

Aus der Klinik für Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Zelltypspezifische Interaktion
zwischen Endothelin und dem NO-System:
Verteilungsmuster der ET-1-Expression
in mit L-NAME behandelten Nieren
von präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Maren Christian
aus Berlin

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. B. Hoher
 2.: Prof. Dr. med. F.J. Schweigert
 3.: Prof. Dr. med. C. Wanner

Datum der Promotion: 22. Februar 2008

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	9
1.1	Endotheline	9
1.1.1	Erforschung der Endotheline	9
1.1.2	Aufbau und Isoformen der Endotheline	10
1.1.3	Genlokalisierung der Endotheline	11
1.1.4	Biosynthese und Abbau der Endotheline	11
1.1.5	Molekularbiologischer Wirkmechanismus der Endotheline	12
1.1.6	Endothelin-Wirkungen auf den Phänotyp	13
1.2	Stickstoffmonoxid	14
1.2.1	Synthese von Stickstoffmonoxid	15
1.2.2	Lokalisation und Funktion der NO-Synthase-Isoformen	15
1.2.3	Effekte von Stickstoffmonoxid auf die Nierenfunktion	16
1.2.4	Antagonisten von Stickstoffmonoxid	17
1.3	Endothelin-1	18
1.3.1	Molekularbiologischer Wirkmechanismus von Endothelin-1	18
1.3.2	Regulation der Endothelin-1-Expression	18
1.3.3	Rolle von Endothelin-1 in Pathomechanismen	19
1.3.4	Endothelin-1 in der Niere	23
1.4	Wechselwirkungen zwischen ET-1 und NO	25
1.5	Das transgene Tiermodell	26
2	<i>Herleitung der Aufgabenstellung</i>	30
3	<i>Material und Methoden</i>	32
3.1	Materialien	32
3.2	Versuchstiere	33
3.3	Physiologische Methoden	34
3.3.1	Invasive Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks	35
3.3.2	Schwanzplethysmographische Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks	36

3.4	Histologische Methoden	37
3.4.1	Organentnahme	37
3.4.2	Bluo-Gal-Färbung	37
3.4.3	Paraffineinbettung	38
3.4.4	Organblockbilder	38
3.4.5	Grauwertauswertung und Farbauswertung	38
3.4.6	Anfertigung der histologischen Schnitte	39
3.4.7	Gegenfärbungen	39
3.4.8	Bestimmung des Glomeruloskleroseindex	42
3.4.9	Analyse der interstitiellen Fibrose	43
3.4.10	Auswertung der Promotoraktivität	44
3.4.11	Qualitative Auswertung der Nierenhistologie	45
3.5	Immundiagnostische Methoden	45
3.5.1	Aufarbeitung des Nierengewebes zur Immundiagnostik	45
3.5.2	ET-1-Konzentrationsbestimmung in Mäusenieren	46
3.6	Bildmaterial	48
3.7	Statistische Auswertung	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Nachweis des humanen präpro-ET-1-Promotors durch LacZ-Markierung	50
4.1.1	Histologische Darstellung des Produktes der LacZ-Markierung	50
4.1.2	Nachweis der humanen präpro-ET-1-Promotoraktivität am Organschnitt	51
4.1.3	Differenzierung der humanen präpro-ET-1-Promotoraktivität am histologischen Schnitt	52
4.1.4	Kontrastanalyse und Farbanalyse zur Quantifizierung der Präzipitatdichte	53
4.1.5	Manuelle Quantifizierung der Präzipitatdichte	55
4.1.6	Korrelation der Präzipitatdichte mit der ET-1-Gewebekonzentration	56
4.2	Reaktion des Phänotyps auf die Transgenität	57
4.3	Regulation von ET-1 durch NO bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen	64
4.3.1	Effekt von L-NAME auf die ET-1-Konzentration bei der transgenen Maus	64
4.3.2	Effekt von L-NAME auf den Blutdruck der transgenen Maus	65
4.4	Lokalisierung von ET-1 in den Strukturen der transgenen Niere	66
4.4.1	Lokalisierung des präpro-ET-1-Promotors in der transgenen Mäuseniere	66
4.4.2	Modifizierte Expression des präpro-ET-1-Promotors durch L-NAME	71

5	<i>Diskussion</i>	73
5.1	Evaluation des präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusemodells	73
5.1.1	Evaluation der Bluo-Gal-Färbung	73
5.1.2	Korrelation von ET-1-Konzentration und Präzipitaten	74
5.2	Betrachtung des Phänotyps der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Maus	75
5.3	In-vivo-Nachweis des ET-1-cGMP-NO-Regelkreises	76
5.3.1	Einfluss von L-NAME auf den arteriellen Blutdruck der transgenen Maus	77
5.4	Lokalisation des präpro-ET-1-Promotors in der transgenen Mäuseniere	79
6	<i>Zusammenfassung</i>	81
6.1	Schlussfolgerung	82

Widmung

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AD	Außendurchmesser
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
APES	Aminotriethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
Bluo-Gal	5-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
CD4	Cluster of differentiation 4
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX-1	Cyclooxygenase-1
DAG	1,2-Diacylglycerol
ECE	Endothelin Converting Enzyme
EDRF	endothelabhängiger vasorelaxierender Faktor
EGF	epidermaler growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
eNaC	epithelialer Natriumkanal
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
FGF β	Fibroblast growth factor
G	Glomeruloskleroseindex
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ID	Innendurchmesser
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP3	1,4,5-Inositol-triphosphat
K ₃ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanoferrat(III)
K ₄ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanidoferrat(II)
LDL	Low Density Lipoprotein
L-NAME	L-Nitroargininmethylester
L-NMMA	NG-Monomethyl-L-Arginin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration

MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N.	Nervus
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF γ	Nekrosefaktor γ
NF κ B	Nuclear Factor Kappa B
NMRI	Naval Medical Research Institute
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PAS	Periodsäure-Schiff'sche-Färbung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGDF	Platelet-Derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
RBF	renaler Blutfluss
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SF	Schweregrad der interstitiellen Fibrose
SG	Schweregrad der Glomerulosklerose
tg	transgen
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
UpM	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
X-Gal	5-bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid

1 Einleitung

Diese Arbeit beschreibt die Lokalisation von Endothelin-1 (ET-1) in den unterschiedlichen Strukturen der Mäuseniere und betrachtet dessen Einfluss auf Stickstoffmonoxid in der Niere. Um die Effekte von ET-1 im Gewebe sowohl histologisch als auch in vivo beobachten zu können, wird auf ein transgenes Tiermodell zurückgegriffen, bei dem die Promotorregion an einem eingefügten humanen ET-1-Gen chromogen markiert und damit histologisch sichtbar gemacht werden kann.

Im Folgenden werden die Hintergründe der Fragestellung und Methodik umrissen.

1.1 Endotheline

Dieser Abschnitt beschreibt den Aufbau und die Funktion der ET und gibt einen Überblick über den Hintergrund der Forschung zu dieser Hormongruppe.

1.1.1 Erforschung der Endotheline

Das Endothel dient als anatomische Grenze zwischen dem zirkulierenden Blut und der Gefäßwand. Es reguliert darüber hinaus Gefäßfunktionen, indem es vasoaktive Faktoren produziert und freisetzt. Diese Faktoren können direkt an den endothelialen Zellen, aber auch als autokrine oder parakrine Hormone an anderen Gefäßzellen agieren. Dieses System blieb bis vor drei Dekaden unerforscht.

Nach der Identifizierung von Prostazyklin als relaxierender Faktor an glatter Muskulatur gelang die Entdeckung des endothelabhängigen vasorelaxierenden Faktors EDRF [**Furchgott et al., 1980**]. Die Entdeckung von Prostazyklin und EDRF führte zu intensiver Forschung auf dem Gebiet der Endothelfunktion.

Ein von Hickey beschriebener endothelabhängiger vasokonstriktiver Faktor wurde von Yanagisawa aus kulturell gezüchteten Aortenendothelzellen von Schweinen isoliert und nach seinem Ursprungsort Endothelin (ET) genannt [**Yanagisawa et al., 1988; Hickey et al., 1985**]. Kontraktionen an isolierten Gefäßbetten sowie die Blutdrucksteigerung nach ET-Gabe deutete bereits damals auf einen Zusammenhang zwischen ET und der Regulation des Herzkreislaufsystems.

1.1.2 Aufbau und Isoformen der Endotheline

ET besteht aus 21 Aminosäuren, deren Abfolge durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken verbunden ist. Es fungiert bei vielen verschiedenen Säugetierspezies als potenter Vasokonstriktor. Bei der Entschlüsselung des ET-Gens wurden die drei Isoformen ET-1, ET-2 und ET-3 gefunden [Inoue et al., 1989]. Abbildung 1 zeigt, dass sich deren Aminosäuresequenzen untereinander nur gering unterscheiden. Durch die zwei intramolekularen Disulfidbrücken weisen alle Isoformen eine charakteristische Haarnadelform auf.

Die drei ET-Isopeptide werden in verschiedenen Zellen der Organe in variablen Konzentrationen hergestellt. Das Gefäßendothel synthetisiert fast ausschließlich ET-1 und ist gleichzeitig der Hauptbildungsort für ET-1 [Yanagisawa et al., 1988]. ET-1 wird auch von Zellen der Niere, des Herzens, der Lunge, der Leber, des Gastrointestinaltraktes, der Nebennieren, der Prostata, der Augen, der Epidermis und von Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems gebildet [Simonson et Dunn, 1993]. ET-2 wird im Epithel des gesamten Gastrointestinaltraktes, im Kolon jedoch mit gesteigerter Expression, nachgewiesen [Takizawa et al., 2005]. ET-3 wird überwiegend im zentralen Nervensystem, der Hypophyse und im Darm exprimiert [Matsumoto et al., 1989].

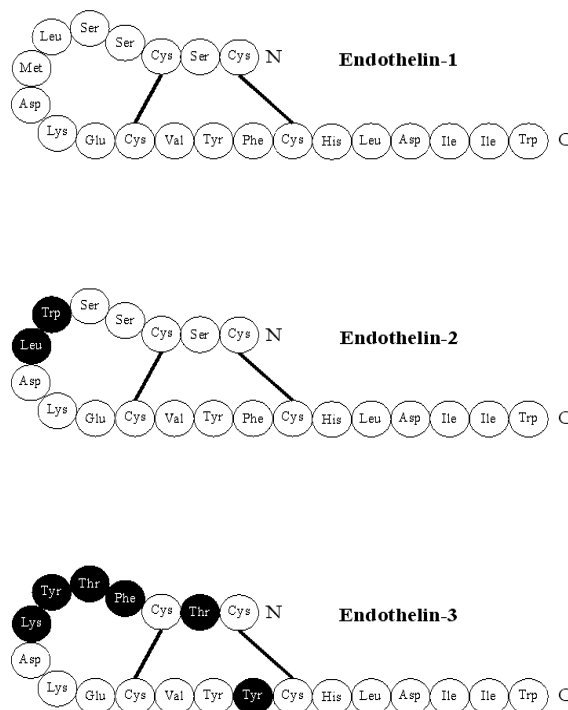


Abbildung 1: Strukturformel des ET-1, ET-2 und des ET-3. Die von der Aminosäuresequenz des ET-1 abweichenden Aminosäuren sind schwarz dargestellt.

1.1.3 Genlokalisierung der Endotheline

Beim Menschen sind die Gene von ET-1, ET-2 und ET-3 auf den Chromosomenabschnitten 6p23-24, 1p34 und 20q13.2-13.3 lokalisiert [Arinami et al., 1991]. Die komplette Nukleotidsequenz des humanen ET-1-Gens ist bekannt. Es setzt sich aus fünf Exons und vier Introns zusammen, wobei die kodierende Sequenz für ET-1 im zweiten Exon enthalten ist [Inoue et al., 1989].

1.1.4 Biosynthese und Abbau der Endotheline

Genetische Analysen der ET-1-cDNA zeigen, dass ET-1 aus dem primären Transkriptionsprodukt präpro-ET-1-mRNA synthetisiert wird. Aus der präpro-ET-1-mRNA wird präpro-ET-1 gebildet, das aus 203 Aminosäuren besteht. Wie die Abbildung 2 zeigt, entsteht aus präpro-ET-1 nach Spaltung durch spezifische Endopeptidasen die biologisch inaktive Zwischenstufe pro-ET-1, welche aus 38 Aminosäuren besteht und auch big-ET-1 genannt wird. Big-ET-1 wird durch ECE-1 (*endothelin-converting enzyme 1*) zum biologisch aktiven ET-1 gespalten [Yanagisawa et al., 1988]. Die Spaltung von big-ET-1 zu ET-1 ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der ET-Synthese [Kimura et al., 1989]. ET-2 und ET-3 werden aus eigenen Vorstufen synthetisiert. Der exakte molekularbiologische Mechanismus dieser Synthese ist bisher jedoch unklar.

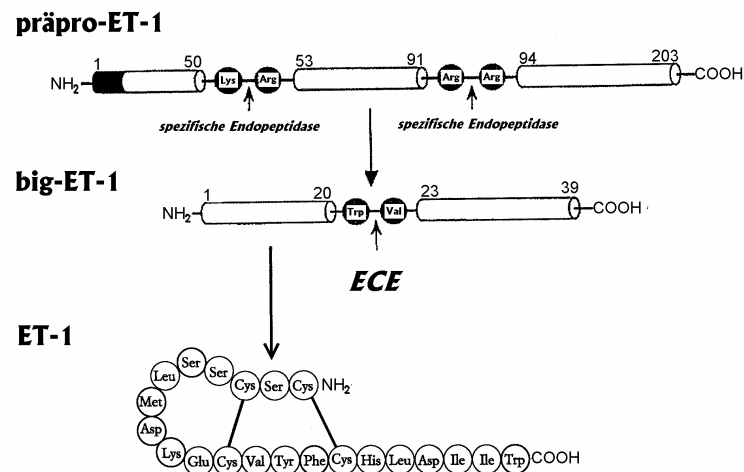


Abbildung 2: Biosynthese von präpro-ET-1 zu ET-1.

Der höchste Anteil von ECE-1 wird im Gefäßendothel nachgewiesen [**Korth et al., 1999**]. Neben den bisher isolierten, in verschiedenen subzellulären Strukturen vorhandenen humanen ECE-1 Isoformen, ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d [**Coder, 2001**], wurde als weiteres ET-Konversionsenzym das ECE-2 identifiziert [**Emoto et al., 1995**]. Bei ECE-1- und ECE-2-doppel-knockout-Mäusen konnten hohe ET-1-Konzentrationen gemessen werden. Die Existenz von weiteren ECE-Isoformen ist deshalb wahrscheinlich [**Yanagisawa et al., 2000**].

Das zirkulierende ET-1 wird überwiegend in der Lunge durch zwei verschiedene Klassen von Endopeptidasen mit einem neutralen bzw. einem sauren pH-Optimum abgebaut [**Simonson und Dunn, 1993**].

1.1.5 Molekularbiologischer Wirkmechanismus der Endotheline

Bisher sind drei verschiedene ET-Rezeptoren bekannt: ET_A-, ET_B- und ET_C [**Douglas et al., 1995**]. Sie unterscheiden sich in der Nucleotid- und Aminosäuresequenz, in ihrer Bindungsaffinität zu den ET-Isopeptiden, in ihrem Expressionsmuster in verschiedenen Organsystemen und durch ihre rezeptorvermittelte Aktivierung von second-messenger-Systemen.

Der ET_A-Rezeptor bindet ET-1 mit einer höheren Affinität als ET-2. Am geringsten ist seine Affinität zu ET-3. Der ET_B-Rezeptor bindet alle drei ET-Isoformen mit gleicher Affinität [**Bax et Saxena, 1994**]. Der ET_C-Rezeptor bindet ET-3 mit einer höheren Affinität als ET-1 und ET-2 [**Masaki et al., 1994**].

Die ET_A- und ET_B-Rezeptoren kommen in unterschiedlichen Expressionsgraden in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten, Hepatozyten und in Neuronen vor. Sie gehören zur Gruppe der rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren und bestehen aus sieben transmembranären Regionen. Über den ET_C-Rezeptor ist wenig bekannt, er konnte zunächst nur aus Amphibien gewonnen werden. Heute ist jedoch auch das Klonen aus Säugetierzellen möglich [**Nambi et al., 1994**].

Die glatten Gefäßmuskelzellen exprimieren überwiegend ET_A-Rezeptoren. Auf den endothelialen Zellen befinden sich hauptsächlich ET_B-Rezeptoren. Das in den Endothelzellen synthetisierte und zu 80% nach basolateral und zu 20% nach luminal sezernierte ET-1 [**Hochoer et al., 1997a**] vermittelt über den ET_A-Rezeptor der glatten Muskelzellen, über den weniger vorhandenen ET_A-Rezeptor der endothelialen Zellen und über den nur gering vorhandenen ET_B-Rezeptor der glat-

ten Muskelzellen eine Vasokonstriktion [Haynes et al., 1995; Hori et al., 1992]. Zusätzlich werden über den ET_A-Rezeptor Prozesse wie Zellwachstum und Zelladhäsion vermittelt.

Wie die Abbildung 3 zeigt, erfolgt durch Bindung von ET-1 am endothelialen ET_B-Rezeptor eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und damit die Synthese von NO. Ferner kommt es durch den aktivierten endothelialen ET_B-Rezeptor zu einer Stimulierung der cyclooxygenaseabhängigen (COX-1) Phospholipase A₂ und so zur Synthese von Prostacyclin. Die Syntheseprodukte NO und Prostacyclin induzieren daraufhin die Vasodilatation.

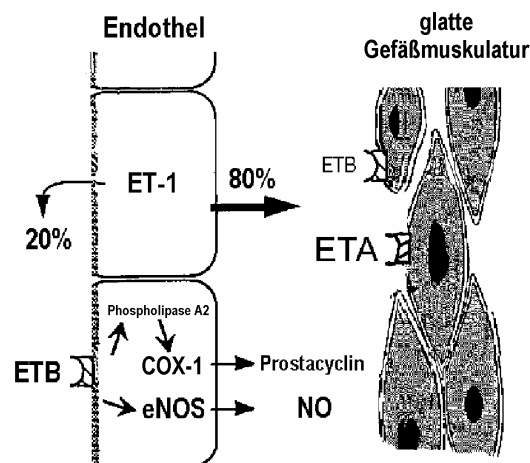


Abbildung 3: ET-System der Arterienwand.

Darüber hinaus wird vermutet, dass die endothelialen ET_B-Rezeptoren in Apoptoseprozessen als protektive Faktoren wirken, die ECE-1-Expression in endothelialen Zellen inhibieren und eine wichtige Rolle in der ET-1-Freisetzung spielen [Hori et al., 1992].

Die Plasmakonzentrationen von ET sind unter physiologischen Bedingungen nur sehr niedrig. Bei Menschen und Tieren liegt die Plasmakonzentration von ET-1, ET-2, ET-3 und big-ET im Bereich zwischen 0,3 bis 3 pg/ml. Aus diesem Grund wird angenommen, dass ET-1 kein zirkulierendes Hormon ist, sondern autokrin und parakrin wirkt [Nakas-Icindic et al., 2004].

1.1.6 Endothelin-Wirkungen auf den Phänotyp

Die biologische Wirkung von ET kann in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe beinhaltet Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion und Kontraktion von uterinen glatten Gefäßmuskulaturzellen. Für diese Wirkungen sind ET-1 und ET-2 die stärkeren Agonisten als ET-3. Die zweite Gruppe beinhaltet die Endothel-abhängige Vasodilatation. Für diese Wirkung agieren die drei

ET-Isoformen annähernd mit gleicher Affinität. Darüber hinaus ist ET-1 zusätzlich am Wachstum unter anderem der Endothelzellen, der glatten Muskelzellen und Astrozyten beteiligt [Simonson et al., 2001].

Ergebnisse von verschiedenen knockout-Mäuse-Modellen zeigen die physiologische Rolle des ET-Systems in der Zellproliferation, bei der Reperatur und Gewebedifferenzierung sowie bei der Regulation des Gefäßtonus, bei der Regulation des Natriumhaushaltes, in der frühen Entwicklung der Neuralleiste und in der in Abbildung 5 gezeigten Differenzierung einzelner Organstrukturen. ET-1- und ET_A-Rezeptor-knockout-Mäuse zeigen kraniofaziale morphologische Abnormalitäten sowie Abnormalitäten der intrathorakalen Blutgefäße. Dies legt die Notwendigkeit von ET-1 und ET_A-Rezeptoren bei der Entwicklung der kranialen und kardialen Neuralleiste nahe. ET-3- und ET_B-Rezeptor-knockout-Mäuse zeigen phänotypisch ein Megakolon und ein geflecktes Fell, was die Notwendigkeit von ET-3 und ET_B-Rezeptoren für die Entwicklung von Melanozyten und Darmneuronen unterstreicht [Kedzierski et al., 2001].

Um weitere Einblicke in das komplexe ET-System zu gewinnen wurden neben der Verwendung von ET-transgenen Tieren und ET-knockout Tieren nichtselektive und selektive ET-Rezeptorantagonisten und ECE-Inhibitoren entwickelt [Battistini et al., 2001]. Heute existieren viele Rezeptorantagonisten, die selektiv den ET_A- oder ET_B-Rezeptor antagonisieren oder nichtselektiv beide Rezeptorsubtypen mit gleicher Affinität blockieren.

1.2 Stickstoffmonoxid

1980 berichtete Furchgott, dass der vasodilatierende Effekt von Acetylcholin durch die Freisetzung eines relaxierenden Faktors aus den glatten Gefäßmuskelzellen der endothelialen Zellen erfolgt [Furchgott et al., 1980]. Dieser Faktor wurde endothelabhängiger vasorelaxierender Faktor (EDRF) genannt und später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert. NO ist an physiologischen und pathologischen Prozessen im kardiovaskulären System sowie im Immun-, Reproduktions- und Nervensystem des Organismus beteiligt [Kolb-Bachofen et al., 2006]. In vitro führt NO über die Stimulation der Guanylatcyclase und über eine Zunahme der cGMP-Konzentration zu einer Vasodilatation. NO zeigt zusätzlich antiproliferative und antithrombotische Eigenschaften. NO inhibiert neben der ET-1-Produktion die Proliferation der glatten Muskelzellen sowie die Leukozyten- und Monozytenadhäsion. Es wirkt darüber hinaus positiv inotrop [Spieker, 2005].

1.2.1 Synthese von Stickstoffmonoxid

NO wird in endothelialen Zellen aus der Aminosäure L-Arginin durch Kalzium-Kalmodulin-abhängige NO-Synthasen (NOS) gebildet. Es gelangt durch Diffusion in die glatten Gefäßmuskelzellen und vermittelt dort die Vasodilatation. Die NO-Synthasen sind für die Konversion von L-Arginin zu NO verantwortlich. Sie sind NADPH-abhängige Dioxigenasen.

Endotheliale Zellen können L-Arginin ebenso aus L-Citrullin herstellen. Hierbei handelt es sich um den L-Arginin-Recycling-Syntheseweg. NO kann zusätzlich auch aus L-Arginin-strukturanalogen Vorstufen wie L-Homoarginin, Methyl- und Ethylargininester synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu existieren N^G-Arginin-strukturanaloge Vorstufen wie N^G-Methyl-, Ethyl- und Allyl-L-Arginin, die kompetitive Antagonisten des NO sind (siehe 1.2.4) [Boger et al., 1997].

1.2.2 Lokalisation und Funktion der NO-Synthase-Isoformen

NO wird in Säugetierzellen von drei verschiedenen NO-Synthasen, der endothelialen NOS (eNOS), der neuronalen NOS (nNOS) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), synthetisiert. Die gleichen NOS-Isoformen spielen in verschiedenen Geweben der Säugetiere sehr unterschiedliche Rollen im NOS-Stoffwechselweg. Die eNOS und die nNOS werden durch die intrazelluläre Konzentration von Ca²⁺ und dessen Bindung an Kalmodulin aktiviert. Die iNOS hingegen wird Ca²⁺-unabhängig aktiviert [Stamler et al., 1992].

Die eNOS ist im Gefäßendothel als Membranprotein vorhanden und ist für die Synthese und Freisetzung von endotheliale NO zuständig. Sie wurde aber auch unter anderem in Herzmuskelzellen, in Thrombozyten und in Zellen des Hippocampus nachgewiesen [Radomski et al., 1995]. Die eNOS ist im Wesentlichen für die Botenstofffunktionen von NO unter physiologischen Bedingungen verantwortlich und spielt somit eine große Rolle in der Regulation des systemischen Blutdrucks. eNOS-knockout-Mäuse sind hypertensiv [Shesley et al., 1996]. In transgenen eNOS-überexprimierenden Mäusen wird hingegen eine Hypotension hervorgerufen [Ohashi et al., 1998]. Zusätzlich ist die eNOS an der Inhibition von oxidativem Stress und der Inhibition von Entzündungsreaktionen wie z.B. der Leukozytenadhäsion beteiligt, inhibiert aber auch die Plättchenaggregation und die Proliferation von glatten Muskelzellen. Die eNOS zeigt also antiatherosklerotische, antiproliferative und antithrombotische Eigenschaften [Kausser et al., 2000; Shesely et al., 1996]. Die eNOS wird unter anderem durch Wandspannung, ET, Acetylcholin, Bradykinin, Glutamat, ATP, Plättchen-aktivierenden Faktor, Thrombin, niedrigen

Konzentrationen von oxidiertem LDL und cGMP aktiviert und durch TNF- α , Hypoxie und durch hohe Konzentrationen von oxidiertem LDL gehemmt [Hirata et al., 1995; Stamler et al., 1992].

Die nNOS kommt im zentralen und peripheren Nervensystem und in der Skelettmuskulatur vor. Im peripheren Nervensystem fungiert die nNOS als Neurotransmitter und relaxiert z.B. die gastrointestinale Motilität. nNOS-knockout-Mäuse zeigen eine Hypertrophie des Pylorussphinkters [Teichert et al., 2000]. Die nNOS reguliert auch den regionalen Blutfluss im Gehirn und ist an neuroendokrinen Funktionen beteiligt. Im zentralen Nervensystem spielt die nNOS eine Rolle als Neuromodulator. Sie hat einen Einfluss auf die Gehirnentwicklung und sie beeinflusst das Verhalten und die Gedächtnisfunktion. In der Skelettmuskulatur reguliert die nNOS den Muskelmetabolismus und die Muskelkontraktilität [Chrisopherson et al., 1997].

Die iNOS wurde unter anderem in Makrophagen, Thrombozyten, Herzmuskelzellen, Gliazellen, glatten Gefäßmuskelzellen und in der Niere gefunden [Chen et al., 1996; Noiri et al., 1996]. Die Transkription der iNOS ist vom Transkriptionsfaktor NF- κ B abhängig und kann durch die Zytokine IL-1 β , INF- γ , TNF- α sowie durch bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharide und durch freie Radikale bei oxidativem Stress induziert werden [Noiri et al., 1996]. Einige Wachstumsfaktoren wie der TGF- β und PGDF sowie Glukokortikoide hemmen die Transkription und Aktivität der iNOS [Pfeilschifter et al., 1993]. Die iNOS spielt eine Rolle bei der Regulation der zellulären Antwort auf Infektionen und Entzündungen. Entzündungen und Verletzungen der Zelle sind mit einer Erhöhung der Expression der iNOS assoziiert [Nathan et al., 1997; Radomski et al., 1995]. iNOS-knockout-Mäuse sind anfällig für systemische virale und bakterielle Infektionen sowie für systemische Pilzinfektionen [Teichert et al., 2000].

1.2.3 Effekte von Stickstoffmonoxid auf die Nierenfunktion

NO spielt eine wichtige Rolle in der intrarenalen Hämodynamik. Alle drei NOS-Isoformen kommen in der Niere in unterschiedlichen Geweben vor [Noiri et al., 1996]. Unter physiologischen Bedingungen ist NO in der Niere wichtig für die Regulation der glomerulären Ultrafiltration, der tubulären Reabsorption und des tubuloglomerulären Feedback-Systems [Vallon et al., 1995]. Die Blockade der NO-Synthese führt zu ausgeprägten Veränderungen der Nierenfunktion bis hin zur renalen Vasokonstriktion mit Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) [Granger et al., 1992]. Darüber hinaus vermindert eine Hemmung der NOS-Isoformen die proximale Reabsorption. Da die Macula densa der Sensor des tubuloglomerulären Feedbacks ist, führt eine

lokale Hemmung der NOS-Isoformen in der Macula densa durch Konstriktion des Vas afferens zu einem Abfall des glomerulären Kapillardruckes [Wilcox et al., 1992]. NO spielt somit eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie vieler Nierenerkrankungen. So wird bei chronischen Nierenerkrankungen eine Reduktion von NO im Nierengewebe beobachtet [Vaziri, 2001].

1.2.4 Antagonisten von Stickstoffmonoxid

Innerhalb der physiologischen Regulation der NO-Synthasen wurde das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) als endogener Inhibitor aller NO-Synthasen beschrieben [Kolb-Bachofen et al., 2006].

Die NO-Synthasen können auch pharmakologisch durch N^G-Arginin-strukturanaloge Vorstufen wie N^G-Methyl-, Ethyl-, Allyl-L-Arginin des L-Arginins gehemmt werden. Am gebräuchlichsten sind als kompetitive NO-Antagonisten N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und N^G-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME) zu nennen.

L-NAME ist ein nichtselektiver Inhibitor aller NOS-Isoformen, der die endotheliale NO-Synthase irreversibel und die induzierbare NO-Synthase reversibel hemmt. L-NAME zeigt sich als einer der stärksten Stimuli für die ET-Expression [Castrop et al., 2000].

In der Niere kommt es durch die intravenöse Gabe von L-NAME zu einer dosisabhängigen Zunahme des renalen Perfusionsdrucks, zu einer Reduktion des renalen Blutflusses (RBF) und zu einer verminderten Na⁺- und Wasserausscheidung. Die gefäßwirksame Dosis von L-NAME liegt dabei um den Faktor 10 über der Dosis, die die Elektrolytausscheidung beeinflusst [Conesa et al., 2001]. Mit steigender L-NAME-Dosis zeigt sich zuerst eine Abnahme des Urinvolumens, bei Dosisverdopplung eine Verminderung der Na⁺-Ausscheidung und zeitlich versetzt eine Abnahme des RBF und der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Ab einer Dosis von 10 - 50 µg/kg/min L-NAME erfolgt ein signifikanter Anstieg des Blutdrucks. Der sensitivste Faktor zur Kontrolle der NO-Blockade durch L-NAME ist demnach die Natrium- und Wasserausscheidung [Lahera et al., 1991].

1.3 Endothelin-1

Nach dem Überblick über die Funktion und Lokalisation der Endotheline sowie deren Gegenspieler NO wird im Folgenden das in dieser Arbeit im Besonderen behandelte ET-1 näher betrachtet.

1.3.1 Molekularbiologischer Wirkmechanismus von Endothelin-1

Die intrazellulären molekularen Mechanismen von ET-1 sind noch nicht vollständig erforscht. Bekannt wurde bisher, dass ET-1 überwiegend über den ET_A-Rezeptor an der glatten Muskulatur eine Vasokonstriktion bewirkt. Dazu löst ET-1 am ET_A-Rezeptor eine G-Protein gekoppelte Aktivierung der Phospholipase C mit konsekutiver Bildung von 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Phosphaten, insbesondere 1,4,5-Inositol-triphosphat (IP3) aus. DAG wiederum stimuliert die Proteinkinase C (PKC). IP3 bindet an intrazelluläre IP3-Rezeptoren und führt, unabhängig von der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration, über eine Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, zu einem schnellen transienten Anstieg der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration [Yanagisawa et al., 2000; Miwa et al., 1999]. Der Zunahme dieser intrazellulären Ca²⁺-Konzentration folgt ein über ca. 40 min anhaltender Einstrom von freien Ca²⁺-Ionen aus dem Extrazellulärraum über einen aktivierten nichtselektiven Kationenkanal und einen aktivierten ladungsabhängigen Ca²⁺-Kanal. Der Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellulärraum ist abhängig von der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration und kann durch Ca²⁺-Kanalblocker verhindert werden. Sowohl die Ca²⁺-Freisetzung aus dem Intra- sowie aus dem Extrazellulärraum sind notwendig für eine Kontraktion der glatten Muskulatur [Miwa et al., 1999].

1.3.2 Regulation der Endothelin-1-Expression

Das Endothel als Barriere zwischen Blut und Gewebe spielt eine große Rolle in der Regulation des Gefäßtonus und der kardiovaskulären Homöostase. Das Endothel reagiert auf biochemische und physikalische Stimuli durch Modulation des Gefäßtonus. Dies geschieht durch die Freisetzung von vasodilatatorischen Faktoren wie NO, Prostazykline und Bradykinin sowie über die Freisetzung von vasokonstriktorisches Faktoren wie z.B. ET-1 und Angiotensin II. Hauptfaktoren für die Vasodilatation und Vasokonstriktion, mit Abhängigkeit vom Endothel, sind dabei NO und ET-1 [Alonso et al., 2003].

Viele Faktoren stimulieren die Freisetzung von ET-1 über die Synthese der präpro-ET-1-mRNA. Die bedeutendsten physiologischen Stimuli der präpro-ET-1-mRNA-Synthese sind Angio-

tensin-II, Thrombin, TGF- β , Hypoxie, Gefäßwandspannung und bakterielle Endotoxine. Ferner werden Adrenalin, Bradykinin, Vasopressin, EGF, Zytokine, Dopamin, Insulin, Glukose, IGF-1, Thromboxan A₂ und oxidiertes LDL in der Literatur als physiologische Stimuli der ET-1-Freisetzung beschrieben [Nakas-Icindic et al., 2004; Touyz et Schiffrin, 2003; Barton et al., 1997; Endo et al., 1992; Yanagisawa et al., 1988].

NO hingegen ist der wichtigste physiologische Inhibitor der ET-1-Synthese (siehe 1.2). Zusätzlich existieren jedoch auch andere ET-1-Inhibitoren, die wie NO die cGMP-Synthese erhöhen, wie unter anderen ANF und Prostacyclin [Ahlborg et al., 1997].

1.3.3 Rolle von Endothelin-1 in Pathomechanismen

ET-1 ist der stärkste und langanhaltendste biologische Vasokonstriktor der bis heute identifiziert werden konnte [Patocka et al., 2005]. ET-1 hat verschiedene physiologische Aufgaben im menschlichen Körper, spielt aber auch gleichzeitig bei vielen Erkrankungen eine Rolle. ET-1 induziert Vasokonstriktion, ist am Zellwachstum und am Stoffwechsel der Zelle beteiligt, reguliert die zelluläre Hypertrophie, induziert Proliferation, ist proinflammatorisch, fördert die Ausbildung einer Fibrose und hat mitogene Eigenschaften. Der hauptsächliche Syntheseort von ET-1 befindet sich in Endothelzellen, Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten. Aus diesem Grund spielt ET-1 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Gefäßfunktion sowie bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen. Belege für eine ET-1-Beteiligung finden sich bei Erkrankungen wie der arteriellen Hypertension, der koronaren Herzerkrankung, der chronischen Myokardinsuffizienz, der pulmonalen Hypertonie, der Arteriosklerose, der chronischen Niereninsuffizienz, dem ischämischen Hirninfarkt, bei zerebralen Lakunen und bei zerebralen Gefäßspasmen nach Subarachnoidalblutung. Auch bei nicht direkt kardiovaskulären Pathologien wie dem Diabetes mellitus oder dem Morbus Alzheimer und bei entzündlichen Erkrankungen wie Sepsis, Asthma bronchiale, Arthritis und bei entzündlichen Darmerkrankungen, ist die zirkulierende ET-1-Konzentration erhöht [Bouallegue et al., 2007; Kolb-Bachofen et al., 2006; Schinelli, 2006; Masaki, 2004; Touyz et Schiffrin, 2003].

Ebenso ist ET-1 aufgrund seiner mitogenen und proangiogenen Eigenschaften in der Pathophysiologie des Tumorwachstums involviert. Sowohl der ET_A- als auch der ET_B-Rezeptor werden in einigen Tumorgeweben exprimiert und spielen eine Rolle beim Tumorwachstum und bei der Angiogenese. Beim Ovarialkarzinom, Prostatakarzinom und bei Knochenmetastasen konnten erhöhte ET-1-Plasmaspiegel nachgewiesen werden. ET-1 stimuliert dabei die

Proliferation von Ovarial- und Prostatatumorzellen sowie von Osteoblasten. Beim Prostatakarzinom zeigen selektive ET_A-Rezeptorantagonisten in Studien nützliche Effekte. ET-Rezeptorantagonisten können daneben auch bei Melanomzellen das Zellwachstum verhindern und Apoptose induzieren [Cazaubon et al., 2006; Schinelli, 2006; Lange et al., 2002].

Als ET-Inhibitoren wirken ET-Rezeptorantagonisten und ECE-Inhibitoren. Nichtselektive und selektive ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonisten werden in Studien bei der Behandlung z.B. der essentiellen Hypertonie, der pulmonalen Hypertension, des Herzversagens, der Lungenfibrose, der Subarachnoidalblutung und der Arteriosklerose erprobt. Bei der pulmonalen Hypertonie finden die Substanzen bereits in der Praxis Anwendung [Motte et al., 2006; Iqbal et al., 2005; Martin et al., 2000].

Im Rahmen von **Herz-Kreislauf-Erkrankungen** hat ET-1 vielfältige Funktionen. Die mitogenen Eigenschaften des ET-1 verstärken die kardiale Hypertrophie und das Remodeling bei chronischer Myokardinsuffizienz. Dadurch erklärt sich der günstige Effekt von ET-1-Inhibitoren bei dieser Erkrankung, der sich jedoch auch bei extrakardialen vaskulären Pathologien wie der essentiellen Hypertonie und der pulmonalen Hypertension zeigt [Miyachi et al., 1999].

Bei **koronarer Herzerkrankung** steigt die ET-1-Konzentration in den intrathorakalen Gefäßendothelien, wobei dieser Anstieg mit dem mittleren arteriellen Blutdruck, dem Serumcholesterin und der Anzahl der arteriosklerotischen Veränderungen korreliert [Rossi et al., 1999].

Das ET-1-System beeinflusst die Inotropie und Chronotropie des Herzens. Die abnehmende kardiale Funktion bei **chronischer Myokardinsuffizienz** stimuliert kompensatorisch das ET-1-System. Die Expression von ET-1 und den ET_A- und ET_B-Rezeptoren ist bei ischämischer Kardiomyopathie durch den oxidativen Stress in Kardiomyozyten erhöht, während gleichzeitig präpro-ET-1-mRNA und ECE-1-mRNA auf Kardiomyozyten überexprimiert wird [Kahler et al., 2000; Serner et al., 2000]. Bei einer anhaltenden Aktivierung des ET-1-Systems verschlechtert sich jedoch die kardiale Funktion durch die mitogenen Eigenschaften des ET-1. Herzrhythmusstörungen und Myokardhypertrophie können auftreten, wobei das Überleben bei fortgeschrittener Myokardinsuffizienz negativ mit der big-ET-1-Plasmakonzentration korreliert [Pacher et al., 1996].

Da ET-1 einer der stärksten biologischen Vasokonstriktoren ist, ergibt sich ein großer Einfluss von ET-1 auf den **Blutdruck**. Die unterschiedliche ET-Rezeptorverteilung in Endothelzellen verschiedener Gewebe bestimmt die Ausprägung der ET-Wirkung. Dabei führt ET-1 zu einer

charakteristischen Blutdrucksequenz. Zunächst bewirkt ET-1 eine rasche und schnell erschöpfbare Aktivierung der NO-Synthasen und der Prostacyclin-Synthese über den endothelialen vasodilatierenden ET_B-Rezeptor. Daraus resultiert ein nur Sekunden dauernder Blutdruckabfall. Vasokonstriktorische ET_A-Rezeptoren in den glatten Gefäßmuskelzellen führen daraufhin über die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu einem langsamen und anhaltenden Blutdruckanstieg [Hirata et al., 1993]. Bei ET-1-knockout-Mäusen zeigt sich jedoch auch bei ET-1-Defizienz ein erhöhter systemischer Blutdruck. Dies scheint an der erhöhten Sympathikusaktivität unter den hypoxischen Bedingungen der knockout-Mäuse zu liegen, kann aber auch durch die Reduktion der relaxierenden ET-1-Wirkung der ET_B-Rezeptoren erklärt werden [Ohuchi et al., 1999].

In Tiermodellen führt die einmalige Gabe des selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten *BQ123* und des nichtselektiven ET-Rezeptorantagonisten *Bosentan* durch die akute Blockade des ET-Systems zu einer Abnahme des mittleren arteriellen Blutdrucks. Menschen mit arteriellem Hypertonus zeigen mit *Bosentan* vorübergehend eine signifikante Reduktion des Blutdrucks [Nakov et al., 2002; Krum et al., 1998]. Eine chronische Behandlung von hypertensiven Ratten mit *Bosentan* führt jedoch zu keiner signifikanten Abnahme des Blutdrucks, weshalb das Medikament bei der Dauerbehandlung des Hypertonus bisher nicht verwendet wird [Li et al., 1995]. Bei akuter dekompensierter Myokardinsuffizienz verbessert der nichtselektive ET_A- und ET_B-Rezeptorantagonist *Tezosentan* die Hämodynamik rasch und effektiv über die Senkung des systemischen und pulmonalen Gefäßwiderstands. Zusätzlich wird speziell unter *Tezosentan* kein hämodynamischer Rebound-Effekt beobachtet, der sich bei anderen Rezeptorblockern durch eine Erhöhung der im Blut zirkulierenden ET-1-Konzentration einstellt [Torre-Amione et al., 2003].

ET-1-transgene Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtypmäusen jedoch keine signifikanten Blutdruckunterschiede, sondern reagieren normoton [Quaschnig et al., 2007; Hocher et al., 1997b]. Die chronische ET-1-Überexpression bei ET-1-transgenen Mäusen sowie die chronische pharmakologische Blockade der ET-Rezeptoren führen demnach offensichtlich zu einer Gegenregulation.

In vitro wird diese Gegenregulation durch eine starke Abnahme von ET-Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen und glomerulären Mesangiumzellen bei langandauernder Exposition mit ET-1 bestätigt. In vivo führt darüber hinaus die vermehrte ET-1-Expression bei ET-1-transgenen Tieren, ähnlich wie die chronische ET-1-Gabe, zur Aktivierung der eNOS über den vasodilatierenden endothelialen ET_B-Rezeptor und damit zur Synthesezunahme von NO.

Diese Aktivierung des NO-Systems antagonisiert die vasokonstriktorisches Effekte von ET-1. Diese Antagonisierung wurde bisher für große Blutgefäße belegt. Möglicherweise neutralisiert dort die höhere Bioverfügbarkeit von NO die vasokonstriktorisches Effekte von ET-1.

Die akute Blockade aller NO-Synthasen mit L-NAME unterbindet bei den ET-1-transgenen Tieren die Gegenregulation über das NO-System. Dadurch bewirkt das bei diesen Tieren vermehrt vorhandene ET-1 einen stärkeren Blutdruckanstieg als bei Wildtypmäusen unter L-NAME, was die verstärkte Aktivierung des NO-Systems bei den ET-1-transgenen Tieren belegt [**Patzak et al., 2005; Hocher et al., 2004**].

eNOS-knockout-Mäuse hingegen weisen eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks auf, da hier NO als physiologischer Gegenspieler zu ET-1 vermindert ist. ET-1-transgene eNOS-knockout-Mäuse zeigen eine noch deutlichere Erhöhung des systolischen Blutdrucks als die eNOS-knockout-Mäuse ohne ET-1-Transgenstatus. Bei diesen Tieren wirkt das vermehrt vorhandene ET-1 über den ET_A-Rezeptor ungehindert vasokonstriktorisches, während gleichzeitig der eNOS-knockout-Status NO vermindert. Dieses neue Tiermodell beweist, dass die Gegenregulation bei ET-1-Überexpression zum großen Teil über die eNOS erfolgt, was die Interaktion zwischen ET-1 und NO deutlich widerspiegelt [**Quaschnig et al., 2007**].

Ein weiterer Grund für die arterielle Normotension bei ET-1-transgenen Mäusen könnte neben der Aktivitätssteigerung der eNOS auch eine vermehrte Expression und Aktivität der iNOS in intrarenalen Arterien sein. Die ET-1-transgenen Mäuse zeigen durch die Überexpression des ET-1-Gens eine durch zirkulierende Zytokine getriggerte chronische Entzündungsreaktion der Niere, die mit einer Zunahme der vaskulären iNOS-Expression einhergeht. Es finden sich ausgeprägte, perivaskuläre Infiltrate CD4-positiver Lymphozyten und Makrophagen, die iNOS synthetisieren. Daher kommt es zu einer erhöhten perivaskulären Produktion von vasodilatierendem NO. Dies bewirkt eine Senkung des arteriellen Blutdrucks und die erhöhte Ausscheidung von NO-Metaboliten im Urin bei ET-1-transgenen Mäusen. Bei Wildtypmäusen konnte hingegen keine gefäßabhängige Expression der iNOS nachgewiesen werden. Ob die vermehrte Expression der iNOS in ET-1-transgenen Mäusen zum Teil für die höhere Bioverfügbarkeit von NO verantwortlich sein könnte, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden [**Hochoer et al., 2004**].

Bei der **pulmonalen Hypertension** spielt ET-1 eine wichtige Rolle. ET-1 aktiviert den ET_A-Rezeptor und führt so zu einer Vasokonstriktion und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen. Über den ET_B-Rezeptor vermittelt ET-1 die pulmonale ET-Clearance und induziert die Pro-

duktion von NO und Prostacyclin [Benigni et al., 1999]. Bei der pulmonalen Hypertension ist die NO-Produktion und damit auch die NO-induzierte Vasodilatation vermindert, wohingegen die Expression von ET-1 und ET_A-Rezeptoren im Lungengewebe erhöht ist [Black et Fineman, 2006; Lee et Channick, 2005; Stewart et al., 2001]. Selektive ET_A-Rezeptorantagonisten wie *BQ123* antagonisieren die vasokonstriktorisches Effekte des ET_A-Rezeptors und erhalten die über den ET_B-Rezeptor vermittelte Vasodilatation und ET-Clearance aufrecht [Barst et al., 2004, 2002]. Klinische Studien über den nichtselektiven ET-Rezeptorantagonisten *Bosentan* ergaben echokardiographisch eine Verbesserung der rechts- und der linksventrikulären Funktion. Die Ergebnisse führten dazu, dass *Bosentan* seit 2001 als wirksames Medikament bei pulmonaler Hypertonie klinisch eingesetzt wird [Humbert et al., 2004; Galie et al., 2003; Sitbon et al., 2003].

1.3.4 Endothelin-1 in der Niere

ET spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Regulation des Herzkreislaufsystems, sondern ist auch in anderen Körpersystemen wie der Niere und im endokrinen System als Regulator beteiligt. Die extrakardiovaskuläre Funktion des ET-Systems ist dabei noch weitgehend unklar [Motte et al., 2006; Masaki, 2004].

Obwohl in der menschlichen Niere die mRNA aller drei ET-Isoformen nachweisbar ist, finden sich dort nur ET-1 und ET-3 als Proteine. Die höchste ET-1-Konzentration im menschlichen Körper wurde in den Zellen der inneren medullären Sammelrohre nachgewiesen. Hier findet auch der größte Teil der ET-3-Synthese statt. Diese liefert das Protein jedoch in viel geringeren Mengen als von ET-1.

Die Niere exprimiert ET-1 neben den inneren medullären Sammelrohren auch in den Endothelzellen der intrarenalen Gefäße und in geringeren Konzentrationen in den Mesangiumzellen sowie im Endothel der Tubuli. Die epithelialen Zellen der Glomerula können sowohl ET-1 als auch ET-3 synthetisieren. ET-2 konnte hingegen in der Niere des Menschen nicht nachgewiesen werden [Kohan et al., 1997, 1993, 1992; Ujiie et al., 1992].

ET-1 wirkt in der Niere para- und autokrin. Das renale ET-System ist an der Regulation des renalen Blutflusses, der GFR und der tubulären H₂O- und Na⁺-Reabsorption beteiligt. Zusätzlich stimuliert ET-1 die Proliferation von Mesangiumzellen sowie die Synthese von Matrixproteinen bei Mesangiumzellen und renalen Fibroblasten [Granger et al., 2006; Lariviere et Lebel, 2003; Hocher et al., 1997b, 1996a, 1996b; Kohan et al., 1993].

Das renale Gefäßsystem reagiert auf die Stimulation der Vasokonstriktion durch ET-1 im Vergleich zu extrarenalen Gefäßsystemen etwa zehnfach sensitiver [Madeddu et al., 1990]. Nach systemischer Applikation niedriger Dosen von ET-1 kommt es auch in der Niere zur bereits im Abschnitt 1.3.3 beschriebenen spezifischen Blutdrucksequenz. Der überwiegend auf den Endothelzellen der Sammelrohre in der Niere lokalisierte ET_B-Rezeptor führt dabei für einige Sekunden zu einer initialen Vasodilatation. Über den überwiegend auf den glatten Muskelzellen im Nierengefäßsystem und den Glomerula lokalisierten ET_A-Rezeptor wird daraufhin eine lang anhaltende Vasokonstriktion vermittelt [Brooks et al., 1998]. Zusätzlich kommt es nach der systemischen Gabe von geringen ET-1-Konzentrationen zu einer Vasokonstriktion der afferenten und efferenten Arteriolen mit einem Anstieg des renalen vaskulären Widerstands und zu einer Reduktion des renalen Plasmaflusses. Hieraus resultiert ein diskreter Abfall der GFR [Marsden et al., 1994].

Die ET_B-Rezeptoren finden sich in der Niere ungefähr doppelt so häufig wie die ET_A-Rezeptoren. Der ET_B-Rezeptor wird neben den renalen endothelialen Zellen auch von glomerulären und tubulären Zellen exprimiert. Der tubuläre ET_B-Rezeptor der Niere ist unter anderem an der renalen Na⁺-Regulation beteiligt. ET-1 inhibiert über den aktivierten ET_B-Rezeptor den epithelialen Natriumkanal (*eNaC*) und führt dadurch zu einer Na⁺- und H₂O-Exkretion in der Niere. Zusätzlich fördert der aktivierte ET_B-Rezeptor die Regeneration von beschädigtem Tubulusepithel. Daneben vermittelt ET-1 über den ET_A-Rezeptor sowohl in vitro als auch in vivo eine Proliferation der glomerulären Zellen sowie der glatten Gefäßmuskelzellen [Kuc et Davenport, 2004; Hoher et al., 2001, 1995].

Bei vielen Nierenerkrankungen, wie z.B. beim akuten und chronischen Nierenversagen, der Lupusnephritis, der diabetischen Nephropathie, Nierenerkrankungen, die mit Fibrose einhergehen, und bei dialysepflichtigen Nierenerkrankungen im Endstadium wurde ein aktiviertes ET-System nachgewiesen [Angerio, 2006; Lariviere et Lebel, 2003]. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Blockade von ET nephroprotektiv wirkt. Experimente zeigen dementsprechend, dass ET_A-Rezeptorantagonisten die renale Gefäß- und Gewebeschädigung bei einigen Nierenerkrankungen vermindern. Diese Substanzen bieten sich somit als nephroprotektive und antihypertensive Medikamente an. Die Wirksamkeit der ET-Rezeptorantagonisten für diese Indikationen wurde jedoch bisher noch nicht am Menschen erprobt [Angerio, 2006; Lariviere et Lebel, 2003; Susic, 2000].

Bei den oben genannten Erkrankungen können die Effekte des ET-Systems auch an transgenen Tiermodellen genauer beobachtet werden. Durch gezielte genetische Veränderungen einzelner Elemente des ET-Systems der transgenen Tiere werden so Einblicke in die spezielle Funktion des ET im komplexen Organismus möglich. Bei ET-1-transgenen Mäusen wird beispielsweise ET-1 verstärkt gebildet. Die ET-1-Überexpression speziell in der Niere führt zu charakteristischen Veränderungen der Nierenhistologie. ET-1 induziert bei diesen Tieren altersabhängig eine interstitielle Fibrose. Darüber hinaus ruft die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate eine Glomerulosklerose hervor. Ebenso bilden sich bei ET-1-transgenen Mäusen vermehrt renale Zysten [Hoher et al., 2000, 1997b].

1.4 Wechselwirkungen zwischen ET-1 und NO

NO ist der physiologische Gegenspieler von ET-1 und zeigt sich als der bedeutendste physiologische Inhibitor der ET-1-Synthese. NO hemmt in den Endothelzellen die Bildung der ET-1-Vorstufe präpro-ET-1-mRNA während der Transkription über seinen second messenger cGMP. Ferner bewirkt NO die Dissoziation des ET-1 vom Rezeptor und ist somit in der Lage, die ET-1-Wirkung zu limitieren [Verhaar et al., 1998; Yanagisawa et al., 1988].

ET-1 stimuliert darüber hinaus die eNOS durch Interaktion mit dem endothelialen ET_B-Rezeptor und führt so die Synthese von NO herbei. Die Stimulation des ET_B-Rezeptors durch ET-1 führt zu einer Aktivitätssteigerung der 1,4,5-Triphosphatsynthese über ein G-Protein, wodurch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ansteigt. Dieser Ca²⁺-Anstieg führt zur Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen eNOS und somit zu einem Anstieg der NO-Konzentration. Ebenso vermittelt ET-1 eine Zunahme des endogenen NOS-Inhibitors ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin), welcher wiederum die Bioverfügbarkeit von NO mindert [Kolb-Bachofen et al., 2006].

NO und ET-1 sind somit Komponenten eines lokalen, negativ rückgekoppelten Regelkreises. Die Abbildung 4 verdeutlicht diesen Zusammenhang [Golikorsky et al., 1994; Hirata et al., 1993].

Ein Ungleichgewicht zwischen dem ET-1- und NO-System ruft eine Änderung des Gefäßtonus hervor, wie er bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wird. Eine verminderte Bioverfügbarkeit des NO und eine erhöhte Bioverfügbarkeit von ET-1 finden sich bei vielen Vaskulopathien. Dies illustriert die negative Rückkopplung zwischen dem NO- und ET-1-System. Die richtige Balance zwischen der NO- und ET-1-Produktion ist dadurch für die Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase und der Verhütung einer endothelialen Dys-

funktion entscheidend. Die endotheliale Dysfunktion stellt einen der frühesten Marker für Gefäßabnormalitäten dar, die sich im Verlauf zu verschiedenen Pathologien der Gefäße entwickeln [Marasciulo et al., 2006; Alonso et al., 2003].

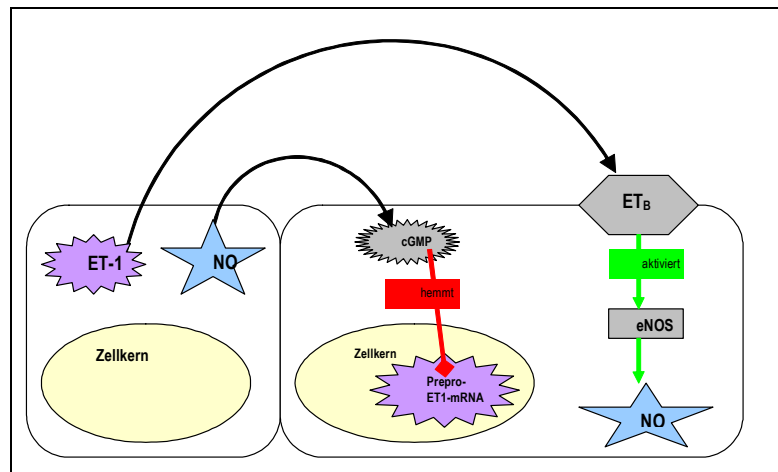


Abbildung 4: ET-1-NO-Regelkreis.

1.5 Das transgene Tiermodell

Ein Ansatz zur genaueren Klärung der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung des ET-Systems ist die Untersuchung von transgenen Tiermodellen. Die transgenen Tiere weisen zu diesem Zweck speziell eine Überexpression oder Defizienz von Elementen des ET-Systems auf [Hochoer et al., 2000].

Bei den transgenen Mäusen in dieser Arbeit handelt es sich um präpro-ET-1-LacZ-transgene Tiere. Im präpro-ET-1-LacZ-transgenen Tiermodell wird die Promotorregion des humanen ET-1-Gens mit dem LacZ-Gen verbunden und die Kombination in das Mäusegenom integriert. Das LacZ-Gen agiert dadurch als Reporter-Gen für die Aktivität des Gens, in das es integriert wurde [Hall et al., 1983; Miller, 1978, 1972], hier das humane präpro-ET-1-Gen. Die eingeschleuste Kombination aus präpro-ET-1-Gen und LacZ-Gen erlaubt dadurch die präzise Lokalisierung der ET-1-Genexpression in einem Zellverband.

Das LacZ-Gen kommt bei Säugern ausschließlich in der Darmflora vor und wird aus E.coli gewonnen. Es wird in transgenen Tiermodellen häufig verwendet, da dessen Produkt ein gebräuchlicher histochemischer Marker ist. Dieses Produkt des Gens ist die β -Galaktosidase, die wiederum das chromogene Substrat Bluo-Gal in einen blauen Farbstoff umwandelt. Die Methode wird Bluo-Gal-Färbung genannt. Es kommt zur Ausfällung blauer intrazellulärer Präzipitate nur in

Zellen, in denen das LacZ-Gen aktiv ist. Im transgenen Tiermodell dieser Arbeit markieren die blauen intrazellulären Präzipitate nach der Bluo-Gal-Färbung den Ort der Genexpression von ET-1 in der Mäuseniere. Sie sind ein Indikator für die Aktivität des an das ET-1-Gen gekoppelten humanen präpro-ET-1-Promotors. Dadurch werden Einblicke in molekulare Mechanismen innerhalb von Gewebestrukturen möglich [Aguzzi et al., 1994].

Die meisten Organismen weisen eine geringe endogene β -Galaktosidaseaktivität auf, die bei niedrigen pH-Werten am aktivsten ist. Um die Aktivität der endogenen β -Galaktosidase im Versuch zu supprimieren, werden Färbungen histologischer Schnitte bei einem pH zwischen 7.5-8.0 durchgeführt [Fire et al., 1992].

Die Abbildung 5 zeigt das histologische Resultat einer ET-1-LacZ-Transgenität nach Bluo-Gal-Färbung, die im Umfeld dieser Arbeit angefertigt wurde. Die Färbung markiert bei einem 16 Tage alten ET-1-LacZ-transgenen Mäuseembryo blau gefärbte Areale. Diese zeigen eine hohe präpro-ET-1-Promotoraktivität in der kraniofazialen Region sowie in Knochen- und Knorpelgewebe des Mäuseembryos während dessen Entwicklung an.



Abbildung 5: Bluo-Gal-Färbung eines ET-1-LacZ-transgenen Mäuseembryo. präpro-ET-1 wird im Knorpel- und Knochengewebe exprimiert.

Das humane ET-1-Gen besteht aus dem präpro-ET-1-Promotor und aus fünf Exons, die über 6836 Basenpaare verteilt sind, wie in Abbildung 6 illustriert wird [Inoue et al., 1989]. Um transgene Mäuse zu erzeugen, die das LacZ-Gen als bakterielles β -Galaktosidase-Gen mit Reporter-Funktion tragen, wird das LacZ-Gen in das Exon-1 der humanen präpro-ET-1-cDNA eingeführt.

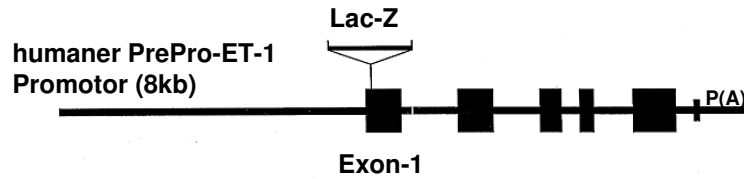


Abbildung 6: Insertionsstelle des LacZ-Reporter-Gens in das Exon-1 der humanen präpro-ET-1-cDNA.

Danach wird eine Mäuseizelle einer NMRI-Maus mit einem Spermium einer NMRI-Maus entsprechend der schematischen Darstellung in Abbildung 7 künstlich befruchtet. NMRI-Mäuse entstammen einem standardisierten Mäusestamm, wie im Kapitel 3.2 ausgeführt wird. In den männlichen Vorkern dieses befruchteten Mäuseeies werden mehrere hundert Kopien der DNA, die das präpro-ET-1-LacZ-cDNA-Konstrukt enthalten, durch Mikroinjektion eingebracht. Im Idealfall kommt es zur zufälligen Integration der cDNA in das Mäusegenom. Die Eizelle wird darauf in den Eileiter einer Ersatzmäusemutter injiziert. Die transgenen Mäuse machen den deutlich geringeren Anteil der Nachkommenschaft aus, da über 90% der Nachkommen nicht-transgene Tiere sind.

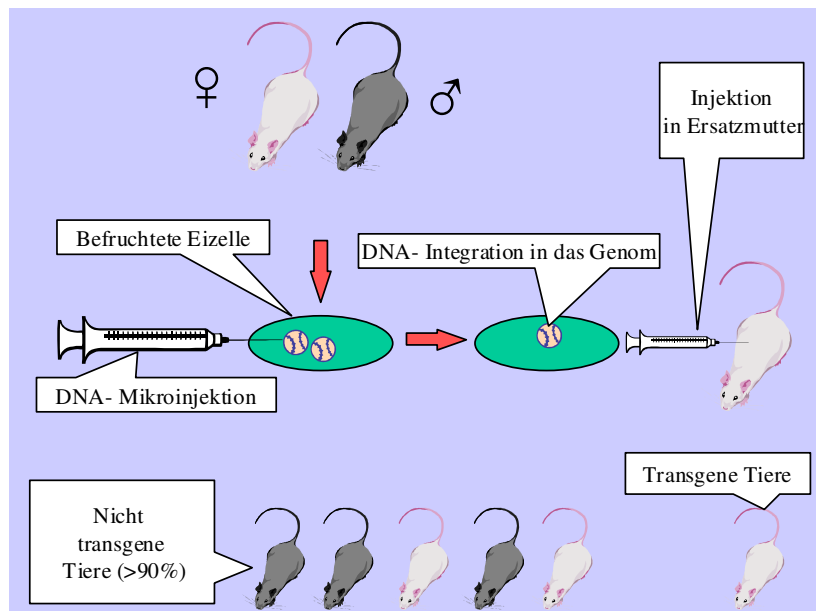


Abbildung 7: Herstellung präpro-ET-1-transgener Mäuse mittels Mikroinjektion von ET-1-LacZ-cDNA.

Im transgenen Mäusemodell dieser Arbeit kommt es zu keiner Überexpression oder Defizienz von ET-1. Der humane präpro-ET-1-Promotor kontrolliert dennoch die Reporter-Genaktivität des LacZ-Gens entsprechend der physiologischen Stimuli für die Produktion von ET-1, dessen Expression in der Folge farblich sichtbar gemacht werden kann.

Dieses Vorgehen entfernt nichts vom ursprünglichen Genom der präpro-ET-1-transgenen Mäuse. Es wird lediglich zusätzlich ein verändertes inaktives humanes ET-1-Gen in das Mäusegenom integriert. Darüber hinaus wird bei den Tieren trotzdem ET-1 in der normalen Größenordnung und entsprechend der physiologischen Stimuli exprimiert.

2 Herleitung der Aufgabenstellung

ET-1-Konzentrationsbestimmungen und die Lokalisation hoher ET-1-Konzentrationen im Nierengewebe wurden bereits beschrieben. Um den Herstellungsort von ET-1 in der Niere jedoch genau bestimmen zu können und gleichzeitig Auswirkungen von Regelkreisen auf ET-1 in vivo zu beobachten, bietet sich eine molekulargenetische Markierung einer Struktur an, die abhängig von der Aktivität des für ET-1 kodierenden Gens stimuliert wird. In dieser Arbeit wird deshalb beobachtet, ob die spezifische Markierung des ins Genom integrierten präpro-ET-1-Gens die Lokalisation des Herstellungsorts von ET-1 in der Niere ermöglicht.

Gleichzeitig überprüft diese Arbeit anhand des bekannten ET-1-cGMP-NO-Regelkreises, ob das transgene Konstrukt die Interaktion von ET-1 und NO in vivo an der Mäuseniere korrekt widerspiegelt.

Methodisch bieten sich zur Überprüfung dieser beiden Thesen folgende Vorgehensweisen an:

- Die Expression der ET-1-DNA im Gewebe der Mäuseniere soll durch die Integration eines genetisch markierten humanen ET-1-Promotors ins Mäusegenom ermittelt werden. Sowohl Quantifizierung als auch Lokalisierung erfolgt durch die histochemische Darstellung des Produkts des den ET-1-Promotor markierenden LacZ-Gens im histologischen Schnitt des Nierengewebes.
- Die Konzentrationen von ET-1 in dessen normaler Größenordnung sowie entsprechend der physiologischen und pharmakologischen Stimuli müssen mit der Quantifizierung der LacZ-Präzipitate im Gewebe korrelieren, um die gemeinsame Aktivitätskontrolle der LacZ-Markierung sowie der ET-1-Expression zu belegen. Die Konzentration von ET-1 wird deshalb unabhängig von dessen Herstellungsort in der Mäuseniere durch einen immunhistochemischen Nachweis direkt bestimmt und die Korrelation überprüft.
- Die ET-1-Expression in der Mäuseniere wird durch die pharmakologische Blockade der NO-Synthese mit dem nicht-selektiven Inhibitor der NO-Synthasen L-NAME variiert. Die Korrelation der resultierenden Variationen der ET-1-Konzentration und der entsprechenden Variation der LacZ-Präzipitate wird überprüft.
- Zur Kontrolle eines Einflusses der den ET-1-Promotor markierenden LacZ-DNA auf den Phänotyp der transgenen Mäuse werden physiologische und histologische Parameter mit einem nichttransgenen Wildtyp des gleichen genetischen Backgrounds verglichen.

Die Fragestellung kann deshalb folgendermaßen differenziert werden:

1. Lässt sich die Aktivität des eingefügten humanen ET-1-Promotors im Nierengewebe einer präpro-ET-1-LacZ-transgenen Maus histologisch darstellen?
2. Spiegelt die histologische Darstellung des humanen ET-1-Promotors die Expression des ET-1-Gens der Maus wieder?
3. Ändert die Insertion des Transgens den Phänotyp der Maus?
4. Lässt sich in vivo die Regulation von ET-1 durch NO in der Mäuseniere durch präpro-ET-1-LacZ-DNA sichtbar machen?
5. In welchen Gewebestrukturen der Mäuseniere wird ET-1 exprimiert?

Der Versuchsablauf dieser Arbeit wird in der Abbildung 8 schematisch dargestellt.

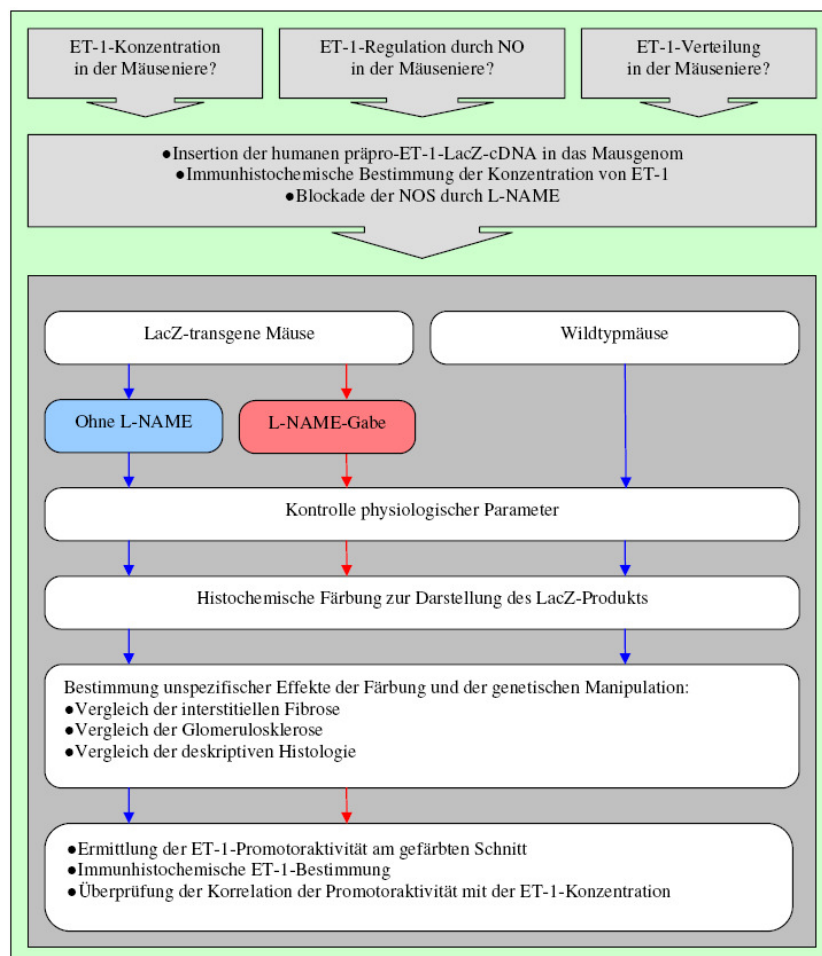


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

3 Material und Methoden

In der Herleitung der Fragestellung werden fünf Fragen definiert. Der in der Abbildung 8 skizzierte systematische Weg zu deren Beantwortung wird im Folgenden dargestellt.

3.1 Materialien

Zur Durchführung der Versuche zeigen die folgenden Tabellen die notwendigen Materialien. In Tabelle 1 werden sämtliche Geräte differenziert. Tabelle 2 beschreibt alle angewandten Chemikalien. In Tabelle 3 werden alle Verbrauchsmaterialien benannt. Tabelle 4 bezeichnet die verwendete Software.

Tabelle 1: Geräte.

Gerät	Typ und Hersteller
Kühlzentrifuge	Beckmann CEN J2-21, BECKMANN Instruments, USA
Homogenisator	Dounce- mit Glaspistill, BRAUN KG, Melsungen
Histokinette	TP 1020, LEICA, Nußloch
Humane ET-1-Mikrotiterplatte	TiterZyme® EIA Kit, IMMUNDIAGNOSTIK AG, Bensheim
Infrarotlampe	Infraphil, PHILIPS AG, Niederlande
Kamera	Olympus c-34AD-4 PM 10 ADS, OLYMPUS, Japan
Kunststoffeinmalgefäße	GREINER; BAXTER; BRAND; NUNC
Mikroskope	BH2, OLYMPUS, Hamburg
Mikrotom	Jung RM 2025, LEICA, Nußloch
Blutdruckverstärker	ML117 BP Amp, ADINSTRUMENTS, Hastings, Großbritannien
Operationsinstrumente	AESFULAP AG, Tuttlingen
Operationsmikroskop	ZEISS AG, Stuttgart
Polyethylenschlauch PE 50	PORTEX, Kent, Großbritannien
Photometer	Eppendorf 1101 M, EPPENDORF GmbH, Hamburg
Polytron	R Typ PT 10 20 3500, KINEMATICA GmbH, Luzern, Schweiz
Scanner	Snapscan, AGFA, Ludwigshafen
Stoffwechselkäfige für Mäuse	SCHERING, Berlin
Teflonkatheter 0,30 mm	KRONLAB, Sinsheim
Tischzentrifuge	Biofuge 13, HERAEUS, Berlin
Tissue Tek Unikassetten	LEICA, Nußloch
Blutdruckabnehmer	Transpac blood pressure transducer, ABBOTT, Sligo, Irland
Varipetten	EPPENDORF GmbH, Hamburg

Tabelle 2: Chemikalien.

Chemikalie	Typ und Hersteller
Bluo-Gal-Färbung	SIGMA-ALDRICH Handels-GmbH, München
Corbitbalsam	HECHT, Kiel-Hassee
Feinchemikalien	MERCK, Darmstadt, BOEHRINGER, Mannheim, ROTH & SIGMA, München
ELISA-Chemikalien	<i>TiterZyme @ EIA Kit</i> , IMMUNDIAGNOSTIK AG, Bensheim
Ketamin	Ketanest 10%®, PARKER DAVIS, München
L-NAME	L-Nitroarginin-Methyl-Ester, MERCK KGaA, Darmstadt
Xylazin	Rompun®, BAYER AG, Leverkusen

Tabelle 3: Materialien.

Material	Typ und Hersteller
Filmmaterial	AGFA, Ludwigshafen
Kunststoffeinmalartikel	GREINER; BAXTER; BRAND; NUNC
Nahtmaterial	ETHICON, Norderstedt
Tierfutter	M-Zucht keimarme Alleindiät für Mäuse, SNIFF Spezialitäten GmbH, Soest

Tabelle 4: Software.

Software	Typ und Hersteller
Bildverarbeitung	PhotoImpact, Version 5.0, Ulead Systems, USA, http://www.ulead.com Photoshop, Adobe Systems Germany, GmbH München, http://www.adobe.com
Datenerfassung	PowerLab/4sp, ADINSTRUMENTS, Hastings, Großbritannien
Statistik	SPSS 9.0, SPSS Inc. Chicago, USA, www.spss.com

3.2 Versuchstiere

Alle 68 Tiere dieser Versuchsreihen sind bei der Organentnahme zehn Monate alt und haben den gleichen genetischen Background (NMRI-Mäuse). Bei den NMRI-Mäusen handelt es sich um einen Zuchtstamm der Hausmaus, dessen Abkürzung für die Herkunft aus dem *Naval Medical Research Institute* steht [<http://www.nmrc.navy.mil/>]. Sie teilen sich in drei Gruppen auf:

- transgen nicht mit L-NAME behandelt
- transgen mit L-NAME behandelt
- nicht transgener Wildtyp, Kontrollgruppe

Die präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuse wurden für diese Arbeit mittels Mikroinjektion eines humanen linearen genomischen DNA-Fragmentes nach der Methode von Theuring und Aguzzi

erzeugt [Aguzzi et al., 1994; Theuring et al., 1990, 1989]. Die Testung des Transgenstatus der Mäuse erfolgt aus Schwanzbiopsien mittels Southern-Blot und PCR-Analysen mit human-ET-1-spezifischen Primern im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Theuring vor der Übernahme der Tiere durch unsere Arbeitsgruppe.

Für die Versuche dieser Arbeit erhalten sechs männliche und sechs weibliche heterozygote ET-1-LacZ-transgene Mäuse 12 Stunden vor der Organentnahme einmalig intraperitoneal 25mg/kg KG L-NAME, um Auswirkungen von L-NAME zu untersuchen. Fünf weibliche und fünf männliche heterozygote ET-1-LacZ-transgene Mäuse erhalten als Kontrollgruppe kein L-NAME.

Bei 12 weiteren ET-1-LacZ-transgenen Mäusen wird die Blutdruckrelevanz vor und nach einer Einmalgabe von 25mg/kg KG L-NAME intraperitoneal durch eine schwanzplethysmographische Blutdruckmessung überprüft.

Zusätzlich werden für die immunhistologische Auswertung der ET-1-Gewebekonzentration in den Nieren weitere 12 ET-1-LacZ-transgene, unbehandelte Mäuse sowie 12 ET-1-LacZ-transgene Mäuse, die einmalig 25mg/kg KG L-NAME intraperitoneal erhalten, gezüchtet.

Die Kontrollgruppe besteht aus fünf männlichen und fünf weiblichen nichttransgenen Wildtypmäusen.

Die Haltung der transgenen Mäuse und der Kontrollmäuse erfolgt in Gruppen von vier bis fünf Mäusen in Käfigen. Alle Tiere werden unter kontrollierten Umgebungsbedingungen mit 20°C Temperatur, 46% Luftfeuchtigkeit und einem Tag-Nachtzyklus von je 12 Stunden gehalten. Die Tiere haben freien Zugang zu Wasser und einer Standardmausdiät. In regelmäßigen Abständen werden alle Mäuse gewogen und die Ergebnisse dokumentiert.

Alle Tierexperimente werden nach den geltenden Richtlinien zum Schutz und der Nutzung von Labortieren durchgeführt.

3.3 Physiologische Methoden

Zur Blutdruckmessung werden in dieser Arbeit zwei unabhängige Methoden verwendet. Die invasive Blutdruckmessung erfolgt bei jenen Tieren, die histologisch untersucht werden, intravaskulär durch zwei Katheter in der *A. carotis* und der *V. jugularis int.*. Der hämodynamische Effekt von L-NAME muss jedoch mit einem Leerwert verglichen werden. Die Blutdruckmes-

sung kann deshalb bei diesen Tieren nur nichtinvasiv überprüft werden. Dies erfolgt durch eine schwanzplethysmographische Blutdruckmessung. Hierfür werden 12 weitere transgene Mäuse verwandt.

3.3.1 Invasive Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks

Aufgrund der ausreichenden statistischen Aussagekraft wird die aufwändige invasive Messung des arteriellen Blutdrucks nur an fünf der zwölf ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäuse und an fünf der zehn Wildtypmäuse durchgeführt. Die Messung des arteriellen Blutdrucks erfolgt modifiziert nach Welch und Wende [Welch et al., 1995; Wende et al., 1993].

Die Implantation der intravaskulären Katheter und die hämodynamischen Messungen erfolgen in Narkose. Während der Implantation und der nachfolgenden Messung liegen die Tiere auf einer Wärmeplatte, um eine Konstanthaltung der Körpertemperatur sicherzustellen. Sie bekommen während des gesamten Versuches eine 0,9%ige NaCl-Infusion (2,4 ml/h pro 100g KG) und erhalten alle eine Trachealkanüle, um eine ausreichende Oxygenierung der Tiere zu gewährleisten.

Die Tiere werden durch intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin narkotisiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wird alle 30 min 50mg/kg Körpergewicht Ketamin intraperitoneal injiziert. Die narkotisierten Tiere werden rasiert und desinfiziert. Die Haut wird mit einem ungefähr 1 cm langen axialen Schnitt lateral der *A. carotis dexter* eröffnet. Die *A. carotis* und die *V. jugularis int.* werden stumpf präpariert. Die *A. carotis* wird über eine Länge von 0,5 cm unter Schonung des *N. vagus* mobilisiert. Die Arterie wird daraufhin mit zwei Fäden angeschlossen und distal ligiert. Das Gefäß wird im spitzen Winkel zur Gefäßachse eröffnet und der Teflonkatheter mit einer Gefäßpinzette ungefähr einen Zentimeter nach proximal in die Arterie vorgeschoben. Der proximale Faden wird dann vorsichtig um den in der Arterie liegenden Katheter geknotet. Die *V. jugularis int.* wird distal abgeklemmt und die Vene eröffnet. Ein zweiter mit heparinierter 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllter Teflonkatheter wird in die Vene vorgeschoben und die Eintrittsöffnung mit Klebstoff (*Pattex Blitz-Gel*) verschlossen. Damit wird gleichzeitig der Katheter fixiert. Danach wird der Blutfluss in der Vene wieder freigegeben. Der venöse Katheter wird mit einer Mikrospritze verbunden und entlüftet. Nach dem Legen der Katheter wird bei jeder Messung der Blutdruck über eine Stunde registriert und dokumentiert.

Zur Messung wird ein Polyethylenkatheter (ID 0,58 mm; AD 0,96 mm) von ungefähr 15 cm Länge über einen Teflonkatheter (ID 0,3 mm; AD 0,6 mm) geschoben. Der so konstruierte

Schlauch wird mit heparinierter physiologischer Kochsalzlösung (25000 IE *Liquemin*/l NaCl 0,9%) gefüllt und auf Dichtigkeit geprüft.

Der Schlauch wird mit einem *Transpac*-Druckaufnehmer verbunden. Das Signal des Druckaufnehmers wird über einen *ML 117 BP Amp*-Verstärker geleitet und mit der *PowerLab/4sp*-Software registriert. Das digitale Signal wird mit Hilfe des Programms *Chart 4.0 für Windows* von *ADInstruments* weiter bearbeitet. Der gemessene arterielle Blutdruck wird mit einer Frequenz von 1000 Hz registriert und gespeichert.

Ein zweiter Katheter wird auf die oben beschriebene Weise vorbereitet und mit einer Mikrospritze verbunden. Mit dem Programm *Chart 4.0* wird der mittlere arterielle Blutdruck als zyklischer Mittelwert aus der Blutdruckkurve errechnet. Mit Hilfe des Programms werden auch der systolische Blutdruck und der diastolische Blutdruck, als zyklisches Maximum bzw. Minimum der Blutdruckkurve sowie die Pulsfrequenz ermittelt.

3.3.2 Schwanzplethysmographische Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks

Zur Analyse der Blutdruckrelevanz einer Einmalgabe von L-NAME werden zwölf transgene Mäuse vor und nach pharmakologischer Blockade des NO-Systems durch L-NAME untersucht. Die Messung wird nach dem Prinzip der Schwanzplethysmographie mit dem *NIBP CONTROLLER* von *POWER LAB/4 SP* durchgeführt [Byrom et Wilson, 1938].

Zur Messung werden zwölf ET-1-LacZ-transgene, unbehandelte Mäuse einzeln in einen Messkäfig gesetzt, aus dem der Schwanz vollständig herausragt. Anschließend wird der Messkäfig abgedeckt, um möglichst jede Art der Aufregung von den Tieren fern zu halten. Über den Schwanz wird die Blutdruckmanschette mit einem Druckabnehmer gezogen. In drei Sitzungen werden die Tiere zunächst an die Messapparatur gewöhnt. Für die hämodynamischen Messungen wird der Messkäfig mit einem Infrarotstrahler erwärmt. Nach 15 min wird die Blutdruckmessung an der Schwanzarterie der jeweiligen Maus begonnen. Um einen zuverlässigen Blutdruckwert zu erhalten, werden pro Maus drei Messungen an drei verschiedenen Messtagen vorgenommen und der jeweilige Blutdruckmittelwert errechnet. Danach erhalten diese Mäuse einmalig intraperitoneal 25 mg/kg L-NAME. Nach 12 Stunden erfolgen erneute hämodynamische Messungen.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Organentnahme

Vor der Organentnahme werden alle Mäuse, die histologisch untersucht werden sollen, gewogen und narkotisiert. Als Narkosemittel werden 16 mg/kg Körpergewicht Rompun und 80 mg/kg Körpergewicht Ketamin intraperitoneal verabreicht.

Den narkotisierten Mäusen wird Blut durch Punktion des Herzens abgenommen. Das Blut wird bei 4°C mit 4000 UpM 15 min in der Beckmann Kühlzentrifuge zentrifugiert und das Plasma abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt. Das Serum wird mit Hilfe eines Autoanalyzers auf wichtige Metabolite hin analysiert.

Beide Nieren werden präpariert und entnommen. Danach erfolgt die Tötung der Mäuse durch Dekapitation. Die Nierenkapseln werden entfernt. Die entnommenen Nieren werden in 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und gewogen.

Alle Nieren der ET-1-LacZ-transgenen Tiere und die Nieren von zwei Mäusen der Kontrollgruppe werden wie unter 3.4.2 beschrieben mit der Bluo-Gal-Färbung gefärbt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Später werden die Organe nach Halbierung entlang ihrer Längsebene in 4%igem Formalin fixiert, was das Auftreten postmortaler Veränderungen im Nierengewebe verhindert. Formaldehyd führt dabei durch Bildung von Methylenbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine zur Vernetzung der Eiweiße. Das Formalin wird nach 24h und 48h erneuert.

3.4.2 Bluo-Gal-Färbung

Die frischen Organe werden en bloc mit der Bluo-Gal-Technik gefärbt. Die Bluo-Gal-Färbung zeigt die unter 1.5 beschriebene β -Galaktosidaseaktivität in den Nierenpräparaten. Sie wird nach der von Theuring und Aguzzi publizierten Methode an den Organen aller ET-1-LacZ-transgenen Tiere nach der Organentnahme durchgeführt. Um eine unspezifische β -Galaktosidaseaktivität der Nierenpräparate auszuschließen, erfolgt zusätzlich die Bluo-Gal-Färbung an Nieren zweier nichttransgener Kontrollmäuse [Theuring et al., 1995; Aguzzi et al., 1994].

Die β -Galaktosidaseaktivität wird in der Bluo-Gal-Färbung (5-bromo-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid) durch blaue Präzipitate dargestellt. Für die Bluo-Gal-Färbung werden die Nieren eine Stunde bei 4°C in einer PBS-Lösung (1,9 mM NaH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄; 154

mM NaCl), die zusätzlich 1% Formalin, 0,2% Glutaraldehyd und 0,02% Nonidet P40 enthält, fixiert. Danach werden die Organe zweimalig in PBS gewaschen und für 24 Stunden bei 31°C in einer PBS-Lösung unter Zusatz von 3,1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 3,1 mM $K_4Fe(CN)_6$, 1 mM $MgCl_2$ und 0,05 M Bluo-Gal gefärbt. Nach einer erneuten zweimaligen Waschung in PBS werden die Nieren in PBS mit Zusatz von 4%igem Formalin fixiert.

3.4.3 Paraffineinbettung

Um für die histologische Auswertung möglichst dünne Gewebeschnitte herstellen zu können, werden die Organe eingebettet. Die Einbettung der Nierenhälften in Paraffin erfolgt automatisiert in einer *Histokinette*. Beim Einbetten durchtränkt das zunächst flüssige Paraffin das Gewebe vollständig und wird beim Abkühlen so fest, dass Paraffin und Gewebe gemeinsam am Mikrotom schneidbar werden.

Durch die *Histokinette* werden die Nierenhälften für je eine Stunde in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 2 x 96% und 3 x 100% Ethanol) entwässert. Zur erfolgreichen Einbettung in Paraffin ist jedoch die Entfernung des Ethanols notwendig, da Alkohol sich nicht mit Paraffin verbindet. Hierzu werden die Präparate nach der Entwässerung für vier Stunden in Xylol gegeben, das sich sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin mischt. Das Xylol verdrängt das Ethanol aus den Organen. In acht Stunden wird das Xylol zweimal erneuert. Die Präparate werden daraufhin bei 56°C zweimal für je eine Stunde in geschmolzenes Paraffin gegeben. Zusätzlich werden die Nieren nach ungefähr 12 Stunden in *Tissue Tek Unikassetten* mit 56°C warmem Paraffin übergossen. Nach Erkalten des Paraffins werden am Mikrotom histologische Schnitte des Präparats angefertigt.

3.4.4 Organblockbilder

Die Oberfläche der halbierten eingebetteten Organe wird frisch angeschnitten und eingescannt. Aus Organen der Kontrollgruppe, der transgenen unbehandelten Gruppe und der transgenen L-NAME Gruppe wird je ein Organblockbild im *Photo Impact* Bildverarbeitungsprogramm erstellt, um die β -Galaktosidaseaktivität optisch darzustellen.

3.4.5 Grauwertauswertung und Farbauswertung

Nach dem Einscannen der Nierenhälften werden von allen Organblockbildern der transgenen Mäuse zur groben Differenzierung Schwarz-Weiß-Kontrastanalysen in der *Photoshop*-Software vorgenommen. Dabei wird der durchschnittliche Grauwert der Darstellung der Nierenhälften in

einer Graustufenskala mit 256 Stufen erhoben und verglichen. Da die Organe nach der Bluo-Gal-Färbung eine Blaufärbung aufweisen, erfolgt in *Photoshop* ein Vergleich der blau gefärbten Areale innerhalb der Darstellung. Dazu wird die Häufigkeit blauer Areale in der jeweiligen Nierenhälfte anhand der Farbintensität im blauen Spektrum ermittelt.

Pro Nierenhälfte werden drei Messungen des Schwarz-Weiß-Kontrasts und drei Messungen der Farbintensität im blauen Spektrum ohne Kenntnis der Organgruppenzugehörigkeit durchgeführt. Die Messergebnisse werden mit Hilfe des Programms *SPSS 9.0* für Windows statistisch ausgewertet.

3.4.6 Anfertigung der histologischen Schnitte

Um eine bessere Haftung des Gewebes auf den Objektträgern zu erreichen, werden diese silanisiert. Dazu erhalten die Objektträger eine Schicht aus Alkylgruppen, die später eine kovalente Verbindung mit dem Gewebe eingehen können. Pro Hellendahl-Küvette werden 18 Objektträger fünf Minuten in 100%igem Aceton entfettet, weitere fünf Minuten in eine 2%ige 3-Aminotriethoxysilan[APES]/Aceton-Lösung getaucht (4ml APES in 200 ml Aceton) und kurz in Aqua bidest. gespült. Die Küvetten werden mit Folie abgedeckt und über Nacht luftgetrocknet.

Am Mikrotom werden 3 und 5 μm dicke Schnitte aus der Äquatorialebene der Nieren hergestellt, auf die silanisierten Objektträger aufgezogen, auf einer Heizplatte bei 80°C getrocknet, beschriftet und, wie unter Punkt 3.4.7 beschrieben, weiterverarbeitet.

3.4.7 Gegenfärbungen

Zur weiteren Differenzierung wird das Gewebe nach dem histologischen Schnitt einer Sirius-Red-, PAS- oder HE-Färbung unterzogen.

Die **Sirius-Red-Färbung** stellt sowohl die blauen Präzipitate der β -Galaktosidaseaktivität als auch das Kollagen der interstitiellen Fibrose in den histologischen Schnitten kontrastreich dar. Sirius-Red ist ein anionischer Farbstoff, der auf Grund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt. Diese Färbung wird nach der in Tabelle 6 von Junquera publizierten Methode mit den Lösungen der Tabelle 5 durchgeführt [**Junquera et al., 1979**]. Die Färbung erfolgt an Schnitten der transgenen unbehandelten Tiere, der transgenen L-NAME Mäuse und der Tiere der Kontrollgruppe.

Tabelle 5: Lösungen zur Sirius-Red-Färbung.

Lösung	Konzentration
Aqua destillata	
Ethanol	70%, 80%, 96% und 100%
Xylol	100%
HCL	0,01 N
Pikrinsäure	30-40 g/l, 25-30 g/l
Sirius-Red-Lösung	0,1%

Zur Herstellung der 0,1%igen Sirius-Red-Lösung werden 30-40g Pikrinsäure mit 1000ml heißem Aqua dest. und 25-30g Pikrinsäure mit 1000ml kaltem Aqua dest. versetzt. Die Lösung wird vor dem weiteren Gebrauch gemischt und filtriert. 0,1g des so gewonnenen Sirius-Red-Farbstoffes werden in 100 ml Pikrinsäure gelöst, filtriert und der pH auf 2.0 titriert.

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgt in Xylol mit anschließender Spülung in einer absteigenden Alkoholreihe. Danach werden die Schnitte in Aqua bidest gewaschen, mit Sirius-Red in gesättigter wässriger Pikrinsäure gefärbt, in HCL gesäuert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zuletzt wird in Xylol gespült. Danach wird auf die Präparate mit Corbitbalsam ein Deckgläschen aufgeklebt.

Tabelle 6: Arbeitsschritte der Sirius-Red-Färbung.

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
1	Xylol	2x10 min
2	Ethanol (100%, 96%, 80%, 70%)	je 5min
3	Aqua destillata	5 min
4	Sirius-Red 0,1%	60 min
5	HCL 0.01 N	1-2 min
6	Ethanol (70%, 80%, 96%, 100%)	je 5 min
7	Xylol	2x10 min

Durch die **PAS-Färbung** werden die bei der Glomerulosklerose vermehrt vorhandenen Kohlenhydrate im Nierengewebe dargestellt. Die Perjodsäure-Schiff's-Reaktion dieser Färbung markiert Kohlenhydratgruppen durch Spaltung von Kohlenhydraten mit Hilfe der Perjodsäure und teilweiser Umwandlung benachbarter Hydroxyl- zu Aldehyd-Gruppen. Mit dem Schiff'schen Reagenz Leukofuchsin bildet sich daraus ein stabiler roter Farbkomplex. Die Färbung erfolgt an

Schnitten der transgenen unbehandelten Tiere und der Kontrollgruppe nach den in Tabelle 8 genannten Arbeitsschritten mit den in Tabelle 7 genannten Lösungen.

Tabelle 7: Lösungen zur PAS-Färbung.

Lösung	Konzentration / Zusammensetzung
Ethanol	70%, 80%, 96% und 100%
Xylol	100%
Perjodsäure 2% ig	2g kristalline Perjodsäure, 100 ml Aqua dest.
Schiff'sches Reagenz (Merck)	
Sulfitwasser	18 ml 10% Natriumdisulfit, 300 ml Aqua dest., 15 ml 1M HCL
Meyers Hämaunlösung	1g Hämatoxylin, 0,2g Natriumiodat, 50g Kaliumaluminiumsulfat, 1000 ml Aqua dest., 50g Chloralhydrat, 1g kristalline Zitronensäure

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgt in Xylol mit anschließender Spülung in einer absteigenden Alkoholreihe. Danach werden die Schnitte in 2%iger Perjodsäure gefärbt und in Aqua dest. gespült. Nach Inkubation in Schiff'schem-Reagenz erfolgt die Spülung in Sulfitwasser und Leitungswasser. Danach folgt eine Kernfärbung mit Hämaun und eine Spülung unter Leitungswasser. Die Schnitte werden durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Xylol gespült. Danach wird auf die Präparate ein Deckgläschen aufgeklebt.

Tabelle 8: Arbeitsschritte der PAS-Färbung.

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
1	Xylol	2x10 min
2	Ethanol (100%, 96%, 80%, 70%)	je 5 min
3	2% Perjodsäure	10 min
4	Aqua destillata	3x1-2 min
5	Schiff'sches Reagenz	15 min
6	Sulfitwasser	1-2 min
7	Fließendes Leitungswasser	15 min
8	Meyers Hämaun	4 min
9	Fließendes Leitungswasser	10 min
10	Ethanol (70%, 80%, 96%, 100%)	je 3 min
11	Xylol	2x 10 min

Zur qualitativen Auswertung der Nierenhistologie werden **HE-Färbungen** an Schnitten der transgenen unbehandelten Tiere und der Kontrollgruppe nach der Tabelle 10 mit den Lösungen

der Tabelle 9 angefertigt. Die HE-Färbung besteht aus einem basischen Kernfarbstoff wie Aluminiumhämatoxylin oder Eisenhämatoxylin und dem sauren Cytoplasmfarbstoff Eosin.

Tabelle 9: Lösungen zur HE-Färbung.

Lösung	Konzentration / Zusammensetzung
Ethanol	70%, 90%, 100%
Xylol	100%
Meyers Häkalaunlösung	<u>blauviolette Lösung:</u> 1g Hämatoxylin, 0,2g Natriumiodat, 50g Kaliumaluminiumsulfat, 1000ml Aqua dest. <u>rotviolette Lösung:</u> 50g Chloralhydrat, 1g kristalline Zitronensäure zur blauvioletten Lösung
Eosinlösung 1%	1g Eosin in 100 ml Aqua dest.
Eosinfärbelösung	178 ml Ethanol 100%, 2 ml Eisessig, 20 ml Eosinlösung 1%

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgt in Xylol mit anschließender Spülung in einer absteigenden Alkoholreihe. Danach werden die Schnitte in Meyers Häkalaunlösung und in Eosinfärbelösung gefärbt. Anschließend erfolgt die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Zuletzt wird in Xylol gespült. Danach wird auf die Präparate ein Deckgläschen aufgeklebt.

Tabelle 10: Arbeitsschritte der HE-Färbung.

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
1	Xylol	2x10 min
2	Ethanol (100%, 90%, 70%)	je 5 min
3	Meyers Häkalaun	4 min
4	Fließendes Leitungswasser	15 min
5	Eosinfärbelösung	3 min
6	Ethanol (70%, 90%, 100%)	je 3 min
7	Xylol	2x10 min

3.4.8 Bestimmung des Glomeruloskleroseindex

Zur Differenzierung der Glomerulosklerose wird von den Organen der transgenen unbehandelten Tiere und der Kontrolltiere je ein 3µm dicker Paraffinschnitt hergestellt und dieser mit der PAS-Färbung gefärbt.

Das Ausmaß der Glomerulosklerose wird nach dem prozentualen Flächenanteil PAS-positiver Ablagerungen im Glomerulum festgelegt. Die sklerotische Schädigung der glomerulären Kapillaren wird dann semiquantitativ aus dem Schweregrad der Glomerulosklerose nach Tabelle 11

berechnet. Daraus ergibt sich der Glomeruloskleroseindex G entsprechend der von Raij publizierten Methode [Raij et al., 1984].

Tabelle 11: Schweregrad der Glomerulosklerose.

Schweregrad SG	PAS-positive Ablagerungen im Glomerulum
0	0%
1	25%
2	50%
3	75%
4	100%

Pro Nierenschnitt werden bei 320-facher Vergrößerung mindestens 80 Glomerula ausgewertet. Jedem Glomerulum wird der jeweilige Schweregrad der Glomerulosklerose S_G zugeordnet. Der Schweregrad wird mit der Anzahl der betroffenen Glomerula n_S multipliziert und auf die Gesamtzahl der gezählten Glomerula n_{gesamt} bezogen. Man kategorisiert somit die Gewebeschnitte durch den Skleroseindex in Prozent nach der Formel $G = \Sigma(S_G \cdot n_S / n_{\text{gesamt}}) \cdot 100$.

Alle Gewebeschnitte werden auf diese Weise zweimal ohne Kenntnis der Organgruppenzugehörigkeit erfasst und die Gruppen statistisch ausgewertet. Die Präparate werden exemplarisch bei 100-facher Vergrößerung fotografisch dokumentiert.

3.4.9 Analyse der interstitiellen Fibrose

Die interstitielle Fibrose beschreibt die Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes. Das Ausmaß der interstitiellen Fibrose F wird nach dem Flächenanteil vorhandener kollagener Matrix im Gesichtsfeld nach Tabelle 11 semiquantitativ festgelegt.

Für die Analyse der interstitiellen Fibrose wird von den Organen der transgenen unbehandelten Tiere und der Kontrolltiere je ein 3µm dicker Paraffinschnitt hergestellt und mit der Sirius-Red-Färbung gefärbt.

Tabelle 12: Schweregrad der interstitiellen Fibrose.

Schweregrad SF	kollagene Matrix im Gesichtsfeld
0	0%
1	25%
2	50%
3	75%
4	100%

Zur Bestimmung des Anteils an kollagener Matrix werden pro Nierenschnitt 25 Gesichtsfelder aus allen Bereichen des Organquerschnitts standardisiert bei 20-facher Vergrößerung ausgewertet und in die Schweregrade eingeordnet. Der Schweregrad der interstitiellen Fibrose S_F wird nach der Formel $F = \Sigma(S_F \cdot n_S / n_{\text{gesamt}}) \cdot 100$ mit der Anzahl der betroffenen Gesichtsfelder multipliziert und prozentual auf die Gesamtzahl der gezählten Gesichtsfelder bezogen.

Alle Gewebeschnitte werden analog zur Glomeruloskleroseindexbestimmung zweimal ohne Kenntnis der Organgruppenzugehörigkeit erfasst und die Gruppen statistisch ausgewertet. Die Präparate werden für die Dokumentation der Ergebnisse wiederum exemplarisch bei 100-facher Vergrößerung fotografiert.

3.4.10 Auswertung der Promotoraktivität

Die Promotoraktivität des ET-1-LacZ-Gens drückt sich durch die β -Galaktosidaseaktivität aus. Zur Darstellung der β -Galaktosidaseaktivität wird von den Organen der transgenen unbehandelten Tiere und der transgenen L-NAME Tiere je ein 5 μ m dicker Paraffinschnitt hergestellt und mit der Sirius-Red-Färbung gefärbt.

Die β -Galaktosidaseaktivität wird mit dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung durch Auszählung der Menge der blauen Präzipitate in 20 Gesichtsfeldern in Nierenschnitten der transgenen Maus quantifiziert. Zusätzlich erfolgt eine qualitative Differenzierung der β -Galaktosidaseaktivität nach tubulären, glomerulären und vaskulären Strukturen des Nierengewebes.

Von einem Präparat jeder Niere werden 20 Gesichtsfelder aus allen Bereichen des Organquerschnitts, ohne Kenntnis der Organgruppenzugehörigkeit, standardisiert am Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

3.4.11 Qualitative Auswertung der Nierenhistologie

Für die qualitative Auswertung der Nierenhistologie der zehn Monate alten Mäuse wird von den Organen der transgenen unbehandelten Tiere und der Kontrolltiere je ein 3µm dicker Paraffinschnitt hergestellt und mit der HE-Färbung gefärbt.

In jedem Präparat werden bei 80-facher Vergrößerung 20 Gesichtsfelder aus allen Bereichen des Organquerschnitts ohne Kenntnis der Organgruppenzugehörigkeit standardisiert auf Zysten, perivaskuläre Infiltrate und perivaskuläre Fibrosezeichen untersucht. Veränderungen werden beschrieben und für die Dokumentation der Ergebnisse exemplarisch bei 100-facher Vergrößerung fotografiert.

Als Zysten werden massiv dilatierte Tubuli oder dilatierte Glomerula definiert. Perivaskuläre Infiltrate zeigen eine aktive Entzündungsreaktion. Die perivaskuläre Fibrose zeigt eine narbige Veränderung nach einer abgelaufenen Entzündung.

3.5 Immundiagnostische Methoden

Es werden Organe von 12 ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen sowie von 12 ET-1-LacZ-transgenen Mäusen, die 12 Stunden vor der Organentnahme einmalig 25mg/kg KG L-NAME intraperitoneal erhalten haben, untersucht. In den Nieren erfolgt durch immundiagnostische Methoden die quantitative Bestimmung der ET-1-Konzentration.

3.5.1 Aufarbeitung des Nierengewebes zur Immundiagnostik

Die Gewebeaufarbeitung zur Immundiagnostik wird mit den in Tabelle 13 genannten Materialien nach Bolger durchgeführt [Bolger et al., 1991].

Nach Dekapitation der Mäuse werden die Nieren entnommen, in 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert.

Zur weiteren Aufarbeitung werden die Nieren aufgetaut und mit einem Skalpell zerkleinert. Danach werden die Nieren mit Extraktionspuffer suspendiert. Die Lösung wird anschließend im Polytron durch zehn Hübe mit dem Teflonpistill nach Potter bei 1000 UpM und manuell durch 15 Hübe mit dem L-Pistill nach Dounce homogenisiert. Danach wird die Suspension für 15 min bei 25 000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 250 µl HCl versetzt und anschließend 5 min bei 10 000 UpM und 4°C erneut zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird für die weitere Verarbeitung entnommen und bei -70°C eingefroren.

Tabelle 13: Lösungen der Gewebeextraktion.

Lösungen	Zusammensetzung / Konzentration
Extraktionspuffer	CH ₃ COOH (0,2 mol/l) NaCl (0,5 mol/l), pH 7,2 nach Titration mit HCl 4 ml Extraktionspuffer pro Gramm Nierengewebe
HCl	2 mol/l

3.5.2 ET-1-Konzentrationsbestimmung in Mäusenieren

Mit dem *TiterZyme*[®] *EIA Human Endothelin-1 Enzym-Immuno-metric Assay Kit* (© *Assay Designs Inc.*, im Vertrieb durch *Immundiagnostik AG*, Bensheim) kann analog zu Ergebnissen von Chard eine quantitative Bestimmung der humanen ET-1-Konzentration in biologischen Geweben vorgenommen werden [Chard 1995]. Da ET-1 bei Mäusen und Menschen eine identische Aminosäuresequenz hat, kann das für humanes ET-1 hergestellte *TiterZyme*[®] *EIA Kit* auch bei Mäusen angewandt werden.

In diesem Versuch wird mit dem *TiterZyme*[®] *EIA Kit* entsprechend Tabelle 14 eine ET-1-Konzentrationsbestimmung in Mäusenieren durchgeführt. In dem Kit wird ein polyklonaler Antikörper gegen ET-1 verwendet, der durch eine Trägersubstanz auf einer Mikrotiter-Platte fixiert wird. Der Antikörper bindet unter Hinzugabe einer homogenisierten Gewebeprobe das darin enthaltene ET-1 zu einem Immunkomplex. Nach Inkubation wird der nicht gebundene Überstand der Probe ausgewaschen und ein mit Meerrettichperoxidase markierter polyklonaler Antikörper hinzugegeben. Dieser markierte Antikörper bindet an den Immunkomplex auf der Platte. Nach Inkubation des Gemisches werden nicht gebundene Anteile ausgewaschen.

Die Menge an gebundenem markierten Antikörper ist proportional zur ET-Menge in der Gewebeprobe. Ein chromogenes Substrat im Reaktionsansatz macht nach Inkubation die immunkomplexgebundenen Enzymsubstratkomplexe sichtbar.

Die Farbreaktion wird bei 450nm photometrisch bestimmt. Die im Photometer gemessene Farbentwicklung ist proportional zur Konzentration der in Immunkomplexen gebundenen Markerenzyme in der Probe. Durch den Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivitäten wird die ET-1-Konzentration in der Probe ermittelt.

Tabelle 14: Lösungen und Materialien des *TiterZyme*[®] EIA Kit.

Lösungen und Materialien	Zusammensetzung/ Konzentration
ET-1-Mikrotiterplatte	96 Kammern
Meerrettichperoxidase-markierte Antikörper	1 Ampulle
Probenpufferlösung	30ml
Antikörperverdünnungslösung	10ml
Waschpufferlösung	Puffer-Konzentrat 50ml, 25ml mit 975ml Aqua dest. auffüllen
ET-1-Standardlösung	100 pg humanes ET-1, Mischung mit 500µl Aqua dest.
Substratpufferlösung	5ml
Peroxidase-Lösung	5,5ml 0,01%
Substrattabletten	2 Stück
Stop-Lösung	H ₂ SO ₄ 1N 11ml

Zur Herstellung des ET-1-Vergleichsstandards werden nach Herstelleranleitung 100 pg Endothelin im *TiterZyme*[®] EIA Kit mit 500 µl Aqua dest. gemischt. Die Standardlösung enthält somit eine ET-1-Konzentration von 200 pg/ml. Das Gemisch wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In acht Reagenzgläser werden zur Herstellung einer absteigenden Verdünnungsreihe entsprechend Tabelle 15 je 220 µl der Proben-Pufferlösung pipettiert. Reagenzglas Nr.1 wird mit 220 µl der ET-1-Standardlösung versetzt. Von dieser Lösung werden 220 µl aus dem Reagenzglas Nr.1 in Nr. 2 pipettiert. Diese Prozedur wird bis zum achten Reagenzglas wiederholt. Die Lösungen werden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 15: Konzentrationen der Verdünnungsreihe des ET-1-Standards.

Reagenzglas	Konzentration
Nr.1	100 pg/ml
Nr.2	50 pg/ml
Nr.3	25 pg/ml
Nr.4	12,5 pg/ml
Nr.5	6,25 pg/ml
Nr.6	3,125 pg/ml
Nr.7	1,5625 pg/ml
Nr.8	0,78125 pg/ml

Zur Herstellung der Antikörperlösung wird die Antikörperverdünnungslösung des *TiterZyme*[®] *EIA Kit* mit dem markierten Antikörper versetzt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, vermischt und bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung des chromogenen Substrates werden 2,5 ml Substratpuffer kurz vor der Versuchsdurchführung mit einer mitgelieferten Substrattablette und 2,75 ml Peroxid-Lösung versetzt und gemischt.

Die Versuchsdurchführung erfolgt entsprechend der Herstelleranleitung. Hierzu wird die Mikrotiter-Platte mit je 400 µl Waschpufferlösung pro Vertiefung je zweimal gespült und auf einem Löschpapier abgetropft. Es wird darauf geachtet, dass keine Flüssigkeit in den Vertiefungen zurückbleibt.

100 µl der Probenpufferlösung werden als Leerwert in die erste Vertiefung der Platte pipettiert. 100 µl der ET-1-Standard-Lösungen der Reagenzgläser Nr.1 bis Nr.8 werden in die passenden Vertiefungen pipettiert. 100 µl der homogenisierten klaren Gewebeprobe der Nieren werden in die Vertiefungen pipettiert. Durch vorsichtiges Klopfen der Platte wird der Inhalt vermischt. Die Mikrotiter-Platte wird verschlossen und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

Der Inhalt der Vertiefungen wird geleert und insgesamt siebenmal mit je 400 µl Waschpufferlösung pro Vertiefung gespült und auf einem Löschpapier rückstandsfrei abgetropft. 100 µl des markierten Antikörpers werden in alle Vertiefungen außer der Kontrollprobe pipettiert. Die Mikrotiter-Platte wird verschlossen und bei 37°C für 30 min inkubiert.

Der Inhalt der Vertiefungen wird geleert und insgesamt neunmal mit je 400 µl Waschpufferlösung pro Vertiefung gespült und auf einem Löschpapier abgetropft. 100 µl der Substratlösung werden in jede Vertiefung pipettiert. Die Mikrotiter-Platte wird verschlossen und bei Raumtemperatur für 30 min im Dunkeln inkubiert. Danach werden 100 µl der Stop-Lösung in jede Vertiefung pipettiert.

Mittels photometrischer Bestimmung wird die optische Dichte der Proben bei 450 nm entsprechend der Herstellerangabe ermittelt.

3.6 Bildmaterial

Die Entwicklung der Filme erfolgt im Fotolabor des Universitätsklinikums Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin.

3.7 Statistische Auswertung

Die für die einzelnen Kategorien ermittelten Werte werden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen getestet. Als p angegeben ist die asymptotische Signifikanz. $p < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet. Alle Tests werden mit dem Programm SPSS 9.0 für Windows durchgeführt.

4 Ergebnisse

In der Herleitung der Aufgabenstellung wurden zentrale Fragen definiert, die in dieser Arbeit beantwortet werden. Die Ergebnisse gliedern sich entsprechend der Fragen wie folgt:

- Im ersten Abschnitt werden Resultate präsentiert, die die Darstellbarkeit von ET-1-Herstellungsorten in der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Maus anhand der Aktivität des eingefügten humanen ET-1-Promotors belegen.
- Im Anschluss wird belegt, dass die histologische Darstellung des humanen ET-1-Promotors die Expression des ET-1-Gens der Maus widerspiegelt.
- Im nächsten Abschnitt wird die Überprüfung eines Effekts des transgenen Status auf den Phänotyp der transgenen Maus präsentiert.
- Im darauf folgenden Abschnitt wird gezeigt, wie sich die Regulation von ET-1 durch NO in der Mäuseniere durch den humanen präpro-ET-1-LacZ-Promotor darstellen lässt.
- Im letzten Abschnitt werden die Gewebestrukturen untersucht, in denen der humane ET-1-Promotor in der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuseniere exprimiert wird.

4.1 Nachweis des humanen präpro-ET-1-Promotors durch LacZ-Markierung

Zum Nachweis des humanen präpro-ET-1-Promotors im Nierengewebe der transgenen Maus werden die Produkte der LacZ-Markierung des Promotors histologisch dargestellt. Der Nachweis der Kopplung von LacZ an den hinzugefügten humanen Promotor von ET-1 erfolgt über die Korrelation der histologisch nachweisbaren Präzipitate mit der immunhistochemisch ermittelten ET-1-Konzentration im Nierengewebe. Um eine zufällige Korrelation der histologischen Präzipitate mit der immunhistochemisch ermittelten ET-1-Konzentration auszuschließen, wird die ET-1-Konzentration im Nierengewebe gezielt durch L-NAME-Gabe variiert und der Effekt auf die intrazellulären Präzipitate kontrolliert.

4.1.1 Histologische Darstellung des Produktes der LacZ-Markierung

Durch immunhistochemische Konzentrationsbestimmung kann eine Angabe zur Menge des vorhandenen ET-1 im Nierengewebe und zu dessen Abhängigkeit von der Regulation durch NO gemacht werden. Eine Aussage über die Verteilung von ET-1 in den einzelnen Strukturen der Niere wird jedoch nur durch eine histologische Untersuchung möglich. Dazu muss die Zielstruk-

tur jedoch optisch differenziert werden können. Zu diesem Zweck wird das präpro-ET-1-LacZ-transgene Modell angewandt. Hierbei kann die β -Galaktosidase als Produkt des an den humanen präpro-ET-1-Promotor gekoppelten LacZ-Gens durch Bluo-Gal-Färbung intrazellulär nachgewiesen werden.

4.1.2 Nachweis der humanen präpro-ET-1-Promotoraktivität am Organschnitt

Die in Abbildung 9 gezeigten **Organblockbilder** ermöglichen eine mit bloßem Auge durchführbare Inspektion der Bluo-Gal-Färbung am gesamten Organ. Bei der Kontrollgruppe ohne Integration des humanen präpro-ET-1-Promotors ins Genom erfolgt keine LacZ-Markierung. Am entsprechenden Organanschnitt ist keine Blaufärbung sichtbar. Der Organanschnitt aus der transgenen unbehandelten Gruppe zeigt hingegen eine bläuliche Färbung. Hier wurde das Gen für das Farbenzym LacZ an den präpro-ET-1-Promotor gekoppelt. Im Organanschnitt der Gruppe, in deren Genom das LacZ-Gen eingebaut ist und deren NO-Synthese durch eine einmalige intraperitoneale Gabe von L-NAME geblockt wird, sieht man eine intensivere Blaufärbung als bei den transgenen Mäusen ohne L-NAME-Behandlung.

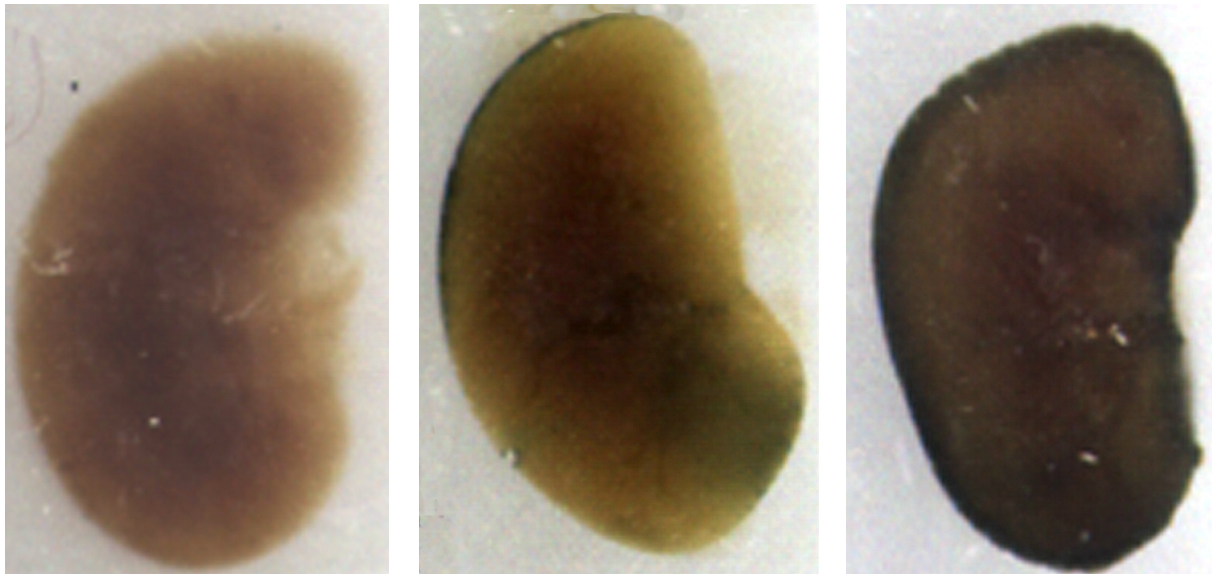


Abbildung 9: Bluo-Gal gefärbte Organanschnitte. Links: Organanschnitt aus der Kontrollgruppe. Mitte: Organanschnitt aus der präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Gruppe. Rechts: Organanschnitt aus der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Gruppe mit L-NAME-Behandlung.

4.1.3 Differenzierung der humanen präpro-ET-1-Promotoraktivität am histologischen Schnitt

Zur differenzierteren Darstellung der β -Galaktosidaseaktivität im Nierengewebe werden **histologische Schnitte** der Bluo-Gal gefärbten Nieren der Sirius-Red-Färbung unterzogen. Die resultierende kontrastreichere Darstellung ermöglicht die spätere histologische Zuordnung der intrazellulären blauen Präzipitate zu den einzelnen Strukturen der Niere, die unter 4.4 vorgenommen wird.

Um eine unspezifische β -Galaktosidaseaktivität der Nierenpräparate auszuschließen, erfolgt als Kontrolle die Bluo-Gal-Färbung von Nieren nicht transgener Wildtypmäuse. Die β -Galaktosidaseaktivität jedes Nierenpräparats wird lichtmikroskopisch an 20 Gesichtsfeldern aus allen Bereichen des Organanschnitts überprüft.

In Abbildung 10 zeigt das linke Foto einen histologischen Sirius-Red-Schnitt aus der Kontrollgruppe ohne blaue Präzipitate. Dagegen wird bei dem histologischen Schnitt im mittleren Foto der Abbildung 10 aus der transgenen unbehandelten Gruppe eine durch intrazelluläre blaue Präzipitate sichtbar gemachte β -Galaktosidaseaktivität nachweisbar. Die höchste β -Galaktosidaseaktivität liegt in der Gruppe der transgenen Mäuse nach L-NAME-Behandlung im rechten Foto der Abbildung 10 vor.

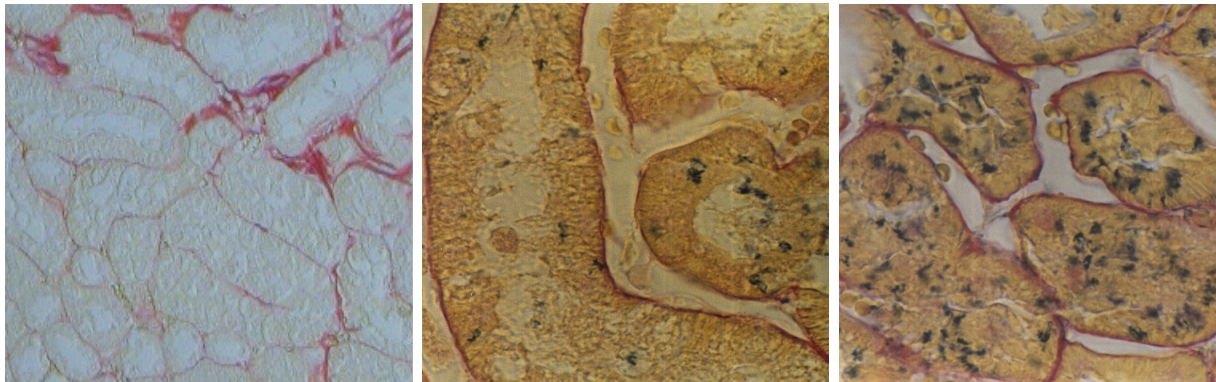


Abbildung 10: Histologische Nierenschnitte nach Sirius-Red-Färbung. Links: Kontrollgruppe ohne blaue Präzipitate. Mitte: präpro-ET-1-LacZ-transgene unbehandelte Gruppe mit vereinzelt blauen Präzipitaten. Rechts: präpro-ET-1-LacZ-transgene mit L-NAME behandelte Gruppe mit zahlreichen blauen Präzipitaten.

Die blauen Präzipitate befinden sich in mehr als 99% der Fälle intrazellulär in Epithelzellen der Tubuli, in den Glomerula und im renalen Gefäßendothel. Ein morphologisches Korrelat für eine Herkunft der extrazellulär vorliegenden Präzipitate aus dem Extrazellulärraum kann nicht gefunden werden. Die wenigen extrazellulär gefundenen Präzipitate lassen sich als Artefakte des histologischen Schnittes und der Färbemethode erklären. Ihr Anteil an der Gesamtzahl der blauen Präzipitate beträgt unter 1%. Sie werden nicht in die Analyse einbezogen.

Da im Wildtyp die LacZ-Markierung fehlt, lässt sich dort auch kein blaues Präzipitat durch das Genprodukt nachweisen. Daher wurde die weitere Untersuchung auf blaue Präzipitate auf die präpro-ET-1-LacZ-transgenen Tiere beschränkt.

4.1.4 Kontrastanalyse und Farbanalyse zur Quantifizierung der Präzipitaddichte

Organblockbilder und histologische Schnitte der präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten und mit L-NAME behandelten Mäuse werden weiter differenziert, um über die Regulation des ET-1-Promotors durch das NO-System zufällige Korrelationen auszuschliessen. Hierzu werden anhand der Organblockbilder nach der Bluo-Gal-Färbung eine Schwarz-Weiß-Kontrastanalyse und eine Auswertung der Intensität des blauen Spektrums vorgenommen. Beide Analysen mitteln das jeweilige Ergebnis über den gesamten Organschnitt.

Anschließend erfolgt im Punkt 4.1.5 eine manuelle Auswertung der β -Galaktosidaseaktivität anhand der mikroskopisch erhobenen Anzahl der blauen Farbkristalle in mit Sirius-Red gefärbten Nierenschnitten.

Die **Schwarz-Weiß-Kontrastanalyse** bei den Organblockschnitten zeigt in Abbildung 11 bei den präpro-ET-1-LacZ-transgenen mit L-NAME behandelten Mäusen im Vergleich zu den präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen eine mit $p = 0,047$ bei männlichen bzw. $p = 0,045$ bei weiblichen Tieren signifikant höhere Einstufung des durchschnittlichen Grauwertes des Organanschnitts innerhalb einer 256-stufigen Graustufenskala.

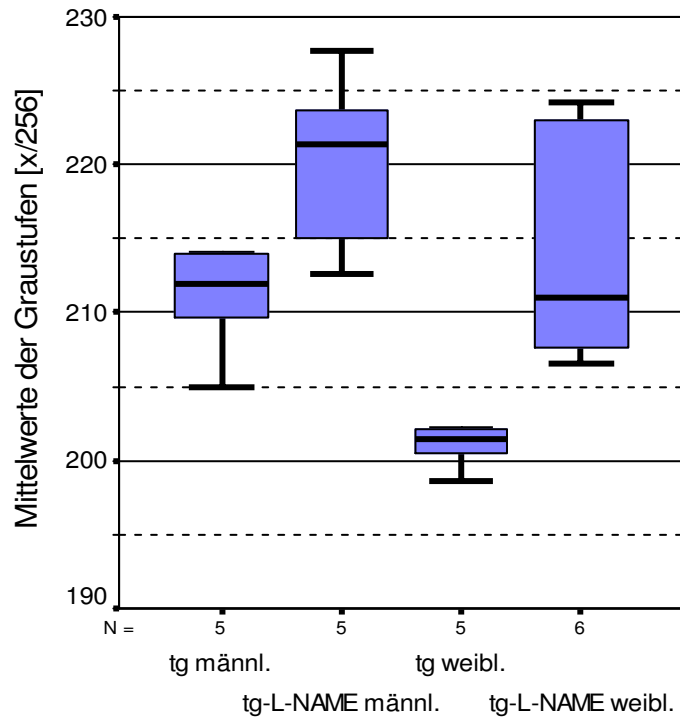


Abbildung 11: Analyse des durchschnittlichen Grauwerts des Organanschnitts innerhalb einer 256-stufigen Graustufenskala bei den präpro-ET-1-LacZ-transgenen (tg) Mäusen mit und ohne L-NAME-Behandlung nach Geschlecht differenziert.

Bei der Auswertung der **Intensität des blauen Spektrums** in Abbildung 12 liegt im Vergleich zu den präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen bei den präpro-ET-1-LacZ-transgenen mit L-NAME behandelten Mäusen eine mit $p = 0,045$ bei männlichen bzw. $p = 0,016$ bei weiblichen Tieren signifikant höhere Intensität des blauen Spektrums in einer 256-stufigen Skala vor.

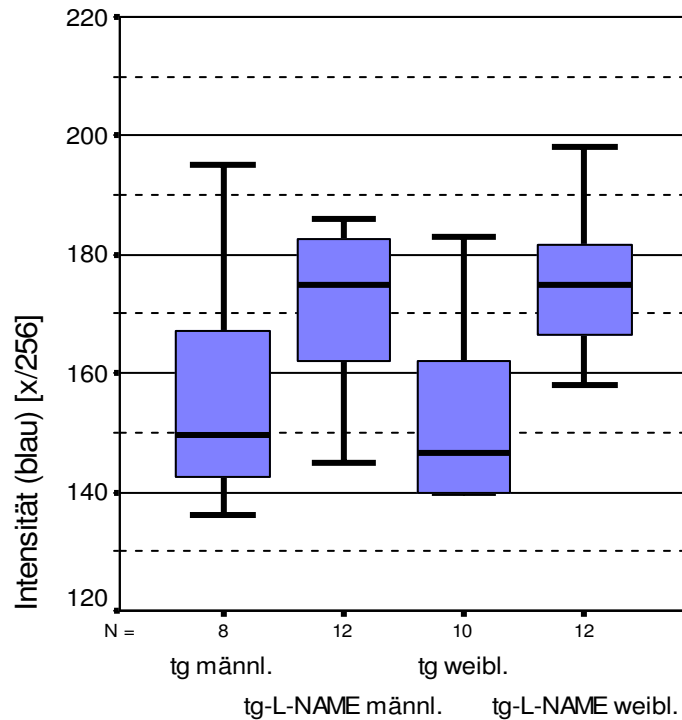


Abbildung 12: Analyse der Intensität im blauen Spektrum am Organanschnitt bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen (tg) mit und ohne L-NAME-Behandlung nach Geschlecht differenziert. Skalierung der Intensität des blauen Spektrums in 256 Stufen.

4.1.5 Manuelle Quantifizierung der Präzipitatdichte

Die differenziertere Auswertung der β -Galaktosidaseaktivität wird anhand der manuellen mikroskopischen Auszählung der Präzipitate in jeweils 20 Gesichtsfeldern aus allen Bereichen der mit Sirius-Red gefärbten **histologischen Nierenschnitte** analog zu Kapitel 3.4.10 durchgeführt. Abbildung 13 zeigt eine mit $p = 0,018$ bei den männlichen und mit $p = 0,045$ bei den weiblichen präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen nach L-NAME-Behandlung signifikant höhere Anzahl der blauen Präzipitate im Gegensatz zu den präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen. Analog hierzu zeigt die Abbildung 10 exemplarisch im rechten Foto der präpro-ET-1-LacZ-transgenen mit L-NAME behandelten Mäuseniere eine höhere Anzahl der blauen intrazellulären Präzipitate im Vergleich zu der präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäuseniere im mittleren Foto.

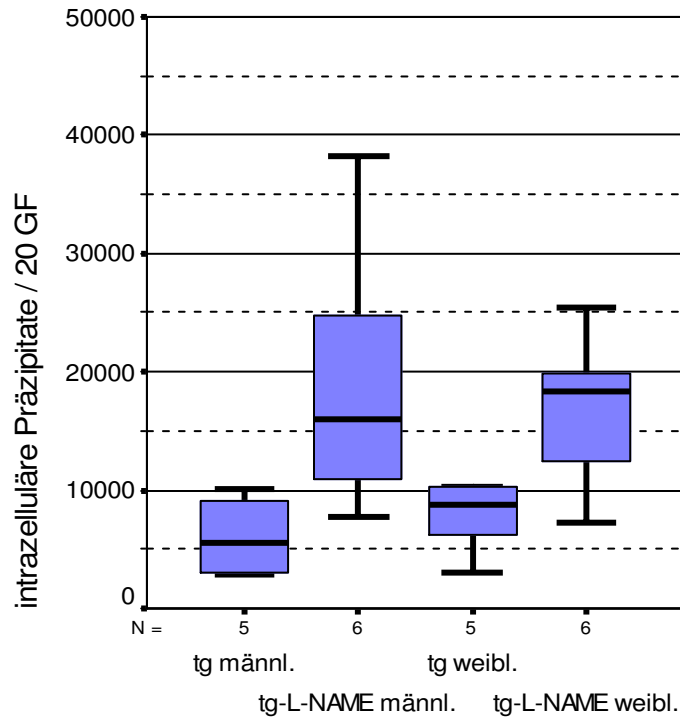


Abbildung 13: Anzahl intrazellulärer Präzipitate in 20 Gesichtsfeldern aus allen Teilen des Organanschnitts bei Nierenschnitten präpro-ET-1-LacZ-transgener Mäuse (tg) mit und ohne L-NAME-Behandlung nach Geschlecht differenziert.

4.1.6 Korrelation der Präzipitardichte mit der ET-1-Gewebekonzentration

Bisher konnte die humane präpro-ET-1-LacZ-Transgenität über die entsprechende Farbreaktion histologisch nachgewiesen werden. Im Folgenden wird die Korrelation der histologischen Merkmale der Transgenität mit der Konzentration von ET-1 im Nierengewebe gezeigt.

Die Konzentration von ET-1 im Nierengewebe der untersuchten Tiere wird mit der unter Kap. 3.5.2 beschriebenen *TiterZyme*[®] EIA mit und ohne Einfluss von L-NAME immunhistochemisch ermittelt.

Die präpro-ET-1-Promotoraktivität wird durch genetische LacZ-Markierung und Bluo-Gal-Färbung histologisch anhand der Auszählung der blauen Präzipitate ermittelt. Bei den transgenen Tieren ohne L-NAME-Behandlung korreliert die Promotoraktivität nach Abbildung 14 signifikant mit der immunhistochemisch bestimmten Konzentration von ET-1-Protein im Nierengewebe mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,918$ und mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit der Korrelation von $p < 0,001$.

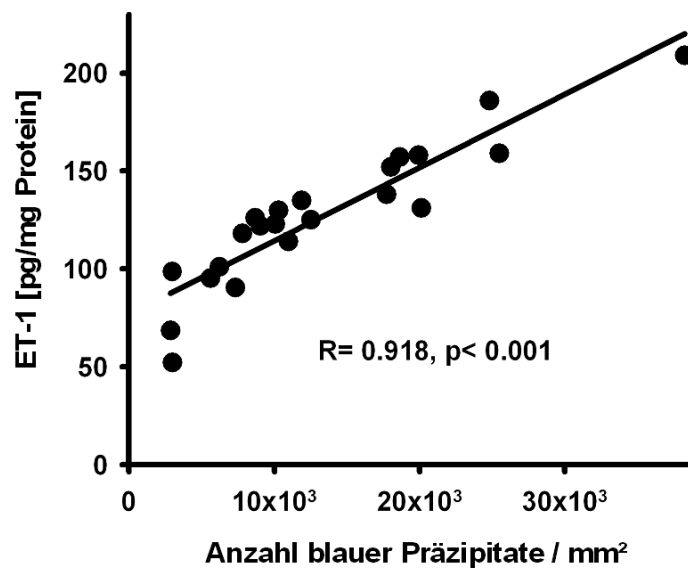


Abbildung 14: Korrelation zwischen der ET-1-Gewebekonzentration und der humanen präpro-ET-1-Promotoraktivität in präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusenieren.

4.2 Reaktion des Phänotyps auf die Transgenität

Um zu klären, ob die Insertion des humanen präpro-ET-1-LacZ-Promotors in das Mäusegenom den Phänotyp der transgenen Mäuse ändert, werden die präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäuse mit den aus dem gleichen genetischen Hintergrund stammenden gleichaltrigen Mäusen der nichttransgenen Kontrollgruppe verglichen.

Als Vergleichsparameter werden Gewicht, Blutbild, Elektrolyte, Nierenretentionsparameter, arterieller Blutdruck, Pulsfrequenz und die Nierenhistologie herangezogen. Zysten, perivaskuläre Infiltrate, perivaskuläre und interstitielle Fibrose sowie Glomerulosklerose dienen als Vergleichsparameter bei der Untersuchung der Nierenhistologie.

Die Abbildung 15 zeigt den **Gewichtsverlauf** der transgenen unbehandelten Mäuse und der Kontrollgruppe für einen Zeitraum von 187 Tagen. Es zeigen sich beim Gewichtsanstieg der Tiere keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die nach dem Geschlecht differenzierten Gewichtsverläufe der präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäuse sowie der nichttransgenen Kontrollmäuse in Abbildung 15 zeigen, dass männliche Tiere im gesamten Verlauf zwar schwerer als weibliche Tiere sind. Ein signifikanter geschlechtsspezifischer Effekt des transgenen Status kann jedoch nicht gezeigt werden.

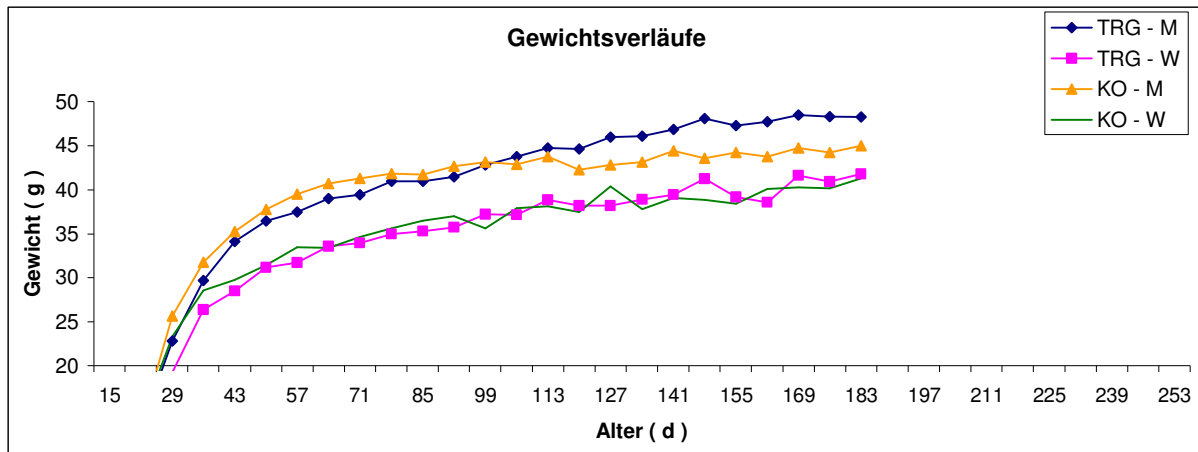


Abbildung 15: Geschlechtsspezifische Gewichtsverläufe der präpro-ET-1-LacZ-transgenen nicht mit L-NAME behandelten Mäuse (TRG-M = transgen männlich, TRG-W = transgen weiblich) und der Mäuse der Kontrollgruppe (KO-M = Kontrolle männlich, KO-W = Kontrolle weiblich).

Das **Blutbild**, die **Elektrolyte** und die **Nierenretentionsparameter** der präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäuse und der nicht transgenen Kontrollmäuse werden entsprechend Tabelle 16 bestimmt. Bei den Blutbildwerten, den Elektrolyten Natrium und Kalium sowie den Nierenretentionsparametern Kreatinin und Harnstoff liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen und den nichttransgenen Kontrollmäusen vor.

Tabelle 16: Geschlechtsunspezifische durchschnittliche (Mean) Laborparameter und deren Standardabweichung (SD) der präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäuse und der nichttransgenen Mäuse.

Laborparameter [Einheit]	präpro-ET-1-LacZ-transgene Mäuse unbehandelt (n=10)		Wildtyp-Mäuse (n= 10)	
	Mean	SD	Mean	SD
<i>Blutbild</i>				
Ery [$10^6/\text{mm}^3$]	9,475	$\pm 0,72$	9,115	$\pm 0,68$
Leuko [$10^3/\text{mm}^3$]	6,915	$\pm 0,66$	6,605	$\pm 0,62$
Hb [g/dl]	8,435	$\pm 0,74$	8,35	$\pm 0,59$
HK [%]	0,46	$\pm 0,05$	0,435	$\pm 0,06$
MCV [fl]	48,78	$\pm 2,78$	47,93	$\pm 3,01$
MCHC [%]	4,52	$\pm 0,33$	4,77	$\pm 0,52$
Thromb [$10^4/\text{mm}^3$]	111,60	$\pm 55,01$	122,35	$\pm 74,45$
<i>Klinische Chemie</i>				
Natrium [mmol/l]	148,00	$\pm 2,58$	147,25	$\pm 6,37$
Kalium [mmol/l]	6,04	n.n	6,3225	n.n
Creatinin [mmol/l]	34,40	$\pm 7,11$	35,25	$\pm 9,34$
Harnstoff [mmol/l]	16,40	$\pm 4,51$	15,04	$\pm 5,77$
Protein [mg/dl]	64,05	$\pm 7,48$	63,25	$\pm 4,66$

Der **arterielle Blutdruck und die Pulsfrequenz** werden entsprechend Punkt 3.3.1 bei jeweils fünf Mäusen der präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Tiere und der nichttransgenen Kontrollgruppe invasiv gemessen und in Tabelle 17 dargestellt. Beim arteriellen Blutdruck liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen und Kontrollmäusen vor.

Tabelle 17: Geschlechtsunspezifische durchschnittliche (Mean) arterielle Blutdrücke und Pulsfrequenz und deren Standardabweichung (SD) von präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Tieren und nichttransgenen Mäusen.

Kreislaufparameter [Einheit]	präpro-ET-1-LacZ-transgene Mäuse unbehandelt (n=5)		Wildtyp-Mäuse (n= 5)	
	Mean	SD	Mean	SD
Arterieller Blutdruck systolisch [mmHg]	126.3	6,5	124.3	7,7
Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]	108.5	n.n	106.2	n.n
Arterieller Blutdruck diastolisch [mmHg]	91.8	8,1	90.7	7,5
Pulsfrequenz [min ⁻¹]	628	38	640	23

Unterschiedliche Schweregrade der interstitiellen Fibrose in der Mäuseniere werden beispielhaft in Abbildung 16 gezeigt. Die **histologische Auswertung des Schweregrades der interstitiellen Fibrose *F*** ergibt bei 10 ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Tieren einen durchschnittlichen Score von 1,76 bei einer Standardabweichung von $\pm 0,14$. Bei 10 nichttransgenen Mäusen ergibt sich hierfür ein durchschnittlicher Score von 1,72 bei einer Standardabweichung von $\pm 0,09$, $p = 0,529$.

Analog hierzu zeigt die Abbildung 17 die grafische Darstellung der histologischen Auswertung. Ein signifikanter Unterschied zwischen den in Kap. 3.4.9 beschriebenen Scores der interstitiellen Fibrose *F* bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen gegenüber den nichttransgenen Mäusen kann nicht gezeigt werden.

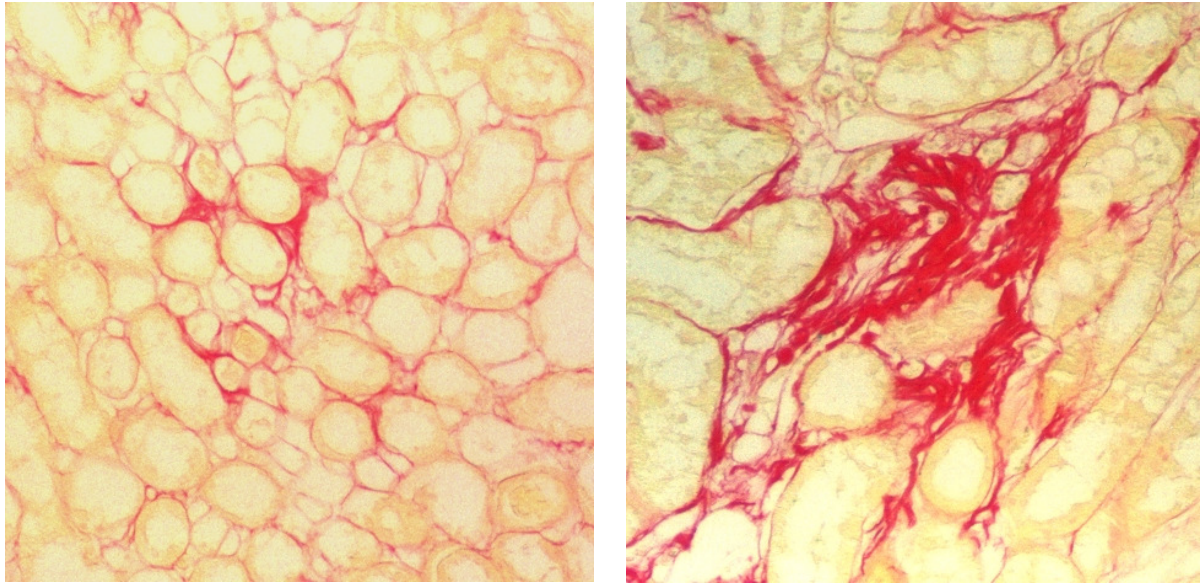


Abbildung 16: Darstellung einer interstitiellen Fibrose in der Mäuseniere mit Schweregrad $F=1$ (links) und $F=4$ (rechts).

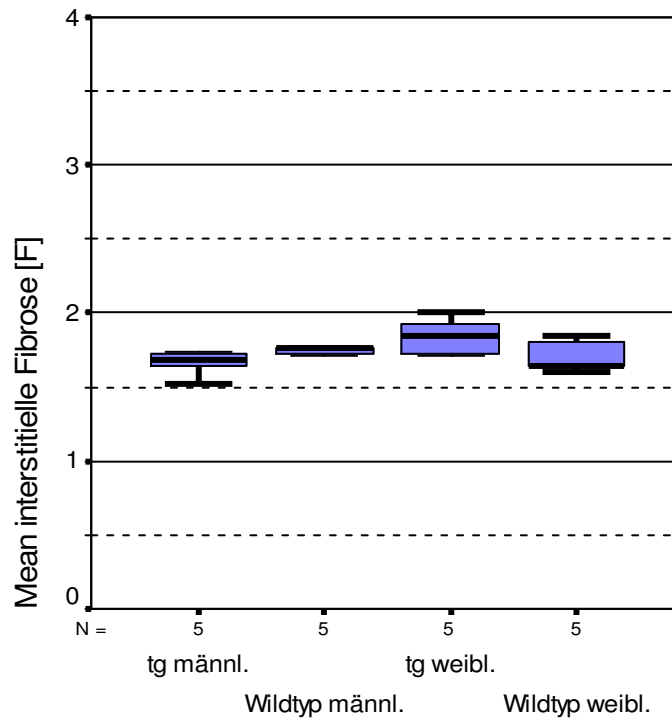


Abbildung 17: Geschlechtsspezifischer Vergleich der interstitiellen Fibrose in Nieren von transgenen unbehandelten Mäusen und nichttransgenen Mäusen.

Die Abbildung 18 zeigt eine beispielhafte Darstellung einer Glomerulosklerose der Mäuseniere in zwei unterschiedlich schweren Ausprägungen. Die im Kapitel 3.4.8 beschriebene **histologische Auswertung der Glomerulosklerose** ergibt für den Grad der Glomerulosklerose G bei 10 präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Tieren einen durchschnittlichen Score von 2,21 bei einer Standardabweichung von $\pm 0,29$. Bei 10 nichttransgenen Mäusen ergibt sich hierfür ein durchschnittlicher Score von 2,16 bei einer Standardabweichung von $\pm 0,23$, $p = 0,631$.

Das Ergebnis der histologischen Auswertung der Glomerulosklerose wird in Abbildung 19 grafisch dargestellt. Zwischen dem in Kap. 3.4.9 beschriebenen Score der Glomerulosklerose G bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen und nichttransgenen Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

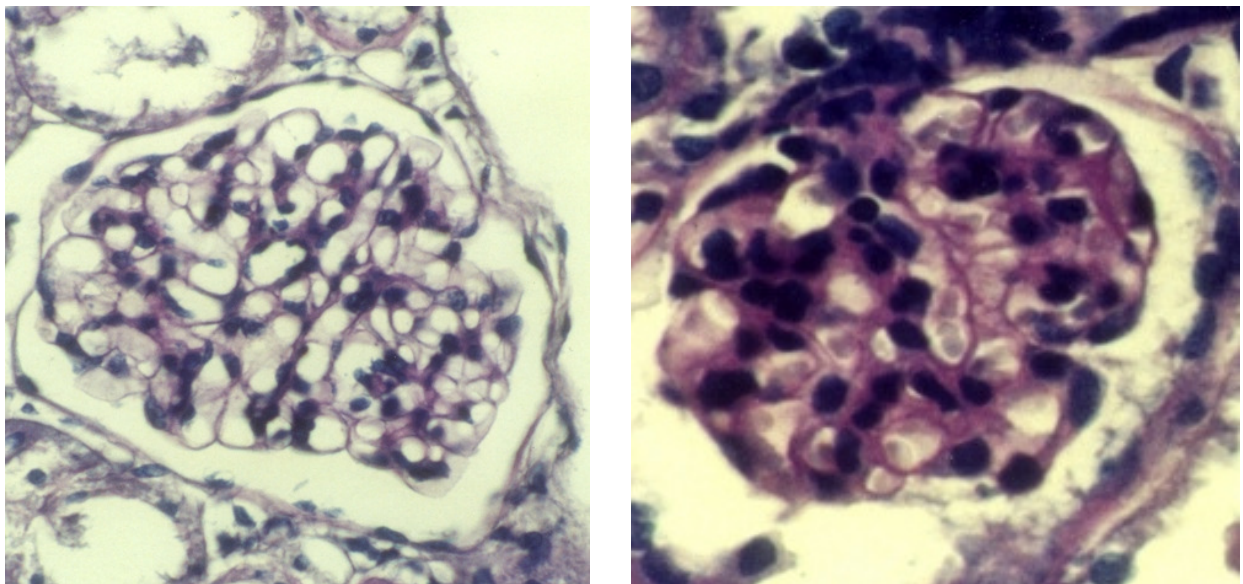


Abbildung 18: Darstellung einer Glomerulosklerose in der Mäuseniere mit Schweregrad $G=1$ (links) und $G=4$ (rechts).

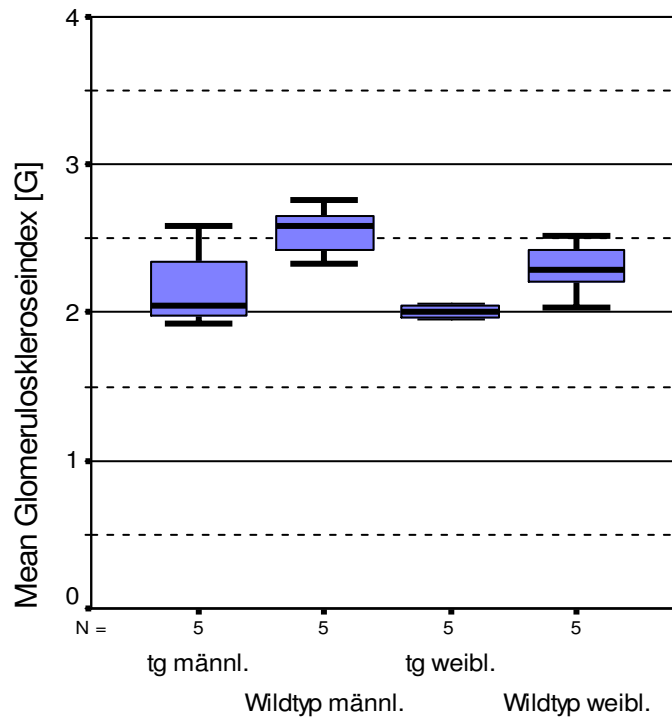


Abbildung 19: Geschlechtsspezifischer Vergleich der Glomerulosklerose in Nieren von transgenen unbehandelten Mäusen und nichttransgenen Mäusen.

Die unter Kap. 3.4.11 dargestellte **deskriptive Nierenhistologie** der präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäuse und der nichttransgenen Mäuse zeigt in Abbildung 20 beispielhaft keine Unterschiede in der Histologie der Nieren der 10 Monate alten Mäuse. Beide Gruppen zeigen eine vergleichbare Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose. Perivaskuläre Infiltrate und perivaskuläre Fibrosezeichen kommen in gleichmäßiger Verteilung bei beiden Gruppen vor. Tubuli, Glomerula und Gefäße zeigen keine eindeutigen Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Zystische Veränderungen waren in beiden Gruppen nicht nachweisbar.

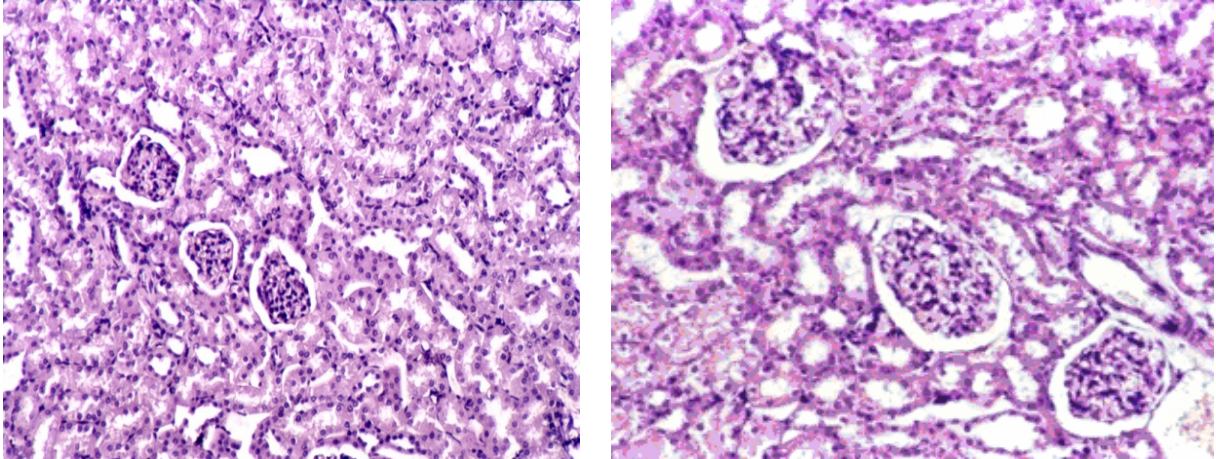


Abbildung 20: Nierenschnitte zur Erstellung einer deskriptiven Nierenhistologie 10 Monate alter Mäuse der transgenen unbehandelten Gruppe (links) und der nichttransgenen Gruppe (rechts).

4.3 Regulation von ET-1 durch NO bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen

Einflüsse der Rückkopplungsmechanismen zwischen ET-1 und NO werden im Folgenden anhand der Konzentrationsbestimmung von ET-1 bei ET-1-LacZ-transgenen Mäusen gezeigt.

4.3.1 Effekt von L-NAME auf die ET-1-Konzentration bei der transgenen Maus

Die immunhistochemisch gemessenen ET-1-Konzentrationen im Nierengewebe der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuse ohne und mit vorheriger L-NAME-Gabe werden in Abbildung 21 dargestellt. Es zeigen sich geschlechtsübergreifend Mittelwerte der ET-1-Konzentration von 67,25 pg/mg für Nierengewebe nach L-NAME-Behandlung und 47,46 pg/mg ohne L-NAME-Behandlung. Die ET-1-Gewebekonzentration in den Nieren der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuse nach einmaliger L-NAME-Gabe zeigt sich in Abbildung 21 mit $p = 0,021$ signifikant höher als die ET-1-Gewebekonzentration in den Nieren der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuse ohne L-NAME-Gabe.

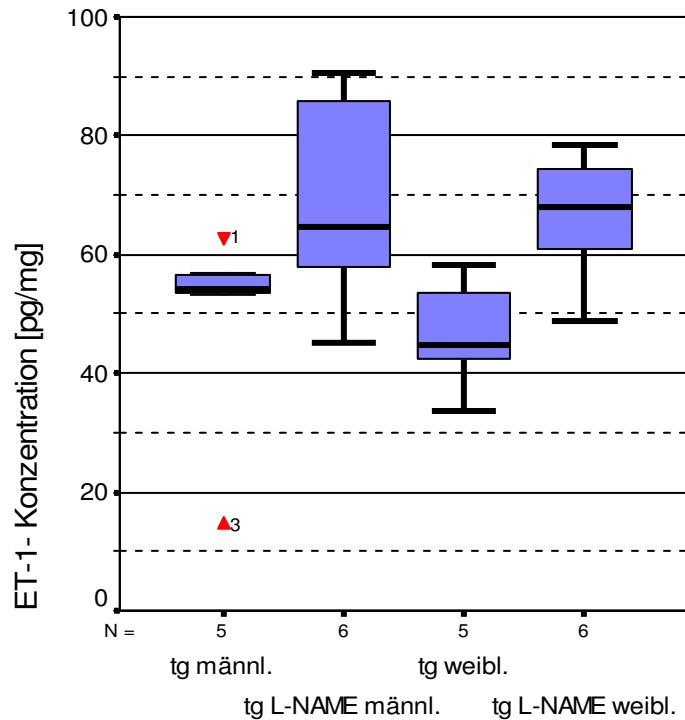


Abbildung 21: ET-1-Gewebekonzentration von präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen mit und ohne vorheriger L-NAME-Gabe.

4.3.2 Effekt von L-NAME auf den Blutdruck der transgenen Maus

Eine Beteiligung des NO-Systems an der Blutdruckregulation auch bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen wird in diesem Versuch pharmakologisch durch Blockung der NO-Synthasen durch eine Einmalgabe von L-NAME überprüft, wie in Kap. 3.3.2 beschrieben wird. Um intraindividuelle Effekte der L-NAME-Gabe zu erkennen, werden die Blutdrücke nichtinvasiv ermittelt.

Die Abbildung 22 zeigt bei 12 präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen nach der Einmalgabe von 25 mg/kg KG L-NAME intraperitoneal geschlechtsübergreifend einen mit $p = 0,001$ hochsignifikant höheren mittleren arteriellen Blutdruck als vor der L-NAME-Gabe. Die L-NAME-Behandlung produziert im Mittel einen systolischen Blutdruck von $175,5 \pm 14,4$ mmHg und einen diastolischen Blutdruck von $110,7 \pm 11,9$ mmHg. Ohne die pharmakologische Intervention zeigt sich ein systolischer Blutdruck von $124,3 \pm 7,7$ mmHg und ein diastolischer Blutdruck von $90,7 \pm 7,5$ mmHg. Die Pulsfrequenz vor und nach L-NAME-Gabe der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuse hingegen zeigt mit 654 ± 79 min^{-1} keine signifikante Änderung.

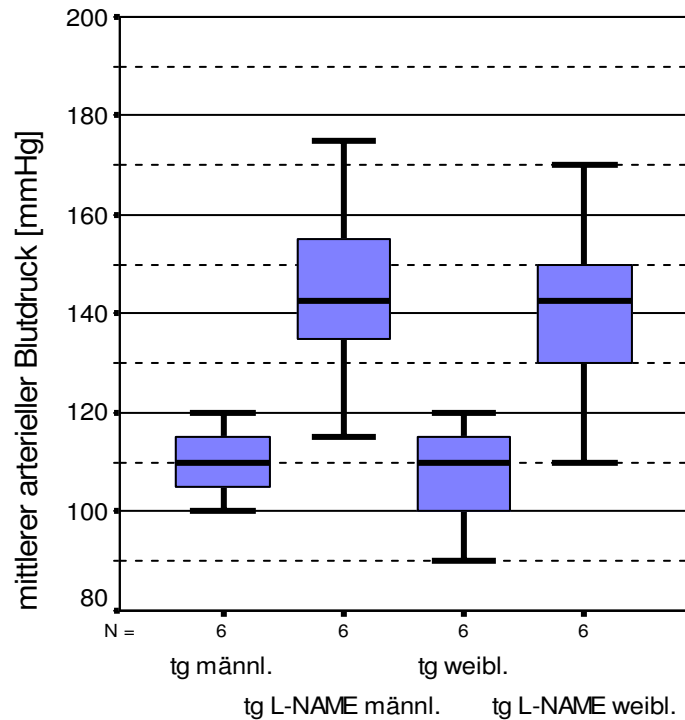


Abbildung 22: Mittlerer arterieller Blutdruck von präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen vor und nach einer einmaligen L-NAME-Gabe.

4.4 Lokalisierung von ET-1 in den Strukturen der transgenen Niere

Die unter 3.4.10 beschriebene **qualitative und quantitative histologische Differenzierung** der Nierenschnitte sowie die Analyse des Effekts einer Behandlung mit L-NAME zeigt im Folgenden, in welchen Organstrukturen der präpro-ET-1-Promotor in der Mäuseniere aktiv ist.

4.4.1 Lokalisierung des präpro-ET-1-Promotors in der transgenen Mäuseniere

Die histologische Auswertung der Bluo-Gal-gefärbten Präzipitate in den **Tubuli** in Abbildung 23 zeigt eine jeweils mit $p = 0,018$ signifikante Zunahme der Präzipitate in den Tubuli männlicher wie weiblicher präpro-ET-1-LacZ-transgener mit L-NAME behandelte Tiere im Vergleich zu den männlichen und weiblichen präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen.

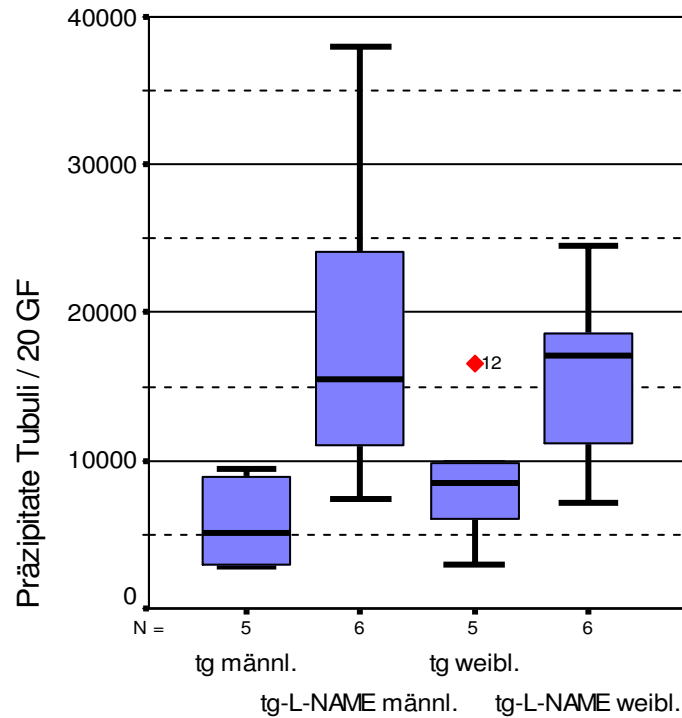


Abbildung 23: Geschlechtsspezifische Differenzierung der Anzahl von Bluo-Gal-Präzipitaten in den Tubuli der Nieren präpro-ET-1-LacZ-transgener mit L-NAME behandelte Mäuse und präpro-ET-1-LacZ-transgener unbehandelter Mäuse.

Die Abbildung 24 zeigt anhand von histologischen Schnittbildern beispielhaft die statistisch signifikant unterschiedliche Präzipitanzahl in Tubuli männlicher präpro-ET-1-LacZ-transgener mit L-NAME behandelte Mäuse und transgener männlicher Tiere, die unbehandelt blieben.

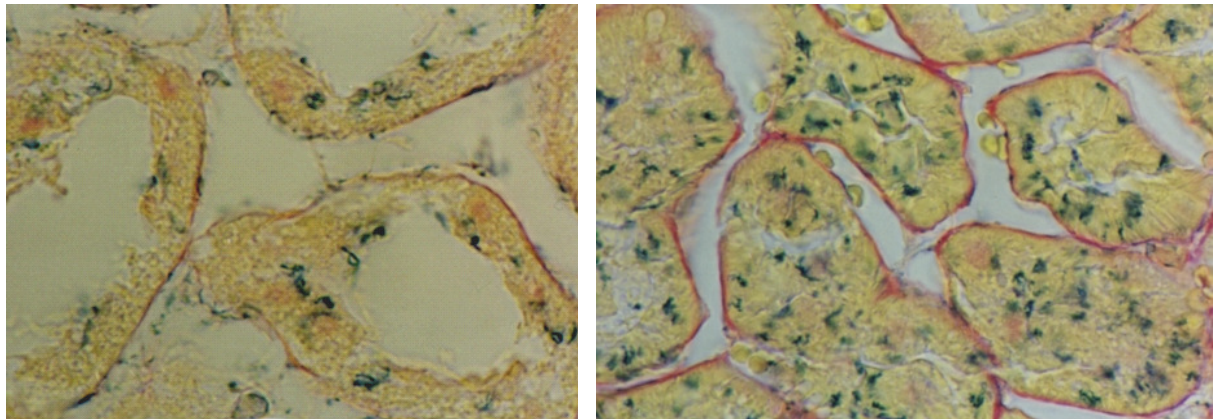


Abbildung 24: Vergleich der Darstellung von Tubuli präpro-ET-1-LacZ-transgener männlicher Tiere ohne (links) und mit L-NAME-Behandlung (rechts).

Die Abbildung 25 belegt eine mit $p = 0,045$ signifikant höhere Anzahl der blauen Präzipitate in den **Glomerula** von weiblichen gegenüber männlichen präpro-ET-1-LacZ-transgenen mit L-NAME behandelten Mäusen. Dieser Sachverhalt wird im Vergleich der histologischen Schnitte in der Abbildung 26 beispielhaft verdeutlicht. Geschlechtsübergreifend liegen beim Vergleich der Präzipitate in Glomerula in der Mäuseniere der transgenen unbehandelten und der transgenen L-NAME-Mäuse jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Präzipitate vor.

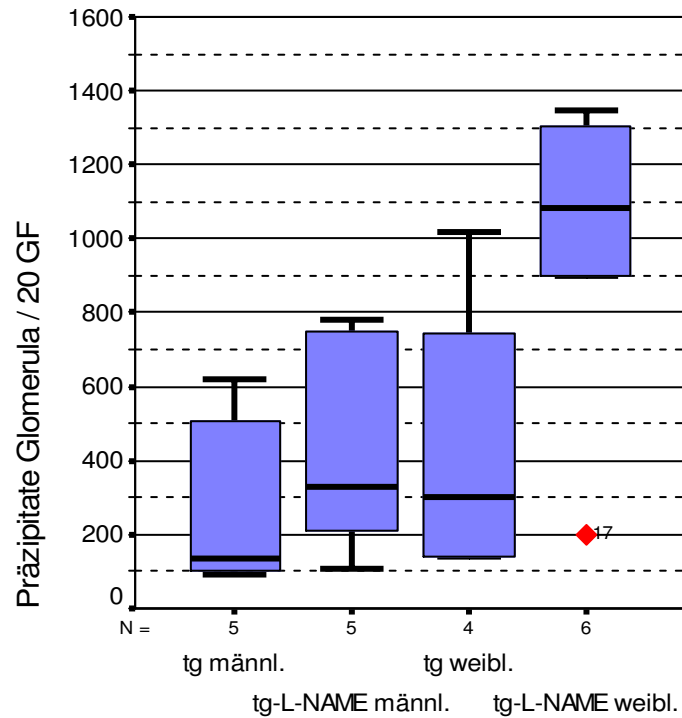


Abbildung 25: Geschlechtsspezifische Differenzierung der Anzahl von Bluo-Gal-Präzipitaten in den Glomerula der Nieren präpro-ET-1-LacZ-transgener mit L-NAME behandelter Mäuse und präpro-ET-1-LacZ-transgener unbehandelter Mäuse.

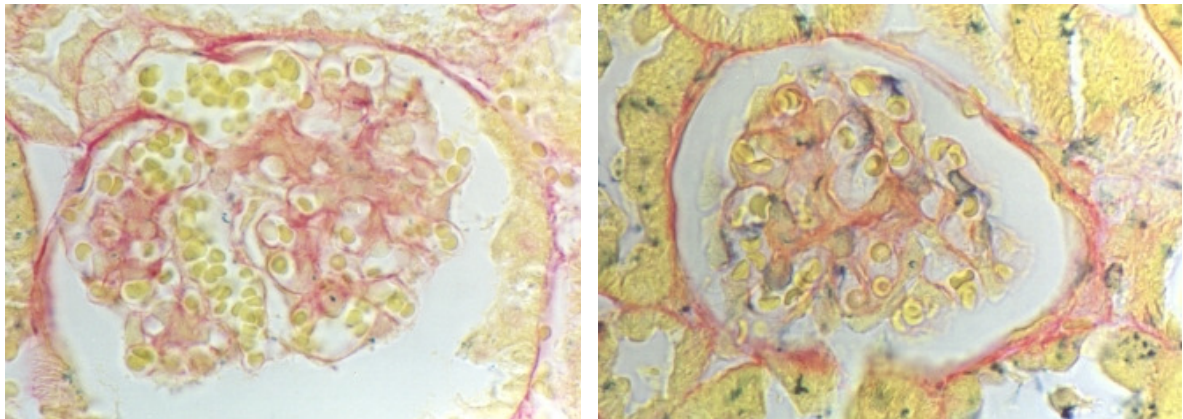


Abbildung 26: Vergleich der Darstellung von Glomerula präpro-ET-1-LacZ-transgener Tiere mit L-NAME-Behandlung männlichen (links) und weiblichen (rechts) Geschlechts.

Die histologische Auswertung der **Gefäße** zeigt nach Abbildung 27 mit $p > 0,05$ keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Präzipitate in Abhängigkeit vom Geschlecht oder der Be-

handlung mit L-NAME. Dies wird auch in den Beispielen der histologischen Gefäßanschnitte der einzelnen Kategorien in Abbildung 28 deutlich.

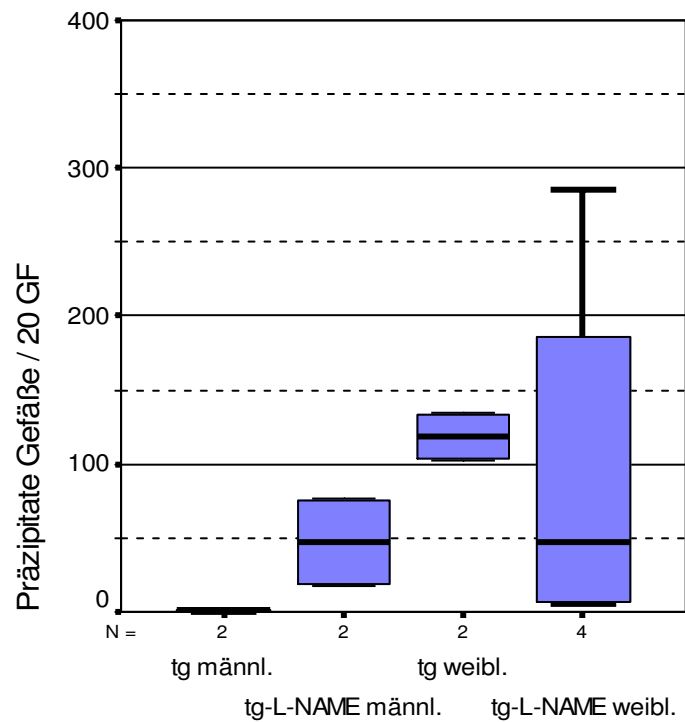


Abbildung 27: Diagramm der Auswertung der blauen Farbkristalle in den Gefäßen der Niere von präpro-ET-1-LacZ-transgenen L-NAME-Mäusen und von präpro-ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäusen.

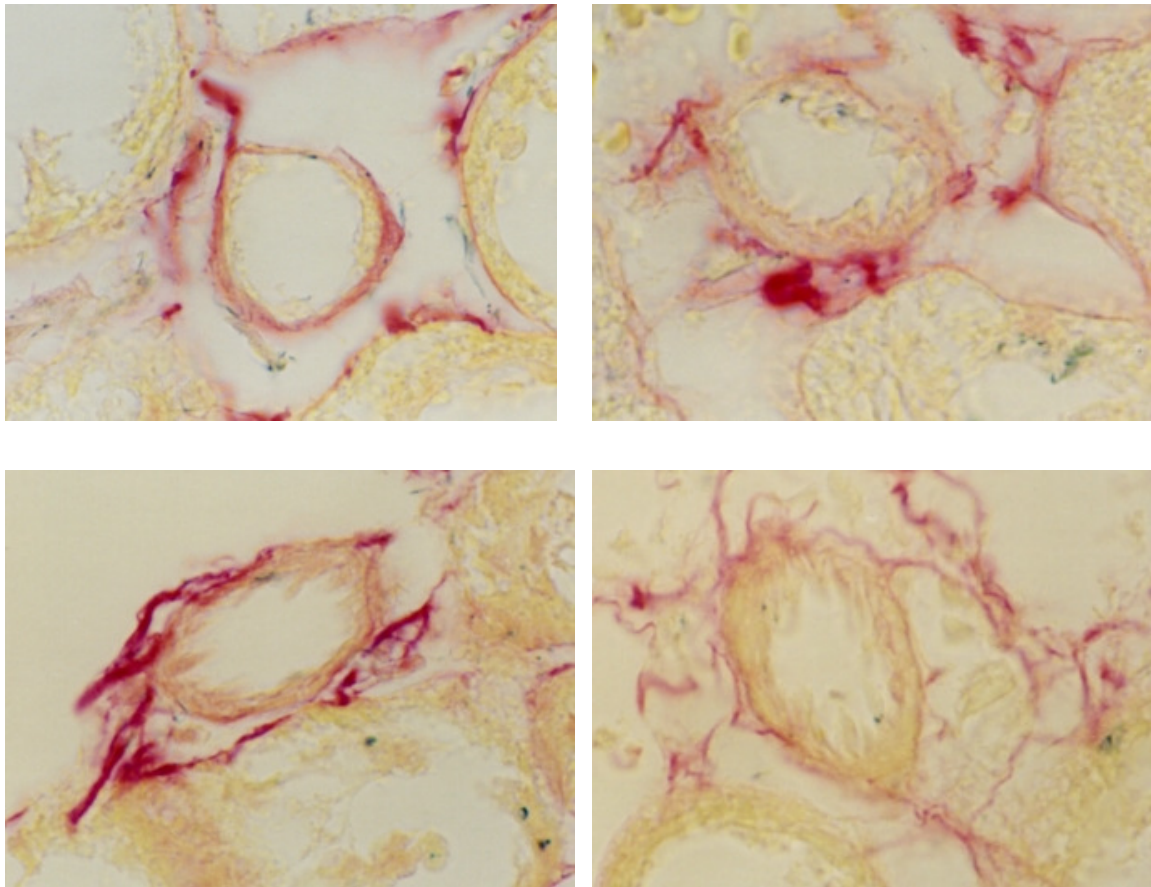


Abbildung 28: Vergleich der Darstellung von Präzipitaten in Gefäßen weiblicher präpro-ET-1-LacZ-transgener Tiere mit L-NAME-Behandlung (links oben) und ohne Behandlung (rechts oben) sowie männlicher präpro-ET-1-LacZ-transgener Tiere mit L-NAME-Behandlung (links unten) und ohne Behandlung (rechts unten).

4.4.2 Modifizierte Expression des präpro-ET-1-Promotors durch L-NAME

Die L-NAME-Behandlung der transgenen Mäuse führt zu der in diesem Kapitel für die einzelnen Nierenstrukturen dargestellten Veränderung der Dichte der durch die Bluo-Gal-Färbung markierten präpro-ET-1-Promotoraktivität in den Organstrukturen der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Nieren.

In der Übersicht über die L-NAME-abhängige Präzipitatzunahme in Abbildung 29 zeigt sich die höchste Zunahme der Promotoraktivität in den Tubuli der Nieren. Die Zunahme der präpro-

ET-1-Promotoraktivität nimmt zu den glomerulären Zellen hin ab und erreicht in den Gefäßen der Mäuseniere die geringste Zunahme der Promotoraktivität.

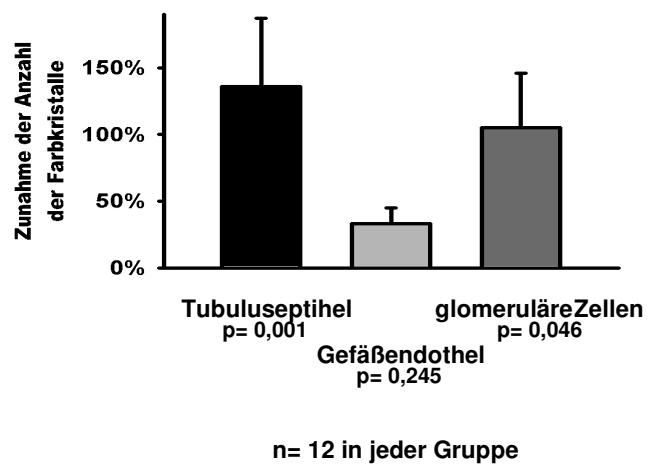


Abbildung 29: Zunahme der Anzahl der Blu-Gal-Präzipitate durch L-NAME-Behandlung in den verschiedenen Organstrukturen der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuseniere.

5 Diskussion

In dieser Arbeit werden die molekularbiologischen Grundlagen des ET-1-Systems an präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen untersucht. Die Untersuchungen erlauben Einblicke in den ET-1-cGMP-NO-Regelkreis an der Mäuseniere und beleuchten die Regulation des arteriellen Blutdrucks der Tiere in vivo. Darüber hinaus werden anhand des ins Genom integrierten humanen präpro-ET-1-Promotors Einblicke in die Lokalisation der Expression von ET-1 in der Niere gegeben. Im Folgenden werden die Untersuchungen kritisch betrachtet.

5.1 Evaluation des präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusemodells

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der histologischen Färbung und die Schlussfolgerungen daraus im Bezug auf die Funktion des transgenen Tiermodells diskutiert.

5.1.1 Evaluation der Bluo-Gal-Färbung

Dieser Abschnitt des Kapitels klärt, ob sich bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen die Aktivität des in das Mäusegenom integrierten präpro-ET-1-Promotors im Nierengewebe histologisch darstellen lässt. Zur Lokalisation des humanen ET-1-Promotors in der ET-1-LacZ-transgenen Mäuseniere wird die enzymatische Aktivität des mit dem Promotor verknüpften LacZ-Reportergens mit Hilfe des chromogenen Substrates Bluo-Gal histologisch sichtbar gemacht.

Die Bluo-Gal-Färbung erzeugt in äquatorialen Schnitten der Nieren ET-1-LacZ-transgener Mäuse eine Blaufärbung der Organe. Histologische Schnitte dieser Organe zeigen intrazelluläre blaue Präzipitate im Nierengewebe. Die Nieren nicht transgener Wildtypmäuse hingegen zeigen weder im Organanschnitt noch im histologischen Nierenschnittpräparat die für die Bluo-Gal-Färbung charakteristischen blauen Präzipitate.

Das Fehlen der blauen Präzipitate in den Nierenschnitten der nicht transgenen Wildtypmäuse sowie die intrazelluläre Lokalisation der blauen Präzipitate in den Organschnitten der transgenen Mäusenieren legen einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Transkription des ET-1-Transgens und dem Vorhandensein der blauen Präzipitate nahe. Das komplette Fehlen der blauen Präzipitate in den gefärbten Nieren der Wildtypmäuse schließt gleichzeitig eine unspezifische β -Galaktosidaseaktivität im nicht transgenen Gewebe aus.

Bei der von Aguzzi entwickelten Bluo-Gal-Färbung können durch eine unterschiedliche Diffusion des Farbstoffes ins Nierengewebe Inhomogenitäten auftreten [Aguzzi et al., 1994]. Um solche Effekte zu neutralisieren, erfolgt in dieser Arbeit eine standardisierte, gleichmäßige Anordnung der mikroskopischen Gesichtsfelder innerhalb der Organschnitte. Um die Lage der Schnittebene in den verschiedenen Organen vergleichen zu können, werden nur in Äquatornähe gewonnene Organschnitte zur Auswertung herangezogen. So werden die Organschnitte vergleichbar erfasst.

Um Inhomogenitäten der Färbung in weiterführenden Untersuchungen am präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusemodell zu vermeiden, bietet sich in Zukunft die Optimierung der Färbemethode an. Möglicherweise ergibt sich daraus eine weitere Intensivierung des Farbsignals. Ein ähnlicher Effekt hat Aguzzi zur Anwendung der Bluo-Gal-Färbung anstelle der X-Gal-Färbung veranlasst [Aguzzi et al., 1994].

Da die Vergleichbarkeit der Farbbalance und des Kontrasts der Organblockbilder von der Entwicklung im Fotolabor und von der Farbtreue der digitalen Bildaufnahme und -wiedergabe abhängig ist, werden alle Fotos unter standardisierten Einstellungsparametern mit dem gleichen Film bzw. der gleichen Digitalkamera aufgenommen und im gleichen Fotolabor unter standardisierten Bedingungen entwickelt.

5.1.2 Korrelation von ET-1-Konzentration und Präzipitaten

Im Folgenden wird diskutiert, ob der humane präpro-ET-1-Promotor durch seine Chromogenität die Expression von ET-1 im Nierengewebe repräsentativ darstellt.

Die über die Konzentration der Präzipitate bestimmte präpro-ET-1-Promotoraktivität korreliert mit der durch ELISA bestimmten ET-1-Gewebekonzentration in ET-1-LacZ-transgenen Mäusen. Da der humane präpro-ET-1-Promotor zwar wie das Mäuse-ET-1-Gen stimuliert wird, selbst jedoch kein ET-1 exprimiert, entsprechen die blauen Präzipitate in den Nierenschnitten der Aktivität des ins Genom integrierten humanen präpro-ET-1-Promotors und zeigen gleichzeitig die Aktivität des Mäuse-ET-1-Gens.

Die Korrelation beweist, dass die durch die blauen Präzipitate gezeigte Promotoraktivität der ET-1-Expression im Nierengewebe der ET-1-LacZ-transgenen Tiere entspricht. Diese Korrelation zwischen Präzipitaten und ET-1-Konzentration belegt, dass das ET-1-LacZ-transgene Tiermodell funktioniert. Zur Erhärtung des Nachweises wird zusätzlich die Expression von ET-1

stimuliert. Dies geschieht durch die pharmakologische Blockade von NO durch L-NAME. Die Zunahme der ET-1-Konzentration im Gewebe entspricht der Zunahme der LacZ-Präzipitate.

5.2 Betrachtung des Phänotyps der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Maus

Nachdem in dieser Arbeit nachgewiesen wird, dass mit Hilfe des präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusemodells die präpro-ET-1-Promotoraktivität in den Nieren dieser Tiere anhand von blauen Präzipitaten sichtbar gemacht werden kann, stellt sich nun die Frage, ob dieses transgene Modell den Phänotyp der Mäuse verändert.

Hierzu werden die ET-1-LacZ-transgenen unbehandelten Mäuse mit gleichaltrigen nichttransgenen Wildtypmäusen des gleichen genetischen NMRI-Backgrounds verglichen. Der gleiche genetische Background der verwendeten Mäuse stellt die Vergleichbarkeit der jeweiligen Phänotypen sicher, wie in der Literatur belegt wird [**Sibilia et Wagner, 1995**]. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen diese Aussage für die hier verwendeten Tiere.

Die Literatur belegt bereits, dass die Insertion eines LacZ-Gens die Expression des restlichen Genoms nicht beeinflusst. Die Insertion des LacZ-Gens in das Exon-1 des humanen präpro-ET-1-Gens verhindert dessen Transkription, so dass das Einfügen des humanen präpro-ET-1-Gens keinen Einfluss auf die Konzentration von ET-1 nimmt. Die Galaktosidase-Farbreaktion zeigt jedoch gleichzeitig die Aktivität des Gens an [**Theuring et al., 1995**].

Um den Phänotyp der Mäuse darüber hinaus zu vergleichen, wird in dieser Arbeit das Gewicht der Nieren, der arterielle Blutdruck und Laborparameter wie Blutbild, Elektrolyte und Nierenretentionsparameter sowie die Histologie der Nieren betrachtet.

Im Vergleich zwischen transgenen Mäusen und Wildtypmäusen beeinflusst die Insertion der humanen ET-1-LacZ-DNA in das Mäusegenom keinen der untersuchten Parameter. Bei dem verwendeten präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusemodell bleibt der Phänotyp der Mäuse also in Bezug auf die untersuchten Parameter unverändert.

Da die Insertion der humanen ET-1-LacZ-DNA in das Mäusegenom offensichtlich im beobachteten Rahmen keinen Einfluss auf weitere Gene der Maus ausübt, eignet sich dieses transgene Mäusemodell für weitere Untersuchungen des ET-1-Systems *in vivo*. Es bleibt jedoch in Zukunft zu klären, ob das präpro-ET-1-LacZ-transgene Modell Veränderungen des Phänotyps an anderen Organsystemen der Maus außer der Niere hervorruft, da ET-1 auch in anderen Organen exprimiert wird. In dieser Arbeit werden beispielhaft einige Parameter des Phänotyps von transgenen

Tieren und Wildtypmäusen herausgegriffen. Hier bietet sich eine intensivere Untersuchung weiterer Parameter an, um die Verwendbarkeit des präpro-ET-1-LacZ-transgenen Modells auch für die Betrachtung anderer Organsysteme zu belegen.

Die Auswertung der Nierenhistologie der zehn Monate alten Mäuse zeigt keine Unterschiede zwischen den ET-1-LacZ-transgenen Mäusen und den Wildtypmäusen. Bei dieser Auswertung wird berücksichtigt, dass histologische Veränderungen bei zehn Monate alten Mäusen in einem gewissen Rahmen physiologisch vorkommen. Diese mit dem Alter zunehmende Glomerulosklerose und Nephrosklerose bei Wildtypmäusen wird in der Literatur beschrieben [Lichtig et al., 1987]. Die Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose sind bei beiden hier untersuchten Mäusegruppen vergleichbar. Perivaskuläre Infiltrate und perivaskuläre Fibrosezeichen kommen ebenfalls gleichmäßig bei beiden Gruppen vor. Nicht transgene NMRI-Mäuse entwickeln darüber hinaus auch eine geringe Anzahl von kleinen Nierenzysten in Abhängigkeit vom Lebensalter [Thöne-Reineke, 1997]. Diese wurden jedoch in dieser Arbeit bei keiner der beiden Gruppen gefunden.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine altersentsprechende Nierenhistologie zehn Monate alter Mäuse bei beiden Gruppen vorliegt. Da die Klassifizierung der Schweregrade der Glomerulosklerose und der interstitiellen Fibrose jedoch untersucherabhängig ist, können in zukünftigen Auswertungen der Nierenhistologie objektivere Messmethoden oder eine automatisierte Erhebung von Parametern noch zielführender sein.

5.3 In-vivo-Nachweis des ET-1-cGMP-NO-Regelkreises

Um der Frage nachzugehen ob sich im Nierengewebe der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Maus histologisch die Interaktion von ET-1 und NO darstellen lässt, wird mittels mikroskopischer Auswertung die humane ET-1-Promotoraktivität der transgenen Mäuse mit und ohne intraperitonealer L-NAME-Gabe durch Auszählung der blauen Präzipitate in den jeweiligen Nierenschnitten quantifiziert. Zusätzlich wird zur Untermauerung der Aussage, dass es sich bei der histologischen Darstellung der Bluo-Gal-Präzipitate tatsächlich um den Ort der ET-1-Expression handelt, neben der histologischen Untersuchung die immunhistochemische ET-1-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA ohne und unter dem Einfluss von L-NAME durchgeführt.

Die präpro-ET-1-LacZ-transgenen Tiere mit vorheriger einmaliger L-NAME-Gabe weisen in der Niere eine signifikant höhere ET-1-Promotoraktivität und ET-1-Konzentration als die transgenen

unbehandelten Tiere auf. Da in dieser Arbeit L-NAME zu einer Steigerung sowohl der ET-1-Konzentration als auch zu einer Zunahme der Blau-Gal-Präzipitate in der Mäuseniere führt, kann von einem Zusammenhang der gesteigerten humanen ET-1-Promotoraktivität und der gesteigerten Expression von ET-1 ausgegangen werden.

Da bei der Blockade der NO-Synthasen durch L-NAME das in geringerer Konzentration vorhandene NO die ET-1-Synthese weniger inhibiert, erwartet man in diesem Versuch eine gesteigerte ET-1-Expression. Diese vermehrte ET-1-Expression spiegelt sich bei den präpro-ET-1-LacZ-transgenen mit L-NAME behandelten Mäusen sowohl in einer Aktivitätszunahme des ET-1-Promotors in der Niere als auch in einer Zunahme der immunhistochemisch gemessenen ET-1-Konzentration im Nierengewebe wieder.

Die Regelmechanismen der Interaktion zwischen NO und ET-1 werden nicht nur im Tierexperiment belegt, sondern lassen sich auch beim Menschen zeigen. Die Arbeit von Wagner untersucht beispielsweise die Modulation des ET-1-Plasmaspiegels durch inhalative NO-Therapie bei Patienten mit endgradiger Kardiomyopathie im Verlauf der Implantation eines linksventrikulären Assist-Systems. Die Untersuchung belegt den Rückgang eines krankheitsbedingt initial stark erhöhten ET-1-Plasmaspiegels um fast 50% innerhalb von 72 Stunden nach dem Eingriff durch die Verabreichung von NO über die Atemluft [Wagner et al., 2003].

Die Einzelschritte des Regelmechanismus zwischen ET-1 und NO werden in der Literatur eingehend beschrieben und belegt [Alonso et al., 2003; Yanagisawa et al., 2000, 1988; Miwa et al., 1999; Verhaar et al., 1998; Golikorsky et al., 1994; Hirata et al., 1993]. Diese Arbeit konzentriert sich deshalb auf die histologische und histochemische Darstellung des Resultats der Faktorenkette, ohne die Einzelfaktoren weiter auszudifferenzieren. Natürlich kann jedoch die differenziertere Analyse der Faktorenkette selbst weitere Erkenntnisse bringen.

5.3.1 Einfluss von L-NAME auf den arteriellen Blutdruck der transgenen Maus

Diese Arbeit geht des Weiteren der Frage nach, ob sich die Beteiligung des NO-Systems an der Blutdruckregulation auch bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen darstellen lässt.

Zur Beantwortung der Frage erhält ein Teil der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuse L-NAME zur Blockung der NO-Synthasen. Aufgrund dieser NO-Blockade zeigen die präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuse einen signifikant höheren mittleren arteriellen Blutdruck als vor der L-NAME-Gabe. Der Effekt der Blockade der NO-Synthasen durch L-NAME belegt eine

Beteiligung des NO-Systems an der Blutdruckregulation auch bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen.

Die Tatsache, dass die Blockade des NO-Systems mit L-NAME einen dosisabhängigen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks bewirkt, wird auch von Filep und Ruschitzka unabhängig voneinander beschrieben [**Ruschitzka et al., 2000; Filep et al., 1997**]. Ebenso beschreiben Qiu und Banting, dass die Ausschaltung des stärksten endogenen Vasodilatators NO die Wirkung endogener Vasokonstriktoren, insbesondere des ET-1, verstärkt [**Banting et al., 1996; Qiu et al., 1995; Hirata et al., 1993**].

Die Literatur differenziert darüber hinaus auch die chronische L-NAME-Gabe von der in dieser Arbeit beschriebenen akuten Verabreichung. Moreau zeigt, dass eine chronische L-NAME-Gabe bei der Ratte zu einer Zunahme der ET-1-Konzentration in der thorakalen Aorta bei unveränderter ET-1-Konzentration im Kortex der Niere und in den Arterien des Mesenteriums führt. Die chronische L-NAME-Behandlung führt somit zu erhöhter ET-1-Konzentration in großen Gefäßen, jedoch nicht in den kleinen arteriellen Widerstandsgefäßen [**Moreau et al., 2000**]. Dagegen zeigt diese Arbeit den Anstieg des arteriellen Blutdrucks sowie den Anstieg der ET-1-Konzentration in der Niere unter akuter L-NAME-Gabe.

In der Literatur werden die verschiedenen ET-1-Rezeptoren weiter differenziert. Endogenes ET-1 ist über ET_A- und ET_B-Rezeptoren an der Regulation des peripheren Blutflusses beteiligt. Studien von Verhaar und Haynes mit Rezeptorantagonisten zeigen, dass die akute ET-induzierte Vasokonstriktion auch beim Menschen überwiegend über ET_A-Rezeptoren vermittelt wird [**Verhaar et al., 1998; Haynes et al., 1996**]. Krum und Clozel zeigen, daß die chronische Gabe des gemischten ET_A/ET_B-Rezeptorantagonisten *Bosentan* über 6 Wochen den Blutdruck bei Menschen mit essentieller Hypertonie senkt. Sie gehen daher von einer pathogenetischen Rolle von ET bei der essentiellen Hypertonie des Menschen aus [**Krum et al., 1998; Clozel et al., 1994**].

Der Einfluss von ET-1 auf den Blutdruck beim Menschen zeigt jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Kohno konnte zwar höhere ET-1-Plasmakonzentrationen bei hypertensiven Menschen feststellen, findet aber gleichzeitig keine Aktivierung des ET-1-Systems bei essentieller Hypertonie [**Kohno et al., 1990**]. Hierbei muss jedoch der schwierige Nachweis der niedrigen Plasmakonzentrationen von ET-1 bei dessen vornehmlich parakriner Wirkung in Betracht gezogen werden, wie Goddard und Webb feststellen [**Goddard et Webb, 2000**].

Zur Messung des Blutdrucks werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Messmethoden verwendet. Bei der kritischen Überprüfung dieser Methoden könnten diese zu Abweichungen führen. Zum einen wird die invasive Messung des Blutdrucks mittels Implantation eines intravaskulären Katheters durchgeführt. Zum anderen wird der Blutdruck nichtinvasiv durch schwanzplethysmographische Messung bestimmt. Zur invasiven Messung erhalten die Mäuse als Narkotikum initial intravenös Ketamin. Bei der Gabe von Ketamin kann es beim Menschen als unerwünschte Wirkung zu einem Blutdruckanstieg und zu einer Tachykardie kommen. Aus diesem Grund muss hier kritisch erwähnt werden, dass die Gabe des Narkotikums auch bei den Mäusen kreislaufwirksam sein kann und somit die Blutdruckmesswerte verfälschen könnte. Die schwanzplethysmographische Blutdruckmessung hingegen ermöglicht die nichtinvasive Ermittlung des Blutdrucks jeweils vor und nach L-NAME-Gabe. Auch hier ist zu beachten, dass es bei der verwendeten Methode trotz durchgeführter Reizabschirmung der Mäuse bei der Blutdruckmessung zu Stress und damit zu einem Blutdruckanstieg kommen kann.

Aufgrund der komplexen und zum Teil widersprüchlichen Aussagen über die ET-1-Wirkung auf den Blutdruck empfehlen sich weitere Untersuchungen mit Hilfe von ET-1-transgenen Tieren. Dies kann der vollständigen Klärung des Einflusses von ET-1 auf den Pathomechanismus bei einer Fehlregulation des Blutdrucks dienen.

5.4 Lokalisation des präpro-ET-1-Promotors in der transgenen Mäuseniere

Die präpro-ET-1-LacZ-transgene Maus eignet sich für Studien am renalen ET-1-System, wie unter 4.1 gezeigt wird. In dieser Arbeit wird unter anderem auf die Frage eingegangen, in welchen Gewebestrukturen und in welchem Ausmaß der präpro-ET-1-Promotor in der Mäuseniere exprimiert wird. Als Ergänzung der Experimente werden die Ergebnisse zusätzlich unter der Blockade der NO-Synthese durch L-NAME betrachtet.

Die Aktivität des präpro-ET-1-Promotors ist in Form von intrazellulären blauen Präzipitaten im Epithel der Tubuli, den Gefäßen und in glomerulären Zellen der Niere der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Maus histologisch quantifizierbar. Nach der Blockade der NO-Synthese durch L-NAME erfolgt eine Aktivitätszunahme des präpro-ET-1-Promotors in den einzelnen Strukturen der Niere. Die höchste Promotoraktivitätszunahme ist im Epithel der Tubuli zu beobachten, gefolgt von den glomerulären Zellen. Eine unveränderte Promotoraktivität nach L-NAME-Gabe ist im Gefäßendothel zu verzeichnen.

Die Zunahme der Aktivität des präpro-ET-1-Promotors nach L-NAME-Gabe betrifft in dieser Arbeit im Wesentlichen die Expression in den Tubuli der Maus. Auch beim Menschen wird die höchste ET-1-Konzentration in den Tubuli nachgewiesen [Ujiie et al., 1992]. Warum die höchste Reporter-Gen-Aktivität in den Tubuli lokalisiert ist, bleibt jedoch auf molekularer Ebene weiterhin unbekannt und erfordert zur Klärung weiterführende Experimente.

In den Glomerula zeigen die präpro-ET-1-LacZ-transgenen weiblichen mit L-NAME behandelten Tiere eine signifikant höhere ET-1-Promotoraktivität als die männlichen präpro-ET-1-LacZ-transgenen mit L-NAME behandelten Mäuse und als die männlichen transgenen unbehandelten Tiere. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Expression des ET-1-Promotors in den Glomerula der ET-1-LacZ-transgenen Mäuseniere geschlechtsabhängig ist. Ein stichhaltiger Beleg muss jedoch durch höhere Fallzahlen erbracht werden.

In den renalen Gefäßendothelien zeigt die Genaktivität des präpro-ET-1-Promotors der Mäuse mit und ohne L-NAME-Behandlung im Gegensatz zu den Tubuli und den Glomerula keine Unterschiede. Hier zeigt sich eine vergleichbare Verteilung der Bluo-Gal-Präzipitate in den unterschiedlichen Gruppen. Die eventuell vorhandenen geringen Unterschiede zwischen den Präzipitatenmengen in den einzelnen Gruppen sind mit der hier angewandten Methode möglicherweise erst nachweisbar, wenn die basale Expression des präpro-ET-1-Promotors im Endothel der Gefäße für die Differenzierung ausreichend ausgeprägt ist.

Die Aktivität des ET-1-Promotors nimmt in den betrachteten Nierenstrukturen unter L-NAME-Gabe unterschiedlich stark zu. Dies spricht für eine Zellspezifität der negativen Rückkopplung von NO und seinem second messenger cGMP auf die ET-1-Promotoraktivität. Die Zellspezifität dieser Rückkopplung wird auch in der Literatur gezeigt [Moridaira et al., 2003; Kahler et al., 2000; Deng et Schiffrin, 1998].

Eine differenziertere Zuordnung der ET-1-Expression zu den einzelnen Strukturen des Nierengewebes der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Maus kann in Zukunft weitere Rückschlüsse auf Funktionen von ET-1 erlauben.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird anhand der Expression des humanen präpro-ET-1-Promotors bei präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen die Regulation der ET-1-Expression auf zellulärer Ebene in vivo in der Mäuseniere analysiert.

Dazu stellen sich die Fragen, ob sich mit Hilfe dieses neuen transgenen Tiermodells der humane präpro-ET-1-Promotor in der Mäuseniere sichtbar machen lässt, und wenn ja, in welchen Gewebestrukturen der Mäuseniere der ET-1-Promotor exprimiert wird. In dem Zusammenhang muss belegt werden, dass die Aktivität des eingefügten humanen präpro-ET-1-Promotors auch die Expression des Hormons ET-1 in der Zelle anzeigt, ohne selbst auf die ET-1-Expression Einfluss zu nehmen. Schließlich wird der Frage nachgegangen, ob sich mit Hilfe des transgenen Tiermodells die Regulation von ET-1 durch NO über die Gabe des NO-Synthasen-Blockers L-NAME auf zellulärer Ebene in vivo darstellen lässt.

Die Lokalisationsbestimmung des ET-1-Promotors im Nierengewebe der transgenen Maus erfolgt durch histologische Untersuchungen. Zum histologischen Nachweis des humanen ET-1-Promotors im Nierengewebe der Maus wird humane ET-1-DNA durch Kopplung des präpro-ET-1-Promotors an das chromogene LacZ-Gen molekulargenetisch markiert und in das Mäusegenom inseriert. Die LacZ-Markierung führt zu den gezeigten blauen Präzipitaten im transgenen Nierengewebe nach Bluo-Gal-Färbung. Die Nachweisbarkeit einer genetischen Markierung durch LacZ wird durch den histologischen Vergleich zwischen LacZ-positivem und LacZ-negativem Nierengewebe der Mäuse nach Bluo-Gal-Färbung dargestellt.

Zum Beleg des Zusammenhangs zwischen der präpro-ET-1-LacZ-Transgenität und der ET-1-Expression wird neben dem histologischen Nachweis des humanen präpro-ET-1-Promotors die Konzentration von ET-1 im Nierengewebe immunhistochemisch bestimmt und mit den histologischen Ergebnissen verglichen. Zur Erhärtung des Nachweises wird zusätzlich die Expression von ET-1 durch die pharmakologische Blockade von NO stimuliert und die Zunahme der ET-1-Konzentration im Gewebe mit der Zunahme der LacZ-Präzipitate verglichen. Die Stimulation von ET-1 erfolgt durch die nichtselektive NO-Blockade durch L-NAME.

Physiologische und histologische Parameter der transgenen ohne L-NAME behandelten Tiere werden kontrolliert und mit den Parametern von Wildtypmäusen verglichen, um über die Chromogenität des LacZ hinausgehende Effekte der Transgenität auf den Phänotyp zu ermitteln.

Als Ergebnis ist festzuhalten, dass das präpro-ET-1-LacZ-transgene Tiermodell nicht nur die Konzentrationsbestimmung der blauen LacZ-Präzipitate sondern durch diese auch die differenzierte Lokalisation des humanen präpro-ET-1-Promotors in der Niere der Maus gut möglich macht.

Unter L-NAME-Gabe zeigt sich histologisch eine deutliche Aktivitätszunahme der LacZ-markierten humanen präpro-ET-1-Promotorregionen im Nierengewebe. Dies belegt den Zusammenhang zwischen dem LacZ-markierten humanen ET-1-Promotor und dem ET-1-Gen der Maus und belegt gleichzeitig die Abhängigkeit der ET-1-Expression im Nierengewebe von NO. Der ET-1-cGMP-NO-Regelkreis war bis jetzt nur auf zellulärer Ebene bekannt. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal dessen Bedeutung im Nierengewebe *in vivo*.

Die Korrelation zwischen der immunhistochemisch ermittelten ET-1-Gewebekonzentration und der durch LacZ-Markierung histologisch ermittelten humanen ET-1-Promotoraktivität ist signifikant. Dies belegt, dass die dargestellte Farbveränderung tatsächlich die Aktivität des transgenen humanen präpro-ET-1-Promotors sowie dessen Kopplung an die Expression von ET-1 widerspiegelt. Die präpro-ET-1-LacZ-Transgenität ruft dabei am Phänotyp der transgenen Mäuse keine Veränderungen bezüglich der untersuchten physiologischen, laborchemischen und histologischen Parameter hervor.

Dadurch erlaubt das transgene Modell die exakte Lokalisation der ET-1-Expression im Nierengewebe der Maus *in vivo*. Die gewebespezifische Lokalisation des präpro-ET-1-Promotors in der Niere wird mit Hilfe des chromogenen LacZ-Gens sichtbar gemacht. Die entsprechenden Präzipitate finden sich rein intrazellulär. Sie lassen sich mikroskopisch eindeutig quantifizieren und in absteigender Konzentration den Epithelzellen der Tubuli, den Glomerula und dem Gefäßendothel der Niere zuordnen. Darüber hinaus finden sich in den Glomerula Zeichen einer Geschlechtsabhängigkeit der Expression des präpro-ET-1-Promotors.

6.1 Schlussfolgerung

Die histologische Markierung des aktiven humanen präpro-ET-1-Promotors in der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäuseniere durch LacZ zeigt die Aktivität des ET-1-Gens an. Somit bietet das Modell der präpro-ET-1-LacZ-transgenen Maus die Möglichkeit, die Regulation des humanen präpro-ET-1-Promotors und somit die Regulation des ET-1-Systems auf zellulärer Ebene *in vivo* im Nierengewebe zu analysieren.

Der Transgenstatus in diesem transgenen Tiermodell übt im untersuchten Rahmen keinen Einfluss auf den Phänotyp aus. Das präpro-ET-1-LacZ-transgene Modell eignet sich somit für die Erforschung des ET-1-Systems *in vivo*.

Die Blockade der NO-Synthasen durch L-NAME führt in der Niere *in vivo* zu einer Steigerung der präpro-ET-1-Promotoraktivität. Dadurch nimmt die ET-1-Konzentration in der Niere zu. Die Korrelation zwischen der ET-1-Gewebekonzentration und der präpro-ET-1-Promotoraktivität unter L-NAME-Gabe belegt *in vivo* die Interaktion des bisher nur auf zellulärer Ebene bekannten renalen ET-1-cGMP-NO-Regelkreises.

Literaturverzeichnis

1. Naval Medical Research Center. <http://www.nmrc.navy.mil/>. 2007.
2. Aguzzi A, Theuring F. Improved in situ beta-galactosidase staining for histological analysis of transgenic mice. *Histochemistry* 1994;102:477-81.
3. Ahlborg G, Lundberg JM. Nitric oxide-endothelin-1 interaction in humans. *J.Appl.Physiol* 1997;82:1593-600.
4. Alonso D, Radomski MW. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail.Rev.* 2003;8:107-15.
5. Angerio AD. Endothelin-1-mediated inflammation in acute renal failure. *Crit Care Nurs.Q.* 2006;29:152-56.
6. Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC et al. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am.J.Hum.Genet.* 1991;48:990-96.
7. Banting JD, Friberg P, Adams MA. Acute hypertension after nitric oxide synthase inhibition is mediated primarily by increased endothelin vasoconstriction. *J.Hypertens.* 1996;14:975-81.
8. Barst RJ, Rich S, Widlitz A, Horn EM, McLaughlin V, McFarlin J. Clinical efficacy of sitaxsentan, an endothelin-A receptor antagonist, in patients with pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Chest* 2002;121:1860-68.
9. Barst RJ, Langleben D, Frost A, Horn EM, Oudiz R, Shapiro S et al. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2004;169:441-47.
10. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1997;238:861-65.
11. Battistini B, Jeng AY. Endothelin-converting enzyme inhibitors and their effects, In: Warner TD, editor. *Handbook of Experimental Pharmacology: Endothelin and Its Inhibitors*, vol. 152. Heidelberg: Springer; 2001. p. 155-208.

12. Bax WA, Saxena PR. The current endothelin receptor classification: time for reconsideration? *Trends Pharmacol.Sci.* 1994;15:379-86.
13. Benigni A, Remuzzi G. Endothelin antagonists. *Lancet* 1999;353:133-38.
14. Black SM, Fineman JR. Oxidative and nitrosative stress in pediatric pulmonary hypertension: roles of endothelin-1 and nitric oxide. *Vascul.Pharmacol.* 2006;45:308-16.
15. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997;95:2068-74.
16. Bolger GT, Liard F, Jodoin A, Jaramillo J. Vascular reactivity, tissue levels, and binding sites for endothelin: a comparison in the spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 1991;69:406-13.
17. Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr.Vasc.Pharmacol.* 2007;5:45-52.
18. Brooks DP, DePalma PD, Pullen M, Elliott JD, Ohlstein EH, Nambi P. SB 234551, a novel endothelin--A receptor antagonist, unmasks endothelin-induced renal vasodilatation in the dog. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S339-S341.
19. Byrom FB, Wilson C. A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *J.Physiol* 1938;93:301-04.
20. Cazaubon S, Deshayes F, Couraud PO, Nahmias C. [Endothelin-1, angiotensin II and cancer]. *Med.Sci.(Paris)* 2006;22:416-22.
21. Chard T. *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, 4 ed. Amsterdam: Elsevier Science; 1990.
22. Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1996;27:154-58.
23. Christopherson KS, Brecht DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J.Clin.Invest* 1997;100:2424-29.
24. Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Loffler BM, Burri K et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1994;270:228-35.

25. Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, Lopez B, Arregui B et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2001;281:R730-R737.
26. Corder R. Identity of endothelin-converting enzyme and other targets for the therapeutic regulation of endothelin biosynthesis, In: Warner TD, editor. *Handbook of Experimental Pharmacology: Endothelin and Its Inhibitors*, vol. 152. Heidelberg: Springer; 2001. p. 35-67.
27. Dedeoglu IO, Springate JE. Effect of nitric oxide inhibition on kidney function in experimental renovascular hypertension. *Clin.Exp.Hypertens.* 2001;23:267-75.
28. Deng LY, Schiffrin EL. Endothelin-1 gene expression in blood vessels and kidney of spontaneously hypertensive rats (SHR), L-NAME-treated SHR, and renovascular hypertensive rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S380-S383.
29. Douglas SA, Beck GR, Jr., Elliott JD, Ohlstein EH. Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br.J.Pharmacol.* 1995;114:1529-40.
30. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J.Biol.Chem.* 1995;270:15262-68.
31. Endo T, Uchida Y, Matsumoto H, Suzuki N, Nomura A, Hirata F et al. Regulation of endothelin-1 synthesis in cultured guinea pig airway epithelial cells by various cytokines. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1992;186:1594-99.
32. Filep JG. Endogenous endothelin modulates blood pressure, plasma volume, and albumin escape after systemic nitric oxide blockade. *Hypertension* 1997;30:22-28.
33. Fire A. Histochemical techniques for locating *Escherichia coli* beta-galactosidase activity in transgenic organisms. *Genet.Anal.Tech.Appl.* 1992;9:151-58.
34. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-76.
35. Galie N, Hinderliter AL, Torbicki A, Fourme T, Simonneau G, Pulido T et al. Effects of the oral endothelin-receptor antagonist bosentan on echocardiographic and doppler measures in patients with pulmonary arterial hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003;41:1380-86.
36. Goddard J, Webb DJ. Plasma endothelin concentrations in hypertension. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2000;35:S25-S31.

37. Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF. Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J.Cell Physiol* 1994;158:485-94.
38. Granger JP, Alberola AM, Salazar FJ, Nakamura T. Control of renal hemodynamics during intrarenal and systemic blockade of nitric oxide synthesis in conscious dogs. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1992;20 Suppl 12:S160-S162.
39. Granger JP, Abram S, Stec D, Chandler D, LaMarca B. Endothelin, the kidney, and hypertension. *Curr.Hypertens.Rep.* 2006;8:298-303.
40. Gray GA, Webb DJ. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol.Ther.* 1996;72:109-48.
41. Hall CV, Jacob PE, Ringold GM, Lee F. Expression and regulation of Escherichia coli lacZ gene fusions in mammalian cells. *J.Mol.Appl.Genet.* 1983;2:101-09.
42. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 1995;92:357-63.
43. Haynes WG, Ferro CJ, O'Kane KP, Somerville D, Lomax CC, Webb DJ. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 1996;93:1860-70.
44. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am.J.Physiol* 1985;248:C550-C556.
45. Hirata K, Miki N, Kuroda Y, Sakoda T, Kawashima S, Yokoyama M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ.Res.* 1995;76:958-62.
46. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K et al. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J.Clin.Invest* 1993;91:1367-73.
47. Hocher B, Rohmeiss P, Diekmann F, Zart R, Vogt V, Schiller S et al. Distribution of endothelin receptor subtypes in the rat kidney. Renal and haemodynamic effects of the mixed (A/B) endothelin receptor antagonist bosentan. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1995;33:463-72.
48. Hocher B, Zart R, Diekmann F, Rohmeiss P, Distler A, Neumayer HH et al. Paracrine renal endothelin system in rats with liver cirrhosis. *Br.J.Pharmacol.* 1996;118:220-27.

49. Hocher B, Rohmeiss P, Zart R, Diekmann F, Vogt V, Metz D et al. Function and expression of endothelin receptor subtypes in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc.Res.* 1996;31:499-510.
50. Hocher B, Thone-Reineke C, Bauer C, Raschack M, Neumayer HH. The paracrine endothelin system: pathophysiology and implications in clinical medicine. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1997;35:175-89.
51. Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmagar F, Slowinski T, Burst V et al. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J.Clin.Invest* 1997;99:1380-89.
52. Hocher B, Dembowski C, Slowinski T, Friese ST, Schwarz A, Siren AL et al. Impaired sodium excretion, decreased glomerular filtration rate and elevated blood pressure in endothelin receptor type B deficient rats. *J.Mol.Med.* 2001;78:633-41.
53. Hocher B, Schwarz A, Slowinski T, Bachmann S, Pfeilschifter J, Neumayer HH et al. In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin. *J.Hypertens.* 2004;22:111-19.
54. Hori S, Komatsu Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology* 1992;130:1885-95.
55. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994;79:1267-76.
56. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N.Engl.J.Med.* 2004;351:1425-36.
57. Iijima K, Lin L, Nasjletti A, Goligorsky MS. Intracellular signaling pathway of endothelin-1. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1991;17 Suppl 7:S146-S149.
58. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J.Biol.Chem.* 1989;264:14954-59.
59. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989;86:2863-67.

60. Iqbal J, Sanghia R, Das SK. Endothelin receptor antagonists: an overview of their synthesis and structure-activity relationship. *Mini.Rev.Med.Chem.* 2005;5:381-408.
61. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem.J.* 1979;11:447-55.
62. Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, Orzechowski HD, Mittmann C, Koster R et al. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2000;32:1429-37.
63. Kauser K, Da C, V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000;278:H1679-H1685.
64. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2001;41:851-76.
65. Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugita Y, Yanagisawa M et al. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 1989;13 Suppl 5:S5-S7.
66. Kloog Y, Sokolovsky M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol.Sci.* 1989;10:212-14.
67. Kohan DE. Production of endothelin-1 by rat mesangial cells: regulation by tumor necrosis factor. *J.Lab Clin.Med.* 1992;119:477-84.
68. Kohan DE. Endothelins in the kidney: physiology and pathophysiology. *Am.J.Kidney Dis.* 1993;22:493-510.
69. Kohan DE. Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am.J.Kidney Dis.* 1997;29:2-26.
70. Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Horio T, Fukui T et al. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am.J.Med.* 1990;88:614-18.
71. Kolb-Bachofen V, Kuhn A, Suschek CV. The role of nitric oxide. *Rheumatology* 2006;iii17-iii19.
72. Korth P, Bohle RM, Corvol P, Pinet F. Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J.Histochem.Cytochem.* 1999;47:447-62.

73. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N.Engl.J.Med.* 1998;338:784-90.
74. Kuc R, Davenport AP. Comparison of Endothelin-A and Endothelin-B Receptor Distribution Visualized by Radioligand Binding versus Immunocytochemical Localization using Subtype Selective Antisera. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2004;44 Suppl 1:S224-S226.
75. Kuwaki T, Kurihara H, Cao WH, Kurihara Y, Unekawa M, Yazaki Y et al. Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse. *Prog.Neurobiol.* 1997;51:545-79.
76. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am.J.Physiol* 1991;261:F1033-F1037.
77. Lange M, Pagotto U, Renner U, Arzberger T, Oeckler R, Stalla GK. The role of endothelins in the regulation of pituitary function. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 2002;110:103-12.
78. Langenstroer P, Tang R, Shapiro E, Divish B, Opgenorth T, Lepor H. Endothelin-1 in the human prostate: tissue levels, source of production and isometric tension studies. *J.Urol.* 1993;150:495-99.
79. Lariviere R, Lebel M. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 2003;81:607-21.
80. Lee SH, Channick RN. Endothelin antagonism in pulmonary arterial hypertension. *Semin.Respir.Crit Care Med.* 2005;26:402-08.
81. Lerman A, Sandok EK, Hildebrand FL, Jr., Burnett JC, Jr. Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation* 1992;85:1894-98.
82. Li JS, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment of adult spontaneously hypertensive rats with an endothelin receptor antagonist. *Hypertension* 1995;25:495-500.
83. Lichtig C, Levy J, Gershon D, Reznick AZ. Effect of aging and exercise on the kidney. Anatomical and morphological studies. *Gerontology* 1987;33:40-48.
84. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann.Intern.Med.* 1994;120:227-37.
85. Madeddu P, Yang XP, Anania V, Troffa C, Pazzola A, Soro A et al. Efficacy of nifedipine to prevent systemic and renal vasoconstrictor effects of endothelin. *Am.J.Physiol* 1990;259:F304-F311.

86. Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA. Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr.Med.Chem.* 2006;13:1655-65.
87. Martin P, Tzanidis A, Stein-Oakley A, Krum H. Effect of a highly selective endothelin-converting enzyme inhibitor on cardiac remodeling in rats after myocardial infarction. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2000;36:S367-S370.
88. Masaki T, Vane JR, Vanhoutte PM. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol.Rev.* 1994;46:137-42.
89. Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol.Sci.* 2004;25:219-24.
90. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1989;164:74-80.
91. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J.Clin.Invest* 1997;100:2146-52.
92. Miller JH. The operon, In: Miller JH, editor. *Experiments in molecular genetics.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972. p. 31-88.
93. Miller JH. The lacZ gene: its role in lac operon control and its use as a genetic system, In: Miller JH, editor. *Experiments in molecular genetics.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972. p. 31-88.
94. Miwa S, Iwamuro Y, Zhang XF, Inoki T, Okamoto Y, Okazawa M et al. Ca²⁺ entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn.J.Pharmacol.* 1999;80:281-88.
95. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu.Rev.Physiol* 1999;61:391-415.
96. Moreau C, Lariviere R, Kingma I, Grose JH, Lebel M. Chronic nitric oxide inhibition aggravates hypertension in erythropoietin-treated renal failure rats. *Clin.Exp.Hypertens.* 2000;22:663-74.
97. Moridaira K, Nodera M, Sato G, Yanagisawa H. Detection of prepro-ET-1 mRNA in normal rat kidney by in situ RT-PCR. *Nephron Exp.Nephrol.* 2003;95:e55-e61.
98. Motte S, McEntee K, Naeije R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol.Ther.* 2006;110:386-414.
99. Nakas-Icindic E, Zaciragic A, Hadzovic A, Avdagic N. Endothelin in health and disease. *Bosn.J.Basic Med.Sci.* 2004;4:31-34.

100. Nakov R, Pfarr E, Eberle S. Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am.J.Hypertens.* 2002;15:583-89.
101. Nambi P, Pullen M, Kumar C. Identification of a novel endothelin receptor in *Xenopus laevis* liver. *Neuropeptides* 1994;26:181-85.
102. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J.Clin.Invest* 1997;100:2417-23.
103. Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS. In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J.Clin.Invest* 1996;97:2377-83.
104. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J.Clin.Invest* 1998;102:2061-71.
105. Ohuchi T, Kuwaki T, Ling GY, Dewit D, Ju KH, Onodera M et al. Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of the ETB receptor in mice. *Am.J.Physiol* 1999;276:R1071-R1077.
106. Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, Koller-Strametz J, Berger R, Schuller M et al. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1996;27:633-41.
107. Patocka J, Merka V, Hrdina V, Hrdina R. Pharmacological potential of endothelin receptors agonists and antagonists. *Acta Medica.(Hradec.Kralove)* 2005;48:67-73.
108. Patzak A, Bontscho J, Lai E, Kupsch E, Skalweit A, Richter CM et al. Angiotensin II sensitivity of afferent glomerular arterioles in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2005;20:2681-89.
109. Pereira LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Glomerular profile numerical density per area and mean glomerular volume in rats submitted to nitric oxide synthase blockade. *Histol.Histopathol.* 2001;16:15-20.
110. Pfeilschifter J, Kunz D, Muhl H. Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron* 1993;64:518-25.
111. Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, Dewit D, Yanagisawa M et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 1994;79:1257-66.

112. Qiu C, Engels K, Baylis C. Endothelin modulates the pressor actions of acute systemic nitric oxide blockade. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1995;6:1476-81.
113. Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab 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.* 2007;18:730-40.
114. Radomski MW, Salas E. Nitric oxide--biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1995;118 Suppl:S69-S80.
115. Raji L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.* 1984;26:137-43.
116. Redmond EM, Cahill PA, Hodges R, Zhang S, Sitzmann JV. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J.Cell Physiol* 1996;166:469-79.
117. Rossi GP, Colonna S, Pavan E, Albertin G, Della RF, Gerosa G et al. Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. *Circulation* 1999;99:1147-55.
118. Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K et al. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:11609-13.
119. Schinelli S. Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. *Curr.Med.Chem.* 2006;13:627-38.
120. Sernerri GG, Cecioni I, Vanni S, Paniccia R, Bandinelli B, Vetere A 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.* 2000;86:377-85.
121. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:13176-81.
122. Sibilina M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995;269:234-38.
123. Simonson MS, Wang Y, Dunn MJ. Cellular signaling by endothelin peptides: pathways to the nucleus. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1992;2:S116-S125.
124. Simonson MS, Dunn MJ. Renal actions of endothelin peptides. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 1993;2:51-60.

125. Sitbon O, Badesch DB, Channick RN, Frost A, Robbins IM, Simonneau G et al. Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest* 2003;124:247-54.
126. Slowinski T, Schulz N, Ruschitzka FT, Quaschnig T, Bauer C, Theuring F et al. Pattern of prepro-endothelin-1 expression revealed by reporter-gene activity in kidneys of erythropoietin-overexpressing mice. *Clin.Sci.(Lond)* 2002;103 Suppl 48:44S-7S.
127. Slowinski T, Kalk P, Christian M, Schmager F, Relle K, Godes M et al. Cell-type specific interaction of endothelin and the nitric oxide system: pattern of prepro-ET-1 expression in kidneys of L-NAME treated prepro-ET-1 promoter-lacZ-transgenic mice. *J.Physiol* 2007;581:1173-81.
128. Spieker LE, Luscher TF. Protection of endothelial function. *Handb.Exp.Pharmacol.* 2005;619-44.
129. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992;258:1898-902.
130. Stewart DJ, Zhao YD, Courtman DW. Cell therapy for pulmonary hypertension: what is the true potential of endothelial progenitor cells? *Circulation* 2004;109:e172-e173.
131. Susic D. Renal protective potential of antihypertensive drugs. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 2000;9:2593-600.
132. Suzuki S, Kajikuri J, Suzuki A, Itoh T. Effects of endothelin-1 on endothelial cells in the porcine coronary artery. *Circ.Res.* 1991;69:1361-68.
133. Takizawa S, Uchida T, Adur J, Kozakai T, Kotake-Nara E, Quan J et al. Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract. *J.Mol.Endocrinol.* 2005;35:201-09.
134. Teichert AM, Miller TL, Tai SC, Wang Y, Bei X, Robb GB et al. In vivo expression profile of an endothelial nitric oxide synthase promoter-reporter transgene. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2000;278:H1352-H1361.
135. Theuring F, Gotz W, Balling R, Korf HW, Schulze F, Herken R et al. Tumorigenesis and eye abnormalities in transgenic mice expressing MSV-SV40 large T-antigen. *Oncogene* 1990;5:225-32.
136. Theuring F, Aguzzi A, Kropp C, Wohn KD, Hoffmann S, Schleuning WD. Analysis of the human tissue-type plasminogen activator gene promoter activity during embryogenesis of transgenic mice and rats. *Fibrinolysis* 1995;9:277-87.

137. Thone-Reineke, C. Charakterisierung human Endothelin 1 transgener Mäuse. Dissertation, Institut für Veterinärphysiologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, 1997.
138. Tijssen P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Amsterdam: Elsevier; 1985.
139. Torre-Amione G, Young JB, Colucci WS, Lewis BS, Pratt C, Cotter G et al. Hemodynamic and clinical effects of tezosentan, an intravenous dual endothelin receptor antagonist, in patients hospitalized for acute decompensated heart failure. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2003;42:140-47.
140. Touyz RM, Schiffrin EL. Role of endothelin in human hypertension. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 2003;81:533-41.
141. Ujiie K, Terada Y, Nonoguchi H, Shinohara M, Tomita K, Marumo F. Messenger RNA expression and synthesis of endothelin-1 along rat nephron segments. *J.Clin.Invest* 1992;90:1043-48.
142. Vallon V, Thomson S. Inhibition of local nitric oxide synthase increases homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback. *Am.J.Physiol* 1995;269:F892-F899.
143. Vaziri ND. Effect of chronic renal failure on nitric oxide metabolism. *Am.J.Kidney Dis.* 2001;38:S74-S79.
144. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998;97:752-56.
145. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998;97:752-56.
146. Wagner FD, Buz S, Knosalla C, Hetzer R, Hoher B. Modulation of circulating endothelin-1 and big endothelin by nitric oxide inhalation following left ventricular assist device implantation. *Circulation* 2003;108 Suppl 1:II278-II284.
147. Warner TD, Schmidt HH, Murad F. Interactions of endothelins and EDRF in bovine native endothelial cells: selective effects of endothelin-3. *Am.J.Physiol* 1992;262:H1600-H1605.
148. Welch WJ, Deng X, Snellen H, Wilcox CS. Validation of miniature ultrasonic transit-time flow probes for measurement of renal blood flow in rats. *Am.J.Physiol* 1995;268:F175-F178.

149. Wende P, Strauch M, Unger T, Gretz N, Rohmeiss P. [Autoregulation of kidney circulation, glomerular filtration rate and plasma renin activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar rats]. *Med.Klin.(Munich)* 1993;88:207-11.
150. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R et al. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992;89:11993-97.
151. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda S et al. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J.Clin.Invest* 2000;105:1373-82.
152. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-15.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern für die beständige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Diese Arbeit konnte darüber hinaus nur durch die qualifizierte Kritik und Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. Berthold Hocher zustande kommen, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Herrn Dr. med. Georg Christian, für dessen ausdauernde Hilfe und Geduld.

Ich bedanke mich des weiteren bei Herrn Prof. Dr. Franz Theuring für die Möglichkeit, mit den in seiner Arbeitsgruppe gezüchteten transgenen Mäusen zu arbeiten.

Mein Dank gilt darüber hinaus dem gesamten Team der Arbeitsgruppe und im Besonderen Herrn Dr. med. Torsten Slowinski am Center for Cardiovascular Research / Institute of Pharmacology der Charité in Berlin für die Hilfe bei der Konzeption, Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Natürlich gilt mein Dank auch den freundlichen Korrekturlesern dieser Arbeit, Frau Ninja Süßenbach und meinem Ehemann.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publizierte Ergebnisse

Die Ergebnisse der ET-1-Lokalisierung und Interaktionsbetrachtung von ET-1 mit NO im Nierengewebe wurden im Einverständnis mit dem Betreuer dieser Dissertation, Herrn Prof. Dr. med Berthold Hofer vorab veröffentlicht in:

- Slowinski T, Kalk P, Christian M, Schmager F, Relle K, Godes M et al. Cell-type specific interaction of endothelin and the nitric oxide system: pattern of prepro-ET-1 expression in kidneys of L-NAME treated prepro-ET-1 promoter-lacZ-transgenic mice. *J.Physiol* 2007;581:1173-81.

Eidstattliche Erklärung

Ich, Maren Christian, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Zell-typspezifische Interaktion zwischen Endothelin und dem NO-System: Verteilungsmuster der ET-1-Expression in mit L-NAME behandelten Nieren von präpro-ET-1-LacZ-transgenen Mäusen“ selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum:

Unterschrift: