

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für klinische Pharmakologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. I. Roots

EXPRESSION DER ENDOTHELIN-REZEPTOREN UND
INTERAGIERENDER VASOAKTIVER SYSTEME IN EINEM
TRANSGENEN RATTENMODELL MIT
GLATTMUSKELSPEZIFISCHER EXPRESSION DES HUMANEN
ENDOTHELIN-A REZEPTORS

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen
Doktorwürde
Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von: Stefan Kliesch

aus: Potsdam

Gutachter:

1. Privatdozent Dr. med. Hans-Dieter Orzechowski
2. Prof. Dr. med. F.C. Luft
3. Prof. Dr. med. A.R. Pries

:

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am 13.01.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1 Danksagung.....	5
2. Abkürzungsverzeichnis	6
3 Einleitung.....	9
3.1. Überblick Endothelinsystem.....	9
3.1.1. Endotheline	9
3.1.2. Endothelin Converting Enzyme (ECE)	11
3.1.3. Die Endothelin-Rezeptoren	13
3.1.4. Regulation des Endothelinsystems	15
3.1.5. Alpha-1 adrenerge Rezeptoren	17
3.1.6. Pathophysiologische Bedeutung des Endothelinsystems	17
3.1.6.1. Kardiovaskuläres System	18
3.1.6.2. Pulmonales System	19
3.1.6.3. Zentrales Nervensystem	20
3.2. Funktionsmodelle G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	21
3.3. Transgene Tiermodelle.....	22
3.3.1. Geschichtlicher Überblick.....	22
3.3.2. Pronukleäre Mikroinjektion.....	23
3.3.2.1. Aufbau des transgenen Konstruktes	24
3.3.3. Transgene Tiermodelle des Endothelinsystems	24
4. Fragestellung.....	26
5. Material und Methoden	27
5.1. Genotypisierung.....	27
5.1.1. DNA-Extraktion aus Rattenschwanzspitzen	27
5.1.2. DNA-Konzentrationsbestimmung	27
5.1.3. PCR-Analyse des Transgenstatus	28
5.1.4. Visualisierung der PCR-Produkte mittels Agarose-Ethidiumbromid Gel	28
5.1.5. Realtime SYBR-Green Untersuchungen zur Bestimmung des Zygotiestatus und der Transgenkopienanzahl	29
5.1.6. PCR zur Untersuchung auf das Vorliegen multipler Kopien.....	30
5.2. RNA-Expression	31
5.2.1. Rattentötung	31
5.2.2. Organentnahme	31
5.2.3. RNA-Extraktion	32
5.2.4. RNA-Konzentrationsbestimmung und Lagerung	34
5.2.5. DNase Dau	34
5.2.6. RNA-Qualitätskontrolle mittels RNA-Chip	35
5.2.7. Reverse Transkription	36
5.2.7.1. Reverse Transkription für konventionelle RT-PCR	36
5.2.7.2. Reverse Transkription für quantitative Realtime-PCR	37
5.2.7.3. Lagerung.....	37
5.2.8. Konventionelle PCR Untersuchungen mit cDNA von Organen und Gefäßen	37
5.2.9. Realtime PCR mit aortaler- und mesenterialarterieller cDNA	38
5.2.9.1. Bestimmung der relativen Expression durch Primer-Sonden Realtime-PCR	38
5.2.9.2. Datenauswertung	41
5.2.9.3. Bestimmung der relativen Expression durch SYBR-Green basierte Realtime-PCR.....	43
5.2.10. Grafische und statistische Auswertung	43
5.3. Materialien.....	44

6. Ergebnisse.....	50
6.1. Auswertung genomischer Ergebnisse	50
6.1.1. Identifizierung transgener Ratten mittels genomischer PCR	50
6.1.2. Analyse des Zygostatus transgener Tiere.....	50
6.1.3. Bestimmung der Anzahl genomisch integrierter transgener Kopien	53
6.1.4. Nachweis in gleichsinniger Orientierung angeordneter Transgenkopien.....	54
6.2. Qualitative Analyse der humET _A R mRNA-Expression	55
6.2.1. Postnatale Expression	55
6.2.2. Transgenexpression nach einem Monat	57
6.2.3. Expression nach vier Monaten und nach einem Jahr.....	58
6.3. Quantifizierung der RNA-Expression mittels Realtime-PCR.....	59
6.3.1. Effekt der verwendeten DNase auf die Signalstärke	59
6.3.2. Amplifikationseffizienzen (AE).....	59
6.3.3. RNA-Expression des Transgens bei einen Monat bzw. einen Jahr alten Tieren	60
6.3.4. RNA-Expression des endogenen ET _A R in einen Monat bzw. einen Jahr alten Tieren.....	61
6.3.5. Bestimmung der RNA-Gesamttranskriptmenge des Endothelin-A Rezeptors	64
6.3.6. RNA-Expression von humanen- und endogenen ET _A R in transgen-homozygoten und heterozygoten Tieren von L6878	66
6.3.7. RNA-Expression des endogenen ET _B R in einen Monat bzw. einen Jahr alten Tieren.....	67
6.3.8. Auswirkungen auf alpha1-adrenerge Rezeptoren.....	68
6.3.9. RNA-Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen GRK2 und GRK3	70
6.3.10. Zusammenhang zwischen alpha1B adrenerger mRNA-Rezeptorexpression und mRNA Expression von GRK2	71
7. Diskussion	73
7.1. Insertion des Transgens.....	73
7.2. Expression.....	75
7.2.1. Expression des Transgens	75
7.2.2. Expression des Transgens in Abhängigkeit von der Anzahl genomisch integrierter Transgenkopien	77
7.2.3. Expression des endogenen ET _A R	79
7.2.4. Expression des endogenen ET _B R	81
7.2.5. Expression der alpha1-adrenergen Rezeptoren.....	82
7.2.6. Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen 2 und 3.....	83
7.3. Methodische Diskussion.....	84
7.3.1. Zygostatusbestimmung mittels SYBR-Green basierter Real-Time PCR	84
7.3.2. Bewertung der Realtime-PCR ermittelten Expressionsdaten	86
8. Zusammenfassung.....	88
9. Lebenslauf	90
10. Veröffentlichungen.....	91
11. Literaturverzeichnis	92

1 Danksagung

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während meiner beruflichen Ausbildung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn PD Dr. Hans Dieter Orzechowski gilt mein herzlicher Dank dafür, dass ich unter seiner Betreuung diese Promotion anfertigen konnte. Besonders danke ich ihm für die stetige Förderung und Motivation, sowie für die Gewährung der mir eingeräumten wissenschaftlichen Freiheiten.

Herrn Dr. Frank Zollmann danke ich für die konstruktiven und kritischen Anmerkungen zur gesamten Arbeit und die sehr hilfreiche und zuverlässige Korrektur der Manuskripte.

Frau Schwaneberg danke ich für die Einführung in die Arbeit am Institut sowie die vielen technischen Unterstützungen während der Promotionsarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen, insbesondere Herrn Dr. Markus Wehland für die technische Unterstützung bei der Realtime-PCR.

Außerdem danke ich allen Mit-Doktorandinnen und Doktoranden für die freundschaftliche, konstruktive und immer kooperative Zusammenarbeit: Insbesondere Juliane Bremer, Ali Kassab Bachi, Simone Geschwend und Amit Saxena.

Zusätzlich danke ich Katharina Bülow für die Hilfe bei der grafischen Gestaltung von Abbildungen.

2. Abkürzungsverzeichnis

A	lat.: Arteria (Arterie)
Aa	lat.: Arteriae (Arterien)
Abb	Abbildung
AC	Adenylatcytclase
ACE	engl.: angiotensin converting enzyme (Angiotensin Konversionsenzym)
AE	Amplifikationseffizienz in der Realtime-PCR
alpha1A/B/D	alpha-1 adrenerge Rezeptoren A/B/D
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
as	engl.: antisense
AS	Aminosäuren
BAC	engl.: bacterial artificial chromosome
BAL	Bronchalveoläre Lavage
BGH	engl.: bovine growth hormone (Wachstumshormon des Rindes)
bp	engl.: base pairs (Basenpaare)
cAMP	engl.: cyclic AMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cDNA	engl.: complementary DNA (komplementäre DNA)
cGMP	engl.: cyclic GMP (zyklisches Guanosinmonophosphat)
CMV	Cytomegalievirus
CT	CycleTreshold
DAG	Diazylglyzerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH2O	destilliertes Wasser
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	engl.: deoxynucleotide triphosphat (Deoxynukleotid-Triphosphat)
Dox:	Doxicyclin
ECE	engl.: endothelin converting enzyme (Endothelin-Konversionsenzym)
EDCF	engl.: endothelium-derived contraction factor (endothelialer Kontraktionsfaktor)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Endothelin(e)
ET-R	Endothelin-Rezeptor(en)
ET_AR	Endothelin-A Rezeptor(en)
ET_BR	Endothelin-B Rezeptor(en)
FAM	Farbstoffmolekül mit Einsatz in Realtime-PCR
FET	engl. fluorescence energy transfer (Fluorescence-Energie-Übertragung)
Fo	engl.: Founder (Startindividuum)
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
G-Protein	Guaninnukleotidbindendes Protein

GRK	engl.: G Protein-Coupled Receptor Kinase (G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
hDAF	human decay accelerating factor
HI	Herzinfarkt
HkG	Housekeeping-Gen
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
hum	human
HDL	engl.: high density lipoproteins (Lipoproteine hoher Dichte)
HF	Herzfrequenz
HWZ	Halbwertszeit
IP3	Inositol-Triphosphat
iv	intravenös
kb	engl.: kilo base (1000 Basen)
KG	Körpergewicht
LacZ	Gen für Galaktosidase
lat	lateinisch
LDL	engl.: low density lipoproteins (Lipoproteine geringer Dichte)
m	männlich
MHC	engl.: myosine heavy chain (Myosin-Schwerkette)
min	Minute
MLC	engl.: myosine light chain (Myosin-Leichtkette)
MLCK	engl.: MLC kinase (MLC kinase)
MM	Mastermix
mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MW	Mittelwert
Neo	Neomycin
NO	engl.: nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
ns	nicht signifikant
NYHA	engl.: New York Heart Association (Einteilung der Herzinsuffizienz)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl.: polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pCMV	CMV-Promotor
PDGF	engl.: platelet derived growth factor (von Thrombozyten gebildeter Wachstumsfaktor)
PGI	Prostaglandin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C (cGMP-Abhängige Proteinkinase)
PNMI	Pronukleoäre Mikroinjektion
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
pSM22α	SM22 α -Promotor
polyA	Polyadenylierungssignal
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
RNA	engl.: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rat	Ratte(n)

RT	Reverse Transkription
rt-PCR	engl.: reverse transcribed PCR (Reverse-Transkriptions-PCR)
rtTA	engl.: reverse tTA (reverser tTA)
sek	Sekunden
SD	Sprague-Dawley (Rattenstamm)
SEM	engl.: standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SKNMC	humane Tumorzelllinie, die u.a. ET _A R expremiert
SM	engl.: smooth muscle (glatter Muskel)
ss	engl.: sense
SSC	engl.: Saline-sodium citrate
SYBR	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff zum Nachweis von doppelsträngiger DNA
Tab	Tabelle
TAE	engl.: TRIS / Acetic Acid (Essigsäure) / EDTA
TBE	Tris / Borsäure / EDTA
Tet	Tetrazyklin
Tg	Transgen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VIC	engl.: vasoactive intestinal contractor (gefäßaktiver intestinaler Kontraktionsfaktor)
VSMC	engl.: vascular smooth muscle cell(s) (glatte Gefäßmuskelzelle(n))
w	weiblich

3 Einleitung

3.1. Überblick Endothelinsystem

Im Jahre 1988 wurde im Fachjournal Nature von Yanagisawa et al. ein Artikel mit dem Titel „A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells“ veröffentlicht¹. Darin wurde ein aus aortalen und pulmonalen Gefäßendothel isoliertes Oligopeptid beschrieben. Dieses nannte man aufgrund seiner Herkunft Endothelin.

Es wurde jedoch bald erkannt, dass es sich nicht nur um einen sehr potenten Vasokonstriktor handelte, sondern um einen multifunktionellen Botenstoff mit weitreichenden Wirkungen auf den gesamten Organismus.

Insbesondere sind hier Effekte auf die embryonale Entwicklung,² die Karzinogenese,³ die Regulation des Bronchialwiderstandes,⁴ das Prostatawachstum⁵ und weitere gastrointestinale^{6 7} und endokrine Funktionen^{8 9 10} zu nennen.

Aufgrund unterschiedlicher Affinitäten des ET zu seinen Bindungsstellen wurde postuliert, dass es mehrere Rezeptoren geben musste, die als Endothelin-A (ET_AR) und Endothelin-B (ET_BR) Rezeptoren bezeichnet wurden. Diese Rezeptoren unterscheiden sich sowohl in ihrer Bindungsaffinität zum ET-1, als auch in ihrer zellulären Verteilung und Wirkung.^{11 12}

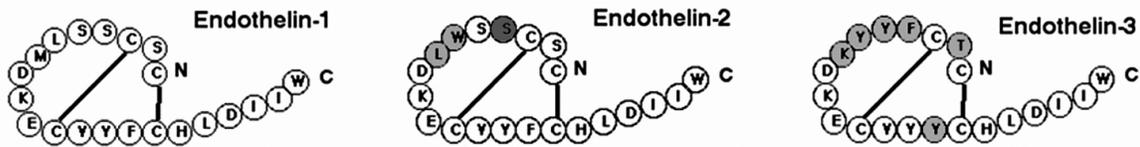
Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Systems ist das Endothelin Converting Enzym (ECE), dessen Aufgabe es ist, die gebildeten Vorläufervarianten des ET in die wirksamen Formen umzuwandeln.

3.1.1. Endotheline

Die Endotheline bilden eine Peptidfamilie, die als ET-1, ET-2 und ET-3 bezeichnet werden.^{13 14 15} Diese unterscheiden sich in ihrer zellulären Verteilung, in ihrer Wirkungsweise und durch unterschiedliche Affinitäten zu den ET-Rezeptoren.

Gemeinsam ist eine Struktur aus 21 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz von ET-2 unterscheidet sich in 2 und die des ET-3 in 6 Positionen von der des ET-1.

Abb.1: Aminosäuresequenz von Endothelin 1, 2 und 3 des Menschen und der Ratte.



ET-2 unterscheidet sich in 2 und ET-3 in 6 Aminosäuren (hellgrau) vom ET-1. Während ET-1 und ET-3 zwischen Mensch und Ratte identisch sind, ist im ET-2 der Ratte an Position 4 (dunkelgrau) Serin durch Asparagin ausgetauscht.

Die Peptidsequenzen von ET-1 und ET-3 stimmen bei Mensch und Ratte überein. Beim ET-2 ist an Position 4 die Aminosäure Serin durch Asparagin ausgetauscht (siehe Abbildung 1).

In der N-terminalen Domäne, welche die Affinität zum Rezeptor bestimmt, besitzt ET-1 zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten in Position 1 und 15 bzw. 3 und 11.

In der die Rezeptorbindungsstelle beinhaltenden C-terminalen Domäne befindet sich ein hydrophober Rest.

Obwohl zuerst im Endothel entdeckt, stellte sich heraus, dass ET-1 auch in anderen Geweben, wie z.B. Gehirn, Niere und Lunge vorhanden ist.¹⁶ ET-2 und ET-3 wurden u.a. im Verdauungstrakt, den Nebennieren und im Gehirn nachgewiesen. Da insbesondere ET-3 in relativ hoher Konzentration im Gehirn vorhanden ist, wird davon ausgegangen, dass es sich um die neuronale Form des ET handelt.^{17 18 19}

Obwohl alle ET-Peptide über Endothelin Typ A Rezeptoren (ET_AR) der glatten Gefäßmuskelzellen in der Lage sind, eine lang anhaltende und starke Vasokonstriktion hervorzurufen, konnte bisher aus den Endothelzellen von Gefäßen nur ET-1 isoliert werden.

Im menschlichen Genom befindet sich das ET-Gen auf dem Chromosomen 6 und die durch Spaltungsvorgänge entstehende wirksame Form ET-1, ist im zweiten Exon kodiert.²⁰ ET-2 und 3 werden durch Gene auf den Chromosomen 1 und 20 kodiert.²¹

Die resultierende mRNA wird in eine Präkursorform des Endothelins translatiert. Hierdurch entsteht das so genannte Präpro-Endothelin. Aus diesem 203 AS umfassenden Protein wird durch weitere endoproteolytische Spaltung, das aus 38 AS bestehende ProET (Big-ET) und im nächsten Schritt die eigentliche, wirksame ET-Form. Dieser letzte Schritt wird u.a. durch das so genannte Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) ausgeführt.

Die Spaltungsstellen von ET-1 und ET-2 befinden sich zwischen Tryptophan₂₁ und Valin₂₂ und die des ET-3 zwischen Tryptophan und Isoleucin.^{22 23 24}

Das so entstehende ET wird überwiegend basolateral sezerniert und wirkt daher v.a. als autokriner bzw. parokriner Faktor.^{25 26} Diese Annahme wird u.a. auch auf die nur kurze Plasmahalbwertszeit des ET von ca. 4-7 Minuten gestützt. Schnell wird es durch ET degradierende Enzyme abgebaut.²⁷ Die physiologische Konzentration im Plasma beträgt daher nur ca. 1 fmol/ μ l.^{28 29}

3.1.2. Endothelin Converting Enzyme (ECE)

Bei den sogenannten ECEs handelt es sich um membrangebundene Zink-Metalloproteasen der Neprilysinfamilie, von denen bisher 3 Isoformen bekannt sind, die sich insbesondere aufgrund ihrer Lokalisation und des pH-Wertes ihrer maximalen Aktivität unterscheiden. Weiterhin differieren sie in ihrer Sensitivität gegenüber Phosphoramidon.

Das ECE-1, von welchem weitere 4 Isoformen bekannt sind (ECE-1 a, b, c, d) wird auf der Oberfläche unterschiedlicher Zellen exprimiert und hat sein Wirkungsoptimum bei einem neutralen pH-Wert. Es spaltet Big-ET sowohl intra- als auch extrazellulär.³⁰

Da ECE-2 sein Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von ca. 5,8 aufweist ist es v.a. für die intrazelluläre Spaltung von Proendothelin verantwortlich.³¹ Seine Sensitivität gegenüber Phosphoramidon ist ca. 200fach höher als die des ECE-1³².

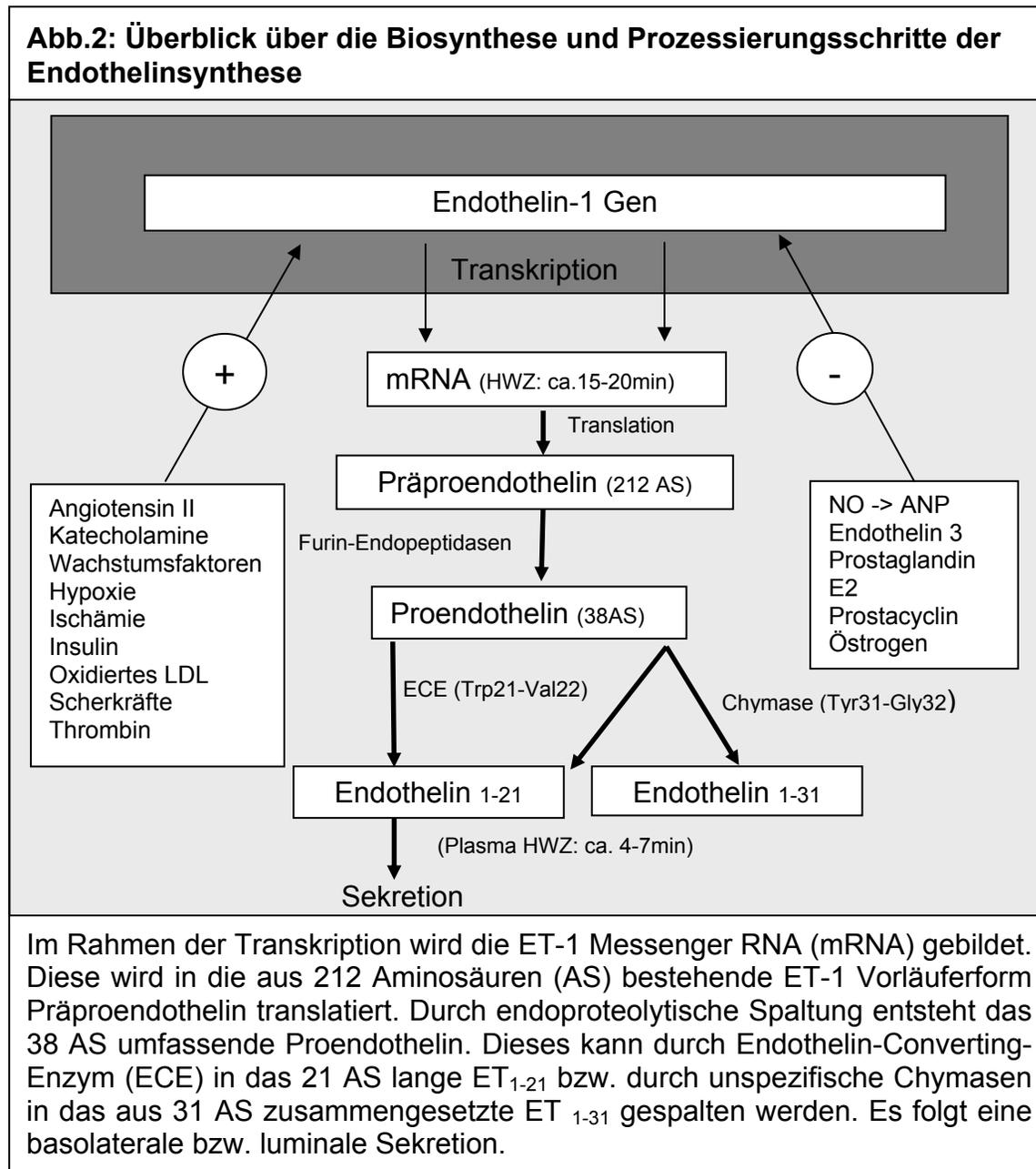
Die Affinität der Enzyme zu den Isoformen des Big-ET ist in vitro für Big-ET-1 im Vergleich zu Big-ET-2 bzw.3 am höchsten. Das bisher nur biochemisch charakterisierte ECE-3 führt zu einer spezifischen Umwandlung von Big-ET-1 in ET-3.³³

ECE sind auf weiteren Zellen zu finden, wie z.B. auf Endothelzellen^{34 35}, glatten Muskelzellen^{36 37 38}, Cardiomyozyten^{39 40} und Makrophagen.^{41 42}

Da in ECE-Knock-out Mäusen die ET-Plasma Konzentration nur um ein Drittel erniedrigt wurde, geht man davon aus, das es weitere Endothelin generierende Wege geben muss,

wie z.B. durch unspezifische Chymasen, die Big-ET zwischen Tyr₃₁-Gly₃₂ spalten, wodurch das ET-1₁₋₃₁, eine Sonderform des ET, entsteht⁴³.

Die hier beschriebenen Formen der ECE sind jedoch nicht selektiv für die Umwandlung von Big-ET-1, sondern beteiligen sich auch an der Hydrolysierung von Bradykinin, Substanz P und Insulin.^{44 45}



3.1.3. Die Endothelin-Rezeptoren

Im Jahre 1990 konnten zwei Endothelin-bindende Rezeptoren isoliert werden: der Endothelin-A (ET_A R) und der Endothelin-B (ET_B R) Rezeptor. Beide gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und haben eine Molekülgrösse zwischen 45 und 50 kD.

Ein weiterer ET-Rezeptor wurde bei der Art der *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) gefunden. Dieser so genannte ET_C -Rezeptor hat eine besonders hohe Bindungsaffinität für ET-3.⁴⁶ Ein entsprechender Rezeptor wurde bei Säugetieren bisher nicht nachgewiesen.

Während an den ET_B R ET-1, ET-2 und ET-3 mit ungefähr gleicher Affinität binden⁴⁷, ist der ET_A R relativ spezifisch für das Endothelin-1, welches er mit einer gegenüber dem ET-3 ca. 1000fach höheren Affinität bindet.⁴⁸

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass die durch ET hervorgerufene Vasokonstriktion ausschließlich durch ET_A R auf den glatten Muskelzellen der Gefäße und die Vasodilation durch ET_B R auf den Endothelzellen der Gefäße vermittelt wird. An der V. jugularis und der V.saphena von Kaninchen konnte jedoch gezeigt werden, dass auch ET_B R in den glatten Muskelzellen dieser Gefäße vorhanden sind und dort vasokonstriktorisch wirken.^{49 50} Aus dieser Erkenntnis wurde postuliert, dass es zwei verschiedene ET_B R geben müsse. Anhand unterschiedlicher pharmakologischer Eigenschaften unterschied man daher ab 1993 den auf dem Gefäßendothel sitzenden und vasodilatatorisch wirkenden ET_B1 R und den auf den glatten Gefäßmuskelzellen befindlichen und vasokonstriktorisch wirkenden ET_B2 R.⁵¹ Weiterhin wurden auch ET_B R auf Makrophagen beschrieben.⁵²

Durch die Bindung von ET an den ET_A R kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die dann Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) freisetzt. Durch die darauf folgende Freisetzung von Calcium (Ca^{2+}) aus intrazellulären Speichern kommt es zu einer Vasokonstriktion.^{53 54 55 56 57} Weiterhin wird angenommen, dass es auch zur Phosphorylierung von IP3 kommt, wodurch dann Inositoltetraphosphat entsteht, welches zu einer Verstärkung der Durchlässigkeit von Ca^{2+} -Kanälen führt. Die dadurch ausgelöste Depolarisation der Zelle führt zu einer Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ, die zu der lang anhaltenden Vasokonstriktion beitragen.^{58 59 60 61 62 63 64 65}

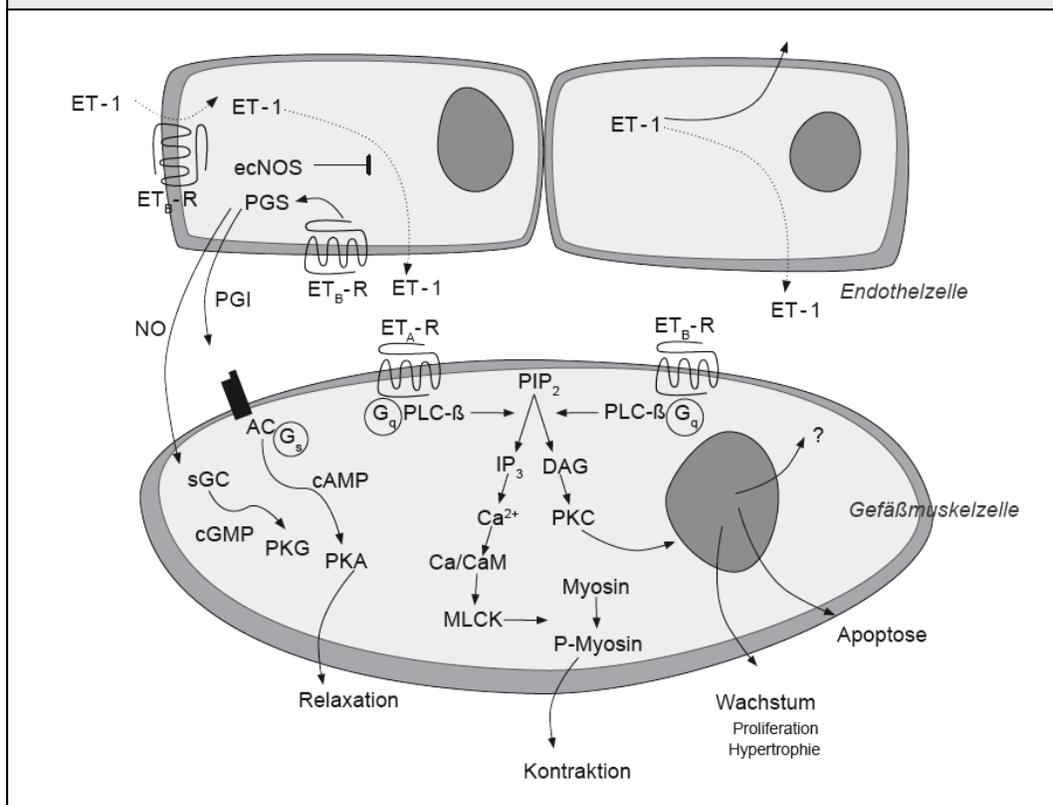
Das entstandene DAG führt zusätzlich zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche nun einen Proliferationsreiz in einer Reihe unterschiedlicher Gewebe auslösen kann. Zu diesen gehören z.B. glatte Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten.^{66 67 68 69 70 71}

Nach intravenöser ET-1 Zufuhr ist ein initialer Blutdruckabfall, gefolgt von einem lang anhaltenden Blutdruckanstieg zu beobachten. Da der hypotone Effekt bei niedrigerer ET-Konzentrationen stärker und bei zunehmender Konzentration geringer ausfällt, ist davon auszugehen, dass bei geringen ET-Konzentrationen v.a. die endothelialen ET_BR aktiviert werden. Diese führen über NO- und Prostacyclinfreisetzung zu einer Aktivierung der löslichen Guanylcyclase und so zu einem Anstieg von zyklischem Guanin-Mono-Phosphat (cGMP), welches dann eine Relaxation der betroffenen glatten Gefäßmuskulatur auslöst. Bei steigenden ET-1 Konzentrationen ist das ET verstärkt in der Lage, das Endothel zu durchdringen und dadurch an die ET_AR der glatten Gefäßmuskelzellen zu binden um so einen vasokonstriktorisches Effekt auszulösen.⁷²

Weiterhin wurde beschrieben, dass die Affinität von Endothelin zu endothelialen Rezeptoren größer als zu muskulären Rezeptoren ist.⁷³ Bei Schädigung des Endothels bzw. bei hohen ET-Konzentrationen überwiegt deshalb die Blutdruck erhöhende Komponente des ET.⁷⁴

Weitere wichtige Funktionen der ET_BR sind die pulmonale Clearance von zirkulierendem ET-1,⁷⁵ Hemmung der Apoptose⁷⁶ und der ECE-1 Expression in endothelialen Zellen.⁷⁷ Eine Übersicht der Signaltransduktionswege von ET_AR und ET_BR zeigt Abbildung 3.

Abb. 3: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege der Endothelinrezeptoren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von HD Orzechowski, unveröffentlicht)



3.1.4. Regulation des Endothelinsystems

Systemisch ist das ET-1 v.a. an der Aufrechterhaltung der basalen Vasomotorenfunktion beteiligt und ist einer der potentesten endogenen Vasokonstriktoren mit einer ca. 100fach stärkeren Wirkung als Norepinephrin. Weiterhin potenziert es die Wirkung anderer Vasokonstriktoren. Katecholamine wiederum verstärken die Wirkung von ET.⁷⁸

Da die Endothelzellen nicht in der Lage sind, ET zu speichern und bei Bedarf abzugeben muss Regulation auf Expressionsebene erfolgen.⁷⁹

Als wichtige Stimuli für die ET-Synthese haben sich Hypoxie, Ischämie und auf das Gefäß einwirkende Scherkräfte herausgestellt. Weitere wichtige Beeinflussung erfährt die ET-Synthese auf neurohumeralem Weg: Substanzen wie z.B. Angiotensin II, Vasopressin, Thrombin, HDL, LDL und Insulin führen zu einer Heraufregulation der ET-Synthese. Als weitere Aktivatoren gelten TGF-β, IGF-1, EGF und bFGF (basic fibroblast growth factor).⁸⁰

Innerhalb von Minuten wird bei Auftreten dieser Reize die mRNA Produktion gesteigert. Die so entstandene RNA besitzt eine Halbwertszeit von 15 bis 20 Minuten.⁸¹ Das gebildete Präpro-ET wird auf oben beschriebener Art und Weise weiter prozessiert und überwiegend in das basolaterale Kompartiment abgegeben. Der luminal sezernierte Rest wird in der Lunge bei der ersten Passage zu ca. 80-90 % abgebaut und besitzt eine Plasma-HWZ von 4-7 Minuten.⁸²

Die ET-Synthese nimmt selbst Einfluss auf die Produktion und Wirkung anderer Hormone. So ist ET-1 z.B. via ACE ein wichtiger Stimulator bei der Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II und regt so indirekt die Aldosteronsynthese an.⁸³

Andererseits kann ET-1 auch eine Ausschüttung des Atrialen Natriuretischen Peptids (ANP) bewirken⁸⁴ und so der systemischen Vasokonstriktion entgegensteuern.

Wichtige Aktivatoren der ET-Rezeptorexpression von Endothel- und glatten Muskelzellen sind, ähnlich wie bei der Regulation der ET-Expression, Hypoxie und Cyclosporine. Weiterhin spielen der Epidermale growth Faktor (EGF), cAMP und Östrogene eine Rolle bei der Steigerung der ET-Rezeptorenexpression.⁸⁵

ANP und Angiotensin II führen hingegen zu einer Steigerung der ET_BR Expression.

Da die ET-Rezeptoren zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Wirkungsweise siehe unten) gehören, sind, neben der Regulation auf Expressionsebene, insbesondere die durch eine Dauerstimulation von ET_AR durch ET-1 ausgelöste Rezeptorinaktivierung über Phosphorylierung und Internalisierung wichtige Kontrollmechanismen für die Rezeptorsteuerung. Diese Phosphorylierung an den zytoplasmatischen Serin- und Threonin-reichen Enden des Rezeptors kann durch zwei unterschiedliche Proteinkinasen erfolgen: den cAMP-abhängigen PKC-Isoformen und durch die GRKs (GRK: G-protein-coupled receptor kinase), welche insbesondere zu einer Deaktivierung von Agonist aktivierten Rezeptormolekülen führen.⁸⁶

Es wird angenommen, dass durch GRK-abhängige Rezeptorphosphorylierung, das inhibitorisch wirkende Protein Arrestin am Rezeptor binden kann, was zu einer Auflösung der Verbindung von G-Protein und Rezeptorbindungsstelle führt. Diese homologe Desensibilisierung kann innerhalb von Sekunden bzw. Minuten auftreten. Experimentell konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Inhibition von GRK2 zu einer verminderten ET_{A/B}R Desensibilisierung führt.⁸⁷

3.1.5. Alpha-1 adrenerge Rezeptoren

Alpha-1 adrenerge Rezeptoren gehören, wie die ET-R zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und besitzen 7-Transmembrandomänen. Endogene Liganden dieser Rezeptoren sind Katecholamine. Aufgrund unterschiedlicher pharmakologischer Eigenschaften unterscheidet man den alpha1A, B und D-Rezeptor. Klinisch bedeutsam sind insbesondere ihre Wirkungen auf die arterielle Hypertonie, Myokardhypertrophie, Prostatahyperplasie und kardiale Inotropie.

Während alpha1B Rezeptoren vor allem auf Zelloberflächen anzutreffen sind, kommen alpha1A und D zusätzlich in Nukleus-nahen Vesikeln und im Zytoplasma verstreut vor. Alpha 1B und 1D Rezeptoren werden bei lang anhaltender Agonist-Stimulation herunterreguliert sowie über Phosphorylierung funktionell deaktiviert. Dahingegen führt Stimulation der alpha1A Rezeptoren zu einer Zunahme der Rezeptordichte und Rezeptoraktivierung.⁸⁸

An isolierten Fibroblasten konnte bereits gezeigt werden, dass die Daueraktivierung von ET_AR zu einer alpha1B Rezeptorphosphorylierung und Inaktivierung führt. Dieser Effekt war sogar stärker ausgeprägt als die über den endogenen Agonisten Norepinephrin ausgelöste homologe Rezeptordesensibilisierung.⁸⁹

GRKs führen, wie bei den ET-R, auch bei den alpha-1 adrenergen Rezeptoren via Phosphorylierung zu einer Rezeptordeaktivierung.

3.1.6. Pathophysiologische Bedeutung des Endothelinsystems

In Studien hat sich gezeigt, dass das ET-System bei einer Reihe von Erkrankungen aktiviert ist und dazu beiträgt, diese zu unterhalten bzw. in ihrer Ausprägung zu beeinflussen. Aufgrund der vielen verschiedenen Wirkungsweisen und der ausgeprägten Beziehungen der einzelnen Komponenten des Systems untereinander und mit anderen regulierenden Faktoren im Körper, hat sich ein komplexes Bild ergeben, welches bisher nur ansatzweise verstanden und interpretiert werden kann. Die pathophysiologische Bedeutung des ET-Systems ist v.a. nach Schädigungen bestimmter Organsysteme, wie z.B. nach einem Herzinfarkt, Hirninfarkt, Niereninfarkt ect. zu suchen.

3.1.6.1. Kardiovaskuläres System

Obwohl eine wichtige Funktion des ET die Aufrechterhaltung des basalen arteriellen Blutdrucks ist, gibt es bisher wenig direkte Hinweise darauf, dass das ET-System eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Unterhaltung der essentiellen Hypertonie spielt, da die meisten an dieser Krankheit leidenden Menschen keine signifikante Erhöhung der ET-Plasmakonzentration aufweisen. Eine Ausnahme davon scheinen Afroamerikaner darzustellen.^{90 91}

Obwohl die Wirkung des ET v.a. auf parakrinem Weg geschieht, erweist sich die Plasmaspiegelbestimmung bei einer Reihe von Erkrankungen sowohl für die Einschätzung des Schweregrades, als auch für die Langzeitprognose als nützlich. An dieser Stelle ist insbesondere die chronische Herzinsuffizienz zu nennen. Hierbei sind die Plasmakonzentrationen um das 3-4 fache gegenüber der Konzentration in Kontrollgruppen erhöht und korrelieren gut mit dem Schweregrad der Erkrankung.^{92 93}

Die drei Tage nach einem Herzinfarkt gemessene ET-1 Konzentration im Plasma besitzt eine starke Korrelation mit der 1-Jahr Überlebensrate der entsprechenden Patienten.⁹⁴ Korrespondierend konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die Infusion von ET-1 in unphysiologischer Konzentration, zu einer Zunahme des peripheren vaskulären Widerstandes führt und konsekutiv das kardiale Auswurfvolumen vermindert wird.⁹⁵ Durch die ET-1 getriggerte zusätzliche Aldosteroproduktion und die daraus resultierende Salz- und Wasserretention wird diese Entwicklung noch verstärkt.⁹⁶

Weiterhin kann durch intravenöse Applikation von ET-1 die koronare Durchblutung um mehr als 90% gesenkt werden. Bei Ratten wurde gezeigt, dass ein durch experimentellen Koronargefäßverschluss ausgelöster Herzinfarkt in seiner Ausbreitung um 45% gemindert werden kann, wenn man vorher einen ET-Antikörper verabreicht.⁹⁷ Entsprechende bei Hunden durchgeführte Experimente, führten durch die Gabe des ET-1 Antagonisten BQ123 zu vergleichbaren Ergebnissen.⁹⁸

Eine zusammenfassende Darstellung über Veränderungen des zirkulierenden Endothelins und der Endothelinrezeptordichte kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Tab.1: Veränderungen der zirkulierenden Endothelinkonzentration und der Endothelinrezeptordichte bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen.

Erkrankung	zirkulierendes ET-1	ETA _R und ET _B R Dichte	Referenzen
Atherosklerose	↑	↔ / ↑ (ETA-R + ETB-R)	Lerman et al., 1991, Dagassan et al., 1996, Bacon et al., 1996
Angina pectoris -stabil	↔		
-instabil	↑		
Ischämische Herzkrankheit		↓ (Aorta - ETA-R)	Kuc et al., 2000
Herzhypertrophie: - Volumenbelastung	↑	↑ (ETA _R + ET _B R)	Arai et al., 1995 Sakai et al., 1995
- Druckbelastung	↔		
Herzinsuffizienz - NYHA I-II	↑	↔ (ETA _R + ET _B R)	Cody et al., 1992 Thomas et al., 1996
- NYHA III-IV	↑↑		Pönicke et al., 1998
Hypertonie: -leichte arterielle	↔ - ↑	↓ (kardial - ETA _R + ET _B R)	Shichiri et al., 1990 Widimsky et al., 1991
-schwere arterielle	↑	↓ (Aorta, A. pulmonales – ETA _R)	Stewart et al., 1991a Hayzer et al., 1994;
- pulmonale	↑↑	↑ (A. pulmonales - ETB-R)	Kuc et al., 2000 Bauer et al., 2002
Myokardinfarkt	↑↑	↔ (Ventrikel) ↓ (linker Vorhof)	Miyauchi et al., 1989 Stewart et al., 1991b Nambi et al., 1991

3.1.6.2. Pulmonales System

Erwähnenswert ist, dass Asthmapatienten einen erhöhten ET-1 Spiegel in der bronchoalveolären Lavage aufweisen, der nach Behandlung in ca. 75% der Fälle wieder auf Normalniveau abfällt.⁹⁹ Insbesondere scheint hierbei eine ET-vermittelte Aktivierung der Thromboxansynthese eine Rolle zu spielen.¹⁰⁰

Eine weitere wichtige Rolle nimmt das ET-System im Rahmen der pulmonal-arteriellen Hypertonie ein. Hierbei handelt es sich um Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie, welche durch eine Zunahme des Druckes in der pulmonal-arteriellen Strombahn mit konsekutivem Rechtsherzversagen, gekennzeichnet sind. Die pulmonale Hypertonie tritt sowohl als ideopathische, als auch als sekundäre Form im Rahmen von verschiedenen

Kollagenosen, angeborenen systemisch-pulmonalen Shunts, portaler Hypertension und HIV-Infektionen auf (Piertra et al, 1989). Da die pathohistologischen Veränderungen zwischen den ursächlich unterschiedlichen Erkrankungen sehr ähnlich sind, geht man davon aus, dass im Hinblick auf die Lunge ähnliche Endstreckenveränderungen ablaufen. Insbesondere scheinen hier endotheliale Dysfunktionen in der pulmonalen Zirkulation eine Rolle zu spielen. Es kommt im Verlauf zu Vasokonstriktion und Remodeling der Gefäßbahn. Wichtige endothelial-endokrine Faktoren sind die vasodilatatorisch-antimitotisch wirkenden Prostacycline und das NO-System, sowie das vasokonstriktorisch- mitogen wirkende Thromboxan A2 sowie ET-1.¹⁰¹

In einer randomisierten prospektiven klinischen Studie zeigte sich der unspezifische ET_A-R/ET_B-R Blocker Bosentan bei der Behandlung der primären arteriellen Hypertonie der Placebogabe im Hinblick auf das klinische Ergebnis (Gehstreckenzunahme) signifikant überlegen.¹⁰²

3.1.6.3. Zentrales Nervensystem

Ähnlich wie beim Herzinfarkt, können auch beim akuten ischämischen Hirninfarkt erhöhte ET-1 Konzentrationen im Plasma gemessen werden.¹⁰³

Auch die therapierelevante Komplikation von Subarachnoidalblutungen - die um den 4. Tag nach Blutung einsetzenden Vasospasmen, scheinen einen Zusammenhang mit dem ET-System aufzuweisen, da gezeigt werden konnte, dass viele Patienten mit Vasospasmen einen signifikant erhöhten ET-Spiegel im Liquor aufweisen, der bei Komplikationen weiter ansteigt.¹⁰⁴

Weiterhin übernimmt das ET-System im ZNS über ET_BR eine Hemmung der Heraufregulation der Second Messenger- Synthese durch andere Neurotransmitter.¹⁰⁵

Außerdem sind ET-1 und ET-3 die bisher einzigen bekannten Stimulatoren des Na/K/2CL Kotransporters der zentralnervösen kapillären Endothelien und übernehmen somit wichtige Aufgaben bei der Regulation der Blut-Hirn-Schranke.¹⁰⁶ Zugleich ist ET in der Lage, über die Stimulation des Sympathikus, eine zentrale Blutdruckerhöhung zu generieren und die Produktion von ADH anzuregen.^{107 108}

3.2. Funktionsmodelle G-Protein gekoppelter Rezeptoren

G-Protein gekoppelten Rezeptoren befinden sich auf der Zelloberfläche und besitzen 7-Transmembrandomänen. Im intrazellulären Bereich sind sie mit einem Guanin-Nukleotid bindenden, heterotrimeren Protein (G-Protein), bestehend aus einer α -, β - und γ -Untereinheit, assoziiert. Durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Rezeptordomäne kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die intrazelluläre Bindung des G-Proteins ermöglicht. Dieses wird nun durch den Austausch von Guanin-Monophosphat (GMP) mit Guanin-Triphosphat (GTP) in der α -Untereinheit aktiviert, wodurch die weitere Signaltransduktionskaskade eingeleitet wird. Abhängig vom Untertyp des G-Proteins kommt es zu einer Aktivierung der Adenylcyclase (AC), zur Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) aus der Zellmembran, sowie zu Veränderungen unterschiedlicher Ionenkanäle. Verschiedene G-Proteine unterscheiden sich durch unterschiedlichen Aufbau der einzelnen α -, β - und γ -Untereinheiten und den Signaltransduktionswegen.

Ein komplexeres Rezeptorverständnis geht davon aus, dass die Rezeptoraktivierung nicht nur durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgt, sondern ein Anteil an Rezeptoren auch spontan die aktive Rezeptorkonformation aufweisen. Hieraus ergibt sich ein bestimmtes Verhältnis von aktiven zu passiven Rezeptoren. Dieses wird durch die Bindung von Agonisten zu Gunsten der aktiven Konformation verschoben. Ein inverser Agonist hingegen führt zur Stabilisierung der inaktiven Rezeptorkonformation, ein Antagonist verdrängt den Agonisten von der Rezeptorbindungsstelle.¹⁰⁹

Eine Rezeptorüberexpression, wie in dem hier verwendeten transgenen Rattenmodell, würde demnach zu einer erhöhten Anzahl von aktiven Rezeptormolekülen führen.

Weiterhin wird diskutiert, dass es nicht nur eine, sondern mehrere aktive Rezeptorkonformationszustände gibt, welche unterschiedliche Signalkaskaden zur Folge haben.¹¹⁰

3.3. Transgene Tiermodelle

Insbesondere zum Studium der Langzeitwirkungen bestimmter Funktionsproteine bietet sich der Einsatz transgener Tiermodelle an. Mit diesen lassen sich nicht nur die Wirkungen der eingebrachten Genprodukte, sondern auch die gegenregulatorischen Mechanismen eines Organismus gegenüber der Transgenexpression erfassen. Man bekommt dadurch einen tieferen Einblick in die Komplexität von in vivo-Vorgängen, als dies bei der reduzierten Betrachtung von in vitro-Experimenten möglich ist.

Im Rahmen der Generierung von transgenen Tiermodellen hat sich mittlerweile eine Vielzahl von Vorgehensweisen entwickelt.

Ein relativ einfaches Modell ist das isolierte Einbringen bzw. Ausschalten eines Gens in das Genom eines Organismus mittels der Technik der homologen Rekombination. Mit diesen Modellen ist es möglich, die Auswirkungen eines Genverlusts (Knock out) oder die Überexpression von Genen zu studieren (Gain of function). Teilweise können sich hieraus letale Phänotypen ergeben, so dass die Auswirkungen auf den adulten Organismus nicht mehr erfassbar sind.

Für die Generierung von transgenen Tiermodellen bieten sich aufgrund schneller Reproduktionszyklen, geringer Haltungskosten und somit guter Verfügbarkeit insbesondere Mäuse an. Wegen der geringen Größe treten hier jedoch Limitationen im Hinblick auf die Charakterisierung des Modells auf. Weitere Einschränkungen ergeben sich aufgrund des fehlenden Auftretens bestimmter Erkrankungen, wie z.B. spontaner Hypertension. Insbesondere im Hinblick auf die Erforschung kardiovaskulärer Pathophysiologien scheint daher das Rattenmodell vorteilhafter zu sein.

3.3.1. Geschichtlicher Überblick

Jaenisch und Mintz (Jaenisch & Mintz, 1974) waren die ersten, die Fremd-DNA in befruchtete Mauseizellen einbrachten und diese dann in verschiedenen Geweben nachweisen konnten. Mit Hilfe des Murine leukemia Retrovirus konnten sie zeigen, dass solche viralen Sequenzen auch stabil in das Genom von Mäusen integriert werden und auf die nachfolgenden Generationen weitervererbt werden können. Dieses Einbringen von Fremd-DNA mittels eines viralen Vektors war jedoch mit einer starken Limitation der Größe

der Fremd-DNA verbunden. In den folgenden Jahren versuchte man daher, DNA direkt in die Vorkerne befruchteter Eizellen einzubringen. Hierdurch ist es möglich, Sequenzen einer Länge von bis zu 7 Kilobasen in das Genom zu integrieren (Gordon et al, 1984, Brinster et al, 1981, Constantini et al, 1984, Wagner et al 1984).

Palmiter et al konnten durch Einbringen einer für das Rattenwachstumshormon kodierenden Sequenz in befruchtete Mauseizellen eine Veränderung des Phänotyps erreichen.¹¹¹ Betroffene Mäuse wiesen nicht nur stark gesteigerte Konzentrationen der mRNA für Rattenwachstumshormon in den verschiedenen Organen auf, sondern wurden auch signifikant größer als ihre genetisch unveränderten Wurfgenossen. Mit Hilfe dieses Ansatzes hatte man nicht nur ein Modell, mit dem man die Wirkung des Wachstumshormons studieren konnte, sondern gleichzeitig auch ein pathophysiologisches Modell für den Wachstumshormon-abhängigen Gigantismus.

3.3.2. Pronukleäre Mikroinjektion

Bei der Pronukleären Mikroinjektion (PNMI) führt man gereinigte doppelsträngige DNA in den Vorkern einer befruchteten Eizelle ein.

Ziel der PNMI ist die stabile Integration der DNA in ein Chromosom der befruchteten Eizelle. Wird dies erreicht, entwickelt sich aus dieser Eizelle ein Organismus, welcher die auf diese Art und Weise modifizierte genomische Information in jeder Körperzelle trägt. Solche Tiere in der ersten Generation bezeichnet man als Founder. Diese Tiere sind in der Lage, ihr verändertes Erbgut entsprechend den Mendelschen-Regeln weiterzuvererben.

Findet die DNA-Integration nach der ersten Zellteilung statt, kann dies zu genomisch inhomogenen Tieren führen. Ein Tier enthält demzufolge in bestimmten Zellen das unveränderte Erbgut und in anderen das genetisch veränderte. Findet die Integration in Zellen statt, aus welchen sich im weiteren Verlauf die Gameten ableiten, kann das veränderte Genom trotzdem an nachfolgende Generationen weitergegeben werden. Diese besitzen dann wieder ein homogenes Genom.

Da der Ort der Integration des genetischen Konstruktes in ein Chromosom der Eizelle nicht vorhersehbar ist, entstehen aus unterschiedlichen Eizellen genomisch unterschiedliche Tiere. Diese variieren häufig in der Stärke der Expression.

Da das Konstrukt im Allgemeinen in der Foundergeneration nur auf einem der paarweise angeordneten Chromosomen eingebaut wird, ist ein solches Tier heterozygot in Bezug auf dieses Merkmal. Durch Rückkreuzung mit einem weiteren heterozygoten Tier derselben Linie, lassen sich homozygote Tiere züchten.

3.3.2.1. Aufbau des transgenen Konstruktes

Bei den in dieser Arbeit untersuchten transgenen Ratten wurde ein 1,3 Kilobasen umfassendes Fragment des sm22-alpha Promotor verwendet. Dessen Funktion wurde durch Li et al. bereits in einem transgenen Mausmodell untersucht.¹¹² Während der Promotor in der Embryonalperiode sowohl im Herzen (Embryonaltag 8 bis 12,5) als auch in der Skelettmuskulatur und den glatten Gefäßmuskelzellen aktiv ist, ist er postnatal relativ spezifisch für glatte Gefäßmuskelzellen.

Weiterhin beschrieben andere Arbeitsgruppen die Gefäßmuskel-spezifische sm22-alpha Expression in Reporter-genassays.¹¹³ Eine Arbeitsgruppe um Imai et al. benutzte diesen Promotor bereits erfolgreich bei der Generierung transgener Mäuse, welche die Heme-Oxygenase gefäßmuskelspezifisch exprimierten.¹¹⁴

Subkloniert wurde die cDNA des Promotors und des humanen ET_AR in den pcDNA3-Vektor der Firma Invitrogen. Dieser besitzt eine Länge von 5,4 Kilobasen und eine Reihe von Selektionsmarkern sowie verschiedene Schnittstellen.

Die eingefügte humane ET_AR-cDNA hat eine Länge ca. 1,4 Kilobasen und enthält die endogenen Start- und Stoppkodons.

Zusätzlich befindet sich am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal aus dem bovinen Wachstumshormon, welches Bestandteil des Vektors ist.

3.3.3. Transgene Tiermodelle des Endothelinsystems

Mittlerweile existieren mehrere transgene Tiermodelle für Komponenten des Endothelinsystems. Diese umfassen sowohl Modelle mit Überexpression (gain of function) als auch solche mit Funktionsverlust (knock out).

Im Maus- bzw. Rattenmodell, welche ET-1 bzw. ET-2 überexprimieren^{115 116} zeigte sich überraschenderweise keine Erhöhung des Blutdrucks, jedoch traten in beiden Fällen,

insbesondere die Nieren betreffende Endorganschäden (Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und renale Zysten) auf. In einem kürzlich erschienenen Paper von Amiri et al. (2004) wurde eine Endothel-spezifischen ET-1 Überexpressionsmodell in der Maus beschrieben.¹¹⁷ Bei geringfügig erhöhtem Blutdruck konnte eine Mediahypertrophie der A. mesenterica und eine vermehrte Expression des ET_BR gezeigt werden.

In ET-1 bzw. ET_AR Knock-out Modellen konnte die Bedeutung des ET-Systems für die embryonale Entwicklung gezeigt werden. In beiden Fällen waren die Transgenhomozygoten Tiere nicht überlebensfähig und zeigten sowohl kardiale als auch kraniofaciale Defekte.^{118 119} Paradoxe Weise zeigte sich im ET-1 Knockoutmodell sogar eine moderate Erhöhung des Blutdruckes.

Bei den Knockout-Modellen des ET-3 bzw. ET_BR kommt es sowohl zur Ausbildung einer hellen Fellfleckung als auch zur Entwicklung eines Megakolons.^{120 121} In beiden Fällen sind auch hier die Homozygoten Merkmalsträger nicht lebensfähig.

Einen ähnlichen Phänotyp zeigt auch die natürlicherweise vorkommende Rattenmutante Spottet lethal (sl), welche durch eine ET_BR-Dysfunktion gekennzeichnet ist.^{122 123} Shin et al. konnten hier durch eine temporäre Tertrazyklinabhängige ET_BR-Expression, das für die Entwicklung der Melanoblasten und enteralen Neuroblasten notwendige ET_BR-Zeitfenster bestimmen.¹²⁴

4. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit waren Genexpressionsanalysen in einem transgenen Rattenmodell mit gefäßmuskelspezifischer Expression des humanen Endothelinrezeptors Typ A (ET_AR.) Hierbei wurden mehrere, unabhängig voneinander generierte, transgene Linien untersucht. Zunächst sollte ein qualitatives Screening der Transgen-Expression in ausgewählten Blutgefäßen und Organen mittels konventioneller Reverser-Transkriptions PCR durchgeführt werden.

Dann sollte in der Aorta und im mesenterialen Gefäßbett eine Quantifizierung der Transgenexpression mittels Realtime-PCR in zwei unabhängig generierten transgenen Linien zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden. Um mögliche gegenregulatorische Mechanismen zu identifizieren, sollte weiterhin die Expression des endogenen ET_AR, des ET_BR, der alpha1-adrenergen Rezeptoren A, B und D sowie der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen 1 und 2 mittels Realtime-PCR ermittelt werden.

Durch die Untersuchung der quantitativen mRNA-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten, können nicht nur zeitliche Veränderungen der Transgen-Expression, sondern gleichzeitig adaptive Expressionsveränderungen der anderen untersuchten Gene analysiert werden.

Zusätzlich sollte eine auf der Realtime-PCR basierende Methode zur Identifizierung von homozygoten transgenen Merkmalsträgern etabliert werden. Nachfolgend sollte die Transgenexpression von homozygoten Tieren mit der Expression von heterozygoten Tieren verglichen werden.

5. Material und Methoden

5.1. Genotypisierung

5.1.1. DNA-Extraktion aus Rattenschwanzspitzen

Im Rahmen der Genotypisierung zur weiteren Zuchtauswahl wurde den Ratten ein Stück ihres Schwanzes abgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und dann eingefroren.

Zur DNA-Isolierung wurden die Schwänze in 750 µl Tail-Buffer und 50 µl Proteinase K (10mg/ml) bei 55°C in ständiger Rotation über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden den aufgelösten Schwanzspitzen 500 µl Roti-Phenol/Chloroform/Isoamyalkohol zugegeben und gevortext. Die Proben wurden 5 Minuten auf Eis gestellt und dann erneut gevortext und wieder 5 Minuten auf Eis gestellt, noch mal gevortext und dann bei 4°C und 16000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und es wurde 750 µl eines 10:1 Gemisch aus Isopropanol und Na-Acetat hinzugegeben und geschüttelt. Die DNA fiel als weißer Faden aus. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 8000g über 15 Minuten, während der sich die DNA am Gefäßboden absetzte. Der Überstand wurde verworfen und das Pallet mit 750µl 80% Ethanol gewaschen. Erneut wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pallet dann für einige Minuten an der Luft trocknen gelassen.

Im letzten Schritt wurde die DNA in 50-100 µl Wasser oder TE-Puffer (pH 8) gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

5.1.2. DNA-Konzentrationsbestimmung

Aus der gelösten und isolierten DNA werden jeweils 2 µl abgenommen und in 98µl (bzw. 198µl bei hoher DNA-Ausbeute) TE-Puffer pH 8 gegeben. Am Photometer wird die Extinktion bei 260 nm bestimmt, wobei eine Extinktion von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Zur Berechnung wird dann für die DNA folgende Formel verwendet: $c(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \cdot 50 \cdot 1000 \cdot \text{Verdünnung}$. Der 260nm/280nm Quotient sollte zur weiteren Verwendung der DNA höher als 1,6 sein.

5.1.3. PCR-Analyse des Transgenstatus

Die Determinierung des transgenen Status erfolgt über eine konventionelle PCR-Analyse auf eine für das Transgen spezifische Sequenz.

Es erfolgt die Ansetzung eines Mastermixes folgender Zusammensetzung (pro 1 Probe).

10xPCR Puffer	2,50 µl
Q-Solution (Wasser)	5,00 µl
Wasser	15,50 µl
dNTP (10mM)	0,50 µl
Primer ss (100µM)	0,15 µl
Primer as(100µM)	0,15 µl
Hotstar-Taq	0,20 µl
Template (Konz.: 100µg/µl)	1,00 µl

Die PCR erfolgt dann in einem Thermocycler nach folgenden Bedingungen:

Cyclerprogramm:

1. 94°C für 15 Minuten
2. 94°C für 10 Sekunden
3. X°C für 30 Sekunden (je nach verwendeten Primer unterschiedlich)
4. 72°C für 1 Minute
5. GOTO Step 2 for 40 times
6. 72°C für 6 Minuten
7. 4°C für 4 Minuten

5.1.4. Visualisierung der PCR-Produkte mittels Agarose-Ethidiumbromid Gel

Verwendet wird ein 1 % Agarosegel dem 1µl Ethidiumbromid pro 100 ml TBE - Puffer zugefügt wird. Durch Anlage eines elektrischen Feldes (70-100V) in 1xTBE Puffers kommt es zur Auftrennung der DNA-Amplikons. Mit Hilfe eines aufgetragenen Längstandards für DNA Fragmente, wird bestimmt, ob es sich um die ausgewählten Produkte handelt. Unter

einer UV-Lampe wird nach einer bestimmten Zeit, in der Regel 30-45 Minuten, das Gel photographiert und auf einer Diskette abgespeichert.

5.1.5. Realtime SYBR-Green Untersuchungen zur Bestimmung des Zygotiestatus und der Transgenkopienanzahl

Zur Festlegung des Zygotiestatus der transgenen Tiere erfolgte die SYBR-Green basierte Quantifizierung von HPRT und humET_AR.

Durch Bildung der Differenz der CT-Werte des HPRT und humET_AR, kann bei gleicher Amplifikationseffizienz der Gene, das Verhältnis X von humET_AR zu HPRT entsprechend der Formel

$$X = (1+AE)^{[HPRT]-CT[humET_{A}R]}$$

berechnet werden.

Der nach dieser Formel berechnete Wert von homozygoten Tieren musste doppelt so hoch sein, wie der der heterozygoten Tiere.

Da HPRT bei weiblichen Tieren zweifach vorhanden ist und daher der CT-Wert einen PCR-Zyklus vor dem von männlichen Tieren erreicht wird, wurde in der grafischen Auswertung der HPRT-CT Wert weiblicher Tiere um 1 erhöht.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Primern besitzt das HPRT-Amplikon eine Länge von 76 Basenpaaren und das humET_AR-Amplikon eine Länge von 98 Bp.

Um unspezifische Bindungen der Primer an den stark homologen endogenen ratET_AR zu vermeiden, wurden ausschließlich HPLC gereinigte Primer verwendet. Mittels konventioneller PCR wurde die unspezifische Bindung der Primer an den endogenen Rezeptor ausgeschlossen. Mittels Gelelektrophorese wurde das Auftreten unspezifischer Amplifikate ausgeschlossen.

Durchführung:

Es wird entsprechend der Probenanzahl ein Mastermix erstellt, wobei jede Probe pro Ansatz zweifach gemessen wird (technische Duplikate). Anschließend erfolgt die Auftragung auf eine 96-Fächer Mikrotiterplatte und die Analyse im ABI PRISM^a 7700 Sequence Detection System wie vom Hersteller angegeben.

Die Berechnungen erfolgten mit Microsoft-Excel, die Erstellung der Boxplots mit SPSS.

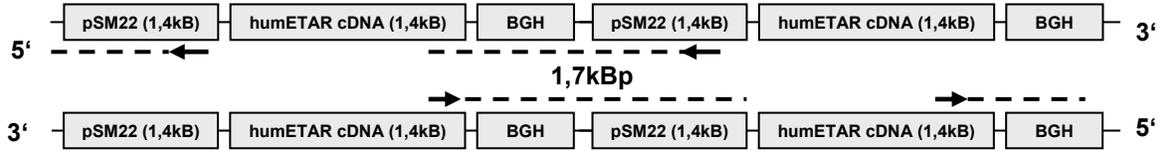
Mastermix (MM) für 1 Probe:

2xMM Puffer	12,5 µl
sense Primer (100µM)	0,11 µl
antisense Primer (100µM)	0,11 µl
Wasser	11,3 µl
Template (0,005 µg/µl)	1,0 µl

5.1.6. PCR zur Untersuchung auf das Vorliegen multipler Kopien

Zur Kontrolle auf das Vorliegen multipler Kopien in benachbarter Anordnung, wurde eine konventionelle PCR-Reaktion mit genomischer DNA durchgeführt, bei welcher die Anordnung von Sense- und Antisenseprimer vertauscht wurde. Durch Platzierung des Sense-Forward Primers 3' vom Antisense-Reverse Primer entstand nur ein Amplifikat, wenn mindestens 2 transgene Kopien in Nachbarschaft und 5'-3' Richtung integriert wurden. Das entstehende Fragment musste eine Länge von ca. 1,7kBp besitzen.

Abb. 4: Genomisches Konstrukt und Primerbindungsstellen zum Nachweis multipler genomischer Transgenkopien in gleichsinniger und aufeinander folgender Anordnung.



Zwei Kopien des transgenen Konstruktes in gleichsinniger Anordnung, bestehend aus dem SM22 α -Promotor (pSM22), der cDNA des humanen Endothelinrezeptors Typ A (humET_A-cDNA) und dem Polyadenylierungssignal des bovinen Gens für Wachstumshormon (BGH). Durch Positionierung des antisense Primers (Pfeil nach links) Downstream vom sense Primer (Pfeil nach rechts) kann nur bei mindestens zwei aufeinander folgenden Transgenkopien ein Amplikon mit einer Länge von ca. 1,7kBp (gestrichelte Linie) nachgewiesen werden.

5.2. RNA-Expression

5.2.1. Rattentötung

Vor der Organentnahme wurden die Ratten durch eine intraperitoneale Injektion von Xylazinhydrochlorothiazid und Ketamin in einer letalen Dosis betäubt. Danach wurde mittels Schere der Halsteil der Ratte eröffnet, gefolgt von Thorax und Abdominalbereich. Danach wurde die Vena cava am rechten Herzvorhof aufgesucht und mittels Pinzette abgeklemmt, um dann mit einer Schere durchtrennt zu werden. Der Tod trat augenblicklich durch Kreislaufstillstand ein.

5.2.2. Organentnahme

Nun wurden zuerst die Gefäße (V. cava, A. carotis A. pulmonalis, A.renalis, Aa. mesentericae, Aa. iliacae, Aorta) herauspräpariert und in Eppendorfgefäße überführt. Die Aorta für die quantitativen Auswertungen wurde hierbei vom Arcus aortae bis zum Zwerchfelldurchtritt entnommen. Die Aa. mesentericae wurden ausgehend vom Abgang

aus der Aorta mit Pinzette und Mikroschere soweit wie möglich entlang des Mesenteriums präpariert. Anheftendes Fett wurde vorsichtig entfernt. Typischerweise konnte hierbei Arterienäste bis zur 3. bzw. 4. Arcade entnommen werden.

Entnommenes Gewebe wurde sofort in flüssigen Stickstoff getaucht.

Darauf folgend wurden die entsprechenden Organe (Lunge, Herz, Muskel, Leber, Niere, Colon) entfernt, gewogen und ebenfalls in Eppendorfgefäße überführt und in flüssigen Stickstoff zwischengelagert. Am Herzen wurden die Ventrikel von den Vorhöfen getrennt, dann der rechte Ventrikel entlang des Septum interventrikulare vom linken gelöst.

Nach der Präparation wurden die entnommenen Proben bei minus 80 Grad Celsius bis zur weiteren Prozessierung gelagert.

5.2.3. RNA-Extraktion

Ablauf generell:

Die bei minus 80 Grad Celsius gelagerten Proben wurden im Eppendorfgefäß in flüssigen Stickstoff überführt.

Gefäße und Organe wurden aufgrund der zu erwartenden RNA-Menge unterschiedlich verarbeitet.

Ebenso wurden die Proben der transgen-positiven nach denen der transgen-negativen Tiere prozessiert, um die transgene Kontamination und falsch positive Banden in der PCR-Amplifikation zu vermeiden.

Ablauf Organe aller Tiere und Aorten der 4 Monate alten Tiere:

Die gefrorenen Organe wurden mithilfe eines Pistills und eines Mörsers unter Hinzugabe von flüssigem Stickstoff im gefrorenen Zustand zerrieben. Das Endprodukt wurde dann zusammen mit dem Stickstoff in ein Polypropylen-Röhrchen (10ml) gegossen. Nach Abdampfen des Stickstoffs wurden 2 ml Trizol zugegeben, um dann mit dem Ultraturax eine 30 sek andauernde Homogenisierung durchzuführen. Im Anschluss wurden die Proben für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zugabe von 0,4 ml Chloroform wurde kurz gevortext und dann weitere 3 Minuten inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000g für 15 Minuten, bei welcher sich eine phenolhaltige untere und eine wässrige obere Phase bildeten. Die RNA befand sich in der oberen Phase und wurde vorsichtig in ein neues Polypropylen-Röhrchen pipettiert. Danach wurde 1ml Isopropranylalkohol hinzugeben und erneut bei 12000g für 10 Minuten zentrifugiert.

Am Boden des Gefäßes bildete sich nun ein RNA-Pellet. Der Überstand wurde dekantiert und vorsichtig auf ein Zellstofftuch abgetupft. Es folgte ein Waschschrift mit 2 ml Ethanol und darauf folgend eine erneute Zentrifugation bei 9000g für 10 Minuten. Das Ethanol wurde dann abgegossen und mit einem sterilen Tupfer Anheftungen des Alkohols entfernt. Abschließend wurde die RNA für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und dann mit RNase freiem Wasser aufgenommen.

Die Lagerung erfolgt bei minus 80 Grad Celsius

Ablauf Gefäße ausgenommen Aorten der 4 Monate alten Tiere:

Die gefrorenen Gefäße wurden innerhalb eines 1,5 ml Polypropylen-Röhrchen mit einem Plastikmörser im gefrorenen Zustand zerrieben. Im nächsten Schritt wurde 1 ml Trizol hinzugegeben. Mit einer 2 oder 5 ml Spritze und einer 0,7x30 mm Kanüle wurde das in Trizol befindliche Gewebe durch mehrfaches Auf- und Abziehen durch die Kanüle homogenisiert. Darauf folgend wurde für 30 Sekunden gevortext und zum Lysieren der Zellen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Bei Raumtemperatur wurde dann für 10-15 Minuten inkubiert. Nun wurde 0,26 ml Chloroform hinzugegeben und 3 Minuten inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 g für 15 Minuten, bei welcher sich eine phenolhaltige untere und eine wässrige obere Phase bildeten. Alle weiteren Schritte entsprachen denen der Gefäße mit einer Anpassung der Reagenzien auf 1 ml Trizol, d.h. eine Halbierung der Selbigen.

5.2.4. RNA-Konzentrationsbestimmung und Lagerung

Aus der gelösten und isolierten RNA wurden jeweils 2 µl abgenommen und in 98 µl (bzw. 198 µl bei hoher RNA-Ausbeute) TE-Puffer pH 8 gegeben. Am Photometer wurde nach Leerwertbestimmung die Extinktion bei 260 nm bestimmt, wobei eine Extinktion von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Der 260nm/280nm Quotient sollte zur weiteren Verwendung der RNA höher als 1,6 sein.

Zur Berechnung wurde dann für die RNA folgende Formel verwendet:

$$c (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \cdot 40 \cdot 1000 \cdot \text{Verdünnung}.$$

Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Prozessierung bei -80°C gelagert.

5.2.5. DNase Dau

DNase Dau von in konventioneller RT-PCR eingesetzten Proben

Vor der Reversen Transkription der RNA in cDNA wurde ein DNase Dau durchgeführt. Dies ist insbesondere erforderlich, da das integrierte Konstrukt auf cDNA Basis konstruiert wurde und daher bei einer folgenden PCR aufgrund gleicher Bandengröße, nicht von der transkribierten und im Sinne der Expression nachzuweisenden RNA unterschieden werden könnte.

Aufgrund der kleineren RNA-Ausbeute bei den Gefäßen, wurde bei diesen eine RNA-Menge von 0,8µg als Ausgangsmenge eingesetzt, wohingegen bei den Organen 3µg RNA verwendet wurden. Die Mengen der eingesetzten RNA wurden entsprechend der Photometrischen Extinktionsbestimmung berechnet.

Zu der eingesetzten RNA-Menge wurden nun 5 µl 10x Puffer von Promega und 1 µl bei den Gefäßen bzw. 2 µl bei den Organen RQ1 DNase (1U/µl, no.M6101) zugesetzt. Üblicherweise wurden entsprechende Mastermixe angesetzt.

Anschließend wurde mit DEPC Wasser auf 50µl aufgefüllt.

Im Thermocycler wurde dann für 30 min bei 37°C die DNA gedaut und folgend bei 65°C für 10 Minuten die DNase inaktiviert.

DNase Dau von in Realtime-PCR eingesetzten Proben

Um Schwankungen der in die Reverse Transkription eingesetzten RNA-Mengen möglichst gering zu halten, wurde nach dem DNase Dau der mittels Realtime-PCR untersuchten Proben eine weitere Konzentrationsbestimmung im Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt. Der eigentliche DNase-Dau wurde auf Qiagen-RNA Säulen entsprechend Herstellerprotokoll durchgeführt. In die folgende Reverse Transkription wurden dann 200 ng DNase-gedaute RNA eingesetzt.

5.2.6. RNA-Qualitätskontrolle mittels RNA-Chip

Eine Güte- und Konzentrationsbestimmung der für die Realtime-PCR verwendeten DNase gedauten aortalen RNA wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt.

Dieses Verfahren beruht im Prinzip auf einer Gel-elektrophoretischen Auftrennung der RNA auf einem speziellen Chip. Vorteile dieser Methode liegen im geringen Zeitaufwand und der geringen RNA-Einsatzmenge (<200 ng RNA). Mittels computergestützter Auswertung erfolgt die digitale Ausgabe von Fragmentgröße und Konzentration der getesteten Probe.

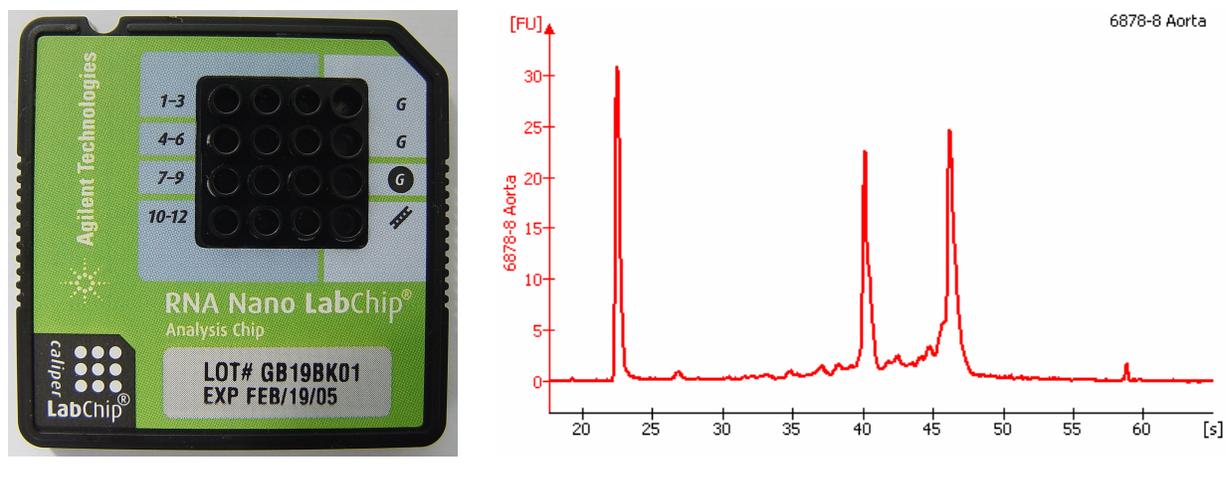
Der genutzte 16-fach RNA-Chip besteht aus einer Grundplatine und 16 Fächern für die zu untersuchenden Proben, sowie für einen internen Standard. Zwischen den Fächern besteht ein Netzwerk aus feinsten Verbindungen. Durch Füllung der einzelnen Fächer wird ein für jede Probe separater elektrischer Stromkreis geschlossen. Geladene Biomoleküle, wie z.B. RNA werden nun entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und interkalieren auf ihrem Weg durch das Netzwerk mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Dieser wird mittels Laser aktiviert und das induzierte Signal detektiert. Durch eine gleichzeitig aufgetragene RNA-Leiter bekannter Konzentration und Fragmentgrößen wird das Verhältnis Migrationszeit zu Fragmentgröße bestimmt und in Form einer Flächenkurve vom System verarbeitet. Die zu testenden Proben werden dann anhand ihres Flächen-Verhältnisses zur RNA-Sondenfläche bestimmt.

Weiterhin läuft mit jeder Probe ein weiterer Marker zur Anordnung von Sample- und RNA-Leiter mit. Hierdurch werden Abweichungen während der elektrophoretischen Auftrennung im Kapillarsystem des Chips herausgefiltert.

Die Visualisierung erfolgt sowohl über eine Gel-ähnliche Abbildung als auch über die Flächenkurve der Probe.

Die Anwendung erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

Abb. 5 RNA-Chip der Firma Agilent und Beispielauswertung der RNA-Güte über Flächenkurvenfunktion.



Rechts: RNA-Chip mit 12 Beladungsslots für RNA-Proben. Links: Flächenkurvenfunktion einer RNA-Probe zeigt typischerweise 3 Banden: RNA-Leiter sowie 18S und 28S RNA-Banden. Die mRNA liegt zwischen den beiden Banden ribosomaler RNA.

5.2.7. Reverse Transkription

5.2.7.1. Reverse Transkription für konventionelle RT-PCR

Von den entsprechenden DNase gedauten RNA Lösungen wurden jeweils 10 µl in 2 neue Eppendorfgefäße mit der Kennzeichnung RT-plus und RT-minus pipettiert.

Pro Eppendorfgefäß wurden 1 µl 10 mM dNTP und 1 µl 100 µM RandomHex Primer zugesetzt und es wurde bei 65°C für 5 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und auch auf Eis weiterverarbeitet. Aus einem angefertigtem Mastermix wurden pro Ansatz 8 µl first strand buffer, 4µl 0,1M DTT und 2 µl RNasin hinzugegeben. Bei den mit RT-positiv gekennzeichneten Proben wurde jeweils 1 µl Superscript II (200U/µl) hinzugegeben, bei den RT-negativ Proben entsprechend Wasser.

Es folgte eine Inkubation für 50 Minuten bei 42°C und eine Hitzinaktivierung der Superscript II bei 70°C für 10 Minuten.

5.2.7.2. Reverse Transkription für quantitative Realtime-PCR

Es wurden 200 ng der DNase gedauten RNA eingesetzt. Diese wurden mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die weiteren Schritte erfolgen entsprechend oben angegebenem Protokoll.

Abschließend wurde die cDNA durch Hinzugabe von 30 µl H₂O verdünnt.

5.2.7.3. Lagerung

Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.2.8. Konventionelle PCR Untersuchungen mit cDNA von Organen und Gefäßen

Zur Bestimmung der Expression wurden im Verlauf der Arbeit PCR-Reaktionen auf verschiedene Gene angewendet. Die Abläufe der unterschiedlichen PCR-Reaktionen unterschieden sich in der Auswahl der Primer, der Annealing-Temperatur und in der Anzahl der Zyklen.

Die Konzentration der Reagenzien entsprach, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, dem hier dargestellten Schema:

10xPCR Puffer Qiagen	2,50 µl
Wasser	20,50 µl
dNTPs (10 µM)	0,50 µl
primer ss (100 µM)	0,15 µl
primer as (100 µM)	0,15 µl

HotstarTaq	0,20 µl
gesamt	24 µl

5.2.9. Realtime PCR mit aortaler- und mesenterialarterieller cDNA

5.2.9.1. Bestimmung der relativen Expression durch Primer-Sonden Realtime-PCR

Die Realtime-PCR ist ein Verfahren, welches während der DNA-Amplifikation einer PCR, die Echtzeitdarstellung der Quantität des PCR-Produktes ermöglicht.

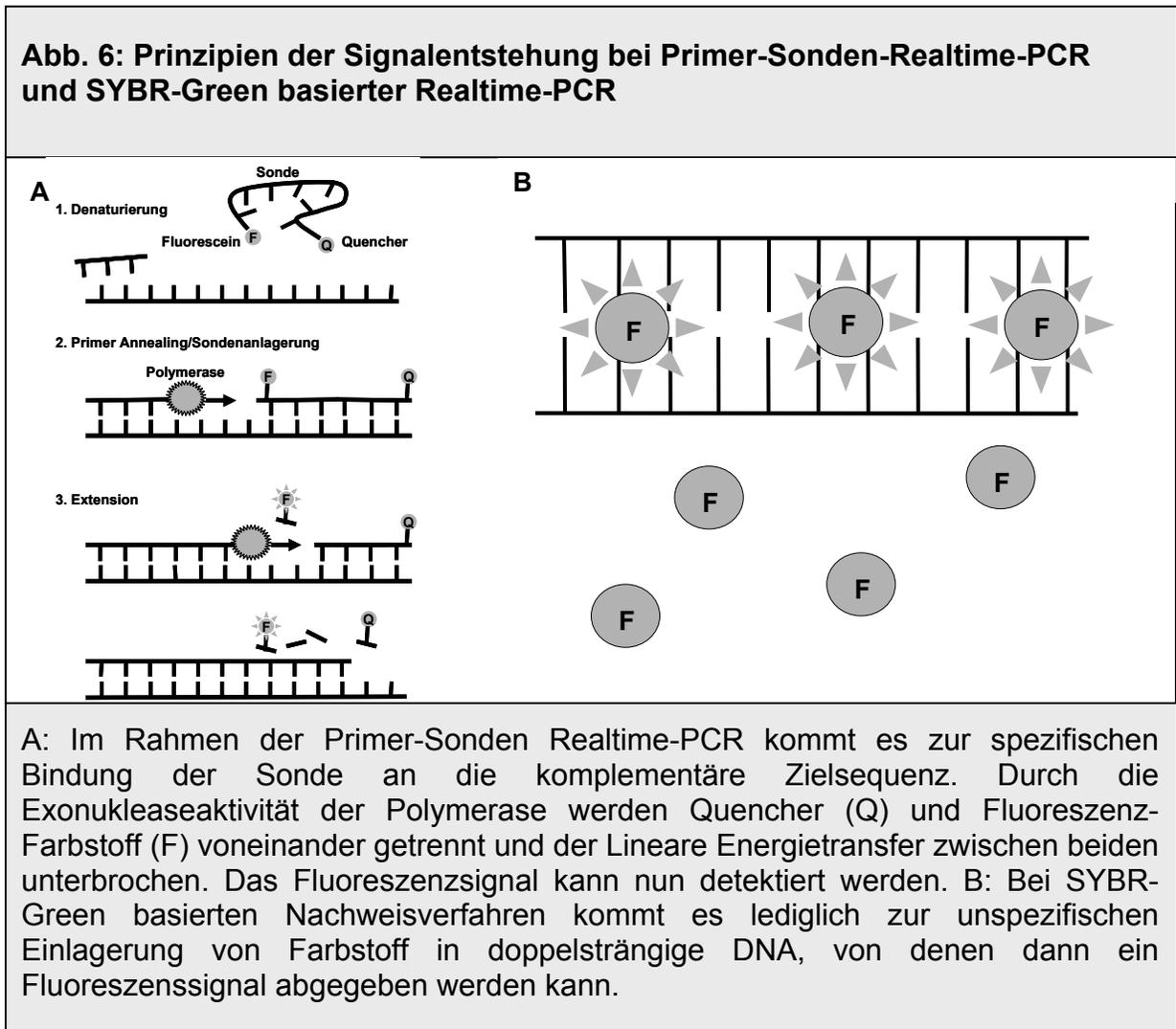
Zur Durchführung benötigt man, wie bei der konventionellen PCR, zwei Primer im Sense und Antisense-Format. Weiterhin setzt man eine DNA-Sonde ein, welche zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz bindet. Dieses Oligonukleotid besitzt am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (z.B. 6-Carboxy-Fluorescein=FAM) und am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff (z.B. 6-Carboxy-tetramethylrhodamin=TAMRA), sowie eine die Extension blockierende Phosphatgruppe. Bei intakter Sonde unterdrückt der durch räumliche Nähe von Reporter und Quencher-Farbstoff stattfindende Fluoreszenz-Energie-Transfers (FET) eine messbare Fluoreszenz des Reporters ¹²⁵.

Durch Ausnutzung 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase kommt es während der Amplifikation zu einer Spaltung der Sonde und einer Freisetzung des Reporterfarbstoffes. Durch daraus resultierender Aufhebung der räumlichen Nähe zum Quencherfarbstoffes, kommt es zur Unterbrechung des FET. Der Reporterfarbstoff kann nun bei Licht einer Wellenlänge von 488nm (FAM) angeregt werden und das spezifische Signal vom Detektor gemessen werden.

Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem Zyklus an. Da nicht gebundene Sonde nicht detektiert wird, sowie nicht spezifisch-gebundene Sonden von der DNA-Polymerase vom Strang gelöst werden, ist das gemessene Signal Sequenzspezifisch.

Die Zykluszahl, bei welcher das Fluoreszenzsignal einen statistisch signifikanten Wert erreicht, wird als Cycle-treshold-Wert (CT) bezeichnet. Der CT-Wert ist umso kleiner, je mehr Ausgangsmatrize zu Beginn der Reaktion vorhanden war. Eine vergleichende

Darstellung von Primer-Sonden Realtime-PCR und SYBR-Green basierender Realtime-PCR zeigt Abb. 5.



Die Proben wurden nach der Trizol-RNA-Aufreinigung entsprechend oben beschriebener Standardprotokolle mit DNase gedaut und dann durch Reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Es wurde eine RNA-Startmenge von 200 ng pro Probe eingesetzt. Der cDNA-Lösung wurde nachfolgend 30 µl Wasser hinzu gegeben.

Mittels ABI PRISM^a 7700 Sequence Detection System wurde dann eine Realtime-PCR durchgeführt.

Praktischer Ablauf:

Herstellung eines Mastermixes folgender Zusammensetzung:

Für 1 Probe:

2 x MM (Mastermix-Applied Biosystem) Puffer	12,5 µl
Primer ss (100µM)	0,225 µl
Primer as (100µM)	0,225 µl
Sonde (100µM)	0,05 µl
Wasser	11 µl
Gesamtvolumen	24 µl

Da jeweils Triplets generiert wurden, betrug die benötigte Mastermixmenge pro zu messender Probe 72 µl. Diese wurden in 1,5 ml-Eppendorftubes gegeben und dann wurden jeweils 3 µl der Proben-cDNA hinzugegeben. Danach wurde durchmischt und die Proben auf eine 96 Fächer fassende Mikrotiterplatte gegeben. Pro Fach wurden 23 µl pipettiert.

Mit dem ABI PRISM^a 7700 Sequence Detection System wurde nun eine Zwei-Schritt PCR durchgeführt. Die Annealing/Extensionstemperatur beträgt 60°C. Geschmolzen werden die DNA-Stränge bei 95 °C. Die Gesamtzykluszahl beträgt 40.

Als Bezugspunkt für die semiquantitative Auswertung und zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurden Standardverdünnungen eines DNA-Fragmentes angefertigt, welche das zu amplifizierende DNA-Fragment enthielten. Diese wurden mittels Primern, welche Up- und Downstream der zu amplifizierenden Sequenz ansetzen, generiert. Diese Sequenz wurde dann amplifiziert und mittels Qiagen DNA-Purification-Kit (entsprechend Herstellerprotokoll) aufgereinigt.

Für die Standardreihe wurde die Lösung im ersten Schritt 1:100 verdünnt. Darauf folgend wurde mehrfach 1:10 verdünnt, so dass am Ende 7 1:10 verdünnte Standard-DNA Lösungen vorhanden waren.

5.2.9.2. Datenauswertung

Die Daten wurden mittels ABI PRISM^a Sequence Detection Software (Vers. 1.6) ausgewertet. Hierbei werden die CT-Werten der Proben entsprechend den zugewiesenen Quantitäten der Standardreihenverdünnungen durch die Software quantifiziert. Aus den Mittelwerten der technischen Triplikate wird die „Mean-Quantity“ (MQty) für jede Probe errechnet, welche die Grundlage für die weiteren Berechnungen darstellt. Sowohl MQty als auch CT-Werte werden dann als Export-Files in Microsoft-Excel übertragen. Da die Standardreihen nicht untereinander kalibriert wurden, können mittels Standardreihenquantifizierung keine Aussagen über die Expression unterschiedlicher Gene innerhalb der Gruppen getroffen werden, d.h. es lässt sich z.B. nicht die Expression des endogenen ET_BR mit der Expression des endogenen ET_AR vergleichen. Diese Art der Auswertung wurde für die Expressionsanalyse des ratET_BR verwendet.

Um die Expressionsdaten von humET_AR und ratET_AR direkt miteinander vergleichen zu können, wurde hier nicht über die Standardreihe quantifiziert, sondern (bei nahezu gleicher Amplifikationseffizienz für beide Gene) eine Kombination aus Δ CT- und Standardreihenkurven-Methode verwendet.

Auf der Analyseebene der ABI PRISM^a Sequence Detection Software wurde hierfür der sog. Cycle-Threshold manuell auf 0,4 festgesetzt und die CT-Werte von humET_AR und ratET_AR bestimmt.

Für die Bildung des Δ CT-Wertes wurde der CT-Mittelwert der ratET_AR-Expression von Aorten der 1 Monat alten transgen-negativen Kontrolltiere als Bezugspunkt benutzt. Dieser entsprach 30. Die Berechnung der relativen Genexpression (RGE) erfolgte dann nach der Formel:

$$RGE = 2^{(CT[\text{hum bzw. ratET}_A\text{R}]-30)}$$

Da der hieraus resultierende Wert nicht nur von der Stärke der Expression, sondern u.a. auch von der in die RT-PCR Reaktion eingesetzten RNA-Menge abhängig war, wurde mit Hilfe eines Standardisierungsgens normalisiert. In dieser Arbeit wurde eine

Standardisierung auf 18S, als Maß für die in der RT-PCR umgeschriebene Gesamt-RNA, sowie eine Standardisierung über das glattmuskelspezifische SM22-Protein, als Marker für den Anteil der aus glatten Muskelzellen stammenden RNA, verwendet.

Aus den vorangegangenen Berechnungen resultierten letztendlich Zahlenwerte ohne Einheiten. Zur besseren Darstellbarkeit dieser erfolgte bei der Bestimmung der relativen humET_AR- und ratET_AR-Expression eine weitere Division aller Einzelwerte durch den Mittelwert der ratET_AR Expression der Aorten der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 1 Monat und die Multiplikation der erhaltenen Werte mit 100.

Die erhaltenen Ergebnisse für die verschiedenen Zeitpunkte sind demzufolge als Prozent des Mittelwertes der ratET_AR-Expression der Aorten von einem Monat alten Kontrolltieren zu verstehen.

Die Expression des ratET_BR wurde mittels Standardkurvenmethode quantifiziert. Es erfolgten dann Normalisierungen auf die Expression der 18S RNA zur Bestimmung der ET_BR Expression in der Gesamtprobe und auf die Expression von SM22alpha mRNA zur Bestimmung der gefäßmuskelspezifischen ET_BR-Expression.

Die Berechnung der Amplifikationseffizienz (AE) erfolgte entsprechend SDS 7700 Workshop Vers.2.1 nach folgender Formel:

$$AE = 10^{(-1/s)} - 1$$

wobei s die Steigung der Geraden der Graphischen Darstellung des C_T-Wertes über dem Logarithmus der Startkopienzahl darstellt.

Aus der AE lässt sich die amplifizierte DNA in Abhängigkeit von der Zykluszahl n nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Amplifizierte DNA} = (1+AE)^n \quad (n=\text{Anzahl der PCR-Zyklen})$$

5.2.9.3. Bestimmung der relativen Expression durch SYBR-Green basierte Realtime-PCR

Die Expression der α 1-adrenergen Rezeptorsubtypen A, B und D wurde mittels SYBR-Green basierter Realtime-PCR bestimmt. Eine Quantifizierung mittels Standardreihe erfolgte nicht. Es ist aber aufgrund der Amplikongröße davon auszugehen, dass die Amplifikationseffizienz bei 100% liegt.

Für die weitere Berechnung wurde dann die Δ CT-Methode verwendet, wobei der CT-Mittelwert der Aorten der Kontrolltiere zum Zeitpunkt 1 Monat für jedes Gen als Bezugs-CT-Wert herangezogen wurde. Im Rahmen einer Standardisierung wurde dann durch den mittels Standardreihenmethode bestimmten SM22-Wert dividiert:

$$\text{relative Expression} = 2^{(\Delta\text{CT})/\text{SM22}}$$

Auch hieraus resultieren Einheiten-freie Werte, welche nur Aussagen über die relative Expression eines Genes in den Versuchsgruppen zulassen, d.h. Aussagen über ein Überwiegen des einen Rezeptortypen gegenüber einem anderen, können bei Unkenntnis über die genauen AE nicht getroffen werden.

5.2.10. Grafische und statistische Auswertung

Die Erstellung der Abbildungen und die Berechnungen der Signifikanzniveaus erfolgte mittels SPSS Version 13.0. Es wurde hierbei für die Grafiken eine Darstellung in Boxplotform gewählt. Hierdurch lassen sich auf einen Blick der Median, die 50% und 95% Perzentile, sowie die Verteilung der Messwerte erkennen.

Aufgrund der fehlenden Normalverteilung und der geringen Stichprobenanzahl, wurde der Mann-Whitney-Test als nicht-parametrisches Testverfahren zur Bestimmung der Signifikanzniveaus angewandt.

5.3. Materialien

DNA-Extraktion:

- Proteinase K (10mg/ml, Roth)
- Tail-Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1%SDS ad ddH₂O 1000ml)
- Isopropanol (Roth)
- Na-Acetat pH 8 (Fa. Merck)
- Rotiphenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Fa. Roth)

Konzentrationsbestimmung:

- TE-Puffer pH8 (10mM Tris, 1mM EDTA)

PCR-Analyse auf Transgenstatus:

- Qiagen-PCR 10x Puffer (Fa. Qiagen)
- Qiagen-Q-Solution (Fa. Qiagen)
- Qiagen Hot-Star Taq (Fa. Qiagen)
- Wasser
- dNTP (10mM, Fa. Promega)
- sense Primer: ATAGTGTCACCTAAATGCTAG (Proligo, France)
- antisense Primer: ATAGAGCCCACCGCATCCCC (Proligo, France)
- Peltier Thermocycler PTC100

Visualisierung der PCR-Produkte mittels Agarose-Ethidiumbromid Gel:

- Agarose (Roth, Art. 6352.4)
- 1xTBE Puffer (Tris, Borsäure, 0,5M EDTA pH8)
- Ethidiumbromid 1% (Roth, Art. 2218.1)

Realtime SYBR-Green Untersuchungen zur Bestimmung des Zygotiestatus und der Kopienzahl insertierter Transgene:

- Applied Biosystems SYBR® Green RT-PCR Reagents (Applied Biosystems Katalognummer 4309155)
- Wasser

Rattentötung:

- Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun, Bayer)
- Esketaminhydrochlorid 25mg/ml (Ketanest S, Pfizer)

RNA-Gewinnung:

- Trizol: Invitrogen- Cat No. 15596-018, Lot No.: 1126455
- Chloroform: 102445.1000, K26406045919
- Isopropranylalkohol, Firma ROTH Art.-Nr. 9866.1
- Ethanol (75%), J.T. Baker Art.Nr. 0406110002
- RNase freies Wasser

DNase Dau für konventionelle RT-PCR Proben:

- 10x Puffer (Promega RNase free DNase Kit)
- RQ1 RNase free DNase (1U/µl, Promega, Art.Nr: M6101)
- DEPC-wasser

RNA-Qualitätskontrolle mittels RNA-Chip:

- RNA-Nano Lab Chip (Agilent)
- RNA6000 Leiter (Ambion Art. 7152)
- RNA-Nano Lab Kit (Agilent)

Reverse Transkription konventionelle RT-PCR Proben:

- dNTPs (10 mM, Rapidozym: GEN-009-250)
- Randomhexprimer (100 µM, Amersham Code-Nr. 27-2166-01)
- First strand buffer 5x (Invitrogen)
- 0,1 M DTT (Invitrogen)
- RNasin (40U/µl, Promega, Cat. No N2111)

- Superscript II (200 U/μl, Invitrogen)

Konventionelle PCR Untersuchungen mit cDNA von Organen und Gefäßen:

- Qiagen-PCR 10x Puffer (Qiagen)
- Qiagen Hot-Star Taq (Qiagen)
- ddWasser
- sense Primer: siehe Tabelle
- antisense Primer: siehe Tabelle

Bestimmung der relativen Expression durch Primer/Sonden Realtime-PCR:

- TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Art.Nr. 4304437)
- Primer
- ddWasser
- 20 MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL (Art. Nr. 128)
- QIAquick PCR-Purifikation Kit (Qiagen)

Bestimmung der relativen Expression durch SYBR-Green basierte Realtime-PCR:

- SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Art.Nr. 4312704)
- Wasser

Sequenzen der Primer für konventionelle PCR:

Gen	Primer	Sequenz
GAPDH	ss	TTCATTGACCTCAACTACATG
	as	GTGGCAGTGATGGCATGGAC
humET _A R	ss	TGGGAATGGTGGGGAATGCAACTCA
	as	GAGCGCAGAGGTTGAGGACGGTGA
ratET _A R	ss	CGTCTTCTGCTTGGTTGTCA
	as	AAGAACCAGGAGCAGAACCA

alpha-1AR	ss	CGAGTCTACGTAGTAGCC
	as	GTCTTGGCAGCTTTCTTC
alpha-1BR	ss	ATCGTGGCCAAGAGGACC
	as	TTTGGCTGCTTTCTTTTC
alpha-1DR	ss	CGCGTGTACGTGGTCGCAC
	as	CTTGGCAGCCTTTTTC

Sequenzen der Primer und Sonden für Realtime-PCR:

Untersuchtes Gen	Primer	Sequenz
humET _A R	ss	GATACAGCACAAATCTAAGCAATCATG
	as	CAAATTAGTGGGTTGATGAGTGGTAA
	Sonde	TTTCGTGGCACAGAGCTCAGCTTCCT
ratET _A R	ss	GAATGGGAGCTTGCGGATT
	as	CAGCACAGGGCGAAGATGA
	Sonde	AGCGAACACCTCAAGCAGCGTCGA
ratET _B R	ss	GTGCATGAGAAATGGTCCCAAT
	as	GGGAATGTGATGATGATGTGTAG
	Sonde	TCTTGATCGCCAGCCTGGCTCTG
18S	ss	GGAGCCTGCGGCTTAATTT
	as	CAACTAAGAACGGCCATGCA
	Sonde	CAATCTGTCAATCCTGTCCGTGTCCG
SM22	ss	GCAAGTTGGTGAACAGCCTGTA
	as	AAGAATTGAGCCACCTGTTCCA
	Sonde	CCGCCCTCCATGGTCTTCAAGCA

Sequenzen der Primer für Standardreihengenerierung:

DNA-Fragment	Primer	Sequenz
humET _A R	ss	GCTGGCACTGGTTGGATGT
	as	TCTGGTAAATGATCCTGAGCAGAGT
ratET _A R	ss	CTTCTGCATGCCCTTGGTG
	as	GCAAGAAGCTGAGCAGTTCACA
ratET _B R	ss	ACCAAAGGAGGGAGGGTGG
	as	TCTCAGCTCCAAATGGCCAG
18S	ss	CGAAAGCATTGCCAAGAATG
	as	AGCATGCCGAGAGTCTCGT
SM22	ss	TGTGGCTGAAGAATGGCGT
	as	TCAGTCTTCGTGACTCCATAATCCT

Sequenzen der Primer für SYBR-Green basierte Genexpressionsbestimmungen:

Gen	Primer	Sequenz
alpha-1AR	ss	TGATCCTCTCAGTGGCCTGTC
	as	CAGCACAGTGGAGGTGAGGAG
alpha-1BR	ss	CAGTACTGCCCTTCTCCGCT
	as	TGGAGGCCGTACAGCACAG
alpha-1DR	ss	AGCCATTATGACAGAGCGCA
	as	GGCACTGGCTCCTTCCAAC
GRK2	ss	GAATGACTTCAGTGTGCATCGAA
	as	GGGTCTCTCCCTGCTTCATCT
GRK3	ss	CCAGGAAGAAGGCTAAAAATAACA
	as	GGTAAAAATAACGTCTTTGCCACTGT

Primersequenzen für SYBR-Green basierte Tg-Kopienanzahlbestimmung

humET _A	ss	GATACAGCACAAATCTAAGCAATCATG
	as	CAAATTAGTGGGTTGATGAGTGGTAA
HPRT	ss	GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT
	as	GCCACATCAACAGGACTCTTGTAG

6. Ergebnisse

6.1. Auswertung genomischer Ergebnisse

6.1.1. Identifizierung transgener Ratten mittels genomischer PCR

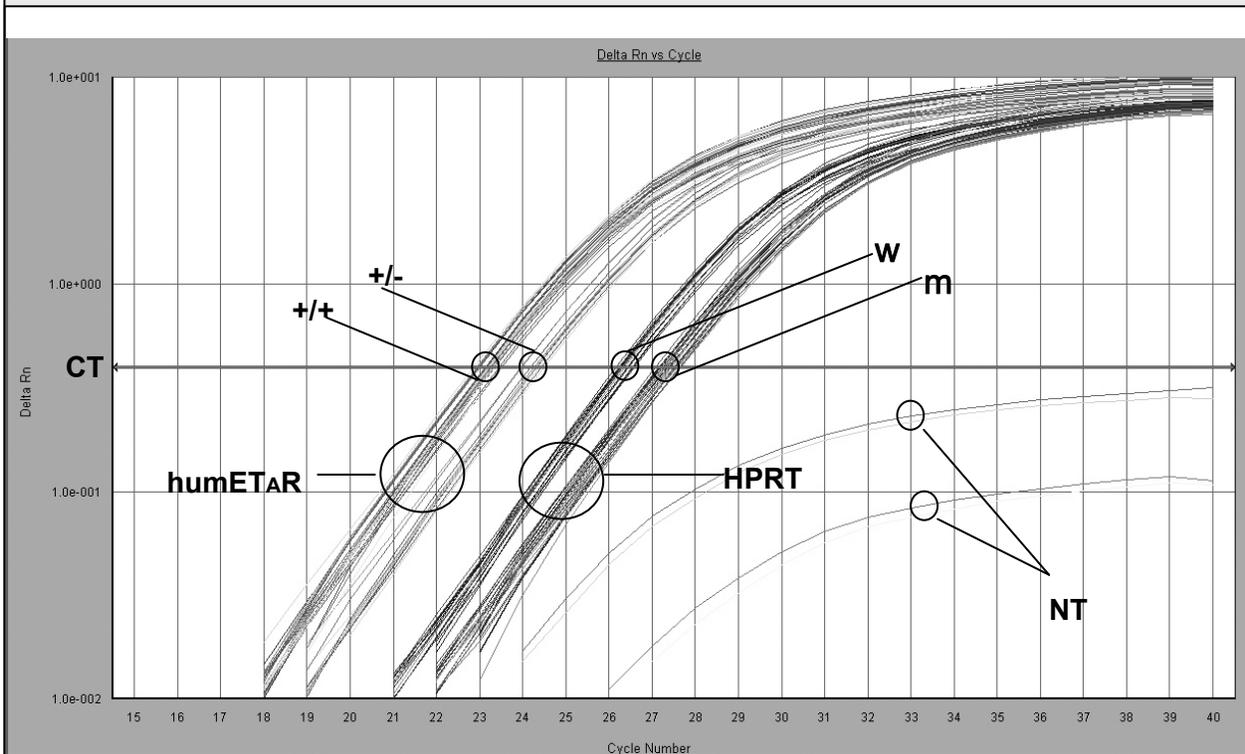
Grundlage dieser Doktorarbeit waren 5 unabhängig voneinander generierte transgene Tierlinien.

Diese wurden als L6341, L6351, L6353, L6878 und L6888 bezeichnet. Von diesen wurden die Linien 6351, 6878 und 6888 als transgene Linien dauerhaft etabliert. Durch Züchtung war es möglich, dass Transgen entsprechend den Mendelschen Regeln an Folgegenerationen weiterzugeben.

6.1.2. Analyse des Zygotiestatus transgener Tiere

Mittels SYBR-Green basierter Realtime-PCR konnten potentiell homozygote Träger des Transgens in L6351 und L6878 identifiziert werden. Für hetero- bzw. homozygote Tiere repräsentative Fluoreszenzkurven zeigt Abb. 7.

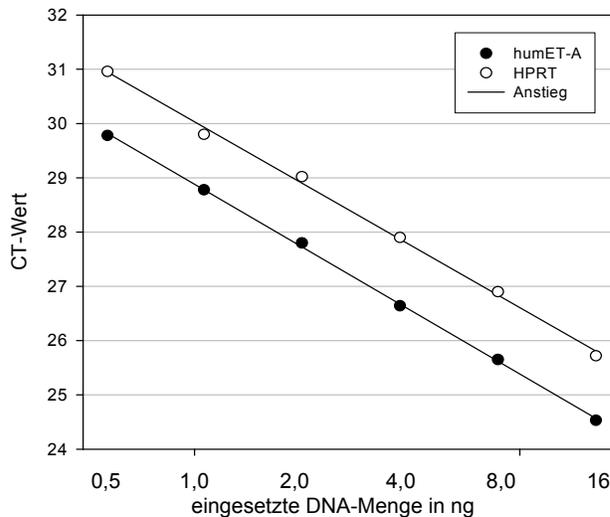
Abb. 7: Darstellung von humET_AR- und HPRT CT-Werten in Abhängigkeit vom Transgenzygotiestatus und Geschlecht in Tieren von L6351.



Bildschirmdarstellung aus Applied Biosystems SDS-Sequence Detektion Software Vers.1.2.3. (Ausschnitt) zeigt die Fluoreszenzsignaländerung (DeltaRn) in Abhängigkeit von der PCR-Zykluszahl (CycleNumber). Die PCR-Zykluszahl beim Schnittpunkt des Fluoreszenzsignals (bunte Linien) mit einem einstellbaren Schwellenwert (CT) wird als CT-Wert bezeichnet. Im gleichen Durchlauf wurde bei 20 Tieren der CT-Wert für das Transgen (humET_AR) und für HPRT bestimmt. In der Transgenanalyse erreichen Homozygote Tiere (+/+) den CT ca. einen PCR-Zyklus früher als heterozygote Tiere (+/-). In der HPRT-Analyse erreichen weibliche Tiere (w) den CT einen Zyklus früher als männliche Tiere (m). Kein Erreichen des CT in den Wasserproben (NTC).

Voraussetzung für die Auswertung über Bildung des Δ CT sind annähernd gleiche Amplifikationseffizienzen in der PCR der untersuchten Gene. Dies konnte zwischen DNA-Konzentrationen von 0,5-17 ng/μl für beide Gene gezeigt werden. In diesem Bereich betrug die AE für HPRT 95% und für humET_AR 93%, entsprechend einem Anstieg in den gezeigte Kurven von -3,46 bzw. -3,51.

Abb. 8: Amplifikationseffizienzen bei der Quantifizierung der Kopienzahl der Gene für HPRT und humET_AR.

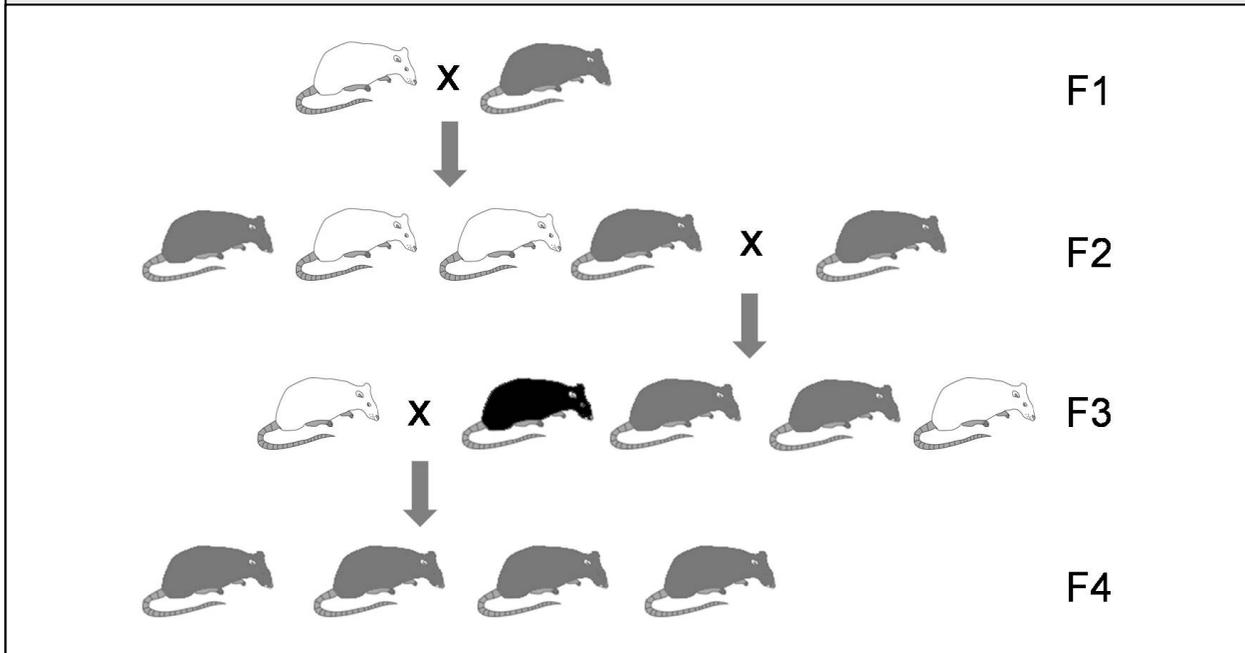


In sechs aufeinander folgenden 1:2 Verdünnungen genomischer DNA, beträgt zwischen einer eingesetzten DNA-Menge von 0,5-16 ng die Amplifikationseffizienz 95 (HPRT) bzw. 93% (humET_AR), d.h. die Verdopplung der DNA-Ausgangsmenge führt zu einer Reduktion des CT-Wertes um eins.

Bei höheren DNA-Konzentrationen zeigte sich eine Inhibierung der PCR-Reaktion durch erhöhte CT-Werte und erniedrigten Endpunktfluoreszenzen.

Im Rahmen der Methodvalidierung wurden als potenziell homozygot identifizierte Tiere mit Wildtyp Sprague-Dawley Ratten rückgekreuzt. Die so erzeugten Nachkommen würden bei korrekter Zygotiebestimmung entsprechend den Mendelschen Regeln durchgehend heterozygote transgene Merkmalsträger und damit transgen-positiv sein (siehe Abbildung 9). Dies wurde für drei weibliche und ein männliches Tieren über zwei Generationen exemplarisch gezeigt.

Abb. 9: Generierung und Identifizierung von homozygoten Merkmalsträgern durch Rückkreuzung.

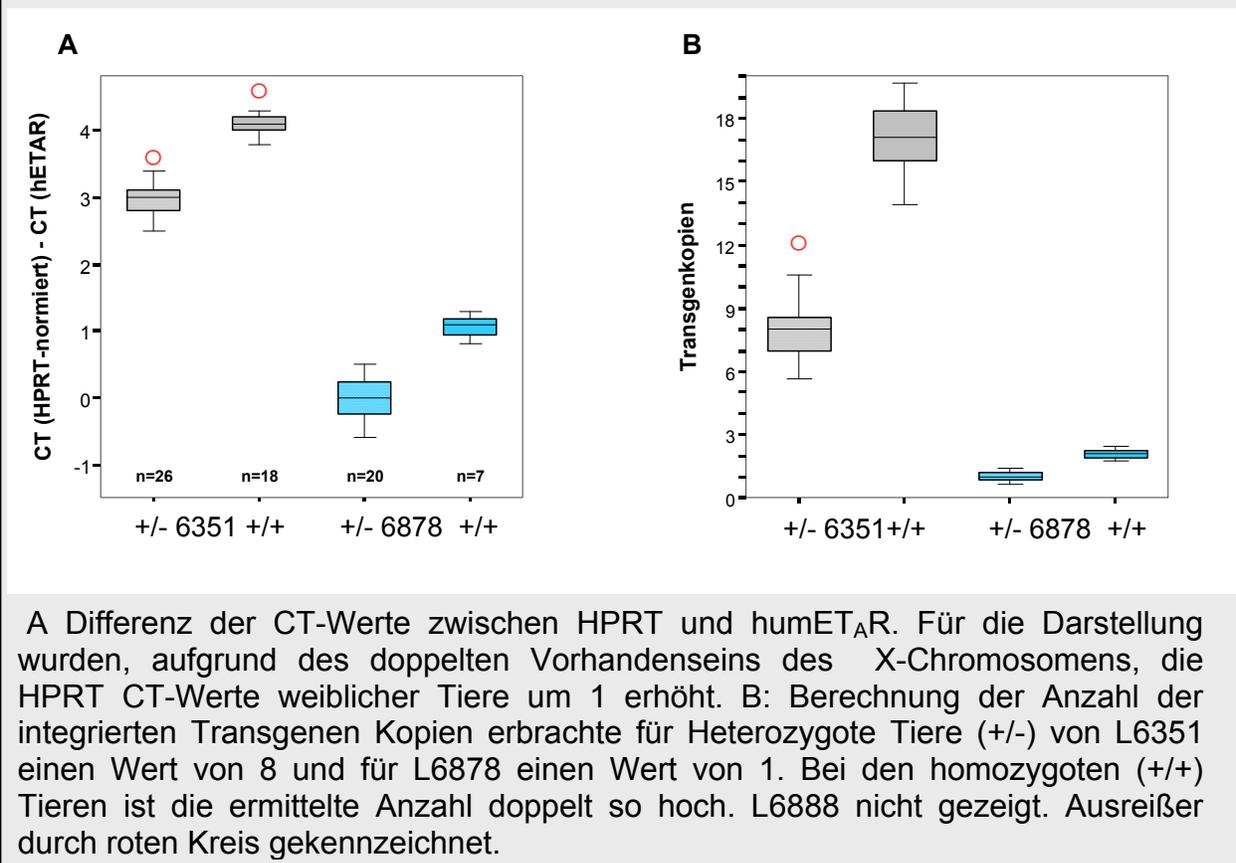


Durch Verpaarung einer transgen-negativen (weiß) mit einer transgen-heterozygoten Ratte (grau) erhält man in der ersten Generation (F1) entsprechend den Mendelschen Regeln sowohl negative als auch heterozygot-positive Merkmalsträger im Verhältnis 1:1. Durch anschließende Kreuzung von zwei heterozygoten Tieren können nun transgen-homozygote Tiere (schwarz) entstehen. Durch Rückkreuzung mit einem negativen Tier entstehen in der nächsten Generation durchgehend transgen-heterozygote Tiere. Der letzte Schritt ist notwendig zur Identifizierung von homozygoten Merkmalsträgern.

6.1.3. Bestimmung der Anzahl genomisch integrierter transgener Kopien

Mittels genomischer Realtime-PCR wurde die Anzahl genomisch integrierter Kopien in den Linien 6878, 6351 und 6888 untersucht. Es wurde in heterozygoten männlichen Tieren der Linie 6351 gezeigt, dass das Transgen 8mal häufiger als das HPRT-Gen vorhanden war, entsprechend einer CT-Wert Differenz von 3. In L6878 betrug die CT-Wert Differenz 0, d.h. HPRT und Transgen waren in gleicher Anzahl vorhanden (siehe Abbildung 10). In L6888 war das Transgen 4mal vorhanden, entsprechend einer CT-Wert Differenz von 2.

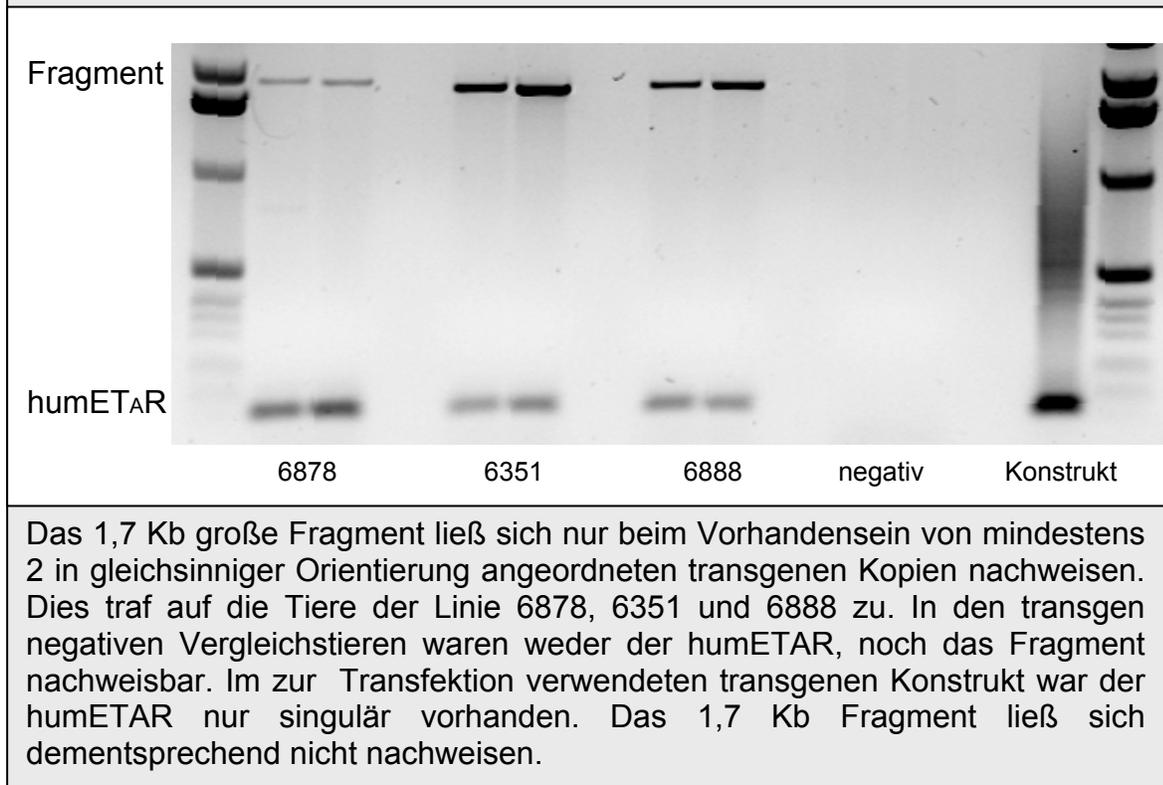
Abb. 10: CT-Wert Differenz von HPRT und humET_AR in L6351 und L6878 sowie daraus berechnete Anzahl der integrierten Transgen-Kopien.



6.1.4. Nachweis in gleichsinniger Orientierung angeordneter Transgenkopien

Durch eine konventionelle PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass sich in L6351, L6878 und L6888 mindestens 2 nebeneinander liegende Transgenkopien bzw. mittels der verwendeten Primer amplifizierbare Transgenfragmente befanden (siehe Abb. 11). Dieses Ergebnis widerspricht in L6878 der in der Realtime-PCR ermittelten singulären Transgeninsertion.

Abb. 11: Nachweis von 2 in gleichsinniger Orientierung angeordneter Transgenkopien in transgenen Tieren.

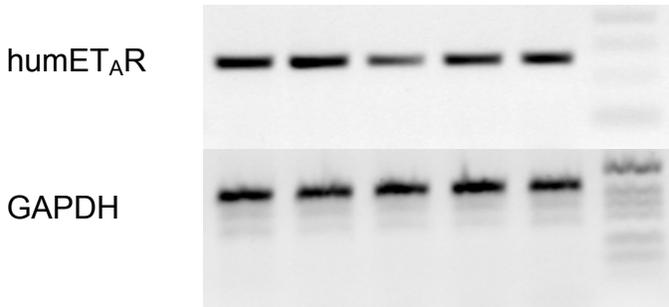


6.2. Qualitative Analyse der humET_AR mRNA-Expression

6.2.1. Postnatale Expression

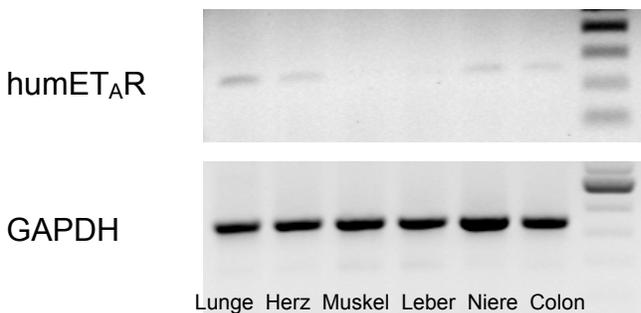
In Aorten von drei Tage alten Ratten eines Wurfes der Linie 6351 konnte eine deutliche Transgenexpression nachgewiesen werden (siehe Abb. 12). In den Organen zeigte sich dagegen kaum Expression (siehe Abb. 13). Drei Tage alte Tiere von L6878 und L6888 wurden nicht untersucht

Abb. 12: Aortale humET_AR und GAPDH Expression in neonatalen Tieren der Linie L6351.



Expression von humET_AR wurde mittels RT-PCR in fünf verschiedenen drei Tage alten transgen-positiven Tieren bestimmt. GAPDH diente als Expressionskontrolle. humET_AR: 34 PCR-Zyklen, GAPDH 22 PCR-Zyklen

Abb. 13: Organspezifische humET_AR und GAPDH Expression in einem neonatalen Tier der Linie 6351.



Expression von humET_AR wurde mittels RT-PCR in verschiedenen Organen von drei Tage alten transgen-positiven Tieren bestimmt. GAPDH diente als Expressionskontrolle. Schwache Banden in humET_AR-Expression sind als Signale aus intramuralen Gefäßen interpretierbar. humET_AR: 34 PCR-Zyklen, GAPDH 22 PCR-Zyklen

6.2.2. Transgenexpression nach einem Monat

Mittels konventioneller RT-PCR erfolgte ein Screening der Expression des Transgens in L6341, L6353, L6351, L6878 und L6888.

Nach einem Monat ließ sich eine Transgenexpression in den untersuchten Gefäßen aller Linien nachweisen. Die Expression variierte jedoch zwischen den einzelnen Linien erheblich. (Abb. 14).

Eine relevante Expression des Transgens wurde für L6351, L6878 und L6888 angenommen, während in L6353 und L6341 lediglich eine schwache Expression nachweisbar war.

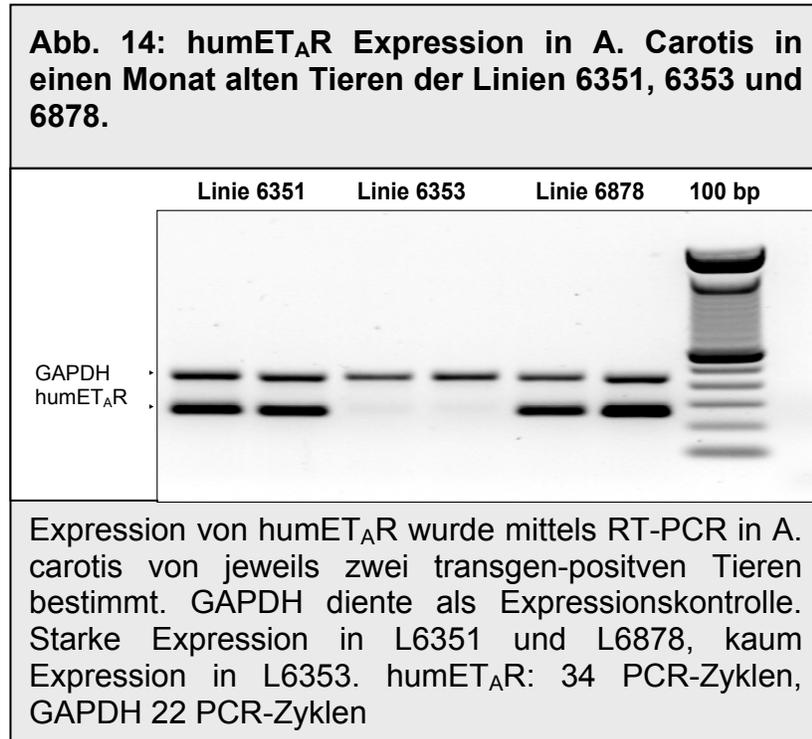
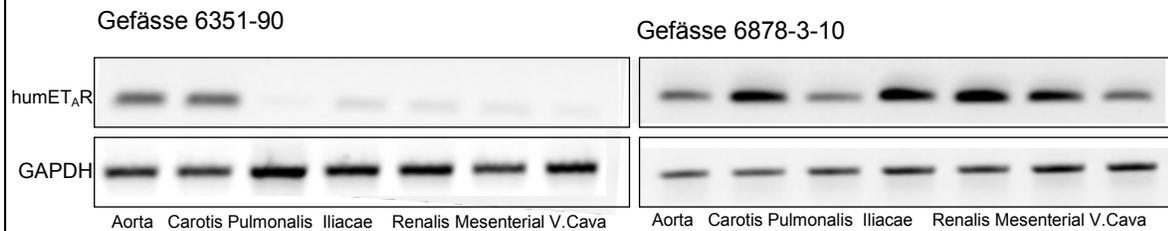
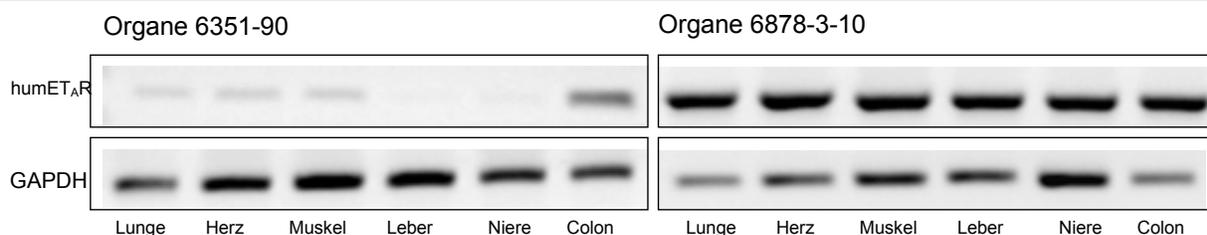


Abb.15: Vaskuläre humET_AR Expression in einen Monat alten Tieren der Linien 6351 und 6878.



Expression von humET_AR wurde mittels RT-PCR in angegeben Gefäßen von transgen-positiven Tieren bestimmt. GAPDH diente als Expressionskontrolle. Starke Expression beider Linien in Aorta und A. carotis. Deutlich schwächere Expression in den übrigen Gefäßen von L6351 bei starker Expression in L6878. humET_AR: 34 PCR-Zyklen, GAPDH 22 PCR-Zyklen

Abb. 16: Organspezifische humET_AR Expression in einen Monat alten Tieren der Linien 6351 und 6878.

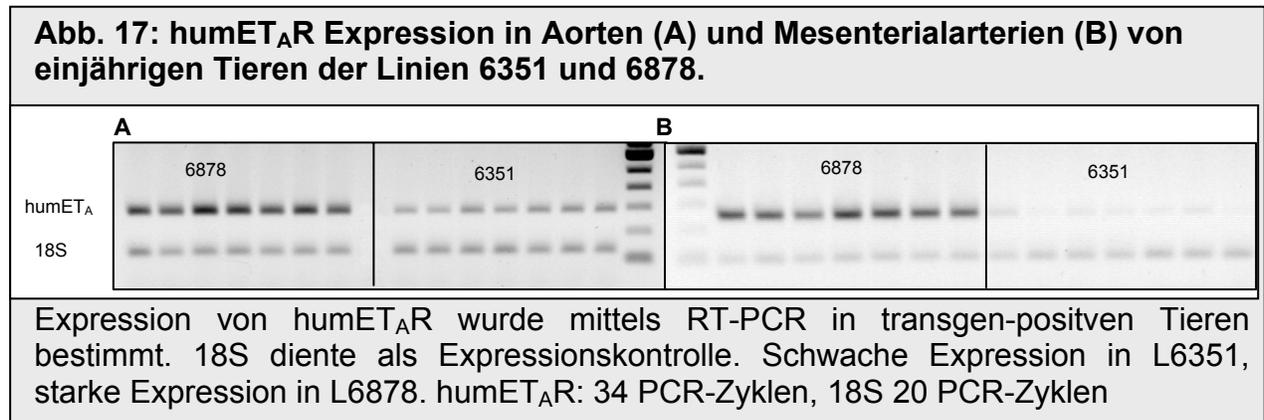


Expression von humET_AR wurde mittels RT-PCR in angegeben Organen von transgen-positiven Tieren bestimmt. GAPDH diente als Expressionskontrolle. Kaum Expression in L6351, starke Expression in L6878. humET_AR: 34 PCR-Zyklen, GAPDH 22 PCR-Zyklen

6.2.3. Expression nach vier Monaten und nach einem Jahr

Über die Zeit war die Expression des Transgens in allen Linien rückläufig. Auch hier zeigten sich aber deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Linien. Während in L6341 nach vier Monaten mittels konventioneller PCR keine Expression nachweisbar war, war in L6351 und L6878 auch nach einem Jahr noch nachweisbare Transgenexpression

vorhanden. Diese war, wie auch schon bei der Organexpression beobachtet, in L6878 deutlich stärker als in L6351.



6.3. Quantifizierung der RNA-Expression mittels Realtime-PCR

6.3.1. Effekt der verwendeten DNase auf die Signalstärke

Vor der cDNA-Synthese wurden zwei verschiedene Protokolle für den DNAase-Dau verglichen: der im Reaktionsgefäß ablaufende Dau mit RQ1-DNase (Fa. Promega) und dem RNase free DNase Set (Fa. Qiagen), welcher zusätzlich eine RNA-Aufreinigung auf Qiagen RNeasy-Säulen beinhaltet. Als Ausdruck einer stärkeren mRNA-Anreicherung durch das Qiagen Protokoll zeigten sich erhöhte ratET_AR/18S-Quotienten (Daten nicht gezeigt).

Für die Realtime-PCR wurde daher ausschließlich nach dem Qiagen-Protokoll DNase gedaute RNA eingesetzt, deren Qualität nachfolgend mit dem Agilent-Bioanalyzer kontrolliert wurde.

6.3.2. Amplifikationseffizienzen (AE)

Die mittels Standardkurven ermittelten AE betragen für humET_AR und ratET_AR jeweils 97% und für SM22 100% (Abb. 18). Für die Quantifizierung von humET_AR und ratET_AR konnte daher die Standardkurven-unabhängige Δ CT-Methode angewendet und die

Expressionsniveaus direkt miteinander verglichen werden. Aufgrund der geringeren Effizienz des ET_BR-Assays wurden mittels Standardkurven ermittelte Expressionsdaten verwendet.

Abb. 18: Zusammenhang der Steigung von Standardkurve und errechneter Amplifikationseffizienz mit relativer Abweichung nach 30 PCR-Zyklen.			
amplifiziertes Gen	Steigung	AE	Abweichung nach 30 Zyklen
humET _A R	3,39	97	1,5
ratET _A R	3,39	97	1,5
ratET _B R	3,74	85	10,2
18S	3,71	86	8,8
SM22	3,32	100	1,0

Entsprechend der Steigung in der Standardkurve kann die Amplifikationseffizienz (AE) errechnet werden. Im Vergleich mit einer mit 100% AE amplifizierten Probe würde nach 30 Zyklen unter Anwendung der Δ CT-Methode nur der in Spalte 4 angegebene Teil der wirklichen Expression in der Realtime-PCR ermittelt werden.

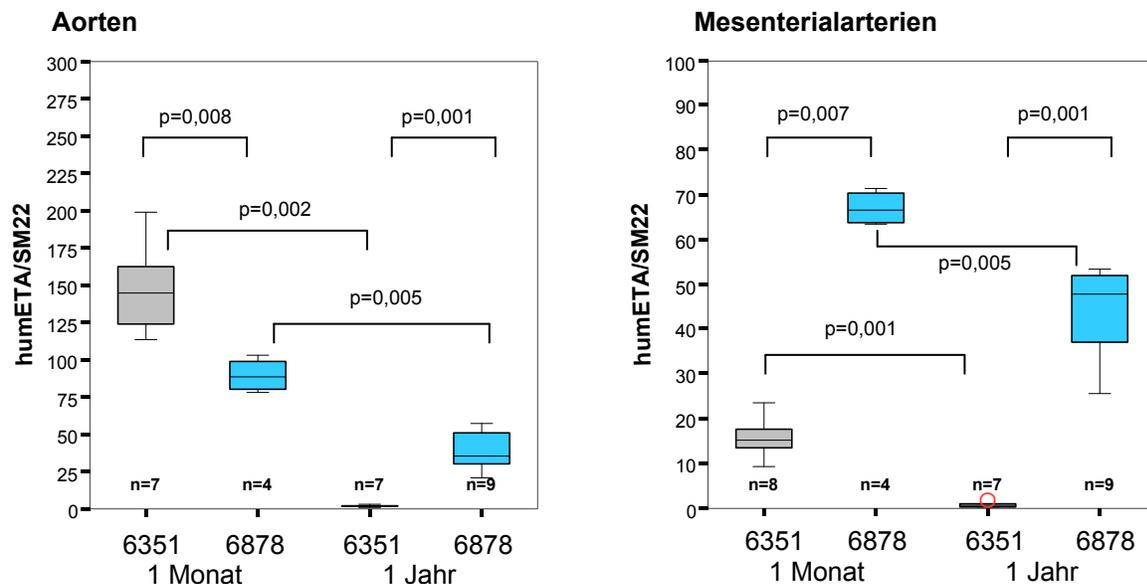
6.3.3. RNA-Expression des Transgens bei einem Monat bzw. einem Jahr alten Tieren

Die Expression des humET_AR nach einem Monat unterschied sich zwischen beiden Linien. Während die mediane Expression in den Aorten von L6351 1,6fach höher war als in L6878, betrug die Expression in den Mesenterialarterien von L6351 nur 23% der Expression in L6878.

Nach einem Jahr kam es in beiden Linien sowohl in den Aorten, als auch in den Mesenterialarterien zu einem Rückgang der humET_AR Expression.

Während dieser Rückgang bei einjährigen Tieren von L6878 in den Aorten 60% und den Mesenterialarterien 30% betrug, war in L6351 eine signifikante Expression des Transgens nicht mehr nachweisbar.

Abb.19: RNA-Expression des transgenen ET_AR (humET_AR) in Aorten und Mesenterialarterien von einem Monat bzw. einen Jahr alten Tieren der Linien 6878 und 6351.



Die Expression von humET_AR wurde mittels Realtime PCR quantifiziert und auf die Expression des muskelzellspezifischen Markers SM22 α normalisiert. Die Expression von humET_AR wurde auf die durchschnittliche Expression des endogenen ET_AR in Aorten von einem Monat alten transgen-negativen Kontrolltieren bezogen, welche mit 100% festgelegt wurde. Dargestellt sind die Mediane und 50% (Boxen) bzw. 95% Quantile (sog. Whiskers). Ausreißer sind mit einem roten Kreis markiert. Tiere der Linie 6351 grau und 6878 blau gekennzeichnet.

6.3.4. RNA-Expression des endogenen ET_AR in einen Monat bzw. einen Jahr alten Tieren

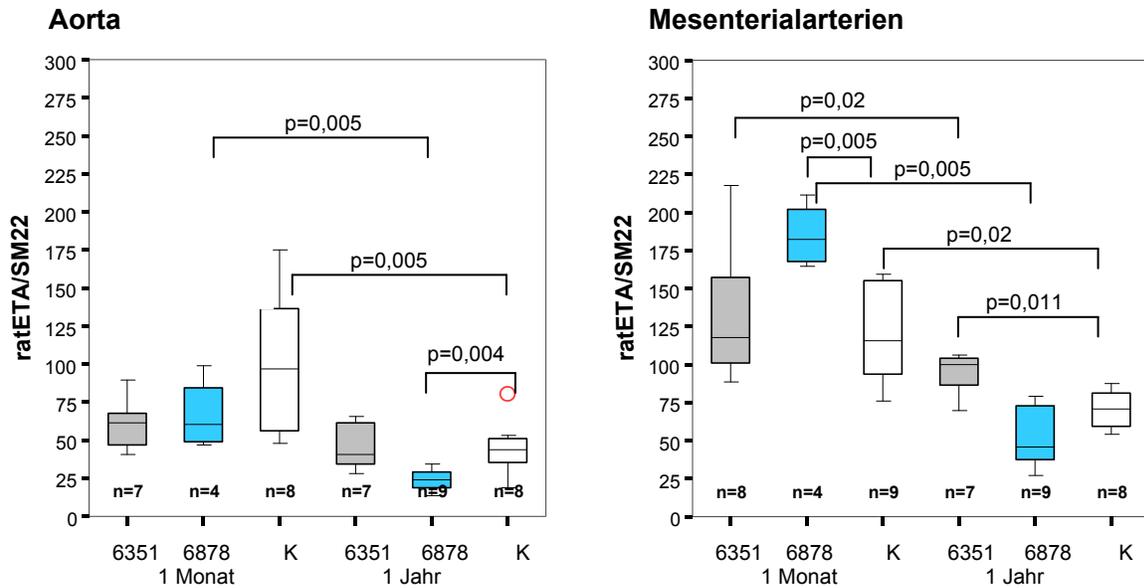
In den Aorten von einem Monat alten Tieren von L6878 und L6351 wurde eine verminderte Expression des endogenen ET_AR (ratET_AR) gegenüber der Transgen-negativen Kontrollgruppe beobachtet. Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant. Zwischen L6351 und L6878 bestanden bzgl. der ratET_AR-Expression keine relevanten Expressionsdifferenzen. Nach einem Jahr war eine Expressionsminderung des ratET_AR nur noch in der weiterhin auf hohem Niveau Transgen-exprimierenden L6878 nachweisbar. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war hier die ratET_AR-Expression um 44% vermindert.

In Mesenterialarterien zeigte sich nach einem Monat zwischen L6351 und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der ratET_AR Expression. In L6878 kam es hingegen zu einer Expressionszunahme des endogenen Rezeptors gegenüber der Kontrollgruppe um 58%. Nach einem Jahr zeigte sich lediglich in L6351 eine statistisch signifikant erhöhte mRNA-Expression um 41% gegenüber der Kontrollgruppe. In L6878 war die Expression hingegen vermindert (statistisch nicht signifikant).

Sowohl in den Aorten als auch in den Mesenterialarterien aller untersuchten Gruppen war nach einem Jahr eine Verminderung der auf die Expression von sm22 α standardisierten ratET_AR-Expression beobachtbar. In den Aorten der Kontrolltiere verminderte sich die Expression nach einem Jahr gegenüber der nach einem Monat um 55% und in L6878 um 60%. Die Abnahme der Expression in L6351 war statistisch nicht signifikant.

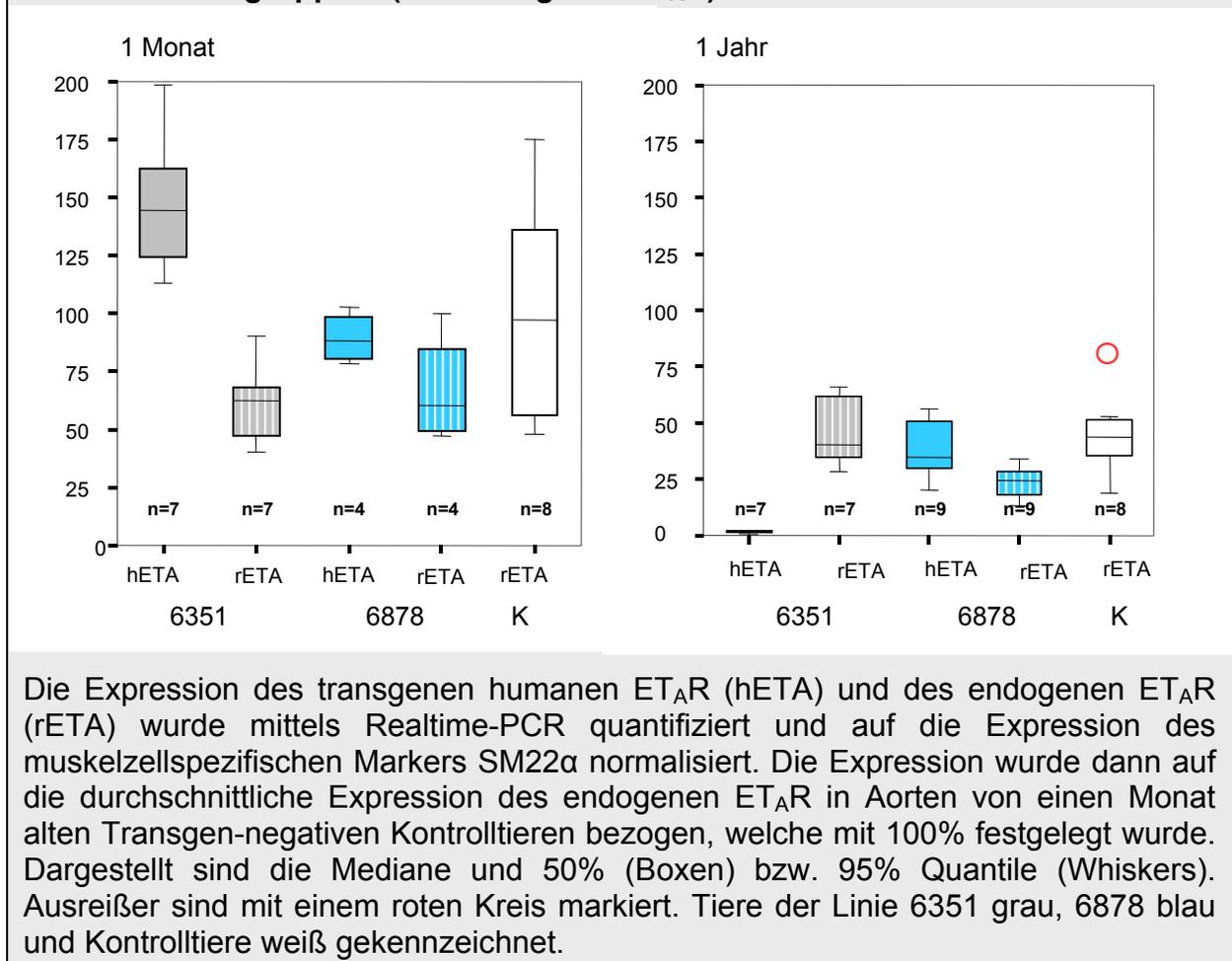
Nach einem Jahr verminderte sich die Expression des ratET_AR in den Mesenterialarterien der Kontrolltiere um 39%, in L6351 um 15% und in L6878 um 75% gegenüber der Expression nach einem Monat.

Abb.20: RNA-Expression des endogenen ET_AR (ratET_AR) in Aorten (A) und Mesenterialarterien (B) von einen Monat bzw. einen Jahr alten Tieren der Linien 6351, 6878 sowie der transgen-negativen Kontrollgruppe (K).



Die Expression von ratET_AR wurde mittels Real time PCR quantifiziert und auf die Expression des muskelzellspezifischen Markers SM22 α normalisiert. Die Expression von ratET_AR wurde auf die durchschnittliche Expression in Aorten von einen Monat alten Kontrolltieren bezogen, welche mit 100% festgelegt wurde. Dargestellt sind die Mediane und 50% (Boxen) bzw. 95% Quantile (Whiskers). Ausreißer sind mit einem roten Kreis markiert. Tiere der Linie 6351 grau, 6878 blau und Kontrollgruppe weiß gekennzeichnet.

Abb. 21: Vergleich der Expression des transgenen und endogenen ET_AR in Aorten von einem Monat bzw. einen Jahr alten Tieren der Linien 6351, 6878 und in der Kontrollgruppe K (nur endogener ET_AR).



6.3.5. Bestimmung der RNA-Gesamttranskriptmenge des Endothelin-A Rezeptors

Die summative Darstellung der ET_AR-Transkriptmenge (humET_AR + ratET_AR) zeigt Abbildung 22. Voraussetzung für die Quantifizierung war die nachgewiesene nahezu identische Amplifikationseffizienz für humET_AR und ratET_AR sowie die Anwendung der Δ CT-Methode.

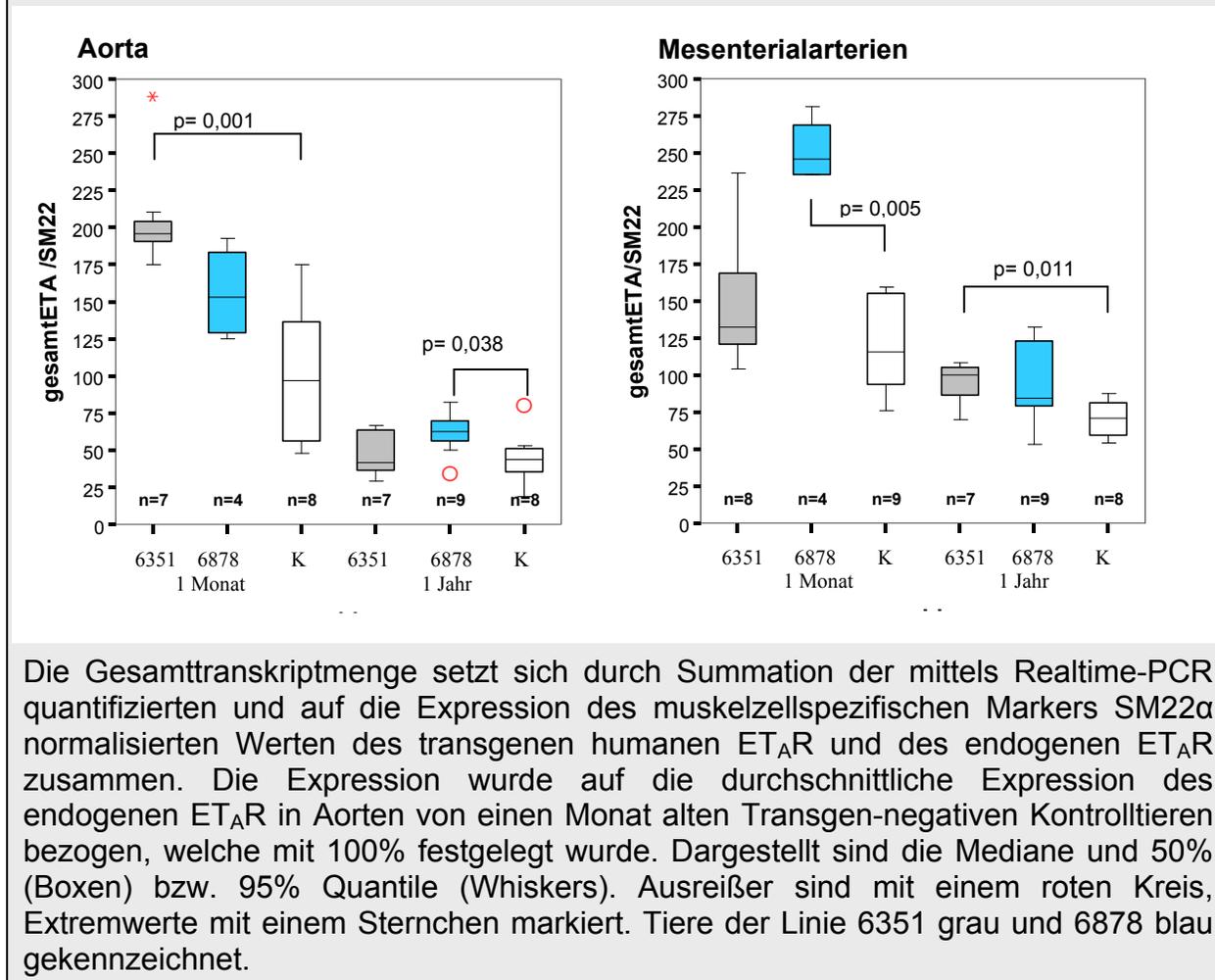
Hierbei zeigte sich nach einem Monat in den Aorten eine Erhöhung der Gesamttranskriptmenge sowohl in L6878 um 58% (statistisch nicht signifikant), als auch in L6351 um 102% gegenüber der Kontrollgruppe. Nach einem Jahr war ein statistisch

signifikanter Unterschied nur noch in L6878 im Sinne einer Expressionserhöhung um 44% gegenüber der Kontrollgruppe nachweisbar.

In den Mesenterialarterien bestand nach einem Monat in L6878 eine Expressionserhöhung gegenüber der Kontrollgruppe um 113%. Diese beruhte jedoch nicht nur auf der anhaltenden Transgenexpression, sondern insbesondere auf der erhöhten endogenen ratET_AR-Expression. Nach einem Jahr war keine statistisch signifikante Erhöhung der Gesamttranskriptmenge mehr nachweisbar.

In den Mesenterialarterien von L6351 war nach einem Monat keine Erhöhung der ET_AR-Gesamttranskriptmenge gegenüber der Kontrollgruppe nachweisbar. Nach einem Jahr bestand eine Transkriptionserhöhung gegenüber der Kontrollgruppe um 30% welche jedoch, bei kaum noch nachweisbarer Transgenexpression, hauptsächlich auf einer erhöhten endogenen Rezeptorexpression zurückzuführen war.

Abb. 22: Summative Darstellung der Gesamt-RNA Expression des ET_AR in Aorten und Mesenterialarterien von einem Monat bzw. einen Jahr alten Tieren der Linien 6351, 6878 sowie der Kontrollgruppe (K).



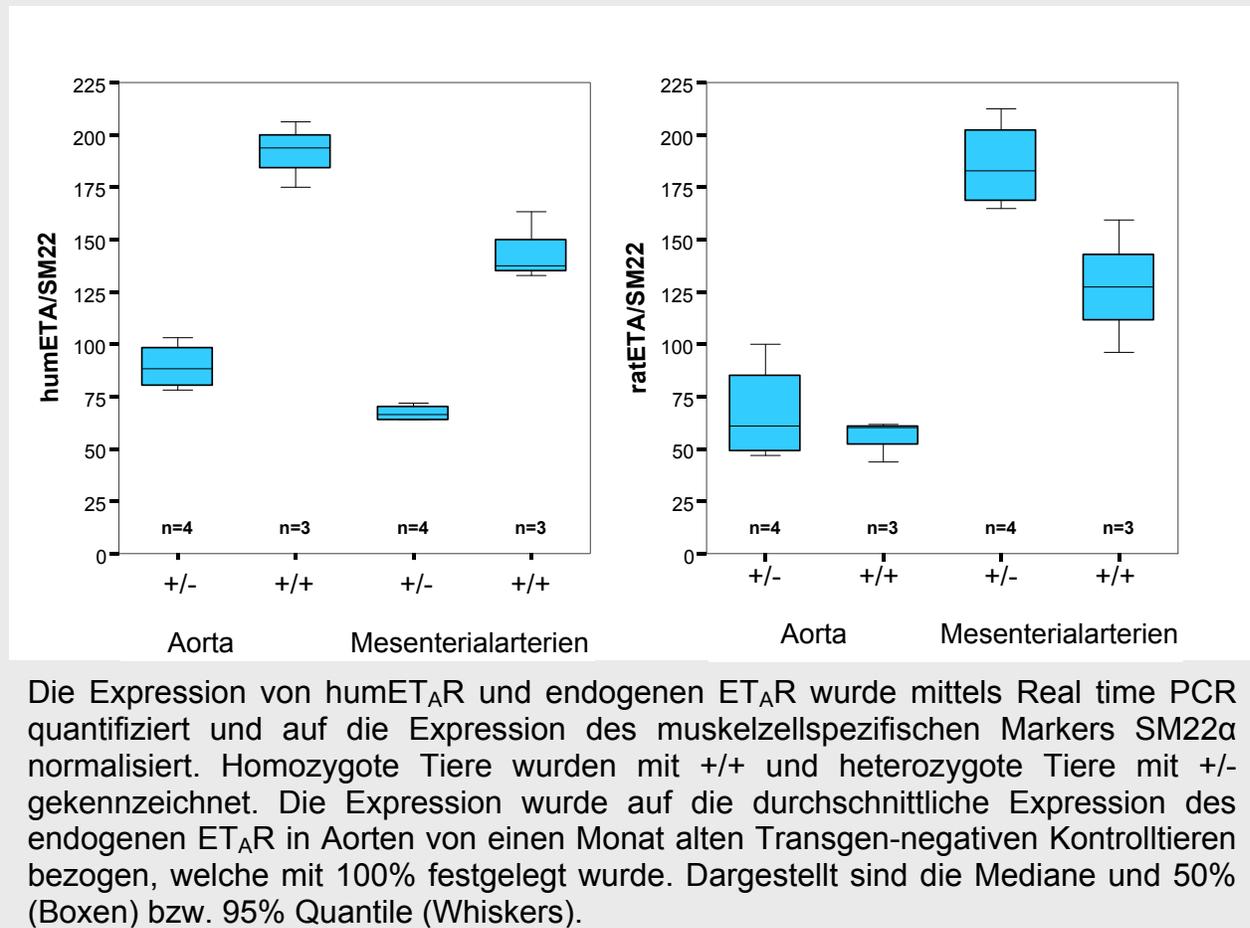
6.3.6. RNA-Expression von humanen- und endogenen ET_AR in transgen-homozygoten und heterozygoten Tieren von L6878

Mittels SYBR-Green Realtime PCR wurde bei drei einen Monat alten Tieren von L6878 Homozygotie bezüglich des transgenen Status ermittelt (siehe oben).

Es zeigte sich, dass die Transgen-Expression in diesen Tieren gegenüber heterozygoten Merkmalsträgern sowohl in Aorten als auch in Mesenterialarterien um den Faktor 2 erhöht war.

Eine Erniedrigung des endogenen $ET_A R$ ließ sich jedoch nur in den Mesenterialarterien nachweisen. Aufgrund der geringen Gruppengröße wurde eine statistische Signifikanztestung unterlassen.

Abb. 23: RNA-Expression des transgenen $humET_A R$ und endogenen $ET_A R$ in Abhängigkeit vom Transgen-Zygotiestatus in Aorten und Mesenterialarterien von einem Monat alten Tieren der Linie 6878.



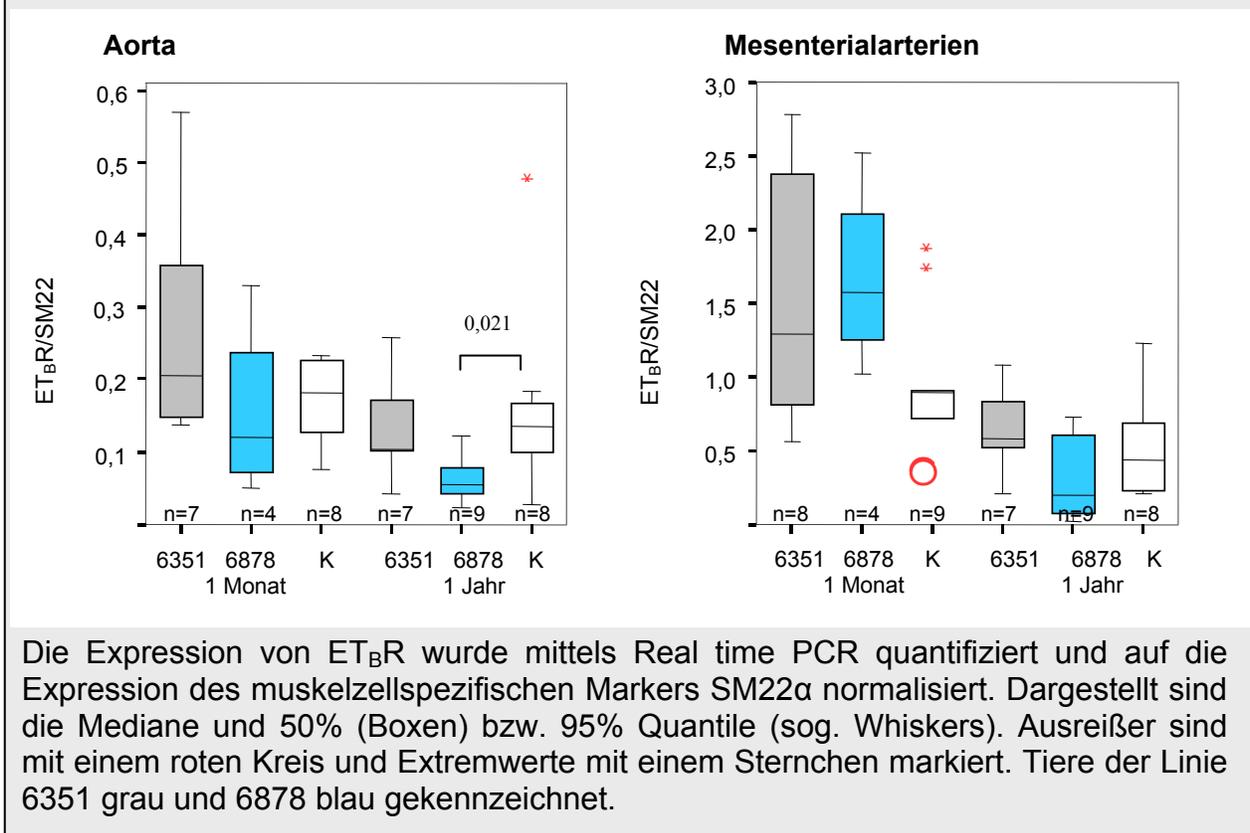
6.3.7. RNA-Expression des endogenen $ET_B R$ in einen Monat bzw. einen Jahr alten Tieren

Aufgrund der endothelialen Expression des endogenen $ET_B R$ wurde in der Analyse sowohl eine Standardisierung über 18S, zur Erfassung der Gesamt- $ET_B R$ Expression, als auch über $SM22$, zur Erfassung der glattmuskelspezifischen $ET_B R$ -Expression durchgeführt. Es

zeigten sich in beiden Auswertungen, außer einer verminderten Expression in den Aorten der einjährigen Tiere von L6878, keine relevanten Unterschiede zwischen den Transgenen- und den Kontrolltieren.

In der SM22-Auswertung war weiterhin eine Abnahme der ET_B R -Expression nach einem Jahr gegenüber einem Monat zu verzeichnen. Diese war in den Mesenterialarterien stärker ausgeprägt als in den Aorten.

Abb. 24: RNA-Expression des endogenen ET_B R in Aorten und Mesenterialarterien von einem Monat bzw. einen Jahr alten Tieren der Linien L6878 und L6351, sowie der Kontrollgruppe K.

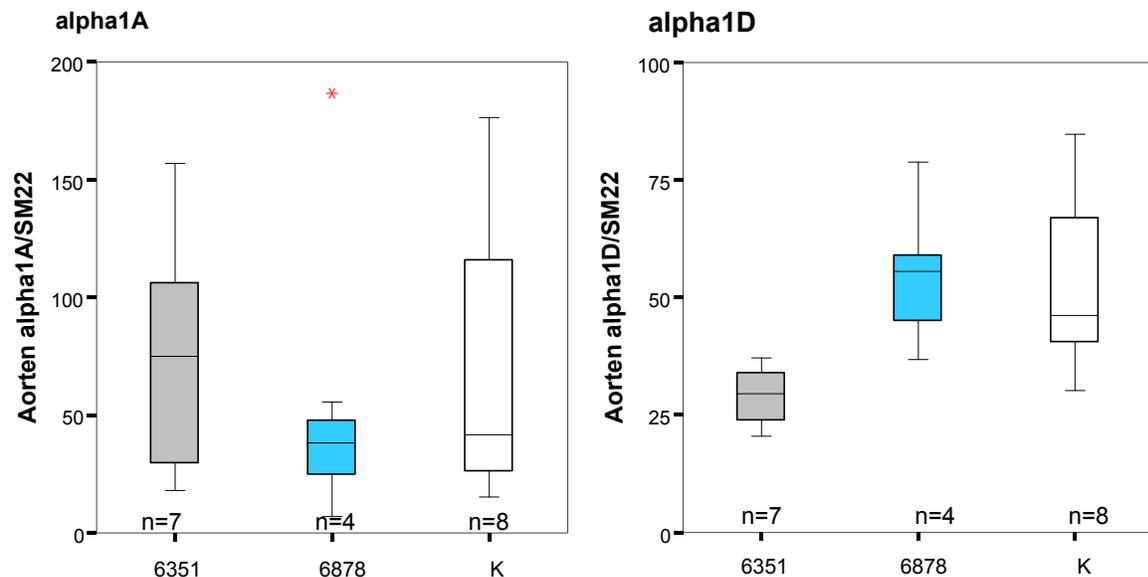


6.3.8. Auswirkungen auf alpha1-adrenerge Rezeptoren

Mittels SYBR-Green basierter Realtime-PCR wurde die Expression des alpha1B-Rezeptors in allen Linien sowohl in den Aorten als auch in den Mesenterialarterien untersucht. Die alpha1A und D Rezeptoren wurden nur in Aorten von einem Monat alten Tieren bestimmt.

Zwischen alpha1A und D Rezeptoren von transgen-negativen und transgen-positiven Tieren ließen sich keine signifikanten Unterschiede zeigen. Es zeigte sich innerhalb der Gruppen eine starke Variabilität (Abb. 25).

Abb. 25: RNA-Expression der alpha1A und D adrenergen Rezeptoren in Aorten von einen Monat alten Tieren der Linien L6878 und L6351 sowie der Kontrollgruppe K.

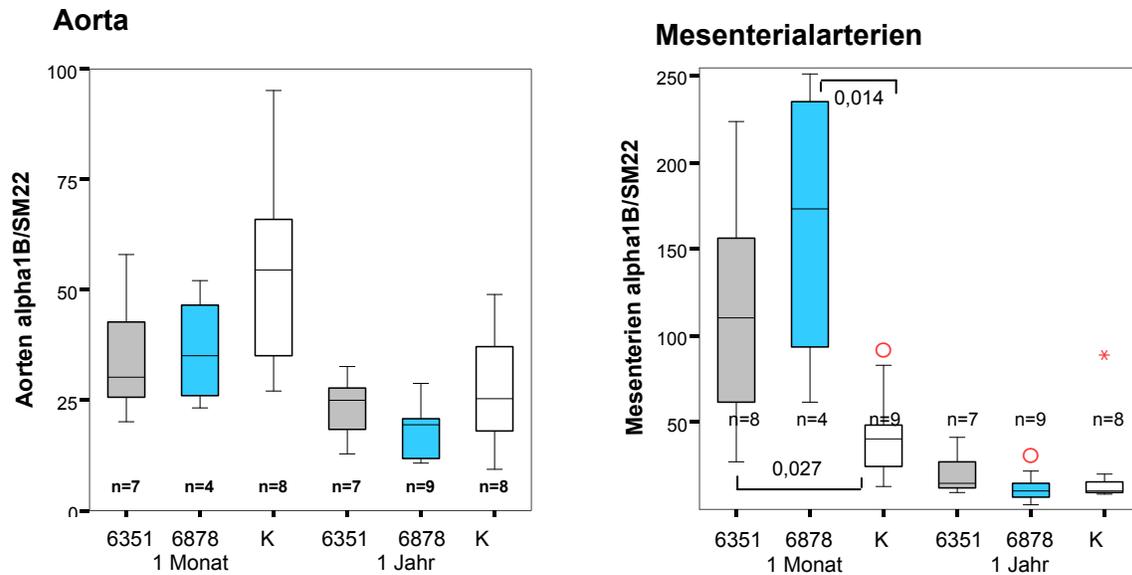


Die Expression der alpha1A und D-Rezeptoren wurde mittels SYBR-Green basierter Realtime PCR quantifiziert und auf die Expression des muskelzellspezifischen Markers SM22 α normalisiert. Alle Werte wurden mit der Δ CT-Methode berechnet und auf den durchschnittlichen CT-Wert von einen Monat alten Kontrolltieren bezogen. Dargestellt sind die Mediane und 50% (Boxen) bzw. 95% Quantile (Whiskers). Extremwerte sind mit einem Sternchen markiert. Tiere der Linie 6351 grau und 6878 blau gekennzeichnet.

Auch bei der Expression des alpha1B-Rezeptors zeigte sich eine starke interindividuelle Variabilität in den Gruppen.

Während in den Aorten der transgen-positiven Tiere zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Expressionsunterschied nachgewiesen werden konnte, war die alpha1B-Expression in Mesenterialarterien von einen Monat alten Tieren von L6351 und L6878 gegenüber der Kontrollgruppe um den Faktor 2,5 bzw. 2,8 signifikant erhöht. Nach einem Jahr war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar (Abb. 26).

Abb. 26: RNA-Expression des alpha1B-adrenergen Rezeptors in Aorten und Mesenterialarterien von einen Monat alten Tieren der Linien 6351, 6878 und Kontrolltieren



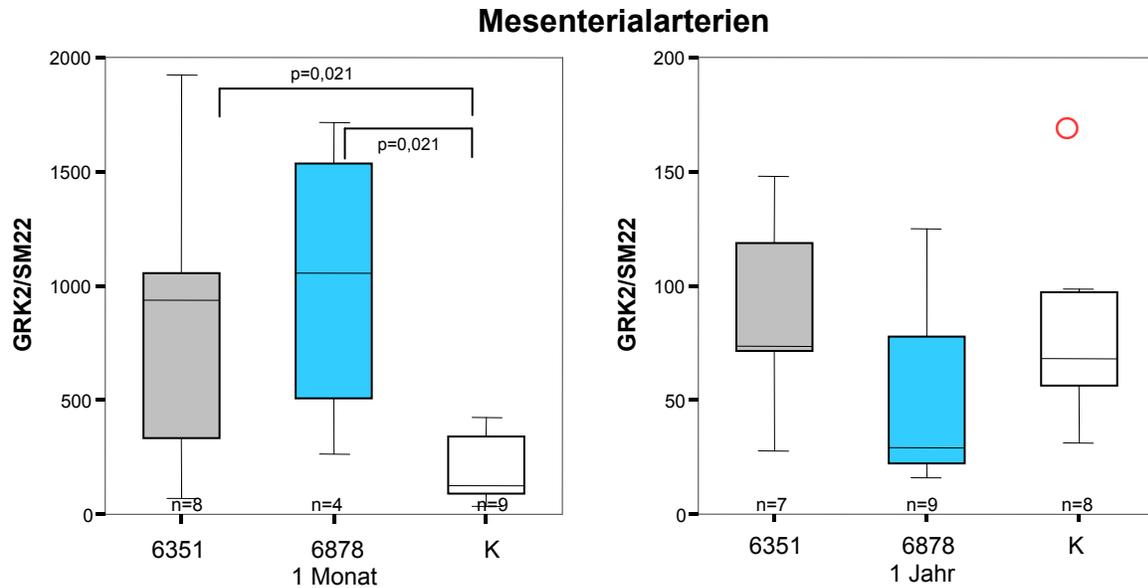
Die Expression von alpha1B wurde mittels SYBR-Green basierter Realtime PCR quantifiziert und auf die Expression des muskelspezifischen Markers SM22 α normalisiert. Alle Werte wurden mit der Δ CT-Methode berechnet und auf den durchschnittlichen CT-Wert von Aorten einen Monat alter Kontrolltiere bezogen. Dargestellt sind die Mediane und 50% (Boxen) bzw. 95% Quantile (Whiskers). Extremwerte sind mit einem Sternchen markiert. Tiere der Linie 6351 grau, 6878 blau und Kontrolltiere weiß gekennzeichnet.

6.3.9. RNA-Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen GRK2 und GRK3

Mittels SYBR-Green basierter Realtime-PCR wurde die Expression der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen 2 und 3 bestimmt.

In den Mesenterialarterien ließ sich bei einen Monat alten Tieren eine signifikante Expressionssteigerung von GRK2 in L6351 und L6878 gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen. Auch hier traten, wie bei den alpha1B-adrenergen Rezeptoren, innerhalb der Gruppen starke Schwankungen der GRK2-Expression auf. Die Expression war bei den einjährigen Tieren deutlich geringer als bei den einen Monat alten Tieren.

Abb. 27: RNA-Expression der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2) in Mesenterialarterien von einem Monat (A) und einem Jahr (B) alten Transgenen- und Kontrolltieren.

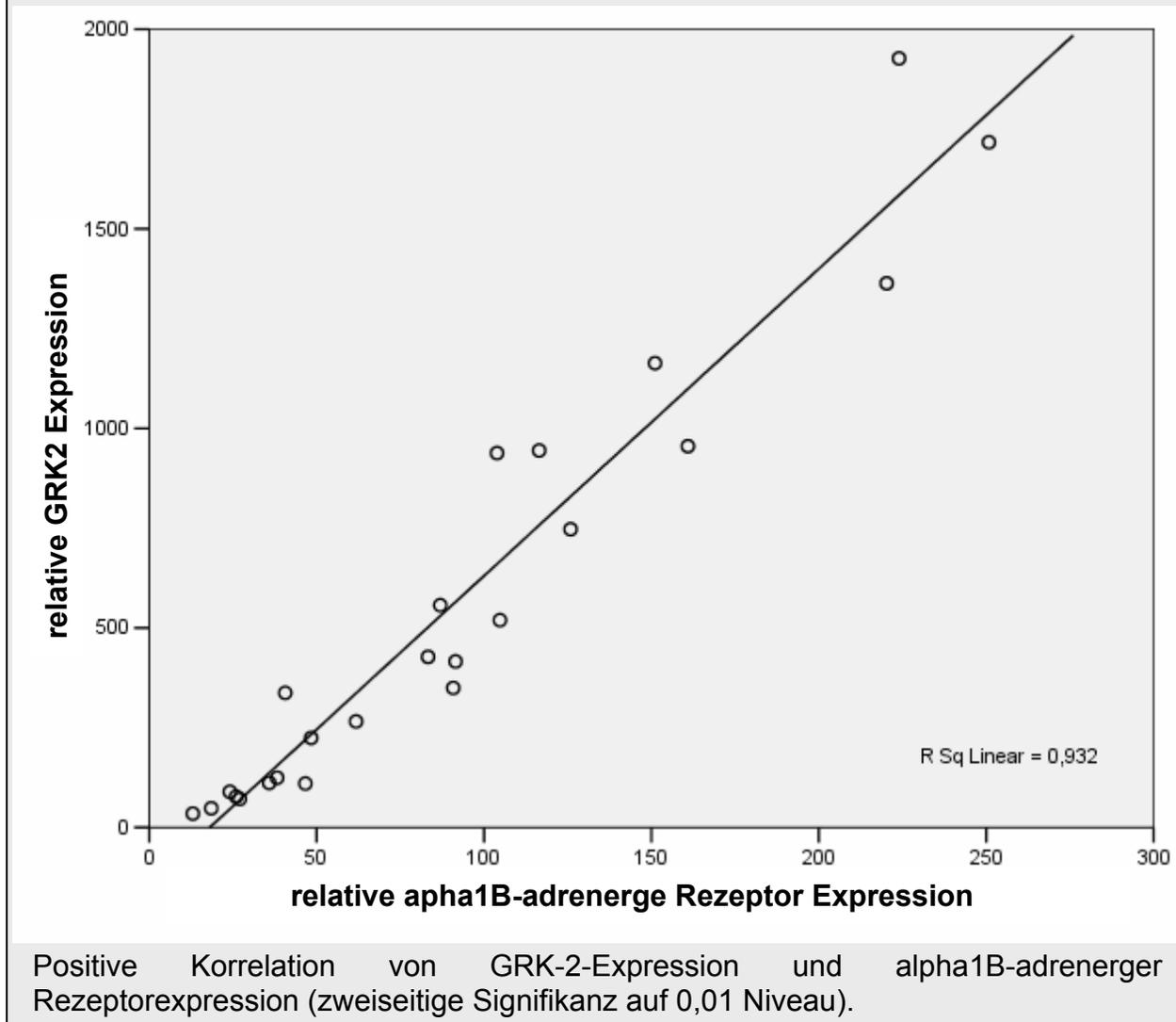


Die Expression von GRK2 wurde mittels SYBR-Green basierter Realtime PCR quantifiziert und auf die Expression des muskelzellspezifischen Markers SM22 α normalisiert. Alle Werte wurden mit der Δ CT-Methode berechnet und auf den durchschnittlichen CT-Wert von Aorten einen Monat alter Kontrolltiere bezogen. Dargestellt sind die Mediane und 50% (Boxen) bzw. 95% Quantile (sog. Whiskers). Ausreißer sind mit einem Kreis markiert. Tiere der Linie 6351 grau, 6878 blau und Kontrolltiere weiß gekennzeichnet.

6.3.10. Zusammenhang zwischen alpha1B adrenerger mRNA-Rezeptorexpression und mRNA Expression von GRK2

Aufgrund der starken mRNA Expressionsvariabilität von GRK2 und alpha1B-adrenergen Rezeptor wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei den Mesenterialarterien von einem Monat alten Tieren eine hochsignifikante, nahezu lineare Korrelation (Korrelationskoeffizient 0,93).

Abb. 28: Korrelation der mRNA-Expression von alpha1B-adrenergen Rezeptor und G-Protein gekoppelter Rezeptorkinase 2 (GRK2) in Mesenterialarterien von einen Monat alten transgenen und Kontrolltieren.



Eine nach Pearson signifikant positive Korrelation (0,01 Signifikanzniveau) ergab sich auch bei Testung der Mesenterialarterien und Aorten von einjährigen Tieren (Daten nicht gezeigt).

In den Aorten von einen Monat alten Tieren wurde nur eine nicht-parametrische Signifikanz nach Spearman (0,01 Signifikanzniveau) nachgewiesen.

7. Diskussion

Durch pronukleäre Mikroinjektion wurde ein transgenes Tiermodell generiert, welches den humanen Endothelinrezeptor Typ A unter Kontrolle eines Promotorfragmentes des murinen SM22 α Promotors genomisch integriert hatte. Dieses Promotorfragment sollte eine gefäßmuskelspezifische Expression gewährleisten.

Mit diesem Modell ist es nicht nur möglich, die ET_AR-Funktion in vivo durch pharmakologische Tests zu untersuchen, sondern auch Adaptationsvorgänge des Organismus bei unphysiologisch erhöhter Rezeptorfunktion aufzuklären.

Diese Arbeit befasste sich hierbei insbesondere mit der Untersuchung von Anpassungsvorgängen auf mRNA-Expressionsebene.

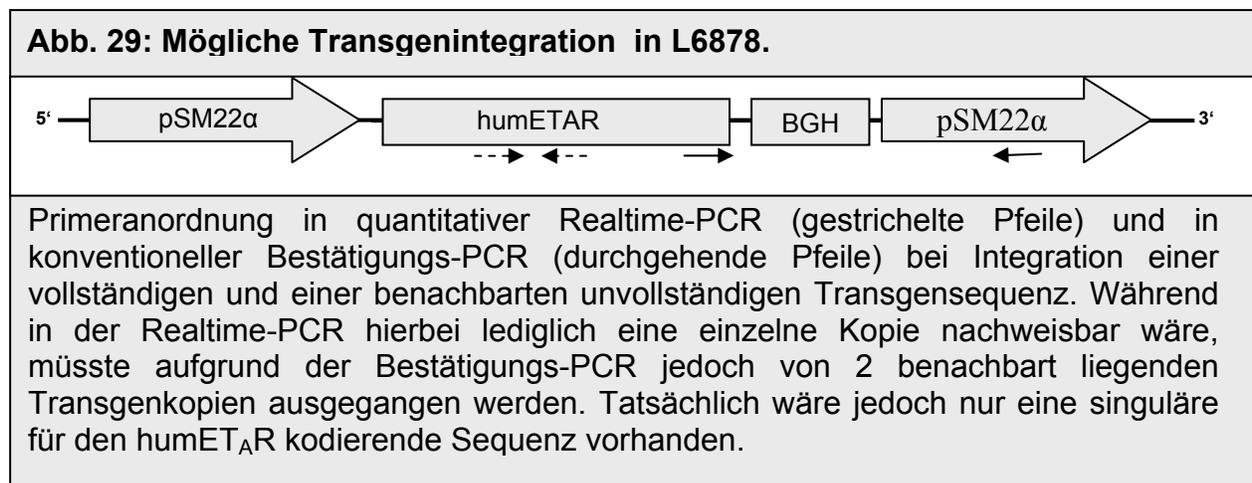
7.1. Insertion des Transgens

Es konnte für drei etablierte transgene Linien gezeigt werden, dass das transgene Konstrukt in unterschiedlicher Häufigkeit in das Genom integriert wurde. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass mindestens zwei Fragmente bzw. vollständige Kopien in Nachbarschaft und gleichsinniger Orientierung auf einem Chromosom liegen müssen. Diese Insertion multipler transgener Kopien an einen Ort eines Chromosoms wurde bereits in der Literatur beschrieben.¹²⁶

In der Linie 6878 kam es hierbei zu widersprüchlichen Ergebnissen zwischen quantitativer Realtime-PCR und konventioneller Bestätigungs-PCR. Während in der quantitativen PCR eine einzelne Kopie nachgewiesen wurde, musste aufgrund der konventionellen PCR jedoch von mindestens zwei gleichsinnig angeordneten Tg-Kopien bzw. Tg-Fragmenten ausgegangen werden. Diese Abweichung in der Kopienzahlbestimmung könnte durch geringe Unterschiede in der Amplifikationseffizienz des Transgens und des HPRT-Gens in der Realtime-PCR bedingt sein. Diese würden aber nach durchschnittlich 25 PCR-Zyklen bis zum Erreichen des CT-Wertes nur eine Abweichung um den Faktor 1,3 erlauben (siehe Abbildung 18). Da in der konventionellen PCR jedoch immer benachbarte und in gleichsinniger Orientierung angeordnete 3' humET_AR und 5' SM-22 Abschnitte nachgewiesen wurden, wäre es auch möglich, dass innerhalb des Tg-Konstruktes

Strangbrüche auftraten, welche zu einer Integration von unvollständigen Transgenfragmenten in das Rattengenom führten. So könnte z.B. eine vollständige Transgenkopie in Verbindung mit dem 3' Ende eines unvollständigen Transgenfragmentes, welches nicht die humET_AR-Sequenz beinhaltete (und daher auch nicht in der Realtime-PCR erfasst worden wäre), eingefügt worden sein (siehe Abb. 29).

Aufgrund des Nachweises der eigentlichen humET_AR-Sequenz ist der Realtime-PCR basierten Kopienzahlbestimmung eine größere Bedeutung zuzuweisen als der konventionellen Bestätigungs-PCR.



Weiterhin wäre eine Tg-Integration auf mehreren Chromosomen prinzipiell möglich und würde im Verlauf der Generationen transgener Ratten zu Veränderungen der Kopienanzahl führen können. Die Transgenkopienzahlbestimmung in dieser Arbeit zeigte aber keine Veränderungen in der Transgenanzahl über verschiedene Generationen.

Weiterhin unbestimmt bleibt auch der Ort der chromosomalen Transgenintegration. Diese Orte werden sowohl aufgrund zufälliger chromosomaler Strangbrüche als auch durch kurze homologe Sequenzen des Transgens zum Integrationsort bestimmt. ¹²⁷

7.2. Expression

7.2.1. Expression des Transgens

Mittels Endpunkt-PCR wurde in den Gefäßen und Organen der transgenen Tiere die Expression des Transgens im Rahmen eines Screenings bestimmt. Hierbei ließen sich bereits deutliche Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Linien ausmachen. Obwohl das Transgen bei einen Monat alten Tieren in den Gefäßen aller Linien nachweisbar war, zeigten sich deutlich stärkere Expressionssignale in L6878 und L6351 gegenüber L6341 und L6353. Die Weiterzucht der beiden letztgenannten Linien wurde daher beendet. In L6878 zeigte sich zusätzlich eine deutliche Expression in den entnommenen Organen.

In L6351 und L6878 wurde nachfolgend mittels quantitativer Realtime-PCR die Transgenexpression an zwei ausgewählten Gefäßsystemen (Aorta und Mesenterialarterien) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (ein Monat und ein Jahr) genau quantifiziert. Die mittels Endpunkt-PCR erzielten Ergebnisse konnten hierdurch bestätigt werden und es ließen sich weitergehend wichtige Aussagen bezüglich der Expressionsniveaus des Transgens in beiden untersuchten Linien treffen. Hierbei zeigten sich nicht nur unterschiedliche Expressionsstärken zwischen den untersuchten Gefäßsystemen (Aorta versus Mesenterialarterien) innerhalb einer Linie, sondern auch differenzierte Expressionsniveaus zwischen den beiden Linien.

Interessanterweise zeigte sich in den Aorten von einen Monat alten Tieren der Linie 6351 eine gegenüber L6878 leicht erhöhte Tg-Expression, während die Expression in den Mesenterialarterien von L6351 gegenüber L6878 deutlich geringer ausgeprägt war. Auch war der Abfall der Tg-Expression in L6351 in beiden untersuchten Gefäßsystemen gegenüber L6878 deutlich verstärkt, so dass das Transgen nach einem Jahr in L6351 sowohl in den Aorten, als auch in den Mesenterialarterien kaum noch exprimiert wurde. In L6878 kam es hingegen lediglich zu einer geringen Expressionsminderung.

Inwieweit die verminderte Tg-Expression in den Mesenterialarterien von L6351 gegenüber L6878 Ausdruck einer bereits weiter fortgeschrittenen Herunterregulation des Tg ist,

könnte nur durch engere Fassung der Untersuchungszeitpunkte, z.B. durch Einfügen weiterer Zeitpunkte, beantwortet werden.

Die hier beobachtete Downregulation von Transgenen unter der Kontrolle des SM22 α -Promotors wurde bereits von Xu et al. 2003 beschrieben.¹²⁸ In einem LacZ-Reporterassay konnte gezeigt werden, dass neben den für die Expressionsregulation wichtigen CArG-Boxen weitere regulatorische Elemente im Promotor vorhanden sind, welche in dem hier verwendeten Promotorfragment fehlten. Möglicherweise sind es gerade diese Bereiche, welche für eine anhaltende Promotorfunktion erforderlich sind. In selbiger Arbeit konnte auch eine im adulten Stadium anhaltende SM22 α -gesteuerte Reporterexpression durch Verwendung eines sog. bakteriellen artifiziellen Chromosoms (BAC) gezeigt werden. Dieses BAC beinhaltete neben der gesamten genomischen SM22 α -Sequenz zusätzlich die benachbarten 100 Kilobasen zum 5' und 32 Kilobasen zum 3' Ende. Gleichzeitig ging dies jedoch mit einem Verlust der glattmuskelzell-spezifischen Expression einher.

Weitere wichtige Faktoren für die Promotorfunktion sind auch der Acetylierungs- und Methylierungsstatus, wie von Qiu et al. und Mutskov et al. gezeigt werden konnte.^{129 130} Durch Anwendung von methylierungsspezifischen PCR-Verfahren könnte geklärt werden, ob in den hier untersuchten Tiermodellen eine Methylierung des Transgens erfolgte und ob sich diese im Laufe der Zeit änderte.

Interessanterweise war die Expression des Transgens in einen Monat alten Tieren auf dem Niveau der Expression des endogenen ET_AR der Ratte. Aufgrund dieses Expressionsniveaus sollte der transgene Rezeptor auch eine funktionelle Relevanz entfalten können. Inwieweit sich jedoch die RNA-Protein Relationen zwischen endogenem und transgenem Rezeptor unterscheiden, wurde in dieser Arbeit nicht geklärt. Denkbar wären u.a. strukturbedingte unterschiedliche RNA-Halbwertszeiten.

Da jedoch auch bekannt ist, dass der Rückschluss von RNA-Expression auf Protein-Translation nur bedingt gültig ist,¹³¹ wäre zur weiteren Charakterisierung von transgenen Modellen der Proteinnachweis des Transgens zu fordern. Aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zwischen humanen und murinen ET_AR wären Westernblotanalysen zur Erfassung der Gesamtzeptormenge geeignet.

Konkret ließe sich die erhöhte ET_AR-Dichte in vitro durch eine erhöhte Proteinbindung und in vivo durch eine Linksverschiebung der ET-1 Antwort nachweisen. Dies konnte in Mesenterialarterien von Tieren der Linien 6351 und 6878 gezeigt werden (Saxena A. 2007).

In vivo wäre jedoch auch eine funktionelle post-translationale Rezeptorinaktivierung möglich. Anhaltspunkte für eine Beteiligung an auto- und heterologer Rezeptorinaktivierung sind u.a. in einer Arbeit von Freedmann et al. zu finden.¹³² Wichtige Bindestellen hierfür scheinen insbesondere die G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen zu sein, deren Beziehung zum Endothelinsystem weiter unten besprochen wird.

Insgesamt sollte sich aus der vermehrten Rezeptorexpression ein moderater Phänotyp entfalten können. Amiri et al. (2004) demonstrierten an einem transgenen Mausmodell, welches ET-1 Gefäßendothel-spezifisch überexprimierte, dass es Blutdruck unabhängig zu einer Hypertrophie der Tunica media von Gefäßen kommt. Saxena konnte dies auch an Aorten von L6351 nachweisen (Saxena A, 2007).

7.2.2. Expression des Transgens in Abhängigkeit von der Anzahl genomisch integrierten Transgenkopien

In mehreren Arbeiten wurde bereits auf den Zusammenhang zwischen der Anzahl der integrierten Kopien und der Expressionsstärke und -dauer eingegangen. Es wurden hier sowohl positive, als auch negative Korrelationen beschrieben.^{133 134}

In dieser Arbeit wurde in L6878 eine Tg-Kopie, in L6351 acht Tg-Kopien und in 6888 vier Tg-Kopien nachgewiesen. Da nur für L6351 und L6878 Realtime-PCR ermittelte Expressionsdaten zur Verfügung standen, wird auf L6888 in der weiteren Diskussion nicht weiter eingegangen.

Mit zunehmender Anzahl transgener Kopien wurde ein stärkerer zeitlicher Rückgang der Expression des Transgens beobachtet. Ob dies auf eine erhöhte Histon-Deacetylierung bzw. DNA-Methylierung zurückzuführen ist, wurde nicht geklärt. Aufgrund der anzunehmenden unterschiedlichen genomischen Integrationsorte des Transgens in L6878 und L6351 könnte diese Differenz auch Ausdruck eines Positionseffektes sein, was wiederum die Histon-Deacetylierung bzw. DNA-Methylierung beeinflussen könnte.

In der Literatur wurde weiterhin auf die wichtige Rolle von Insulatoren in der Genregulation hingewiesen.¹³⁵ Es wäre demnach auch denkbar, dass das Einfügen „nackter“ Gene bzw. von cDNA-Konstrukten in das Genom eines Wirtsorganismus durch die fehlende stabilisierende DNA-Umgebung positionsunabhängig zu einer ineffizienten Transkription führen kann.

Möglicherweise könnte bereits das Vorhandensein von sich wiederholenden Transgenabschnitten auf dem Wirtschromosom zu einer vermehrten Methylierung führen. Dies könnte dann mit der in L6351 beobachteten, frühzeitigen Transgendownregulation einhergehen.

Interessanterweise zeigte sich bei Verdopplung der Kopienanzahl in einen Monat alten Tg-homozygoten Tieren der Linie 6878, eine proportionale Zunahme der Tg-Expression sowohl in Aorten als auch in Mesenterialarterien gegenüber Tg-heterozygoten Tieren derselben Linie. Im Gegensatz zu multiplen Kopien auf einem einzelnen Chromosom hatte die Verdopplung der Kopienanzahl auf homologen Chromosomen einen additiven transkriptionellen Effekt.

Aufgrund der hohen genetischen Homologie zwischen heterozygoten und homozygoten Tieren einer Linie kann es unter Umständen sinnvoll sein, Auswirkungen des Transgens innerhalb dieser Gruppen zu untersuchen, anstelle des in dieser Arbeit durchgeführten Vergleichs mit einer Tg-negativen Kontrollgruppe. Die hierbei beobachteten Unterschiede würden nahezu ausschließlich auf die transkriptionellen Auswirkungen des Transgens zurückzuführen sein. Besonderheiten aufgrund unterschiedlicher genomischer Integrationsorte würden hierbei in den Hintergrund treten. Allerdings könnten die zur Transgeninaktivierung führenden Ereignisse in homozygoten Tieren anders ablaufen als in heterozygoten Tieren.

Aus praktischer Sicht soll an dieser Stelle angemerkt werden, dass durch die in dieser Arbeit etablierte Methode der Zygotiebestimmung mittels quantitativer Realtime-PCR eine schnelle Überprüfbarkeit des Zygotiestatus und dadurch auch eine ausreichende Verfügbarkeit von Tg-homozygoten Tieren bei vertretbarem Zuchtaufwand möglich wäre.

Insbesondere bei fehlendem oder nur gering ausgeprägtem Phänotyp wäre es durch Kreuzung von Tieren der beiden transgenen Linien 6351 und 6878 möglich, kostengünstig ein transgenes Hybrid-Modell zu schaffen, welches eine gegenüber den einzelnen Linien noch höhere Transgenexpression aufweist, so dass das Auftreten eines deutlicheren Phänotyps wahrscheinlicher werden würde. Es ist aber auch vorstellbar, dass die dann deutlich erhöhte ET_AR-Expression zum fetalen Tod führen könnte.

7.2.3. Expression des endogenen ET_AR

In den Aorten der transgenen Linien 6351 und 6878 war nach einem Monat eine verminderte Expression des endogenen ET_AR nachweisbar, welche jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Aufgrund der verminderten endogenen Rezeptorexpression in einen Monat alten Tieren erhöhte sich die ET_AR Gesamttranskriptmenge in L6878 nur um ca. 50% und in L6351 um ca. 90%.

Nach einem Jahr hingegen war eine verminderte Expression des endogenen Rezeptors nur noch in L6878 statistisch signifikant nachweisbar. Da in dieser Linie zu diesem Zeitpunkt auch eine fortbestehende signifikante Expression des Transgens gezeigt werden konnte, könnte dies einen Anpassungsmechanismus des Organismus gegenüber einer erhöhten ET_AR-Transkriptmenge darstellen.

Im Gegensatz zur Aorta ließ sich in den Mesenterialarterien von einen Monat alten Tieren keine verminderte Expression des endogenen Rezeptors nachweisen. In L6878 war die Expression gegenüber der Kontrollgruppe sogar signifikant erhöht. Ursächlich hierfür könnten Funktionen in der noch nicht vollständig beendeten Entwicklung des gastrointestinalen Gefäßsystems sein. Su et al. konnten an Mesenterialarterien vom Schwein im ersten Lebensmonat einen 80% Rückgang auf Proteinebene und einen 60% Rückgang auf Transkriptebeine der ET_AR-Expression nachweisen, wobei der Abfall zwischen Tag 10 und Tag 30 im Vergleich mit den anderen untersuchten Zeiträumen deutlich schneller erfolgte. Dies deutet auf eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung des ET_AR in der postnatalen Entwicklung des mesenterialen Gefäßbettes hin. Während der Adoleszenz könnte ET_AR vor allem wichtige Differenzierungs- und Wachstumssignale vermitteln, wohingegen der auf geringerem Niveau exprimierte Rezeptor im adulten

Organismus insbesondere an der Aufrechterhaltung des basalen Vasomotonus beteiligt ist. Wichtig für die eigenen Untersuchungen ist weiterhin, dass Su et al. eine hohe Transkript-Protein-Korrelation für den ET_AR nachgewiesen haben.¹³⁶

Möglicherweise differiert auch die Funktionsverteilung Spezies-spezifisch zwischen ET_AR der Ratte und ET_AR des Menschen, so dass es im Rahmen der Differenzierung nach einem Monat nur zu einer geringen gegenregulatorischen Verminderung der endogenen ET_AR-Expression kam, in adulten Tieren bei anhaltender Transgenexpression zeigten sich hingegen stärker ausgeprägte Anpassungsvorgänge. Passend zu dieser Hypothese war zusätzlich die Beobachtung, dass zwar ein genereller Rückgang der endogenen ET_AR-Expression nach einem Jahr im Vergleich zu einem Monat sowohl bei Tg-positiven als auch bei Kontrolltieren zu verzeichnen war, dieser aber in der auch nach einem Jahr noch Tg-exprimierenden L6878 am stärksten ausgeprägt war.

Es ist demnach bei der Charakterisierung von Rezeptorfunktionen wichtig, den zeitlichen Kontext mit einzubeziehen. In vivo Untersuchungen über unterschiedliche zelluläre Rezeptor-Signaltransduktionswege in Abhängigkeit vom ontogenetischen Entwicklungsstatus des Organismus könnten hier wertvolle neue Informationen zu unserem Rezeptorverständnis beisteuern.

Von Bedeutung für die Interpretation der Expressionsdaten im Kontext des zeitlichen Verlaufs ist, dass die hier beobachteten Anpassungsvorgänge der endogenen ET_A-Rezeptorexpression nur in der SM22 normierten Auswertung sichtbar waren. In der auf 18S normierten Auswertung (Daten nicht gezeigt) wurde nur in den Aorten von einem Monat alten Tieren der Linie 6351 und in homozygoten Tieren von L6878 eine statistisch signifikante Verminderung der endogenen ET_AR-Expression beobachtet. In ein Jahr alten Tieren ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der ET_AR-Expression nachweisen.

Betrachtet man jedoch nach einem Jahr die auf 18S normierte SM22 RNA-Expression in Mesenterialarterien, zeigte sich in L6878 eine gegenüber L6351 und der Kontrollgruppe erhöhte SM22 Expression. In der auf SM22 normierten endogenen ET_AR-Expression führte dies zu verminderten Expressionswerten in dieser Gruppe. Aufgrund der gegenüber der Kontrollgruppe verminderten 18S normierten Expression des endogenen ET_AR in L6351 und homozygoten Tieren in L6878, scheint dieser Effekt aber dennoch von der

Expressionsstärke des Transgens abhängig zu sein, da in diesen Gruppen zu diesen Zeitpunkten auch eine starke Tg-Expression nachweisbar war.

Welchen Einfluss die Transgenexpression auf die Expression des SM22 Gens besitzt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Eignung als gefäßmuskelspezifisches Housekeeping-Gen sollte z.B. in isolierten Gefäßmuskelzellen weiter untersucht werden. Aufgrund der gefäßmuskelspezifischen Expression des Transgens ist die Normalisierung der Tg-Expression auf SM22 gegenüber der 18S-Normalisierung jedoch als sinnvoller anzusehen, da „Verdünnungseffekte“ durch nichtglattmuskuläre Zellen umgangen werden. Weiterhin ist wichtig, dass die SM22 Normalisierung eine Normalisierung ausschließlich auf mRNA-Ebene beinhaltet. Bei der Normalisierung auf 18S würde sich hingegen die mRNA des Zielgens auf die Gesamtmenge (Total-RNA) der eingesetzten RNA beziehen. Hierbei könnten insbesondere durch unterschiedliche Verhältnisse der Menge von mRNA zur Gesamt-RNA Verzerrungen auftreten.

7.2.4. Expression des endogenen ET_BR

Während der auf Gefäßendothelzellen lokalisierte ET_BR vasodilatatorisch wirkt, ist die Wirkung von auf glatten Muskelzellen lokalisierten ET_BR vasokonstriktorisch. Weiterhin sind in Lunge und Niere lokalisierte ET_BR an der systemischen Endothelin-clearance maßgeblich beteiligt. Es ist also zu vermuten, dass eine dauerhaft erhöhte ET_AR-Aktivität auch zu Anpassungsvorgängen auf transkriptioneller Ebene des Endothelin-B Rezeptors führt. Eine solche funktionelle Verknüpfung zwischen ET_BR- und ET_AR-System wurde kürzlich am ET_BR-Knockout Modell in der Maus gezeigt.¹³⁷ Hier führte die fehlende Expression des ET_B-Rezeptors zu einer verminderten ET_AR-Funktion.

In den in dieser Arbeit untersuchten Proben war jedoch eine signifikante Änderung der ET_BR-Expression zwischen Tg-Positiven und Tg-negativen Tieren nicht nachzuweisen. Eine Ausnahme bildeten hierbei die Aorten von einjährigen Tieren in L6878.

Es ist demnach anzunehmen, dass die ET_AR-Überexpression durch das Transgen in unserem Rattenmodell nur einen geringen Einfluss auf die ET_BR mRNA-Expression ausübte.

Des Weiteren ist darauf hinzuweisen, dass entlang der Verzweigungen des Mesenterialgefäßsystems eine unterschiedliche ET_BR-Rezeptordichte nachgewiesen wurde.¹³⁸ Während in den proximalen Abschnitten immunhistochemisch kaum ET_BR nachgewiesen wurde, nimmt die Expression mit der Abnahme des Gefäßdurchmessers zu, bei maximaler Expression in den Arteriolen. Präparationsbedingt waren insbesondere kleine Arterien entlang der distalen Arterienaufzweigungen in den in dieser Arbeit untersuchten Proben unterrepräsentiert. Zusätzlich kann das Verhältnis von proximalen zu distalen Abschnitten zwischen den einzelnen Proben variieren, was auch die hohe Variabilität der ET_BR-Expression erklären könnte.

7.2.5. Expression der alpha1-adrenergen Rezeptoren

Aufgrund der bereits beschriebenen funktionellen Verknüpfung von alpha1-adrenergem und Endothelinsystem wurde die Hypothese untersucht, ob die Überexpression des ET_AR zu Anpassungsvorgängen auf Transkriptionsebene der alpha1-adrenergen Rezeptoren A, B und D führt.

Während für alpha1A und alpha1D-Rezeptoren in Aorten und Mesenterialarterien von einen Monat alten transgenen Tieren von L6878 und L6351 keine statistisch signifikante Tg-abhängige mRNA-Expressionsänderung nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in den Mesenterialarterien dieser Tiere eine gegenüber der Kontrollgruppe jeweils signifikant erhöhte mRNA Expression des alpha1B-Rezeptors.

In vitro wurde bereits an isolierten Rattenfibroblasten die funktionelle Inaktivierung von alpha1B Rezeptoren durch ET_AR-Stimulation beschrieben (z.B. Vazquez-Prado et al. 1997). D'Angelo et al. konnten diesen Effekt bei Dahl-Salz-resistenten Ratten auch in vivo zeigen. Diese Tiere zeigten nach Ausschüttung von endogenen Katecholaminen in Stressreaktionen unter Gabe des selektiven ET_AR-Blockers ABT-627 einen deutlich erhöhten akuten Blutdruckanstieg. Weiterhin war in anästhesierten Ratten unter ET_AR- und Ganglionblockade der Phenylephrin getriggerte Blutdruckanstieg deutlich höher als in unbehandelten Kontrolltieren.

Die erhöhte alpha1BR-Expression in Mesenterialarterien von einen Monat alten transgenen Tieren der Linien 6351 und 6878 kann daher als ein gegenregulatorischer

Mechanismus auf eine verminderte adrenerge Funktion aufgrund der ET_AR-Überexpression verstanden werden

Dass Überexpression des ET_AR in den Aorten die alpha1BR-Expression nicht signifikant beeinflusste, kann durch eine fehlende Interaktion zwischen diesen Rezeptoren in einem anatomisch und funktionell andersartigen Gefäß erklärt werden.

Auffallend war weiterhin die starke interindividuelle Variabilität der Rezeptorexpression innerhalb der Gruppen, welche u.a. auf der unterschiedlichen alpha1BR-Dichte entlang der Aufteilung der Mesenterialarterien zurückzuführen sein und daher einen präparationsbedingten Artefakt darstellen könnte.

Eine weitere Erklärung wäre auch das Vorkommen von alpha1B-Rezeptoren auf gefäßmuskelzellfremden Zellen, die vermutlich in unterschiedlichem Ausmaß in den Mesenterialarterienpräparationen zu finden waren. Faber et al. (2001) beschrieben z.B. ein Vorkommen von alpha-adrenergen Rezeptoren in Fibroblasten, welche aus der Adventita von Rattenaorten isoliert wurden¹³⁹. Moriyama et al. (2000)¹⁴⁰ hingegen beschrieben aufgrund von durchgeführten In situ Hybridisierungen die Lokalisation der alpha1-adrenergen Rezeptoren ausschließlich in der Tunica media von Nierengefäßen. Inwieweit diese Ergebnisse auf die Meseterialarterien der hier untersuchten Ratten zu übertragen sind, ließe sich nur durch weiterführende immunhistochemische Untersuchungen klären.

7.2.6. Expression von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen 2 und 3

Die G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK), insbesondere GRK2, spielen eine zentrale Rolle in der funktionellen Inaktivierung sowohl von ET-Rezeptoren als auch von alpha1B-adrenergen Rezeptoren.¹⁴¹ Diese wird durch eine Rezeptorphosphorylierung eingeleitet. Im hier beschriebenen ET_AR-Überexpressionsmodell könnte sowohl eine heterologe (über alpha-adrenerge Rezeptoren) als auch eine autologe (über ET_AR-Aktivierung) ET_A-Rezeptorinaktivierung bedeutsam sein. Aufgrund der Überexpression von ET_AR in den transgenen Linien 6878 und 6351 wurde auch die mRNA-Expression der GRK2 und GRK3 untersucht. Hier zeigte sich, ähnlich wie bei den alpha1B-adrenergen Rezeptoren, eine deutlich verstärkte Expression in den Mesenterialarterien der transgenen Tiere gegenüber den Kontrolltieren. Auch hier war eine große interindividuelle Variabilität

der Expression zu verzeichnen. Die durchgeführte Korrelationsanalyse zeigte eine sehr hohe positive Korrelation (Pearson 0,965) zwischen alpha1BR und GRK2 in den Mesenterialarterien von einem Monat alten Tieren. Diese Korrelation zwischen alpha1BR und GRK2 mRNA Expression zeigte sich auch noch in den Aorten und Mesenterialarterien von einjährigen Tieren, wenngleich die Korrelationskoeffizienten hier geringer ausfielen. Eine enge Verknüpfung von GRK2 und alpha1BR konnte somit auf mRNA-Ebene in vivo nachgewiesen werden. Welche funktionelle Relevanz dieser Verbindung zugeschrieben werden kann, sollte anhand von Bindungs- und Phosphorylierungsstudien weiter untersucht werden. Insbesondere gilt zu klären, welche Auswirkungen die GRK2-Überexpression auf die Rezeptoren des ET-Systems besitzt. Möglich wäre z.B. eine durch Phosphorylierung hervorgerufene funktionelle Inaktivierung der transkriptionellen Überexpression. Andererseits könnte sich dieser Prozess auch nur auf das alpha1B-adrenerge System auswirken und hier über eine vermehrte alpha1B-Rezeptorphosphorylierung einen Rezeptorfunktionsverlust bewirken.

Weiterhin wäre die Abfolge der hier auftretenden Veränderungen zu klären. Am Anfang der Kaskade stand im hier untersuchten Modell eine Überexpression von ET_A-Rezeptoren. Theoretisch wäre als gegenregulatorischer nächster Schritt sowohl die Überexpression von GRK2 als auch die direkte transkriptionelle Steigerung der alpha1BR-Expression möglich. Erstgenannte Alternative könnte nun zu einer funktionellen Inaktivierung der alpha1B Rezeptoren führen, welche ihrerseits eine alpha1BR-Expressionssteigerung nach sich ziehen könnte. In zuletzt genannter Alternative könnte die GRK2 Überexpression die Antwort des Organismus auf eine (durch ET_AR-Überexpression) gesteigerte alpha1BR-Expression darstellen.

7.3. Methodische Diskussion

7.3.1. Zygotiestatusbestimmung mittels SYBR-Green basierter Real-Time PCR

Die Bestimmung des Zygotiestatus mittels SYBR-Green basierter Realtime-PCR ermöglichte es, zuverlässig transgen-heterozygote und homozygote Tiere zu unterscheiden. Prinzipiell wäre für eine solche Diskriminierung allein die quantitative

Transgenbestimmung ausreichend. Der Zygotiestatus könnte dann durch Kalibrierung an Tieren mit bekanntem transgenen Zygotiestatus ermittelt werden. Es zeigte sich jedoch, dass durch die Kombination mit HPRT eine höhere Genauigkeit erreicht werden konnte. Insbesondere Abweichungen in der DNA-Konzentrationsbestimmung, Verdünnungsfehler und unterschiedliche DNA-Qualitäten konnten hiermit ausgeglichen werden. Weiterhin kann als interne Qualitätskontrolle der quantitativen PCR eine Geschlechtsbestimmung anhand der HPRT-Werte durchgeführt und mit dem phänotypischen Geschlecht kontrolliert werden. Absolut notwendige Voraussetzung für die Bildung von Δ CT-Werten zwischen unterschiedlichen Genen ist eine gleiche Amplifikationseffizienz der Assays. Dies konnte für DNA-Konzentrationen zwischen 0,5-16 ng/ μ l nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen führten zu verzögerten Anstiegen im Fluoreszenzsignal, im Sinne einer Inhibition der PCR-Reaktion. Ursächlich könnten Phenol- und Salzverunreinigungen in der genomischen DNA-Aufreinigung sein. Bei geringeren Konzentrationen zeigten sich starke Schwankungen zwischen den technischen Replikaten.

Tesson et al. entwarfen einen Primer/Sonden Assay zur Zygotiebestimmung in transgenen Ratten des Human decay accelerating factor (hDAF).¹⁴² In einem 1-Gefäß-Ansatz wurde gleichzeitig hDAF und HPRT bestimmt. Es zeigte sich in dieser Arbeit ein erhöhter DNA-Konzentrationstoleranzbereich von 6,25-100ng/ μ l. Vorteile dieser Methode sind insbesondere die Vermeidung von Fehlern, welche direkt bei Beladung der eingesetzten Mikrotiterplatten auftreten können und die höhere Spezifität der Primer-Sonden basierten Realtime-PCR gegenüber der SYBR-Green basierten Realtime-PCR. Nachteilig sind der höhere Etablierungsaufwand der Multiplex-PCR, sowie die mit dem Sondereinsatz verbundenen Mehrkosten des Assays.

Als mögliche Fehlerquelle der Tg-Quantifizierung stellte sich die Verwendung von nicht HPLC-gereinigten humET_AR Primern heraus. Hiermit zeigte sich in allen Proben ein um eins erhöhter Δ CT zwischen humET_AR und HPRT im Sinne einer scheinbar erhöhten Transgenkopienzahl. Durch das Vorhandensein von unvollständigen Primerfragmenten in den nicht HPLC-gereinigten Primer könnte es zur Koamplifikation des stark homologen endogenen ET_AR gekommen sein. Es wurden daher in dieser Arbeit ausschließlich HPLC-aufgereinigte Primer verwendet.

7.3.2. Bewertung der Realtime-PCR ermittelten Expressionsdaten

Die Realtime-PCR ist eine hochempfindliche Methode, mit der es möglich ist, aus einer geringen RNA-Menge eine große Anzahl an quantitativen Expressionsdaten zu ermitteln. Sie hat sich neben den wenig sensitiven Northern Blot und RNase-Protektions Assays als wichtige quantitative Methode etabliert, welche einen immer größeren Stellenwert einnimmt.

Trotz vieler Vorteile beinhaltet diese Methode jedoch auch Limitationen, welche bei der Datenanalyse zu beachten sind. Bustin et al. fassten in einem sehr interessanten Review die Wichtigsten davon bei der Anwendung der Realtime-PCR zusammen.¹⁴³

Insbesondere Unterschiede in der RNA-Qualität wirken sich auf verschiedene Gene unterschiedlich stark aus. Es kann durch RNA-Degradation sowohl zu einer vermehrten, als auch zu einer verminderten Umschreibung während der cDNA-Synthese kommen. Diese Auswirkung können durch den Vergleich von Expressionswerten degradierter mit nicht-degradierten Proben aufgedeckt werden: Hat die RNA-Degradation nur einen geringen Einfluss auf die gemessene Expression, würden hier nur geringfügig von eins verschiedene Quotienten (Expression: RNA-nicht degradiert/RNA-degradiert) nachweisbar sein, während bei großer Beeinflussung Quotienten über oder unter eins auftreten würden. Insbesondere die Tatsache, dass unterschiedliche RNA-Moleküle unterschiedlich schnell degradieren (Shelby et al. 1975) führt zu einer noch höheren Komplexität. Durch Analyse der RNA-Qualität mittels Agilent-Bioanalyser wurde versucht, diesen Fehler möglichst gering zu halten.

Ein weiterer wichtiger und zu berücksichtigender Punkt ist die Auswahl der in der Reversen Transkription eingesetzten Primer. Insbesondere durch Verwendung von, wie in dieser Arbeit bei der cDNA-Synthese eingesetzten, „random“ Hexameren, besteht durch Generierung multipler cDNA-Moleküle aus singulären RNA-Matrizen die Gefahr, die reale Expression zu überschätzen. Zhang et al. konnten zeigen, dass die ermittelte RNA-Kopienzahl bei Anwendung von „random“ Hexamer Primern im Vergleich mit spezifisch geprimter RNA 19fach höher sein kann.¹⁴⁴ Es ist anzunehmen, dass diese Verzerrung der Expression beim Vergleich gleicher Gene in verschiedenen Gruppen keinen großen

Einfluss nehmen wird. Wird hingegen die Expression von unterschiedlichen Genen miteinander verglichen, wie es in dieser Arbeit für den humET_AR und den ratET_AR erfolgte, muss diese Fehlerquelle, neben den unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen, beachtet werden. Aufgrund der engen strukturellen Homologie zwischen dem hier verwendeten transgenen und dem endogenen ET_AR kann davon ausgegangen werden, dass der Fehler in dieser Arbeit nur gering ausgeprägt war.

Vorteil der mit „random“ Hexameren geprimten cDNA-Synthese ist die Vermeidung einer verminderten cDNA-Synthese durch die RNA-Sekundärstruktur, wie dies bei Anwendung von spezifischen oder oligo-dT Primern auftreten kann.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellen aus DNA-Fragmenten generierte Standardreihen dar, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Diese wurden durch Amplifikation und Aufreinigung einer cDNA-Probe mittels Primern, welche up- und downstream von den in der Realtime PCR zu generierenden Amplikons ansetzen, hergestellt. Inwieweit sich die hieraus abgeleiteten Amplifikationseffizienzen auch auf die cDNA-Templates der untersuchten Proben übertragen lassen bleibt unklar. Es ist zu bedenken, dass die realen Amplifikationseffizienzen der cDNA-Templates durch Verunreinigungen aus der subsequenten reversen Transkription geringer gewesen sein könnten als die mittels Standardreihen ermittelten AE. Die Folge hiervon wäre eine Überschätzung der realen Transkriptunterschiede.

Insbesondere auch bei RNA-Ausgangsmengenstandardisierung auf ein Housekeeping-Gen (HkG) würden, bei nicht gleichen AE zwischen diesem und dem zu untersuchendem Gen und zusätzlich ausgeprägten Unterschieden der CT-Werte des HkG zwischen den einzelnen Proben (z.B. aufgrund unterschiedlicher RNA-Mengen/ Transkriptionseffizienzen in der RT-PCR), zusätzliche Expressionsverzerrungen auftreten. Minimierbar wären diese durch nahezu gleiche CT-Werte für die HkG, d.h. durch Einsatz gleicher RNA-Ausgangsmengen.

In dieser Arbeit wurde sowohl durch Einsatz gleicher RNA-Mengen, als auch durch die Anwendung der Δ CT-Methode versucht, diesen Fehler gering zu halten.

8. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die genomische Integration, die Transgen-Expression und die adaptiven transkriptionellen Reaktionen auf RNA-Ebene in einem transgenen Rattenmodell des humanen Endothelinrezeptors Typ A (ET_AR) untersucht. Mit diesem Modell sollte die in vivo Funktion des glattmuskellzellspezifisch exprimierten ET_AR untersucht werden.

Hierfür standen fünf durch pronukleäre Mikroinjektion generierte transgene Rattenlinien zur Verfügung (L6341, L6351, L6888, L6353, L6888). Diese exprimierten den humanen ET_AR unter Kontrolle des murinen SM22 α Promotors gefäßmuskelspezifisch in unterschiedlichem Ausmaß.

Die Identifizierung von Tg-Merkmalsträgern erfolgte durch eine konventionelle genomische PCR. Zusätzlich wurde ein auf der Realtime-PCR basierender Assay zur Quantifizierung der genomisch integrierten Kopien etabliert. Es ließen sich hiermit in Transgen (Tg)-heterozygoten Tieren von L6878 eine Kopie, in L6351 acht Kopien und in L6888 vier Kopien nachweisen. Gleichzeitig war mit diesem Assay die Identifizierung von homozygoten Merkmalsträgern möglich.

Auf RNA-Ebene erfolgte die Charakterisierung der Rezeptorexpression in ausgesuchten Gefäßen und Organen durch RT-PCR Untersuchungen. Hierbei zeigten sich bereits ausgeprägte Expressionsunterschiede. Während in L6341 praktisch keine Rezeptorexpression nachweisbar war, ließ sich eine eindeutige Expression in L6351 und L6878 nachweisen. Die anderen beiden Linien lagen in ihrer Tg-Expression dazwischen. Zusätzlich zeigte sich in L6878 auch eine mRNA-Expression in verschiedenen Organen.

In L6878 und L6351 erfolgte mittels Realtime-PCR die Quantifizierung der mRNA-Expression des Tg-Rezeptors sowie der endogenen ET_AR und ET_BR in Mesenterialarterien und Aorten in einen Monat und einen Jahr alten Tieren. Auch hier zeigte sich ein differenziertes Rezeptorexpressionsniveau. Während in den Aorten von L6351 mehr Tg-Rezeptor als in L6878 exprimiert wurde, war in L6878 in den Mesenterialarterien eine deutlich höhere Rezeptorexpression als in L6351 nachweisbar. Insgesamt lag hierbei die mRNA-Expressionsstärke des Tg-Rezeptors in einen Monat alten Tieren auf dem Niveau des endogenen ET_AR.

In beiden Linien kam es nach einem Jahr zu einer Abnahme der Tg-Expression. Während diese in L6878 jedoch prozentual gering war, ließ sich in L6351 kaum noch Expression nachweisen.

In homozygoten Tieren von L6878 war die mRNA-Expression des Transgens im Vergleich zu heterozygoten Tieren derselben Linie verdoppelt.

Weiterhin zeigte sich in den Aorten von L6878 in ein Jahr alten Tieren eine signifikant verminderte Expression des endogenen ET_AR.

Signifikante mRNA-Expressionsänderungen ließen sich für den ET_BR in beiden untersuchten Tg-Linien nicht nachweisen.

Neben den Anpassungsvorgängen im ET-System zeigte sich im Vergleich mit einer Tg-negativen Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Expression des alpha1B-adrenergen Rezeptors in Mesenterialarterien von einen Monat alten Tieren sowohl in L6351 als auch in L6878. Gleichzeitig war die mRNA-Expression der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2) signifikant erhöht. Zusätzlich zeigte sich hierbei eine enge Korrelation der mRNA-Expression von alpha1BR und GRK2 in Tg-negativen und Tg-positiven Tieren.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für die weitere phänotypische Charakterisierung der transgenen Rattenmodelle und sind damit Ausgangspunkt für die Gewinnung eines tiefer gehenden Verständnisses der ET_AR-Funktion in der Gefäßwand. Die hier aufgezeigten Anpassungsvorgänge machen gleichzeitig die Limitationen der konstitutiven transgenen Rezeptorexpression deutlich.

9. Lebenslauf

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

10. Veröffentlichungen

Publizierte Abstracts:

Saxena A, Zollmann FS, Kliesch S, Gschwend S, Schmidt NS, Paul M, Orzechowski HD (2005) Blutdruck und Vasoreagibilität in einem transgenen Modell des humanen Endothelinrezeptors Typ A. Dtsch Med Wochenschr 130 (Suppl. 4): S154

Präsentiert auf dem 29. Wissenschaftlichen Kongress der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks, Berlin, 23.-25.11.2005

Kliesch S, Zollmann FS, Saxena A, Oksche A, Bader M, Paul M, Orzechowski HD (2005) Genotyp- und Genexpressionsanalyse transgener Rattenmodelle mit glattmuskelspezifischer Expression des humanen Endothelinrezeptors Typ A. Dtsch Med Wochenschr 130 (Suppl. 4): S155

Saxena A, Zollmann FS, Kliesch S, Schmidt NS, Gschwend S, Oksche A, Bader M, Paul M, Orzechowski HD (2005) Transgenic rat models of the human ETA receptor develop arterial hypertension and show blunted response to adrenergic receptor stimulation. J Vascular Res 42 (Suppl. 2): II/88

Zollmann FS, Saxena A, Gschwend S, Kliesch S, Schmidt NS, Oksche A, Bader M, Paul M, Orzechowski HD (2005) In vivo-crosstalk between human endothelin type A receptor and alpha-adrenergic receptors in the vascular wall revealed by functional analysis of transgenic rat models. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 371 (Suppl.1): R27.

Zollmann FS, Gschwend S, Schmidt NS, Kliesch S, Bader M, Paul M, Orzechowski HD (2004) Significantly decreased responsiveness to alpha-adrenergic stimuli in hETA-R transgenic rats. Z Kardiol 93 (Suppl.3): III/5.

Poster:

Genotyp- und Genexpressionsanalyse transgener Rattenmodelle mit glattmuskelspezifischer Expression des humanen Endothelinrezeptors Typ A“ auf 29. Wissenschaftlichen Kongress HYPERTONIE 2005

11. Literaturverzeichnis

- ¹ Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
- ² Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*. 1994;368:703–710
- ³ Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11496–11500
- ⁴ Uchida Y, Ninomiya H, Saotome M, et al. Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol*. 1998;154:227–228.
- ⁵ Walden PD, Ittmann M, Monaco ME, et al. Endothelin-1 production and agonist activities in cultured prostate-derived cells: implication for regulation of endothelin bioactivity and bioavailability in prostatic hyperplasia. *Prostate*. 1998;34:241–250.
- ⁶ Wallace JL, Cirino G, De Nucci G, et al. Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *Am J Physiol*. 1989;256:G661–G666
- ⁷ Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology*. 1996;24:233–240
- ⁸ Ferri C, Pittoni V, Piccoli A, et al. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:829–835.
- ⁹ Rossi GP, Albertin G, Neri G, et al. Endothelin-1 stimulates steroid secretion of human adrenocortical cells ex vivo via both ETA and ETB receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3445–3449
- ¹⁰ Jougasaki M, Schirger JA, Simari RD, et al. Autocrine role for the endothelin-b receptor in the secretion of adrenomedullin. *Hypertension*. 1998;32:917–922
- ¹¹ Hosoda K, Nakao K, Arai H, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 1991; 287: 23]6.
- ¹² Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai M, Takuwa Y, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 656]63.
- ¹³ Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T. Goto K, Masaki T. The human Endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2863]7.
- ¹⁴ Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T. Goto K, Masaki T. The human Endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2863]7.
- ¹⁵ Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family: molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem*. 1989;264:14613–14616

-
- ¹⁶ Sakurai T, Yanagisawa M, Inoue A, Ryan US, Kimura S, Mitsui I, Goto K, Masaki T. cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat pre- proendothelin-1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 44]7.
- ¹⁷ Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J Biol Chem* 1989; 264: 18156]61.
- ¹⁸ Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Matsumoto H, Suzuki N, Kimura C, Ondo H, Fujino M. Specific expression of human endothelin-2 ET-2 gene in a renal adenocarcinoma cell line. *FEBS Lett* 1990; 274: 136]40.
- ¹⁹ Shiba R, Sakurai T, Yamada G, Morimoto H, Saito A, Masaki T, Goto K. Cloning and expression of rat preproendothelin- cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 588]94.
- ²⁰ Lee M-E, Bloch KD, Clifford JA, Quertermous T. Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter: evidence for an endothelial cell-specific cisacting sequence. *J Biol Chem* 1990; 265: 10446-50.
- ²¹ Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, Hamaguchi H. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet.* 1991 May; 48(5): 990-6.
- ²² Ikegawa R, Matsumura Y, Tsukahara Y, Takaoka M, Morimoto S. Phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor, suppresses the secretion of endothelin-1 from cultured endothelial cells by inhibiting big endothelin-1 converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171: 669]75.
- ²³ Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K. Endothelin-converting enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2653]9.
- ²⁴ Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaus S, DeWit D, Yanagisawa M. ECE-1: a membranebound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78: 473]85.
- ²⁵ Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke* 1991; 22: 378-83.
- ²⁶ Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W, Binder BR. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 16066-8.
- ²⁷ Warner TD, Battistini B, Doherty AM, Corder R. Endothelin receptor antagonists: actions and rationale for their development. *Biochem Pharmacol.* 1994; 48 (4) : 625-35.
- ²⁸ Battistini B, D'Orleans-Juste P, Sirois P. Biology of disease. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 1993; 68: 600-28.
- ²⁹ Howard PG, Plumpton C, Davenport AP. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *Hypertension* 1992; 10: 1379-86.
- ³⁰ Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaus S, et al. 1994. ECE-1: a membranebound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78: 473-85
- ³¹ Emoto N, Yanagisawa M. 1995. Endothelin converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* 270: 15262-68
- ³² Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound phosphoramidon sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995; 270: 15262-8.

-
- ³³ Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, et al. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.* 1998;428:394–398.
- ³⁴ Xu D, Emoto N, Giaid A, et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* 1994;78:473–485
- ³⁵ Schweizer A, Valdernaire O, Nelbock P, et al. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *J Biol Chem.* 1997;328:29794–29798.
- ³⁶ Maguire JJ, Johnson CM, Mockridge JW, et al. Endothelin converting enzyme (ECE) activity in human vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1997;122:1647–1654
- ³⁷ Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, et al. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1997;95:221–230
- ³⁸ Rossi GP, Colonna S, Pavan E, et al. Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries *ex vivo*. *Circulation.* 1999;99:1147–1155
- ³⁹ Kobayashi T, Miyauuchi T, Sakai S, et al. Endothelin converting enzyme (ECE) and angiotensin-converting enzyme in failing hearts of rats with myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:S417–S420
- ⁴⁰ Fukuchi M, Giaid A. Expression of endothelin-1 and endothelin-converting-enzyme-1 mRNAs and proteins in failing human hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:S421–S423
- ⁴¹ Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, et al. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1997;95:221–230.
- ⁴² Fukuchi M, Giaid A. Expression of endothelin-1 and endothelin-converting-enzyme-1 mRNAs and proteins in failing human hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:S421–S423
- ⁴³ Nakano A, Kishi F, Ninami K, et al. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol.* 1997;159:1987–1992
- ⁴⁴ Hoang MV, Turner AJ. Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. *Biochem J.* 1998;327:23–26
- ⁴⁵ Johnson GD, Stevenson T, Ahn K. Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1: a comparison with neprilysin. *J Biol Chem.* 1999;274:4053–4058
- ⁴⁶ Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET-C receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993; 268: 19126-33.
- ⁴⁷ Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai M, Takuwa Y, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 656-63.
- ⁴⁸ Hosoda K, Nakao K, Arai H, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 1991; 287: 23-6.
- ⁴⁹ Summner MI, Cannon TR, Mundin JW, White DG, Watts IS. Endothelin ET-A and ET-B receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 858-60.
- ⁵⁰ Moreland S, McMullen DM, Delaney CR, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET -Blike receptors. *Biochem Biophys ResCommun* 1992; 184: 100-06.

-
- ⁵¹ Warner TD, Allcock GH, Corder R, Vane JR. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 777-82.
- ⁵² Bacon CR, Cary NR, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res*. 1996;79:794–801.
- ⁵³ Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, et al. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca(2+) channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:3915–3918
- ⁵⁴ Yang Z, Bauer E, von Seegesser L, et al. Different mobilization of calcium in endothelin-1-induced contractions in human arteries and veins: effects of calcium antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;16:654–660.
- ⁵⁵ Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J*. 1995;9:1196–1204
- ⁵⁶ Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, et al. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol*. 1985;248:C550–C556
- ⁵⁷ Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411–415
- ⁵⁸ Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Watanabe TX, Kumagai S, Nakajima K, Sakakibara S. Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor Endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 868-75.
- ⁵⁹ Van Renterghem C, Vigne P, Barhanin J, Schmid-Alliana A, Frelin C, Lazdunski M. Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 977-85.
- ⁶⁰ Danthuluri NR, Brown K, Brock TA. Inositoltriphosphate IP/diacylglycerol (DG) second messenger generation in endothelin-stimulated A-10 vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 1989; 3: A719.
- ⁶¹ Highsmith R, Pang DC, Rapoport RM. Endothelial cell-derived vasoconstrictors: mechanisms of action in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989; 13 Suppl. 5 : S36-44.
- ⁶² Marsden PA, Danthuluri NR, Brenner BN, Ballermann BJ, Brock TA. Endothelin action on vascular smooth muscle involves inositol triphosphate and calcium mobilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 86-93.
- ⁶³ Highsmith RF, Schmidt DJ, Pang DC, Stauderman KA, Rapoport RM. Mechanisms of action of endothelial cell-derived constricting factors. In: Rubanyi GM, Vanhoutte PM. eds. *Endothelium Derived Contracting Factors*. Basel: Karger, 1990; pp. 50-9.
- ⁶⁴ Pang DC, Johns A, Patterson K, Botelho LHP, Rubanyi GM. Cellular mechanisms of action of endothelin in isolated canine coronary arteries. In: Rubanyi GM, Vanhoutte PM. eds. *Endothelium Derived Contracting Factors*. Basel: Karger, 1990; pp.66-72.
- ⁶⁵ Liu CY, Sturek M. Attenuation of endothelin-1-induced calcium response by tyrosine kinase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996; 270: C1825-33.
- ⁶⁶ Alberts GF, Peifley KA, Johns A, et al. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem*. 1994;269:10112–10118.

-
- ⁶⁷ Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, et al. The selective endothelin ET-A receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur J Pharmacol*. 1992;225:347–350.
- ⁶⁸ Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1989; 78: 225-8.
- ⁶⁹ Golfman LS, Hata T, Beamish RE, Dhalla NS. Role of endothelin in heart function in health and disease. *Can J Cardiol* 1993; 9: 635-53.
- ⁷⁰ Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchel A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1990; 258: C408-15.
- ⁷¹ Simonson MS, Wann S, Mene P. Endothelin stimulates phospholipase C, Na/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 708-12.
- ⁷² Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 235-55
- ⁷³ Mehta JL, Lawson DL, Yang BC, Mehta P, Nichols WW. Modulation of vascular tone by endothelin-1: role of preload, endothelial integrity and concentration of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 1992: 127-32.
- ⁷⁴ Inagami T, Naruse M, Hoover R. Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 171-89.
- ⁷⁵ Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, et al. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199:1461–1465.
- ⁷⁶ Shichiri M, Kato M, Marumo F, et al. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension*. 1997;30:1198–1203.
- ⁷⁷ Naomi S, Iwaoka T, Disashi T, et al. Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation*. 1998;97:234–236.
- ⁷⁸ Tabuchi Y, Nakamaru M, Rakugi H, Nagano M, Mikami H, Ogihara T. Endothelin inhibits presynaptic adrenergic neurotransmission in rat mesenteric artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:803-8.
- Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17734-43.
- ⁷⁹ Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Demura H, Uemura H. Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry* 1990;94:475-7.
- ⁸⁰ Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. 2000 Nov 7;102(19):2434-40.
- ⁸¹ Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. *J Biol Chem* 1989;264:14954-9.
- ⁸² de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9797-800.
- ⁸³ Cozza EN, Chiou S, Gomez-Sanchez CE. Endothelin-1 potentiation of angiotensin II stimulation of aldosterone production. *Am J Physiol* 1992;262: R85-R89.

-
- ⁸⁴ Schiebinger RJ, Gomez-Sanchez CE. Endothelin: a potent stimulus of atrial natriuretic peptide secretion by superfused rat atria and its dependency on calcium. *Endocrinology* 1990;127:119-25.
- ⁸⁵ Simonson MS. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev* 1993; 73:375-411.
- ⁸⁶ Wang J, Chiou WJ, Gagne GD et al. Internalization of type-A endothelin receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000 Nov;36(5 Suppl 1):S61-5.
- ⁸⁷ Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17734-43.
- ⁸⁸ Hawrylyshyn KA, Michelotti GA, Coge F, Guenin SP, Schwinn DA. Update on human alpha1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Sep;25(9):449-55.
- ⁸⁹ Vazquez-Prado J, Medina LC, Garcia-Sainz JA. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem*. 1997 Oct 24; 272(43):27330-7.
- ⁹⁰ Evans RR, Phillips BG, Singh G, et al. Racial and gender differences in endothelin-1. *Am J Cardiol*. 1996;78:486-488.
- ⁹¹ Ergul S, Parish DC, Puett D, et al. Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension*. 1996;28:652-655.
- ⁹² Wei C-M, Lerman A, Rodeheffer RJ, et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89:1580-6.
- ⁹³ Pacher R, Bergler-Klein J, Globits S, et al. Plasma big endothelin-1 concentrations in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1993;71:1293-9.
- ⁹⁴ Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarstrand T, Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 1994;89:1573-9.
- ⁹⁵ Lerman A, Hildebrand FL Jr, Aarhus LL, Burnett JC Jr. Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations. *Circulation* 1991;83: 1808-14.
- ⁹⁶ Rosolowsky LJ, Campbell WB. Endothelin enhances adrenocorticotropin-stimulated aldosterone release from cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* 1990;126:1860-6.
- ⁹⁷ Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Endothelin in myocardial infarction. *Nature* 1990;344:114.
- ⁹⁸ Grover GJ, Dzwonczyk S, Parham CS. The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduced infarct size in a canine model of coronary occlusion and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1993;27:1613-8.
- ⁹⁹ Mattoli S, Soloperto M, Marini M, Fasoli A. Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:376-84.
- ¹⁰⁰ Schumacher WA, Steinbacher TE, Allen GT, Ogletree ML. Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *Prostaglandins* 1990;40:71-9.
- ¹⁰¹ Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993;328: 1732-9.

-
- ¹⁰² Sitbon O, Badesch DB, Channick RN, Frost A, Robbins IM, Simonneau G, Tapson VF, Rubin LJ. Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest*. 2003 Jul;124(1):247-54.
- ¹⁰³ Ziv I, Fleminger G, Djaldetti R, Achiron A, Melamed E, Sokolovsky M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke* 1992;23:1014-6.
- ¹⁰⁴ Suzuki R, Masaoka H, Hirata Y, Marumo F, Isotani E, Hirakawa K. The role of endothelin-1 in the origin of cerebral vasospasm in patients with aneurismal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1992;77:96-100.
- ¹⁰⁵ Levin ER, Frank HJL, Pedram A. Endothelin receptors on cultured fetal rat diencephalic glia. *J Neurochem* 1992; 58: 659-66.
- ¹⁰⁶ Vigne P, Lopez Farre A, Frelin C. Na/K/2Cl cotransporter of brain capillary endothelial cells: properties and regulation by endothelins, hyperosmolar solutions, calyculin A, and interleukin-1. *J Biol Chem* 1994;269:19925-30.
- ¹⁰⁷ Yamamoto T, Kimura T, Ota K, et al. Central effects of endothelin-1 on vasopressin release, blood pressure, and renal solute excretion. *Am J Physiol* 1992;262:E856-E862.
- ¹⁰⁸ Ouchi Y, Kim S, Souza AC, et al. Central effect of endothelin on blood pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 1989;256:H1747-H1751.
- ¹⁰⁹ Cooper: *The Cell- A Molekular Approach*, 1991 Geoffrey M Cooper Boston University Second Edition Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Missachusetts
- ¹¹⁰ Leff P, Scaramellini C, Law C, McKechnie K. A three-state receptor model of agonist action. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Oct;18(10):355-62. Review
- ¹¹¹ Brinster RL, Palmiter RD. Transgenic mice containing growth hormone fusion genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1984 Dec 4;307(1132):309-12.
- ¹¹² Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res*. 1996 Feb;78(2):188-95.
- ¹¹³ Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger LE, Niu Q, Morrissey EE, Ip HS, Parmacek MS. Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem*. 1995 Jun 2;270(22):13460-9.
- ¹¹⁴ Imai, T. , Morita, T. , Shindo, T. , Nagai, R. , Yazki, Y. , Kurihara, H. , Suematsu, M. & Katayama, S. (2001) *Circ. Res*. 89, 55-62
- ¹¹⁵ Hocher B, Liefeldt L, Thone-Reineke C, Orzechowski HD, Distler A, Bauer C, Paul M. Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *Hypertension*. 1996 Aug;28(2):196-201.
- ¹¹⁶ Liefeldt L, Schonfelder G, Bocker W, Hocher B, Talsness CE, Rettig R, Paul M. Transgenic rats expressing the human ET-2 gene: a model for the study of endothelin actions in vivo. *J Mol Med*. 1999 Jul;77(7):565-74. Erratum in: *J Mol Med* 1999 Sep;77(9):690.
- ¹¹⁷ Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004 Oct 12;110(15):2233-40.

-
- ¹¹⁸ Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N, Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature*. 1994 Apr 21;368(6473):703-10.
- ¹¹⁹ Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*. 1998 Mar;125(5):813-24.
- ¹²⁰ Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*. 1994 Dec 30;79(7):1277-85.
- ¹²¹ Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*. 1994 Dec 30;79(7):1267-76.
- ¹²² Ceccherini I, Zhang AL, Matera I, Yang G, Devoto M, Romeo G, Cass DT Interstitial deletion of the endothelin-B receptor gene in the spotting lethal (sl) rat. *Hum Mol Genet*. 1995 Nov;4(11):2089-96.
- ¹²³ Garipey CE, Cass DT, Yanagisawa M. Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 23;93(2):867-72.
- ¹²⁴ Shin MK, Levrorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature*. 1999 Dec 2;402(6761):496-501.
- ¹²⁵ Förster, V. Th. (1948): Zwischenmolekulare Energie-Wanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics (Leipzig)* 2, 55-75.
- ¹²⁶ Richard M.Rohan, Donna King and William I.Frels:” Direct sequencing of PCR-amplified junction fragments from tandemly repeated Transgenes” 1990 *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 20 S6089
- ¹²⁷ Richard M.Rohan, Donna King and William I.Frels:” Direct sequencing of PCR-amplified junction fragments from tandemly repeated Transgenes” 1990 *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 20 S6089
- ¹²⁸ Xu R, Ho YS, Ritchie RP, Li L. Human SM22 alpha BAC encompasses regulatory sequences for expression in vascular and visceral smooth muscles at fetal and adult stages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H1398–H1407.
- ¹²⁹ Qiu, P., and Li, L. 2002. Histone acetylation and recruitment of serum responsive factor and CREB-binding protein onto SM22 promoter during SM22 gene expression. *Circ. Res.* 90:858-865.
- ¹³⁰ Mutskov, V., and G. Felsenfeld. 2004. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J.* 23:138-149.
- ¹³¹ Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999;19:1720–1730.
- ¹³² Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem*. 1997; 272: 17734–17743.
- ¹³³ Le TH, Kim HS, Allen AM, Spurney RF, Smithies O, Coffman TM. Physiological impact of increased expression of the AT1 angiotensin receptor. *Hypertension*. 2003; 42: 507–514.

-
- ¹³⁴ Dorer, D.R. & Henikoff, S. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 77, 1–20 (1994)
- ¹³⁵ Burgess-Beusse B. Farrell C. Gaszner M. Litt M. Mutskov V. Recillas-Targa F. Simpson M. West A. Felsenfeld G. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002
- ¹³⁶ Su BY, Reber KM, Nankervis CA. Developmental expression of endothelin receptors in postnatal swine mesenteric artery. *Pediatr Res*. 2004 Sep;56(3):359-65. Epub 2004 Jul 7.
- ¹³⁷ Davenport, A. P. and R. E. Kuc (2004). "Down-regulation of ETA Receptors in ETB Receptor-deficient Mice." *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1: S276-8.
- ¹³⁸ Wendel M, Kummer W, Knels L, Schmeck J, Koch T. Muscular ETB receptors develop postnatally and are differentially distributed in specific segments of the rat vasculature. *J Histochem Cytochem*. 2005 Feb;53(2):187-96.
- ¹³⁹ Faber JE, Yang N, Xin X. Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Aug;298(2):441-52.
- ¹⁴⁰ Kurooka, Y., Moriyama, N., Nasu, K., Kameyama, S., Fukasawa, R., Yano, J., Kawabe, K. Distribution of α 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human renal cortex *BJU International* 83 (3), pp. 299-304
- ¹⁴¹ Diviani D, Lattion AL, Larbi N, Kunapuli P, Pronin A, Benovic JL, Cotecchia S. Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1996 Mar 1;271(9):5049-58.
- ¹⁴² Tesson L, Heslan JM, Menoret S, Anegon I. Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res*. 2002 Feb;11(1):43-8.
- ¹⁴³ Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004 Sep;15(3):155-66. Review.
- ¹⁴⁴ Zhang J, Byrne CD. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem J* 1999;337:231–241.

Erklärung

„Ich, Stefan Kliesch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Expression der Endothelin-Rezeptoren und interagierender vasoaktiver Systeme in einem transgenen Rattenmodell mit glattmuskelspezifischer Expression des humanen Endothelin-A Rezeptors“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

13.01.2009

Stefan Kliesch