

**Aus dem Center for Cardiovascular Research Charité Campus Mitte,**

**Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin,**

**eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie**

**des Fachbereichs Veterinärmedizin**

**der Freien Universität Berlin**

**Einfluss eines zusätzlichen iNOS knockouts auf den kardialen Phänotyp von  
human Endothelin-1 transgenen Mäusen**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines**

**Doktors der Veterinärmedizin**

**an der**

**Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von Sophia Herzfeld**

**Tierärztin aus Berlin**

**Berlin 2007**

**Journal-Nr.: 3169**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Holger Martens  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Berthold Hocher  
Dritter Gutachter: Univ.- Prof. Jürgen Zentek

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

blood pressure, nitric oxide, transgenic animals, mice, animal  
models, heart diseases, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 25.04.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN-13: 978-3-86664-257-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2007  
D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten

© **mbv** 2008

nordendstr. 75 - 13156 berlin – 030-45494866  
verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meiner Familie



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>5</b>
1.1	Das Endothelinsystem	5
1.1.1	Entdeckung und Aufbau der Endotheline	5
1.1.2	Lokalisation und Synthese	7
1.1.3	Endothelinrezeptoren	12
1.1.3.1	Allgemein	12
1.1.3.2	Der ETA-Rezeptor	12
1.1.3.3	Der ETB-Rezeptor	13
1.1.3.4	Abbau der Endotheline	15
1.1.4	Rolle des Endothelins im kardiovaskulären System	15
1.1.5	Human Endothelin-1 transgene Mäuse	19
1.1.6	Stickstoffmonoxid	19
1.1.7	Wechselwirkung von NO und Endothelin	21
1.1.8	Generation von iNOS knockout Mäusen	24
1.1.9	Phänotyp der iNOS knockout Mäuse	24
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>26</b>

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1	Material	27
3.1.1	Geräte	27
3.1.2	Chemikalien	29
3.2	Methoden	32
3.2.1	Züchtung	32
3.2.2	Tierhaltung	34
3.2.3	Genotypisierung	34
3.2.3.1	Blutentnahme	34
3.2.3.2	DNA-Isolierung	35
3.2.3.3	PCR Amplifikation	35
3.2.3.4	Agarosegelelektrophorese	39
3.2.4	BNP Konzentration im Plasma	41
3.2.5	Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig	42
3.2.6	Nicht-invasive Blutdruckmessung	43
3.2.7	Herzkatheter	44
3.2.7.1	Das Druck-Volumen-Diagramm	45
3.2.7.2	Das Modell des Herzkatheters	47
3.2.7.3	Die Ermittlung der Parallelen Conductance (GP)	48

3.2.7.4	Okklusion der Vena cava (inferior)	49
3.2.7.5	Präparation und Versuchsablauf	53
3.2.8	Histologische Methoden	55
3.2.8.1	Fixierung	55
3.2.8.2	Paraffineinbettung	55
3.2.8.3	Färbung	57
3.2.9	Statistik	63
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
4.1	Körper-und Organgewichte	64
4.2	Blutdruckmessung	67
4.3	Blutparameter	69
4.3.1	Plasmawerte	69
4.3.2	BNP	70
4.4	Urinparameter	71
4.5	Herzkatheter – Parameter	72
4.6	Histologische Parameter des Herzens	78
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>91</b>

<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>112</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen</b>	<b>116</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>117</b>
<b>12</b>	<b>Erklärung</b>	<b>118</b>



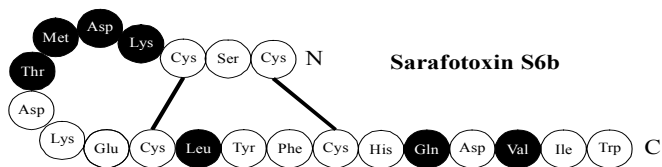
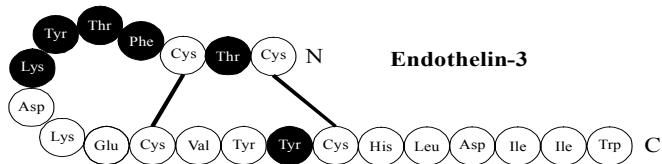
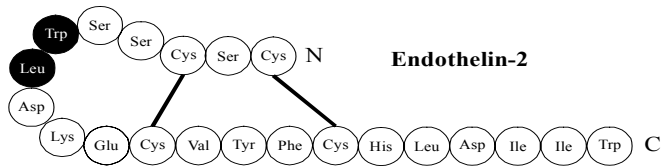
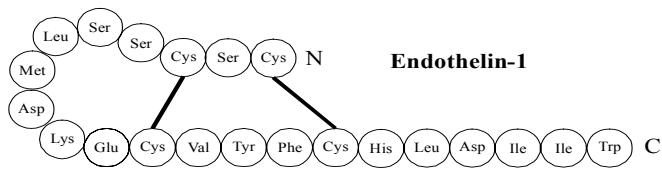
# 1 Literaturübersicht

## 1.1 Das Endothelinsystem

### 1.1.1 Entdeckung und Aufbau der Endotheline

Aus dem Überstand von kultivierten Schweineaortenzellen wurde 1988 von Yanagisawa et al. <sup>1</sup> ein vasoaktives Peptid isoliert und beschrieben. Der Name Endothelin leitet sich von seinem Bildungsort dem Endothel ab. Durch Vergleich von Sequenzen in cDNA-Datenbanken mit der Sequenz von Endothelin wurden zwei weitere Isoformen des Endothelins entdeckt <sup>2,2,3</sup>. Das zuerst beschriebene Endothelin wird Endothelin-1 (ET-1) genannt, die beiden anderen Isoformen Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3).

Endotheline sind autokrin und parakrin wirkende Gewebshormone, mit einer Molmasse von 2,5 kDa. Sie sind aus 21 Aminosäuren aufgebaut, zwei intramolekulare Disulfidbrücken führen zur charakteristischen Haarnadelform (s. Abb.1). Die drei Isoformen dieses Peptides unterscheiden sich in einer geringfügig unterschiedlichen Aminosäuresequenz: ET-1 und ET-2 differieren in 2 Aminosäuren, ET-1 und ET-3 in 6 Aminosäuren <sup>3</sup> (s. Abb.1). Die Endothelinpeptide weisen eine hohe Sequenz- und Bioaktivitätshomologie mit einer Familie von Peptidtoxinen, den Sarafotoxinen, auf, die aus dem Gift der *Atractaspis engaddensis* isoliert worden sind <sup>4</sup> (s. Abb.1). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese beiden Peptidfamilien aus einer Gen-Superfamilie mit gemeinsamem evolutionären Ursprung abgeleitet sind <sup>5,6</sup>. Die hohe Sequenzhomologie zwischen den Endothelinen und den Sarafotoxinen, sowie zwischen Endothelinen in verschiedenen Säugetierspezies läßt vermuten, dass die Endothelin-Gene unter einem hohen evolutionären Druck in Richtung auf Erhaltung der Struktur und der Funktion der Endothelin-Peptide standen <sup>7</sup>.



**Abb. 1: Strukturformel des ET-1, ET-2, ET-3 und zum Vergleich die des Schlangengiftes Sarafotoxin S6b<sup>5</sup>.**

*Die von der Aminosäuresequenz des ET-1 abweichenden Aminosäuren sind schwarz dargestellt.*

### 1.1.2 Lokalisation und Synthese

Die Gene der Endothelinisopeptide (ET-1, ET-2, ET-3) sind beim Menschen auf den Chromosomenabschnitten 6p23-24, 1p34 und 20q13.2-13.3 lokalisiert <sup>8</sup>.

Das Gen setzt sich zusammen aus fünf Exons und 4 Introns. Die kodierende Sequenz für ET-1 ist im zweiten Exon enthalten. Die 5'-flankierende Region enthält regulatorische Elemente, wie zum Beispiel AP-1 Bindungsstellen für c-fos/c-jun-Komplexe und Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor *nuclear factor-1*. Die 3'-flankierende Region des ET-1-Gens enthält einen Abschnitt aus ungefähr 250 Basenpaaren mit hoher Sequenzhomologie zwischen Mensch und Schwein, welcher wahrscheinlich eine wichtige Bedeutung für die Stabilität der ET-1-mRNA hat <sup>9</sup>.

Es sind bisher keine Speichergranula für Endotheline nachgewiesen worden <sup>10</sup>. Die Regulation der Biosynthese findet auf der Ebene der mRNA statt. Die Promotorregion des Endothelins hat typische GAAT- und TATA-Sequenzen, die die Transkription stimulieren. Sie enthalten eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor, das GATA-2-Protein <sup>11</sup>, das eine entscheidende Rolle in der basalen Produktion von ET-1 in endothelialen Zellen spielt.

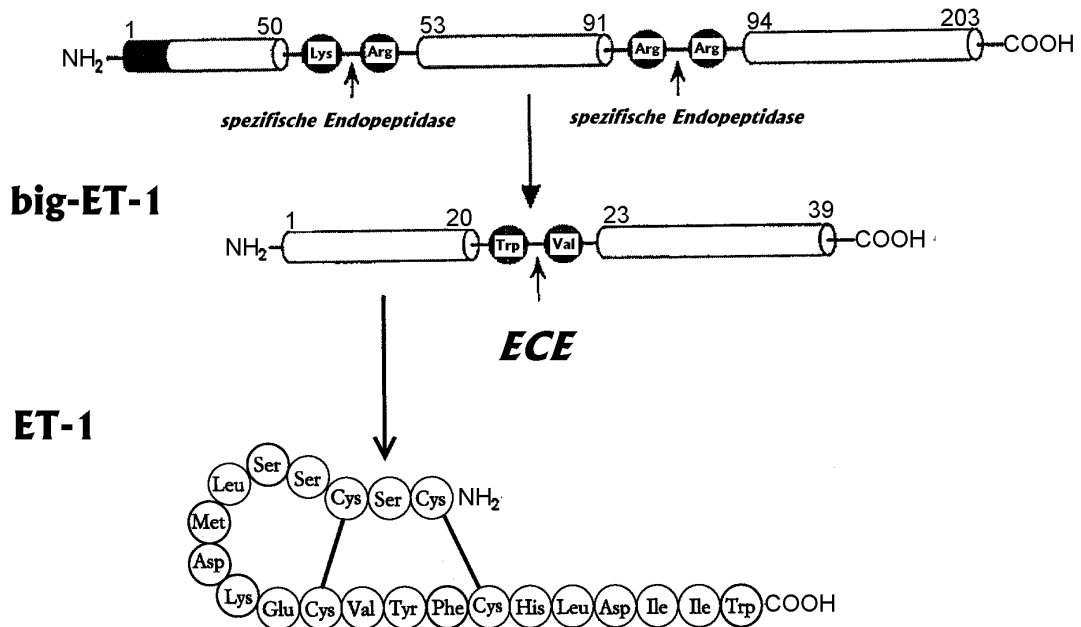
Das primäre Transkriptionsprodukt des Endothelins ist Präpro-Endothelin-mRNA. Diese wird translatiert in Präpro-Endothelin, welches beim Menschen aus 212 Aminosäuren besteht. Nach proteolytischer Spaltung durch spezifische Endopeptidasen entsteht das aus 38 Aminosäuren bestehende Proendothelin, welches auch Big-Endothelin genannt wird <sup>12-14</sup>. Big-Endothelin wird durch ein Endothelin-Konversionsenzym (ECE) zum biologisch aktiven Endothelin gespalten (s. Abb. 2). Zwei Isoenzyme des ECE (ECE-1 und ECE-2) konnten identifiziert werden <sup>15,16</sup>. Das ECE ist wahrscheinlich spezifisch für Big-Endothelin. Die relative Konversionsrate von Big-endothelin zu Endothelin beträgt ET-1 : ET-2 : ET-3, 4 : 1 : 2.

Vergleicht man die Sequenz der extrazellulär vorkommenden Form des Endothelinkonversionsenzyms (ECE-1) mit der des intrazellulären Endothelinkonversionsenzyms (ECE-2), so ergeben sich im N-terminalen Bereich 52% und im C-terminalen Bereich 72% Sequenzhomologie.

Die Enzyme differieren in der Anzahl ihrer Aminosäuren (ECE-1 = 758 und ECE-2 = 787 Aminosäuren), in der Aminosäuresequenz der transmembranären Domäne (ECE-1 = 21 Aminosäuren und ECE-2 = 23 Aminosäuren), im pH-Optimum (ECE-1 = pH 6,8 und ECE-2 = pH 5,4), in der Lokalisation (ECE-1 in der Plasmamembran und extrazellulär und ECE-2 nur intrazellulär am Golgiapparat) und im Vorkommen (ECE-1 in Lunge, Herz, Pankreas, Plazenta und endothelialen Zellen und ECE-2 in Gehirn, Uterus und Hoden).

Es wird angenommen, dass es von ECE weitere Subtypen gibt, die spezifisch die Konversion von ET-2 und ET-3 katalysieren.

## präpro-ET-1



**Abb. 2: Umwandlung von prä-pro-Endothelin-1 zu Endothelin-1**

*Präpro-Endothelin-1 (prä-pro-ET-1) besteht aus 203 Aminosäuren. Nach Spaltung durch spezifische Endopeptidasen entsteht Pro-Endothelin-1 (in der Regel Big-Endothelin-1 genannt). Big-Endothelin-1 wird durch ein Endothelin-Konversionsenzym (ECE; endothelin converting enzyme) zum biologisch aktiven Endothelin-1 gespalten. Diese Spaltung von Big-Endothelin-1 zum biologisch aktiven Endothelin-1 ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Endothelinsynthese (nach<sup>17</sup>).*

Entgegen der ursprünglichen Annahme, das Endothel sei der einzige Synthesort für ET-1, konnte gezeigt werden, dass ET-1 von Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, der Niere, der Leber, des Herzens, der Lunge, des Gastrointestinaltraktes, der Nebennieren, der Prostata, der Augen und der Epidermis gebildet wird<sup>13,18-22</sup>.

Die Syntheserate der Endothelinisopeptide ist in verschiedenen Organen deutlich different. So konnte gezeigt werden, dass ET-3 vornehmlich im zentralen Nervensystem, der Hypophyse und im Darm exprimiert wird. ET-1 hingegen wird hauptsächlich vom Endothel der Gefäße gebildet<sup>1,13</sup>. Das in den Endothelzellen der Gefäße synthetisierte ET-1 wird zu 20% luminal und zu 80% basolateral sezerniert<sup>17,23</sup>.

Bezüglich intrarenaler Gefäße wurde gezeigt, dass das Endothel ET-1, nicht jedoch ET-3 freisetzt<sup>24</sup>. Mesangiumzellen in Kultur zeigen eine Synthese und Freisetzung von ET-1, wenn auch in einer deutlich geringeren Menge als Endothelzellen<sup>25,26</sup>. Mesangiumzellen können also wie die phylogenetisch verwandten glatten Gefäßmuskelzellen ET-1 bilden<sup>27</sup>. Für glomeruläre epitheliale Zellen wurde gezeigt, dass sie sowohl ET-1 als auch ET-3 bilden können<sup>28</sup>. Als Ort der höchsten ET-1 Konzentration im menschlichen Körper wurde die innere renale Medulla beschrieben<sup>29</sup>. Die Zellen, die zu dieser hohen Konzentration hauptsächlich beitragen, befinden sich im Bereich der Sammelrohre, hier insbesondere an den inneren medullären Sammelrohren (IMCD)<sup>30</sup>. Dort ist ebenfalls der renale Hauptsyntheseort für ET-3, wobei diese Isoform jedoch in deutlich geringeren Maße synthetisiert wird<sup>31</sup>. Eine Synthese von ET-2 wurde im menschlichen Nephron nicht nachgewiesen<sup>32</sup>.

Im Herz wird hauptsächlich ET-1 synthetisiert von Kardiomyozyten, Endothelzellen und kardialen Fibroblasten<sup>33</sup>.

Eine Reihe von Faktoren regulieren die Freisetzung von ET-1. Die Regulierung der ET-1 Freisetzung erfolgt über die Regulierung der Präpro-ET-1-mRNA Synthese<sup>1</sup>.

Wichtige Stimuli, die die Freisetzung von Endothelin-1 in vitro und in vivo induzieren, sind:

1. **Peptidhormone:** Thrombin <sup>24</sup>, TGF- $\alpha$  <sup>34</sup>, Angiotensin II <sup>32</sup>, Insulin <sup>35</sup>, Bradykinin <sup>24</sup>, Vasopressin <sup>36</sup>, Endotoxine <sup>37</sup> und Cytokine wie Interleukin 2<sup>38</sup>.
2. **Hypoxie** <sup>39</sup>
3. **Pharmaka:** Cyclosporin A <sup>40</sup>, Glukokortikoide, Glukose <sup>41</sup> und Ca<sup>2+</sup>-Ionophoren <sup>1</sup>.
4. **Physikalische Faktoren:** Gefäßwandspannung und Scherkräfte <sup>42</sup>.

Der wichtigste Inhibitor der ET-1 Synthese ist der physiologische Gegenspieler von ET-1, Stickstoffmonoxid (NO). NO hemmt über seinen zweiten Botenstoff cGMP die Bildung der Präpro-ET-1-mRNA. Andere Mediatoren die ebenfalls die cGMP-Synthese erhöhen, wie atrialer natriuretischer Faktor (ANF) und Prostacyclin, hemmen auch die ET-1-Synthese. ET-1 stimuliert wiederum durch Interaktion mit dem ETB-Rezeptor die Synthese von NO. NO und ET-1 sind damit Teile eines lokalen negativ-rückgekoppelten Regelkreises <sup>1</sup>. Weitere Inhibitoren der ET-1 Freisetzung sind Prostaglandin E2, Endothelin-3, Heparin und cAMP.

### 1.1.3 Endothelinrezeptoren

#### 1.1.3.1 Allgemein

Die biologischen Wirkungen von Endothelin werden durch plasmamembranständige Rezeptoren vermittelt. Drei Endothelinrezeptorsubtypen konnten bisher kloniert werden: Endothelin-A-, Endothelin-B- und Endothelin-C-Rezeptoren<sup>43-46</sup>. Der ETC-Rezeptor ist bisher nur im Xenopus Herz beschrieben worden<sup>47</sup>, ob er eine Speziesvariante des ETA- oder ETB-Rezeptors ist, oder einen neuen Subtyp darstellt, ist zur Zeit noch nicht eindeutig zu entscheiden<sup>48</sup>.

Die Aminosäuresequenzen der ETA- und ETB-Rezeptoren weisen eine 50%-ige Sequenzhomologie auf, die in verschiedenen Säugetierspezies hoch konserviert ist (85%-90%)<sup>49</sup>. Der ETA- und der ETB-Rezeptor gehören zur Familie der rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 transmembranären Regionen<sup>48</sup>.

Die unterschiedlichen Wirkungen der 3 Isopeptide ergeben sich aus der unterschiedlichen Gewebespezifität und Verteilung der plasmamembranständigen ETA- und ETB-Rezeptoren. Sie können synergistische und antagonistische Effekte vermitteln.

#### 1.1.3.2 Der ETA-Rezeptor

Der ETA-Rezeptor hat eine 100fach höhere Bindungsaffinität zum Endothelin-1 als zum Endothelin-3 und eine 2-10fach höhere Bindungsaffinität zum ET-1 als zum ET-2<sup>43</sup>.

Er wird überwiegend an glatten Gefäßmuskelzellen und an Herzmuskelzellen exprimiert. Dieser Rezeptor vermittelt vasokonstriktorische Wirkungen von Endothelin-1 über die G-Protein-gekoppelte Aktivierung von Phospholipase C mit konsekutiver Bildung von Inositol 1,4,5-Trisphosphat und Diacylglycerin<sup>1</sup>. Es folgt ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Neben der Vasokonstriktion kann durch die erhöhte Konzentration von Diacylglycerin und Kalzium die Proteinkinase C stimuliert werden, die mitogene

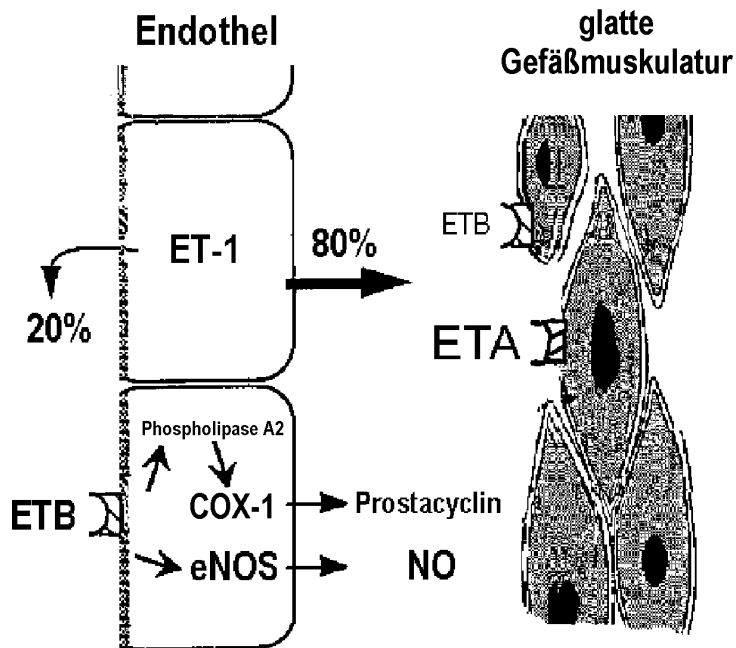


Effekte auslöst. Dies konnte bisher nur in vitro an Zellkulturen von Mesangiumzellen<sup>50</sup>, von glatten Gefäßmuskelzellen<sup>51</sup>, von Fibroblasten<sup>52</sup> und von Herzmuskelzellen<sup>53</sup> gezeigt werden.

### 1.1.3.3 Der ETB-Rezeptor

Der ETB-Rezeptor hat eine gleichstarke Bindungsaffinität zu den drei Endothelinisopeptiden<sup>54</sup>. Er wird überwiegend auf endothelialen Zellen exprimiert, weniger stark auf glatten Gefäßmuskelzellen<sup>54</sup>. Die second messenger Kaskade verläuft ähnlich wie beim ETA-Rezeptor. Es kommt jedoch zu unterschiedlichen biologischen Effekten, weil die Zellen mit unterschiedlichen Enzymen ausgestattet sind. Die Aktivierung der Phospholipase C führt zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und damit zur Aktivierung der kalziumabhängigen NO-Synthase. Die Freisetzung von NO bewirkt die initiale Vasodilatation<sup>48</sup>.

Weiterhin aktiviert der ETB-Rezeptor die Phospholipase A2, was sekundär zu einer Freisetzung von Arachidonsäurederivaten, insbesondere Prostazyklin, führt. Ist der ETB-Rezeptor mit einem inhibitorischen G-Protein gekoppelt, unterdrückt er in einigen Zellen die Entstehung von cAMP und die Aktivierung des Natrium-Protonen-Antiports<sup>55,56</sup>.



**Abb. 3: ET-System der Arterienwand:**

*Das in den Endothelzellen synthetisierte ET-1 wird zu 80% basolateral und zu 20% luminal sezerniert. Der ETB-Rezeptor auf den Endothelzellen vermittelt über die Phospholipase A<sub>2</sub> cyclooxygenaseabhängig (COX-1) und über die endotheliale NO-Synthase (eNOS) die ET-1 induzierte Vasodilatation. Auf den glatten Gefäßmuskelzellen wird überwiegend der ETA-Rezeptor exprimiert, welcher die Vasokonstriktion vermittelt. In einigen Gefäßregionen ist der ETB-Rezeptor auch auf glatten Gefäßmuskelzellen nachweisbar und vermittelt hier eine Vasokonstriktion<sup>57-60</sup>.*

#### 1.1.3.4 Abbau der Endotheline

Es sind bis heute im wesentlichen drei Mechanismen des Endothelinabbaus beschrieben worden<sup>50</sup>: der hydrolytische Abbau durch neutrale Endopeptidasen, der Abbau in Lysosomen und der Abbau von zirkulierendem Endothelin in der Lunge.

#### 1.1.4 Rolle des Endothelins im kardiovaskulären System

Endotheline unterscheiden sich von anderen bekannten Vasokonstriktoren durch eine biphasische Blutdruckantwort. Die intravenöse Infusion von ET-1, ET-2 und ET-3 führt zu einem mehrere Sekunden anhaltenden Blutdruckabfall, gefolgt von einem lang anhaltenden Anstieg des Blutdrucks<sup>61</sup>. Der initiale Abfall des Blutdrucks wird der vasodilatierenden Wirkung des ET<sub>B</sub>-Rezeptors über die Stimulation der NO-Synthasen und der Prostacyclin-Synthese zugeschrieben, der nachfolgende Anstieg der vasokonstriktorischen Wirkung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in glatten Gefäßmuskelzellen. Anzumerken ist, dass in mehreren Studien jedoch auch eine vasokonstriktorische ET<sub>B</sub>-Rezeptoraktivität gezeigt wurde<sup>62-64</sup>.

Der Verlauf der Endothelinwirkung auf den Blutdruck ist durch die ET-Rezeptorverteilung und durch die unterschiedlichen Effektor-Proteine in den Zellen der Gefäßwand erklärbar. Die über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor auf dem Gefäßendothel stimulierte NO- und Prostacyclin-Freisetzung beginnt rascher und ist schneller erschöpfbar. Die vornehmlich über den ET<sub>A</sub>-Rezeptor auf glatten Gefäßmuskelzellen vermittelte Vasokonstriktion beginnt hingegen langsamer und ist länger anhaltend<sup>51,65</sup>.

In verschiedenen Infusionsstudien an Tiermodellen der arteriellen Hypertonie (spontan hypertensive Ratten (SHR); Ratten mit Desoxycorticosteron induzierter Hypertonie (DOCA Salzhypertension)) ist untersucht worden, ob es eine Korrelation zwischen erhöhter Endothelinplasmakonzentration und der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Hypertonie gibt. Nur bei malignen Hochdruckerkrankungen von Mensch und Tier sowie bei der Präeklampsie lassen sich erhöhte

Plasmaendothelinspiegel nachweisen<sup>66,67</sup>. Diese Befunde besagen jedoch nicht, dass generell ein Zusammenhang zwischen Endothelin und arterieller Hypertonie bestehen muß. Außerdem ist zu bedenken, dass die Bestimmung der Endothelinkonzentration im Plasma nur bedingt aussagefähig ist, da es sich beim Endothelin um einen Mediator mit überwiegend parakriner und autokriner Wirkung handelt.

Angestiegene ET-1 und Big-ET-1 Plasmakonzentrationen sind bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, wie zum Beispiel bei Herzinsuffizienz, beschrieben worden. Dies suggeriert eine mögliche pathophysiologische Bedeutung<sup>68-71</sup>. In dieser Hinsicht beschrieben Pacher et al eine umgekehrte Korrelation zwischen dem Big- Endothelin-1 Plasmaspiegel und dem Überleben bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz und präsentierten damit einen stärkeren prognostischen Marker für Mortalität im Vergleich zu anderen hämodynamischen Variablen<sup>72</sup>. Es wurde gezeigt, dass die Expression von ET-1 und seine Rezeptoren in den Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz angestiegen ist. Übereinstimmend wurde ein Anstieg der Dichte der ETA- und ETB-Rezeptoren der Kardiomyozyten und ventrikulären Membranen und eine Überexpression von mRNA des Präpro-ET-1 und des ECE-1 der Kardiomyozyten bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie beschrieben<sup>73</sup>. Ferner konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress die Synthese von Big-ET-1 durch Aktivierung des ET-1 Promoters erhöht<sup>74</sup>.

Das natürliche Korrelat zu den Infusionsstudien sind endothelinproduzierende Hämangioendotheliome; sie führen zu einem Anstieg der Endothelinplasmakonzentration sowie des Blutdrucks. Diese Veränderungen gehen nach Entfernung des Hämangioendothelioms wieder zurück<sup>75</sup>. Somit weist diese Beobachtung darauf hin, dass Endothelin in der Lage ist, den mittleren arteriellen Blutdruck zu steigern.

In den Coronararterien führt ET-1 zu einer starken Vasokonstriktion und kann sekundär im Tier Kammerflimmern auslösen. Dieser Effekt ist vollständig blockierbar durch ETA-Rezeptor Antagonisten<sup>76</sup>.

Sehr gut korreliert der Endothelinplasmaspiegel bei hypertensiven Patienten mit dem Grad der Reduktion der glomerulären Filtrationsrate [GFR] <sup>77</sup>.

Weiterhin sprechen einige Beobachtungen dafür, dass zwischen der aktuellen ET-1 Konzentration und der Genese der Arteriosklerose ein Zusammenhang bestehen könnte <sup>78</sup>. Wird ET-1 über einen Ballonkatheter infundiert, so ließ sich lokal in diesem Bereich pathologisches Zellwachstum wie Neointimabildung mit nachfolgender Restenose nachweisen. Diese Wirkung kann durch selektiv wirkende ETA-Antagonisten aufgehoben werden <sup>79</sup>.

Vergleicht man die Wirkung von exogen zugeführten ET-1 auf den Blutdruck von normotensiven Ratten mit der von exogen zugeführten ET-1 auf verschiedene Rattenmodelle mit arteriellen Hypertonus, so ergibt sich kein einheitliches Bild. Gleiche Dosen an exogen zugeführten ET-1 führen zu einer verstärkten, gleichen oder auch herabgesetzten Vasokonstriktion in den verschiedenen Hochdruckmodellen, in verschiedenen Gefäßregionen und bei verschiedenen experimentellen Bedingungen <sup>80-82</sup>.

Untersuchungen mit ET-Antikörpern bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Vergleich zu normotensiven Kontrollen deuteten erstmals an, dass die Blockade des ET-Systems *in vivo* bei SHR zu einem Abfall des Blutdrucks und einem Anstieg der GFR und der Nierendurchblutung führen kann <sup>83</sup>.

Erst mit der Entwicklung selektiver ET-Rezeptorantagonisten wie BQ-123, gelang der Nachweis, dass die kurzzeitige systemische Gabe dieses selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten oder des kombinierten ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonisten Bosentan zu einem signifikanten Abfall des Blutdrucks bei SHR führte, wohingegen diese Antagonisten einen geringeren oder keinen Effekt auf den Blutdruck bei normotensiven Kontrollen hatte <sup>84,85</sup>.

Bei chronischer Applikation von Bosentan sah man allerdings keinen Effekt auf den Blutdruck bei SHR <sup>86</sup>. Die Ursache für den unterschiedlichen Effekt von akuter und chronischer Blockade des parakrinen Endothelin-Systems bei SHR bleibt unklar. In verschiedenen experimentellen Hochdruckmodellen konnte eine Aktivierung des

Endothelin-Systems nachgewiesen werden. Dies sind insbesondere Hochdruckmodelle, die eine durch eine Salzbelastung hervorgerufenen Hypertonie zeigen, wie Desoxykortikosteronacetat (DOCA) Salz-sensitive Ratten<sup>87</sup>, DOCA Salz behandelte spontan hypertensive Ratten (SHR)<sup>88</sup> und Dahl Salz-sensitive Ratten<sup>89,90</sup>. Die Blutdruckerhöhung bei Ratten nach Angiotensin II Infusion kann durch Gabe von ET-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden, was die Vermutung zuläßt, dass ein großer Teil der Angiotensin II-Wirkung über ET-1 vermittelt wird<sup>91</sup>. In Ren2 transgenen Ratten kann die durch das Transgen hervorgerufene Abnahme der kardialen Kontraktilität durch ET<sub>A</sub>-Antagonisten aufgehoben werden. Die Wirkung der ET<sub>A</sub>-Antagonisten besteht in diesem Modell in einer Zunahme der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration unter ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockade. Der erhöhte Blutdruck der transgenen Ratten wurde durch den ET<sub>A</sub>-Antagonisten hingegen nicht beeinflusst<sup>92</sup>. Im Modell der 2-Niere 1-Clip Goldblatt hypertensiven Ratten konnte eine Aktivierung des renalen Endothelin-Systems gezeigt werden<sup>93</sup>. Im selben Modell konnten Hoher et al<sup>94</sup> eine Regredienz der linksventrikulären kardialen Fibrose unter Behandlung mit ET<sub>B</sub>-Antagonisten und eine Normalisierung der Zunahme der Gefäßwanddicke intramyokardialer arterieller Gefäße unter ET<sub>B</sub>-Antagonismus zeigen. Der arterielle Blutdruck blieb auch in diesem letztgenannten Experiment unbeeinflusst. Im Modell der 2-Niere 1-Clip Goldblatt hypertensiven Ratten konnten im Einklang mit den genannten Arbeiten auch in der renin-abhängigen Frühphase keine generalisierte vaskuläre Überexpression von ET-1 nachgewiesen werden<sup>95</sup>. Der Zusammenhang von Endothelin- und Renin-Angiotensin-System ist also komplex und ihr Zusammenspiel noch nicht sicher geklärt. Durch exogen infundiertes Angiotensin II ist das Endothelin-System offensichtlich stimulierbar, wohingegen eine endogene Überexpression von Angiotensin II das blutdruckregulierende, vaskuläre Endothelin-System nicht involviert<sup>96</sup>.

Ein Ansatz zur genaueren Klärung der primären physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung des Endothelin-Systems ist die Untersuchung von transgenen Tiermodellen, die eine Überexpression oder Defizienz von Elementen des Endothelin-Systems aufweisen<sup>97</sup>.

### 1.1.5 Human Endothelin-1 transgene Mäuse

Human Endothelin-1 transgene Mäuse sind in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Theuring, Schering AG, generiert worden. Ein 16 kD Klon, der das gesamte menschliche Endothelin-1 Gen und ungefähr 8 kb der 5' flankierenden Sequenzen und 1,5 kb der 3' flankierenden Sequenzen enthält, wurde in befruchtete Mausoozyten aus NMRI Mäusen mikroinjiziert. Die mikroinjizierten Oozyten wurden in scheinchwangere NMRI Mäuse implantiert. Transgene Mäuse wurden durch PCR-Analysen genomischer DNA aus Schwanzbiopsien unter Verwendung human ET-1 spezifischer Primer und Southern-blot-Analysen identifiziert. Es wurden 3 Linien (260, 238, 856) etabliert. Tiere der Linie 856 standen für die in dieser Dissertation beschriebenen Experimente zur Verfügung.

Durch Northern-blot-Analysen konnte eine Expression des Transgens im Gehirn, Lungen und Nieren aller transgenen Linien nachgewiesen werden. Mit Hilfe der RT-PCR konnten niedrigere Niveaus der Transgenexpression im Herz, Leber, Speicheldrüsen, Milz und Hoden gezeigt werden. Der Phänotyp dieser Mäuse wurde 1997 von Hocher et al.<sup>98</sup> beschrieben. Die Tiere entwickeln altersabhängig renale Zysten, interstitielle Fibrose in den Nieren und Glomerulosklerose. Letzteres führt zu einem progressiven Abfall der Glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die Pathologie entwickelt sich trotz eines nur geringen Anstieges von ET-1 im Plasma und in den Geweben. Der Blutdruck ist nicht beeinträchtigt, auch nach der verschlechterten GFR nicht.

### 1.1.6 Stickstoffmonoxid

Der wichtigste Inhibitor der ET-1 Synthese ist der physiologische Gegenspieler Stickstoffmonoxid (NO). Ende der 70er Jahre wurde der Pharmakologe Ferid Murad erstmals auf das Stickstoffmonoxid (NO) aufmerksam. Bei Untersuchungen mit Nitraten entdeckte er, dass diese NO freisetzen, welches eine Dilatation der Blutgefäße bewirkt. Auch der Pharmakologe Robert F. Furchgott untersuchte die Auswirkungen von Medikamenten auf die Blutgefäße. Er fand heraus, dass das Endothel eine unbekannt Substanz produziert, die in der darunterliegenden

Muskelschicht deren Relaxierung herbeiführt. Da er die Substanz nicht bestimmen konnte, nannte er sie EDRF (Endothelium-derived relaxing Factor). Erst im Laufe der 80er Jahre gelang es dann, die unbekannte Substanz EDRF zu entschlüsseln. Unabhängig voneinander identifizierten Louis J. Ignarro<sup>112</sup>, R.M. Palmer<sup>113</sup> und Robert F. Furchgott EDRF als Stickstoffmonoxid<sup>114</sup>.

Der gasförmige sekundäre Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen. Viele der biologischen Aktivitäten von NO werden von dem Guanylatzyklase - cGMP System vermittelt. Wird NO auf einen Stimulus hin – zum Beispiel in Form von Bradykinin, Acetylcholin oder Scherkräften synthetisiert, diffundiert es anschließend in die angrenzenden Zellen der Gefäßwand. Dort aktiviert es die Guanylatzyklase und löst einen Anstieg der cGMP-Konzentration aus. Diese Reaktionskaskade vermittelt einige der biologischen Effekte von NO, inklusive der Relaxation vaskulären und nicht-vaskulären glatten Muskelzellen, Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation, Hemmung der Chemotaxis von polymorphnukleären Zellen und der Signalübertragung im zentralen und peripheren Nervensystem.<sup>115,116</sup> cGMP unabhängig dagegen sind z.B. die zytotoxischen Effekte von NO<sup>117</sup>. NO spielt damit eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Funktion<sup>118</sup>, ist involviert in die Regulation des Gefäßtonus<sup>119</sup> und der systolischer und diastolischen Herzfunktion<sup>120</sup>.

NO wird im Körper von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) durch eine NADPH-abhängige Oxidation der Guanidino-Stickstoffgruppe des L-Arginin mit Hilfe von molekularem Sauerstoff synthetisiert<sup>117,121</sup>. Bei der Reaktion sind mehrere Kofaktoren (FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin, Calmodulin) beteiligt, die u.a. für den Elektronentransfer vom NADPH auf das Substrat L-Arginin sorgen, das durch die Abspaltung von NO zu Citrullin umgewandelt wird<sup>122,123</sup>. Bisher konnten drei NOS-Formen identifiziert werden, die von drei unterschiedlichen Genen kodiert und in verschiedenen Zellarten u. a. im Herzen exprimiert werden<sup>124</sup>: die induzierbare (iNOS; NOS-2) und die endotheliale (eNOS; NOS-3) und die neuronale (nNOS; NOS-1) Synthase. In ihrer Struktur und Funktion sind sie sich jedoch recht ähnlich. So besitzen alle drei NOS-Formen eine N-terminale Oxygenase-Domäne sowie eine C-terminale Reduktase-Domäne, die strukturell dem Cytochrom P450 ähnelt<sup>122</sup>.



Weiterhin wurden für alle NOS-Formen die Bindungsstellen für die Kofaktoren und das Substrat L-Arginin sowie eine Homodimerisierungssequenz identifiziert <sup>125</sup>. Die zunächst aus Neuronen isolierte nNOS und die endotheliale eNOS werden in der Regel als konstitutive Formen angesehen, die nur geringe Mengen NO produzieren <sup>126</sup>. Demgegenüber gilt die iNOS in der Regel als induzierbares Enzym, das erst nach Stimulation durch Cytokine (z.B.  $\gamma$ -Interferon) oder bakterielle Lipopolysaccharide in Makrophagen in nennenswerten Mengen auftritt und dann hohe, antimikrobiell wirksame Konzentrationen an NO synthetisiert <sup>117,127</sup>. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Herzinsuffizienz kommt es zu einer hohen Freisetzung von NO, was zu einer Verschlechterung der Herzfunktion beitragen kann. Der Abbau von freiem NO in reaktiven Sauerstoff schädigt zelluläre Strukturen und fördert die Herzinsuffizienz und Apoptose<sup>128-130</sup>.

#### 1.1.7 Wechselwirkung von NO und Endothelin

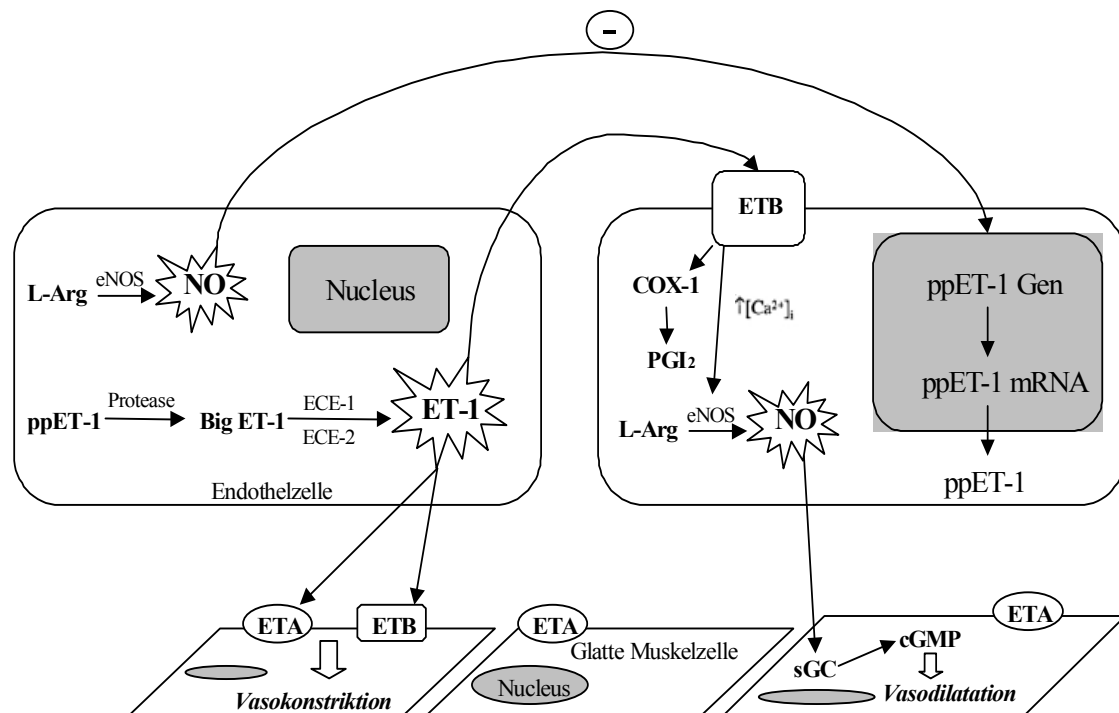
Die Feststellung, dass eine andauernde human ET-1 Überexpression nicht zwangsläufig zu einem erhöhten Blutdruck führen muß, stimmt überein mit Studien an ET-2 transgenen Ratten, die ebenfalls normotensiv sind <sup>99,100</sup>. Ein über lange Zeit aktiviertes parakrines Endothelinsystem führt zu einer starken Aktivierung von gegenregulatorischen Mechanismen. Diese Gegenregulation könnte in verschiedene Komponenten des Endothelinsystems eingreifen. Zum einen wird eine veränderte Expression der Endothelinrezeptoren diskutiert. Ferner ist an einen kompensatorischen Anstieg der Aktivität des NO-Systems zu denken <sup>101,102</sup>. Eine Studie von Hocher et al <sup>103</sup> hat sich mit beiden Theorien beschäftigt. Eine intravenöse Bolusinjektion von  $N^{[\text{omega}]}$ -nitro-l-arginine methyl ester (L-NAME), ein nichtselektiver Inhibitor der NO-Synthase, führte bei human ET-1 transgenen Mäusen zu einem signifikant höheren Anstieg des Blutdruckes im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren. Andererseits stieg der Blutdruck in beiden Gruppen gleich stark an nach einer i.v. Injektion von ET-1. Eine Vorbehandlung mit Dexamethason hob den höheren Blutdruckanstieg nach L-Name Gabe in human ET-1 transgenen Mäusen wieder auf. Die Exkretion von NO – Metaboliten im Urin war bei human ET-1 transgenen Mäusen angestiegen und signifikant gesunken nach Behandlung

mit Dexamethason. Die Immunhistologie hat gezeigt, dass die induzierbare NO Synthase in den intrarenalen Arterien stark exprimiert ist bei den human ET-1 transgenen Mäusen im Gegensatz zu den nicht transgenen Kontrolltieren. Eine Vorbehandlung mit Dexamethason verhindert die vaskuläre iNOS Expression. Außerdem zeigten die ET-1 transgenen Mäuse eine höhere Dichte an CD4-positiven Lymphozyten und Makrophagen im Nierengewebe. Eine Analyse der Endothelinrezeptorexpression und – funktion offenbarte, dass der ETA Rezeptor in ET-1 transgenen Mäusen nicht anders exprimiert war als in den altersgleichen Kontrolltieren. Die Blutdruckantwort auf einen ETA Rezeptorantagonisten war in den ET-1 transgenen Mäusen und in den altersgleichen Kontrolltieren gleich. Die ETA Rezeptordichte war in den ET-1 transgenen Mäusen niedriger. Die Behandlung mit einem ETB Rezeptorantagonisten führte zu keinem signifikant höheren Blutdruckanstieg in ET-1 transgenen Mäusen im Vergleich zu den altersgleichen Kontrolltieren. Schlußfolgernd konnte gesagt werden, dass das Muster der Endothelinrezeptoren und die Blutdruckantwort auf die ETA- und ETB-Rezeptorantagonisten nicht das Fehlen eines Bluthochdrucks in human ET-1 transgenen Mäusen erklären können.

Die Überexpression des humanen ET-1 Gens verursacht eine chronische Nierenentzündung mit Induktion einer vaskulären iNOS-Expression. Diese Induktion der iNOS-Expression könnte ein neues lokales Gleichgewicht zwischen vaskulärem ET-1 und NO herstellen, dass sich in einen unveränderten Blutdruck in human ET-1 transgenen Mäusen äußert<sup>104</sup>. Shimojo et al<sup>105</sup> beschrieb eine Hochregulation der iNOS Genexpression in Kardiomyozyten, die einem erhöhten Level von ET-1 ausgesetzt waren. Und auch Keller et al<sup>106</sup> beschrieb eine Hochregulation der iNOS - Aktivität bei einem erhöhten ET-1 Level.

Diverse Studien geben Hinweise darauf, Stickstoffmonoxid als physiologischen Gegenspieler von Endothelin-1 zu sehen<sup>88-90,90,107-109</sup>. Stickstoffmonoxid und Endothelin-1 sind Komponenten eines lokalen negativ-rückgekoppelten Regelkreises. Die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC) führt so zur Vasodilatation und hemmt über seinen “second messenger” cGMP die Bildung der präpro-ET-1 mRNA (s. Abb. 4) Ebenso stimuliert ET-1 durch Interaktion mit dem

ETB-Rezeptor die Synthese von NO. So führt z.B. die ETB-Rezeptor vermittelte Stimulation endothelialer Zellen zur Aktivierung der kalziumsensitiven konstitutiven NO-Synthase<sup>101,110,111</sup>. Die Freisetzung von NO erklärt die initiale Vasodilatation bei Infusionsexperimenten mit ET-1<sup>48</sup>.



**Abb. 4: Überblick über die Regulation des Blutgefäßtonus durch NO und ET-1**

Stickstoffmonoxid (NO) wird mit Hilfe der eNOS aus L-Arginin (L-Arg) in Endothelzellen gebildet. NO stimuliert die lösliche Guanylatcyclase (sGC). Dies führt zur Bildung von cGMP und damit zur Vasodilatation, aber es hemmt auch die Synthese von ET-1 in den Endothelzellen auf der Transkriptionsebene durch Hemmung der Bildung von präpro Endothelin-1 mRNA (ppET-1 mRNA). ET-1 wird von Endothelzellen produziert und aktiviert zwei Typen von Rezeptoren, den ETA- und ETB-Rezeptor. In glatten Muskelzellen führt die Aktivierung des ETA- und ETB-Rezeptors zu einer Vasokonstriktion. Die Aktivierung des ETB-Rezeptors der Endothelzellen stimuliert die Prostacyclinproduktion und führt zur Aktivierung der kalziumsensitiven konstitutiven NO-Synthase und so zur Synthese von NO (nach<sup>33</sup>).

### 1.1.8 Generation von iNOS knockout Mäusen

Die iNOS knockout Mäuse wurden von David M. Rodman vom Cardiovascular Pulmonary Research Laboratory and Department of Physiology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado 80262 zur Verfügung gestellt.

Die iNOS defizienten Mäuse wurden durch die klassische knockout Methode mit embryonalen Stammzellen generiert. Dabei wurden überlappende Cosmid Klone, die das 72 kb Mausgenom enthalten, davon ca. 36 kb des NOS2 Locus und 36 kb vorgeschaltete Sequenzen, isoliert. Der Gen Ersatzvektor pINOS-RV1 wurde generiert, um die proximalen 585 Basen des iNOS Promoters (eine Region für die iNOS Expression in Makrophagen) und die Exone 1-4, einschließlich des ATG-Translationsstartpunktes in Exon 2 zu entfernen. Mittels Elektroporation wurde der Vektor in embryonale Stammzellen der Maus verbracht und diese in Blastocysten injiziert. Da die Keimbahntransmission über die Fellfarbe identifiziert werden konnte, wurden so Chimere generiert aus denen homozygote knockout Mäuse gezüchtet wurden <sup>132</sup>.

### 1.1.9 Phänotyp der iNOS knockout Mäuse

Die iNOS knockout Mäuse wurden im Alter von 11 Wochen mit gleichaltrigen Wildtypmäusen verglichen. Sie unterschieden sich nicht in Körpergewicht, Wachstum und mittleren arteriellen Blutdruck. Als histologisch normal wurden folgende Gewebe befundet: Herz, Aorta, Lunge, Leber, Gallenblase, Milz, Niere, Nebenniere, Harnblase, Gebärmutter, Eierstöcke, Bauchspeicheldrüse, Magen, Darm, Gehirn, Rückenmark, periphere Nerven, Augen, Thymus, Lymphknoten, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Speicheldrüse, Skelettmuskulatur, Braunes Fettgewebe, Knochenmark, Nase, Zunge und Haut. Des weiteren waren Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, Zahl der Thrombozyten und Leukozyten, Verhältnis und Morphologie der Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, Glucose, Kreatinin, Gesamtprotein, Albumin, Globulin, Gesamtbilirubin, Alkalische Phosphatase, Alanin-Amino-Transferase, Aspartat-Amino-Transferase, Cholesterin, Triglyzeride, Natrium,

Kalium, Chlorid, Bikarbonat, Kalzium, Phosphat, Magnesium und Osmolalität normal. Außerdem wurde die Entzündungsantwort auf bestimmte Noxen als normal eingestuft <sup>132</sup>.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Welche pathophysiologische Rolle spielt eine zusätzliche iNOS-Defizienz vor dem Hintergrund einer ET-1 Überexpression mit Blick auf die kardiale Morphologie und Funktion im doppelt transgenen Mausmodell (iNOS -/- ET +/+)?
2. Welche Auswirkungen hat die zusätzliche iNOS-Defizienz in diesem Mausmodell konkret auf die kardiale Histologie mit Blick auf Fibrose, Myozytendurchmesser und Gefäßgeometrie?
3. Hat die zusätzliche iNOS-Defizienz bei gleichzeitiger ET-1 Überexpression Einfluss auf konkrete systolische und diastolische kardiale Funktionsparameter im Herzkatheter?
4. Beeinflusst die zusätzliche iNOS-Defizienz den Blutdruck der ET-1 überexprimierenden Tiere?

Um diese Ziele zu erreichen, bin ich folgendermaßen vorgegangen:

1. Züchtung von iNOS knockout und ET-1 transgenen Mäusen
2. Messung des Blutdruckes mittels Schwanzplethysmographie (tail-cuff)
3. Messung der Herzfunktion mittels Herzkatheter
4. Für die Beschreibung morphologischer Veränderungen: Wiegen und Fixieren der Herzen, Bestimmung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose, Bestimmung von Media-zu-Lumen-Ratio der Herzarteriolen und des Durchmessers der Myozyten

### **3 Material und Methoden**

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

-20°C und 4°C Kühlschränke von Liebherr BSS 2986 Premium refrigerator, Liebherr-Hausgeräte GmbH, Deizisau, Deutschland

4-French großer Druck-Volumen-Miniaturkatheter (Model Aria SPR-719) von Millar Instruments, Houston, Texas

56°C and 37°C Wasserbad GFL

ArtPad II, WACOM EUROPE, Neuss

Autoanalyzer

Biofuge 13, Heraeus/Sepatech GmbH, Osterode am Harz, Deutschland

Biometra standard power pack P25(115 V/230 V), max. 400 V, 1000 mA, 200 W, Whatman biometra GmbH, Thürbingen, Deutschland

Biometra T3 Thermocycler, Whatman biometra GmbH, Thürbingen, Deutschland

Blutdruckmeßgerät ML 125/M NIBP System für Mäuse, Druckmanschette, Pulsaufnehmer, Tierhalter MLA 5016 und MLA 5018, ADInstruments GmbH, Spechbach

CCD-Kamera, KP-140, HITACHI EUROPE, Düsseldorf

Histokinette TP1020, LEICA, Nußloch

Leitz Mikrotom

Mikroprocessor pH Meter pH 537

Mikroskop Axiovert 100, ZEISS AG, Stuttgart

Mikroskop BH2, OLYMPUS, Hamburg

Sartorius BL 600 Waage, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

SBC 22 Waage, Scaltec instruments GmbH, Göttingen, Deutschland

Software IOX 1.5 Emka, France

Stoffwechselkäfige für Mäuse, Spezialanfertigung von Schering, Deutschland

Thermostat TCR 100, Roth, Deutschland

Tissue Tek Unikassetten, LEICA, Nußloch

Ultraviolet transilluminator TI 1,230 volt, Whatman biometra GmbH, Thüringen,  
Deutschland

Vortex genie 2-mixer, Bender & Hobein AG, Zürich, Switzerland



### 3.1.2 Chemikalien

Adrenalin

Altromin Standard 1320 Ratte/ Maus Halterungsdiät

Altromin Standard 1310 Ratte/Maus Zuchtdiät rohfaserreich

AmpliAq Gold® DNA polymerase (5 Units/ $\mu$ l), Applied biosystems, Deutschland

Boric acid ( $H_3BO_3$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Bromophenol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

EDTA, ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ethidiumbromid (10mg/ml), Amresco Inc., Ohio, USA

Fest- und Feinchemikalien der Firmen Merck, Roth, Boehringer, Roth und Sigma, Deutschland

Forene® Abbott

Formalin 38 %

GeneAmp® 10X PCR Puffer II (1.5mL), Applied biosystems, Deutschland

GeneAmp® dNTPs (10 mM, each dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 320  $\mu$ L, Applied biosystems, Deutschland

GeneRuler™ 50bp DNA ladder, MBI fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland

Glycerine ( $C_3H_8O_3$ ), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Haematokrit – Kapillaren, Hirschmann Laborgeräte

MgCl<sub>2</sub> Lösung (25mM, 1.5ml), Applied biosystems, Deutschland

Primer : TIB molbiol syntheseslabor, Berlin, Deutschland

Primer	Sequenzen 5' - 3'	Produktgröße
ET-1 9003 se	5' CCC CAT TCT AA <sub>g</sub> CAT Agg ggC 3'	503 bp
ET-1 9507 ase	5' AgC CA <sub>g</sub> TgA AgA Tgg TTg ggg 3'	503 bp
iNOS-WT3 se	5' gAC CAT gCg AA <sub>g</sub> ATg AgT gg 3'	662 bp
iNOS WT5 ase	5' gTT AgA Tgg TgC CAA TAT TCC 3'	662 bp
NeoR2 se	5' TTg TCA AgA CCg ACC TgT CC 3'	Ca. 300 bp
NeoR2 ase	5' ACA AgA CCg gCT TCC ATC Cg 3'	Ca. 300 bp

Proteinase K (100mg), Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Roti®-Histokitt, C. ROTH GmbH & Co., Karlsruhe

Safe-Lock Reaktionsgefäße von Eppendorf 1,5 ml

SeaKem® LE agarose, Biozym diagnostik GmbH, Deutschland

S-Monovetten, Lithium Heparin, Sarstedt

Thiopental

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) (2,5 Kg), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tween-20, SERVA Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, Deutschland

Xylene cyanol (C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

## Puffer und Lösungen

0,5 M EDTA: 186,12 g EDTA, 1 l A. dest., pH 8,0

TE-Puffer : 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.5

K-Puffer : 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3

K-Puffer<sup>2</sup> : 985 µl K- Puffer, 10 µl Proteinase K ( 100 µg/ml), 5 µl Tween 20

10x TBE Puffer: Tris 108 g/l, Borsäure 55 g/l, 0.5 M EDTA 40 ml/l, pH 8.0

Blaumarker: 50 mg/ 100 ml Bromophenolblau, 250 mg/ 100 ml Xylene cyanol,

30 g/100 ml Glycerol

50bp DNA Leiter: 320 µl autoclaviertes, ultrafiltriertes Wasser, 70 µl Blaumarker,

10 µl 50bp DNA Leiter (0.5mg DNA/ml), Konservierung bei -20°C.

10 x PBS: 80,0g/l NaCl, 2,0g/l KCl, 11,5g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH-Wert: 7,4

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Züchtung

Es wurden homozygot human Endothelin-1 transgene Mäuse der Linie 856 (ET +/+) mit homozygot iNOS knockout Mäusen (iNOS -/-) verpaart. Die daraus resultierende F1-Generation war heterozygot iNOS knockout und heterozygot human Endothelin-1 transgen (iNOS +/- ET +/-). Diese Tiere wurden innerhalb der F1-Generation wiederum miteinander verpaart. Mittels PCR wurden aus der entstehenden F2-Generation Tiere mit folgendem Genstatus selektiert: homozygot iNOS knockout und human Endothelin-1 transgen (iNOS -/- ET +); homozygot iNOS knockout (iNOS -/-). Nun fand eine Rückkreuzung statt, d.h. die homozygot iNOS knockout und human Endothelin-1 transgenen Mäuse (iNOS -/-ET+) wurden mit homozygot human Endothelin-1 transgenen Mäusen der Linie 856 verpaart (ET +/+) und die homozygot iNOS knockout (iNOS -/-) wurden mit Endothelin-1 Wildtypmäusen (WT) aus der Linie 856 verpaart. Die F3-Generation beinhaltete unter anderem die folgenden vier von mir untersuchten Gruppen:

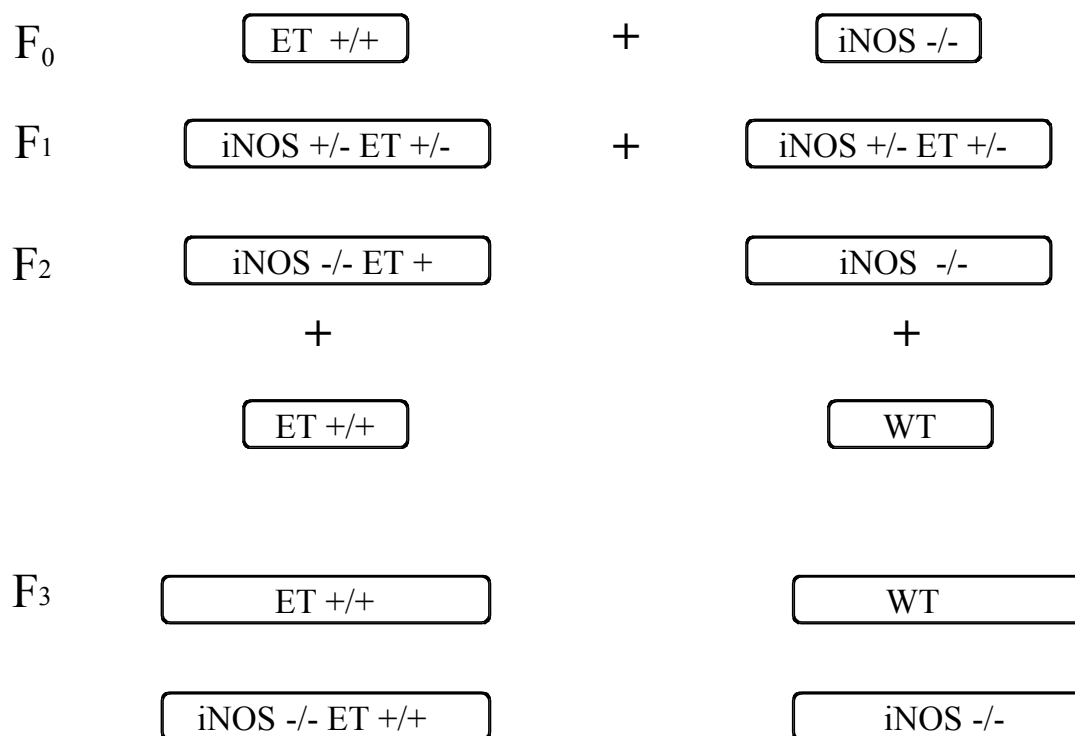
iNOS -/- ET +/+ homozygot iNOS knockout und human Endothelin-1 transgen

iNOS -/- homozygot iNOS knockout

ET +/+ homozygot human Endothelin-1 transgen

WT Wildtyp

### Kreuzungsschema der Zucht



**Abb. 5: Kreuzungsschema der Zucht**

*Züchtung der vier untersuchten Gruppen iNOS -/- ET +/+, iNOS -/-, ET +/+ und WT.*

Zur Identifikation wurde allen Mäusen der F2 und F3-Generation im Alter von 2 Monaten retrobulbär Blut abgenommen.

Homozygote iNOS – knockout Tiere sind eindeutig mittels PCR zu bestimmen. Mit Hilfe der PCR läßt sich auch bestimmen, ob Mäuse human Endothelin-1 transgen sind oder nicht. Es läßt sich jedoch nicht bestimmen, ob sie homo – oder heterozygot human Endothelin-1 transgen sind. Dies kann man nur durch Kreuzung mit Wildtypen und Typisierung ihrer Nachkommen bestimmen. Sind die Nachkommen alle heterozygot ET-1 transgen, so muß das zu bestimmende Elterntier homozygot sein. Die Wurfgröße mußte in diesem Fall mindestens bei 6 Tieren liegen, um eine Aussage über das Elterntier zu erlauben.

Von der Zeit der Verpaarung bis zum Absetzen der Jungtiere bekamen die Mäuse eine Standard Zuchtdiät für Mäuse. Untersucht wurden jeweils Tiere gleichen Alters beiden Geschlechts. Es sind jeweils altersgleiche Tiergruppen von den drei Linien sowie aus Kontrolltieren gebildet worden. Sie wurden im Alter von 60, 300 und 400 Tagen gewogen. Es wurde ihr Blut und Urin untersucht, der Blutdruck gemessen, eine Herzkatheteruntersuchung vorgenommen, dann wurden sie getötet und die Organe entnommen.

### 3.2.2 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).

### 3.2.3 Genotypisierung

#### 3.2.3.1 Blutentnahme

Das Blut für die Typisierung wurde mittels Punktion des retrobulbären Venenplexus unter Inhalationskurznarkose mit Isofluran im Alter von 8 Wochen gewonnen. und in mit 0,5 M EDTA beschichteten 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die Reaktionsgefäße wurden beschichtet, indem man sie mit 1 ml EDTA spülte, die verwendete Lösung daraufhin vollständig verwarf und ihnen dann 10 µl frische EDTA – Lösung zusetzte. Das Blut wurde dann 5 Minuten mit 3000 Upm zentrifugiert. Das Plasma wurde verworfen und die Zellen 1:2 mit isotoner NaCl-Lösung versetzt und gemischt.

### 3.2.3.2 DNA-Isolierung

50µl dieser Mischung wurde mit 500µl TE-Puffer gemischt und 3 Minuten mit 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500µl TE-Puffer resuspendiert und erneut 1 Minute mit 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Das gewonnene Pellet wurde in 100µl K-Puffer<sup>2</sup> resuspendiert und mindestens 45 Minuten bei 56°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch 10 Minuten im Thermoblock bei 95°C. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und bei –20°C gelagert.

### 3.2.3.3 PCR Amplifikation

#### **3.2.3.3.1 Die ET-1 PCR**

Der PCR Ansatz wurde wie in Tabelle beschrieben durchgeführt. Die Amplifikation ist in Tabelle beschrieben. Die Denaturierung erfolgte in 40 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, das Annealing bei 60°C für 30 Sekunden, die Extension bei 72°C für 2 Minuten und der finale Extensionsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

**Tab. 1: Das PCR Protokoll**

Material	Konzentration	Reaktionsmischung
Autoklaviertes,	-	13,728
10 x PCR Puffer	100 mM	Tris-HCL, 2,2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,76
dNTPs (Mix)	2,5 µmol	0,44
ET-1 9003 se	10 pmol/ µl	0,88
ET-1 9507 ase	10 pmol/ µl	0,88
Taq DNA Polymerase	5 U/ µl	0,132
Template		1,98
Total (Summe)		22

**Tab. 2: Das PCR Programm**

Heizdeckel	105°C			
Vorlauf	ein			
Schritt	Temp.	Zeit	←	Zyklen
1	94°C	Pause		
2	94°C	6 min		
3	60°C	30 sek		
4	72°C	2 min		
5	94°C	30 sek	zu Schritt 3	39 x
6	60°C	30 sek		
7	72°C	10 min		
8	10°C	Pause		

Die verwendeten Primer:

ET-1 9003 se mit der Sequenz 5' CCC CAT TCT AAg CAT Agg ggC 3' und

ET-1 9507 ase mit der Sequenz 5' AgC CAg TgA AgA Tgg TTg ggg 3'.



### 3.2.3.3.2 Die iNOS WT PCR

Der PCR Ansatz wurde wie in Tabelle beschrieben durchgeführt. Die Amplifikation ist in Tabelle beschrieben. Die Denaturierung erfolgte in 40 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, das Annealing bei 60°C für 30 Sekunden, die Extension bei 72°C für 2 Minuten und der finale Extensionschritt bei 72°C für 10 Minuten.

**Tab. 3: Das PCR Protokoll**

Material	Konzentration	Reaktionsmischung (µl)
Autoklaviertes,	-	13,728
10 x PCR Puffer	100 mM	Tris-HCL, 2,2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,76
dNTPs (Mix)	2,5 µmol	0,44
iNOS-WT 3 se	10 pmol/ µl	0,88
iNOS-WT 5 ase	10 pmol/ µl	0,88
Taq DNA Polymerase	5 U/ µl	0,132
Template		1,98
Total (Summe)		22

**Tab. 4: Das PCR Programm**

Heizdeckel	105°C			
Vorlauf	ein			
Schritt	Temp.	Zeit	←	Zyklen
1	94°C	Pause		
2	94°C	6 min		
3	60°C	30 sek		
4	72°C	2 min		
5	94°C	30 sek	zu Schritt 3	39 x
6	60°C	30 sek		
7	72°C	10 min		
8	10°C	Pause		

Die verwendeten Primer:

iNOS-WT 3 se mit der Sequenz 5' gAC CAT gCg AAg ATg AgT gg 3'und

iNOS-WT 5 ase mit der Sequenz 5' gTT AgA Tgg TgC CAA TAT TCC 3'.

### 3.2.3.3.3 Die NeoR-PCR

Der PCR Ansatz wurde wie in Tabelle beschrieben durchgeführt. Die Amplifikation ist in Tabelle beschrieben. Die Denaturierung erfolgte in 40 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, das Annealing bei 64°C für 30 Sekunden, die Extension bei 72°C für 2 Minuten und der finale Extensionsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

**Tab. 5: Das PCR Protokoll**

Material	Konzentration	Reaktionsmischung (µl)
Autoklaviertes,	-	13,728
10 x PCR Puffer	100 mM Tris-HCL,	2,2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,76
dNTPs (Mix)	2,5 µmol	0,44
NeoR2 se	10 pmol/µl	0,88
NeoR2 ase	10 pmol/µl	0,88
Taq DNA Polymerase	5 U/ µl	0,132
Template		1,98
Total (Summe)		22

**Tab. 6: Das PCR Programm**

Heizdeckel	105°C			
Vorlauf	ein			
Schritt	Temp.	Zeit	←	Zyklen
1	94°C	Pause		
2	94°C	6 min		
3	64°C	30 sek		
4	72°C	2 min		
5	94°C	30 sek	zu Schritt 3	39 x
6	60°C	30 sek		
7	72°C	10 min		
8	10°C	Pause		

Die verwendeten Primer:

NeoR2 se mit der Sequenz 5' TTg TCA AgA CCg ACC TgT CC 3' und

NeoR2 ase mit der Sequenz 5' ACA AgA CCg gCT TCC ATC Cg 3'.

#### 3.2.3.4 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. 30 Minuten, dann gefärbt mit 0,05% (0,5µg/ml) Ethidiumbromid und sichtbar gemacht durch UV-Licht mittels Transilluminator. Die Produktgröße der ET PCR liegt bei 503 bp, die der iNOS WT PCR bei 662 bp und die der NeoR PCR bei ca. 300 bp.

Mit Hilfe der ET PCR läßt sich bestimmen, ob eine Maus human Endothelin-1 transgen ist oder nicht, sie weist das humane ET-1 Gen nach. Es läßt sich jedoch nicht bestimmen, ob sie homo – oder heterozygot human Endothelin-1 transgen ist. Dies kann man nur durch Verpaarung mit Wildtypen und Typisierung ihrer Nachkommen bestimmen. Sind die Nachkommen alle heterozygot ET-1 transgen, so muß das zu bestimmende Elterntier homozygot sein.

Um eine Aussage über iNOS Homo- oder Heterozygotie treffen zu können, muß man die Ergebnisse von zwei PCR's zusammen betrachten. Die iNOS WT PCR weist das iNOS Gen nach. Das bedeutet, wenn bei dieser PCR eine Bande zu erkennen ist, ist das iNOS Gen vorhanden. Die NeoR PCR weist das bei der Herstellung des iNOS Knockouts das mit dem Gen Ersatzvektor pINOS-RV1 eingeschleuste neo Markergen nach. Das bedeutet, wenn bei dieser PCR eine Bande zu erkennen ist, ist das neo Markergen vorhanden. Die folgende Tabelle zeigt die möglichen Kombinationen der Ergebnisse beider PCR's und die Schlußfolgerungen die man daraus ziehen kann.

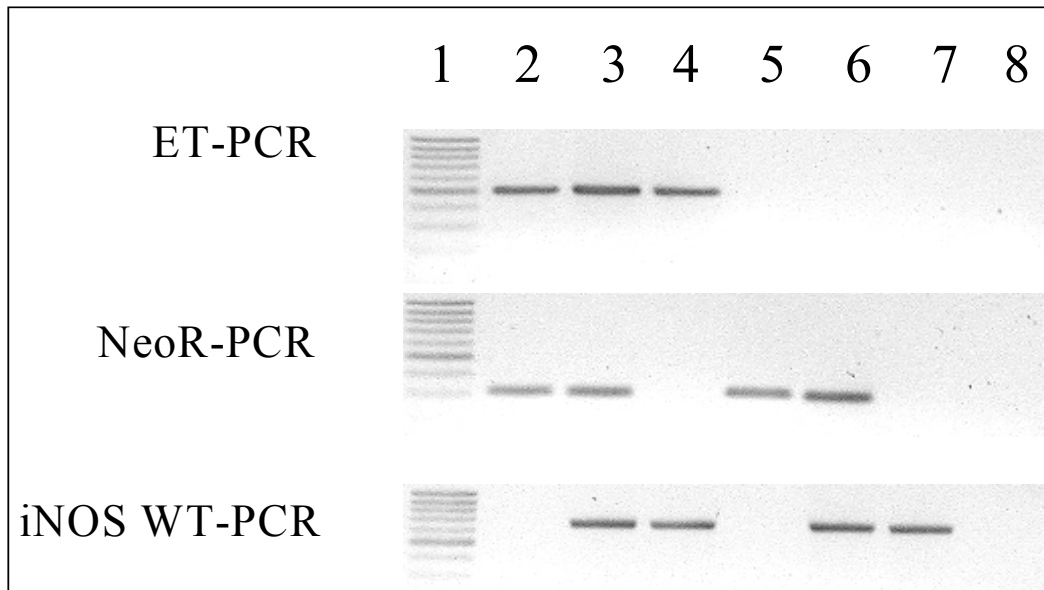
PCR	Ergebnis der Ablesung		
NeoR	+	+	-
iNOS WT	-	+	+
Status	iNOS -/-	iNOS -/+	iNOS WT

**Tab. 7: Interpretation der PCR Ergebnisse**

*Folgende Aussagen können mittels der INOS WT und der NeoR PCR über den Genstatus des Tieres gemacht werden können: Tiere mit dem Status iNOS -/- haben nur eine Bande bei der NeoR PCR; Tiere mit dem Status iNOS -/+ haben je eine Bande bei der NeoR und iNOS WT PCR; Tiere mit dem Status iNOS WT haben nur eine Bande bei der iNOS WT PCR. + bedeutet, dass eine Bande vorhanden, - bedeutet, dass keine Bande vorhanden ist.*

Wenn bei der NeoR PCR eine Bande vorhanden ist, muß ein knockout vorliegen. Wenn gleichzeitig kein iNOS Gen nachweisbar ist, ist das Tier homozygot knockout. Ist gleichzeitig ein iNOS Gen nachweisbar, ist das Tier heterozygot knockout.

Ist bei der NeoR PCR keine Bande vorhanden, liegt kein knockout vor. Die iNOS WT PCR zeigt eine Bande, da es sich dann in diesem Fall um ein iNOS Wildtyptier handelt.



**Abb. 6: PCR-Produkte**

*Dargestellt auf einem 1,5 % Gel sind jeweils die ET-PCR (Produktgröße 503 bp), die NeoR-PCR (Produktgröße ca. 300 bp) und die iNOS WT-PCR (Produktgröße 662 bp).*

*1. 50 bp DNA Leiter, 2. ET + / iNOS -/-, 3. ET + / iNOS +/-, 4. ET + , 5. iNOS -/- , 6. iNOS +/-, 7. WT , 8. Negativkontrolle.*

### 3.2.4 BNP Konzentration im Plasma

#### Versuchsdurchführung

Im Alter von ca. 250 Tagen wurden den Tieren mittels Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut abgenommen. Das Blut wurde dann 5 Minuten mit 3000 Upm zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  konserviert. Da die Mengen des gewonnenen Plasma pro Tier sehr gering sind, wuren jeweils Proben von 2–4 Tieren (abhängig von der Ausgangsmenge) gleichen Alters und Geschlecht gepoolt, um eine ausreichende Plasmamenge zur Analyse zu erhalten.

Die quantitative Bestimmung des Brain natriuretic peptide (B-type natriuretic peptide, BNP) fand im Labor. PD Dr. Stasch, Bayer Health Care AG mittels Radioimmunoassay (RIA) statt.

### 3.2.5 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig

#### Versuchsdurchführung

Alle Mäuse waren zum Untersuchungszeitpunkt ungefähr 300 Tage alt.

Zu Beginn des Stoffwechselfersuches wurden die Tiere gewogen. Nach 24 h wurde die Urinmenge, die aufgenommene Futter- und Wassermenge protokolliert und eine Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus unter Inhalationskurznarkose mit Isofluran durchgeführt.

#### Urinparameter

Das Urinvolumen wurde zunächst gravimetrisch erfaßt. Die quantitative Bestimmung des cyclischen Guanosin-Monophosphates (cGMP) fand im Labor. PD Dr. Stasch, Bayer Health Care AG mittels Radioimmunoassay (RIA) statt. Das Kreatinin wurde mit Hilfe des Autoanalyzers gemessen. Die GFR wurde aus gemessenen Parametern berechnet.

#### Plasmauntersuchung

Das Plasmakreatinin wurde mit Hilfe des Autoanalyzers gemessen.

#### Berechnung der GFR

Die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist der Quotient aus Kreatinin im Urin (UC) und Kreatinin im Serum (SC) multipliziert mit dem Urinfluß in ml/min (Uvol).

$$GFR = U_c \times U_{vol}/S_c$$

### 3.2.6 Nicht-invasive Blutdruckmessung

Die Schwanzplethysmographie ist eine nicht-invasive Blutdruckmessung am Schwanz der Tiere unter Verwendung einer Druckmanschette und eines piezoelektrischen Pulsaufnehmers. Sie ist analog zur Methode nach Riva-Rocci beim Menschen<sup>133</sup>. Es werden der systolische arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt.

Die Untersuchung findet in einem ruhigen Raum statt und wird immer von der selben Person durchgeführt. Ein schonender, ruhiger Umgang mit den Tieren verhindert eine unnötige und störende Aufregung der Mäuse.

Um eine Hyperämisierung der Schwanzarterie zu erreichen, wird das Tier für ca. 10 Minuten mittels einer Rotlichtlampe vorgewärmt. Die Umgebungstemperatur erreicht dabei 40°C. Danach wird sie zur Fixation in eine Plexiglas-Röhre gesetzt, die durch Verschieben der Stirnwand an die Größe der Maus angepasst werden kann. Der Durchmesser der Röhre ist so gewählt, dass sich die Maus nicht umdrehen kann. Der Schwanz wird durch eine Öffnung an der Rückwand aus der Röhre herausgeführt, so dass die aufblasbare Druckmanschette an der Schwanzwurzel angelegt werden kann. Damit die Körpertemperatur der Maus nach dem Vorwärmen konstant bleibt, befindet sich neben der Plexiglasröhre ebenfalls eine Rotlichtlampe. Distal der Manschette wird der Pulsabnehmer an einer der seitlichen Schwanzvenen mit einem Pflasterstreifen befestigt. Der Kontakt des Pulsabnehmers mit dem Schwanz muss einerseits fest sein, andererseits soll durch die Befestigung keine Störung des venösen Abflusses entstehen. Eine Lagerung des Schwanzes in leicht gekrümmter Stellung und eine lockere Aufhängung des Pulsabnehmerkabels verhindern Störungen durch Atembewegung des Tieres. Die Maus darf sich während der Blutdruckmessung nicht bewegen, da sonst Bewegungsartefakte vom Pulsabnehmer wiedergegeben werden und ein korrektes Ablesen der Druckkurve nicht möglich ist. Die Herzfrequenz wird kontinuierlich aus dem Pulssignal durch Mittelwertbildung errechnet.

## Durchführung der Blutdruckmessung

Alle Mäuse waren zum Untersuchungszeitpunkt ungefähr 300 Tage alt.

Damit sich die Tiere an die Prozedur gewöhnen, wird die Messung mehrmals simuliert. Erst nach dieser Eingewöhnungsphase wurde bei den Tieren der Blutdruck gemessen.

Sobald sich das Tier in der Röhre beruhigt hat, werden die Messungen vorgenommen. Hierbei erscheint zunächst der gemessene Puls graphisch dargestellt mit Hilfe der Powerlab Software®. Nach etwa 10 Sekunden Pulsmessung wird auf Knopfdruck die Druckmanschette bis zum Erreichen eines vorgewählten Drucks mit Luft gefüllt und der Druckabfall setzt ein. Der systolische Blutdruck wird bei fallendem Manschettendruck am Auftreten der Pulsationen ermittelt und ebenfalls graphisch dargestellt. Bei 30 mm Hg entlüftet sich die Druckmanschette selbstständig und die Messung ist beendet. Es wurden jeweils 3 Messungen pro Tier und Termin durchgeführt. Insgesamt fanden 4 Termine statt.

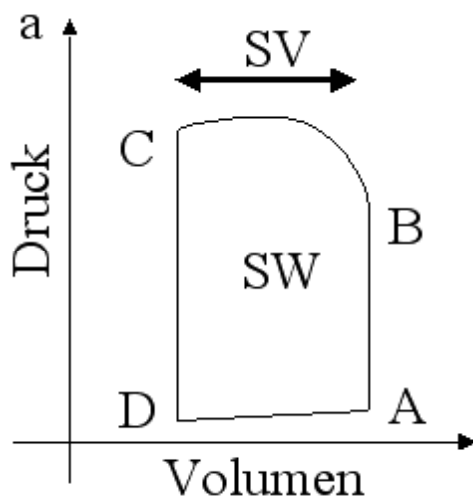
### 3.2.7 Herzkatheter

Die Aufzeichnung des Herzzyklus als Druck-Volumen-Kurve mittels der Konduktanzmethode ist die genaueste Methode um die linksventrikuläre systolische und diastolische Pumpfunktion des Herzens zu beschreiben. Eine große Anzahl von volumenabhängigen und auch volumenunabhängigen Parametern steht durch diese Analyse zur Verfügung und lässt einen genauen Rückschluss auf die kardiale Funktion zu. Die Aufzeichnung von Druck-Volumen-Kurven gilt daher als Goldstandard der Hämodynamik-Messung bei Menschen und großen Tieren <sup>134</sup>. Durch die Entwicklung eines Konduktanz-Katheters für Kleintiermodelle ist es nun gelungen, diese Druck-Volumen-Kurven auch in vivo im Maus- und Rattenmodell aufzuzeichnen <sup>135</sup>. Die Methode ist auch von besonderem Interesse, wenn es darum geht den kardialen Phänotyp genetisch veränderter Kleintiere zu untersuchen <sup>136</sup>.



### 3.2.7.1 Das Druck-Volumen-Diagramm

Trägt man für die Dauer eines Herzzyklus den linksventrikulären Druck gegen das Volumen im linken Ventrikel auf, erhält man so genannte Druck-Volumen-Kurven (Druck-Volumen-Diagramme), mit dem Aussehen einer geschlossenen Schleife (engl. loop). Die folgende Abbildung zeigt einen solchen Loop.



**Abb. 7: Die vier Aktionsphasen des Herzzyklus:**

*A-B Anspannungsphase, B-C Austreibungsphase, C- D Isovolumetrische Entspannungsphase, D-A Füllungsphase, SV=Schlagvolumen, SW=Stroke work (Schlagarbeit) (schematisch nach eigenen Aufzeichnungen bei der Maus)*

Die Kurve stellt einen kompletten Herzzyklus dar und lässt sich in die vier Aktionsphasen des Herzens bzw. des Ventrikels einteilen.

(1) A →B: Anspannungsphase (Isovolumic contraction): Dies ist der Beginn der Kammer systole, die A-V-Klappe schließt sich sofort aufgrund des einsetzenden

Druckanstieges, die Herzkammer beginnt sich zu kontrahieren, die Aortenklappe ist aber noch geschlossen.

(2) B →C: Austreibungsphase (Ejection): Der Druck in der Kammer übersteigt den diastolischen Aortendruck, woraufhin sich die Aortenklappe öffnet, das Blut wird in den großen Kreislauf getrieben. Da sich in dieser Phase der Herzmuskel aber weiter kontrahiert, kommt es trotz des abfallenden Volumens zu einem anhaltenden Druckanstieg. Man spricht dabei auch von einem auxochtonen Druckanstieg. Der Druck steigt zunächst bis zu einem Maximalwert an und fällt dann gegen Ende der Systole wieder ab. Der Ventrikel wirft dabei unter Ruhebedingungen nur etwa die Hälfte seines Inhaltes als Schlagvolumen (Stroke Volume, SV) in die Aorta aus. Den Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen Füllungsvolumen bezeichnet man als Auswurffraktion (Ejection Fraction, EF). Eine normale Auswurffraktion beträgt etwa 70 – 80 %. Der anschließende Verschluss der Aortenklappe markiert das Ende der Systole.

(3) C →D: Isovolumetrische Entspannungsphase (Isovolumic Relaxation): Zu Beginn der Diastole sind alle Klappen geschlossen. Der intraventrikuläre Druck fällt rasch auf nahezu null ab. Das Unterschreiten des Vorhofdruckes bewirkt ein Öffnen der AV-Klappen.

(4) D →A: Füllungsphase (Diastolic Filling): Man kann eine frühe Füllungsperiode, bedingt durch den Ventilebenen-Mechanismus und daran anschließend eine langsamere und späte Periode (Diastase) unterscheiden. Die rasche Füllung zu Beginn der Füllungsphase wird zusätzlich durch die diastolische Erschlaffung der Ventrikel selbst aufgrund eines passiven elastischen Ausgleiches von Verformungen aus der Systole ergänzt. Die dadurch entstehende Saugwirkung verstärkt die Wirkungen des Ventilebenen- Mechanismus. Bei normaler Herzfrequenz trägt die Vorhofkontraktion nur noch ganz wenig zur Volumenzunahme bei (ca. 8 %) und ist für den letzten Teil der Füllung verantwortlich.

### 3.2.7.2 Das Modell des Herzkatheters

Die Funktionsanalyse des linken Ventrikels mit Hilfe des Herzkatheters erfolgte mittels den Druck-Volumen-Diagrammen. Dies erfordert eine simultane Druck- und Volumenmessung und wurde in der vorliegenden Studie mit einem kombinierten Miniaturkatheter durchgeführt, der neben einer Druckeinheit ein Messsystem für das Volumen integriert hat, dem so genannten Conductance-Katheter. Die Conductance Technik liefert ein kontinuierliches elektrisches Signal, das dem wahren linksventrikulären Kammervolumen (abzüglich der Parallelen Conductance) proportional ist<sup>137</sup>.

Bei der Studie wurde ein 1,4-French großer Druck-Volumen-Miniaturkatheter (Model Aria SPR-719) von Millar Instruments, Houston, Texas verwendet und die Daten mit der Software IOX 1.5 Emka, France bearbeitet. Zur Messung des Volumens hat der Katheter an seinem distalen Ende vier Platinelektroden von jeweils 0,25 mm Länge. Die Elektroden sind in bestimmten Abständen zueinander angeordnet. Zwischen der ersten (proximalen) und der zweiten Elektrode beträgt der Abstand 0,5 mm. Die nächste Elektrode folgt mit 9 mm Abstand. Zwischen der dritten und vierten (distalen) Elektrode sind es dann wieder 0,5 mm. Der Druck wird kontinuierlich über ein elektronisches Miniaturmanometer gemessen, das zwischen den beiden inneren Elektroden platziert ist.

Zur Messung wird der Katheter retrograd zum Blutfluss über die Arteria carotis in den linken Ventrikel vorgeschoben und so positioniert, dass die distale Elektrode kurz vor der Herzspitze und die proximale direkt unter der Aortenklappe zu liegen kommt. Der interne Oszillator einer an den Katheter angeschlossenen Conductance-Einheit generiert ein elektrisches Feld von 20 kHz und 40 Mikroampere Stromstärke mit dem Ventrikel, dabei wirken die beiden äußeren Elektroden als Sende-Elektroden. Das durch den Ventrikel hindurchfließende Blut, mit seinen elektrisch geladenen Teilchen, verändert dieses elektrische Feld. Die Einwirkungen werden kontinuierlich von den inneren Elektroden, den Mess-Elektroden, gemessen. Dabei werden Änderungen des Leitwertes registriert und anschließend wird das so erhaltene Signal in ein Volumensignal konvertiert, unter der Annahme, dass das Herz einem idealisierten Zylinder entspricht. In diese Berechnungen fließen die

spezifische Leitfähigkeit des Blutes und der Abstand der Mess-Elektroden mit ein.

Das zeitabhängige Volumen wird folgendermaßen berechnet:

$$V_{\text{cath}} = (1/\alpha \cdot L^2/\sigma_b)[G(t) - GP],$$

wobei  $\sigma_b$  die spezifische Leitfähigkeit des Blutes,  $L$  der Abstand der Katheterelektroden ist,  $G(t)$  für den Gesamtleitwert zu der Zeit  $t$  und  $GP$  für die so genannte Parallele Conductance steht.

Die Konstante  $\alpha$  ist ein dimensionsloser Faktor, der aus folgendem Grund eingeführt worden ist: Nach der Korrektur mit dem Wert der Parallelen Conductance ist das Signal, welches mit dem Conductance-Katheter gemessen wird, direkt proportional zum absoluten Volumen, doch im Allgemeinen wird das wahre Volumen um einen von vorneherein bestimmten Prozentsatz unterschätzt. Um diese Abweichung zu korrigieren, führte man die Variable  $\alpha$  ein. In der Praxis wird  $\alpha$  bestimmt, indem man das mit der Conductance-Methode bestimmte Volumen (oder das Schlagvolumen, SV) mit einer unabhängigen Messmethode, wie z.B. der Angiografie oder der Thermodilution, vergleicht (Referenzmessmethoden). Bei kleineren Versuchstieren, wie der Ratte und der Maus, nähert sich  $\alpha$  aber 1,0. Da in dieser Studie die Versuche an Mäusen durchgeführt wurden, verzichtete man auf eine genaue Bestimmung von  $\alpha$  und wies der Konstanten statt dessen den Wert 1,0 zu.

### 3.2.7.3 Die Ermittlung der Parallelen Conductance (GP)

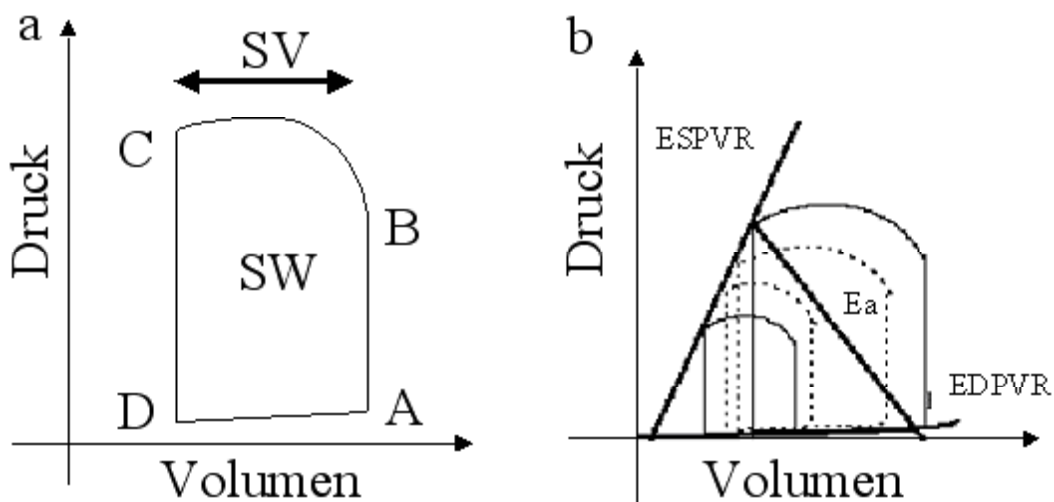
Wie beschrieben ist das aufgezeichnete Volumensignal ein Gesamtvolumen aus der Konduktanz des Blutes und der parallelen Konduktanz. Durch Infusion von hypertonen Kochsalzlösung kann die parallele Konduktanz ermittelt und so das reale Blutvolumen errechnet werden<sup>138</sup>. Hierzu wird die linke Vena jugularis punktiert. Anschließend werden 5 $\mu$ l 10%-NaCl infundiert. Das Konduktanzsignal im linken Ventrikel nimmt durch den Einstrom der hypertonen NaCl rapide zu, obwohl das Volumen unverändert bleibt. Das zeigt, dass das Konduktanzsignal die Osmolarität des Volumens im linken Ventrikel angibt und daraus das Blutvolumen errechnet werden kann.

### 3.2.7.4 Okklusion der Vena cava (inferior)

Schnelle Laständerungen, wie sie für die Bestimmung von einigen Parametern notwendig sind, können entweder pharmakologisch oder mittels temporärer Okklusion der Vena cava (inferior) Zur Aufzeichnung von vorlastunabhängigen Hämodynamik-Parametern wurde die Vorlast gesenkt und gleichzeitig die Hämodynamik im linken Ventrikel gemessen. Zur Senkung der Vorlast wurde die Vena cava inferior nach der Eröffnung des Peritoneums mit einer Pinzette für etwa 3 Sekunden abgeklemmt. Dadurch fiel der Druck im linken Ventrikel und das Volumen verringerte sich, so dass die Druck-Volumen-Kurven abfielen und nach links verschoben wurden.

#### 3.2.7.4.1 Parameter aus dem Druck-Volumen-Diagramm

Aus den Schleifen lassen sich Parameter direkt ableiten oder können berechnet werden. Zur Verdeutlichung ist in der folgenden Abbildung noch einmal ein Beispiel für eine Messung mit einer Laständerung dargestellt.



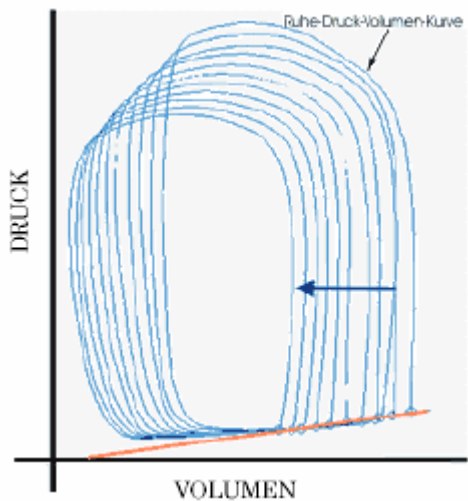
**Abb. 8: Schleifenwanderung**

*Durch die Vorlastsenkung fallen Druck und Volumen ab. Die Schleifen „wandern“ nach links unten (b). Die Gerade durch die Punkte der Endsystole ist ein Maß für die Kontraktilität. Aus der Verbindung der enddiastolischen Punkte lässt sich die*

*Steifigkeit berechnen, ein Maß für die Compliance. SV=Schlagvolumen, SW=Schlagarbeit, EDPVR=enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung, ESPVR=Endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (nach <sup>139</sup>).*

Ein wichtiges Maß für die Kontraktilität im linken Ventrikel ist die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dP_{dtmax}$ . Dies ist der Punkt mit dem schnellsten (steilsten) Druckanstieg pro Zeiteinheit während eines Herzzyklus. Das für einige Berechnungen benötigte Schlagvolumen (engl. stroke volume, SV) wird durch den horizontalen Abstand von B nach C repräsentiert (Abbildung a). Die Fläche, die das Druck-Volumen-Diagramm einschließt, wird als Schlagarbeit (engl. stroke work, SW) des linken Ventrikels bezeichnet, oder anders formuliert als die Energie, die während der Kontraktion mit dem Blut weitergegeben wird. Viele Parameter sind abhängig von den Ladebedingungen am Herzen, also von Vorlast und Nachlast. Als Vorlast (engl. preload) bezeichnet man die Kraft, welche die entspannte Ventrikelwand in der enddiastolischen Herzzyklusphase (Füllungsphase) dehnt und damit die Sarkomerlänge der Herzmuskelfasern vor der Kontraktion bestimmt. Im engeren Sinne also das enddiastolische Volumen. Unter der Nachlast (engl. afterload) versteht man die (gegen den Gefäßwiderstand) bei der Herzkammerentleerung (Austreibungsperiode) von der Ventrikelwand zu erbringende Kraft, deren Ausmaß v.a. vom diastolischen Druck in der Aorta bzw. im Truncus pulmonalis abhängt, somit also vom peripheren Widerstand des großen bzw. kleinen Kreislaufes. Durch eine Änderung der Vorlast oder Nachlast erhält man eine zeitliche Abfolge sich verändernder Druck-Volumen-Diagramme. Eine plötzliche Vorlastsenkung induziert eine Schleifenwanderung der initialen Zyklen und legt damit den Verlauf der isometrischen Maximallinie für den betreffenden jeweiligen Interventionszustand fest. Wenn man davon ausgeht, dass der kontraktile Zustand des Herzens während dieser Phase konstant bleibt, so fallen z.B. die endsystolischen Druck-Volumenpunkte (Punkt C in Abb. a) alle entlang einer Linie. Diese Linie entspricht im physiologischen Bereich einer Geraden (Abb. b). Im Bereich der Endsystole wird diese Gerade als die Endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (engl. endsystolic pressure-volume relationship, ESPVR) bezeichnet. Die Steigung

dieser Geraden nennt man die endsystolische Elastizität (endsystolic elastance). Dieser Anstieg gilt wegen seiner weitgehenden Lastunabhängigkeit als sehr sensitiver Index für linksventrikuläre Kontraktilität<sup>140</sup>. Während sich die linksventrikuläre Funktion durch die Erfassung der Auswurffraktion (ejection fraction, EF) relativ leicht bestimmen lässt, ist dies bei der Bestimmung einer abnormalen linksventrikulären isovolumetrischen Relaxation, gestörter Füllung und/oder verminderter Dehnungsfähigkeit viel schwieriger. Durch die invasive Methode mithilfe des Conductance-Katheters lässt sich eine eventuell vorhandene Diastolische Dysfunktion hämodynamisch beweisen: Es kann zu einer Erhöhung des enddiastolischen Druckes und/oder einer verminderten Druckabfallgeschwindigkeit  $dP_{dtmin}$  und/oder einer verminderten Relaxationsgeschwindigkeit  $\tau$  und/oder einer myokardialen Steifigkeitszunahme kommen. Dabei kann die Steifigkeitskonstante ebenso wie die Endsystolische Elastance direkt aus einer Vorlastsenkung (Vena-Cava- Okklusion) bestimmt werden.



**Abb. 9: Druck-Volumenschleife bei der Vena-Cava-Okklusion**

*Druck-Volumen-Schleife in Ruhe (kleinerer Pfeil) und deren Änderung während einer kurzzeitigen Vena-Cava-Okklusion. Während der Vorlastsenkung kommt es zu einer Linksverschiebung der Kurve (größerer Pfeil). Der Winkel der Tangente, die Verbindung der gemessenen Veränderungen der linksventrikulären enddiastolischen Drücke, ist ein Maß für die linksventrikuläre Steifigkeit Steifigkeitskonstante  $b$ <sup>141</sup>.*



Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Parameter bei der Herzkathetermessung.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Formelzeichen</b>	<b>Einheit</b>
<b>Linksventrikulärer enddiastolischer Druck</b>	<b>LVEDP</b>	<b>mmHg</b>
<b>Linksventrikulärer maximaler Druck</b>	<b>LVP max</b>	<b>mmHg</b>
<b>Linksventrikulärer endsystolischer Druck</b>	<b>LVESP</b>	<b>mmHg</b>
<b>Maximaler Anstieg des linksventrikulären Druckes</b>	<b>dPdtmax</b>	<b>mmHg/s</b>
<b>Minimaler Anstieg des linksventrikulären Druckes</b>	<b>dPdtmax</b>	<b>mmHg/s</b>
<b>Herzfrequenz (Schläge pro Minute)</b>	<b>HR</b>	<b>bpm</b>
<b>Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen</b>	<b>LVEDV</b>	<b>μl</b>
<b>Linksventrikuläres endsystolisches Volumen</b>	<b>LVESV</b>	<b>μl</b>
<b>Herzminutenvolumen (cardiac output)</b>	<b>CO</b>	<b>μl/min</b>
<b>Schlagvolumen (stroke volume)</b>	<b>SV</b>	<b>mmHg/s</b>
<b>Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls</b>	<b>Tau</b>	<b>ms</b>
<b>Schlagarbeit (stroke work)</b>	<b>SW</b>	<b>mmHg*</b>
<b>Auswurffraktion (ejection fraction)</b>	<b>EF</b>	<b>%</b>
<b>Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung</b>	<b>EDPVR</b>	<b>μl-1</b>
<b>Druckhalbwertszeit (pressure halftime)</b>	<b>PHT</b>	

**Tab. 8: Parameter der Herzkathetermessung**

### 3.2.7.5 Präparation und Versuchsablauf

Zur Messung mit dem Herzkatheter wurden die Tiere mit 125 μg/ g KGW Thiopental i.p. narkotisiert, intubiert und künstlich beatmet (200 mal pro min; Atemzugvolumen 8μl / g KGW; FiO<sub>2</sub> 21%).

Anschließend wurden die Tiere im Bereich des Kehlgangs rasiert und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert. Um Wärmeverluste zu vermeiden, wurden die Tiere mit einem Vlies abgedeckt. Nun wurde ein venöser Zugang für die Injektion der hypertonen Kochsalzlösung gelegt. Die Vena jugularis wurde frei präpariert und kopfwärts abgebunden. In die inzisierte Vene wurde dann ein dünner Katheter bis

kurz vor den rechten Vorhof vorgeschoben und in dieser Lage fixiert. Jetzt wurde die Arteria carotis unter Schonung des Nervus vagus frei präpariert. Mit Hilfe einer Mini-Klemme unterband man den arteriellen Blutfluss. Nun wurde das Gefäß kopfwärts ligiert, anschließend die Arteria carotis unmittelbar neben der kopfseitigen Ligatur inzidiert und der Conductance-Katheter in Richtung Herz bis zur Mini-Klemme vorgeschoben. Die Ligatur wurde nur so fest angezogen, dass sich der Katheter nach dem Lösen der Klemme gerade noch so weiterschieben ließ. Nach dem Entfernen der Klemme wurde der Conductance-Katheter retrograd zum Blutfluss über die Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben. Nun folgte die Ermittlung der Parallelen Conductance über eine Injektion von 5 bis 10  $\mu$ l hypertonischer Kochsalzlösung (ca. 10%ig) über den Katheter in der Vena jugularis. Um Irritationen durch die Beatmung zu vermeiden, wurde der Respirator während der Injektion für 6 bis 8 Sekunden in endexpiratorischer Stellung ausgeschaltet. Diese Prozedur wurde 2 bis 3 mal wiederholt, um sicher zu gehen, dass man einen optimalen Verlauf der Änderung in der Blutleitfähigkeit bekommen hat. Dann wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Vena cava caudalis zwischen Leber und Zwerchfell frei präpariert. Der Blutdruck fiel dabei mehr oder weniger stark ab, erholte sich aber wieder nach kurzer Zeit. Nach dieser Erholungsphase wurde die Vena cava caudalis mit Hilfe einer Pinzette kurzzeitig okkludiert, um eine Laständerung hervorzurufen. Alle Messungen wurden vorgenommen unter Aussetzung der Beatmung in endexpiratorischer Stellung. Zum Schluss wurde das Tier durch schnellen Blutentzug getötet. Das Blut wurde in S-Monovetten, Lithium Heparin aufgefangen, 5 Minuten mit 3000 Upm zentrifugiert und das Plasma mit dem Autoanalyser analysiert.

Im Anschluss an die Blutentnahme fand die Organentnahme statt. Es wurden Herz, Lunge, beide Nieren, Leber, und Milz entnommen. Alle Organe wurden gewogen. Das Herz wurde standardisiert horizontal geteilt mit dem Ziel beide Ventrikel darzustellen. Die Basis wurde in 4 % Formalin/ PBS und die Apex bei  $- 80^{\circ}\text{C}$  konserviert. Auch die restlichen Organe wurden jeweils zur Hälfte in 4 % Formalin/ PBS bzw. bei  $- 80^{\circ}\text{C}$  konserviert.

### 3.2.8 Histologische Methoden

#### 3.2.8.1 Fixierung

Durch die Fixierung der Organe wird das Auftreten postmortalen Veränderungen und eine Herauslösung von Zellbestandteilen während histochemischer Reaktionen verhindert. Dies wird durch Fällung der Zellproteine und einer Stabilisierung von Fetten und Lipiden erreicht.

Formaldehyd (HCHO) führt zur Bildung von Methylenbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine, was eine Blockade dieser Aminogruppen zur Folge hat. Es kommt zu einer Vernetzung der Eiweiße.

Die Organe wurden 24 h in 4%igem Formalin / PBS fixiert.

#### 3.2.8.2 Paraffineinbettung

##### Prinzip:

Um möglichst dünne Schnitte herstellen zu können, bettet man das Gewebematerial ein. Es bekommt hierdurch eine bestimmte Härte und Stabilität. Die Einbettung von Gewebe ist nur unter der Voraussetzung möglich, dass das zunächst flüssige Einbettungsmittel das Gewebe vollständig durchtränkt, dann fest wird und schließlich gemeinsam mit dem durchtränkten Gewebe geschnitten werden kann. Das Gewebe muß dazu vollständig entwässert und außerdem alkoholfrei sein. Da die Entwässerung in Alkohol durchgeführt wird, Alkohol sich aber nicht mit Paraffin verbindet, muß ein Intermedium zwischengeschaltet werden. Das Intermedium z. B. Xylol mischt sich sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin.

##### Durchführung

Die formalinfixierten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iges, 80%iges, 2 mal 96%iges und 3 mal absolutes Ethanol) für je 1 h entwässert, anschließend für 4 h in Xylol überführt. Dieser Vorgang wurde 2 mal mit

einer frischen Xylol-Lösung wiederholt.

Danach wurden die Präparate für 1 h in reines geschmolzenes Paraffin bei 56°C gegeben, danach nochmals für 2 h in ein weiteres Paraffinbad überführt.

Diese Schritte wurden über Nacht automatisch in einer Histokinette durchgeführt.

Am folgenden Tag wurden die Organe in TissueTek Unikassetten mit 56°C warmen Paraffin übergossen. Nach dem Erkalten des Paraffins waren die Präparate schnittfähig.

Am Mikrotom wurden 3 µm dicke bzw. für die Vermessung der Kardiomyozyten 1 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt.

### 3.2.8.3 Färbung

Es wurden Sirius Red, Elastica und HE Färbungen durchgeführt, die man in die folgenden Färbeschritte unterteilen kann:

#### I. Entparaffinieren und Bewässern

Die Paraffinschnitte wurden 2 mal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten in absolutem, 96%igem, 80%igem und 70%igem Ethanol) bewässert.

#### II. Einsatz der Färbelösungen

Mit den Färbelösungen wurden die spezifischen Strukturen (z.B. Zellkerne, Gefäße, Bindegewebe) gefärbt.

#### III. Entwässern

Die gefärbten Schnitte wurden dann in der aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten in 70%igem, 80%igem, 96%igem und absolutem Ethanol) und 2 mal 10 Minuten in Xylol entwässert.

#### IV. Eindecken

Anschließend wurden alle Schnitte mit Deckglas und Roti®-Histokitt eingedeckt.

#### *Die Sirius Red Färbung*

##### Prinzip:

Sirius Red ist ein anionischer Farbstoff, der auf Grund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt. Diese Färbung wurde nach der von Junqueira et al. publizierten Methode durchgeführt <sup>142</sup>:

### Benötigte Färbelösungen:

#### 1. Gesättigte wässrige Pikrinsäure:

- 7,5 - 10 g Pikrinsäure in 250 ml heißem A. dest. Lösen
- 6 - 7,5 g Pikrinsäure in 250 ml kaltem A. dest. lösen
- beide Ansätze mischen und filtrieren

#### 2. Sirius Red- 0,1 %ige Lösung:

- 0,2 g Sirius Red in 200 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure lösen, mischen und filtrieren; ph-Wert 2,0

#### 3. HCL 0,01 M:

- 0,5 ml HCL in 199,5 ml abs. Ethanol

### Färbung:

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

## Auswertung:

### 1. Analyse der interstitiellen Fibrose am Herzen

Zur digitalen Bildverarbeitung wurde ein PowerMac G4 (Macintosh) und das Programm Image in der Version 1.29d (Shareware des National Institute of Health, NIH, USA) genutzt. Zur morphometrischen Analyse wurden Ausschnitte der histologischen Präparate mit einem Olympus BH-2 Mikroskop und einer Farbkamera von Scion Corporation Model CFW-1310 C mit dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application Version 1.0 in den Rechner eingelesen. Zur Bestimmung des Anteils an kollagener Matrix pro Bildausschnitt wurden die Farbbilder vom Typ RGB color in Bilder 8-bit (grayscale) konvertiert. Im Treshold-Modus wurde dann eine Schwarz / Weißgrenze festgelegt, bei der die zu messenden Flächen schwarz zur Geltung kamen. Das Programm Image ermöglicht es, Partikel in einem bestimmten Größenbereich, unter der Angabe der minimalen und der maximalen Fläche, zu zählen. An jedem Präparat wurden 30 zufällig ausgewählte Ausschnitte vermessen. Alle Präparate wurden bei derselben Schwarz / Weißgrenze gemessen. Der Computer ermittelte die Gesamtfläche und die Sirius Red positive Fläche in Pixel. Die interstitielle Fibrose wurde dann als prozentualer Anteil der Sirius Red positiven Fläche an der Gesamtfläche des Bildausschnitts angegeben.

### 2. Analyse des perivaskulären Fibroseindex am Herzen

Zur Bewertung der perivaskulären Fibrose werden alle Arterien aufgesucht und beurteilt, deren Gefäßwand von gleichmäßiger Stärke ist, die also quer geschnitten sind. Man beurteilt den Durchmesser des Bindegewebes um die Gefäße herum und setzt sie ins Verhältnis zum Durchmesser der Gefäßmedia. Die Beurteilung wird in 5 Schweregrade unterteilt: 1 (0-25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (75-100%) und 5 (>100%). 50% bedeutet also in diesem Fall, dass der Durchmesser des Bindegewebes halb so groß ist wie der Durchmesser der Gefäßmedia. Dann wird der Schweregrad mit der Anzahl der Gefäße multipliziert und prozentual auf die Gesamtzahl der gezählten Gefäße bezogen.

Perivaskulärer Fibroseindex =  $(1x_n + 2x_n + 3x_n + 4x_n + 5x_n) / N$

n ist die Anzahl der Gefäße in diesem bestimmten Schweregrad und N ist die Gesamtzahl der untersuchten Gefäße.

Alle Gewebeschnitte wurden auf diese Weise von 2 Untersuchern beurteilt ohne die Gruppenzugehörigkeit zu kennen, es wurden Mittelwerte gebildet und die Gruppen statistisch ausgewertet.

### *Die HE Färbung*

#### Prinzip:

Die HE Färbung ist eine sukzessive Lackfärbung mit einem basischen Kernfarbstoff (Aluminiumhämatoxylin oder Eisenhämatoxylin) und einem sauren Cytoplasmafarbstoff (Eosin).

In dieser Färbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxylin dargestellt, so dass die Kerne, aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk blau erscheinen. Das Zytoplasma der Zellen, Kollagen und proteinhaltige Lösungen werden nuanciert rot angefärbt.

#### Benötigte Färbelösungen:

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

#### Färbung:

1. Entparaffinieren
2. kurz spülen in A. dest.
3. 1,5 Minuten in Hämalaun 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

### Auswertung

#### Bestimmung des Durchmessers der Kardiomyozyten

Zur Analyse des Myozytendurchmessers wurden 1 µm dicke, HE gefärbte Präparate verwendet. Diese wurden mit Hilfe einer am Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Deutschland) angeschlossenen CCD-Kamera (Hitachi Europe, Düsseldorf) in einen Power MacIntosh 7500/100 eingelesen und mit dem Programm Image, Version 1.61 (eine shareware des National Institut of Health, USA) analysiert. Es wurden 30 zufällig ausgewählte, über den Schnitt verteilte Myozyten vermessen. Mit Hilfe eines digitalen Zeichenbretts (Wacom ArtPad II) wurde der Durchmesser der Myozyte in Höhe des Myozytenkernes möglichst im rechten Winkel zum Faserverlauf markiert. Das Programm gibt diesen Durchmesser in Pixel an. Anschließend wurden die Pixel mit folgendem Umrechnungsfaktor umgerechnet:

2300 Pixel entsprechen 1 mm.

Der Umrechnungsfaktor wurde mit Hilfe einer Zählkammer unter den gleichen Bedingungen, mit der gleichen Vergrößerung bestimmt.

#### *Die Elastica Färbung*

#### 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.

### Benötigte Färbelösungen:

Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert

### Färbung:

1. Entparaffinieren
2. 10 Minuten in Resorcin- Fuchsin- Lösung im Brutschrank bei 60 °C
3. spülen in Leitungswasser
4. spülen in A. dest
5. Entwässern:
  - 2 mal spülen in 96 %igem Ethanol
  - 2 Minuten in absolutem Ethanol
  - 2 mal 5 Minuten in Xylol
6. Eindecken

### Auswertung

Bestimmung der Media zu Lumen Ratio

Zur Analyse der Media zu Lumen Ratio wurde ein weiteres digitales Bildverarbeitungssystem genutzt.

Die Präparate wurden am Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Deutschland) nach Arterien durchgesucht. Zur vergleichbaren Beurteilung der Medienstärke dürfen nur quer geschnittene Gefäße vermessen werden. Ein Kriterium dafür, dass ein Gefäß quer geschnitten dargestellt wird, ist das die Gefäßwandstruktur von gleichmäßiger Stärke ist, also einen gleichmäßig runden Querschnitt aufweist. Alle dieses Kriterium erfüllende Arterien wurden mit Hilfe einer am Mikroskop angeschlossenen CCD-Kamera (Hitachi Europe, Düsseldorf) in einen Power MacIntosh 7500/100 eingelesen und mit dem Programm Image, Version 1.61 (eine shareware des National Institut of Health, USA) analysiert. Die äußere und innere Begrenzung der Media der Arterien wurde mit Hilfe eines digitalen Zeichenbretts (Wacom ArtPad II) markiert.

Das Programm Image gibt dann die somit markierten Flächen des Lumenquerschnitts (innen) sowie des Gesamtquerschnitts in Pixeln an. Anschließend wurden aus diesen Flächen folgendermaßen die Mediafläche und die Media zu Lumen Ratio berechnet.

Mediafläche = Gesamtfläche – Lumenfläche

Media zu Lumen Ratio= Mediafläche/ Lumenfläche

### 3.2.9 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des t-Tests nach Student und des Mann-Whitney Rank Sum Tests (bei fehlender Normalverteilung) auf Signifikanz überprüft, wobei das Signifikanzniveau auf  $p < 0,05$  festgelegt wurde und in den Abbildungen und Tabellen teilweise durch \*, + bzw. # gekennzeichnet ist. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 11.0 für Windows durchgeführt. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden Grafiken aus gemittelten Gruppenwerten und den entsprechenden mittleren Fehlern der Mittelwerte (SEM) erstellt.

## **4 Ergebnisse**

Das folgende Kapitel präsentiert die Ergebnisse der vorliegenden Studie, welche anhand der beschriebenen Testverfahren statistisch abgesichert wurden.

Es ist eine Mäuselinie etabliert worden, die homozygot human ET-1 transgen und gleichzeitig iNOS ko ist. Der Status wurde mittels PCR aus Vollblut und durch Nachkommenprüfung bestätigt. Zum Vergleich wurden homozygot ET-1 transgene, homozygot iNOS ko und Wildtypiere untersucht.

Es sind jeweils altersgleiche Tiergruppen von den drei Linien sowie aus Kontrolltieren gebildet worden. Sie wurden im Alter von 60, 300 und 400 Tagen gewogen. Es wurde ihr Blut und Urin untersucht, der Blutdruck gemessen, eine Herzkatheteruntersuchung vorgenommen, dann wurden sie getötet und die Organe entnommen.

### **4.1 Körper-und Organgewichte**

Die Körper- und Organgewichte der homozygot human ET-1 transgenen / iNOS ko, homozygot ET-1 transgenen, homozygot iNOS ko und Wildtypiere wurden miteinander verglichen. Sie wurden im Alter von 60, 300 und 400 Tagen gewogen und jeweils im gleichen Alter getötet und seziiert. Die Körpergewichte der 60 Tage alten Tiere der Gruppe iNOS -/- und der 300 Tage alten Tiere der Gruppe iNOS -/- ET +/+ waren signifikant schwerer als die altersgleichen Tiere der Gruppe ET +/+. In der Altersgruppe der 400 Tage alten Tiere gab es dann keine signifikanten Unterschiede mehr. Der Vergleich der Werte ergab keinen signifikanten Unterschied der relativen und absoluten Organgewichte zwischen den Gruppen.

Status	iNOS -/- ET +/+	iNOS -/-	ET +/+	WT
Tierzahl	n = 20	n = 11	n = 17	n = 10
KG 60 d alt	28,96 ± 3,19	30,25 ± 8,01 +	26,87 ± 3,19	29,73 ± 4,63
KG 300 d alt	37,28 ± 4,50 +	38,97 ± 7,07	33,98 ± 5,84	38,92 ± 6,58
KG 400 d alt	35,85 ± 3,86	38,87 ± 6,20	35,07 ± 3,32	38,91 ± 7,72

**Tab. 9: Körpergewichte im Alter von 60, 300 und 400 Tagen**

Die Körpergewichte (KG) der 60 Tage alten Tiere der Gruppe iNOS -/- und der 300 Tage alten Tiere der Gruppe iNOS -/- ET +/+ waren signifikant schwerer als die altersgleichen Tiere der Gruppe ET +/+. In der Altersgruppe der 400 Tage alten Tiere gab es keine signifikanten Unterschiede mehr. Die Angaben sind Mittelwerte ± Standardfehler. + :  $p < 0,05$  versus ET +/+. Weiterhin ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).

Absolute Organgewichte [g]				
Status	iNOS -/- ET +/+	iNOS -/-	ET +/+	WT
Tierzahl	n = 20	n = 11	n = 17	n = 10
Herz	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,07	0,19 ± 0,05
Niere links	0,26 ± 0,07	0,24 ± 0,05	0,27 ± 0,08	0,28 ± 0,08
Niere rechts	0,27 ± 0,07	0,26 ± 0,08	0,27 ± 0,07	0,03 ± 0,10
Leber	1,55 ± 0,33	1,69 ± 0,27	1,45 ± 0,23	1,52 ± 0,30
Lunge	0,26 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,32 ± 0,30	0,27 ± 0,07
Milz	0,12 ± 0,06	0,16 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,02

**Tab. 10: Absolute Organgewichte von 400 Tage alten Mäusen**

Die absoluten Organgewichte waren innerhalb der Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Angaben sind Mittelwerte ± Standardfehler. Weiterhin ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).

Relative Organgewichte [%]				
Status	iNOS -/- ET +/+	iNOS -/-	ET +/+	WT
Tierzahl	n = 20	n = 11	n = 17	n = 10
Herz	0,52 ± 0,06	0,52 ± 0,09	0,56 ± 0,17	0,49 ± 0,08
Niere links	0,72 ± 0,16	0,63 ± 0,11	0,76 ± 0,20	0,72 ± 0,13
Niere rechts	0,75 ± 0,16	0,68 ± 0,15	0,75 ± 0,16	0,75 ± 0,17
Leber	4,31 ± 0,68	4,40 ± 0,65	4,13 ± 0,49	3,95 ± 0,65
Lunge	0,72 ± 0,10	0,66 ± 0,15	0,92 ± 0,88	0,69 ± 0,14
Milz	0,34 ± 0,15	0,39 ± 0,20	0,31 ± 0,10	0,29 ± 0,07

**Tab. 11: Relative Organgewichte von 400 Tage alten Mäusen**

*Die relativen Organgewichte (Anteil des Organgewichtes am Körpergewicht in Prozent) waren innerhalb der Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Angaben sind Mittelwerte ± Standardfehler. Weiterhin ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).*

## 4.2 Blutdruckmessung

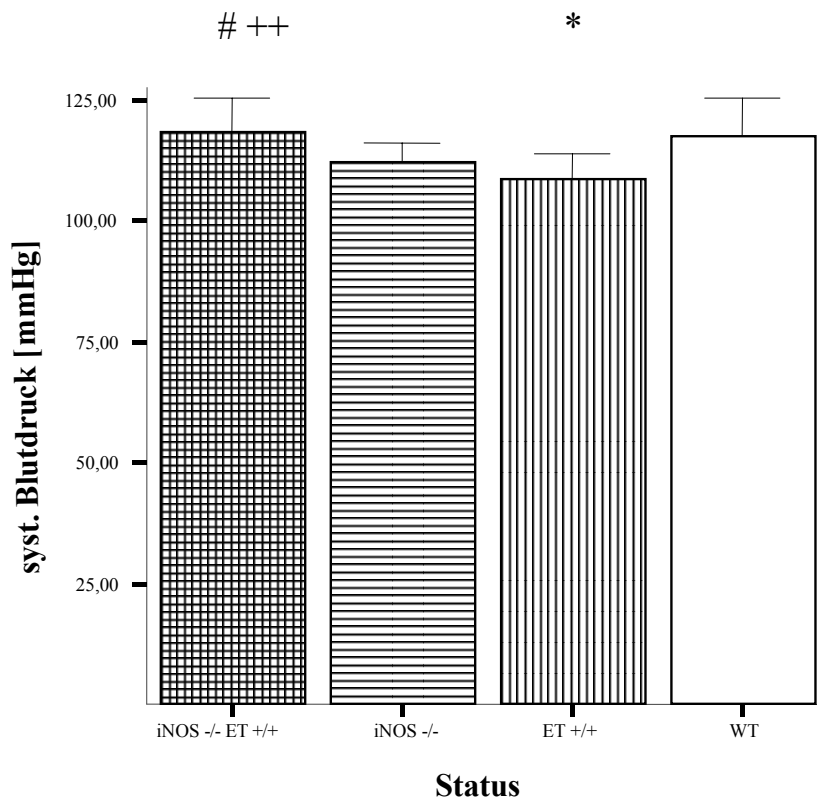
Die Blutdruckmessung erfolgte mittels der Tail-Cuff-Methode. Dies ist eine nicht-invasive Blutdruckmessmethode, wobei unter Verwendung einer Druckmanschette am Schwanz der Tiere und eines piezoelektrischen Pulsaufnehmers der mittlere systolische Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt werden.

Der mittlere systolische Blutdruck und die Herzfrequenz der iNOS -/- ET +/+ Tiere waren signifikant höher als der der iNOS -/- Tiere und der ET +/+ Tiere, aber sie waren gleich im Vergleich zu den Wildtyptieren. Der mittlere systolische Blutdruck der ET +/+ Tiere war signifikant niedriger als der der Wildtyptiere.

Status	iNOS -/- ET +/+	iNOS -/-	ET +/+	WT
Tierzahl	n = 29	n = 8	n = 19	n = 8
syst. BD [mmHg]	118,52 ± 7,05 #++	112,28 ± 3,75	108,64 ± 5,26 *	117,52 ± 8,07
HF [bpm]	697,71 ± 42,45 ##	664,76 ± 23,66	669,05 ± 37,41	693,55 ± 51,36

**Tab. 11: Mittlerer systolischer Blutdruck (syst. BD) und Herzfrequenz (HF)**

*Der mittlere systolische Blutdruck (syst. Blutdruck) und die Herzfrequenz (HF) der iNOS -/- ET +/+ Tiere sind signifikant höher als der der iNOS -/- Tiere und der ET +/+ Tiere. Der mittlere systolische Blutdruck der ET +/+ Tiere ist signifikant niedriger als der der Wildtyptiere. Die Angaben sind Mittelwerte ± Standardfehler. #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$  verglichen mit iNOS -/- ; +:  $p < 0,05$  und ++:  $p < 0,001$  verglichen mit ET +/+; \*:  $p < 0,05$  verglichen mit WT . Weiterhin ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).*



**Abb. 10: Mittlerer systolischer Blutdruck (syst. Blutdruck)**

Der mittlere systolische Blutdruck (syst. Blutdruck) der *iNOS* -/- *ET* +/+ Tiere ist signifikant höher als der der Gruppen *iNOS* -/- und *ET* +/+. Der Wert der *ET* +/+ Tiere ist signifikant niedriger als der der Wildtypiere. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. #:  $p < 0,05$  verglichen mit *iNOS* -/-; ++:  $p < 0,001$  verglichen mit *ET* +/+; \*:  $p < 0,05$  verglichen mit Wildtypieren.  $n = 8 - 29$  Tiere pro Gruppe.



### 4.3 Blutparameter

#### 4.3.1 Plasmawerte

Im Anschluß an die Herzkatheteruntersuchung wurde das Blut aufgefangen, zentrifugiert und das Plasma mit dem Autoanalyzer analysiert. Die untersuchten Tiere hatten ein Alter von ca. 400 Tagen.

Die gemessenen Werte sind bei allen Tiergruppen nicht unterschiedlich zum Normwert, jedoch im Vergleich zu den ET +/+ ist das Natrium der iNOS -/- ET +/+ Tiere signifikant niedriger und das C-reaktive Protein der iNOS -/- Tiere, das Totalprotein und das Albumin der ET +/+ Tiere gegenüber den Wildtyptieren signifikant höher.

Status	iNOS -/- ET +/+	iNOS -/-	ET +/+	WT
Tiere	n = 20	n = 10	n = 15	n = 9
Gluc [mg/ dl]	193,50 ± 54,84	155,50 ± 47,63	193,27 ± 101,06	246,25 ± 63,46
Crea [mg/dl]	0,17 ± 0,07	0,14 ± 0,05	0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,08
Urea [mgdl]	58,91 ± 21,38	48,36 ± 11,08	51,61 ± 10,32	51,22 ± 8,35
TP [g/dl]	4,91 ± 0,47	5,12 ± 0,32	5,25 ± 0,54 *	4,80 ± 0,47
Alb [g/dl]	2,72 ± 0,37	2,96 ± 0,32	3,32 ± 0,39 *	2,88 ± 0,36
ALT 25□QU/l]	67,35 ± 21,00	71,50 ± 29,76	77,53 ± 64,98	76,00 ± 20,16
ALT 37□QU/l]	36,37 ± 11,34	38,61 ± 16,07	41,87 ± 35,09	36,48 ± 17,05
AST 25□QU/l]	138,55 ± 65,61	141,50 ± 67,61	115,33 ± 40,17	179,22 ± 105,13
AST 37□QU/l]	67,89 ± 32,15	69,34 ± 33,13	56,51 ± 19,69	79,82 ± 51,82
CK [U/l]	1638,85 ± 1338,83	978,6 ± 322,81	931,87 ± 734,28	1213,43±690,78
CRP [mg/dl]	0,036 ± 0,013	0,043 ± 0,003 *	0,035 ± 0,007	0,035 ± 0,011
Na [mmol/l]	142,40 ± 11,49 +	160,70 ± 31,78	156,80 ± 22,41	158,00 ± 31,38
K [mmol/l]	5,23 ± 2,16	4,20 ± 0,67	4,38 ± 0,90	4,42 ± 0,89
Cl [mmol/l]	115,30 ± 8,95	114,40 ± 10,77	118,20 ± 4,75	117,43 ± 1,13

**Tab. 12: Blutwerte**

*Das Natrium (Na) der iNOS -/- ET +/+ Tiere ist signifikant niedriger als das der ET +/+. Das C-reaktive Protein (CRP) der iNOS -/- Tiere, das Totalprotein (TP) und das Albumin (Alb) der ET +/+ Tiere sind gegenüber den Wildtyptieren signifikant höher. Die Angaben sind Mittelwerte ± Standardfehler. + : p < 0,01*

verglichen mit ET +/+; \*:  $p < 0,05$  verglichen mit WT. Weiterhin ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).

#### 4.3.2 BNP

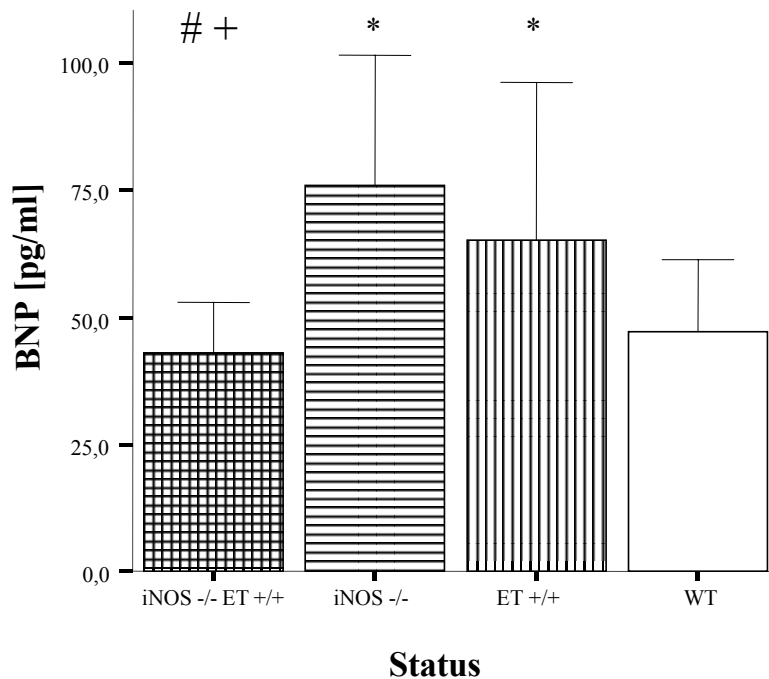
Im Alter von ca. 250 Tagen wurden den Tieren mittels Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut abgenommen. Die quantitative Bestimmung des Brain natriuretic peptide aus dem Plasma fand mittels Radioimmunoassay (RIA) statt. Die BNP Konzentration der iNOS -/- ET +/+ Tiere ist signifikant niedriger als die der iNOS -/- und der ET +/+ Tiere.

Status	iNOS -/- ET +/+	iNOS -/-	ET +/+	WT
Tierzahl	n = 31	n = 12	n = 23	n = 9
BNP [pg/ ml]	42,77 ± 10,03#+	75,76 ± 25,80*	65,15 ± 31,06*	47,09 ± 14,45

**Tab. 13: BNP Konzentration im Plasma**

Die BNP Konzentration der iNOS -/- ET +/+ Tiere ist signifikant niedriger als die der iNOS -/- und der ET +/+ Tiere. Die Angaben sind Mittelwerte ± Standardfehler.

\* =  $p < 0,01$  verglichen mit WT; # =  $p < 0,01$  verglichen mit iNOS -/-; + =  $p < 0,01$  verglichen mit ET +/+. Weiterhin ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).



**Abb. 11: BNP Konzentration im Plasma**

Die BNP Konzentration der *iNOS* -/- *ET* +/+ Tiere ist signifikant niedriger als die der *iNOS* -/- und der *ET* +/+ Tiere. \* =  $p < 0,01$  verglichen mit WT; # =  $p < 0,01$  verglichen mit *iNOS* -/-; + =  $p < 0,01$  verglichen mit *ET* +/+. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.  $n = 9-31$  Tiere pro Gruppe

#### 4.4 Urinparameter

Alle Mäuse waren zum Untersuchungszeitpunkt ungefähr 300 Tage alt. Zu Beginn des Stoffwechselversuches wurden die Tiere gewogen und in den Stoffwechselkäfig gesetzt. Nach 24 h wurde die Urinmenge protokolliert und eine Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus unter Inhalationskurznarkose mit Isofluran durchgeführt. Das Urinvolumen wurde gravimetrisch erfaßt. Die quantitative Bestimmung des cyclischen Guanodin-Monophosphates (cGMP) erfolgte mittels Radioimmunoassay (RIA). Das Plasma- und Urinkreatinin wurde mit Hilfe des

Autoanalyzers gemessen. Daraus erfolgte die Berechnung der GFR. Es konnten keine Unterschiede im Urinvolumen, in der Urinkreatininkonzentration, der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des cyclischen Guanosin-Monophosphates (cGMP) im 24h-Urin festgestellt werden

Status	iNOS -/- ET	iNOS -/-	ET +/-	WT
Tierzahl	n = 14	n = 19	n = 7	n = 20
Volumen [ml/24 h]	5,16 ± 1,32	4,90 ± 3,03	5,58 ± 2,56	5,52 ± 3,47
Kreatinin [mg/dl]	0,51 ± 0,19	0,50 ± 0,21	0,40 ± 0,09	0,55 ± 0,14
GFR [ml/ min]	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,03
cGMP [nmol/ 24h]	2,33 ± 1,69	3,98 ± 3,40	2,56 ± 2,56	1,24 ± 1,35

**Tab. 14: Urinparameter**

*Die Werte für das Urinvolumen, die Kreatininkonzentration im Urin, die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und des cyclischen Guanosin-Monophosphates (cGMP) im 24h-Urin unterscheiden sich nicht innerhalb der vier Gruppen. Die Angaben sind Mittelwerte ± Standardfehler. Weiterhin ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).*

#### **4.5 Herzkatheter – Parameter**

Im Alter von ca. 400 Tagen wurden die Mäuse einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen. Die Mittelwerte ± Standardfehler der dabei gemessenen bzw. berechneten Werte können aus der Tabelle entnommen werden. Grafisch abgebildet sind der Linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP), der Linksventrikuläre maximale Druck (LVP max), der Linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP), der Maximale Anstieg des Linksventrikulären Druckes (dPdtMax), der Minimale Anstieg des Linksventrikulären Druckes (dPdtMin), die Druckhalbzeit (Pressure Halftime, PHT) und die Diastolische Steifigkeit (EDPVR) (Abb. 13 bis Abb. 19). Mit Ausnahme der Diastolischen Steifigkeit (EDPVR) sind die Werte der iNOS -/- ET +/- Tiere im Vergleich zu den Werten der Wildtypiere nicht unterschiedlich. Im Vergleich zu den Wildtypieren ist die Diastolische Steifigkeit

wie bei den beiden anderen Gruppen auch zwar höher, aber im Vergleich zu ET +/+ signifikant niedriger. Der Linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP), der Linksventrikuläre maximale Druck (LVPmax) und der Linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) der iNOS -/- ET +/+ sind niedriger im Vergleich zu den ET +/+ Tieren, deren LVESP und LVPmax signifikant höher als die der Wildtypiere sind. Der Linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die Druckhalbzeit (Pressure Halftime, PHT) der iNOS -/- ET +/+ Tiere sind niedriger im Vergleich zu den iNOS -/- Tieren, deren LVEDP signifikant höher als der der Wildtypiere ist. Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dPdtmax) der iNOS -/- ET +/+ Gruppe ist signifikant höher als die der iNOS -/- Gruppe. Die maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dPdtmin) der ET +/+ ist höher als die der Wildtypiere.

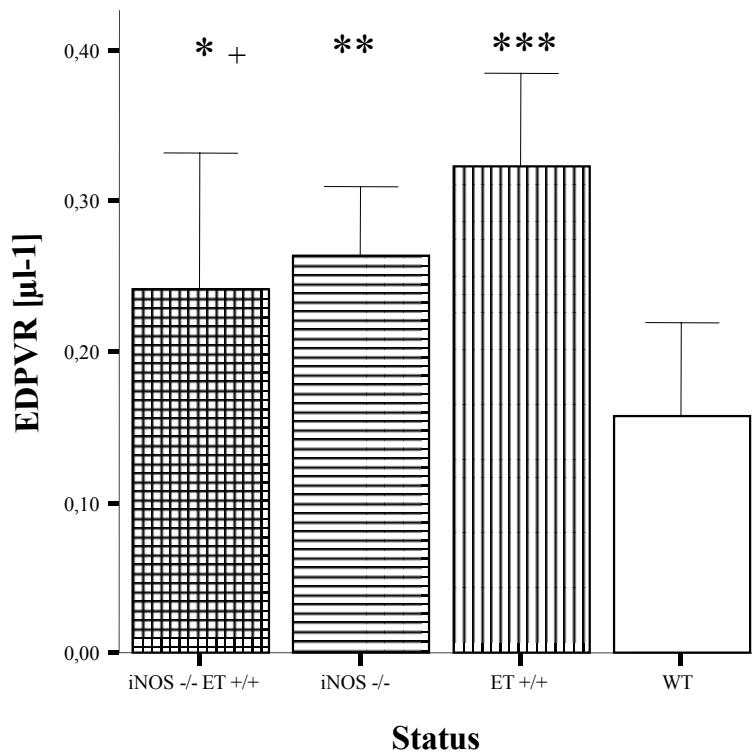
Status	iNOS -/- ET +/+	iNOS -/-	ET +/+	WT
Tiere	n=15	n=7	n=8	n=8
LVESP [mmHg]	76,17 ± 13,21 <sup>+</sup>	75,99 ± 10,95	93,38 ± 15,82 <sup>*</sup>	76,24 ± 10,02
LVP max [mmHg]	96,12 ± 10,67 <sup>+</sup>	89,85 ± 9,27	106,51 ± 12,66 <sup>**</sup>	91,84 ± 8,21
LVEDP [mmHg]	4,88 ± 1,45 <sup>###+</sup>	8,06 ± 1,99 <sup>*</sup>	7,18 ± 2,71	5,74 ± 1,96
dPdtMax [mmHg/s]	7599,18 ± 1677,19	6078,61 ± 1207,76	7981,73 ± 2096,46	6484,99 ± 938,86
dPdtMin [mmHg/s]	-6172,58 ± 1447,69	5362,71 ± 1207,76	-7075,44 ± 1563,97 <sup>*</sup>	-5669,18 ± 830,43
SW [mmHg * μl]	2454,14 ± 700,64	2194,67 ± 631,62	2429,40 ± 1032,45	1759,45 ± 1056,91
Tau [ms]	8,78 ± 1,02	9,39 ± 0,83	9,66 ± 1,48	9,57 ± 1,33
PHT	4,94 ± 0,53 <sup>#</sup>	5,77 ± 0,74	5,67 ± 1,04	5,48 ± 0,86
CO [μl/min]	12517,44 ± 4206,16	12278,53 ± 2188,24	12272,98 ± 3548,96	11,25,46 ± 3649,28
SV [mmHg/s]	28,30 ± 7,18	30,80 ± 6,56	27,62 ± 11,14	27,25 ± 5,59
EF [%]	41,94 ± 7,17	44,69 ± 9,49	42,43 ± 10,56	39,76 ± 12,46
LVESV [μl]	43,85 ± 10,91	48,37 ± 22,90	42,33 ± 15,06	42,01 ± 11,56
LVEDV [μl]	68,87 ± 16,04	72,39 ± 23,45	65,55 ± 17,81	66,01 ± 9,27
EDPVR [μl-1]	0,24 ± 0,09 <sup>*+</sup>	0,26 ± 0,05 <sup>**</sup>	0,32 ± 0,06 <sup>***</sup>	0,16 ± 0,06
HR [bpm]	426,49 ± 56,41	402,19 ± 42,28	432,42 ± 46,29	426,20 ± 38,05

**Tab. 15: Ergebnisse der Herzkathetermessungen**

Mit Ausnahme der Diastolischen Steifigkeit (EDPVR) sind die Werte der iNOS -/- ET +/+ Tiere im Vergleich zu den Werten der Wildtypiere nicht unterschiedlich. Die Diastolische Steifigkeit aller drei Gruppen ist höher als die der Wildtypiere, aber im Vergleich zu ET +/+ ist die EDPVR der iNOS -/- ET +/+ signifikant niedriger. Der Linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP), der Linksventrikuläre maximale Druck (LVPmax) und der Linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) der iNOS -/- ET +/+ sind niedriger im Vergleich zu den ET +/+ Tieren, deren LVESP und LVPmax signifikant höher als die der Wildtypiere sind. Es sind für alle gemessenen und berechneten Parameter jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. CO = Herzminutenvolumen (cardiac output) [μl/min], dPdtmax = Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit [mmHg /s], dPdtmin = Maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit [mmHg /s], EDPVR = Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung [μl -1], Maß für die Steifheit des Herzens in der Enddiastole, die so genannte Steifigkeitskonstante (stiffness), EF = Auswurfraction

(ejection fraction) [%], HR = Herzfrequenz (heart rate) [bpm],  
LVEDP = Linksventrikulärer enddiastolischer Druck [mmHg],  
LVESP = Linksventrikulärer endsystolischer Druck [mmHg],  
PHT = Druckhalbwertzeit (Pressure Halftime), LVP max = Linksventrikulärer  
maximaler Druck [mmHg], SV = Schlagvolumen [mmHg/s], SW = Schlagarbeit  
(stroke work) [mmHg\* $\mu$ l], t = Isovolumetrische Relaxationsgeschwindigkeit [ms],  
LVEDV = Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen [ $\mu$ l] und  
LVESV = Linksventrikuläres endsystolisches Volumen [ $\mu$ l]. \* =  $p < 0,05$ ,  
\*\* =  $p < 0,01$  \*\*\* =  $p < 0,001$  verglichen mit WT, # =  $p < 0,05$ , ## =  $p < 0,01$   
vergleichen mit iNOS -/- und + =  $p < 0,05$  verglichen mit ET +/-+. Weiterhin ist die  
Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).

## Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung

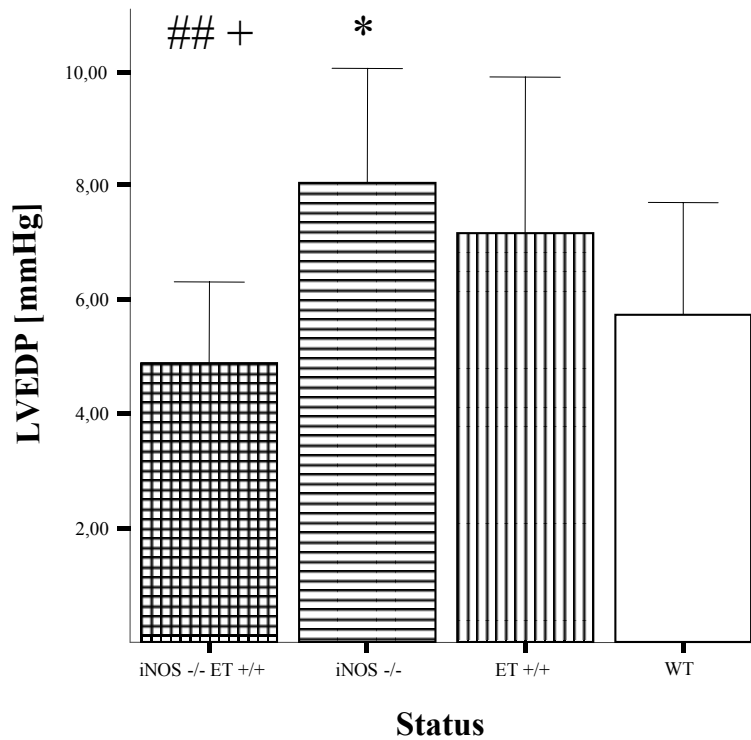


**Abb. 12: Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR)**

EDPVR ist ein Maß für die Steifheit des linken Ventrikels in der Diastole. Die Diastolische Steifigkeit aller drei Gruppen ist höher als die der Wildtyptiere, aber im Vergleich zu ET +/+ ist die EDPVR der iNOS -/- ET +/+ signifikant niedriger. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  verglichen mit WT, + =  $p < 0,05$  verglichen mit ET +/+. n = 7-15 Tiere pro Gruppe.



## Linksventrikulärer enddiastolischer Druck



**Abb. 13: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)**

Der Linksventrikuläre enddiastolische Druck der Gruppe *iNOS* -/- *ET* +/+ ist signifikant niedriger als der der *iNOS* -/- und *ET* +/+ Tiere, unterscheidet sich jedoch nicht von dem der Wildtypiere. Der Linksventrikuläre enddiastolische Druck der Gruppe *iNOS* -/- ist signifikant höher als der der Wildtypiere. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. \* =  $p < 0,05$ , verglichen mit WT, ## =  $p < 0,01$  verglichen mit *iNOS* -/- und + =  $p < 0,05$  verglichen mit *ET* +/+.  $n = 7-15$  Tiere pro Gruppe.

#### **4.6 Histologische Parameter des Herzens**

Die Organentnahme bei den ca. 400 Tage alten Tieren erfolgte im Anschluß an die Herzkatheteruntersuchung. Die Herzen wurden in 4%igem Formalin fixiert, eingebettet, geschnitten, gefärbt und ausgewertet.

Die histologischen Schnitte zur Beurteilung der Media zu Lumen Ratio wurden mit der Färbung Elastica gefärbt und alle vollständig dargestellten Arterien im Schnitt analysiert. Mit Hilfe des Computers wurden die äußere und innere Begrenzung der Media der Arterien markiert und so die Gesamt- und Lumenfläche ermittelt. Die Mediafläche und der Quotient (Ratio) Mediafläche / Lumenfläche wurden errechnet. Der Quotient Media- zu Lumenfläche war nicht unterschiedlich innerhalb der Gruppen.

Die Auswertung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose erfolgte an Sirius Red gefärbten Schnitten, bei der sich das Bindegewebe rot darstellt. Zur Bewertung der perivaskulären Fibrose werden alle vollständig dargestellten Arterien analysiert. Man beurteilt den Durchmesser des Bindegewebes um die Gefäße herum und setzt sie ins Verhältnis zum Durchmesser der Gefäßmedia. Der Perivaskuläre Fibroseindex wurde wie oben beschrieben berechnet. Der Perivaskuläre Fibroseindex der iNOS -/- ET +/- unterscheidet sich nicht von dem der Wildtyptiere. Der Indices der iNOS -/- und ET +/- sind verglichen mit dem der Wildtyptiere erhöht.

Die Auswertung der interstitiellen Fibrose der Herzen erfolgte mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungssystems. Es wurde der prozentuale Anteil an Sirius Red positiver Fläche berechnet. Alle drei Gruppen zeigten vermehrt interstitielle Fibrose im Vergleich zu den Wildtyptieren.

Die Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers erfolgte an HE gefärbten Gewebeschnitten mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungssystems. Es wurden 30 zufällig ausgewählte, über den Schnitt verteilte Myozyten vermessen. Mit Hilfe eines digitalen Zeichenbretts wurde der Durchmesser des Myozyten in Höhe des Myozytenkernes möglichst im rechten Winkel zum Faserverlauf markiert. Das Programm gibt diesen Durchmesser in Pixel an. Anschließend wurden die Pixel in

µm umgerechnet:

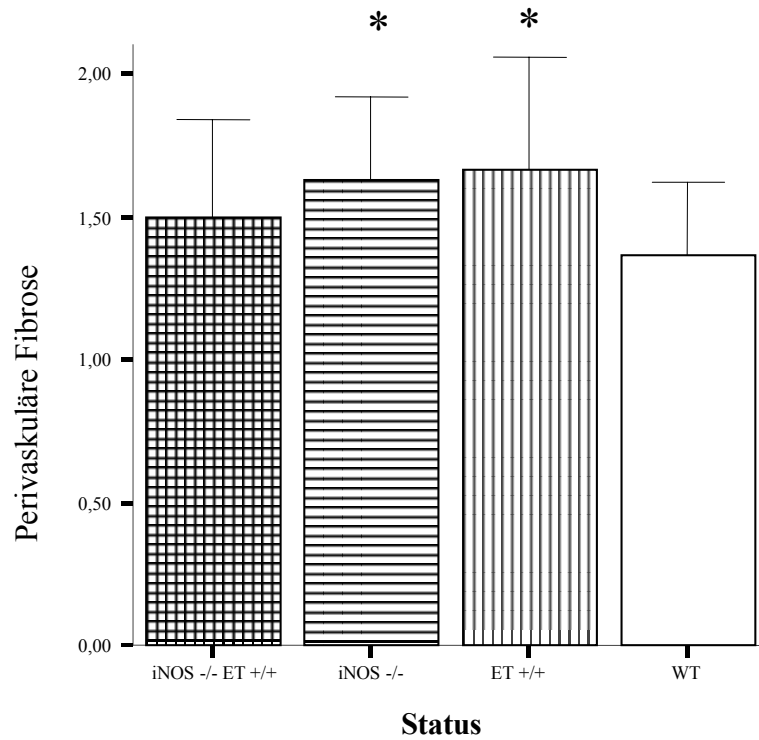
Es ergaben sich keine Unterschiede in den Kardiomyozytendurchmesser der vier Gruppen.

Status	iNOS -/- ET +/+	iNOS -/-	ET +/+	WT
Tiere	n = 19	n = 11	n = 17	n = 10
Media zu Lumen Ratio	1,27 ± 0,32	1,14 ± 0,36	1,22 ± 0,29	1,32 ± 0,41
Perivaskuläre Fibrose	1,50 ± 0,34	1,63 ± 0,29 *	1,67 ± 0,39 *	1,36 ± 0,26
Interstitielle Fibrose [%]	1,44 ± 0,51 *	1,81 ± 0,86 *	1,51 ± 0,32 *	1,00 ± 0,16
Myozytendurchmesser [µm]	10,48 ± 1,20	10,09 ± 0,94	9,59 ± 0,93	9,62 ± 0,73

**Tab. 16: Histologische Parameter der Herzen**

*Der Perivaskuläre Fibroseindex der iNOS -/- ET +/+ unterscheidet sich nicht von dem der Wildtypiere. Der Indices der iNOS -/- und ET +/+ sind verglichen mit dem der Wildtypiere erhöht. Die interstitielle Fibrose aller drei Gruppen war verglichen mit der der Wildtypiere erhöht. Keine Unterschiede ergaben sich bei der Media zu Lumen Ratio und beim Myozytendurchmesser. Es sind die Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. \* =  $p < 0,05$  verglichen mit WT. Weiterhin ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe angegeben (n).*

## Perivaskuläre Fibrose

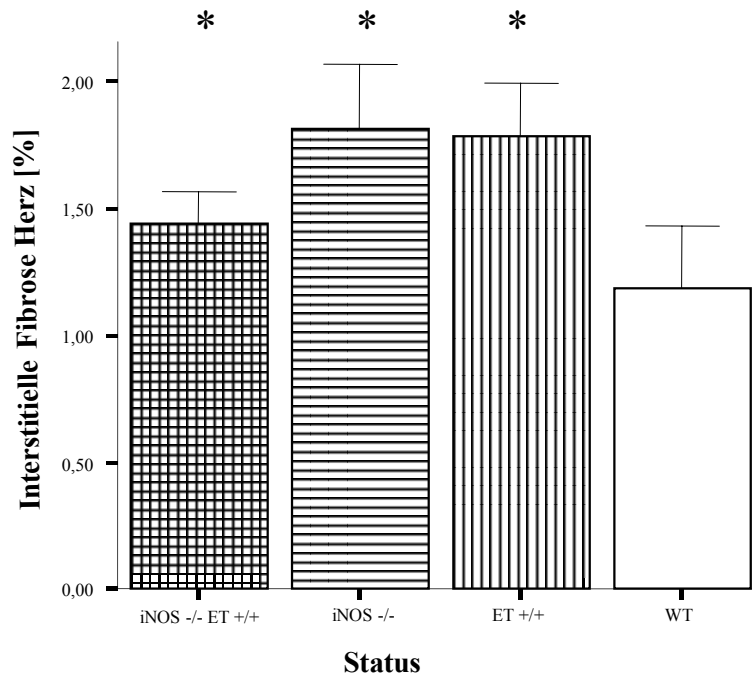


**Abb. 14: Perivaskuläre Fibrose**

*Der Perivaskuläre Fibroseindex der iNOS -/- ET +/+ unterscheidet sich nicht von dem der Wildtypiere. Der Indices der iNOS -/- und ET +/+ sind verglichen mit dem der Wildtypiere erhöht. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.*

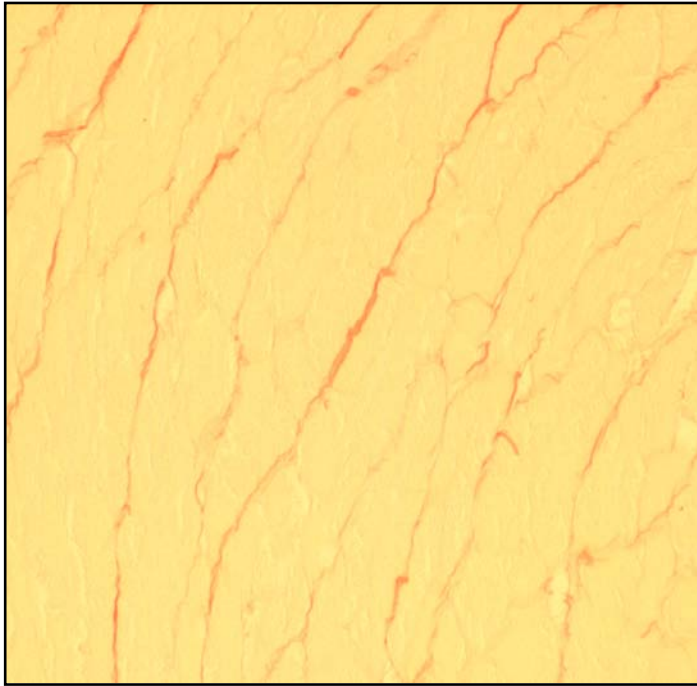
*. \* =  $p < 0,05$  verglichen mit WT.  $n = 10-19$  Tiere pro Gruppe.*

## Interstitielle Fibrose

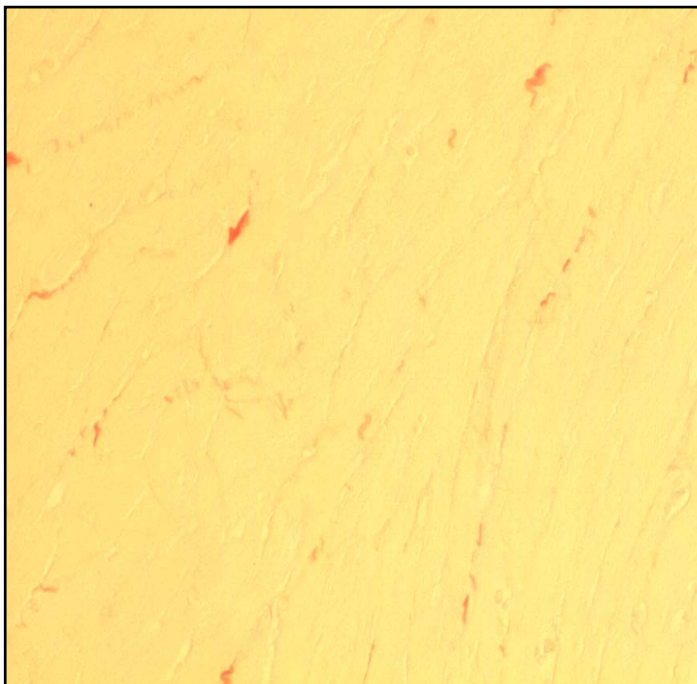


**Abb. 14: Interstitielle Fibrose**

*Die interstitielle Fibrose aller drei Gruppen war verglichen mit der der Wildtypiere erhöht. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt. \* =  $p < 0,05$  verglichen mit WT.  $n = 10-19$  Tiere pro Gruppe.*



**Abb. 15: Histologischer Ausschnitt eines Herzens (ET +/+) mit ausgeprägter interstitieller Fibrose, Sirius Red, Vergr. 200**



**Abb. 16: Histologischer Ausschnitt eines Herzens (WT) mit einem physiologischen Maß an interstitiellen Bindegewebe, Sirius Red, Vergr. 200**

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt anhand eines transgenen Mausmodells den Einfluss der Unterdrückung der iNOS-abhängigen NO-Synthese im Zustand einer Überproduktion von Endothelin-1 auf den Blutdruck, die Herzfunktion und den kardialen Phänotyp.

Endothelin-1 (ET-1) ist ein potenter Vasokonstriktor<sup>1</sup>. Die intravenöse Gabe von ET-1 führt zu einer schnellen und kurzfristigen Vasodilatation, gefolgt von einem langanhaltenden Blutdruckanstieg<sup>61</sup>. Die vermutete Rolle des ET-1 als Blutdruck kontrollierendes Peptid konnte jedoch nicht klar bestätigt werden, human ET-1 transgene Mäuse stellten sich als nicht hypertensiv heraus<sup>143</sup>. Diverse Studien geben Hinweise darauf, Stickstoffmonoxid als physiologischen Gegenspieler von Endothelin-1 zu sehen<sup>88-90,90,107,109,144</sup>, sie sind Komponenten eines lokalen negativ-rückgekoppelten Regelkreises. Nach Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME, sowie nach Vorbehandlung mit Dexamethason als selektiven Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase, war der Blutdruck human ET-1 transgener Mäuse erhöht. Außerdem zeigten human ET-1 transgene Mäuse eine Veränderung des kardialen Phänotyps nach chronischer pharmakologischer Blockade der NO Synthese<sup>145</sup>. Aus diesem Grund wurden transgene Mäuse gezüchtet, die das humane Endothelin-1 Gen und einen iNOS knockout haben. Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob und wie der iNOS k.o. die Herzfunktion, den Blutdruck und den kardialen Phänotyp der human Endothelin-1 transgenen Mäuse beeinflusst. Die Züchtung erfolgte aus einem gemeinsamen genetischen Pool. Der Erfolg der Züchtung konnte durch Genanalysen und Rückkreuzungen bewiesen werden.

Die Messung des systolischen Blutdrucks zeigte einen höheren Druck bei den iNOS -/- ET +/+ im Vergleich mit den ET-1 transgenen Tieren, gleichzeitig wiesen sie ein niedrigeres BNP auf. Das wichtigste Ergebnis der Herzkathetermessung war, dass bei allen 3 transgenen Gruppen die Diastolische Steifigkeit (EDPVR) erhöht war, ein Zeichen einer diastolischen Dysfunktion. Bei den iNOS -/- ET +/+ allerdings war die EDPVR signifikant niedriger als bei den ET-1 transgenen Tieren. Zusätzlich

zeigt sich, dass bei den iNOS -/- ET +/+ Mäusen die LVEDP signifikant niedriger ist als bei den ET +/+ Tieren. Die verbesserte Herzfunktion spiegelt sich auch histologisch wider. Sie zeigten keine erhöhte perivaskuläre Fibrose wie die ET-1 transgenen Tiere.

Mittlerer systolischer Blutdruck und mittlere Herzfrequenz der ET-1 transgenen iNOS -/- Mäuse

Als mögliche Ursache der arteriellen Hypotension der ET-1 transgenen Mäuse wurde die von Hocher et al.<sup>146</sup> beschriebene vermehrte Expression und Aktivität der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) bei diesen Tieren vermutet. Die transgenen Mäuse zeigten ausgeprägte, vornehmlich perivaskulär lokalisierte Infiltrate CD4-positiver Zellen, welche in der Lage sind iNOS zu synthetisieren. Folglich kommt es zu einer erhöhten perivaskulären Produktion von vasodilatierendem NO und damit zu einer Senkung des arteriellen Blutdrucks. Unter der akuten Blockade der NO-Synthasen mit L-Nitroarginin-methyl-ester (L-NAME) kam es bei den ET-1 transgenen Tieren zu einem stärkeren Blutdruckanstieg als bei den Wildtyp-Mäusen, was ebenfalls für eine verstärkte Aktivierung des NO-Systems bei den ET-1 transgenen Tieren spricht.

Auch die Ergebnisse von Quaschnig et al.<sup>147</sup> führten zu derselben Schlußfolgerung. Hier zeigten Versuche mit isolierten Aortenringen von ET-1 transgenen und von Wildtyp-Mäusen eine unterschiedlich starke Antwort auf ET-1 bzw. Big ET-1 Gabe. Die Kontraktion der Aortenringe der ET-1 transgenen Mäuse war geringer, doch dieser Unterschied konnte durch die in vitro Blockade der NO-Synthasen mit L-Nitroarginin-methyl-ester (L-NAME) aufgehoben werden. Auch meine Ergebnisse unterstützen diese Theorie. Der mittlere systolische Blutdruck der iNOS -/- ET-1 transgenen Tiere ist signifikant höher als der der ET-1 transgenen Mäuse. Er ist auch geringfügig höher als der der Wildtypiere, dies erreicht jedoch keine Signifikanz.

Bei der Verwendung von L-Nitroarginin-methyl-ester (L-NAME) werden sowohl iNOS als auch nNOS und eNOS blockiert, erst dann kommt es bei den ET-1 transgenen Tieren zu einem stärkeren Blutdruckanstieg als bei den Wildtyp-Mäusen. Dies spricht dafür, daß zusätzlich unter anderem auch eNOS in der



Blutdruckregulation eine Rolle spielt. Die eNOS-Aktivität ist hauptsächlich verantwortlich für die Endothel-abhängige Relaxation und weist multiple Interaktionen mit dem Endothelinsystem auf <sup>148-150</sup>. Aus diesem Grund wurden parallel eNOS knockout ET-1 transgene Mäuse nach einem ähnlichen Protokoll gezüchtet und untersucht <sup>151</sup>. Die Blutdruckmessung ergab einen deutlich höheren systolischen Blutdruck bei dieser Gruppe im Vergleich zu eNOS knockout, ET-1 transgenen und den Wildtyptieren. Daraus lässt sich schließen, dass eNOS für die Blutdruckregulation eine größere Relevanz als iNOS zu besitzen scheint.

Die Unterschiede der Herzfrequenz, die bei der nicht-invasiven Blutdruckmessung erfasst wurden, sind zwar statistisch signifikant, aber sicher nicht klinisch relevant. Es handelt sich um eine Schwankungsbreite von ca. 33 Schlägen pro Minute, was auf die Gesamtschlagzahl pro Minute von fast 700 Schlägen keine 5 % ausmacht. Bei der Herzkathetermessung waren keine signifikanten Unterschiede zu vermessen.

## BNP

BNP ist ein natriuretisches Peptid, dessen Hauptquelle der Synthese und Sekretion kardialen Ursprungs ist<sup>152-155</sup> und das vor allem in der Diagnostik von Herzerkrankungen sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin genutzt wird. Es wird bei Herzinsuffizienzpatienten durch erhöhte Wandspannung im Ventrikel ausgeschüttet <sup>156</sup>. Es hat sich gezeigt, dass BNP mit dem Ausmaß der systolischen Herzinsuffizienz korrelieren <sup>157</sup>, aber es hat sich auch als sehr sensitiver Marker zur Erkennung einer diastolischen Dysfunktion erwiesen<sup>158-161</sup>. Es zeigt bei Individuen mit diastolischer Dysfunktion einen signifikanten Anstieg im Vergleich mit gesunden Probanden. Auch in dieser Arbeit war die Bestimmung zur in vivo Diagnostik gedacht. Der wesentliche Nachteil der Methode bestand darin, dass für die Durchführung der BNP-Messung sehr viel Probenmaterial benötigt wird und das Blutvolumen pro Maus und Abnahme beschränkt ist. So musste Plasma mehrerer Tiere gleichen Alters und Geschlechts innerhalb der jeweiligen Gruppe gepoolt werden. Dies schwächt die Aussagekraft der Ergebnisse ein, da Schwankungen der Individuen ausgeglichen und außer Acht gelassen werden. Bei den von mir

untersuchten Tieren zeigen die ET ++ Tiere einen höheren BNP-Spiegel als die WT Tiere und das BNP der iNOS -/- ET ++ ist signifikant niedriger als bei den ET ++ Tieren. Dies ist ein Hinweis für eine bessere Herzfunktion bei den iNOS -/- ET ++ Tieren im Vergleich zu den ET ++ Tieren.

#### Das Konduktanzmessverfahren zur Evaluierung der Herzfunktion

Das Konduktanzmessverfahren zur Evaluierung der kardialen Funktion durch Analyse der Druck-Volumen-Kurven ist bei Menschen seit den 80er Jahren etabliert. Seit einigen Jahren gibt es das Verfahren für eine genauere kardiale Phänotypisierung beim Kleintiermodell. Die Genauigkeit des Konduktanzmessverfahrens ist mit anderen Messtechniken wie der Echokardiographie abgeglichen und bestätigt worden <sup>162</sup>. Besonders in Hinsicht auf die Analyse der vor- und nachlast- unabhängigen Parameter wie dem ESPVR und dem EDPVR zeigen sich die Vorteile der Konduktanzuntersuchung erst wirklich. Die Herzfunktion ist wesentlich abhängig von der aktuellen Volumensituation im Kreislauf. Besonders die diastolische Funktion und Parameter wie der LVEDP sind davon betroffen. Leicht können durch Senkung des Kreislaufvolumens der LVEDP gesenkt und daher bestehende kardiale Dysfunktionen übersehen werden. Dieser Effekt ermöglicht Fehlinterpretationen im Tiermodell. Diese Fehlinterpretationen lassen sich durch die Analyse von vor- und nachlastunabhängigen Parametern verkleinern. Daher gilt der EDPVR mit seiner Aussage über die intrinsische Steifigkeit des linken Ventrikels während der diastolischen Dehnung durch die Blutfüllung hier unabhängig von der Volumensituation als robust <sup>140,163</sup>. So gilt die Druck-Volumen-Messung per Konduktanzmessmethode, die auch in dieser Studie angewandt wurde, heute als Goldstandard der kardialen Funktionsmessung im Kleintier. Die Tiere müssen dazu allerdings anästhesiert werden, so dass auf den Einfluss der Narkose auf das Herzkreislaufsystem Rücksicht genommen werden muss. Thiopental, das in dieser Studie benutzte Narkotikum, reduziert signifikant den kardialen Index bei anästhesierten Mäusen im Vergleich zu nicht anästhesierten Tieren <sup>164</sup>. Da aber in dieser Studie die genetisch manipulierten Mäuse mit

Wildtypmäusen verglichen wurden und alle Tiergruppen der gleichen Narkose ausgesetzt waren, sollte der Fehler systematisch sein und somit die Relation der Unterschiede und damit die Ergebnisse nicht verfälschen.

Alle transgenen Gruppen zeigen eine höhere EDPVR als die Wildtyptiere, allerdings ist bei den iNOS -/- ET +/+ die EDPVR signifikant niedriger als bei den ET +/+ Tieren. Der EDPVR gilt als einer der sensitivsten Parameter der diastolischen Funktion<sup>165 166</sup>. Die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR) ist ein vor- und nachlastunabhängiger Parameter, der eine direkte Information über die Dehnbarkeit des linken Ventrikels durch die Blutfüllung während der Diastole gibt. Eine Erhöhung der EDPVR ist ein hämodynamischer Nachweis einer linksventrikulären Dysfunktion<sup>167</sup> und laut Ausführungen der European Study Group on Diastolic Heart Failure eines der diagnostischen Kriterien zum Erkennen einer diastolischen Herzinsuffizienz<sup>167,168</sup>. Kompensatorisch sind dabei nun erhöhte Drücke nötig, um die Kammer füllen zu können. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) steigt. Auch bei diesem Parameter zeigt sich, dass bei den iNOS -/- ET +/+ Mäusen der LVEDP signifikant niedriger ist als bei den ET +/+ Tieren. Hämodynamisch ist also auch eine Verbesserung der Herzfunktion zu erkennen, wenn human Endothelin-1 transgene Mäuse mit einem iNOS knockout kombiniert werden.

## Histologie

Die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung kann sich aus unterschiedlichen Gründen verändern<sup>169</sup>. Diskutiert werden zum einen Veränderungen in der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel erhöhte kardiale Fibrose<sup>170</sup> und kardiale Hypertrophie<sup>171</sup>, zum anderen Veränderungen im Kardiomyozyten<sup>167,172</sup> selber. Die Vermessung der Kardiomyozyten hat gezeigt, daß eine kardiale Hypertrophie als Ursache ausgeschlossen werden kann.

Sowohl die iNOS -/- ET +/+ als auch die ET +/+ Tiere zeigen eine vermehrte kardiale interstitielle Fibrose im Vergleich zu den Wildtyptieren. Eine erhöhte

Fibrose trägt zur Zunahme der Steifheit des Myokards bei, vor allem was die diastolische Wandspannung betrifft. Dies führt zu einer verminderten Fähigkeit für den Frank-Starling-Mechanismus und somit zu einer diastolischen Dysfunktion. Während die ET<sup>+/+</sup> Tiere zusätzlich eine kardiale perivaskuläre Fibrose haben, zeigen die iNOS<sup>-/-</sup> ET<sup>+/+</sup> dies nicht.

Die human Endothelin-1 transgenen Mäuse haben im Vergleich zu den Wildtyptieren eine vermehrte kardiale interstitielle und perivaskuläre Fibrose. Dies führt zu einer diastolischen Dysfunktion, erkennbar an einer erhöhten EDPVR, die als einer der sensitivsten Parameter der diastolischen Funktion<sup>165 166</sup> gilt. Es konnte gezeigt werden, dass während einer Herzinsuffizienz iNOS exprimiert wird, was zu einem hohen Level an NO führt, was wiederum den Anstieg von oxidativem Stress fördert.<sup>173</sup> Auch bei den human Endothelin-1 transgenen Mäusen wird ein kompensatorischer Anstieg der Aktivität des NO-Systems vermutet<sup>101,102</sup>. Eine Studie von Hocher et al<sup>174</sup> hat folgende Hinweise darauf gefunden. Eine intravenöse Bolusinjektion von N<sup>[omega]</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), ein nicht-selektiver Inhibitor der NO-Synthase, führte bei human ET-1 transgenen Mäusen zu einem signifikant höheren Anstieg des Blutdruckes im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren. Andererseits stieg der Blutdruck in beiden Gruppen gleich stark an nach einer i.v. Injektion von ET-1. Eine Vorbehandlung mit Dexamethason hob den höheren Blutdruckanstieg nach L-Name Gabe in human ET-1 transgenen Mäusen wieder auf. Die Exkretion von NO – Metaboliten im Urin war bei human ET-1 transgenen Mäusen angestiegen und signifikant gesunken nach Behandlung mit Dexamethason. Die Immunhistologie hat gezeigt, dass die induzierbare NO Synthase in den intrarenalen Arterien stark exprimiert ist bei den human ET-1 transgenen Mäusen im Gegensatz zu den nicht transgenen Kontrolltieren. Eine Vorbehandlung mit Dexamethason verhindert die vaskuläre iNOS Expression. Die exzessive Freisetzung von NO unter pathophysiologischen Bedingungen führt zu einer reduzierten Herzfunktion<sup>175</sup>, durch einen Abbau von freiem NO zu reaktivem Sauerstoff, der die zellulären Strukturen schädigt und Herzinsuffizienz und Apoptose vorantreibt<sup>128-130</sup>.

Diverse Studien an verschiedenen Tiermodellen zeigen, dass das Ausschalten des iNOS-Genes heilsame Effekte auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz hat. Die pharmakologische Hemmung von iNOS bzw. das Ausschalten des iNOS-Genes verbesserte die Herzfunktion nach einem Herzinfarkt<sup>176-178</sup>, mildert die Herzinsuffizienz in einem hypertensiven Rattenmodell<sup>179</sup> und schützt Mäuse vor der Sepsis induzierten Herzinsuffizienz<sup>180</sup>. Auch bei diesen Endothelin-1 transgenen Mäusen, die eine diastolische Herzinsuffizienz entwickeln, ist eine Verbesserung der Herzfunktion zu erkennen. Sowohl in der Hämodynamik, wo die EDPVR und die LVEDP signifikant niedriger sind als bei den ET +/+ Tieren, als auch durch ein niedrigeres BNP, einen wichtigen in vivo Marker der diastolischen und systolischen Dysfunktion. Die Herzen dieser Mäuse zeigen zwar auch eine vermehrte interstitielle Fibrose, aber keine vermehrte perivaskuläre Fibrose wie die Endothelin transgenen Mäuse.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die ET-1 transgenen Mäuse altersabhängig eine linksventrikuläre Versteifung mit nachfolgender diastolischer Dysfunktion entwickeln. Ein zusätzlicher iNOS-Knockout mildert signifikant die Herzschiidigung. Daraus lässt sich schließen, dass die ET-1 induzierte Schädigung zu mindest partiell durch iNOS vermittelt wird.

Abschließend muss betont werden, dass die von uns vorgenommenen Manipulationen am Blutdruck, durch genetische Modifikation der Tiere, nur kleine Veränderungen in einem komplexen System der Kreislaufregulation sind. Somit betrachtet diese Arbeit auch nur einen Teilaspekt der Regulation, wobei andere Faktoren und Mechanismen, die zusätzlich wirken, nicht betrachten werden.

## 6 Zusammenfassung

### **Einfluss eines zusätzlichen iNOS knockouts auf den kardialen Phänotyp von human Endothelin-1 transgenen Mäusen**

Endothelin-1 (ET-1) ist ein potenter Vasokonstriktor. Die intravenöse Gabe von ET-1 führt zu einer schnellen und kurzfristigen Vasodilatation, gefolgt von einem langanhaltenden Blutdruckanstieg. Die vermutete Rolle des ET-1 als Blutdruck kontrollierendes Peptid konnte jedoch nicht klar bestätigt werden, human ET-1 transgene Mäuse stellten sich als nicht hypertensiv heraus. Diverse Studien zeigen Stickstoffmonoxid als physiologischen Gegenspieler von Endothelin-1, sie sind Komponenten eines lokalen negativ-rückgekoppelten Regelkreises. Es wurde vermutet, dass die Effekte von ET-1 durch einen gegenregulatorischen Anstieg von NO, produziert von der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), aufgehoben werden. Aus diesem Grund wurden transgene Mäuse gezüchtet, die das humane Endothelin-1 Gen und einen iNOS knockout haben. Es sollte untersucht werden, wie der iNOS -/- die Herzfunktion, den Blutdruck und den kardialen Phänotyp der human Endothelin-1 transgenen Mäuse beeinflusst. Die Messung des systolischen Blutdrucks zeigte einen höheren Druck bei den iNOS -/- ET +/+ im Vergleich mit den ET-1 transgenen Tieren, gleichzeitig wiesen sie ein niedrigeres BNP auf. Die Herzkathetermessung hat gezeigt, dass sowohl die Gruppe der iNOS -/- ET +/+ als auch der ET +/+ eine diastolische Dysfunktion zeigten. Jedoch war die Diastolische Steifigkeit (EDPVR) und der Linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) signifikant niedriger bei den iNOS -/- ET +/+ als bei den ET +/+ Tieren. Die Herzen der iNOS -/- ET +/+ Mäuse zeigen zwar auch eine vermehrte interstitielle Fibrose, aber keine vermehrte perivaskuläre Fibrose wie die Endothelin transgenen Mäuse.

Schlussfolgerung:

Der systolische Blutdruck der iNOS  $-/-$  ET-1 transgenen Tiere ist signifikant höher als der der ET-1 transgenen Mäuse, aber nicht höher als der der Wildtypiere. Sie zeigen keinen Bluthochdruck. Experimente mit eNOS knockout ET-1 transgenen Mäusen, die hypertensiv sind, haben gezeigt, dass vermutlich eNOS in der Blutdruckregulation eine größere Rolle spielt.

Die exzessive Freisetzung von NO unter pathophysiologischen Bedingungen führt zu einer reduzierten Herzfunktion, durch einen Abbau von freiem NO zu reaktivem Sauerstoff, der die zellulären Strukturen schädigt und Herzinsuffizienz und Apoptose vorantreibt. Ein zusätzlicher iNOS-Knockout in dem ET $+/+$  transgenen Mausmodell mildert signifikant die Herzscheidung, dies ist schlüssig mit anderen Studienergebnissen. Daraus lässt sich schließen, dass die ET-1 induzierte Schädigung zu mindest partiell durch iNOS vermittelt wird.

## 7 Summary

### **Influence of an additional iNOS knockout on the cardiac phenotype of human Endothelin-1 transgenic mice**

Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasoconstrictor. Intravenous administration of ET-1 causes a rapid and transient vasodilation followed by a sustained increase in blood pressure. The supposed role of ET-1 as a blood pressure controlling peptide could not be verified; human ET-1 transgenic mice were not hypertensive. Counterregulatory interactions between ET and nitric oxide are well established. It was hypothesized that effects of ET-1 may be antagonized by an increase of nitric oxide, which is produced by the inducible nitric oxide synthase (iNOS). Therefore, cross-bred animals of ET-1 transgenic mice and iNOS knockout mice were generated. The influence of the lack of iNOS on the heart function, blood pressure und cardiac phenotype was evaluated in these animals. In iNOS  $-/-$  ET  $+/+$  mice systolic blood pressure was elevated and BNP plasma levels were lower when compared to ET  $+/+$  mice. Assessment of cardiac function via micro conductance

catheter showed in both groups a diastolic dysfunction. But the diastolic stiffness (EDPVR) and the leftventricular enddiastolic pressure (LVEDP) were lower in iNOS -/- ET +/+ mice versus ET +/+ mice. Both groups exhibited cardiac interstitial fibrosis, but the iNOS -/- ET +/+ mice had no perivascular fibrosis.

#### Conclusion:

The systolic blood pressure was elevated in iNOS -/- ET +/+ mice versus ET +/+ mice, but not versus wildtype mice. They are not hypertensive. A study with hypertensive eNOS-/- ET +/+ show that eNOS plays a major role in regulation of blood pressure.

The excessive release of NO under pathophysiological conditions contributes to a depressed cardiac function by the degradation of free NO to reactive oxygen species harming cellular structures and promoting cardiac failure and apoptosis. Our study demonstrates that ET transgenic mice develop left ventricular stiffening with subsequent diastolic dysfunction. Additional knock out of iNOS significantly attenuates cardiac injury which is conclusive with other studies. We thus conclude that ET-1-induced cardiac injury is at least partially mediated by iNOS.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Yanagisawa, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415 (1988).
2. Bloch, K.D. *et al.* Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J. Biol. Chem.* **264**, 10851-10857 (1989).
3. Inoue, A. *et al.* The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 2863-2867 (1989).
4. Kloog, Y., Bousso-Mittler, D., Bdolah, A. & Sokolovsky, M. Three apparent receptor subtypes for the endothelin/sarafotoxin family. *FEBS Lett.* **253**, 199-202 (1989).
5. Kloog, Y. & Sokolovsky, M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 212-214 (1989).
6. Landan, G., Bdolah, A., Wollberg, Z., Kochva, E. & Graur, D. The evolutionary history of the sarafotoxin/endothelin/endothelin-like superfamily. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17 Suppl 7**, S517-S519 (1991).
7. Niall, H.D. The evolution of peptide hormones. *Annu. Rev. Physiol* **44**, 615-624 (1982).
8. Arinami, T. *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.* **48**, 990-996 (1991).
9. Miyauchi, T. & Masaki, T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular

system. *Annu. Rev. Physiol* **61**, 391-415 (1999).

10. Nakamura,S., Naruse,M., Naruse,K., Demura,H. & Uemura,H. Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry* **94**, 475-477 (1990).

11. Wilson,D.B., Dorfman,D.M. & Orkin,S.H. A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol. Cell Biol.* **10**, 4854-4862 (1990).

12. Ahn,K., Beningo,K., Olds,G. & Hupe,D. The endothelin-converting enzyme from human umbilical vein is a membrane-bound metalloprotease similar to that from bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 8606-8610 (1992).

13. Masaki,T., Yanagisawa,M. & Goto,K. Physiology and pharmacology of endothelins. *Med. Res. Rev.* **12**, 391-421 (1992).

14. McMahon,E.G., Palomo,M.A., Moore,W.M., McDonald,J.F. & Stern,M.K. Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big endothelin-1-(1-39) in vivo and conversion of big endothelin-1-(1-39) to endothelin-1-(1-21) in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 703-707 (1991).

15. Emoto,N. & Yanagisawa,M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* **270**, 15262-15268 (1995).

16. Xu,D. *et al.* ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78**, 473-485 (1994).

17. Hocher,B., Thone-Reineke,C., Bauer,C., Raschack,M. & Neumayer,H.H. The paracrine endothelin system: pathophysiology and implications in clinical medicine. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **35**, 175-189 (1997).

18. Imokawa,G., Yada,Y. & Miyagishi,M. Endothelins secreted from human

keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 24675-24680 (1992).

19. Langenstroer, P. *et al.* Endothelin-1 in the human prostate: tissue levels, source of production and isometric tension studies. *J. Urol.* **150**, 495-499 (1993).

20. Lee, M.E., de la Monte, S.M., Ng, S.C., Bloch, K.D. & Quertermous, T. Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J. Clin. Invest* **86**, 141-147 (1990).

21. Martin, E.R., Brenner, B.M. & Ballermann, B.J. Heterogeneity of cell surface endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **265**, 14044-14049 (1990).

22. Simonson, M.S. & Dunn, M.J. Renal actions of endothelin peptides. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2**, 51-60 (1993).

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

24. Marsden, P.A. *et al.* Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells. *Am. J. Physiol* **261**, F117-F125 (1991).

25. Kohan, D.E. Production of endothelin-1 by rat mesangial cells: regulation by tumor necrosis factor. *J. Lab Clin. Med.* **119**, 477-484 (1992).

26. Zoja, C. *et al.* Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth factor-beta, thrombin, and a thromboxane A2 analogue. *Lab Invest* **64**, 16-20 (1991).

27. Resink, T.J. *et al.* Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 1303-1310 (1990).

28. Kasinath, B.S., Fried, T.A., Davalath, S. & Marsden, P.A. Glomerular epithelial cells synthesize endothelin peptides. *Am. J. Pathol.* **141**, 279-283 (1992).

29. Kitamura,K., Tanaka,T., Kato,J., Eto,T. & Tanaka,K. Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 348-352 (1989).
30. Ujiie,K. *et al.* Messenger RNA expression and synthesis of endothelin-1 along rat nephron segments. *J. Clin. Invest* **90**, 1043-1048 (1992).
31. Kohan,D.E., Padilla,E. & Hughes,A.K. Endothelin B receptor mediates ET-1 effects on cAMP and PGE<sub>2</sub> accumulation in rat IMCD. *Am. J. Physiol* **265**, F670-F676 (1993).
32. Marsen,T.A., Schramek,H. & Dunn,M.J. Renal actions of endothelin: linking cellular signaling pathways to kidney disease. *Kidney Int.* **45**, 336-344 (1994).
33. Alonso,D. & Radomski,M.W. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail. Rev.* **8**, 107-115 (2003).
34. Kanse,S.M. *et al.* Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. *Life Sci.* **48**, 1379-1384 (1991).
35. Oliver,F.J. *et al.* Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 23251-23256 (1991).
36. Bakris,G.L., Fairbanks,R. & Traish,A.M. Arginine vasopressin stimulates human mesangial cell production of endothelin. *J. Clin. Invest* **87**, 1158-1164 (1991).
37. Sugiura,M., Inagami,T. & Kon,V. Endotoxin stimulates endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 1220-1227 (1989).
38. Kanse,S.M. *et al.* Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. *Life Sci.* **48**, 1379-1384 (1991).
39. Kourembanas,S., Marsden,P.A., McQuillan,L.P. & Faller,D.V. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin.*

*Invest* **88**, 1054-1057 (1991).

40. Takeda,Y., Itoh,Y., Yoneda,T., Miyamori,I. & Takeda,R. Cyclosporine A induces endothelin-1 release from cultured rat vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **233**, 299-301 (1993).

41. Yamauchi,T., Ohnaka,K., Takayanagi,R., Umeda,F. & Nawata,H. Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* **267**, 16-18 (1990).

42. Milner,P., Bodin,P., Loesch,A. & Burnstock,G. Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 649-656 (1990).

43. Arai,H., Hori,S., Aramori,I., Ohkubo,H. & Nakanishi,S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**, 730-732 (1990).

44. Arai,H. *et al.* The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J. Biol. Chem.* **268**, 3463-3470 (1993).

45. Sakamoto,A. *et al.* Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 656-663 (1991).

46. Sakurai,T. *et al.* Level of ETB receptor mRNA is down-regulated by endothelins through decreasing the intracellular stability of mRNA molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 342-347 (1992).

47. Kumar,C. *et al.* Cloning and characterization of a novel endothelin receptor from *Xenopus* heart. *J. Biol. Chem.* **269**, 13414-13420 (1994).

48. Bax,W.A. & Saxena,P.R. The current endothelin receptor classification: time for reconsideration? *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 379-386 (1994).

49. Hosoda,K. *et al.* Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J. Biol. Chem.*

**267**, 18797-18804 (1992).

50. Simonson, M.S. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev.* **73**, 375-411 (1993).

51. Hirata, Y., Takagi, Y., Fukuda, Y. & Marumo, F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **78**, 225-228 (1989).

52. Takuwa, N., Takuwa, Y., Yanagisawa, M., Yamashita, K. & Masaki, T. A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **264**, 7856-7861 (1989).

53. Shubeita, H.E. *et al.* Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **265**, 20555-20562 (1990).

54. Sakurai, T. *et al.* Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**, 732-735 (1990).

55. Aramori, I. & Nakanishi, S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 12468-12474 (1992).

56. Koh, E. *et al.* Endothelin stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Int.* **20**, 375-380 (1990).

57. Batra, V.K., McNeill, J.R., Xu, Y., Wilson, T.W. & Gopalakrishnan, V. ETB receptors on aortic smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol* **264**, C479-C484 (1993).

58. Durham, S.K., Goller, N.L., Lynch, J.S., Fisher, S.M. & Rose, P.M. Endothelin receptor B expression in the rat and rabbit lung as determined by in situ hybridization using nonisotopic probes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22 Suppl 8**, S1-S3 (1993).

59. Masaki,T., Vane,J.R. & Vanhoutte,P.M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol. Rev.* **46**, 137-142 (1994).
60. Seo,B., Oemar,B.S., Siebenmann,R., von Segesser,L. & Luscher,T.F. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* **89**, 1203-1208 (1994).
61. Yanagisawa,M., Kurihara,H., Kimura,S., Goto,K. & Masaki,T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Hypertens. Suppl* **6**, S188-S191 (1988).
62. Clozel,M. & Gray,G.A. Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**, S262-S264 (1995).
63. Clozel,M., Gray,G.A., Breu,V., Loffler,B.M. & Osterwalder,R. The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 867-873 (1992).
64. Pollock,D.M. & Opgenorth,T.J. Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA receptor activation. *Am. J. Physiol* **264**, R222-R226 (1993).
65. Filep,J.G., Foldes-Filep,E., Rousseau,A., Sirois,P. & Fournier,A. Vascular responses to endothelin-1 following inhibition of nitric oxide synthesis in the conscious rat. *Br. J. Pharmacol.* **110**, 1213-1221 (1993).
66. Florijn,K.W. *et al.* Elevated plasma levels of endothelin in pre-eclampsia. *J. Hypertens. Suppl* **9**, S166-S167 (1991).
67. Luscher,T.F., Seo,B.G. & Buhler,F.R. Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension* **21**, 752-757 (1993).
68. McMurray,J.J., Ray,S.G., Abdullah,I., Dargie,H.J. & Morton,J.J. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* **85**, 1374-1379 (1992).

69. Miyauchi,T. *et al.* Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* **2**, 53-54 (1989).
70. Rodeheffer,R.J., Lerman,A., Heublein,D.M. & Burnett,J.C., Jr. Increased plasma concentrations of endothelin in congestive heart failure in humans. *Mayo Clin. Proc.* **67**, 719-724 (1992).
71. Wei,C.M. *et al.* Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* **89**, 1580-1586 (1994).
72. Pacher,R. *et al.* Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **27**, 633-641 (1996).
73. Serneri,G.G. *et al.* Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy: endothelin-1 system in the human failing heart. *Circ. Res.* **86**, 377-385 (2000).
74. Kahler,J. *et al.* Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**, 1429-1437 (2000).
75. Yokokawa,K. *et al.* Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann. Intern. Med.* **114**, 213-215 (1991).
76. Raschack,M., Unger,L., Riechers,H. & Klinge,D. Receptor selectivity of endothelin antagonists and prevention of vasoconstriction and endothelin-induced sudden death. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**, S397-S399 (1995).
77. Kohno,M. *et al.* Plasma immunoreactive endothelin-1 in experimental malignant hypertension. *Hypertension* **18**, 93-100 (1991).
78. Lerman,A. *et al.* Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **325**, 997-1001 (1991).
79. Warner,T.D. & Vane,J.R. Pharmacology. ET touches down in Houston. *Nature*



**362**, 497-498 (1993).

80. Luscher,T.F., Seo,B.G. & Buhler,F.R. Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension* **21**, 752-757 (1993).

81. Tomobe,Y. *et al.* Mechanisms of altered sensitivity to endothelin-1 between aortic smooth muscles of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **257**, 555-561 (1991).

82. Yokokawa,K. *et al.* Effects of endothelin on blood pressure and renal hemodynamics in DOCA-salt hypertensive rats under conscious and unrestrained condition. *Clin. Exp. Hypertens. A* **12**, 1049-1062 (1990).

83. Ohno,A. *et al.* Endothelin-specific antibodies decrease blood pressure and increase glomerular filtration rate and renal plasma flow in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **10**, 781-785 (1992).

84. Bunting,M.W. & Widdop,R.E. Differential haemodynamic effects of endothelin receptor antagonist, SB 209670, in conscious hypertensive and normotensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **381**, 13-21 (1999).

85. Hocher,B. *et al.* Function and expression of endothelin receptor subtypes in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* **31**, 499-510 (1996).

86. Li,J.S., Knafo,L., Turgeon,A., Garcia,R. & Schiffrin,E.L. Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. *Am. J. Physiol* **271**, H88-H93 (1996).

87. Lariviere,R., Day,R. & Schiffrin,E.L. Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* **21**, 916-920 (1993).

88. Schiffrin,E.L., Lariviere,R., Li,J.S., Sventek,P. & Touyz,R.M. Deoxycorticosterone acetate plus salt induces overexpression of vascular endothelin-

1 and severe vascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **25**, 769-773 (1995).

89. Doucet,J., Gonzalez,W. & Michel,J.B. Endothelin antagonists in salt-dependent hypertension associated with renal insufficiency. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27**, 643-651 (1996).

90. Ikeda,T. *et al.* Pathophysiological roles of endothelin-1 in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* **34**, 514-519 (1999).

91. Rajagopalan,S. *et al.* Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* **30**, 29-34 (1997).

92. Rothermund,L. *et al.* Cardiac endothelin system impairs left ventricular function in renin-dependent hypertension via decreased sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake. *Circulation* **102**, 1582-1588 (2000).

93. Diekmann,F. *et al.* Regulation of the renal endothelin system in the two-kidney, one clip renal hypertensive rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**, S191-S194 (2000).

94. Hocher,B. *et al.* Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertension* **33**, 816-822 (1999).

95. Sventek,P., Li,J.S., Grove,K., Deschepper,C.F. & Schiffrin,E.L. Vascular structure and expression of endothelin-1 gene in L-NAME-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **27**, 49-55 (1996).

96. Schiffrin,E.L. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* **34**, 876-881 (1999).

97. Hocher,B. & Paul,M. Transgenic animal models for the analysis of the renal endothelin system. *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**, 935-937 (2000).

98. Hocher,B. *et al.* Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J. Clin. Invest* **99**, 1380-

1389 (1997).

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

100. Liefeldt,L., Bocker,W., Schonfelder,G., Zintz,M. & Paul,M. Regulation of the endothelin system in transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**, S32-S33 (1995).

101. Hirata,Y. *et al.* Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest* **91**, 1367-1373 (1993).

102. Moritoki,H. *et al.* Endothelin-3-induced relaxation of rat thoracic aorta: a role for nitric oxide formation. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 1125-1130 (1993).

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

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

105. Shimojo,N. *et al.* EPA effect on NOS gene expression and on NO level in endothelin-1-induced hypertrophied cardiomyocytes. *Exp. Biol. Med. (Maywood. )* **231**, 913-918 (2006).

106. Keller,S., Karaa,A., Paxian,M., Clemens,M.G. & Zhang,J.X. Inhibition of endothelin-1-mediated up-regulation of iNOS by bosentan ameliorates endotoxin-induced liver injury in cirrhosis. *Shock* **25**, 306-313 (2006).

107. Luscher,T.F., Richard,V., Tschudi,M., Yang,Z.H. & Boulanger,C. Endothelial control of vascular tone in large and small coronary arteries. *J. Am. Coll. Cardiol.* **15**, 519-527 (1990).

108. Hocher,B. *et al.* Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertension* **33**, 816-822 (1999).

109. Sharifi,A.M., He,G., Touyz,R.M. & Schiffrin,E.L. Vascular endothelin-1 expression and effect of an endothelin ETA antagonist on structure and function of small arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc Pharmacol.* **31 Suppl 1**, S309-S312 (1998).
110. de Nucci,G. *et al.* Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 9797-9800 (1988).
111. Filep,J.G. *et al.* Antiaggregatory and hypotensive effects of endothelin-1 in beagle dogs: role for prostacyclin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17 Suppl 7**, S216-S218 (1991).
112. Ignarro,L.J., Byrns,R.E., Buga,G.M., Wood,K.S. & Chaudhuri,G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 181-189 (1988).
113. Palmer,R.M., Ferrige,A.G. & Moncada,S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526 (1987).
114. Furchgott,R.F. & Vanhoutte,P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**, 2007-2018 (1989).
115. Bredt,D.S. & Snyder,S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175-195 (1994).
116. Moncada,S. & Higgs,A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012 (1993).
117. Marletta,M.A., Yoon,P.S., Iyengar,R., Leaf,C.D. & Wishnok,J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.

*Biochemistry* **27**, 8706-8711 (1988).

118. Massion,P.B., Feron,O., Dessy,C. & Balligand,J.L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res* **93**, 388-398 (2003).

119. Fleming,I. & Busse,R. NO: the primary EDRF. *J. Mol. Cell Cardiol.* **31**, 5-14 (1999).

120. Paulus,W.J. & Shah,A.M. NO and cardiac diastolic function. *Cardiovasc. Res* **43**, 595-606 (1999).

121. Palmer,R.M. & Moncada,S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 348-352 (1989).

122. Bredt,D.S. *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714-718 (1991).

123. Nishida,C.R. & Ortiz de Montellano,P.R. Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases. Chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. *J. Biol. Chem.* **273**, 5566-5571 (1998).

124. Forstermann,U., Gath,I., Schwarz,P., Closs,E.I. & Kleinert,H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1321-1332 (1995).

125. Nakane,M., Schmidt,H.H., Pollock,J.S., Forstermann,U. & Murad,F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **316**, 175-180 (1993).

126. Berkels,R., Suerhoff,S., Roesen,R. & Klaus,W. Nitric oxide causes a cGMP-independent intracellular calcium rise in porcine endothelial cells-a paradox? *Microvasc. Res.* **59**, 38-44 (2000).

127. Zhuang,J.C. & Wogan,G.N. Growth and viability of macrophages continuously

stimulated to produce nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 11875-11880 (1997).

128. Heitzer,T., Schlinzig,T., Krohn,K., Meinertz,T. & Munzel,T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**, 2673-2678 (2001).

129. Kojda,G. & Kottenberg,K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc. Res* **41**, 514-523 (1999).

130. Pinsky,D.J. *et al.* Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult rat ventricular myocytes in culture. *Am. J. Physiol* **277**, H1189-H1199 (1999).

131. Paulus,W.J. Beneficial effects of nitric oxide on cardiac diastolic function: 'the flip side of the coin'. *Heart Fail. Rev.* **5**, 337-344 (2000).

132. MacMicking,J.D. *et al.* Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* **81**, 641-650 (1995).

133. Rhoden,C.H., Leeper,D.B., Smith,I.M., Evans,T.C. & Duling,B.R. Blood pressure changes in mice after lethal staphylococcal infection and endotoxin challenge. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **149**, 622-625 (1975).

134. Baan,J. *et al.* Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* **70**, 812-823 (1984).

135. Feldman,M.D., Mao,Y., Valvano,J.W., Pearce,J.A. & Freeman,G.L. Development of a multifrequency conductance catheter-based system to determine LV function in mice. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **279**, H1411-H1420 (2000).

136. Walther,T. *et al.* Angiotensin deficiency in mice leads to dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Pharmacol.* **493**, 161-165 (2004).

137. Burkhoff,D. *et al.* Accuracy of volume measurement by conductance catheter in isolated, ejecting canine hearts. *Circulation* **72**, 440-447 (1985).

138. Steendijk,P., Staal,E., Jukema,J.W. & Baan,J. Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **281**, H755-H763 (2001).
139. Morita,S. *et al.* Standardized ejection fraction as a parameter of overall ventricular pump function. *Jpn. Circ. J.* **64**, 510-515 (2000).
140. Kass,D.A., Midei,M., Graves,W., Brinker,J.A. & Maughan,W.L. Use of a conductance (volume) catheter and transient inferior vena caval occlusion for rapid determination of pressure-volume relationships in man. *Cathet. Cardiovasc. Diagn.* **15**, 192-202 (1988).
141. Tschöpe C.,S.H.P. Diastolische Dysfunktion. *CARDIOVASC 2002 2 Sonderheft 1*, 35-39. 2002. Ref Type: Magazine Article
142. Junqueira,L.C., Bignolas,G. & Brentani,R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447-455 (1979).
143. Hocher,B. *et al.* Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J. Clin. Invest* **99**, 1380-1389 (1997).
144. Hocher,B. *et al.* Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertension* **33**, 816-822 (1999).
145. Hocher,B. *et al.* In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin. *J. Hypertens.* **22**, 111-119 (2004).
146. Hocher,B. *et al.* Inducible NO synthase (iNOS) contributes to blood pressure regulation. *Kidney Blood Press Res* **21**, 110. 1998. Ref Type: Magazine Article
147. Quaschnig,T. *et al.* Increase in nitric oxide bioavailability improves endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 479-483 (2003).

148. Tan, M.S. *et al.* Differential change in expression of pulmonary ET-1 and eNOS in rats after chronic left ventricular pressure overload. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* **231**, 948-953 (2006).
149. Zhou, Y. *et al.* Increased expression of cyclooxygenase-2 mediates enhanced contraction to endothelin ETA receptor stimulation in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Circ. Res* **98**, 1439-1445 (2006).
150. Merkel, S.M. *et al.* LPS inhibits endothelin-1-mediated eNOS translocation to the cell membrane in sinusoidal endothelial cells. *Microcirculation*. **12**, 433-442 (2005).
151. Quaschnig, T. *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.* **18**, 730-740 (2007).
152. Makikallio, K. *et al.* Fetal cardiac natriuretic peptide expression and cardiovascular hemodynamics in endotoxin-induced acute cardiac dysfunction in mouse. *Pediatr. Res* **59**, 180-184 (2006).
153. Chin, S.Y., Wang, C.T., Majid, D.S. & Navar, L.G. Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *Am. J. Physiol* **274**, F876-F882 (1998).
154. Faro, R., Tanus-Santos, J.E., Zappellini, A., Antunes, E. & de Nucci, G. The role of heart rate in the modulation of the decreased cardiac output induced by acute nitric oxide synthesis inhibition in anaesthetized dogs. *J. Auton. Pharmacol.* **19**, 257-262 (1999).
155. Gross, V., Lippoldt, A., Schneider, W. & Luft, F.C. Effect of captopril and angiotensin II receptor blockade on pressure natriuresis in transgenic TGR(mRen-2)<sup>27</sup> rats. *Hypertension* **26**, 471-479 (1995).
156. Mair, J., Hammerer-Lercher, A. & Puschendorf, B. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure.



*Clin. Chem. Lab Med.* **39**, 571-588 (2001).

157. Maisel, A.S. *et al.* Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 2010-2017 (2003).

158. Lubien, E. *et al.* Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* **105**, 595-601 (2002).

159. Cheung, B.M. Plasma concentration of brain natriuretic peptide is related to diastolic function in hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **24**, 966-968 (1997).

160. Lang, C.C. *et al.* Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with isolated diastolic dysfunction. *Am. Heart J.* **127**, 1635-1636 (1994).

161. Yamamoto, K. *et al.* Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* **28**, 988-994 (1996).

162. Feldman, M.D. *et al.* Validation of a mouse conductance system to determine LV volume: comparison to echocardiography and crystals. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **279**, H1698-H1707 (2000).

163. Wallace, A., Lam, H.W. & Mangano, D.T. Linearity, load dependence, hysteresis, and clinical associations of systolic and diastolic indices of left ventricular function in man. Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group. *J. Card Surg.* **10**, 460-467 (1995).

164. Janssen, B.J. *et al.* Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **287**, H1618-H1624 (2004).

165. Baan, J., van der Velde, E.T. & Steendijk, P. Ventricular pressure-volume

relations in vivo. *Eur. Heart J.* **13 Suppl E**, 2-6 (1992).

166. Kass,D.A., Bronzwaer,J.G. & Paulus,W.J. What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ. Res* **94**, 1533-1542 (2004).

167. Zile,M.R. & Brutsaert,D.L. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation* **105**, 1387-1393 (2002).

168. How to diagnose diastolic heart failure. European Study Group on Diastolic Heart Failure. *Eur. Heart J.* **19**, 990-1003 (1998).

169. Zile,M.R., Baicu,C.F. & Gaasch,W.H. Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1953-1959 (2004).

170. Yamamoto,K. *et al.* Myocardial stiffness is determined by ventricular fibrosis, but not by compensatory or excessive hypertrophy in hypertensive heart. *Cardiovasc Res* **55**, 76-82 (2002).

171. Cingolani,O.H., Yang,X.P., Cavaasin,M.A. & Carretero,O.A. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **41**, 249-254 (2003).

172. Zile,M.R. & Brutsaert,D.L. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation* **105**, 1503-1508 (2002).

173. Massion,P.B., Feron,O., Dessy,C. & Balligand,J.L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res* **93**, 388-398 (2003).

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

175. Brunner,F., Andrew,P., Wolkart,G., Zechner,R. & Mayer,B. Myocardial

contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **104**, 3097-3102 (2001).

176. Saito,T. *et al.* Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **283**, H339-H345 (2002).

177. Wang,D., Yang,X.P., Liu,Y.H., Carretero,O.A. & LaPointe,M.C. Reduction of myocardial infarct size by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Hypertens.* **12**, 174-182 (1999).

178. Liu,Y.H. *et al.* Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **289**, H2616-H2623 (2005).

179. Abe,K. *et al.* Involvement of iNOS in postischemic heart dysfunction of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **280**, H668-H673 (2001).

180. Ullrich,R. *et al.* Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circulation* **102**, 1440-1446 (2000).

## 9 Verzeichnis der Abkürzungen

ALAT	Alaninaminotransferase
A. dest.	aqua destillata
Abb.	Abbildung
abs.	absolutes
Alb	Albumin
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
AV-Klappe	Artrio-Ventrikular-Klappe
BNP	Brain natriuretic peptide
bp	Basenpaare
bpm	beats pro minute, Schläge pro Minute
bzw	beziehungsweise
CA 2+	Kalzium
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD4	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DANN
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CK	Creatinkinase
Cl	Chlorid
CO	Herzminutenvolumen (Cardiac output)
COX	Cyclooxygenase
Crea	Kreatinin
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag/e
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCA	Desoxycorticosteron induzierte Hypertonie
dPdtmax	Maximaler Anstieg des Linksventrikulären Druckes

dPdt <sub>min</sub>	Minimaler Anstieg des Linksventrikulären Druckes
ECE	Endothelin-converting enzyme
EDPVR	enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehung, Diast. Steifigkeit
EDRF	Endothelium-derived relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Auswurfraction (Ejection fraction)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ET	Endothelin
ETA-	Endothelin-A-Rezeptor
ETB-	Endothelin-B-Rezeptor
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mono-Nucleotid
g	Gramm
G(t)	Gesamtleitwert zu der Zeit t
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gluc	Glucose
GP	Parallele Conductance
h	Stunde/n
HCHO	Formaldehyd
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HR	Herzfrequenz (Schläge pro Minute)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IMCD	Innere medulläre Sammelrohre
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
K	Kalium
kb	kilo Basen
kD	kilo Dalton
KGW	Körpergewicht
L	Abstand der Katheterelektrode

L-Arg	L-Arginin
L-NAME	N[omega]-nitro-l-arginine methyl ester
LVEDP	Linksventrikulärer Enddiastolischer Druck
LVEDV	Linksventrikuläres Enddiastolisches Volumen
LVESP	Linksventrikulärer Endsystolischer Druck
LVESV	Linksventrikuläres Endsystolisches Volumen
LVP max	Linksventrikulärer Maximaler Druck
M	Mol
min	Minute/n
mmHg	Millimeter Quecksilber
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Na	Natrium
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduzierte Form
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PHT	Druckhalbwertzeit (Pressure Halftime)
pp ET-1	Präpro Endothelin-1
RIA	Radioimmunassey
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s.	siehe
SC	Kreatinin im Serum
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SHR	Spontan hypertensive Ratte
SV	Schlagvolumen (Stroke Volume)
SW	Schlagarbeit (Stroke Work)
syst.	systolisch
Tau	Zeitkonstante des linksventrikulären Druckabfalls

TGF2 $\alpha$	ransforming growth factor2 $\alpha$
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TP	Totalprotein
UC	Kreatinin im Urin
Upm	Umdrehungen pro Minute
Urea	Harnstoff
Uvol	Urinvolumen
v.a.	vor allem
Vcath	zeitabhängige Volumen
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$	dimensionsloser Faktor
$\sigma_b$	spezifische Leitfähigkeit des Blutes
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer

## **10 Publikationen**

### **Additional lack of iNOS attenuates diastolic dysfunction in aged ET-1 transgenic mice**

Philipp Kalk\*, Dirk Westermann\*, Sophia Herzfeld, Katharina Relle, Thiemo Pfab, Christian Bauer, Carsten Tschoepe, Johannes-Peter Stasch, Berthold Hofer  
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, in press

\*: both authors contributed equally

### **Lack of iNOS Impairs Endothelial Function in Endothelin-1 Transgenic Mice.**

Quaschnig T, Voss F, Herzfeld S, Relle K, Kalk P, Godes M, Pfab T, Kraemer-Guth A, Bonz AW, Theuring F, Galle J, Hofer B  
Kidney Blood Press Res. 2008 Apr 7;31(2):127-134

### **Chronic cyclooxygenase-2 inhibition does not alter blood pressure and kidney function in renovascular hypertensive rats.**

Claus-M. Richter, Michael Godes, Charlotte Wagner, Christiane Maser-Gluth, Sophia Herzfeld, Maren Dorn, Friedrich Priem, Torsten Slowinski, Christian Bauer, Wolfgang Schneider, Hans-H. Neumayer, Armin Kurtz and Berthold Hofer Journal of Hypertension 2004, 22:191–198.

### **ETA Receptor Blockade Induces Tubular Cell Proliferation and Cyst Growth in Rats with Polycystic Kidney Disease.**

Berthold Hofer, Philipp Kalk, Torsten Slowinski, Michael Godes, Alexander Mach, Sophia Herzfeld, Doreen Wiesner, Petra Clara Arck, Hans-H. Neumayer and Benno NafzJ Am Soc Nephrol 2003, 14: 367-376.



## **11 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Berthold Hocher möchte ich für die Betreuung meiner Dissertation und die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit danken.

Für die gute Zusammenarbeit mit Dr. med. Dirk Westermann der AG Tschöpe (Department Cardiology and Pneumology, Campus Benjamin Franklin (CBF), Charité Berlin), bei der die in-vivo-Messungen am Herzen stattfanden, möchte ich mich bedanken.

Bei Dr. med. Philipp Kalk und Dr. med. Micha Godes möchte ich mich für die jederzeit angebotene Hilfe, wertvollen Ratschläge und gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei Frau Katja Simon, Frau Maren Dorn und Frau Dr. med. vet. Barbara Eggert möchte ich mich für die moralische Unterstützung und für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Bei Herrn Dr. med. Claus-Michael Richter bedanke ich mich für die Einführung in die Arbeit im Labor.

Ich bedanke mich auch bei Fr. Norma Schulz, Susan Sommerfeld und Anne Massah für die exzellente technische Hilfe, die zuverlässige Überwachung der Aufzucht unserer Versuchstiere und die freundliche Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich meinem Mann Massimiliano Achenza danken, der mich bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Interesse und Anteilnahme begleitete, mich moralisch immer unterstützt hat und nie daran gezweifelt hat, dass ich diese Arbeit irgendwann abschließen würde.

Ich möchte meiner Mama Danke sagen, die mir eine Universitätsausbildung so selbstverständlich erscheinen hat lassen und mich von jeher in jeder Hinsicht unterstützt hat.

## 12 Erklärung

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

Berlin, den 27.09.2007

Sophia Herzfeld