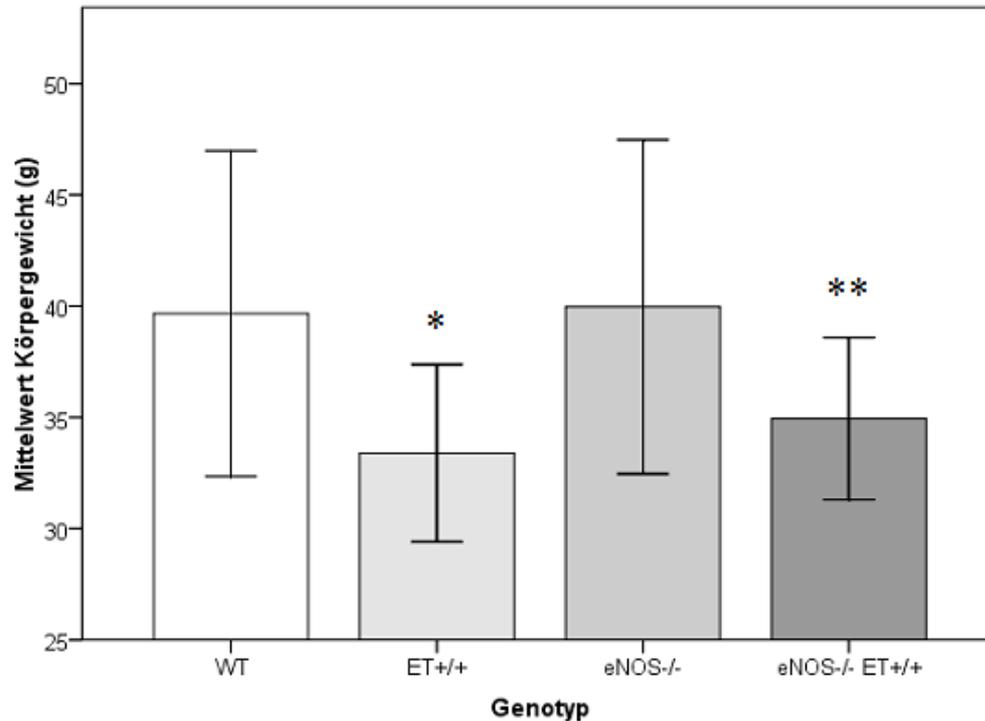


Abbildung 3-1 Körpergewicht, Aufteilung nach Genotyp

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

ANOVA: $P = 0,001$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/-

** $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/-

Tabelle 3-1 Körpergewicht, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	Körpergewicht (g)
WT	39,7 ± 7,3
ET+/+	33,4 ± 4,0 *
eNOS-/-	40,0 ± 7,5
eNOS-/- ET+/+	34,9 ± 3,6 **

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 17-20; ANOVA: P = 0,001

T-Test: * P < 0,05 vs. WT und eNOS-/-; ** P < 0,05 vs. WT und eNOS-/-

3.1.2 Aufteilung nach Geschlecht

Das Körpergewicht war bei den männlichen ET+/+ und den männlichen eNOS-/- ET+/+ signifikant niedriger gegenüber den männlichen WT und den männlichen eNOS-/. Darüber hinaus war es bei den weiblichen ET+/+ signifikant niedriger gegenüber den weiblichen eNOS-/. Es war außerdem bei den männlichen WT signifikant höher als bei den weiblichen WT, gleiches gilt für die männlichen ET+/+, eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+ gegenüber den weiblichen Tieren mit gleichen Genotyp.

Tabelle 3-2 Körpergewicht, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	Körpergewicht (g)
m WT	45,6 ± 4,1 §
m ET+/+	37,2 ± 3,4 § *
m eNOS-/-	45,3 ± 7,2 §
m eNOS-/- ET+/+	37,6 ± 2,1 § **
w WT	33,7 ± 4,2
w ET+/+	31,4 ± 2,5 #
w eNOS-/-	35,7 ± 4,5
w eNOS-/- ET+/+	32,6 ± 3,1

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 7-13; ANOVA: P = 0,000

T-Test: * P < 0,05 vs. m WT und m eNOS-/-; ** P < 0,05 vs. m WT und m eNOS-/-; # P < 0,05 vs. w eNOS-/-; § P < 0,05 vs. Weibchen mit gleichem Genotyp

3.1.3 Herzgewicht

Das Herzgewicht war bei den ET+/+ signifikant niedriger als bei den WT und den eNOS-/- ET+/+-Tieren.

Tabelle 3-3 Herzgewicht und relatives Herzgewicht, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	Herzgewicht (g)	relatives Herzgewicht (mg/g)
WT	0,196 ± 0,042	4,83 ± 0,70
ET+/+	0,171 ± 0,046 *	4,93 ± 0,80
eNOS-/-	0,216 ± 0,036	5,00 ± 0,94
eNOS-/- ET+/+	0,175 ± 0,036	4,74 ± 0,73

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

absolutes Herzgewicht: n = 18-21; Kruskal-Wallis: P = 0,041; Mann Whitney U-Test: * P < 0,05 vs. WT und eNOS-/-

relatives Herzgewicht: n = 17-21; keine signifikanten Unterschiede

3.1.4 Aufteilung nach Geschlecht

Bei den Männchen war das Herzgewicht signifikant erhöht bei den männlichen eNOS-/- vs. den männlichen WT, ET+/+ und eNOS-/- ET+/+. Das Herzgewicht der männlichen eNOS-/- ET+/+ war signifikant niedriger gegenüber den männlichen WT. Bei den Weibchen war das Herzgewicht signifikant niedriger bei den weiblichen ET+/+ gegenüber den weiblichen WT. Das Herzgewicht war bei den männlichen WT signifikant höher als bei den weiblichen WT, gleiches gilt für die männlichen ET+/+ vs. die weiblichen ET+/+, die männlichen eNOS-/- vs. die weiblichen eNOS-/- sowie die männlichen eNOS-/- ET+/+ vs. die weiblichen eNOS-/- ET+/+.

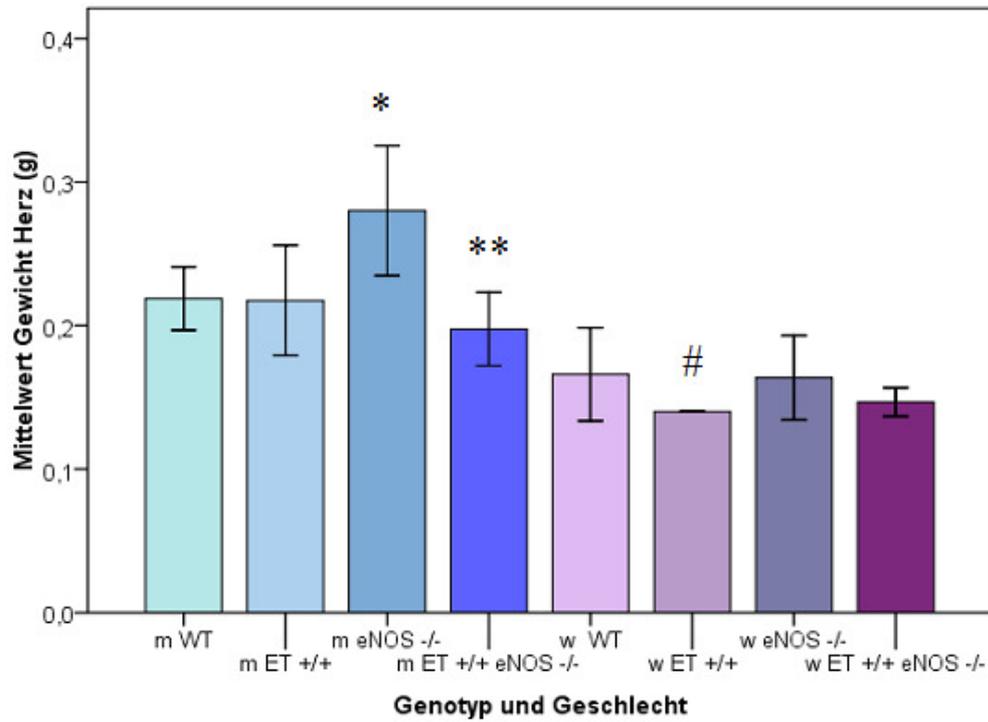


Abbildung 3-2 absolutes Herzgewicht, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Kruskal-Wallis: $P = 0,000$

Mann Whitney U-Test:

* $P < 0,05$ vs. m WT, m ET+/+ und m eNOS-/- ET+/+

** $P < 0,05$ vs. m WT

$P < 0,05$ vs. w WT

§ $P < 0,05$ vs. Weibchen mit dem gleichen Genotyp

Tabelle 3-4 absolutes und relatives Herzgewicht, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	Herzgewicht (g)	relatives Herzgewicht (mg/g)
m WT	0,219 ± 0,022 §	4,802 ± 0,444
m ET+/+	0,218 ± 0,039 §	5,582 ± 0,747 § *
m eNOS-/-	0,280 ± 0,045 § *	5,948 ± 1,299 § **
m eNOS-/- ET+/+	0,198 ± 0,026 § **	5,112 ± 0,265 §
w WT	0,166 ± 0,032	4,695 ± 0,790
w ET+/+	0,140 ± 0,000 #	4,435 ± 0,427
w eNOS-/-	0,164 ± 0,029	4,625 ± 0,810
w eNOS-/- ET+/+	0,147 ± 0,010	4,386 ± 0,556

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

absolutes Herzgewicht: n = 8-11; Kruskal-Wallis: P = 0,000

Mann Whitney U-Test;; * P < 0,05 vs. m WT, m ET+/+ und m eNOS-/- ET+/+ ; ** P < 0,05 vs. m WT ; # P < 0,05 vs. w WT ; § P < 0,05 vs. Weibchen mit dem gleichen Genotyp

relatives Herzgewicht: n = 8-12; Kruskal-Wallis: P = 0,001; Mann Whitney U-Test;; * P < 0,05 vs. m WT; ** P < 0,05 vs. m WT

§ P < 0,05 vs. Weibchen mit dem gleichen Genotyp

3.1.5 relatives Herzgewicht

Für diesen Parameter wurde das Herzgewicht durch das Körpergewicht geteilt. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen.

3.1.6 Aufteilung nach Geschlecht

Bei den Männchen war das relative Herzgewicht signifikant erhöht bei den männlichen eNOS-/- vs. den männlichen WT, und den männlichen ET+/+ vs. den männlichen WT. Bei den Weibchen gab es keine signifikanten Unterschiede. Das Herzgewicht war bei den männlichen ET+/+ signifikant höher als bei den weiblichen ET+/+, gleiches gilt für die die männlichen eNOS-/- vs. den weiblichen eNOS-/- sowie die männlichen eNOS-/- ET+/+ vs. den weiblichen eNOS-/- ET+/+.

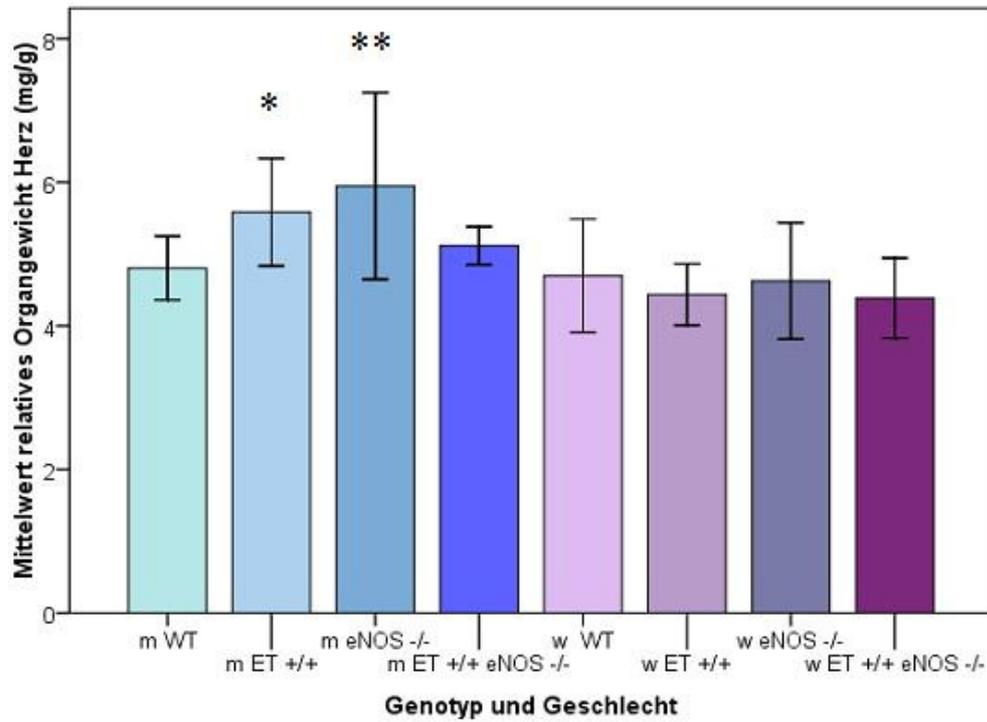


Abbildung 3-3 relatives Herzgewicht, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Kruskal-Wallis: $P = 0,001$

Mann Whitney U-Test:

* $P < 0,05$ vs. m WT

** $P < 0,05$ vs. m WT

3.2 Histologie

3.2.1 Kardiomyozytendurchmesser

Der Kardiomyozytendurchmesser war bei den eNOS^{-/-} signifikant erhöht gegenüber den WT und den ET^{+/+}.

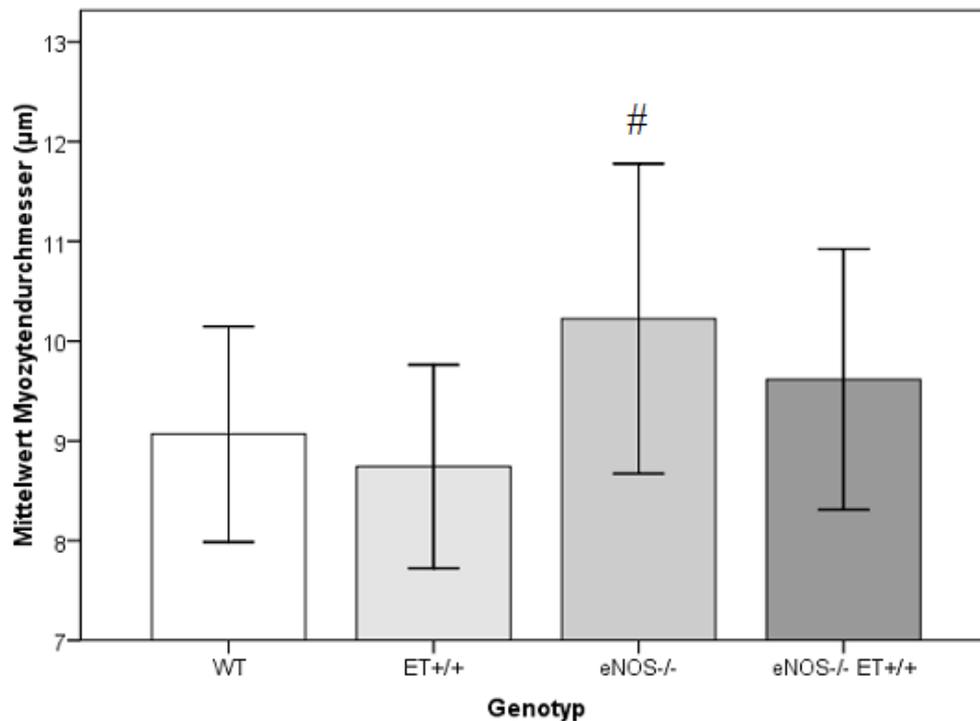


Abbildung 3-4 Kardiomyozytendurchmesser, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: P = 0,008

T-Test: # P < 0,05 vs. WT und ET+/+

Tabelle 3-5 Kardiomyozytendurchmesser, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	Kardiomyozytendurchmesser (µm)
WT	9,067 ± 1,081
ET+/+	8,796 ± 1,004
eNOS-/-	10,225 ± 1,552 #
eNOS-/- ET+/+	9,616 ± 1,307

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 15-20; ANOVA: P = 0,008; T-Test: # P < 0,05 vs. WT und ET+/+

3.2.2 Aufteilung nach Geschlecht

Der Kardiomyozytendurchmesser war bei den männlichen eNOS-/- signifikant höher als bei den männlichen WT. Bei den Weibchen gab es keine signifikanten Unterschiede. Der Kardiomyozytendurchmesser war bei den männlichen ET+/+ gegenüber den weiblichen ET+/+, und den männlichen eNOS-/- signifikant höher gegenüber den weiblichen eNOS-/-.

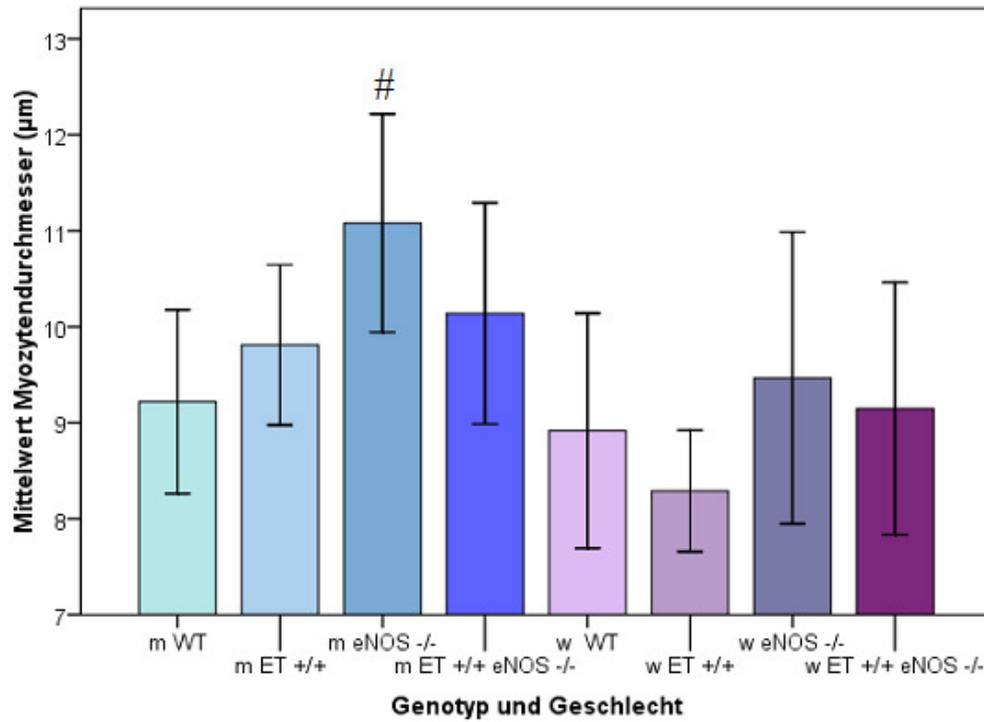


Abbildung 3-5 Kardiomyozytenmesser, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: P = 0,000

T-Test: # P < 0,05 vs. m WT

Tabelle 3-6 Kardiomyozytendurchmesser, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	Kardiomyozytendurchmesser (µm)
m WT	9,219 ± 0,957
m ET+/+	9,811 ± 0,835
m eNOS-/-	11,079 ± 1,137 § #
m eNOS-/- ET+/+	10,137 ± 1,152 §
w WT	8,916 ± 1,224
w ET+/+	8,288 ± 0,632
w eNOS-/-	9,466 ± 1,520
w eNOS-/- ET+/+	9,147 ± 1,313

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 5-10; ANOVA: P = 0,000; T-Test: # P < 0,05 vs. m WT; § P < 0,05 vs. Weibchen mit dem gleichen Genotyp

3.2.3 Interstitielle Fibrose

Der interstitielle Kollagengehalt (interstitielle Fibrose) im Herzgewebe der linken Ventrikelwand und des Septums war bei eNOS^{-/-} ET^{+/+}-Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu allen anderen Gruppen .

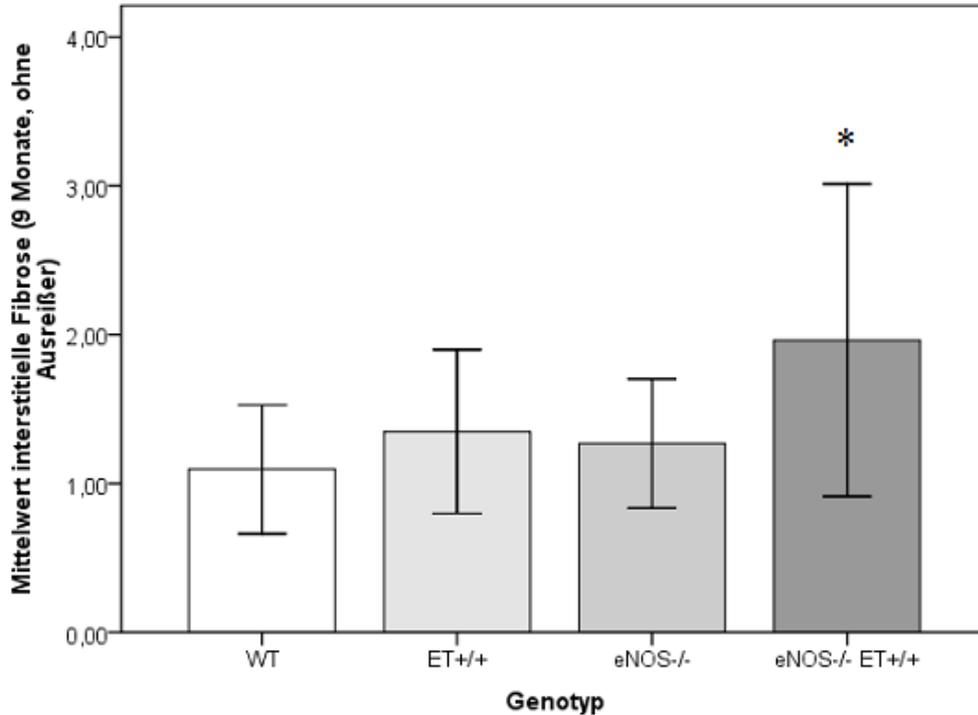


Abbildung 3-6 Interstitielle Fibrose, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P < 0,001$

T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT, ET^{+/+} und eNOS^{-/-}

Tabelle 3-7 Interstitielle Fibrose, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	interstitielle Fibrose (%)
WT	1,10 ± 0,43
ET ^{+/+}	1,35 ± 0,55
eNOS ^{-/-}	1,27 ± 0,43
eNOS ^{-/-} ET ^{+/+}	1,96 ± 1,05 *

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 18-20; ANOVA: $P < 0,001$; T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT, ET^{+/+} und eNOS^{-/-}

3.2.4 Aufteilung nach Geschlecht

Zwischen den männlichen Tieren gab es keine signifikanten Gruppenunterschiede in der interstitiellen Fibrose. Bei den Weibchen war die interstitielle Fibrose bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant erhöht gegenüber den WT und den eNOS^{-/-}. Ein direkter Vergleich zwischen Männchen und Weibchen des gleichen Genotyps ergab keine signifikanten Unterschiede.

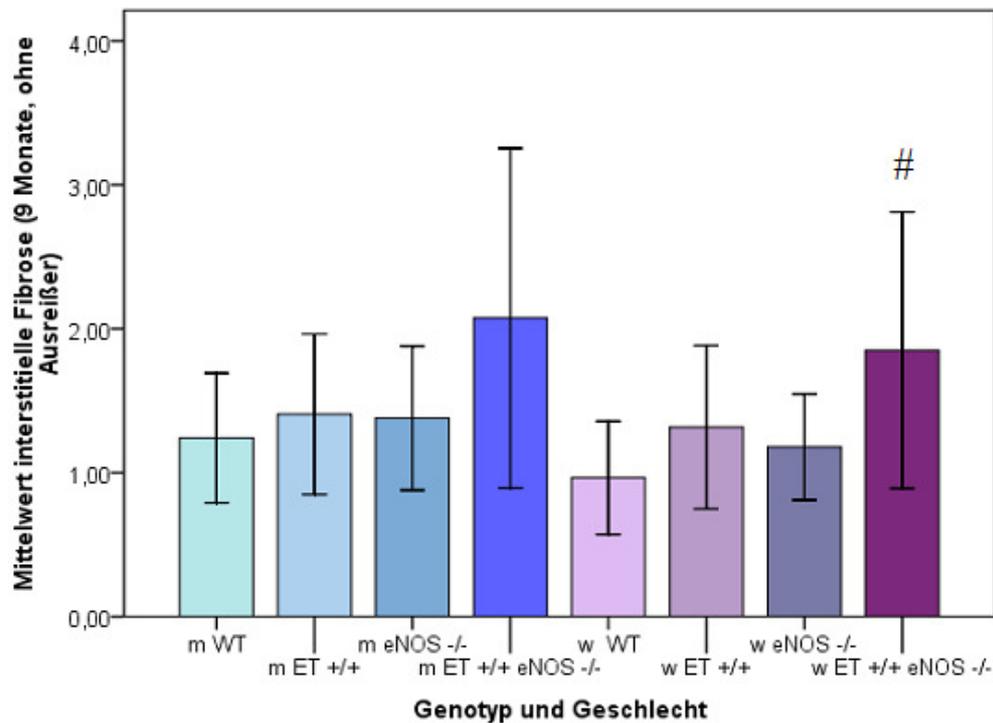


Abbildung 3-7 Interstitielle Fibrose, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P < 0,05$

T-Test: # $P < 0,05$ vs. w WT und w eNOS-/-

Tabelle 3-8 Interstitielle Fibrose, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	interstitielle Fibrose (%)
m WT	1,24 ± 0,45
m ET+/+	1,41 ± 0,56
m eNOS-/-	1,38 ± 0,50
m eNOS-/- ET+/+	2,07 ± 1,18
w WT	0,96 ± 0,39
w ET+/+	1,32 ± 0,57
w eNOS-/-	1,18 ± 0,37
w eNOS-/- ET+/+	1,85 ± 0,96 #

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 7-12; ANOVA: $P < 0,05$; T-Test: # $P < 0,05$ vs. w WT und w eNOS-/-

3.2.5 Media-Lumen-Ratio, Lumenfläche und Mediafläche

Die Media-Lumen-Ratio war bei den ET+/+ und den eNOS-/- ET+/+ -Tieren signifikant niedriger als bei den WT und die Media-Lumen-Ratio war bei den ET+/+ signifikant niedriger gegenüber den eNOS-/- . Die Lumenfläche war bei den ET+/+ und den eNOS-/-

ET+/+ -Tieren signifikant erhöht gegenüber den WT und eNOS-/- . Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Mediafläche.

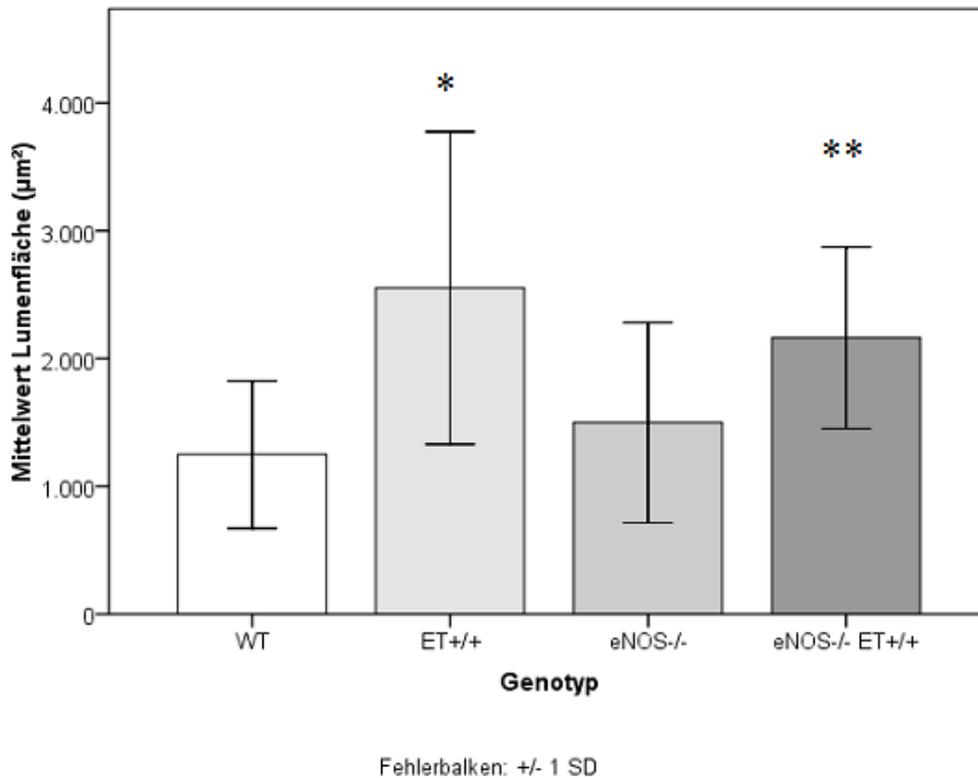


Abbildung 3-8 Lumenfläche, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P < 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/-

** $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/-

Tabelle 3-9 Media-Lumen-Ratio, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	Media-Lumen-Ratio	Lumenfläche (µm ²)	Mediafläche(µm ²)
WT	1,71 ± 0,59	1249 ± 576	1186 ± 471
ET+/+	1,05 ± 0,49 *	2553 ± 1222 *	1753 ± 1056
eNOS-/-	1,50 ± 0,68	1499 ± 783	1433 ± 909
eNOS-/- ET+/+	1,26 ± 0,47 **	2162 ± 711 **	1619 ± 713

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

Media-Lumen-Ratio: n = 16-20; ANOVA: $P = 0,004$; T-Test: ; * $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/-; ** $P < 0,05$ vs. WT

Lumenfläche: n = 15-19; ANOVA: $P = 0,000$; T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/-; ** $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/-

Mediafläche: n = 15-19; keine signifikanten Unterschiede

3.2.6 Aufteilung nach Geschlecht

Die Media-Lumen-Ratio war bei den weiblichen ET+/+ signifikant niedriger als bei den weiblichen WT, weiblichen eNOS-/- und weiblichen eNOS-/- ET+/+ . Die Lumenfläche ist bei den männlichen ET+/+ und eNOS-/- ET+/+ signifikant höher als bei den männlichen WT. Sie war bei den weiblichen ET+/+ signifikant höher als bei den weiblichen WT und eNOS-/-, und sie war bei den weiblichen eNOS-/- ET+/+ signifikant höher als bei den weiblichen eNOS-/-. Die Mediafläche unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen nach Aufteilung nach Geschlecht.

Tabelle 3-10 Media-Lumen-Ratio, Lumenfläche, Mediafläche, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	Media-Lumen-Ratio	Lumenfläche (μm^2)	Mediafläche(μm^2)
m WT	1,51 \pm 0,64	1156 \pm 546	1145 \pm 457
m ET+/+	1,46 \pm 0,51	2737 \pm 1617 *	2163 \pm 1531
m eNOS-/-	1,56 \pm 0,67	1770 \pm 973	1776 \pm 1279
m eNOS-/- ET+/+	1,17 \pm 0,29	2145 \pm 486 **	1675 \pm 620
w WT	1,92 \pm 0,48	1342 \pm 622	1227 \pm 508
w ET+/+	0,77 \pm 0,21 #	2418 \pm 901 #	1424 \pm 334
w eNOS-/-	1,44 \pm 0,72	1288 \pm 571	1165 \pm 375
w eNOS-/- ET+/+	1,36 \pm 0,62	2182 \pm 950 ##	1554 \pm 853

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung;

Media-Lumen-Ratio: n = 7-12; ANOVA: P = 0,001; T-Test: # P < 0,05 vs. w WT, w eNOS-/- und w eNOS-/- ET+/+

Lumenfläche: n = 7-11; ANOVA: P = 0,002; T-Test: ; * P < 0,05 vs. WT; ** P < 0,05 vs. WT; # P < 0,05 vs. WT und eNOS-/-; ## P < 0,05 vs. eNOS-/-

Mediafläche: n = 7-11; keine signifikanten Unterschiede

3.2.7 Perivaskuläre Fibrose

Die perivaskuläre Fibrose war in der ersten Messung (1. Score) im linken Ventrikel bei den ET+/+ signifikant erhöht gegenüber den eNOS-/-. In der zweiten Messung (2. Score) war er bei den ET+/+ signifikant erhöht gegenüber den WT und den eNOS-/-, und sie war bei den eNOS-/- ET+/+ signifikant erhöht gegenüber den WT und den eNOS-/-.

Tabelle 3-11 Perivaskuläre Fibrose, 1. und 2. Score, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	perivaskuläre Fibrose linker Ventrikel (1. Score)	perivaskuläre Fibrose linker Ventrikel (2. Score)
WT	1,91 ± 0,56	1,89 ± 0,26
ET+/+	2,17 ± 0,43 (*)	2,36 ± 0,20 *
eNOS-/-	1,90 ± 0,37	2,10 ± 0,35
eNOS-/- ET+/+	2,27 ± 0,74	2,54 ± 0,61 **

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

perivaskuläre Fibrose linker Ventrikel 1. Score: n = 19-21; ANOVA: kein signifikanter Unterschied; T-Test: (*) P < 0,05 vs. eNOS-/-

perivaskuläre Fibrose linker Ventrikel 2. Score: n = 14-18; ANOVA: P = 0,000; T-Test: * P < 0,05 vs. WT und eNOS-/-; ** P < 0,05 vs. WT und eNOS-/-

3.2.8 Aufteilung nach Geschlecht

In der ersten Messung war die linksventrikuläre perivaskuläre Fibrose signifikant erhöht bei den weiblichen ET+/+ und den weiblichen eNOS-/- ET+/+ gegenüber den weiblichen WT. In der zweiten Messung war die perivaskuläre Fibrose bei den weiblichen ET+/+ und den weiblichen eNOS-/- ET+/+ gegenüber den weiblichen WT auch erhöht. Darüber hinaus war sie bei den männlichen ET+/+ signifikant höher als bei den männlichen WT und den männlichen eNOS-/-, und sie war bei den männlichen eNOS-/- ET+/+ signifikant höher gegenüber den männlichen WT.

Tabelle 3-12 Perivaskuläre Fibrose, 1. und 2. Score, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	perivaskuläre Fibrose linker Ventrikel (1. Score)	perivaskuläre Fibrose linker Ventrikel (2. Score)
m WT	2,11 ± 0,57	1,95 ± 0,15
m ET+/+	1,99 ± 0,40	2,45 ± 0,18 *
m eNOS-/-	1,87 ± 0,37	2,08 ± 0,32
m eNOS-/- ET+/+	2,08 ± 0,61	2,41 ± 0,54 **
w WT	1,70 ± 0,48	1,85 ± 0,33
w ET+/+	2,28 ± 0,43 (#)	2,30 ± 0,20 #
w eNOS-/-	1,93 ± 0,38	2,12 ± 0,39
w eNOS-/- ET+/+	2,43 ± 0,84 (##)	2,67 ± 0,69 ##

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

perivaskuläre Fibrose linker Ventrikel 1. Score: n = 8-10; ANOVA: kein signifikanter Unterschied; T-Test: (#) P < 0,05 vs. w WT; (##) P < 0,05 vs. w WT

perivaskuläre Fibrose linker Ventrikel 2. Score: n = 6-9; ANOVA: P = 0,026; T-Test: * P < 0,05 vs. m WT und m eNOS-/-; ** P < 0,05 vs. m WT; # P < 0,05 vs. w WT; ## P < 0,05 vs. w WT

3.3 Blutdruck und Herzfrequenz

3.3.1 Blutdruck 5+9 Monate alte Tiere

3.3.1.1 Blutdruck systolisch

Es gab keinen signifikanten Unterschied im systolischen Blutdruck zwischen WT und den ET+/+, aber er war signifikant erhöht bei eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+ vs. WT und ET+/+. darüber hinaus war der Blutdruck signifikant erhöht bei eNOS-/- ET+/+ gegenüber eNOS-/-.

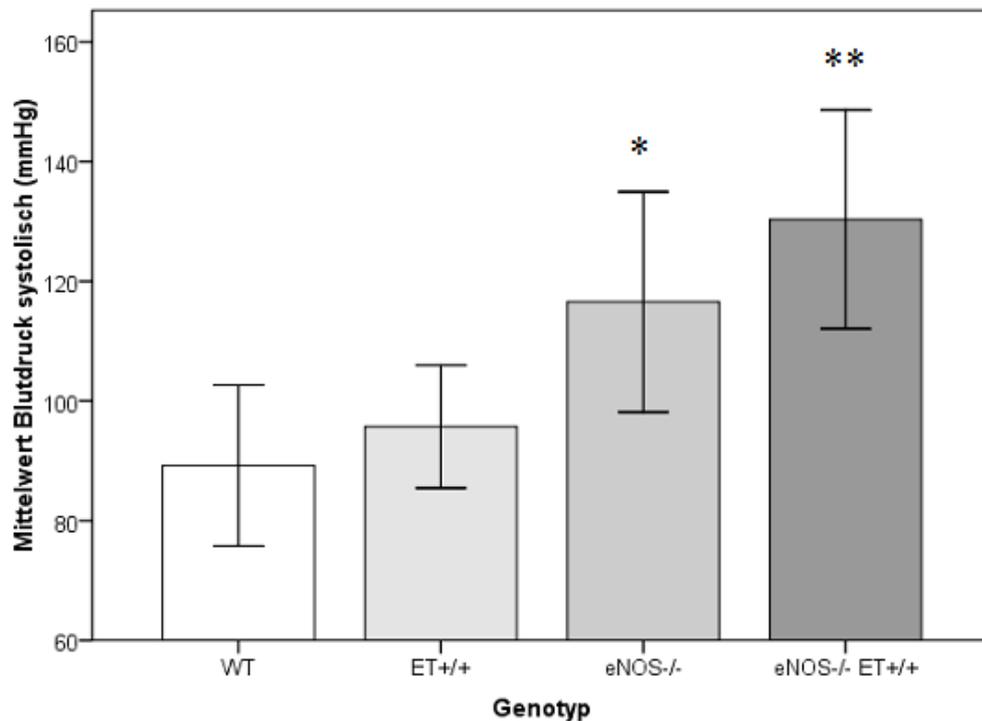


Abbildung 3-9 5+9 Monate alte Tiere, Blutdruck systolisch, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT und ET+/+

** $P < 0,05$ vs. WT, ET+/+ und eNOS

3.3.1.2 Aufteilung nach Geschlecht

Sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen gab es keinen signifikanten Unterschied im systolischen Blutdruck zwischen WT und den ET+/+, aber er war jeweils signifikant erhöht bei eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+ vs. WT und ET+/+. Er war darüber hinaus bei den Weibchen signifikant erhöht bei den eNOS-/- ET+/+ gegenüber den eNOS-/-. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Tieren gleichen Genotyps.

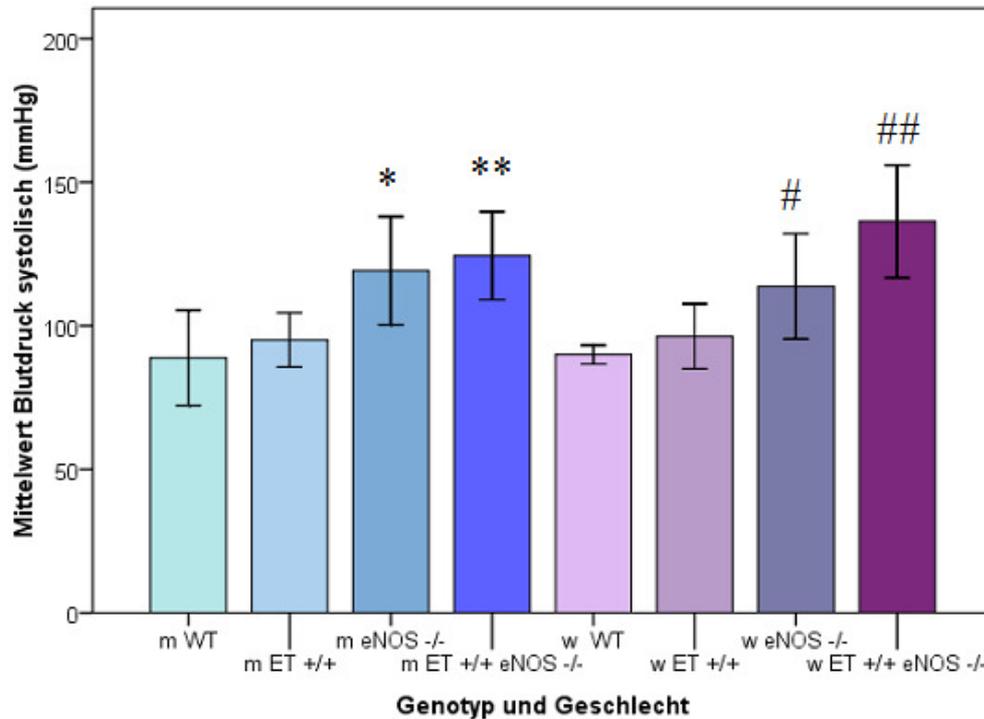


Abbildung 3-10 5+9 Monate alte Tiere, Blutdruck systolisch, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. m WT und m ET+/+

** $P < 0,05$ vs. m WT und m ET+/+

$P < 0,05$ vs. w WT und w ET+/+

$P < 0,05$ vs. w WT, w ET+/+ und w eNOS-/-

3.3.1.3 Blutdruck diastolisch

Es gab keinen signifikanten Unterschied im diastolischen Blutdruck zwischen WT und den ET+/+, aber er war signifikant erhöht bei eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+ vs. WT und ET+/+. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+.

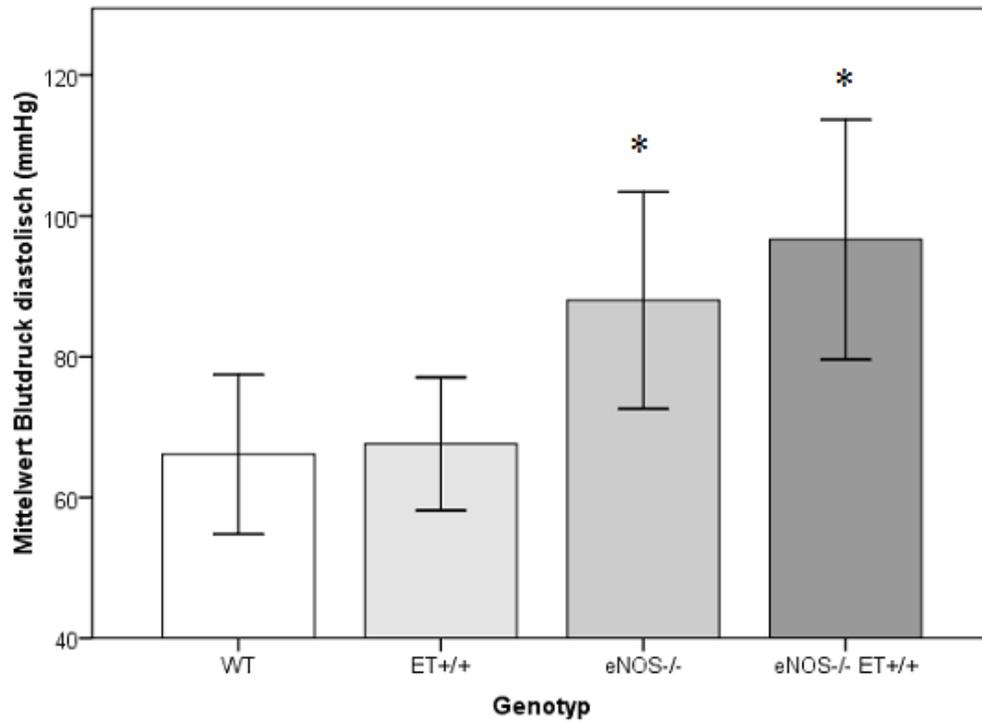


Abbildung 3-11 5+9 Monate alte Tiere, Blutdruck diastolisch, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT und ET+/+

** $P < 0,05$ vs. WT und ET+/+

3.3.1.4 Aufteilung nach Geschlecht

Sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen gab es keinen signifikanten Unterschied im diastolischen Blutdruck zwischen WT und den ET+/+, aber er war jeweils signifikant erhöht bei eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+ vs. WT und ET+/+. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Tieren gleichen Genotyps.

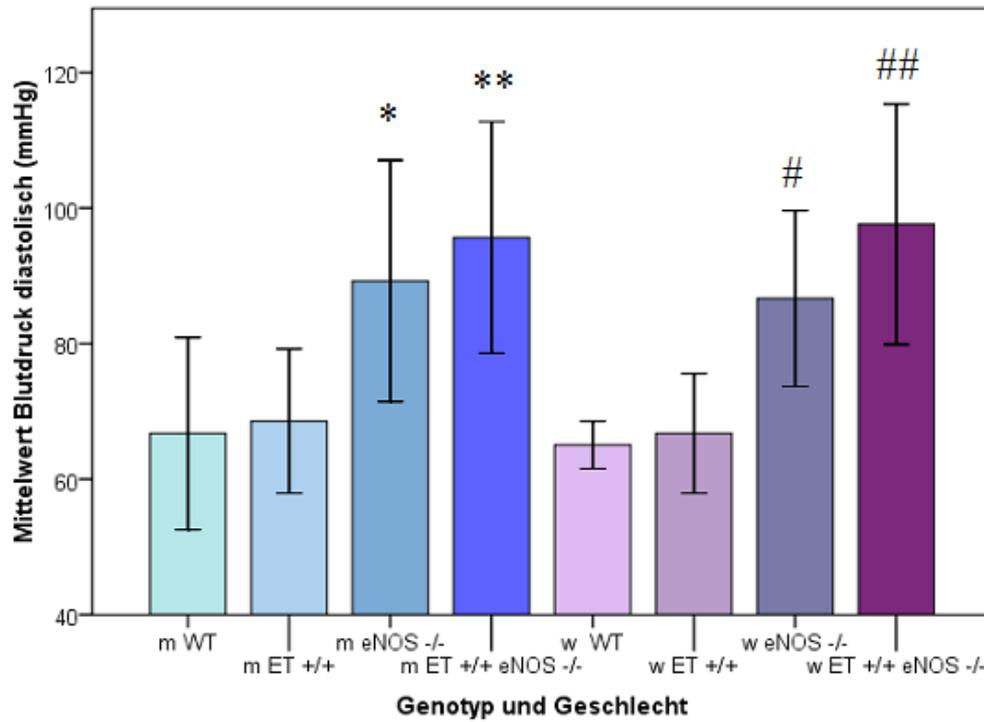


Abbildung 3-12 5+9 Monate alte Tiere, Blutdruck diastolisch, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. m WT und m ET+/+

** $P < 0,05$ vs. m WT und m ET+/+

$P < 0,05$ vs. w WT und w ET+/+

$P < 0,05$ vs. w WT und w ET+/+

3.3.1.5 Herzfrequenz

Bei den ET+/+ war die Herzfrequenz signifikant höher gegenüber allen anderen Gruppen.

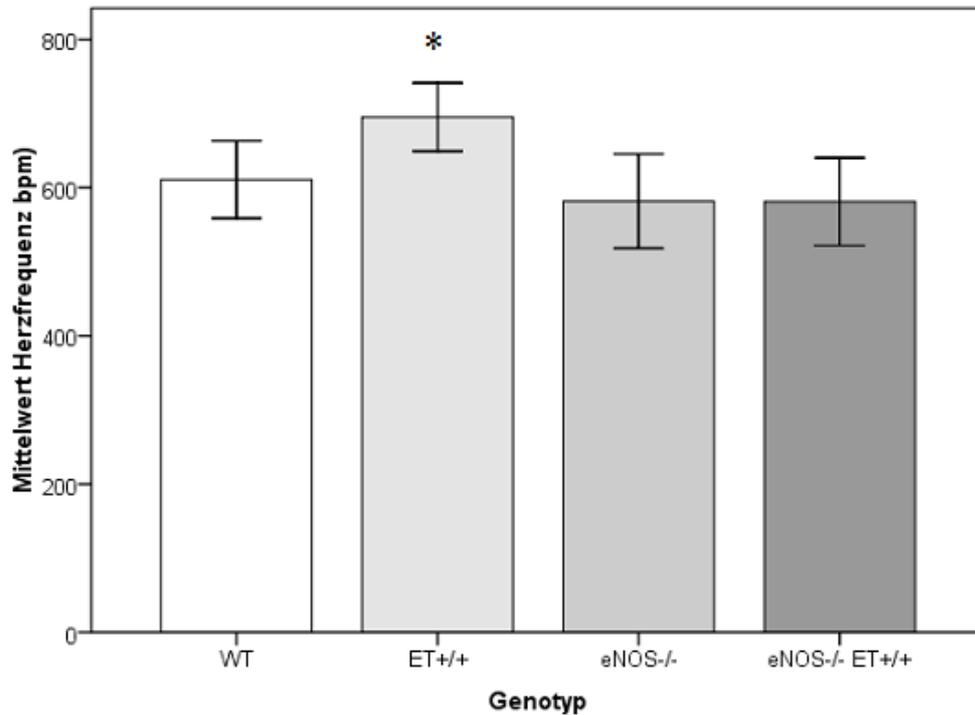


Abbildung 3-13 5+9 Monate alte Tiere, Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT , eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+

3.3.1.6 Aufteilung nach Geschlecht

Bei den Männchen war die Herzfrequenz signifikant höher bei den ET+/+ im Vergleich zu den WT, eNOS-/- und den eNOS-/- ET. Bei den Weibchen war die Herzfrequenz signifikant höher bei den ET+/+ gegenüber den weiblichen WT, eNOS-/- und den eNOS-/- ET+/+. Außerdem war sie bei den weiblichen eNOS-/- ET+/+ signifikant niedriger gegenüber allen anderen weiblichen Gruppen. Der Vergleich zwischen den Geschlechtern ergab, dass bei den männlichen eNOS-/- die Herzfrequenz signifikant niedriger war als bei den weiblichen eNOS-/-.

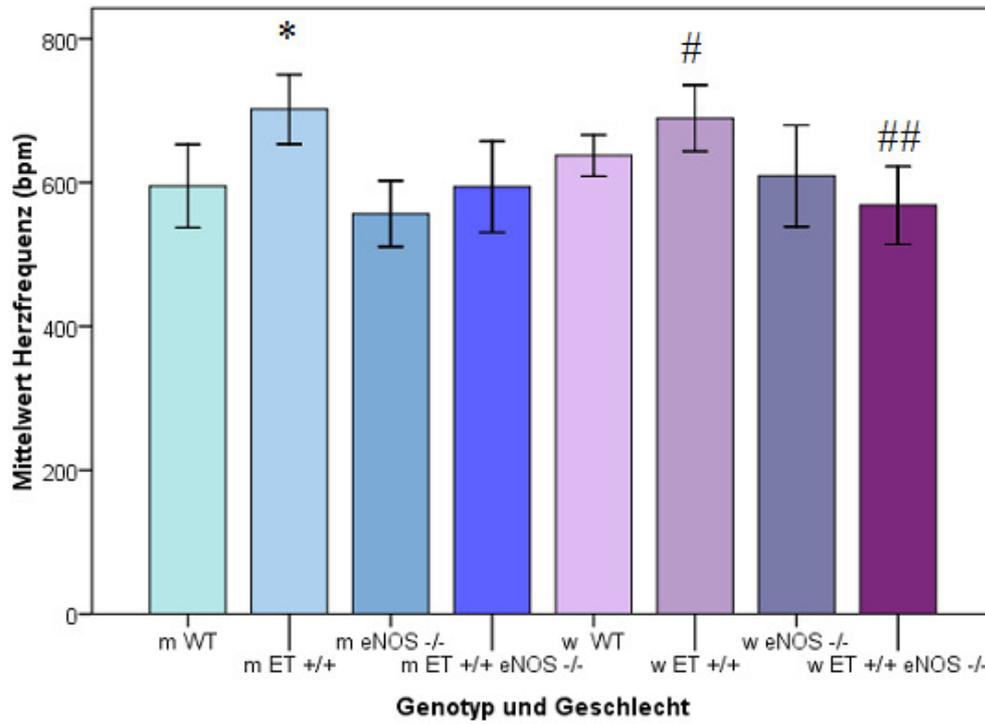


Abbildung 3-14 5+9 Monate alte Tiere, Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. m WT, m eNOS^{-/-} und m eNOS^{-/-} ET^{+/+}

$P < 0,05$ vs. w WT, w eNOS^{-/-} und w eNOS^{-/-} ET^{+/+}

$P < 0,05$ vs. w WT

Tabelle 3-13 5+9 Monate alte Tiere, Systolischer Blutdruck, diastolischer Blutdruck, Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	systolischer Blutdruck 5+9 Monate alte Tiere (mmHg)	diastolischer Blutdruck diastolisch 5+9 Monate alte Tiere (bpm)	Herzfrequenz 5+9 Monate alte Tiere (mmHg/bpm)
WT	89,2 ± 13,4	66,1 ± 11,3	610,8 ± 52,2
ET+/+	95,7 ± 10,2	67,6 ± 9,5	695,5 ± 46,1 *
eNOS-/-	116,5 ± 18,4 *	88,0 ± 15,4 *	581,7 ± 63,6
eNOS-/- ET+/+	130,3 ± 18,3 **	96,6 ± 17,0 **	581,0 ± 59,1

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

systolischer Blutdruck: n = 15-25; ANOVA: P = 0,000 ; T-Test: ; * P < 0,05 vs. WT und ET+/+ ; ** P < 0,05 vs. WT, ET+/+ und eNOS

diastolischer Blutdruck: n = 14-25; ANOVA: P = 0,000; T-Test: * P < 0,05 vs. WT und ET+/+; ** P < 0,05 vs. WT und ET+/+

Herzfrequenz: n = 16-25; ANOVA: P = 0,000; T-Test: * P < 0,05 vs. WT , eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+

Tabelle 3-14 5+9 Monate alte Tiere, Systolischer Blutdruck, diastolischer Blutdruck, Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	systolischer Blutdruck 5+9 Monate alte Tiere (mmHg)	diastolischer Blutdruck diastolisch 5+9 Monate alte Tiere (bpm)	Herzfrequenz 5+9 Monate alte Tiere (mmHg/bpm)
m WT	88,8 ± 16,6	66,7 ± 14,2	594,9 ± 57,7
m ET+/+	95,0 ± 9,5	68,6 ± 10,6	701,6 ± 48,3 *
m eNOS-/-	119,1 ± 18,8 *	89,2 ± 17,8 *	556,6 ± 45,9
m eNOS-/- ET+/+	124,4 ± 15,4 **	95,7 ± 17,1 **	593,9 ± 63,5
w WT	89,9 ± 3,3	65,1 ± 3,5	637,3 ± 28,8
w ET+/+	96,3 ± 11,3	66,8 ± 8,8	689,3 ± 46,2 #
w eNOS-/-	113,7 ± 18,3 #	86,7 ± 13,0 #	609,0 ± 70,5 § ##
w eNOS-/- ET+/+	136,3 ± 19,6 ##	97,6 ± 17,8 ##	568,2 ± 54,2

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

systolischer Blutdruck: n = 5-13; ANOVA: P = 0,000; T-Test: * P < 0,05 vs. m WT und m ET+/+; ** P < 0,05 vs. m WT und m ET+/+; # P < 0,05 vs. w WT und w ET+/+; ## P < 0,05 vs. w WT, w ET+/+ und w eNOS-/-

diastolischer Blutdruck: n = 5-13; ANOVA: P = 0,000; T-Test: * P < 0,05 vs. m WT und m ET+/+; ** P < 0,05 vs. m WT und m ET+/+; # P < 0,05 vs. w WT und w ET+/+; ## P < 0,05 vs. w WT und w ET+/+

Herzfrequenz: n = 6-13; ANOVA: P = 0,000; T-Test: ; * P < 0,05 vs. m WT, m eNOS-/- und m eNOS-/- ET+/+; # P < 0,05 vs. w WT, w eNOS-/- und w eNOS-/- ET+/+; ## P < 0,05 vs. w WT

§ P < 0,05 vs. Männchen mit gleichem Genotyp

3.3.2 Blutdruck 9 Monate alte Tiere

3.3.2.1 Blutdruck systolisch

Es gab keinen signifikanten Unterschied im Blutdruck zwischen WT und den ET+/+, aber er war signifikant erhöht bei eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+ vs. WT und ET+/+. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+.

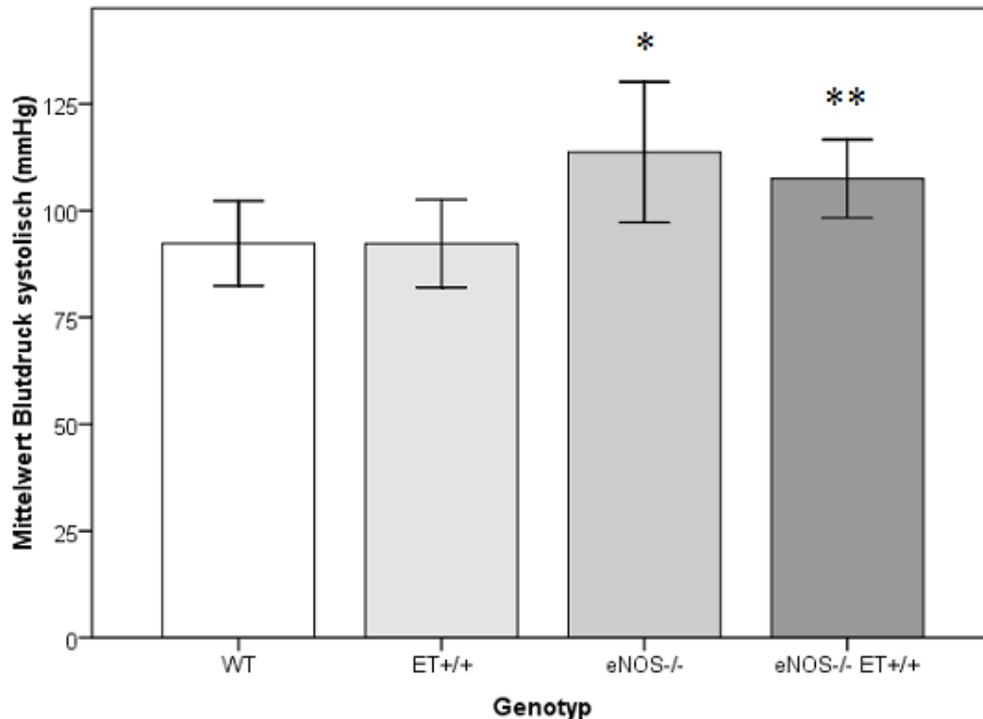


Abbildung 3-15 9 Monate alte Tiere, Blutdruck systolisch, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT und ET+/+

** $P < 0,05$ vs. WT und ET+/+

3.3.2.2 Aufteilung nach Geschlecht

Sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen gab es keinen signifikanten Unterschied im Blutdruck zwischen WT und den ET+/+, aber er war jeweils signifikant erhöht bei eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+ vs. WT und ET+/+. Es gab weder bei den Männchen noch bei den Weibchen keinen signifikanten Unterschied zwischen eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Tieren gleichen Genotyps.

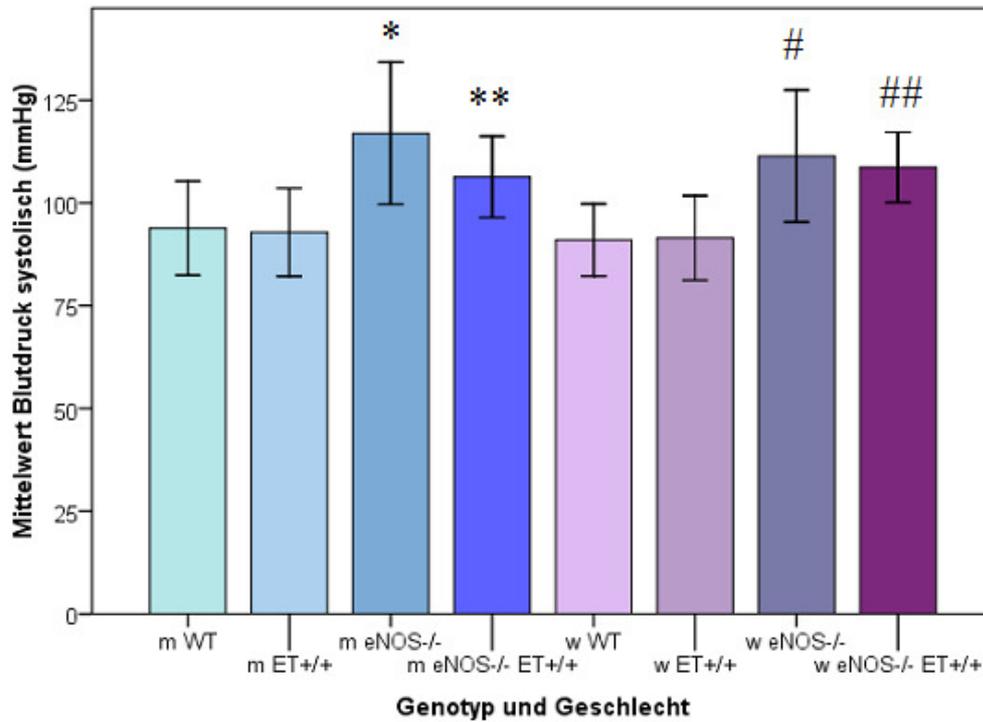


Abbildung 3-16 9 Monate alte Tiere, Blutdruck systolisch, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. m WT und m ET+/+

** $P < 0,05$ vs. m WT und m ET+/+

$P < 0,05$ vs. w WT und w ET+/+

$P < 0,05$ vs. w WT und w ET+/+

3.3.2.3 Herzfrequenz

Bei den ET+/+ war die Herzfrequenz signifikant höher gegenüber allen anderen Gruppen. Die Herzfrequenz war darüber hinaus signifikant niedriger bei eNOS-/- ET+/+ im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

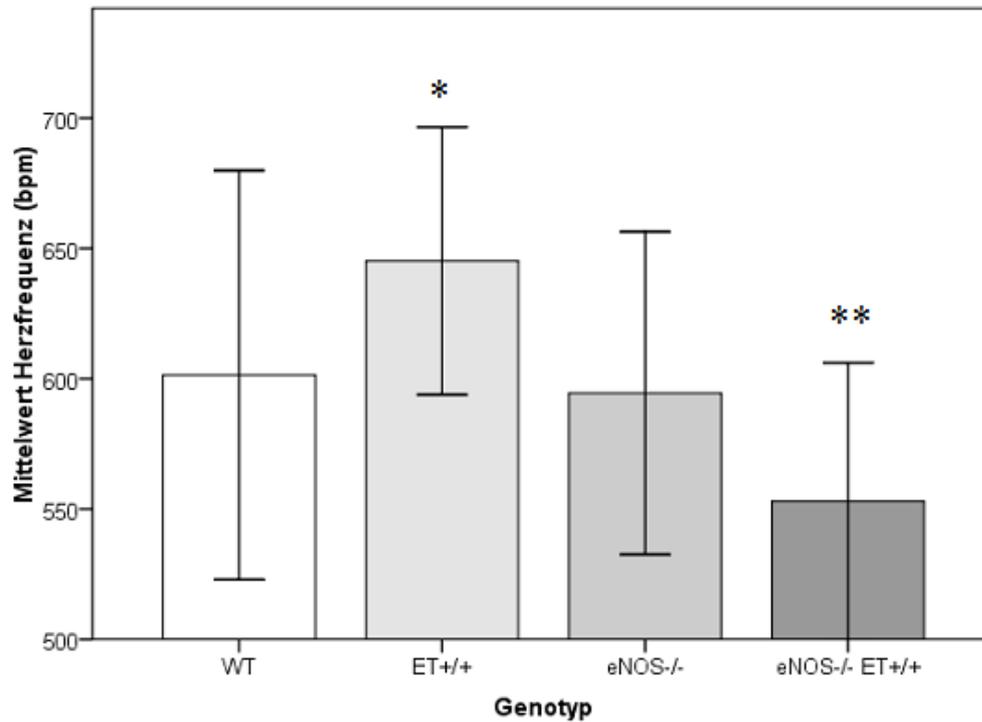


Abbildung 3-17 9 Monate alte Tiere, Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P = 0,000$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT , eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+

** $P < 0,05$ vs. WT , ET+/+ und eNOS-/-

3.3.2.4 Aufteilung nach Geschlecht

Bei den Männchen war die Herzfrequenz signifikant niedriger bei den eNOS-/- ET+/+ im Vergleich zu den eNOS-/- und den ET+/+, aber nicht zu den WT. Bei den Weibchen war die Herzfrequenz signifikant höher bei den ET+/+ gegenüber den weiblichen WT, eNOS-/- und den eNOS-/- ET+/+. Der Vergleich zwischen den Geschlechtern ergab, dass bei den männlichen eNOS-/- die Herzfrequenz signifikant höher war als bei den weiblichen eNOS-/-.

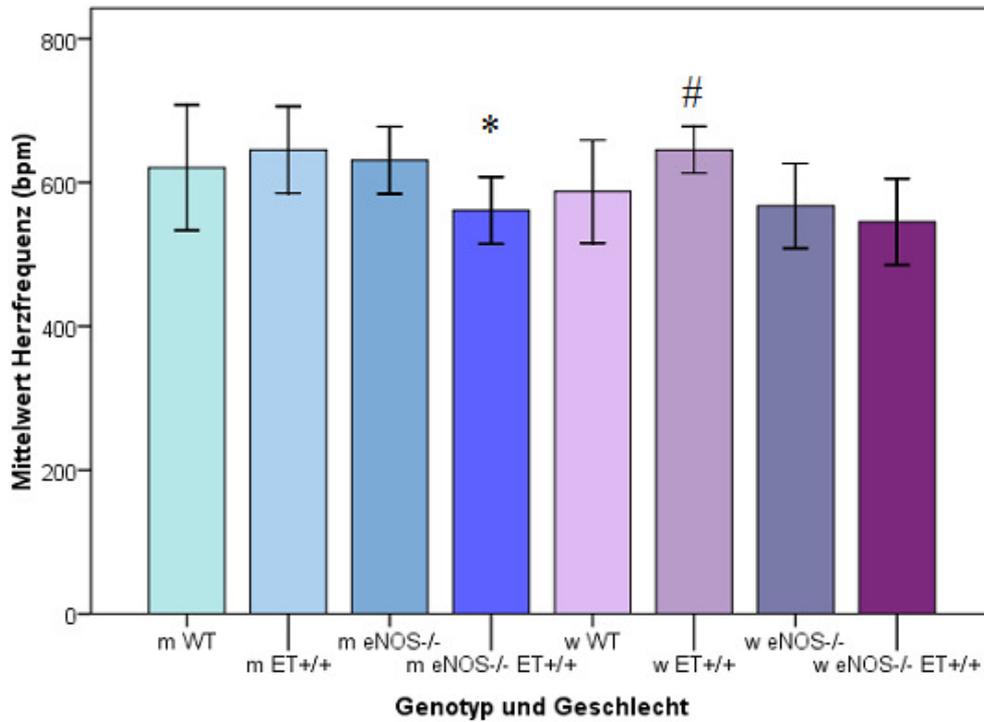


Abbildung 3-18 9 Monate alte Tiere, Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: P = 0,000

T-Test:

* P < 0,05 vs. m ET+/+ und m eNOS-/-

P < 0,05 vs. w WT, w eNOS-/- und w eNOS-/- ET+/+

Tabelle 3-15 9 Monate alte Tiere, Blutdruck und Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	systolischer Blutdruck 9 Monate alte Tiere (mmHg)	Herzfrequenz 9 Monate alte Tiere (mmHg/bpm)
WT	92,3 ± 9,9	601 ± 78
ET+/+	92,3 ± 10,3	645 ± 51 *
eNOS-/-	113,7 ± 16,5 *	595 ± 62
eNOS-/- ET+/+	107,5 ± 9,2 **	553 ± 53 **

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung

systolischer Blutdruck: n = 22-27; ANOVA: P = 0,000 ; T-Test: ; * P < 0,05 vs. WT und ET+/+ ; ** P < 0,05 vs. WT und ET+/+

Herzfrequenz: n = 21-28; ANOVA: P = 0,000; T-Test: * P < 0,05 vs. WT , eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+;

** P < 0,05 vs. WT , ET+/+ und eNOS-/-

Tabelle 3-16 9 Monate alte Tiere, Blutdruck und Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	systolischer Blutdruck 9 Monate alte Tiere (mmHg)	Herzfrequenz 5+9 Monate alte Tiere (mmHg/bpm)
m WT	93,9 ± 11,5	620 ± 87
m ET+/+	92,9 ± 10,7	645 ± 60
m eNOS-/-	116,9 ± 17,3 *	631 ± 47
m eNOS-/- ET+/+	106,3 ± 9,9 **	561 ± 46 *
w WT	91,0 ± 8,8	587 ± 72
w ET+/+	91,5 ± 10,3	645 ± 33 #
w eNOS-/-	111,4 ± 16,1 #	567 ± 59
w eNOS-/- ET+/+	108,7 ± 8,6 ##	545 ± 60

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung

systolischer Blutdruck: n = 10-16; ANOVA: P = 0,000; T-Test: * P < 0,05 vs. m WT und m ET+/+; ** P < 0,05 vs. m WT und m ET+/+; # P < 0,05 vs. w WT und w ET+/+; ## P < 0,05 vs. w WT und w ET+/+

Herzfrequenz: n = 9-16; ANOVA: P = 0,000; T-Test: ; * P < 0,05 vs. m ET+/+ und m eNOS-/-; # P < 0,05 vs. w WT, w eNOS-/- und w eNOS-/- ET+/+

3.4 Herzkatheter

3.4.1 LVP max korrigiert

Obwohl LVP max korrigiert in den eNOS-/- -Mäusen tendenziell erhöht war, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.4.2 nach Genotyp und Geschlecht

Es gab im LVP max korrigiert weder zwischen den verschiedenen Genotypen innerhalb eines Geschlechts signifikante Unterschiede, noch zwischen den Geschlechtern beim Vergleich des jeweils selben Genotyps, obwohl auch hier bei den männlichen eNOS-/- die Werte tendenziell höher waren.

3.4.3 LVP min diastolisch

Der linksventrikuläre minimale diastolische Druck LVP min diastolisch war bei den eNOS-/- signifikant höher gegenüber WT und eNOS-/- ET+/+, aber nicht gegenüber ET+/+.

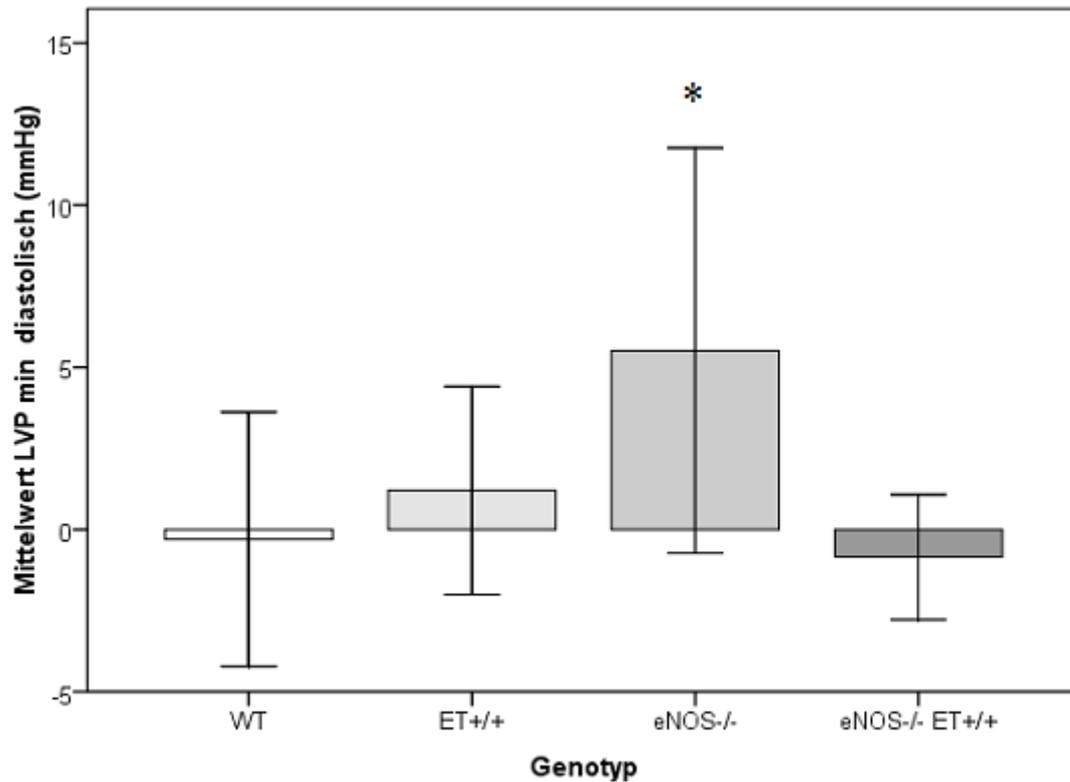


Abbildung 3-19 LVP min, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P = 0,002$

T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/- ET+/+

3.4.4 nach Genotyp und Geschlecht

Bei den Männchen war LVP min diastolisch bei den eNOS-/- signifikant höher gegenüber WT und eNOS-/- ET+/+, aber nicht gegenüber ET+/+. Bei den Weibchen war LVP min diastolisch bei den eNOS-/- signifikant höher gegenüber WT, aber nicht gegenüber ET+/+ und eNOS-/- ET+/+. Darüber hinaus war LVP min diastolisch bei den eNOS-/-Männchen signifikant höher als bei den eNOS-/- Weibchen.

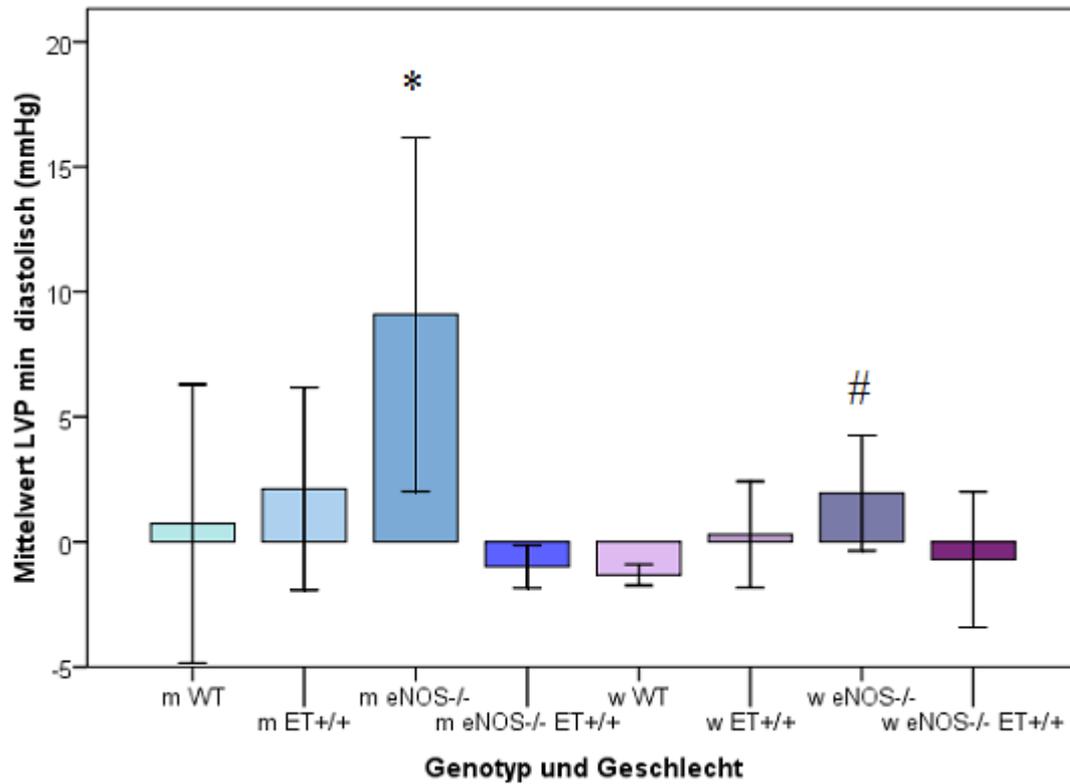


Abbildung 3-20 LVP min, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P = 0,001$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. m WT, m eNOS-/- ET+/+ und w eNOS-/-

$P < 0,05$ vs. w WT

3.4.5 LVEDP korrigiert

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck LVEDP korrigiert war bei den eNOS-/- signifikant höher gegenüber allen anderen Gruppen.

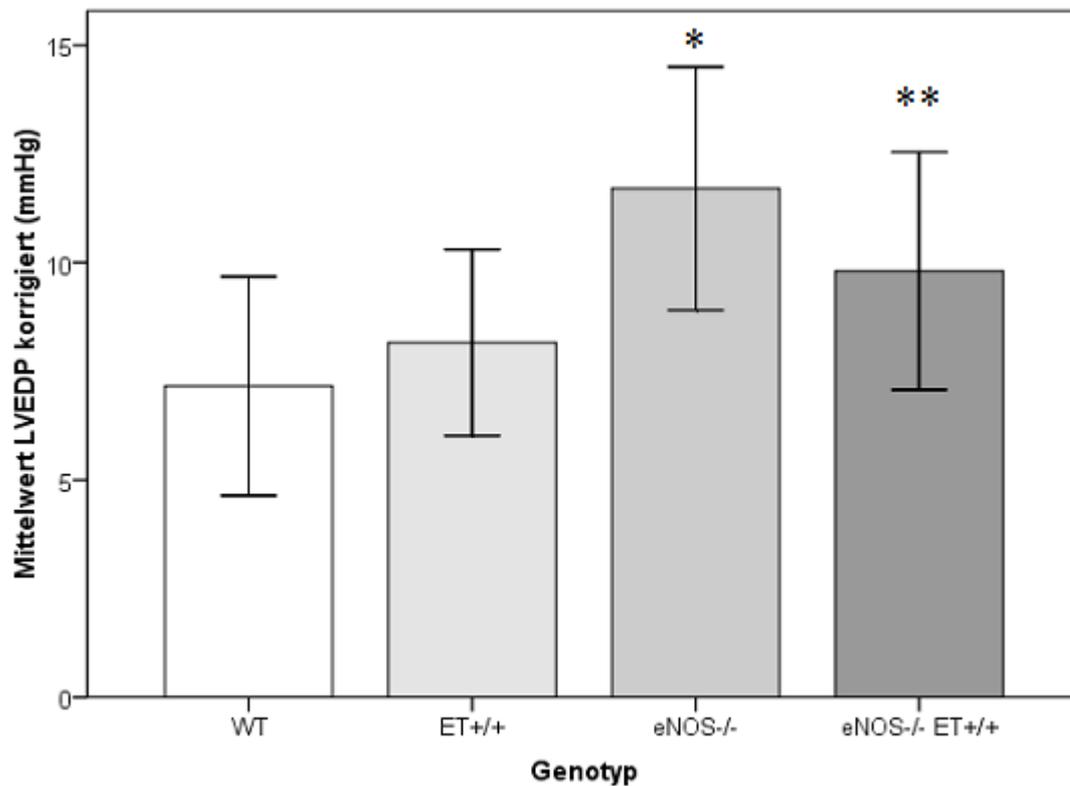


Abbildung 3-21 LVEDP korrigiert, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P = 0,001$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT und ET+/+

** $P < 0,05$ vs. WT

3.4.6 nach Genotyp und Geschlecht

Bei den Männchen war der LVEDP korrigiert bei den eNOS-/- signifikant höher gegenüber allen anderen Genotypen. Bei den Weibchen war LVEDP korrigiert bei den eNOS-/- signifikant höher gegenüber WT und ET+/+, aber nicht gegenüber eNOS-/- ET+/+. Darüber hinaus war LVEDP korrigiert bei den eNOS-/-Männchen signifikant höher als bei den eNOS-/- Weibchen.

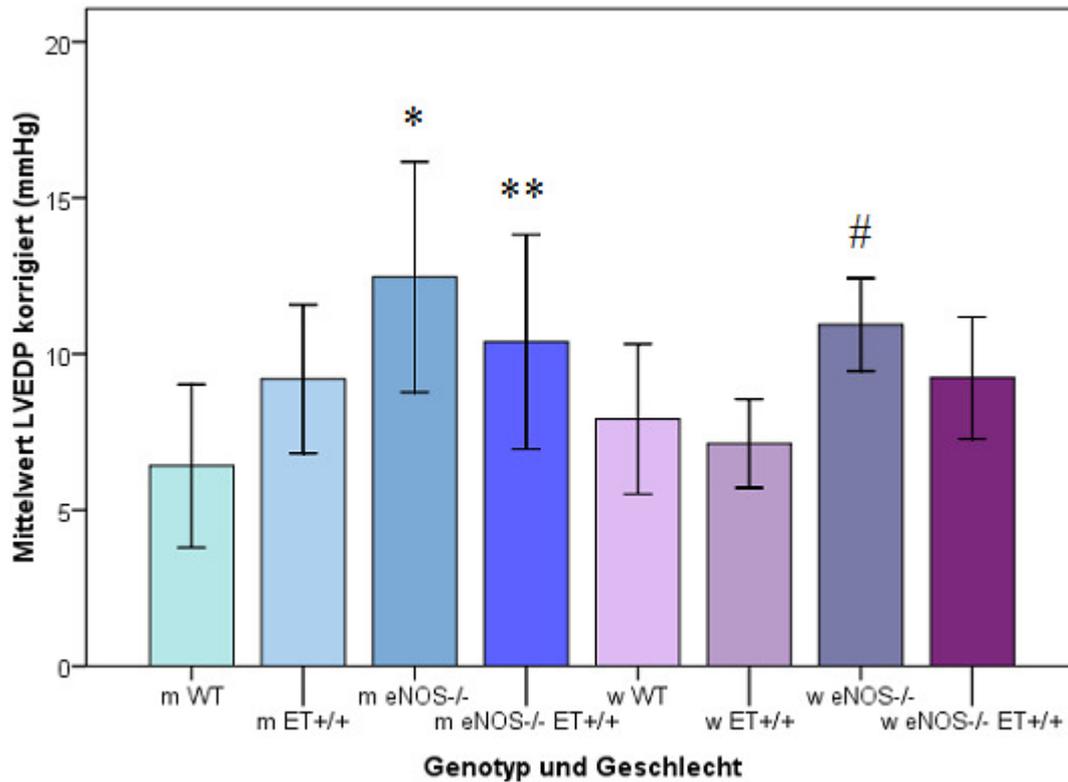


Abbildung 3-22 LVEDP korrigiert, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P = 0,004$

* $P < 0,05$ vs. m WT

** $P < 0,05$ vs. m WT

$P < 0,05$ vs. w WT und w ET+/+

Tabelle 3-17 LVP max korrigiert, LVP min, LVEDP korrigiert, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	LVP max korrigiert (mmHg)	LVP min (mmHg)	LVEDP korrigiert (mmHg)
WT	105 ± 19	$-0,30 \pm 3,92$	$7,16 \pm 2,52$
ET+/+	108 ± 14	$1,21 \pm 3,20$	$8,16 \pm 2,14$
eNOS-/-	118 ± 22	$5,52 \pm 6,25$	$11,70 \pm 2,80$
eNOS-/- ET+/+	108 ± 13	$-0,85 \pm 1,93$	$9,81 \pm 2,73$

angegebene Werte: Mittelwerte \pm Standardabweichung

LVP max korrigiert: 10-12; keine signifikanten Unterschiede

LVP min : n = 10-12; ANOVA: $P = 0,002$; T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT und eNOS-/- ET+/+

LVEDP korrigiert: n = 10-12; ANOVA: $P = 0,001$; T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT und ET+/+; ** $P < 0,05$ vs. WT

Tabelle 3-18 LVP max korrigiert, LVP min, LVEDP korrigiert, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	LVP max korrigiert (mmHg)	LVP min (mmHg)	LVEDP korrigiert (mmHg)
m WT	104 ± 28	0,73 ± 5,57	6,41 ± 2,61
m ET+/-	115 ± 15	2,12 ± 4,06	9,19 ± 2,38
m eNOS-/-	124 ± 29	9,09 ± 7,07 §	12,46 ± 3,69
m eNOS-/- ET+/-	109 ± 14	-0,99 ± 0,86	10,38 ± 3,44
w WT	107 ± 7	-1,32 ± 0,42	7,91 ± 2,40
w ET+/-	101 ± 9	0,29 ± 2,13	7,13 ± 1,41
w eNOS-/-	112 ± 10	1,95 ± 2,30	10,94 ± 1,49
w eNOS-/- ET+/-	107 ± 13	-0,70 ± 2,72	9,24 ± 1,95

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

LVP sys korrigiert: n = 5-6; keine signifikanten Unterschiede

LVP dias : n = 5-6; ANOVA: P = 0,001 ; T-Test: * P < 0,05 vs. m WT, m eNOS-/- ET+/- und w eNOS-/- ; # P < 0,05 vs. w WT; § P < 0,05 vs. Weibchen mit gleichem Genotyp

LVEDP korrigiert: n = 5-6; ANOVA: P = 0,004; T-Test: * P < 0,05 vs. m WT; ** P < 0,05 vs. m WT; # P < 0,05 vs. w WT und w ET+/-

3.4.7 dPTdt max

Es gab für dPdt max keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.4.8 nach Genotyp und Geschlecht

Es gab für dPdt max weder zwischen den verschiedenen Genotypen innerhalb eines Geschlechts signifikante Unterschiede, noch zwischen den Geschlechtern beim Vergleich des jeweils selben Genotyps.

3.4.9 dPdt min

Die minimale Druckerhöhungsgeschwindigkeit dPdt min war bei den eNOS-/- signifikant niedriger gegenüber allen anderen Gruppen.

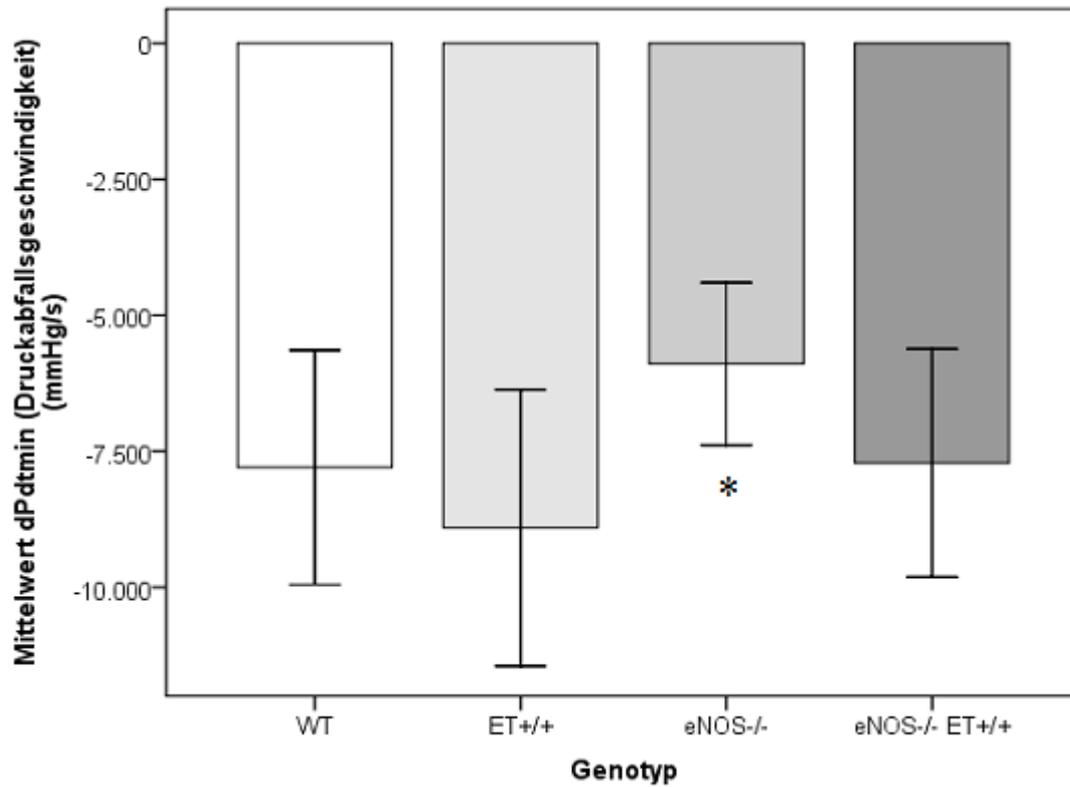


Abbildung 3-23 dpdt min, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P = 0,013$

T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT, ET+/+ und eNOS-/- ET+/+

3.4.10 Genotyp und Geschlecht

Bei den weiblichen eNOS-/- war die minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit dpdt min bei signifikant niedriger gegenüber den weiblichen WT und eNOS-/- ET+/+. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen desselben Genotyps.

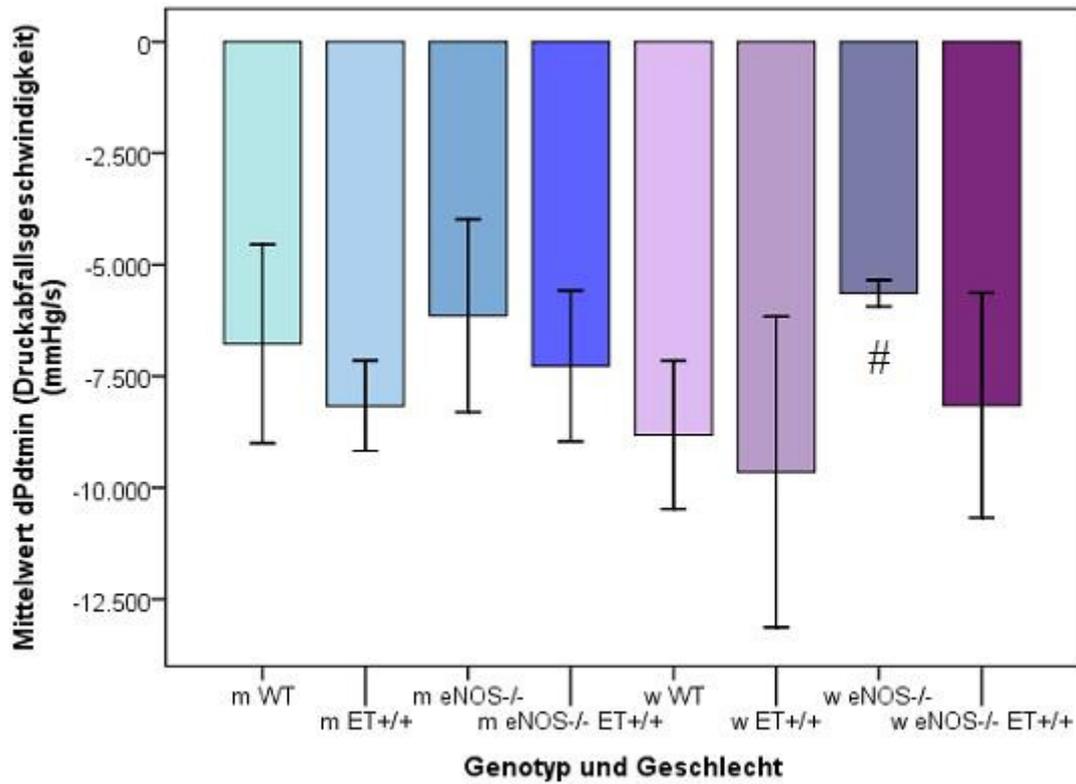


Abbildung 3-24 dpdt min, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P = 0,034$

T-Test:

$P < 0,05$ vs. w WT und w eNOS-/- ET+/+

3.4.11 Tau

Die Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls Tau ist bei den eNOS-/- signifikant erhöht gegenüber allen anderen Gruppen. Darüber hinaus ist sie bei den ET+/+ signifikant niedriger gegenüber allen anderen Gruppen.

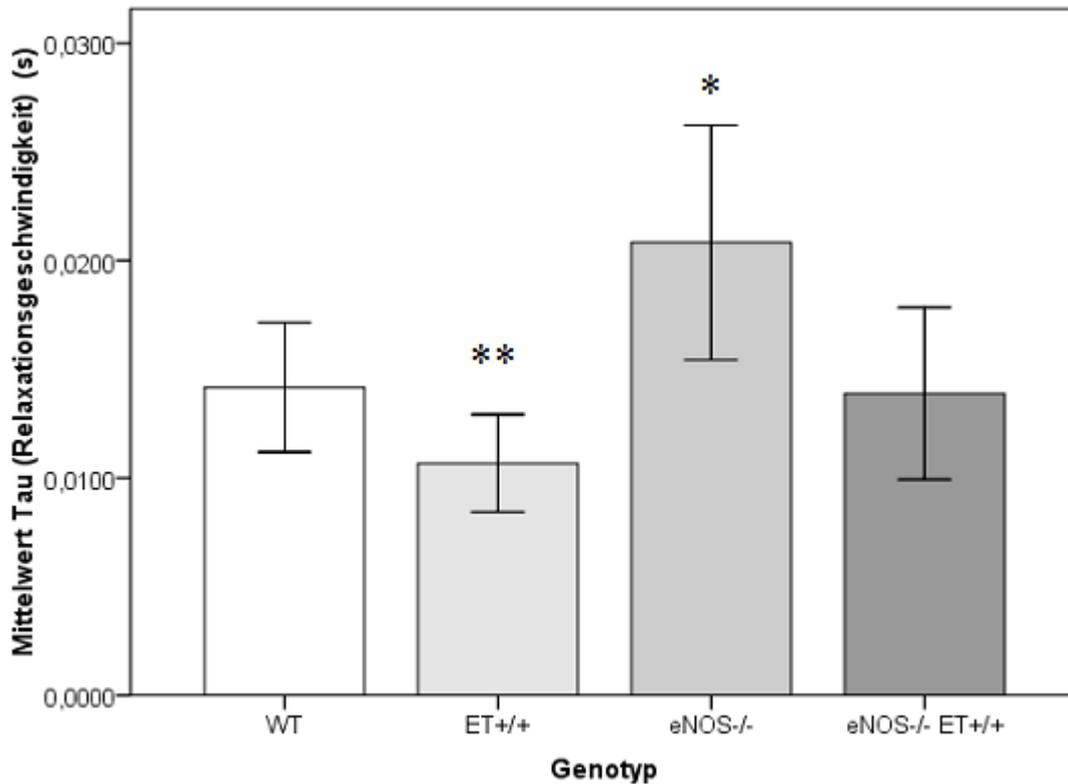


Abbildung 3-25 Tau, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: $P < 0,001$

T-Test:

* $P < 0,05$ vs. WT, ET+/+ und eNOS-/- ET+/+

** $P < 0,05$ vs. WT, eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+

3.4.12 nach Genotyp und Geschlecht

Bei den weiblichen eNOS-/- ist Tau signifikant höher gegenüber den weiblichen WT, ET+/+ und eNOS-/- ET+/+. Bei den weiblichen ET+/+ ist Tau nur tendenziell niedriger als bei allen anderen Gruppen. Bei den Männchen ist Tau dagegen signifikant niedriger bei den ET+/+ versus WT und eNOS-/-, aber nicht eNOS-/- ET+/+, dafür ist Tau bei den eNOS-/- nur tendenziell höher als bei allen anderen Gruppen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen desselben Genotyps.

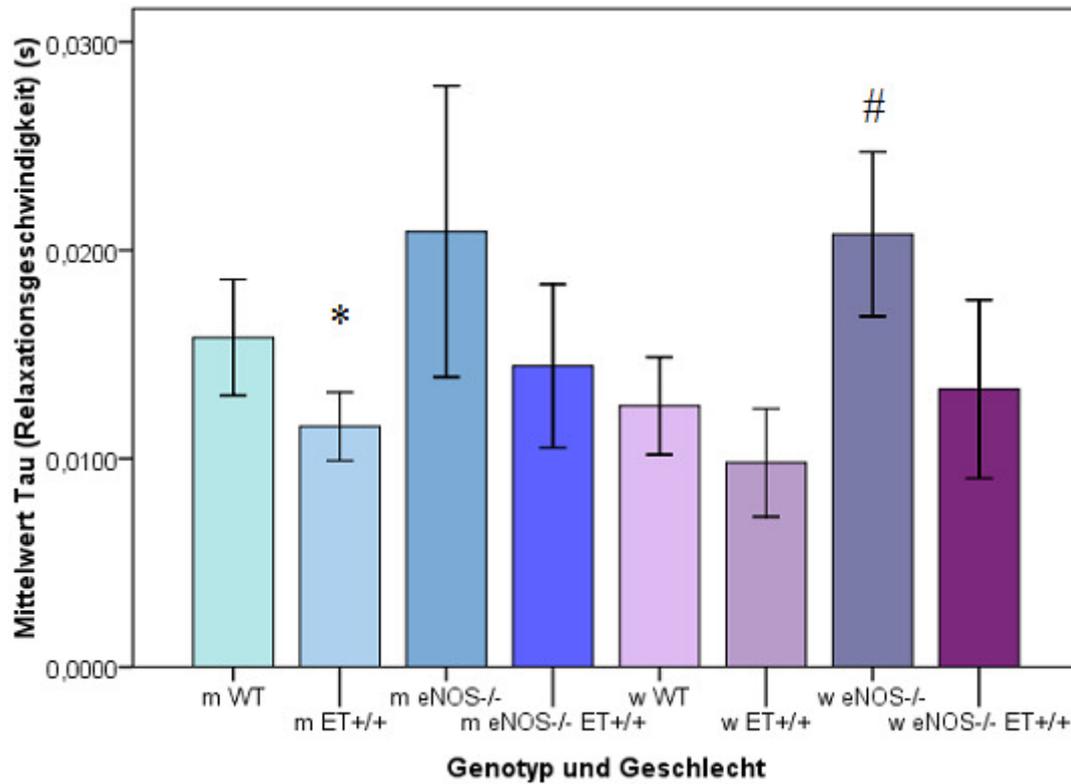


Abbildung 3-26 Tau, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

ANOVA: $P < 0,001$

* $P < 0,05$ vs. m WT und m eNOS-/-

$P < 0,05$ vs. w WT, w ET+/+ und w eNOS-/- ET+/+

Tabelle 3-19 dpdt max, dpdt min, Tau, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	dPdt max (mmHg/s)	dPdt min (mmHg/s)	Tau (s)
WT	6734 ± 1851	-7795 ± 2155	0,014 ± 0,003
ET+/+	7986 ± 1576	-8905 ± 2542	0,011 ± 0,002 **
eNOS-/-	6096 ± 1402	-5892 ± 1495 *	0,021 ± 0,005 *
eNOS-/- ET+/+	7076 ± 1546	-7714 ± 2098	0,014 ± 0,004

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

dPdt max: n = 10-12; keine signifikanten Unterschiede

dPdt min: n = 10-12; ANOVA: $P = 0,013$; T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT, ET+/+ und eNOS-/- ET+/+

Tau: n = 10-12; ANOVA: $P < 0,001$; T-Test: * $P < 0,05$ vs. WT, ET+/+ und eNOS-/- ET+/+ ; ** $P < 0,05$ vs. WT, eNOS-/- und eNOS-/- ET+/+

Tabelle 3-20 dpdt max, dpdt min, Tau, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	dPdt max (mmHg/s)	dPdt min (mmHg/s)	Tau (s)
WT	5991 ± 1869	-6774 ± 2228	0,016 ± 0,003
m ET+/+	8110 ± 1320	-8166 ± 1014	0,012 ± 0,002 *
m eNOS-/-	6542 ± 1941	-6145 ± 2162	0,021 ± 0,007
m eNOS-/- ET+/+	6858 ± 1261	-7272 ± 1694	0,014 ± 0,004
w WT	7477 ± 1649	-8816 ± 1658	0,013 ± 0,002
w ET+/+	7861 ± 1952	-9644 ± 3485	0,010 ± 0,003
w eNOS-/-	5651 ± 286	-5640 ± 297 #	0,021 ± 0,004 #
w eNOS-/- ET+/+	7294 ± 1885	-8156 ± 2519	0,013 ± 0,004

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung;

dPdt max: n = 5-6; keine signifikanten Unterschiede

dPdt min: n = 5-6; ANOVA: P = 0,034; T-Test:; # P < 0,05 vs. w WT und w eNOS-/- ET+/+

Tau: n = 5-6; ANOVA: P < 0,001; T-Test: * P < 0,05 vs. m WT und m eNOS-/- # P < 0,05 vs. w WT, w ET+/+ und w eNOS-/- ET+/+

3.4.13 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz ist bei den ET+/+ signifikant höher gegenüber den WT und den eNOS-/-, jedoch nicht gegenüber den eNOS-/- ET+/+.

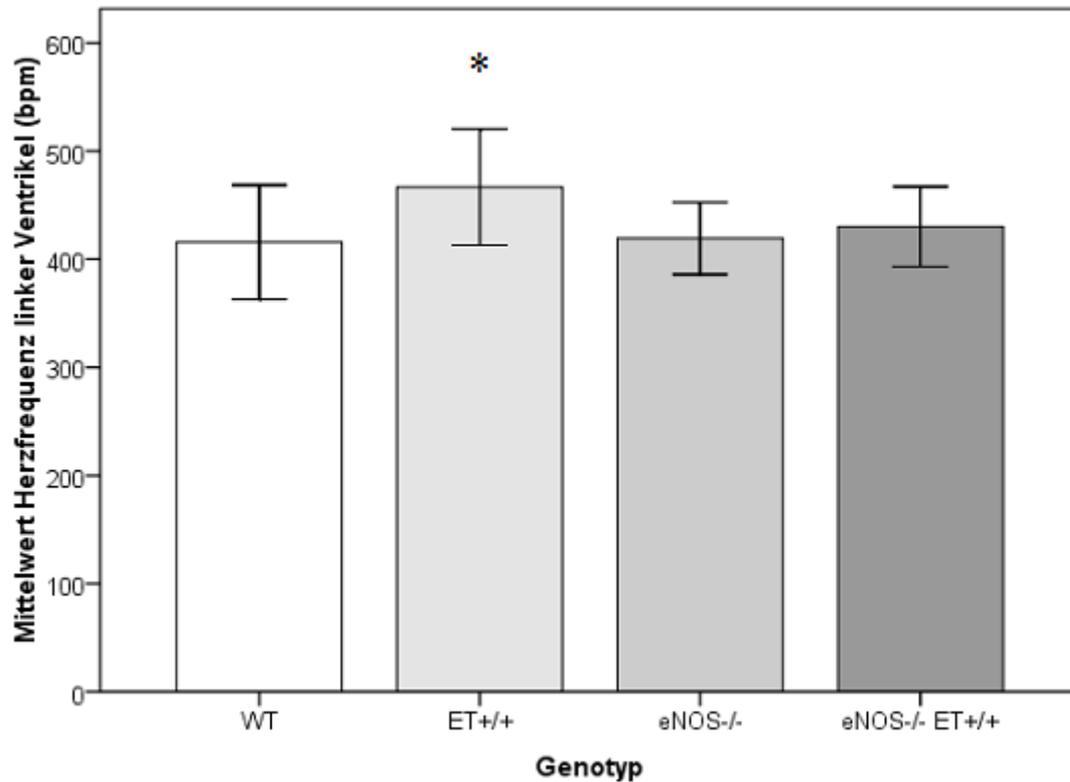


Abbildung 3-27 Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp

ANOVA: P = 0,048

T-Test:

* P < 0,05 vs. WT und eNOS-/-

3.4.14 Aufteilung nach Geschlecht

Bei den Männchen ist die Herzfrequenz bei den WT signifikant niedriger gegenüber allen anderen männlichen Gruppen. Bei den Weibchen ist die Herzfrequenz bei den ET+/+ signifikant höher gegenüber den weiblichen eNOS-/-.

Der Vergleich der Geschlechter ergab, dass die Herzfrequenz bei den männlichen eNOS-/- signifikant höher ist als bei den weiblichen eNOS-/-.

Tabelle 3-21 Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp

Genotyp	Herzfrequenz (bpm)
WT	416 ± 53
ET+/+	467 ± 54 *
eNOS-/-	419 ± 33
eNOS-/- ET+/+	430 ± 37

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 10-12; ANOVA: P = 0,048; T-Test: * P < 0,05 vs. WT und eNOS-/-

Tabelle 3-22 Herzfrequenz, Aufteilung nach Genotyp und Geschlecht

Genotyp	dPdt max (mmHg/s)
WT	390 ± 34 *
m ET+/+	454 ± 32
m eNOS-/-	439 ± 22
m eNOS-/- ET+/+	440 ± 33
w WT	442 ± 58
w ET+/+	479 ± 71 #
w eNOS-/-	399 ± 32 §
w eNOS-/- ET+/+	420 ± 42

angegebene Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung; n = 5-6; ANOVA: P = 0,026; T-Test: * P < 0,05 vs. m ET+/+, m eNOS-/- und m eNOS-/- ET+/+; # P < 0,05 vs. w eNOS-/-; § P < 0,05 vs. Weibchen mit gleichem Genotyp

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Interaktion des Endothelin- und NO-Systems analysiert werden. Es wurde tierexperimentell untersucht, ob die chronische Überexpression von humanem ET-1 und das gleichzeitige Fehlen von NO, welches durch die eNOS gebildet wird, zu einer Erhöhung des Blutdrucks führen. Es sollte weiterhin geklärt werden, ob morphologische Veränderungen im Herzgewebe und an den Gefäßen (am Beispiel der Koronargefäße) entstehen. Weiterhin sollte geklärt werden, ob dies zu einer veränderten Herzfunktion führt. Außerdem sollte durch den direkten Vergleich mit nur human-ET-1-transgenen Tieren und nur eNOS-knockout-Tieren differenziert werden, welche Schäden allein durch ET-1-Überexpression, durch einen eNOS-Knockout oder durch das Zusammentreffen beider Faktoren entstehen.

4.1 Blutdrücke der 5+9 Monate alten Tiere

Die erste Messung des Blutdrucks erfolgte an einer Mäuseserie, die sowohl 5 als auch 9 Monate alte Mäuse einschloss (5+9 Monate alt). Es zeigte sich, dass der systolische Blutdruck bei den eNOS^{-/-} und den eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant höher war gegenüber ET^{+/+} und WT-Tieren, und darüber hinaus war der Blutdruck bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} zusätzlich signifikant höher gegenüber den eNOS^{-/-}. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern, deshalb können die Daten zusammengefasst werden. Hier zeigt sich, dass ein eNOS-knockout zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt. Dies deckt sich mit der Literatur^{62, 106}. Die zusätzliche Blutdrucksteigerung bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} zeigt, dass eine ET-1-NO-Imbalance zu einer weiteren Blutdruckerhöhung führt. Die ET-NO-Interaktion ist somit ein wichtiger Bestandteil der lokalen Blutdruckregulation in den Gefäßen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das NO, welches im Gefäß die Balance zu ET-1 herstellt, im wesentlichen von der eNOS gebildet wird.

Ferner zeigt sich auch in dieser Studie keine Erhöhung des systolischen Blutdrucks bei ET^{+/+}, was sich mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe mit human-ET-1-transgenen NMRI-Mäusen deckt⁷⁶. Bei human-ET-1-transgenen Mäusen mehrerer von uns unabhängigen Arbeitsgruppen und ET-2-transgenen-Ratten zeigte sich auch kein erhöhter Blutdruck^{77, 150, 151}.

Der Blutdruck wurde in diesen Modellen vermutlich durch NO wieder gesenkt, was in unseren eNOS^{-/-}-ET^{+/+}-Mäusen nicht möglich war. Dies hatte zur Folge, dass der Blutdruck stärker anstieg als bei Tieren mit eNOS-Knockout allein.

4.2 Blutdruck der 9 Monate alten Tiere

Im Alter von neun Monaten war der systolische Blutdruck zwar bei eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant höher gegenüber WT und ET^{+/+}, aber es konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden zwischen eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+}, obwohl dies bei den Daten der 5+9 Monate alten Tieren der Fall war. Es ist möglich, dass sich die eNOS-induzierte Blutdruckerhöhung mit steigendem Alter stärker manifestiert und so die ET-Überexpression keinen relevanten zusätzlichen Effekt auf den Blutdruck mehr hat. Möglich ist auch, dass es zu dilatativen Veränderungen der Gefäßmorphologie gekommen ist. Wie noch genauer beschrieben werden soll (siehe Kapitel 4.3), haben eNOS^{-/-} ET^{+/+} eine signifikant höhere Lumenfläche der koronaren Gefäße gegenüber den WT. Diese Lumenvergrößerung ist vermutlich blutdruckunabhängig, denn die ET^{+/+} weisen sie auch auf, aber diese Tiere haben keinen höheren Blutdruck als die WT. Wenn die Lumenvergrößerung in den Gefäßen des gesamten Organismus vorliegt, könnte sie möglicherweise den Blutdruck der eNOS^{-/-} ET^{+/+} senken. Um diese Frage genauer zu klären, sind weitere Blutdruckmessungen und die Bestimmung der Gefäßmorphologie an fünf Monate alten Tieren und ggf. jüngeren Tieren notwendig sowie eine Weiterverfolgung des Blutdrucks bei älteren Tieren.

Als weiterer Grund dafür, dass die Blutdruckergebnisse der 5+9 Monate alten Tiere nicht reproduziert werden konnten, kommt auch ein Sublinienseffekt in Frage, der durch Zucht entstanden ist. Die Tiere in der 9 Monate alten Versuchsreihe sind einige Generationen später geboren worden als die Tiere in der Messreihe der 5+9 Monate alten Mäuse. Da die eNOS^{-/-} ET^{+/+} eine eingeschränkte Fruchtbarkeit aufweisen, gab es möglicherweise eine Selektion zugunsten der Tiere, bei denen die ET-NO-Imbalance nicht so stark zum Tragen kommt. In diesem Fall würden die von uns gezüchteten Tiere ein Tiermodell darstellen, in dem protektive Mechanismen bei chronischer ET-NO-Imbalance untersucht werden könnten (z.B. Aktivierung anderer cGMP-abhängiger Stoffwechselwege, NO/ROS-Redox-Equilibrium). Um eindeutig zu klären, ob eine Imbalance des ET-NO-Systems den Blutdruck steigern kann, wären dennoch Rückkreuzungen zwischen allen vier Versuchsgruppen notwendig. Alternativ wären auch Versuche denkbar, in denen bei human-ET-1-transgenen Mäusen ein eNOS-knockdown mit RNAi durchgeführt wird, oder selektive Blocker der eNOS eingesetzt werden (Cavtratin).

Es gab auch bei den 9 Monate alten Tieren keinen Unterschied in der Höhe des Blutdrucks zwischen Männchen und Weibchen gleichen Genotyps, d.h. die Blutdruckregulation über eNOS und ET ist geschlechtsunabhängig.

4.3 Gefäßmorphologie

Die Media-Lumen-Ratio der Koronarien ist bei den ET+/+ und den eNOS-/- ET+/+ signifikant niedriger gegenüber den WT und den eNOS-/-, wobei die Aufteilung nach Geschlecht keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern ergab. Die Mediafläche war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen Genotypen. Die Lumenfläche war dagegen signifikant höher bei den ET+/+ und den eNOS-/- ET+/+ gegenüber den WT und den eNOS-/- . Es ergab sich auch hier kein Unterschied zwischen den Geschlechtern. Eine ET-1-Überexpression scheint zu einer exzentrischen Morphologie der Arteriolen in der Herzwand zu führen mit vergrößerter Lumenfläche, aber ohne verringerte Fläche der Media. Diese Veränderungen sind geschlechts- und blutdruckunabhängig, denn die ET+/+ haben keinen erhöhten Blutdruck.

Die Bestimmung der perivaskuläre Fibrose ergab im ersten Score für ET+/+ und eNOS-/- ET+/+ eine erhöhte perivaskuläre Fibrose gegenüber WT und eNOS-/-, während sich dies beim zweiten Score nur tendenziell abzeichnete. Ein Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern war in keiner Messung erkennbar. Aus diesen Daten kann abgeleitet werden, dass eine ET-1-Überexpression zu einer tendenziell höheren Matrixproteinsynthese um kardiale Arteriolen herum führt. Diese Veränderungen sind geschlechts- und blutdruckunabhängig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine ET-1-Überexpression unabhängig von Geschlecht, Blutdruck (dieser war bei den ET+/+ nicht erhöht) und der Verfügbarkeit von NO zu morphologischen Veränderungen an den Koronarien führt. Diese sind gekennzeichnet durch eine exzentrische Morphologie der Gefäße mit Erhöhung der Lumenfläche und vermehrter perivaskulärer Fibrose. Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So zeigte sich bei Mäusen mit einer Endothelzellenspezifischen ET-1-Überexpression eine vaskuläre Hypertrophie (auch ohne Blutdruckerhöhung), allerdings war diese eher konzentrisch und nicht wie bei unseren ET-1-transgenen Mäusen exzentrisch⁷⁷.

4.4 Herzgewicht, Kardiomyozytendurchmesser und Herzwandmorphologie

Es zeigte sich ein geschlechtsabhängig erhöhtes Herzgewicht bei den männlichen eNOS-/-, jedoch nicht bei den eNOS-/- ET+/+. Auch der Kardiomyozytendurchmesser war bei den männlichen eNOS-/- signifikant erhöht, während dies den eNOS-/- ET+/+ nicht der Fall war. Die Gesamtfläche des Querschnitts des linken Ventrikels (einschließlich Herzkammer, linke

Herzwand und Septum) war nur tendenziell bei den eNOS^{-/-} erhöht, und die Aufteilung nach Geschlecht ergab nur eine signifikante Erhöhung bei den weiblichen eNOS^{-/-} gegenüber allen anderen weiblichen Gruppen. Der mittlere Wanddurchmesser war signifikant höher bei den männlichen eNOS^{-/-} und den eNOS^{-/-} ET^{+/+} gegenüber den männlichen WT.

Daraus kann geschlossen werden, dass es bei den weiblichen eNOS^{-/-} zu einer eher exzentrischen Morphologie der Herzkammer ohne Zeichen einer Hypertrophie gekommen ist, während bei den männlichen eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} eine Verdickung der Herzwände vorlag. Zusammen mit dem Myozytendurchmesser und den Herzgewichten zeigte sich, dass die männlichen eNOS^{-/-} die stärksten Anzeichen einer Linksherzhypertrophie aufweisen.

In der Literatur zeigte sich bei zwei von einander unabhängigen transgenen Mausmodellen mit eNOS-knockout keine kardiale Hypertrophie^{105, 106}. Allerdings gibt es in keinem der beiden Publikationen eine genaue Angabe zum Alter der Tiere bei Tötung, so dass die Tiere durchaus jünger gewesen sein können als neun Monate. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass im Alter der eNOS-knockout allein schon für die Entwicklung einer Herzhypertrophie ausreicht, während in der Literatur beschrieben ist, dass bei jungen Tieren der eNOS-knockout nur in Verbindung mit Stress (Hypoxie, Aortenstenose) zu Hypertrophie führt^{107, 108}.

Es war zu erwarten, dass die Kombination aus eNOS-knockout und ET-1-Überexpression die Ausprägung einer kardialen Hypertrophie möglicherweise begünstigt, entweder direkt über die antiapoptotischen Effekte von ET-1 und durch den NO-Mangel, oder sekundär durch einen erhöhten systolischen Blutdruck. Der Blutdruck war bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} gleichermaßen erhöht wie bei den eNOS^{-/-}, führte aber bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} nicht zu der deutlichen Linksherzhypertrophie, die vor allem bei den männlichen eNOS^{-/-} vorlag. Entweder liegen hier morphologische Schäden eines anderen Typus vor (z.B. interstitielle Fibrose, siehe Kapitel 4.5), oder es spielen andere protektive Mechanismen eine Rolle (siehe in Kapitel 4.6).

4.5 Interstitielle Fibrose

Die interstitielle Fibrose ist bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant erhöht gegenüber allen anderen Genotypen. Die Aufteilung nach Geschlecht zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

Offensichtlich führt eine gestörte ET-NO-Balance zu der hier beobachteten Fibrose. Weder eine ET-Überexpression allein, noch ein eNOS-knockout mit einem konsekutiv erhöhten Blutdruck lösen diesen Phänotyp aus. Eine mögliche Ursache für die vermehrte interstitielle Fibrose kann eine chronische Entzündungsreaktion sein. Auch in anderen Tiermodellen

fungiert ET-1 als Mediator für Inflammation. So konnte eine Studie an Ratten mit DOCA-salzsensitiver Hypertonie (Tiermodell, welches durch hohe vaskuläre Expressionslevel von ET-1 gekennzeichnet ist) zeigen, dass die Expression von *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) in kardialen Arterien und Venen erhöht ist. Dies führte zu einer Makrophageninfiltration des kardialen Gewebes und damit verbundener starker Zunahme des interstitiellen und perivaskulären Kollagengehaltes¹⁵².

In früheren Studien mit human-ET-1-transgenen Mäusen zeigte sich keine Vermehrung der Gesamtmatrixproteine im Interstitium, wohl aber eine erhöhte Expression von Kollagen Typ III und Laminin⁹³. Möglicherweise ist bei unseren ET+/+ auch die Expression von Kollagen III und Laminin erhöht, allerdings reicht diese nicht aus, um den Gesamtgehalt an Matrixproteinen signifikant zu erhöhen, während bei den eNOS-/- ET+/+ die Expression dieser Matrixproteine sowie anderer Subtypen offensichtlich weiter gesteigert wurde. In weiterführenden Studien an diesen Tieren wäre eine Analyse der Matrixproteinzusammensetzung z.B. durch Immunhistologie sinnvoll. Außerdem könnte über Immunhistologie die Expression von proinflammatorischen Molekülen wie VCAM oder ICAM (Adhäsionsmoleküle für Monozyten und Neutrophile) untersucht werden, sowie eine mögliche Makrophageninfiltration über *cluster of differentiation*-Oberflächenproteine (CD-Oberflächenproteine).

4.6 Herzkatheter

Mittels Herzkatheter sollte die Frage geklärt werden, ob die von uns beobachtete Linksherzhypertrophie bei den eNOS-/- und die interstitielle Fibrose bei den eNOS-/- ET+/+ zu einer Einschränkung der kardialen Funktion führt. Dazu wurden Parameter erfasst, die die Herzfunktion in der Systole (LVP max, dpdt max) und der Diastole (LVP min, LVEDP, dpdt min, Tau) beschreiben. LVP min (Erläuterung: siehe Kapitel 2.2.5.1) war bei den eNOS-/- signifikant höher gegenüber den WT, was auf eine Abnahme des Kammervolumens durch Hypertrophie oder eine Abnahme der Wandelastizität hindeutet. Es handelt sich hierbei vermutlich um einen durch Hypertrophie verursachten Phänotyp, der eine Folgeerscheinung des chronisch erhöhten systolischen Blutdrucks ist. Darauf deuten auch die bereits diskutierten morphologischen Veränderungen der Herzen bei den eNOS-/- hin, die vor allem bei den Männchen ausgeprägt waren (Herzgewicht, Myozytendurchmesser und Wanddurchmesser waren erhöht). Die Auswertung des LVP min nach Geschlecht ergab, dass er sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen eNOS-/- signifikant höher war gegenüber den WT gleichen Geschlechts. Darüber hinaus war LVP min signifikant höher bei

den männlichen eNOS^{-/-} gegenüber den weiblichen eNOS^{-/-}, d.h. auch hier zeigte sich eine geschlechtsabhängige stärkere Ausprägung des Phänotyps bei männlichen Tieren.

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP korrigiert) war bei den eNOS^{-/-} und den eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant höher gegenüber den WT, was bei den eNOS^{-/-} vermutlich auf die bereits beschriebene Hypertrophie zurückzuführen ist. Bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} ist es allerdings vermutlich auf die interstitielle Fibrose zurückzuführen, da hier weder das Herzgewicht noch der Kardiomyozytendurchmesser signifikant höher waren, dafür aber der Anteil an interstitiellen Kollagen im Gewebe des linken Ventrikels. Die Aufteilung nach Geschlecht ergab, dass sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen eNOS^{-/-} der LVEDP signifikant höher war gegenüber den WT gleichen Geschlechts. Der LVEDP war außerdem nur noch bei den männlichen eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant höher gegenüber den WT, was auch hier auf eine geschlechtsabhängig stärkere Abnahme der Ventrikelwandelastizität bei Männchen hindeutet. Bei der interstitiellen Fibrose gab keinen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren, aber der Wanddurchmesser war bei den männlichen eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant höher gegenüber den männlichen WT. Die stärkere Abnahme der Wandelastizität ist bei den männlichen eNOS^{-/-} ET^{+/+} also vermutlich auf eine Kombination aus interstitieller Fibrose und beginnender Linksherzhypertrophie zurückzuführen.

Die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit dp/dt_{min} war bei den eNOS^{-/-} signifikant niedriger als bei allen anderen Gruppen, was darauf zurückzuführen sein kann, dass durch die Verdickung der Herzwände der Kardiomyozyten die Dehnbarkeit abgenommen hat und deshalb der Druck nicht soweit abfiel wie bei den anderen Gruppen, was sich auch in dem höheren LVP_{min} zeigt. Zwischen Männchen und Weibchen gleichen Phänotyps gab es keine signifikanten Unterschiede, d.h. die Daten können zusammengefasst werden.

Die Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls Tau (Erläuterung: siehe Kapitel 2.2.5.1) ist bei den eNOS^{-/-} signifikant höher als bei allen anderen Gruppen, während sie für ET^{+/+} signifikant niedriger ist als für alle anderen Gruppen. Die Erhöhung wird bei den eNOS^{-/-} vermutlich auch bedingt durch die bereits beschriebene Hypertrophie, die zu einem geringeren und langsameren Druckabfall führt.

Die Verringerung von Tau bei den ET^{+/+} ist auf eine Erhöhung der Herzfrequenz zurückzuführen, wodurch sich die Dauer der Kontraktion und Entspannung des Herzmuskels verkürzt (siehe Kapitel 4.7). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern.

Zusammenfassend kann aus den hämodynamischen Daten geschlossen werden, dass bei den eNOS^{-/-} der höhere Blutdruck über eine Erhöhung der Nachlast zu einer linksventrikulären Hypertrophie geführt hat. Durch die Verdickung der Herzwände kam es zu einer Abnahme der Herzwanddehnbarkeit und damit zu einer Einschränkung der diastolischen kardialen Funktion. Diese Funktionsminderung ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung des minimalen linksventrikulären Drucks in der Diastole, einem höheren linksventrikulären enddiastolischen Druck und einer verlängerte Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls τ . Die Analyse der Gesamtventrikelfläche und der Herzwände hat gezeigt, dass das innere Ventrikelvolumen noch nicht stark verringert ist. Bei kardialen Hypertrophien, die durch eine hohe Nachlast verursacht wurden, tritt dies charakteristischerweise ein. Außerdem führt eine kardiale Hypertrophie im Verlauf häufig zu einer Koronarinsuffizienz, die dann in einer symptomatischen Herzinsuffizienz resultiert.

Die hämodynamischen Daten haben gezeigt, dass auch die eNOS^{-/-} ET^{+/+} einen höheren Blutdruck entwickeln, bei einer Messung (5+9 Monate alte Tiere) sogar höher als bei den eNOS^{-/-}. Im Alter von neun Monaten konnte dieser Effekt nicht reproduziert werden, aber der Blutdruck war gleichermaßen erhöht wie bei den eNOS^{-/-}. Umso mehr ist es aber verwunderlich, dass sich kaum eine Hypertrophie mit Veränderungen in der kardialen Funktion bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} gezeigt haben. Bei diesen Tieren war nur der linksventrikuläre enddiastolische Druck höher gegenüber den WT. Die morphologischen Veränderungen der Herzen bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} sind von einem anderen Typus: Hier liegt eine stärkere interstitielle Fibrose vor, aber keine Hypertrophie wie bei den eNOS^{-/-}. Es ist davon auszugehen, dass kompensatorische Mechanismen eine Rolle spielen. Zum einen kann die veränderte Gefäßmorphologie eine Rolle spielen. Wenn die Lumina der peripheren Gefäße im gesamten Organismus wie in den Koronarien größer geworden sind, kann es zu einer Senkung der Nachlast gekommen sein. Weiterführende Studien unserer Arbeitsgruppe haben außerdem ergeben, dass die Media-Lumen-Ratio der Aorta bei den eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant niedriger war als bei allen anderen Gruppen¹⁵³. Auch dies kann zu einer Nachlastsenkung beigetragen haben. Möglich ist aber auch, dass es über Sublinieneffekte z.B. zu einer Aktivierung anderer cGMP-abhängiger Stoffwechselwege gekommen ist, oder ein günstigeres NO/ROS-Redox-Equilibrium im Herzgewebe mit vorliegt (z.B. weniger nitrosativer Stress durch niedrigere NO-Spiegel, siehe Kapitel 4.11).

Eine noch bessere Aussage über den Phänotyp könnte getroffen werden, wenn parallel zur Druckbestimmung im Herzkatheterversuch eine Bestimmung der Füllvolumina, der

Ejektionsfraktion und der diastolischen Steifigkeit erfolgen würde, die ein guter Parameter für die Wandelastizitätsabnahme durch Fibrose ist.

4.7 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz war bei den 5+9 Monate alten Tieren bei eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} unverändert, allerdings war sie bei den ET^{+/+} signifikant höher gegenüber allen anderen Gruppen. Ein gleiches Bild zeigte sich für ET^{+/+} bei der Messung der neun Monate alten Tiere und in den Herzkatheterversuchen.

Dass Endothelin positiv chronotrop wirken kann, konnte auch schon in anderen Studien gezeigt werden. So erhöhte z.B. eine Bolus-Injektion von Endothelin in Ratten deren Herzfrequenz⁹⁴. Bei human-ET-1-transgenen-Mäusen zeigte sich bisher kein signifikanter Unterschied der Herzfrequenz^{76, 77, 92}. Allerdings lagen die Fallzahlen bei maximal zehn Tieren pro Gruppe, während es bei unserer Studie ca. 20 Tiere pro Genotyp waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine chronische ET-1-Überexpression *in vivo* geschlechtsunabhängig eine höhere Herzfrequenz verursacht. Ein Knockout der eNOS scheint dies wieder zu verhindern, und sie eher abzusenken.

4.8 Körpergewicht

Das Körpergewicht war bei den human-ET-1-transgenen Gruppen (ET^{+/+} und eNOS^{-/-} ET^{+/+}) signifikant niedriger gegenüber den Wildtypen und den eNOS^{-/-}. Bei den weiblichen ET^{+/+} war das Körpergewicht nur signifikant niedriger gegenüber den weiblichen eNOS^{-/-}. Eine ET-1-Überexpression scheint zu einem niedrigeren Körpergewicht zu führen.

Ein möglicher Mechanismus für die Gewichtsreduktion könnte sein, dass Endothelin mit dem Fettstoffwechsel interagiert. Isoliertes viszerales Fettgewebe, welches mit ET-1 inkubiert wurde, zeigte *in-vitro* eine verringerte Reaktivität gegenüber Insulin-induzierten antilipolytischen Effekten, d.h., ET-1 fördert die Lipolyse durch Hemmung der Insulinaktivität. Diese Effekte wurden hier über den ETB-Rezeptor vermittelt¹⁵⁴. Eine andere Studie bestätigte, dass Inkubation von humanen Adipozyten mit ET-1 *in-vitro* zu einer vermehrten Lipolyse führte, allerdings führte in dieser Studie die Inkubation mit dem ETA-Rezeptor-Agonisten ET-1(1-31) zu dem selben Effekt, während der spezifische ETB-Rezeptor-Agonist BQ3020 die Lipolyse nicht steigerte¹⁵⁵. Trotz der Widersprüche kann für die uns vorliegenden Ergebnisse spekuliert werden, dass die *in-vivo* ET-1-Überexpression in den ET^{+/+} und den eNOS^{-/-} ET^{+/+}-Mäusen das Körpergewicht über eine verstärkte Lipolyse gesenkt haben könnte und darüber hinaus möglicherweise an der Entstehung einer Insulin-Resistenz beteiligt sein könnte.

4.9 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Geschlechtsabhängige Unterschiede zeigten sich lediglich bei den eNOS^{-/-} in der Ausprägung der kardialen Hypertrophie und den daraus resultierenden Veränderungen der Herzfunktion. Hier waren die Männchen deutlich stärker betroffen als die Weibchen. In der Literatur finden sich Beispiele dafür, dass Östrogene der Entstehung einer kardialen Hypertrophie entgegenwirken können. So zeigten ovariektomierte Mäuse mit künstlicher Aortenstenose eine kardiale Hypertrophie, diese wurde aber abgemildert, wenn sie mit Östrogen behandelt wurden¹⁵⁶. Östrogen greift u.a. in die NO-Synthese ein. Es kann die Zellwand von Endothelzellen passieren und im Zellkern an Östrogen-Rezeptoren (Östrogen-Rezeptor α und β ; ER α , ER β) binden. Dieser Komplex bindet im Zellkern wiederum an Östrogen responsive Abschnitte der DNA (*estrogen responsive element*, ERE) und vermittelt so eine verstärkte eNOS-Expression. Außerdem bindet Östrogen auch extrazellulär an ER α und ER β , und steigert so die Aktivität von angekoppelten NOS (nicht-genomische Aktivierung der NOS)^{157, 158}. Das Ergebnis, dass ein eNOS-knockout vor allem bei den Männchen eine stärker ausgeprägte Hypertrophie erzeugt, zeigt, dass die antihypertrophen Effekte von Östrogen über eine höhere NO-Produktion durch eNOS nur einen kleinen Teil ausmachen. Anderenfalls wäre der hypertrophe kardiale Phänotyp bei weiblichen eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} gleichermaßen oder sogar stärker ausgeprägt als bei den Männchen. Die Modulation des kardialen Phänotyps durch Geschlechtshormone ist vermutlich komplexer. Östrogen reguliert z.B. ANP hoch (atrial natriuretic peptide), welches über cGMP und Proteinkinase G für eine Vasodilatation sorgt und antihypertroph auf Kardiomyozyten wirkt^{154, 159}. Östrogen inhibiert außerdem die ACE-Aktivität und verringert so die Angiotensin-II-Synthese¹⁶⁰.

Es ist interessant, dass keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei den Blutdruckwerten nachweisbar waren. Östrogen aktiviert wie oben beschrieben über genomische und nicht genomische Effekte die eNOS-Aktivität und führt so zu einer verstärkten Vasodilatation¹⁵⁹. Durch den eNOS-knockout bei unseren Tieren wurde dieser Mechanismus inaktiviert, so dass die weiblichen eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} keinen signifikant niedrigeren Blutdruck aufweisen als die Männchen gleichen Genotyps.

Wenn Östrogen tatsächlich in diesem Tiermodell den Phänotyp mitmoduliert hat, könnten folgende Schlüsse gezogen werden. Östrogen reguliert zwar den Blutdruck über die vasodilatatorischen Effekte von NO (gebildet von eNOS) aber verhindert nicht über NO die Entstehung einer Herzhypertrophie. Dies geschieht offensichtlich über andere Stoffwechselwege. Die Daten bestätigen auch, dass die Entstehung einer Herzhypertrophie

durch einen höheren Blutdruck über geschlechtsabhängige Stoffwechselwege zumindest verzögert werden kann.

4.10 Ergebnisse aus weiterführenden Studien

Es sind bereits weiterführende Relaxations-Kontraktions-Versuche mit isolierten Aortenringen von eNOS^{-/-} ET^{+/+}-Tieren und den Kontrollgruppen durchgeführt worden. Hier war die Aorten-Relaxation unter Acetylcholin signifikant höher für ET^{+/+}-Mäuse gegenüber Wildtypen, während es bei eNOS^{-/-} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} zu keiner Endothelium-abhängigen Relaxation kam. Das zeigt, dass die Endothel-abhängige Relaxation durch den eNOS-knockout nachhaltig gestört ist und nicht durch iNOS oder nNOS kompensiert werden kann. Die Kontraktion nach Inkubation mit Endothelin war bei ET^{+/+} und eNOS^{-/-} ET^{+/+} signifikant niedriger im Vergleich zu Wildtypen und eNOS^{-/-}¹⁵³. Um eine mögliche veränderte Expression der ETA- und der ETB-Rezeptoren zu untersuchen, wurde aus Aortengewebe ein Western-Blot durchgeführt. Die Expression der ETA- und ETB-Rezeptoren in der Aorta unterschied sich nicht bei den ET^{+/+} gegenüber den WT. Dies deutet darauf hin, dass die Gegenregulation zu den Folgen eines erhöhten ET-Spiegel nicht durch eine veränderte ET-Rezeptorexpression erfolgt. Die eNOS^{-/-} ET^{+/+} zeigten im Western-Blot eine signifikant höhere ETB-Rezeptordichte in der Aorta als die WT, was zur lokalen Clearance des Endothelins beitragen könnte. Allerdings zeigte sich auch eine signifikant höhere ETA-Rezeptordichte¹⁵³. Bei den Aorten der eNOS^{-/-} ET^{+/+} liegt außerdem eine signifikant niedrigere Media-Lumen-Ratio gegenüber den WT vor. Die veränderte Gefäßmorphologie spielt auch eine Rolle bei der verringerten Aortenkonstriktion zu ET-1.

Es wurde außerdem aus Aorten der vier Gruppen (WT, ET^{+/+}, eNOS^{-/-} eNOS^{-/-} ET^{+/+}) die mRNA isoliert und die Expression verschiedener Komponenten des ET-Systems untersucht. Die mRNA-Level waren hochreguliert in eNOS^{-/-} ET^{+/+}-Mäusen für human-ET-1 gegenüber ET^{+/+}-Mäusen. Außerdem war die Expression hochreguliert für murines ET-1, ECE (Endothelin-Converting-Enzyme), ETA-Rezeptor, ETB-Rezeptor und iNOS gegenüber WT-Mäusen. Hier zeigt sich, dass die Kombination aus ET-1-Überexpression und NO-Mangel zu einer deutlichen Aktivierung des gesamten ET-Systems führt¹⁵³.

4.11 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ein eNOS-knockout allein führt zu einem erhöhten systolischen Blutdruck und einer daraus resultierenden deutlichen Linksherzhypertrophie. Die eNOS^{-/-} ET^{+/+}-Mäuse haben einen noch höheren systolischen Blutdruck, außerdem eine stärkere interstitielle Fibrose und, wie die eNOS^{-/-}, einen höheren korrigierten linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP).

Sie zeigen eine exzentrische Morphologie der koronaren Arterien/Arteriolen und eine stärkere perivaskuläre Fibrose, was auch bei den ET+/+ der Fall ist. Vor allem die fibrotischen Veränderungen deuten auf eine chronische Inflammation hin. Dennoch ist die Tendenz zur Entstehung einer Kardiomyopathie geringer ausgeprägt als bei den eNOS-/. Es ist überraschend, dass die Kombination aus eNOS-knockout und ET-1-Überexpression nicht zu einer deutlicheren Hypertrophie und kardialen Funktionseinschränkung führt als ein eNOS-knockout allein. Tatsächlich treten bei Kardiomyopathien, die durch Kollagenosen verursacht werden (z.B. in Folge von Sklerodermie u.a.), keine hypertrophen sondern eher dilatative Veränderungen auf^{92, 161}. Bei Vorliegen einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) wären dann aber die Herzkatheterdaten für diese Tiere auffälliger gewesen. Die Daten lassen nicht auf ein Vorliegen einer DCM schließen, zumal die Tiere keine auffällige höhere Mortalität bei der Zucht und Haltung aufwiesen. Die bessere Herzfunktion kann zum einen an einer gesenkten Nachlast aufgrund der exzentrischen Veränderungen an den Gefäßen der eNOS-/ET+/+ liegen, wodurch die linke Herzkammer weniger belastet wird. Die Daten deuten aber auch darauf hin, dass sich der kardiale Phänotyp durch eine sublinienbedingte Aktivierung protektiver Stoffwechselwege verbessert hat, was sich schon darin zeigt, dass die systolischen Blutdruckwerte der neun Monate alten eNOS-/ET+/+ nicht signifikant höher sind als die der eNOS-/. Als gegenregulierende Mechanismen kommen z.B. höhere ANP und BNP-Spiegel in Frage. Die ANP und BNP-Expression wird bei hypertrophen Prozessen hochreguliert^{162, 163}, und dies erfolgt u.a. über Endothelin-1, welches in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten *in vitro* die Expression von ANP-mRNA hochreguliert¹⁶⁴. Dazu induziert ET-1 *in vitro* die Bindung des Transkriptionsfaktors Ying Yang 1 an den BNP-Promoter¹⁶⁵. ANP und BNP senken den Blutdruck, hemmen die Entstehung von Hypertrophie, verbessern die GFR und inhibieren das RAAS-System¹⁶⁵. Es ist möglich, dass durch die Überexpression des ET-1 in den eNOS-/ET+/+ ANP und BNP hochreguliert wurden und zusätzlich einer Entstehung einer kardialen Hypertrophie entgegen gewirkt haben. Dies muss dann aber mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei den ET+/+ der Fall gewesen sein. Da diese Tiere ohnehin keinen höheren Bluthochdruck aufwiesen, fiel hier eine mögliche Kardioprotektion aber nicht auf. Auch ein verminderter nitrosativer Stress in den eNOS-/ET+/+ kann den Phänotyp verbessert haben. NO reagiert mit Superoxid zum hochreaktiven Peroxynitrit. Dieses kann zu oxidativen Proteinschädigungen wie der Bildung von Nitrotyrosin-Resten führen, und damit toxisch auf die meisten Zelltypen wirken¹⁰¹.

Um die Mechanismen zu klären, die bei den eNOS-/ET+/+ die Entstehung einer Kardiomyopathie verhindert haben, kann man verschiedene Ansätze wählen.

Zum einen könnte man die Tiere mit Indometacin behandeln, um die Folgen einer chronischen Hemmung der Prostaglandinsynthese zu untersuchen. Weitere Versuche mit chronischer L-NAME-Gabe könnten eine kompensatorische Hochregulierung/Aktivierung von nNOS in Kardiomyozyten aufdecken. Hier könnte man aber schon durch Western-Blot-Analysen des kardialen Gewebes erste Hinweise auf eine Kompensation durch nNOS gewinnen. Um zu überprüfen, ob mögliche Schäden durch verminderten nitrosativen Stress verhindert wurden, kann eine Messung der Nitrotyrosinlevel Aufschluss geben. Parallel dazu ist es sinnvoll, als Marker für oxidativen Stress die NADPH-Oxidase-Aktivität zu bestimmen, da NO-ROS ein empfindliches Redox-Equilibrium bilden.

Die eNOS^{-/-} ET^{+/+} -transgenen Mäusen stellen ein Tiermodell mit ET-1-NO-Imbalance dar. Dieses ist gekennzeichnet durch eine kardiale interstitielle und perivaskuläre Fibrose. Eine ET-1-NO-Imbalance führte außerdem zu einer endothelialen Dysfunktion mit einer Erhöhung des Blutdrucks. Außerdem zeigen die Tiere eine exzentrische Morphologie der Koronargefäße.

Der direkte Vergleich mit nur ET-1-überexprimierenden Tieren und nur eNOS-knockout-Tieren konnten erlaubte eine Analyse der Veränderungen, die durch einen eNOS-Knockout oder einen ET-1-Überschuss allein entstehen. Mäuse mit eNOS-knockout allein haben eine endotheliale Dysfunktion mit daraus resultierendem Bluthochdruck, der zu einer kardialen Hypertrophie führt. Die Hypertrophie wiederum verursacht eine diastolische kardiale Dysfunktion. Dieser Phänotyp ist deutlicher bei männlichen Tieren ausgeprägt.

Eine ET-1-Überexpression wiederum führt zu einer veränderten Gefäßgeometrie mit Lumenvergrößerung und perivaskulärer Fibrose. Diese Veränderungen sind unabhängig vom Blutdruck und Geschlecht.

Durch Interaktion von ET-1-Überexpression und eNOS-Knockout kommt es zu einer kardialen interstitiellen Fibrose, allerdings nur mit geringer Funktionseinschränkung des Herzens. Das hier vorliegende Tiermodell ist geeignet, um kompensatorische Mechanismen zu untersuchen, die hier der Entstehung einer bluthochdruckinduzierten Myokardhypertrophie entgegenwirken.

Viele Studien, die sich mit der physiologischen Wirkung von Endothelin und/oder NO befassen haben, waren *in-vitro*-Studien oder Akutexperimente (Bolus-Injektionen von ET-1, L-NAME-Behandlung). Hier konnte erstmals eine chronische ET-1-NO-Imbalance charakterisiert werden und direkt mit einer chronischen ET-1-Überexpression bzw. einer gestörten NO-Produktion durch eNOS-knockout verglichen werden. Auch wenn sich bei den eNOS^{-/-}

ET+/+-Mäusen im Alter von neun Monaten noch keine kardiale Funktionseinschränkung gezeigt hat, kann dies infolge der interstitiellen Fibrose später noch eintreten. Daher ist diese Tiermodell auch geeignet, um die Spätfolgen einer chronischen ET-NO-Imbalance zu untersuchen und neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Endothelin-1 (ET-1) ist ein autokrines und parakrines Peptid-Hormon, welches hauptsächlich in den Endothelzellen der Gefäße gebildet wird¹. Es ist eines der stärksten Vasokonstriktoren, die bis heute bekannt sind, und wirkt darüber hinaus profibrotisch, mitogen und proinflammatorisch¹. Es wird zu 80 Prozent basolateral in Richtung der Gefäßmedia ausgeschieden¹, wo es an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den Endothelin A-Rezeptor (ETA-Rezeptor) und den Endothelin B-Rezeptor (ETB-Rezeptor), bindet und im endoplasmatischen Retikulum über die Freisetzung von Kalzium (Ca^{2+}) eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen auslöst^{1, 25-29}. Überraschenderweise zeigten Tiermodelle mit erhöhter Endothelin-Expression wie human-Endothelin-1-transgene Mäuse (ET-1) und Endothelin-2-transgene (ET-2) Ratten keine Erhöhung des Blutdrucks^{76, 150, 151}. Die Expression und/oder Wirkung von Endothelin (ET) muss unter physiologischen Bedingungen gegenreguliert werden. Einer der wichtigsten bisher bekannten Gegenspieler des Endothelins ist Stickstoffmonoxid (NO). Die vasokonstriktorische Wirkung des Endothelins wird direkt in den Gefäßen durch NO reduziert^{1, 3}, und NO reguliert außerdem die prepro-ET-1-mRNA-Expression herunter^{1, 159}.

Wir haben daher human-ET-1-transgene Mäuse (ET+/+) mit Mäusen gekreuzt, die einen Knockout der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase aufweisen (eNOS-knockout-Mäuse, eNOS-/-). Auf diesem Weg haben wir homozygote human-ET-1-transgene Mäuse mit gleichzeitigem homozygoten eNOS-knockout rückgezüchtet (eNOS-/- ET+/+). Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine ET-Überexpression bei gleichzeitiger eingeschränkter NO-Produktion zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob diese ET-NO-Imbalance kardiale und vaskuläre Schäden am Herzen verursacht bzw. diese verstärkt werden und ob dies zu einer Einschränkung der Herzfunktion führt. Wir haben daher bei eNOS-/- ET+/+ -Mäusen und den entsprechenden Kontrollgruppen (ET+/+ Mäusen, eNOS-/- -Mäusen und WT -Mäusen) den Blutdruck gemessen, die Herzfunktion mittels Herzkatheter untersucht und die Herzen histologisch analysiert.

Der direkte Vergleich mit nur human-ET-1-überexprimierenden Tieren und nur eNOS-knockout-Tieren erlaubte eine Analyse der Veränderungen, die durch einen eNOS-Knockout oder einen ET-1-Überschuss allein entstehen, oder durch Kombination beider Faktoren. Mäuse mit eNOS-knockout allein (eNOS-/- -Mäuse) entwickelten einen erhöhten Blutdruck, der zu einer kardialen Hypertrophie führte. Die Hypertrophie wiederum verursachte eine kardiale diastolische Dysfunktion. Dieser Phänotyp war deutlicher bei den männlichen Tieren

ausgeprägt. Eine ET-1-Überexpression (in ET+/+-Mäusen) führte wiederum zu einer veränderten Gefäßgeometrie mit Lumenvergrößerung und perivaskulärer Fibrose. Die Kombination von eNOS-Knockout und ET-1-Überexpression (in eNOS-/- ET+/+-Mäusen) führte zu einer signifikant höheren kardialen interstitiellen Fibrose im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Diese fibrotischen Veränderungen deuten auf eine chronische Inflammation hin. Die eNOS-/- ET+/+-Mäuse zeigten die selben Veränderungen der Gefäßgeometrie wie die Tiere mit alleiniger ET-1-Überexpression (Lumenvergrößerung und perivaskuläre Fibrose). Wie bei den eNOS-/- auch, kam es bei den eNOS-/-ET+/+ zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks. Dennoch war die Tendenz zur Entstehung einer kardialen Hypertrophie deutlich geringer ausgeprägt als bei den eNOS-/-, und die eNOS-/- ET+/+ wiesen kaum eine Einschränkung der Herzfunktion im Herzkatheter auf. Vermutlich wurden bei ihnen kompensatorische Stoffwechselwege aktiv, so dass dieses Tiermodell geeignet ist, um derartige Mechanismen zu untersuchen. Fibrotische Veränderungen und chronische Inflammation können aber auch Spätfolgen haben. Auch wenn sich bei den eNOS-/-ET+/+-Tieren im Alter von neun Monaten noch keine kardiale Funktionseinschränkung gezeigt hat, kann dies in einem höheren Alter noch eintreten. Daher können an diesem Tiermodell die Spätfolgen der kardialen Fibrose (verursacht durch ET-NO-Imbalance) untersucht und neue therapeutische Ansätze entwickelt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:851-76.
2. Kloog, Y, Sokolovsky M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol. Sci.* 10 1989. 212-214
3. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988 Mar 31;332(6163):411-5.
4. Kitamura K, Tanaka T, Kato J, et al. Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 May 30;161(1):348-52.
5. MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM, , et al. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Sep;86(18):7285-9.
6. Rozengurt N, Springall DR, Polak JM. Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J Pathol.* 1990 Jan;160(1):5-8.
7. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, et al. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1741-8.
8. Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, et al. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest.* 1995 Aug;96(2):1059-65.
9. Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y. Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Mar 31;191(3):823-30.
10. Grohé C, Nouskas J, Vetter H, et al. Effects of nisoldipine on endothelin-1- and angiotensin II-induced immediate/early gene expression and protein synthesis in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994 Jul;24(1):13-6.
11. Shinmi O, Kimura S, Yoshizawa T, et al. Presence of endothelin-1 in porcine spinal cord: isolation and sequence determination. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Jul 14;162(1):340-6.
12. O'Reilly G, Charnock-Jones DS, Morrison JJ, et al. Alternatively spliced mRNAs for human endothelin-2 and their tissue distribution. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Jun 30;193(3):834-40.

13. Uchide T, Fujimori Y, Temma K, et al. cDNA cloning, sequence analysis and organ distribution of horse preproendothelin-2. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004 Nov;44 Suppl 1:S430-4.
14. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, et al. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Oct 16;164(1):74-80.
15. Kapur RP, Sweetser DA, Doggett B, et al. Intercellular signals downstream of endothelin receptor-B mediate colonization of the large intestine by enteric neuroblasts. *Development.* 1995 Nov;121(11):3787-95.
16. Slowinski T, Kalk P, Christian M, et al. 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.* 2007 Jun 15;581(Pt 3):1173-81.
17. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, et al. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development.* 1998 Mar;125(5):813-2
18. Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, et al. 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.* 1991 May;48(5):990-6.
19. Wilson DB, Dorfman DM, Orkin SH. A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells *Mol Cell Biol.* 1990 Sep;10(9):4854-62.
20. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, et al. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest.* 2000 May;105(10):1373-82.
21. Watts SW, Thakali K, Smark C, et al. Big ET-1 processing into vasoactive peptides in arteries and veins. *Vascul Pharmacol.* 2007 Nov-Dec;47(5-6):302-12.
22. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:391-415. Review.
23. Gan LM, Selin-Sjögren L, Doroudi R, et al. Temporal regulation of endothelial ET-1 and eNOS expression in intact human conduit vessels exposed to different intraluminal pressure levels at physiological shear stress. *Cardiovasc Res.* 2000 Oct;48(1):168-77.

24. Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, et al. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem.* 2000 Jun 9;275(23):17596-604.
25. Eguchi S, Hirata Y, Ihara M, et al. A novel ETA antagonist (BQ-123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1992 May 18;302(3):243-6.
26. Resink TJ, Scott-Burden T, Buhler FR. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 157:1360-1368
27. Emori T, Hirata Y, Marumo F. Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cells and its cellular mechanism of action. *FEBS Lett.* 1990 Apr 24;263(2):261-4.
28. Takuwa Y, Kasuya Y, Takuwa N, et al. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1990 85:653-6
29. Takuwa Y, Kasuya Y, Takuwa N, et al. Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1990 Mar;85(3):653-8.
30. Taurin S, Hogarth K, Sandbo N, et al. Gbetagamma-mediated prostacyclin production and cAMP-dependent protein kinase activation by endothelin-1 promotes vascular smooth muscle cell hypertrophy through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem.* 2007 Jul 6;282(27):19518-25. Epub 2007 May 19.
31. Eguchi S, Hirata Y, Imai T, et al. Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology.* 1993 Feb;132(2):524-9.
32. Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, et al. Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem.* 1995 Feb 15;228(1):102-8.
33. Davis A, Hogarth K, Fernandes D, et al. Functional significance of protein kinase A activation by endothelin-1 and ATP: negative regulation of SRF-dependent gene expression by PKA. *Cell Signal.* 2003 Jun;15(6):597-604.
34. Ishikawa T, Hume JR, Keef KD. Regulation of Ca²⁺ channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1993 Dec;73(6):1128-37.

35. Xiong Z, Sperelakis N, Fenoglio-Preiser C. Regulation of L-type calcium channels by cyclic nucleotides and phosphorylation in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *J Vasc Res.* 1994 Sep-Oct;31(5):271-9
36. Adelstein RS, Conti MA, Hathaway DR, et al. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by the catalytic subunit of adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1978 Dec 10;253(23):8347-50.
37. Gohla A, Schultz G, Offermanns S. Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res.* 2000 Aug 4;87(3):221-7.
38. Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20246-9.
39. Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Rupérez M, et al. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005 Jul 22;97(2):125-34.
40. Ryan US, Zhong R, Hayes BA, et al. Regulation of endothelin-1 expression in normal and transfected endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S38-41.
41. Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, et al. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;13 Suppl 5:S85-8; discussion S102.
42. Edwards RM, Pullen M, Nambi P. Activation of endothelin ETB receptors increases glomerular cGMP via an L-arginine-dependent pathway. *Am J Physiol.* 1992 Dec;263(6 Pt 2):F1020-5.
43. Ivey ME, Osman N, Little PJ. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2008 Aug;199(2):237-47.
44. Moore CA, Milano SK, Benovic JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:451-82.
45. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science.* 2005 Apr 22;308(5721):512-7.
46. Gurevich EV, Gurevich VV. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* 2006;7(9):236.
47. Gasic S, Wagner OF, Vierhapper H, et al. Regional hemodynamic effects and clearance of endothelin-1 in humans: renal and peripheral tissues may contribute to the overall disposal of the peptide. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992 Feb;19(2):176-80.

48. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, et al. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Mar 30;199(3):1461-5.
49. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol.* 1996 Oct;81(4):1510-5.
50. Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, et al. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem.* 1997 Jul 11;272(28):17734-43.
51. Furchgott RF. Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 7:S1-2.
52. Vanhoutte PM. How We Learned to Say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Aug;29(8):1156-60.
53. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of Endothelium derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical: In: Vanhoutte PM, ed. *Mechanisms of vasodilation.* New York: Raven press, 1988:427-35
54. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9265-9.
55. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988 Jun 16;333(6174):664-6.
56. Moncada S, Palmer RM. Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by glucocorticoids: yet another explanation for their anti-inflammatory effects? *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Apr;12(4):130-1.
57. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1992;65:287-346.
58. Mungrue IN, Brecht DS, Stewart DJ, et al. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand.* 2003 Oct;179(2):123-35.
59. Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med.* 2003 Nov 15;35(10):1217-28.
60. Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, et al. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 20;98(24):14126-31.
61. Oess S, Icking A, Fulton D, et al. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J.* 2006 Jun 15;396(3):401-9.

62. Huang PL. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Nov;11 Suppl 16:S120-3.
63. Kleinert H, Schwarz PM, Förstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem.* 2003 Oct-Nov;384(10-11):1343-64.
64. Dias-Junior CA, Cau SB, Tanus-Santos JE. Role of nitric oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications *J Bras Pneumol.* 2008 Jun;34(6):412-9.
65. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med.* 1997;48:489-509.
66. Cunha FQ, Assreuy J, Moncada S, et al. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology.* 1999 79, 408-411
67. Stamler J, Mendelsohn ME, Amarante P, et al. N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res.* 1989 Sep;65(3):789-95.
68. Pohl U, Busse R. EDRF increases cyclic GMP in platelets during passage through the coronary vascular bed. *Circ. Res.* 1989 65:1798–803
69. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991 67(6): 1033–36
70. Suenobu N, Shichiri M, Iwashina M, et al. Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Jan;19(1):140-6.
71. O'Reilly G, Charnock-Jones DS, Cameron IT, et al. Endothelin-2 mRNA splice variants detected by RT-PCR in cultured human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S18-21.
72. Howard PG, Plumpton C, Davenport AP. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens.* 1992 Nov;10(11):1379-86.
73. Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, et al. Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Br J Pharmacol.* 1990 Nov;101(3):632-9.
74. Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1993 Mar;21(3):294-300.

75. Hocher B, Schwarz A, Slowinski T, et al. In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin. *J Hypertens*. 2004 Jan;22(1):111-9.
76. Hocher B, Thöne-Reineke C, Rohmeiss P, et al. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest*. 1997 Mar 15;99(6):1380-9.
77. Amiri F, Viridis A, Neves MF, et al. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004 Oct 12;110(15):2233-40.
78. Hirai Y, Adachi H, Fujiura Y, et al. Plasma endothelin-1 level is related to renal function and smoking status but not to blood pressure: an epidemiological study. *J Hypertens*. 2004 Apr;22(4):713-8.
79. Schiffrin EL, Thibault G. Plasma endothelin in human essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1991 Apr;4(4 Pt 1):303-8.
80. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharm Rev*. 1994 46: 325 – 415
81. Schiffrin EL, Deng LY, Sventek P, et al. Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *J Hypertens*. 1997 Jan;15(1):57-63
82. Oishi S, Sasaki M, Sato T. Elevated immunoreactive endothelin levels in patients with pheochromocytoma. *Am J Hypertens*. 1994 Aug;7(8):717-22.
83. Garipey CE, Ohuchi T, Williams SC, et al. Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(7):925-33.. *J Clin Invest*. 2000;105:925–933.
84. 66. Pollock DM, Pollock JS. Evidence for endothelin involvement in the response to high salt. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Jul;281(1):F144-50.
85. Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, et al. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1999 Feb;33(2):753-8.
86. Cardillo C, Campia U, Kilcoyne CM, et al. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation*. 2002 Jan 29;105(4):452-6.
87. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, C et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation*. 1998 Mar 3;97(8):752-6.

88. Cardillo C, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, et al. Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Circulation*. 1998 Mar 10;97(9):851-6.
89. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, et al. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med*. 1998 Mar 19;338(12):784-90.
90. Larivière R, Deng LY, Day R, et al. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1995 Oct;27(10):2123-31.
91. Giannessi D, Del Ry S, Vitale RL. The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res*. 2001 Feb;43(2):111-26.
92. Yang LL, Gros R, Kabir MG, et al. Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation*. 2004 Jan 20;109(2):255-61. Epub 2004 Jan 12.
93. Schwarz A, Godes M, Thöne-Reineke C, et al. Tissue-dependent expression of matrix proteins in human endothelin-1 transgenic mice. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Aug;103 Suppl 48:39S-43S.
94. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, et al. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch*. 1988 Nov;413(1):108-10.
95. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, et al. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation*. 1996 Mar 15;93(6):1214-22.
96. Mylona P, Cleland JG. Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 1999 Jun;1(2):197-200.
97. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*. 2005 Jun;43(1):19-29.
98. Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, et al. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. *Hypertension*. 2008 Sep;52(3):452-9. Epub 2008 Aug 4.
99. Dickstein K, De Voogd HJ, Miric MP, et al. Effect of single doses of SLV306, an inhibitor of both neutral endopeptidase and endothelin-converting enzyme, on pulmonary pressures in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 2004 Jul 15;94(2):237-9.
100. Sumeray MS, Rees DD, Yellon DM. Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Jan;32(1):35-42.

101. Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):509-17.
102. Arnal JF, el Amrani AI, Chatellier G, et al. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 1993;22:380– 7.
103. Moreno Jr H, Metze K, Bento AC, et al. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res Cardiol* 1996;91:248– 55.
104. Wenzel S, Rohde C, Wingerning S, et al. Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes.; *Hypertension*. 2007 Jan;49(1):193-200. Epub 2006 Oct 30.
105. Gödecke A, Decking UK, Ding Z, et al. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res*. 1998 Feb 9;82(2):186-94.
106. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):13176-81
107. Ruetten H, Dimmeler S, Gehring D, et al. Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2005 Jun 1;66(3):444-53.
108. Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, et al. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):291-9.
109. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, et al. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growthpromoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* 1998;101:812– 8.
110. Shah AM. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthase in cardiac hypertrophy and chamber dilatation? *Cardiovasc Res*. 2005 Jun 1;66(3):421-2.
111. Heineke J, Kempf T, Kraft T, et al. Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide: impact on cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation*. 2003 Mar 18;107(10):1424-32.
112. Fiedler B, Wollert KC. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2004 Aug 15;63(3):450-7.
113. Renale Anämie als kardialer Risikofaktor «Wenn die Niere aufs Herz schlägt». Jäger C, Binet I. Medien & Medizin Verlag MMV AG, Basel; CME, Zertifizierte Fortbildung, CARDIOVASC, veröffentlicht Juni 2006 auf: http://www.springer-medizin.ch/pdf/cme_cv_6_06.pdf,

114. Silbernagl S, Despopoulos A. Tubuloglomeruläre Rückkopplung, Renin-Angiotensin-System. In: Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. 5. Auflage, Stuttgart, Deutschland. Georg Thieme Verlag. 2001. 184-185
115. Harnapparat. e-learning der Universität Freiburg. Prof. B. Schwaller. Faculty of Sciences, Departement de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg, Pérolles, CH-1705 Fribourg, Suisse veröffentlicht 5. April 2005
<http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/harnapparat/niere/d-niere.php>
116. Nieren und Bluthochdruck. Website der Gesellschaft für Nephrologie. Download am 23.06.2009
<http://www.nierengesellschaft.de/patienten/bluthochdruck.html?h=3&&u=2&&uu=1>
117. Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, et al. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol Pharmacol*. 2000 Jun;57(6):1104-13.
118. Burkhart M, Barton M, Shaw SG. Receptor- and non-receptor-mediated clearance of big-endothelin and endothelin-1: differential effects of acute and chronic ETA blockade. *J Hypertens* 18: 273–279, 2000.
119. Garipey CE, Ohuchi T, Williams SC, et al. Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest*. 2000 Apr;105(7):925-33..
120. Ge Y, Stricklett PK, Hughes AK, et al. Collecting duct-specific knockout of the endothelin A receptor alters renal vasopressin responsiveness, but not sodium excretion or blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Oct;289(4):F692-8.
121. Ge Y, Bagnall A, Stricklett PK, et al. Collecting duct-specific knockout of the endothelin B receptor causes hypertension and sodium retention. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Dec;291(6):F1274-80.
122. Ito S, Carretero OA, Abe K. Role of nitric oxide in the control of glomerular microcirculation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997 Aug;24(8):578-81.
123. Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol*. 1995 May;268(5 Pt 2):F885-98.
124. Ujiie K, Yuen J, Hogarth L, et al. Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am J Physiol*. 1994 Aug;267(2 Pt 2):F296-302.
125. Mundel P, Bachmann S, Bader M, et al. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int*. 1992 Oct;42(4):1017-9.

126. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, et al. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):11993-7.
127. Forbes MS, Thornhill BA, Park MH, et al. Lack of endothelial nitric-oxide synthase leads to progressive focal renal injury.; *Am J Pathol*. 2007 Jan;170(1):87-99.
128. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995 Jul 27;333(4):214-21.
129. Lutz J, Gorenflo M, Habighorst M, et al. Endothelin-1- and endothelin-receptors in lung biopsies of patients with pulmonary hypertension due to congenital heart disease. *Clin Chem Lab Med*. 1999 Apr;37(4):423-8.
130. Glassberg MK, Ergul A, Wanner A, et al. Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Mar;10(3):316-21.
131. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, et al. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Jul;23(1):19-26.
132. Stähler G. Specific drugs for the treatment of pulmonary arterial hypertension - current status. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008 Oct;133 Suppl 6:S183-6.
133. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, et al. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation*. 1994 May;89(5):2035-40.
134. Han RN, Stewart DJ. Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Trends Cardiovasc Med*. 2006 Jan;16(1):29-34.
135. Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, et al. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):291-9.
136. Wagner F, Buz S, Neumeyer HH, et al. Nitric oxide inhalation modulates endothelin-1 plasma concentration gradients following left ventricular assist device implantation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 Nov;44 Suppl 1:S89-91.
137. Kobzik L, Translating NO biology into clinical advances: still searching for the right dictionary? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Jul;41(1):9-13. Epub 2009 May 15.
138. Channick RN, Newhart JW, Johnson FW, et al. Pulsed delivery of inhaled nitric oxide to patients with primary pulmonary hypertension: an ambulatory delivery system and initial clinical tests. *Chest*. 1996 Jun;109(6):1545-9.
139. Lepore JJ, Maroo A, Bigatello LM, et al. Hemodynamic effects of sildenafil in patients with congestive heart failure and pulmonary hypertension: combined administration with inhaled nitric oxide. *Chest*. 2005 May;127(5):1647-53.

140. Oishi P, Grobe A, Benavidez E, et al. Inhaled nitric oxide induced NOS inhibition and rebound pulmonary hypertension: a role for superoxide and peroxynitrite in the intact lamb. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Feb;290(2):L359-66.
141. Ferri C, Carlomagno A, Coassin S, et al. Circulating endothelin-1 levels increase during euglycemic hyperinsulinemic clamp in lean NIDDM men. *Diabetes Care*. 1995 Feb;18(2):226-33.
142. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al. Production of endothelin-1 from mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 1991;48:2553-6.
143. Berthiaume N, Mika A, Zinker B. Development of insulin resistance and endothelin-1 levels in the Zucker fatty rat. *Metabolism* 2003; 52:845 - 9.
144. Berthiaume N, Carlson CJ, Rondinone CM, et al. Endothelin antagonism improves hepatic insulin sensitivity associated with insulin signaling in Zucker fatty rats. *Metabolism*. 2005 Nov;54(11):1515-23.
145. Sasser JM, Sullivan JC, Hobbs JL, et al. Endothelin A receptor blockade reduces diabetic renal injury via an anti-inflammatory mechanism. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jan;18(1):143-54. Epub 2006 Dec 13.
146. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, et al. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol*. 1997 Sep;151(3):831-41.
147. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 2:S2.
148. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G et al. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets—a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol* 1994;21:1838–44.
149. Quaschnig T, Koçak S, Bauer C, et al. Increase in nitric oxide bioavailability improves endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Mar;18(3):479-83.
150. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, et al. Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med*. 2002 Feb;80(2):105-16. Epub 2001 Nov 8.
151. Hocher B, Liefeldt L, Thöne-Reineke C, et al. Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *Hypertension*. 1996 Aug;28(2):196-201.

152. Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, et al. ETA receptor mediates altered leukocyte-endothelial cell interaction and adhesion molecules expression in DOCA-salt rats. *Hypertension*. 2004 Apr;43(4):872-9. Epub 2004 Mar 1.
153. Quaschnig T, Voss F, Relle K, et al. 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*. 2007 Mar;18(3):730-40.
154. van Harmelen V, Eriksson A, Aström G, et al. Vascular peptide endothelin-1 links fat accumulation with alterations of visceral adipocyte lipolysis. *Diabetes*. 2008 Feb;57(2):378-86.
155. Eriksson AK, van Harmelen V, Stenson BM, et al. Endothelin-1 stimulates human adipocyte lipolysis through the ET A receptor. *Int J Obes (Lond)*. 2009 Jan;33(1):67-74.
156. van Eickels M, Grohé C, Cleutjens JP, et al. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 2001 Sep 18;104(12):1419-23.
157. Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, et al. 17 Beta-estradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium in-vitro and in-vivo. *Cardiovasc Res*. 1999 Aug 15;43(3):666-74.
158. Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, et al. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(29):27071-6.
159. Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, et al. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res*. 2002 Feb 15;53(3):709-19.
160. Brosnihan KB, Weddle D, Anthony MS, et al. Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys. *J Hypertens*. 1997 Jul;15(7):719-26.
161. Erkrankungen des Endo, Myo- und Perikards. B. Maisch, M. Herzum, G. Hufnagel. In: Fölsch, Kochsiek, Schmidt. *Pathophysiologie*; Springer Verlag, Deutschland, März 2000, S. 87-110
162. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, et al. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*. 1991 Dec;5(15):3037-46.
163. Burnett JC Jr, Kao PC, Hu DC, et al. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science*. 1986 Mar 7;231(4742):1145-7.

164. You HW, Chen X, You HJ, et al. Role of endothelin-1 and its receptors on hypertrophy or proliferation of cultured cardiac cells. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2006 Aug;28(4):520-3.

165. Glenn DJ, Wang F, Chen S, et al. Endothelin-stimulated human B-type natriuretic peptide gene expression is mediated by Yin Yang 1 in association with histone deacetylase 2. *Hypertension*. 2009 Mar;53(3):549-55. Epub 2009 Jan 12.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Flächeninhalt
ACE	<i>engl.: angiotensin-converting enzyme</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANP	<i>engl.: atrial natriuretic peptide</i>
AP1-Jun	<i>engl.: activator protein-1-Jun</i>
ARDS	<i>engl.: Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , Atemnot-Syndrom des Erwachsenen
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	<i>engl.: brain natriuretic peptide</i>
bpm	<i>engl.: beats per minute</i> , Schläge pro Minute
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i> , Oberflächenantigene von Zellen der Immunantwort
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CTGF	<i>engl.: connective tissue growth factor</i>
DAG	Diacylglycerin
DCM	<i>engl.: dilated cardiomyopathy</i> , Dilatative Kardiomyopathie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCA	Deoxycorticosteron-Acetat
dPdt max	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
dPdt min	minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit
ECE	<i>engl.: endothelin-converting enzyme</i> , Endothelin-konvertierendes Enzym
ECE	Endothelin-konvertierenden Enzym
ECE-1	Endothelin-konvertierenden Enzym-1
ECE-2	Endothelin-konvertierenden Enzym-2
ECE-3	Endothelin-konvertierenden Enzym-3
EDRF	<i>engl.: endothelium derived relaxing factor</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENABLE	<i>engl.: Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Cardiac Events in Heart Failure</i>
eNOS	Typ3-NOS; endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS -/-	homozygoter Knockout der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS-/- ET+/+	homozygot human-ET-transgen und zusätzlicher homozygoter eNOS-knockout
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
ERE	<i>engl.: estrogen responsive element</i>
ET	Endothelin
ET+/+	homozygot human-ET1-transgen
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET3	Endothelin-3
ETA-Rezeptor	Endothelin-A-Rezeptor
ETB-Rezeptor	Endothelin-B-Rezeptor
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinasen
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/n
HE	Hematoxylin-Eosin
ICAM	<i>engl.: integrin cell adhesion molecule</i>
Ile	Isoleucin
iNOS	Typ2-NOS; induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3	Inositoltrisphosphat
kb	kilo Basen
L-NAME	N ω -Nitro-L-Arginin Methylester
L-NMMA	NG-monomethyl-L-arginine
LVEDP	<i>engl.: left ventricular end diastolic pressure</i> , linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVP max	<i>engl.: systolic left ventricular pressure</i> , linksventrikulärer maximaler systolischer Druck

LVP min	<i>engl.: diastolic left ventricular pressure</i> , linksventrikulärer maximaler diastolischer Druck
M	Mol
m	männlich
min	Minute
MLP	<i>engl.: Myosin-like-Protein</i>
mmHg	Millimeter Quecksilber
MMP2	Matrix-Metalloproteinase 2
MMP9	Matrix-Metalloproteinase 9
mRNA	<i>engl.: messenger ribonucleic acid</i> , messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEP	neutrale Endopeptidase, Enzym, welches ANP und BNP abbaut
NFAT	<i>engl.: nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>engl.: nuclear factor kappa B</i>
nNOS	Typ1-NOS; neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>engl.: nitric oxide synthase</i> , Stickstoffmonoxid-Synthase
PAH	pulmonal-arterieller Hypertonie
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	<i>engl.: polymerase chain-reaction</i>
PKA	Protein-Kinase A
PKC	Protein-Kinase C
prepro-ET-mRNA	prepro-Endothelin-messenger-Ribonukleinsäure
r	Radius
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REACH	<i>engl.: Research on Endothelin Antagonism in Chronic Heart Failure</i>
RNAi	RNA-Interferenz, kleine RNA-Oligonukleotide, welche u.a. an mRNA-Moleküle eines Zielgens binden und bei diesen die Translation hemmen können
ROCK	<i>engl.: Rho-associated coiled coil containing protein kinase</i> , auch als Rho-Kinase bezeichnet
ROS	<i>engl.: reactive oxygen species</i>
s oder sek	Sekunde
SD	<i>engl.: standard deviation</i> , Standardabweichung

SHR	Spontan-hypertensive Ratten
Tau	Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls
TGF- β	engl.: transforming growth-factor beta
TNF- α	engl.: tumor-necrosis-factor alpha
Trp	Tryptophan
U	Umfang
Upm	Umdrehungen pro Minute
Val	Valin
VCAM	engl.: <i>vascular cell adhesion molecule</i> ICAM
VEGF	engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>
w	weiblich
WT	Wildtyp-Kontrolltiere
z.B.	zum Beispiel
5+9	Versuchsserie mit Mäusen, in der ein Teil der Tiere 5 Monate alt war und ein Teil der Tiere 9 Monate
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

8 Danksagung

Ich möchte ganz herzlich Prof. Dr. Berthold Hoher danken, der diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat, und zusammen mit Dr. Markus Alter, Dr. Thiemo Pfab und Dr. Philipp Kalk, mir bei der Durchführung und dem Abfassen dieser Dissertation mit Ideen, Rat und Tat beiseite gestanden hat.

Ich möchte allen meinen Kollegen danken, die mir nicht nur in vielerlei Hinsicht praktisch geholfen haben, sondern auch durch ihre freundliche Art immer dafür gesorgt haben, dass ich gern mit ihnen zusammengearbeitet habe.

Außerdem möchte ich Elodie Kienlen danken für die angenehme Zusammenarbeit bei der Durchführung der Herzkathetermessungen, welche ohne ihre Geschicklichkeit nicht möglich gewesen wären.

Ganz besonders herzlich möchte ich meiner Familie danken, die mich bei allen meinen Entscheidungen immer ermutigt und unterstützt hat.

9 Publikationsliste

1. Kalk P, Godes M, Relle K, Rothkegel C, Hucke A, Stasch JP, Hocher B. NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol*. 2006 Jul;148(6):853-9. Epub 2006 Jun 12.
2. Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle J, Hocher B. 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*. 2007 Mar;18(3):730-40. Epub 2007 Feb 7.
3. Hocher B, Liefeldt L, Quaschnig T, Kalk P, Ziebig R, Godes M, Relle K, Asmus G, Stasch JP. Soluble CD154 is a unique predictor of nonfatal and fatal atherothrombotic events in patients who have end-stage renal disease and are on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Apr;18(4):1323-30. Epub 2007 Feb 21.
4. Slowinski T, Kalk P, Christian M, Schmager F, Relle K, Godes M, Funke-Kaiser H, Neumayer HH, Bauer C, Theuring F, Hocher B. 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*. 2007 Jun 15;581(Pt 3):1173-81. Epub 2007 Mar 29.
5. Kalk P, Eggert B, Relle K, Godes M, Heiden S, Sharkovska Y, Fischer Y, Ziegler D, Bielenberg GW, Hocher B. The adenosine A1 receptor antagonist SLV320 reduces myocardial fibrosis in rats with 5/6 nephrectomy without affecting blood pressure. *Br J Pharmacol*. 2007 Aug;151(7):1025-32. Epub 2007 Jun 11.
6. Quaschnig T, Voss F, Herzfeld S, Relle K, Kalk P, Godes M, Pfab T, Kraemer-Guth A, Bonz AW, Theuring F, Galle J, Hocher B. Lack of iNOS impairs endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. *Kidney Blood Press Res*. 2008;31(2):127-34. Epub 2008 Apr 7.
7. Kalk P, Westermann D, Herzfeld S, Relle K, Pfab T, Bauer C, Tschöpe C, Stasch JP, Hocher B. Additional lack of iNOS attenuates diastolic dysfunction in aged ET-1 transgenic mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008 Jun;86(6):353-7.
8. Heiden S, Pfab T, von Websky K, Vignon-Zellweger N, Godes M, Relle K, Kalk P, Theuring F, Zidek W, Hocher B. Tissue specific activation of the endothelin system in severe acute liver failure. *Eur J Med Res*. 2008 Jul 28;13(7):327-9.

9. Kalk P, Mach A, Thone-Reineke C, Godes M, Heiden S, Sharkovska Y, von Websky K, Relle K, Hocher B. Pulmonary fibrosis in L-NAME-treated mice is dependent on an activated endothelin system. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008 Aug;86(8):541-5.

10. Kalk P, Guthmann F, Krause K, Relle K, Godes M, Gossing G, Halle H, Wauer R, Hocher B. Impact of maternal body mass index on neonatal outcome. *Eur J Med Res.* 2009 May 14;14(5):216-22.

Erklärung

Ich, Katharina Krause-Relle, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
„Hämodynamische Charakterisierung und Beschreibung des kardialen Phänotyps eines
Mausmodells mit eNOS-Knockout und gleichzeitiger Überexpression von human-Endothelin-
1“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt,
ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer
Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift