

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und
dem Institut für Vegetative Physiologie und Pathophysiologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Pathogenese der hypotensiven Dysregulation bei FGF-2 Defizienz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heike Kilp
Tierärztin aus Köln

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3153

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ. Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter:	Prof. Dr. H. Tönhardt
Zweiter Gutachter:	Univ. Prof. Dr. H. Ehmke
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. K.D. Weyrauch

Deskriptoren: mice, disease models, fibroblasts, growth factors, blood
pressure, hypotension, circadian rhythm, stress, stress
response, aldosterone, angiotensin, renin

Tag der Promotion: 28.02.2008

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs)	3
2.1.1	Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2).....	3
2.2	Entwicklung des Nervensystems	10
2.3	Blutdruckregulation	15
2.3.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	17
2.3.1.1	Aldosteron	20
2.4	Arbeitshypothese und Zielsetzung	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese.....	24
3.1.2	Chemikalien und Enzyme	24
3.2	Versuchstiere	25
3.2.1	Versuchsserien und Stichprobenumfang	26
3.3	Methoden	28
3.3.1	Genotypisierung der Mäuse.....	28
3.3.1.1	Lysierung der Ohrprobe.....	28
3.3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
3.3.1.3	Gelelektrophorese	30
3.3.2	Hämodynamische Untersuchungen an wachen Mäusen	31
3.3.2.1	Chronische Katheter	31
3.3.2.1.1	Katheterherstellung	31
3.3.2.1.2	Operative Katheterimplantation	32
3.3.2.1.3	Blutdruckmessung	33
3.3.2.2	Telemetrie	35
3.3.2.2.1	Maus-Blutdruck-Transmitter.....	35
3.3.2.2.2	Operative Implantation.....	35
3.3.2.2.3	Blutdruckmessung	38
3.3.2.2.4	Stresstest	39
3.3.3	Bestimmung von Blutparametern.....	40
3.3.3.1	Blutentnahme	40

3.3.3.1.1	Blutentnahme für die Aldosteronbestimmung	40
3.3.3.1.2	Blutentnahme für die Elektrolyt-/ Kreatininbestimmung.....	41
3.3.3.2	Analyse.....	41
3.3.3.2.1	Aldosteron	41
3.3.3.2.2	Elektrolyte und Kreatinin.....	42
3.3.4	Bestimmung der renalen mRNA von Renin	43
3.3.4.1	RNA-Isolierung	43
3.3.4.2	Reverse Transkription (RT).....	43
3.3.4.3	Analyse der Real-time PCR	44
3.3.5	Morphometrische Untersuchungen	45
3.3.6	Statistik.....	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Genotypisierung	46
4.2	Ergebnisse Chronischer Katheter	48
4.2.1	Versuchsserien 1 und 2	48
4.2.1.1	Hämodynamische Daten	48
4.2.1.2	Morphometrische Daten	51
4.2.1.3	Plasmaaldosteronkonzentration.....	52
4.2.1.4	Renale mRNA Konzentration von Renin.....	54
4.2.2	Versuchsserie 3.....	55
4.2.2.1	Elektrolyte und Kreatinin.....	55
4.3	Ergebnisse Telemetrie	56
4.3.1	Versuchsserie 3.....	56
4.3.1.1	Tagesmittelwerte	56
4.3.1.2	Zirkadianer Rhythmus.....	58
4.3.1.3	Stresstest	63
5	Diskussion	68
6	Zusammenfassung.....	79
7	Summary	82
8	Literaturverzeichnis	84

Verzeichnis der Abkürzungen

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANG II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT ₁ R	Angiotensin-Rezeptor Typ 1
AT ₂ R	Angiotensin-Rezeptor Typ 2
AT ₄ R	Angiotensin-Rezeptor Typ 4
bFGF	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Centimeter
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
C-Terminus	Carboxyterminus von Proteinen bzw. Peptiden
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2` - Desoxyribonukleotid-5` - triphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
et al.	et alii (und weitere)
Fa.	Firma
FGFR	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor
FGFs	Fibroblastenwachstumsfaktoren
g	Gramm
h	Stunde
HGW	Herzgewicht
H ₂ O	Wasser
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KO	Knockout Maus
l	Liter
Lig.	Ligamentum
LV	Linker Ventrikel
MAD	Mittlerer arterieller Blutdruck
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar

n	Anzahl
N.	Nervus
N-Terminus	Aminoterminus von Proteinen bzw. Peptiden
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
®	eingetragenes Warenzeichen
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunoassay
RV	rechter Ventrikel
s.c.	subkutan
sec	Sekunde
TgC	Transgen C
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V.	Vene
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Die chemischen Elemente werden gemäß dem internationalen Periodensystem abgekürzt.

1 Einleitung

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die regulative Funktionen insbesondere bei der Entwicklung des Organismus ausführen. Es werden zurzeit 6 große Familien von Wachstumsfaktoren beschrieben, zu denen auch die Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren zählt.

Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) ist von großer Bedeutung für verschiedenste Signalprozesse, die das embryonale Wachstum und die Differenzierung, die Physiologie des adulten Organismus und die Pathologie betreffen. Um die *in-vivo* -Funktionen dieses vielfältigen Proteins analysieren zu können, wurde das FGF-2 Gen mittels homologer Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen inaktiviert. FGF-2 Knockout Mäuse sind lebensfähig und fertil. Studien an FGF-2 defizienten Mäusen haben gezeigt, dass die Deletion von FGF-2 mit einer drastischen Reduktion der Zahl von Rückenmarksneuronen assoziiert und die Entwicklung des cerebralen Cortex gestört ist (DONO et al., 1998). Gleichzeitig weisen die Tiere eine arterielle Hypotonie und eine eingeschränkte reflektorische Blutdruckregulation auf (DONO u. FAULHABER et al., 2002). Um die in den FGF-2 defizienten Mäusen nachgewiesenen neuronalen Defekte funktionell zu verstehen und diese mit der beobachteten Hypotonie in Verbindung zu setzen, wurde ein Hühner FGF-2 Transgen unter der Steuerung eines Wnt-1 Promotors zwischen Tag 9.5 und 14.5 selektiv im Neuralrohr von FGF-2 defizienten Embryonen reexprimiert. Diese Tiere wiesen eine normale Rückenmarksmorphogenese und eine intakte reflektorische Blutdruckregulation auf. Zudem konnte bei hoher Expression des FGF-2 Transgens eine Normalisierung des Ruheblutdrucks beobachtet werden (DONO u. FAULHABER et al., 2002). Das spricht dafür, dass FGF-2 eine essentielle Bedeutung in der Entwicklung neuronaler Gewebe, welche an der Blutdruckregulation beteiligt sind, zukommt.

Die in den FGF-2 defizienten Mäusen beschriebenen Symptome deuten auf eine autonome Dysfunktion hin. Bei diesem Krankheitskomplex werden primäre und sekundäre Formen beschrieben. Bei der primären Form stellt das autonome Nervensystem den primären Schädigungsort dar. Die primäre autonome Dysfunktion ist häufig mit einer Hypotension (BANNISTER, 1988) und mit einer beeinträchtigten kurzfristigen Blutdruckregulation assoziiert (MATHIAS, 1988).

FGF-2 defiziente Tiere, die eine gestörte embryonale Entwicklung des zentralen Nervensystems aufweisen, stellen ein genetisches Modell der primären autonomen Dysfunktion dar. Somit können durch weiterführende Analysen dieses Modells weitere

wichtige Erkenntnisse in der physiologischen und pathologischen Entwicklung der autonomen Innervation und in der neuronalen Regulation des Blutdrucks gewonnen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die pathophysiologischen Mechanismen der hypotensiven Dysregulation bei FGF-2 defizienten Mäusen aufzuklären. Im Vordergrund der Untersuchungen steht das für die mittel- bis langfristige Blutdruckregulation bedeutende Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Dabei soll geklärt werden, ob die chronische Defizienz von FGF-2 zu einer eingeschränkten Funktionalität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System führt. Im Anschluss daran soll mit Hilfe telemetrischer Messverfahren untersucht werden, ob FGF-2 defiziente Mäuse eine Beeinträchtigung der beim Stress aktivierten Sympatho-Adrenomedullären-Achse zeigen. Des Weiteren soll mit Hilfe telemetrischer Messverfahren ermittelt werden, ob die chronische Defizienz von FGF-2 zu Störungen des zirkadianen Rhythmus führt.

2 Literaturübersicht

2.1 Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs)

Die Fibroblastenwachstumsfaktoren sind vielfältige Proteine, die in die embryonale und fetale Entwicklung (BOTTCHER et al., 2005), in physiologische Prozesse im adulten Organismus und in pathologische Veränderungen (GROSE et al., 2005) involviert sind. Die Fibroblastenwachstumsfaktoren bilden eine große Familie strukturell verwandter Polypeptide, bestehend aus 155-268 Aminosäuren. FGFs kommen sowohl in Vertebraten, als auch in Avertebraten vor (SUTHERLAND et al., 1996; BURDINE et al., 1997; ORNITZ u. ITOH, 2001). Die FGF-Proteine werden in Säugetieren durch 22 verschiedene Gene kodiert. In der Maus sind sie beispielsweise bekannt als FGF-1 bis FGF-18 und FGF-20 bis FGF-23 (HERBERT et al., 1990; ITOH u. ORNITZ, 2004).

2.1.1 Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2)

Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 wurde erstmals im Jahre 1974 bei der Isolierung von boviden Hypophysen entdeckt (GOSPODAROWICZ et al., 1974).

Das FGF-2 Protein besteht aus 12 antiparallelen β -Faltblattstrukturen, die in einer trigonalen pyramidalen Struktur organisiert sind (ORNITZ u. ITOH, 2001). Die dreidimensionale Struktur des Proteins ist in Abbildung 1 dargestellt.

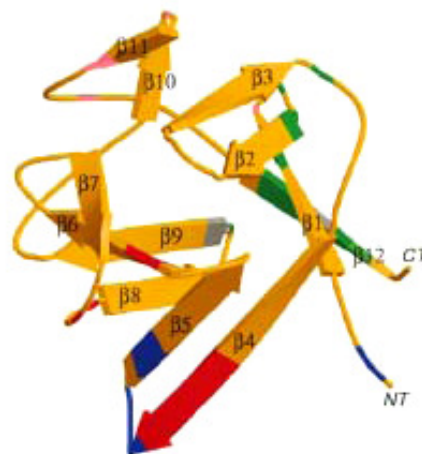


Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur von FGF-2. Die β -Faltblattstrukturen sind mit 1-12 durchnummeriert. Die Bindungsstellen, die den Rezeptor für FGF-2 kontaktieren, sind blau, rot und grün gekennzeichnet. Die Bindungsstelle für Heparin ist pink markiert (aus Ornitz u. Itoh, 2001).

FGF-2 wird auch als basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) bezeichnet, da der isoelektrische Punkt im alkalischen Bereich liegt (BAIRD, 1990). Für FGF-2 existieren aufgrund der unterschiedlichen Initiierung der Translation der FGF-2 mRNA verschiedene Isoformen (TOURIOL et al., 2003), deren Existenz und unterschiedliche Lokalisation für die funktionelle Vielfalt des Proteins verantwortlich sind. Bisher konnten fünf Isoformen beim Menschen (18, 22, 22.5, 24 und 34 kDa), drei Isoformen bei Nagetieren (18, 21 und 23 kDa) und drei Isoformen bei Hühnern (18.5, 20 und 21.5 kDa) identifiziert werden (FLORKIEWICZ et al., 1989; DONO u. ZELLER, 1994; POWELL et al., 1991; ARNAUD et al., 1999).

Auf zellulärer Ebene kann der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 sowohl als klassisches extrazelluläres Signalprotein als auch als intrazellulärer Faktor seine Wirkung entfalten. Die von einer Zelle gebildeten Isoformen von FGF-2 können vom Zytosol in den Zellkern translocieren, wo sie durch Interaktion mit diversen Proteinen zelluläre Prozesse auf intrakrine Weise regulieren können (SØRENSEN et al., 2006). Die 18 kDa Isoform kann durch eine unkonventionelle Sekretionsweise, die über das 27 kDa Hitzeschockprotein vermittelt wird, die Zelle verlassen (PIOTROWICZ et al., 1997) und auf diese Weise extrazellulär wirken.

Durch Bindung von FGF-2 an Heparin bzw. Heparan-Sulfat-Proteoglykan, die auch als FGF-Rezeptoren niedriger Affinität (low-affinity FGFRs) bezeichnet werden, entsteht der FGF-Heparansulfat-Komplex. Dieser Komplex bindet an Rezeptoren mit hoher Affinität (high-affinity FGFRs). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um membranständige Tyrosinkinasen, die als FGFR-1 bis FGFR-4 benannt werden (GREEN et al., 1996). Diese Bindung führt zur Phosphorylierung des Rezeptors und zur Aktivierung des komplexen MAP (Mitogen-Activated-Protein)- Kinase-Transduktionsweges, an dessen Ende ERK (Extracellular signal Regulated-Kinase) in den Zellkern gelangt und Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktiviert (FANTL et al., 1996).

Sezernierter Fibroblastenwachstumsfaktor-2, welcher an FGFR gebunden ist, kann außerdem durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Dort kann das Protein ins Zytosol und in den Zellkern transportiert werden, wo es die Aktivität verschiedener Kinasen beeinflusst (BONNET et al., 1996).

Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 wird in den unterschiedlichsten Geweben und Zelltypen exprimiert. Dementsprechend ist FGF-2 während der Entwicklung und im adulten Organismus an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie z.B.

Mitogenese, Angiogenese, Chemotaxis, Mesoderminduktion und der Differenzierung von Zellen mesodermaler und neuroektodermaler Herkunft involviert.

Eine Übersicht über die Funktionen von FGF-2, die in *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten gesammelt werden konnten, zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Putative Funktionen von FGF-2

Organ	Putative Funktionen	Referenz
Nervensystem	Neurogenese; Neuroprotektion	ORTEGA et al., 1998; DONO et al., 1998; DONO et al., 2002
Herz/Kreislaufsystem	Angiogenese; Proliferation von glatten Muskelzellen; Blutdruckkontrolle	BASILICO et al., 1992; MONTESANO et al., 1992; KLEIN et al., 1993; DONO et al., 1998; DONO et al., 2002
Lunge	Morphogenese	FUKS et al., 1994; LEBECHE et al., 1999
Muskulatur	Myogenese	AMAYA et al., 1993
Knochen	Regulierung der Knochenmasse, Knochenumbauprozesse	MONTERO et al., 2000; GLOBUS et al., 1988
Blutbildendes System	Stimulation der Granulopoese, Megakaryozytopoese; Erhalt von Stammzellen	ALLOUCHE et al., 1995; BIKFALVI et al., 1994; BRUNO et al., 1993; HAN et al., 1992; OLIVER et al., 1990
Fortpflanzungssystem	Spermatogenese	MURONO et al., 1992; VAN DISSEL-EMILIANI et al., 1996
Auge	Erhalt von Photorezeptorzellen; Beteiligung an der Transduktion	FAKTOROVICH et al., 1992; LAVAIL et al., 1992; PLOUET et al., 1990
Haut	Melanogenese; Gewebeheilung	HALABAN, et al., 1992; STENBERG et al., 1991; ORTEGA et al., 1998

Inwieweit FGF-2 seine Wirkungen auf die ersten beiden Organsysteme erfüllt, soll im Rahmen dieser Arbeit erläutert werden.

Verschiedene FGF- Rezeptoren und ihre Liganden werden im sich entwickelnden ZNS exprimiert. Sie besitzen diverse Effekte auf die Entwicklung (VACCARINO et al., 2001) und die Erhaltung von Neuronen (PERRONE-CAPANO u. DI PORZIO, 2000), speziell was die Determination (ANDERSON, 1993), Migration und Differenzierung (KALCHEIM et al., 1996) sowie das Überleben der Zellen betrifft (GROTHE u. WEWETZER, 1996).

FGF-2 wird ab den frühesten Entwicklungsschritten des Gehirns exprimiert. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der FGF-2 Proteine im Gehirn und Rückenmark am Tag 14.5 eines murinen Wildtypembryos (DONO u. ZELLER, 1994). Bei dieser Entwicklungsphase sind die höchsten FGF-2 Proteinmengen in der cerebralen

Hemisphäre präsent, während geringere Mengen in den mehr kaudalen Gehirnregionen und im Rückenmark zu erkennen sind (DONO et al., 1998).

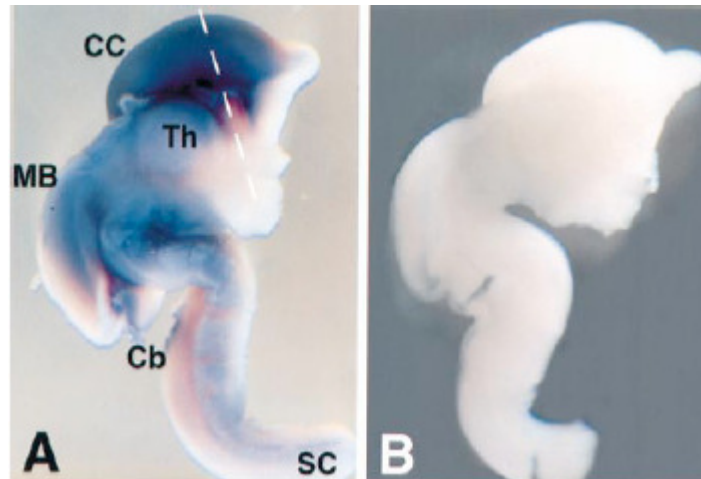


Abbildung 2: Verteilung des FGF-2 Proteins im ZNS von Mäusen am embryonalen Tag 14.5. Abbildung A zeigt das isolierte Gehirn mit Rückenmark eines Wildtyp-Embryos. Das FGF-2 Protein ist mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht worden. Abbildung B zeigt ein gleichaltriges FGF-2 Knockout Embryo, bei dem entsprechend der genetischen Deletion kein FGF-2 nachweisbar war. CC: cerebraler Cortex; Th: Thalamus; MB: Midbrain; Cb: Cerebellum; SC: Spinal cord; (Bildquelle: Dono et al., 1998).

Die Expression des Proteins hält auch im adulten ZNS an (VACCARINO et al., 1999). Dabei wird FGF-2 sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Zellen exprimiert. FGF-2 mRNA konnte verteilt über das gesamte ZNS z.B. in Medulla oblongata, Pons, Thalamus, olfaktorischer Bulbus und cerebraler Cortex (ERNFORS et al., 1990), Hypothalamus-Hypophysen-System (GONZALEZ et al., 1994) und in Neuronen des Cortex und Hippokampus (GOMEZ-PINILLA et al., 1994), der Substantia nigra und im Striatum (BEAN et al., 1991) nachgewiesen werden.

Entsprechend der vielfältigen Expression von FGF-2 im ZNS wurden dem Protein unterschiedlichste Funktionen innerhalb des sich entwickelnden Nervensystems zuerkannt.

Seitdem *in-vitro* Untersuchungen ergeben haben, dass FGF-2 die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben neuraler Vorläuferzellen von Mäusen und Ratten fördert (GENSBURGER et al., 1987; PETROSKI et al., 1991; RAY et al., 1993; VICARIO-ABEJON et al., 1995; QIAN et al., 1997), wird dem Protein eine bedeutende Rolle in der Neurogenese zugesprochen.

Diese Annahme konnte in Untersuchungen am cerebralen Cortex von Mäusen bestätigt werden. Bei murinen Embryonen am Tag 14.5 war es möglich, das FGF-2 Protein und seine Rezeptoren in der ventrikulären und subventrikulären Schicht des Neocortex nachzuweisen (DONO et al., 1998). In dieser Region des Neocortex sind Vorläuferzellen lokalisiert (BAYER u. ALTMAN, 1991). Die Bedeutung des Proteins für die Regulation der Zellanzahl innerhalb des cerebralen Cortex wurde gefestigt, da Mikroinjektionen von FGF-2 in den cerebralen Ventrikel von Rattenembryonen am Anfang der Neurogenese eine permanente Steigerung des corticalen Volumens und der Neuronenanzahl bewirkten (VACCARINO et al., 1999). Auf der anderen Seite konnte die Folge der genetischen Deletion des FGF-2 Proteins eindrucksvoll an histologischen Schnitten von neugeborenen Mäusen veranschaulicht werden. Diese wiesen eine Komprimierung der corticalen Schichten und eine Neuronendefizienz im Vergleich zu den Wildtypen auf (DONO et al., 1998; ORTEGA et al., 1998; VACCARINO et al., 1999; RABALLO et al., 2000). Die neuronalen Defekte in FGF-2 defizienten Mäusen konnten auch im Rückenmark nachgewiesen werden. Dort befanden sich eine geringere Anzahl differenzierter Neurone im Vergleich zu den Wildtypen (DONO et al., 1998).

Neben dem Einfluss von FGF-2 auf die Proliferation und Differenzierung von neuralen Vorläuferzellen ist das Protein auch am Wachstum und an der Verzweigung von Axonen beteiligt (KALIL et al., 2000).

Dem Protein werden zudem neuroprotektive und reparative Effekte zugesprochen. FGF-2 gilt als potenter trophischer Faktor für verschiedene Populationen von Neuronen (OTTO et al., 1989; BIEGER et al., 1995). Nach corticalen Läsionen konnte gezeigt werden, dass das FGF-2 Protein verstärkt synthetisiert wird. Dabei war die FGF-2 Synthese vor allem in der Mikroglia und in Astrozyten nachweisbar (FRAUTSCHY et al., 1991). Infolge cerebraler Ischämie proliferieren und differenzieren Vorläuferzellen des Hippokampus (LIU et al., 1998; TAKAGI et al., 1999). Dieser Prozess ist in FGF-2 defizienten Mäusen beeinträchtigt (YOSHIMURA et al., 2001).

In-vitro Untersuchungen zeigten, dass FGF-2 die Katecholaminlagerung und Synthese in kultivierten Chromaffinzellen fördert (UNSICKER u. WESTERMANN, 1992) und für das Überleben von cholinergen Neuronen im fetalen Rattenhirn verantwortlich gemacht werden konnte (Kushima et al., 1992).

FGF-2 erfüllt verschiedene physiologische Funktionen in der Gefäßentwicklung, im kardialen Wachstum und in der Blutdruckregulation. FGF-2 war einer der ersten

Wachstumsfaktoren, dem proangiogene Wirkung zugeprochen wurde (MOSCATELLI et al., 1986; SHIN et al., 1996). Zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren ist FGF-2 an der Angiogenese beteiligt (GOTO et al., 1993; YOKOYAMA et al., 2001; AKIMOTO et al., 2003). FGF-2 wird im adulten Organismus in glatten Gefäßmuskelzellen (DAVIS et al., 1997) und in Endothelzellen (SCHWEIGERER et al., 1987) exprimiert und stimuliert deren Proliferation. In *vitro* wirkt das Protein chemotaktisch auf Endothelzellen und besitzt einen regulierenden Einfluss auf das Wachstum der Blutgefäße (SCHWEIGERER et al., 1987). Zudem verfügt FGF-2 über die Fähigkeit, die Produktion und Sekretion von Plasminogen-Aktivatoren und Kollagenasen in Endothelzellen zu stimulieren und somit indirekt deren Migration zu fördern (FERNIG u. GALLAGHER, 1994). Aufgrund der proangiogenen Potenz geht man davon aus, dass FGF-2 auch eine Rolle in der Tumorgenese spielt. Dementsprechend konnte in *in-vitro* Studien gezeigt werden, dass FGF-2 von verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert wird (OKUMURA et al., 1989; NAKAMOTO et al., 1992).

FGF-2 wurde sowohl beim Menschen, als auch bei verschiedenen Vertebraten aus dem Herzen isoliert und lokalisiert (KARDAMI u. FANDRICH, 1989; CASSCELLS et al., 1990; SPEIR et al., 1992). FGF-2 ist während der postnatalen kardialen Entwicklung für eine physiologische Kapillarogenese des Herzens verantwortlich. So konnte bei FGF-2 defizienten Mäusen eine signifikant reduzierte myokardiale Kapillarisation festgestellt werden (PELLIEUX et al., 2001). Dagegen ist FGF-2 bei einer experimentell induzierten kardialen Hypertrophie für das Kapillarwachstum nicht essentiell. So zeigten FGF-2 Knockout Mäuse nach einer chronischen Angiotensin II Infusion eine zur Kontrollgruppe vergleichbare kapillare Adaptation (PELLIEUX et al., 2001; AMANN et al., 2006).

FGF-2 wird infolge eines erhöhten mechanischen Drucks von Rattenkardiomyozyten abgegeben und induziert adaptives myokardiales Wachstum (CLARKE et al., 1995). *In vitro* kann FGF-2 die DNA Synthese und Proliferation von neonatalen Rattenkardiomyozyten steigern (PASUMARTHI et al., 1996). Das deutet darauf hin, dass FGF-2 eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Differenzierung von Kardiomyozyten einnimmt. Dementsprechend wiesen FGF-2 Knockout Mäuse ein abgeschwächtes myokardiales Wachstum als Antwort auf eine mechanische Überlastung auf (SCHULTZ et al., 1999).

Systemische Infusion von FGF-2 bewirkt eine Vasodilatation und Hypotension bei Ratten, Hunden und Menschen (CUEVAS et al., 1991; LAZAROUS et al., 1995; LAZAROUS et al., 2000; UNGER et al., 2000). Diese Beobachtung spricht dafür, dass

FGF-2 in einer antihypertensiven vasodilatatorischen Weise fungiert. Erstaunlicherweise führt die genetische Deletion der FGF-2 Proteine bei Mäusen zu chronisch erniedrigten Blutdruckwerten (DONO et al., 1998; ZHOU et al., 1998; DONO et al., 2002). FGF-2 defiziente Tiere zeigen, wie oben bereits erwähnt, bei induzierter Überlastung des Herzens ein beeinträchtigt myokardiales Wachstum (SCHULTZ et al., 1999). So besteht die Möglichkeit, dass eine beeinträchtigte linksventrikuläre Funktion zu der Hypotonie bei FGF-2 defizienten Mäusen beiträgt. Die Hypothese, dass der Hypotonie primär ursächlich eine Insuffizienz der glatten Muskelzellen zugrunde liegt, ist unwahrscheinlich, da FGF-2 defiziente Mäuse auf einen exogen zugeführten Vasokonstriktor mit einer nahezu identischen Erhöhung des Blutdrucks reagieren wie die Wildtyp Tiere (DONO et al., 1998). Eine andere Arbeitsgruppe fand heraus, dass die spontane Kontraktilität von isolierten Portalvenen in FGF-2 defizienten Mäusen reduziert ist (ZHOU et al., 1998), was auf eine myogene Ätiologie des Phänotyps in FGF-2 defizienten Mäusen hindeutet.

FGF-2 wird von Vorläuferzellen neuronaler Gewebe exprimiert, die in der zentralen Blutdruckregulation involviert sind, z.B. im Myelencephalon (DONO et al., 1998) und den intermediolateralen Neuronen des Rückenmarks (STAPF et al., 1997). Zudem wird das Protein in migrierenden Neuralleistenzellen exprimiert, die den Ursprung peripherer kardiovaskulärer Nerven darstellen (SAVAGE et al., 1993). Das spricht dafür, dass FGF-2 eine bedeutende Rolle während der physiologischen Entwicklung der kardiovaskulären Reflexkontrolle zukommt (DONO et al., 2002). So konnte gezeigt werden, dass FGF-2 defiziente Mäuse neben der Hypotension eine Beeinträchtigung des Barosensorenreflexes aufwiesen (DONO et al., 1998; DONO et al., 2002). Mit einem weiteren Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass der kardiovaskuläre Phänotyp durch eine kongenitale Malformation neuronaler Gewebe zustande kommt. Dafür wurden FGF-2 Knockout Mäuse untersucht, bei denen zwischen Tag 9.5 und 14.5 der embryonalen Entwicklung ein Hühner FGF-2 Transgen unter der Kontrolle des Wnt-1 Promotors reexprimiert wurde. Diese Mäuse wiesen eine intakte Reflexkontrolle auf. Zudem konnte bei hoher Expression des FGF-2 Transgens eine Normalisierung des Blutdrucks beobachtet werden (DONO et al., 2002). Es wurde diskutiert, ob der beschriebene kardiovaskuläre Phänotyp in FGF-2 defizienten Mäusen durch eine Dysfunktion präganglionärer Neurone im Rückenmark bedingt ist (DONO et al., 2002). Deren Degeneration führt zu einem erniedrigten sympathoadrenergen Tonus und ist mit einem beeinträchtigten Barorezeptorenreflex und einer Hypotension assoziiert (BANNISTER u. MATHIAS, 1992).

2.2 Entwicklung des Nervensystems

Das Nervensystem dient der Regulation und Anpassung des Organismus an die wechselnden Bedingungen der Außenwelt und des Körperinneren. Das Nervensystem lässt sich strukturell in das zentrale – und das periphere Nervensystem einteilen. Funktionell gesehen, lässt sich das senso-motorische vom vegetativen (autonomen) Nervensystem unterscheiden.

Nachdem sich beim Embryo die drei übereinander liegenden Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm gebildet haben, entstehen durch die induktive Wirkung des Mesoderms und der Chorda dorsalis (primitive Längsachse des Embryos) das Neuroektoderm. Bereits um 1930 wurde entdeckt, dass ein diffusibler Stoff aus der Chorda dorsalis in den direkt darüber liegenden Ektodermzellen eine Veränderung induziert und schließlich das Neuroektoderm entsteht. Erst vor einigen Jahren wurde dieser diffusible Stoff als Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming-Growth-Faktor β , TGF β) identifiziert. Dieser Wachstumsfaktor bildet eine große Familie interzellulärer Signalsubstanzen (FROLIK et al., 1983; ASSOIAN et al., 1987; ROBERTS u. SPORN, 1990). Zu dieser Familie gehören unter anderem Aktivin, BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), Nodal und Myostatin. Auf molekularer Ebene handelt es sich bei den Faktoren, die die neurale Entwicklung induzieren, um Bindungsproteine, einschließlich Chordin und Noggin, für BMPs (ZIMMERMANN et al., 1996). BMPs induzieren im Ektoderm die Differenzierung zur Epidermis. Mesodermzellen, die BMP-Antagonisten, wie Chordin und Noggin, sezernieren, bewirken dadurch im darüber liegenden Ektoderm, dass der BMP-Signalweg, der für die Hemmung des Nervenzelldifferenzierungsprogrammes verantwortlich ist, gehemmt (THOMSON, 1997) und somit der Weg zur Nervenzelldifferenzierung freigelegt wird. In Untersuchungen an *Xenopus* konnte festgestellt, dass die über Noggin und Chordin vermittelte neurale Induktion in der Abwesenheit des FGF-Signalwegs aufgehoben ist (LAUNAY et al., 1996).

In der anschließenden Phase der Neurulation wölbt sich die Neuralplatte beiderseits der Chorda dorsalis zu Neuralfalten auf, die schließlich miteinander verschmelzen und das Neuralrohr bilden. Die Neuralrohrbildung beginnt in Höhe des späteren Hirnstammes und schreitet von hier aus in anteriorer und posteriorer Richtung fort. Auch bei diesem Entwicklungsprozess ist die Beteiligung verschiedenster Wachstumsfaktoren nachgewiesen (MC GREW et al., 1997; HOLOWACZ u. SOKOL, 1999; DOMINGOS et al., 2001; VILLANUEVA et al., 2002).

An den beiden seitlichen Grenzen zwischen der Neuralplatte und dem Oberflächenektoderm sind die Neuralleistenzellen lokalisiert. Mit der Verschmelzung der Neuralfalten entsteht eine unpaare Neuralleiste, aus der die Zellen nach beiden Seiten hin auswandern (CHRIST u. WACHTLER, 1998).

Aus dem vorderen, im Kopfabschnitt gelegenen Ende des Neuralrohrs bildet sich das Gehirn, während aus dem hinteren, im Rumpfabschnitt gelegenen Teil das Rückenmark entsteht. Aus dem Hohlraum des Rohrs entwickelt sich später das Ventrikelsystem. Die Neuralrohrwand gliedert sich in die Grundplatte, aus der die motorischen Vorderhornzellen des Rückenmarks, die motorischen Hirnnervenkerne und Teile des Mittelhirns entstehen und in die Flügelplatte, aus der sich sensible Hinterhornzellen des Rückenmarks, die sensiblen Hirnnervenkerne, Teile des Rückenmarks, Kleinhirn, Zwischenhirn und das Großhirn entwickeln. Aus der Neuralleiste gehen später die ersten afferenten Neurone hervor, welche die sensorischen Spinal- und Hirnnervenganglien bilden. Weiter entstammen die Zellen der sympathischen Ganglien, die Schwann-Zellen, die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und die Melanozyten aus dem Neuralleistenmaterial (ZILLES u. REHKÄMPER, 1998).

Bevor diese funktionelle Gliederung des ZNS stattfinden kann, muss das Neuralrohr in einer rostrokaudalen und dorsoventralen Achse organisiert werden. Durch die rostrokaudale Organisation entsteht die Untergliederung in die Abschnitte Prosencephalon (bestehend aus Telencephalon und Diencephalon), Mesencephalon, Rhombencephalon und Medulla spinalis (ZIGMOND et al., 1999). Im Rhombencephalon werden Segmentgrenzen gezogen (LUMSDEN, 1991). Dadurch entstehen in kranio-kaudaler Richtung sieben Vorwölbungen des Neuralrohrs, die als Rhombomere bezeichnet werden. Zum Rückenmark hin wird eine achte Rhombomere beschrieben, deren Grenzen von außen nicht sichtbar sind. Die aus den Rhombomeren auswandernden Neuralleistenzellen besitzen eine Segmentidentität (KEYNES u. LUMSDEN, 1990). Die positionelle Identität der Rhombomere und der Neuralleistenzellen wird durch HOX-Gene festgelegt, deren Expressionsmuster durch Transkriptionfaktoren induziert werden, die ihrerseits durch Gradienten von FGFs und Retinsäure moduliert werden (MARSHALL et al., 1996; GAVALAS u. KRUMLAUF, 2000; MADEN, 2006).

Die Ausbildung ventraler und dorsaler Strukturen wird durch Signale der Chorda dorsalis, die ventral an das Neuralrohr angrenzt, eingeleitet (JESSEL et al., 1989).

Dorsale Strukturen sind beispielsweise Kommissurenneurone, die die beiden Rückenmarkshälften miteinander verbinden. Ventrale Strukturen werden durch die Bodenplatte und die Motoneurone dargestellt. Unter dem Einfluss eines komplexen Wechselspiels zahlreicher Signale, in das auch das zur Hedgehog-Familie gehörende Sonic hedgehog involviert ist, wird die dorsoventrale Polarisierung des Neuralrohrs kontrolliert (CHIANG et al., 1996).

Die strukturelle Entwicklung des ZNS geht von dem mehrreihigen hochprismatischen Epithel des Neuralrohrs aus. Die Lage der Zellkerne innerhalb des Epithels ist abhängig vom Zellzyklus, wobei die Kerne während der S-Phase außen unter der Basalmembran liegen und anschließend lumenwärts migrieren, um sich zu teilen (ventrikuläre Mitosen). Die neuronale Determination der Zellen erfolgt über den Mechanismus der Lateralinhibition, dem das Delta-Notch-Signalsystem zugrunde liegt (CHENN u. MCCONNELL, 1995). Dabei handelt es sich sowohl bei dem Liganden (Delta), als auch bei dem Rezeptor (Notch) um Transmembranproteine (WEINMEISTER, 1998). Durch die Aktivierung von Notch wird die Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors Neurogenin gehemmt. Neurogenin legt über die Aktivierung eines weiteren bHLH-Transkriptionsfaktors neuroD das neuronale Schicksal der Zellen fest. In dem Falle, dass eine Zelle Delta stärker exprimiert als ihre Nachbarzelle, unterdrückt sie deren Delta-Expression. Das führt dazu, dass diese Zellen dann keine hemmenden Signale mehr aussenden. Folglich wird der Zelle, die als erstes Delta hochreguliert hat, über eine verstärkte Expression von Neurogenin und eines weiteren Transkriptionsfaktors (neuroD) die Differenzierung zum Neuron ermöglicht. An der neuronalen Differenzierung sind weitere Genprodukte und Wachstumsfaktoren, einschließlich bFGF und Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) beteiligt (GANGEMI et al., 2004).

Die ventrikulären Mitosen des Neuralepithels laufen zunächst symmetrisch ab. Bei den symmetrischen Zellteilungen werden die Proteine Notch und Numb gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, während bei den asymmetrischen Zellteilungen, die senkrecht zur inneren Epitheloberfläche verlaufen, die lumenah gelegene Tochterzelle das Numb-Protein und die lumenabgewandte Tochterzelle das Notch-Protein erhält. Infolge der asymmetrischen Zellteilung bleibt die lumenwärts gelegene Zelle als Stammzelle erhalten, wogegen die andere zum Neuron wird und die Proliferationszone verlässt (SPANNA et al., 1995). Durch die Zellmigration entsteht ein mehrschichtiges Neuralepithel, bei dem eine innere ventrikuläre Zone, eine Intermediärzone sowie die äußere Marginalzone, die von Nervenzellfortsätzen gebildet wird, unterschieden

werden kann. Die früh gebildeten Neurone migrieren über kürzere, die später geborenen über längere Distanzen. Als zelluläres „GPS“ fungieren dabei verschiedenste Moleküle an der Oberfläche anderer Zellen und an der extrazellulären Matrix, einschließlich Fibronectin und Laminin (VON DER MARK u. GOODMAN, 1993). Wenn die Migration abgeschlossen ist, d.h. wenn die bei der neuronalen Differenzierung entstandenen Zellen sich in charakteristischer Weise positioniert haben, erfolgt die neuronale Differenzierung. Neurone und Makrogliazellen, wie Astrozyten und Oligodendrozyten, gehen aus einer einzigen multipotenten Vorläuferzelle hervor, wobei Neurone früher und die meisten Gliazellen später entstehen. Durch die Stimulation verschiedener Wachstumsfaktoren können sich die Vorläuferzellen in unterschiedliche Richtungen differenzieren. Unter dem Einfluss von FGF-2 und Neurotrophin 3 (NT3) wird beispielsweise eine neuronale Differenzierung induziert, wohingegen der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) die Differenzierung von Astrozyten begünstigt (GANGEMI et al., 2004).

Wenn die neuronale Differenzierung beendet ist, beginnt die neuronale Maturation. Sie beinhaltet die Ausbildung von Axonen und Dendriten, wobei die Axone über Leitsignale gelenkt, teilweise über beachtliche Entfernungen auswachsen, um ihre Zielzellen zu erreichen (TESSIER-LAVIGNE u. GOODMAN, 1996). Weitere Maturationsschritte sind die Expression der charakteristischen biochemischen Eigenschaften eines Neurons, insbesondere spezifische Transmitterexpression und schließlich die Bildung synaptischer Kontakte mit anderen Neuronen. Unter anderem konnten den Fibroblastenwachstumsfaktoren eine Beteiligung an dem Wachstumsprozess von Neuriten zugesprochen werden (WALICKE et al., 1986; WILLIAMS et al., 1994).

Die Neurogenese des Rückenmarks und der Gehirnabschnitte dauert während der pränatalen Phase unterschiedlich lang an und unterscheidet sich letztendlich auch in der Ausprägung der vorhandenen histogenetischen Zonen.

Die verschiedenen Phasen der Neurogenese stellen komplexe Vorgänge dar, an denen diverse Wachstumsfaktoren, insbesondere auch FGF-2, und unterschiedliche homöotische Faktoren beteiligt sind. Ein fehlender oder unvollständiger Ablauf dieser Phasen führt beispielsweise zum Fehlen ganzer Zelltypen oder zum vermehrten Vorkommen von Vorläuferzellen. In Untersuchungen an histologischen Schnitten des Cortex von FGF-2 defizienten Mäusen, konnte die Bedeutung dieses Wachstumsfaktors für die Neurogenese bestätigt werden. Die Cortexdicke der FGF-2

Knockout Mäuse war im Vergleich zu den Kontrolltieren um ca. 10 % reduziert (DONO et al., 1998). Auf zellulärer Ebene zeigten sich eine Kompression der corticalen Schichten und eine verminderte Dichte an neuronalen Zellen (ORTEGA et al., 1998). Die Bedeutsamkeit des Fibroblastenwachstumsfaktor-2 für die Zellmigration wurde an FGF-2 Knockout Mäusen ersichtlich. Bei diesen Tieren konnten Fraktionen von neuronalen Vorläuferzellen ihre Zielschichten während der cerebralen Cortexmorphogenese nicht erreichen (DONO et al., 1998).

2.3 Blutdruckregulation

Der Blutdruck ist definiert als der in den Gefäßen des Körper- und Lungenkreislaufs bestehende Druck, der die treibende hämodynamische Kraft für die Blutzirkulation bildet. Physikalisch gesehen unterliegt der Blutdruck dem Ohmschen Gesetz für Flüssigkeiten. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), der auch in der vorliegenden Arbeit bei den Blutdruckmessungen ermittelt wurde, stellt den im arteriellen System auf Herzhöhe gegen den Atmosphärendruck ermittelten Druck dar. Der MAP entspricht dem Produkt aus Herzzeitvolumen und totalen peripheren Widerstand zuzüglich des zentral venösen Drucks. Der totale periphere Widerstand ist im Wesentlichen von dem Tonus und der Elastizität der Gefäßwände abhängig, kann aber auch in weitaus geringerem Maße durch die Blutviskosität beeinflusst werden.

Die Aufgaben der Kreislaufregulation bestehen darin, eine adäquate Blutversorgung auch unter wechselnden Umgebungs- und Belastungsbedingungen sicherzustellen. Die Blutdruckregulation erfolgt zum einen durch Änderung des peripheren Widerstands, was durch eine Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation der Widerstandsgefäße bewirkt wird, und zum anderen durch Veränderung des Herzzeitvolumens (KLINKE u. SILBERNAGL, 2005). Dabei sind verschiedene physiologische Mechanismen involviert, zu denen nervale, humorale und metabolische Komponenten zählen (COWLEY, 1992; PERSSON, 1996). Die Regulationsmechanismen interagieren in komplexer Wechselwirkung und zeichnen sich durch unterschiedliche Zeitcharakteristiken aus, in denen sie ihre Wirkung entfalten.

Die nervale Durchblutungsregulation im Gefäßsystem basiert vor allem auf dem sympathischen Anteil des vegetativen Nervensystems. Dabei ziehen postganglionäre Sympathikusfasern in fast alle Blutgefäße und bilden in deren Adventitia Varikositäten aus. In diesen befindet sich der Transmitter Noradrenalin, der häufig zusammen mit anderen Cotransmittern, wie z.B. Neuropeptid Y bereits unter Ruhebedingungen freigesetzt wird und für den basalen Sympathikotonus verantwortlich ist. Noradrenalin bindet hauptsächlich an postsynaptische α_1 oder β_2 -Rezeptoren. Über α_1 -Rezeptoren wird die Vasokonstriktion der Blutgefäße vermittelt. Die im Folgenden beschriebenen Effekte stehen im Sinne einer Erhöhung der Nachlast und Vorlast am Herzen. Die sympathisch vermittelte Vasokonstriktion führt zum einen zur Erhöhung des Strömungswiderstands und zum anderen durch Erhöhung des präkapillaren Widerstands zu einer Senkung des hydrostatischen Drucks in den Kapillaren, wodurch die Verlagerung von Gewebsflüssigkeit aus dem Interstitium zurück in den

Plasmaraum gefördert wird. Ein weiterer Effekt der Gefäßlumenänderung drückt sich in einer reduzierten Dehnbarkeit der Venen aus, wodurch die Mobilisation von Blut aus den Venendepots erleichtert wird.

β_2 -Rezeptoren sind im Gefäßsystem des Skelettmuskels, des Myokards und der Leber lokalisiert. Eine Bindung von Noradrenalin an diese Rezeptoren bewirkt, vermittelt durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, eine Vasodilatation.

Die beschriebenen Effekte sind Folge einer Änderung der Sympathikusaktivität, die dadurch zustande kommt, dass präganglionäre Sympathikusneurone, im Seitenhorn von Thorakal - und Lumbalmark gelegen, von descendierenden Bahnen aus Kerngebieten der Medulla oblongata beeinflusst werden. In diesen Kerngebieten laufen sowohl Afferenzen aus höheren Zentren des ZNS, wie dem Hypothalamus und dem limbischen System, als auch die afferenten Bahnen der sogenannten Kreislaufreflexe zusammen (SCHMIDT u. UNSICKER, 2003). Die Kreislaufreflexe ermöglichen die kurzfristige Anpassung an einen veränderten Durchblutungsbedarf. Dabei spielen die Barosensoren, die in der Gefäßwand des Carotissinus und des Aortenbogens lokalisiert sind und den arteriellen Barosensorenreflex vermitteln, eine zentrale Rolle. Dieser homöostatische Selbststeuerungsmechanismus des Kreislaufs bildet einen in sich geschlossenen Regelkreis, der durch eine negative Rückkoppelung gekennzeichnet ist und innerhalb von 1-2 sec seine Wirkung entfalten kann. In Studien an FGF-2 defizienten Mäusen, die eine gestörte Entwicklung des Nervensystems aufweisen, konnte eine Beeinträchtigung des Barosensorenreflexes beobachtet werden. FGF-2 Knockout Mäuse reagieren auf die Infusion mit Isoproterenol mit einem deutlichen Abfall des Blutdrucks, während die Kontrollgruppe den hypotensiven Stimulus durch die Disinhibition der im Hypothalamus gebildeten und zur Medulla oblongata weitergeleiteten Sympathikusaktivität kompensieren kann (DONO u. FAULHABER et al., 2002).

Bei den Barosensoren handelt es sich um Mechanosensoren, die aufgrund ihres Proportional-Differential-Verhaltens Informationen über den mittleren arteriellen Druck, über die Größe der Druckamplitude, die Steilheit des Druckanstiegs und die Herzfrequenz aufnehmen können. Diese Informationen werden über Afferenzen des IX. und X. Hirnnervens weiter zum Nucleus solitarius und Nucleus ambiguus in der dorsalen Medulla oblongata geleitet. Über efferente sympathische Nervenbahnen erfolgt eine Regulation der Herzfrequenz, des totalen peripheren Widerstands und der Kontraktilität des Herzens (LEVICK, 2003).

In Experimenten konnte die Bedeutung des Barosensorenreflexes für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks bestätigt werden. So führte die experimentelle Ausschaltung der arteriellen Barosensoren zu erheblichen Schwankungen des arteriellen Blutdrucks innerhalb eines großen Druckbereichs (COWLEY et al., 1973).

Forschergruppen, die die Denervierung der Barosensoren an unterschiedlichen Tieren vornahmen, konnten zeigen, dass dadurch eine Hypertonie provoziert wurde, die jedoch innerhalb von 7-14 Tagen wieder kompensiert wurde (COWLEY et al., 1973; ITOH u. SCHER, 1981; BISHOP et al., 1986; SHADE et al., 1990; OHSUMI u. SCHER, 1992). Die Kompensation wird dort von mittel- bis langfristigen Kontrollmechanismen übernommen.

Das Blutvolumen wird mittel- bis langfristig über eine Steuerung der Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz reguliert. Dabei spielen die hormonellen Systeme, wie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das antidiuretische Hormon und das Atriopeptin eine wichtige Rolle.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System steht im Mittelpunkt der pathogenetischen Aufklärung der hypotensiven Dysregulation bei FGF-2 defizienten Tieren und wird deshalb im folgenden Abschnitt eingehender dargestellt.

2.3.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die physiologischen Funktionen des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) für den Organismus bestehen in der mittel- bis langfristigen Blutdruckregulation und in der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts.

Die erste Erkenntnis bezüglich der Blutdruckregulation stammt aus dem Jahre 1898 als Robert Adolf Armand Tigerstedt und einer seiner Studenten eine Substanz aus Kaninchennierenextrakt entdeckten, mit der eine Blutdrucksteigerung ausgelöst werden konnte. Sie benannten den neu entdeckten Stoff entsprechend des Extraktionsortes „Renin“.

Renin ist eine Aspartylprotease und wird in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen gebildet, die in der Tunica media der afferenten Arteriolen am Eingang zu den Nierenglomeruli liegen (BARAJAS, 1979; TAUGNER et al., 1984). Renin wird aus den Vorstufen - Preprorenin und Prorenin - gebildet. In sekretorischen Vesikeln vollzieht sich die proteolytische Umwandlung von den Vorstufen in das enzymatisch aktive Renin. Dieses wird in den Vesikeln gespeichert und durch regulierte Exozytose bei Bedarf ins Blut sezerniert. Die Sekretion von Renin basiert auf unterschiedlichen

Stimulationsmechanismen. Dabei ist der stärkste Stimulus für die Reninfreisetzung ein Abfall des arteriellen Blutdrucks (FINKE et al., 1983). Weiterhin führt eine Verringerung der Na^+ - Konzentration im proximalen Teil des distalen Tubulus, auch Macula densa genannt, zu einer Stimulation der Reninfreisetzung. Eine gesteigerte Sympathikusaktivität führt über β_1 adrenerge Rezeptoren, die in Zellen des juxtaglomerulären Apparats lokalisiert sind, zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der cAMP-Konzentration die Reninsekretion *in vivo* und *in vitro* stimulieren kann (HACKENTHAL et al., 1990; KURTZ u. WAGNER, 1999). Die Reninsekretion unterliegt außerdem der Kontrolle lokaler Faktoren, zu denen u.a. Angiotensin, Prostaglandine, Stickstoffmonoxid, Endothelin und Steroidhormone zählen (TAUGNER et al., 1984; WAGNER et al., 1998). Auf zellulärer Ebene wird die Signalweiterleitung der Stimuli für die Reninsekretion durch second messenger wie cAMP, Ca^{2+} und Proteinkinase C und cGMP vermittelt (FRIIS et al., 2002; SCHWEDA u. KURTZ, 2003).

Für Renin ist derzeit nur ein einziges Substrat, das Glycoprotein Angiotensinogen, bekannt, welches hauptsächlich in der Leber gebildet wird. Renin spaltet im Plasma von dem Angiotensinogenmolekül das Dekapeptid Angiotensin I ab, welches durch das auf der Endotheloberfläche vorkommende Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) sehr schnell um zwei Aminosäuren zum biologisch aktiven Oktapeptid Angiotensin II verkürzt wird. Aufgrund ihrer hohen ACE-Aktivität spielen bei dieser Umwandlung die Lunge und die Niere eine wichtige Rolle.

Angiotensin II ist der Haupteffektor dieses systemischen Regelsystems. Infolge eines Druckabfalls erhöhte Angiotensin II Plasmakonzentrationen bewirken eine Vasokonstriktion und eine Erhöhung der Sympathikusaktivität (KOEPPEN u. STANTON, 2001). Über eine erhöhte Freisetzung von Aldosteron wird die Natriumrückresorption stimuliert. Durch zentrale Beeinflussung erfolgt weiterhin eine Steigerung des Durstgefühls und des Salzappetits. Derzeit sind 3 Rezeptorsubtypen, AT_1 , AT_2 und AT_4 bekannt, an die Angiotensin II bindet (DUPREZ, 2006). Die Wirkungen von Angiotensin II werden im wesentlichen über die G-Protein-gekoppelten Angiotensin II-Typ 1-Rezeptoren (AT_1 -Rezeptoren) und Angiotensin II-Typ 2-Rezeptoren (AT_2 -Rezeptoren) vermittelt. Bei Nagetieren sind zwei zu 94 % identische Subtypen des AT_1 -Rezeptors, AT_{1a} und AT_{1b} -Rezeptor, identifiziert worden (ELTON et al., 1992; IWAI et al., 1992). Die beiden Subtypen weisen ähnliche Rezeptorliganden und Transduktionswege auf. Dagegen unterscheiden sie sich in der Gewebsverteilung und in der transkriptionalen Regulation. In der adulten Maus konnten AT_{1a} –

Rezeptoren in Niere, Leber, Lunge, Herz, Gehirn, Nebenniere, Ovar, Hoden, Fettgewebe und in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (BURSON et al., 1994). Der AT_{1a} -Rezeptor ist unter anderem involviert in der peripheren Vasokonstriktion, der renalen Salz- und Wasserresorption und an der zentralen Blutdruckregulation. Der AT_{1b} -Rezeptor konnte im Gehirn, Nebennieren, Hoden, sowie in mesangialen und juxtaglomerulären Zellen identifiziert werden. Eine Beteiligung des Rezeptors an der Regulation der Aldosteronsekretion in den Nebennieren konnte nachgewiesen werden (KASCHINA u. UNGER, 2003). Die AT_2 -Rezeptoren werden in den verschiedensten fetalen Geweben exprimiert, während die Expression in der frühen postnatalen Phase stark abnimmt oder in einigen Geweben gar nicht mehr nachzuweisen ist (DE GASPARO et al., 2000). Im adulten Gewebe ist die Expression weiterhin im Gehirn, Uterus und in den Nebennieren vorhanden. Funktionell ist der Rezeptor wichtig für die fetale Entwicklung, die Zelldifferenzierung, die Regeneration von Gewebe und die Blutdruckregulation. Zudem konnten den AT_2 -Rezeptoren eine Beteiligung an antiproliferativen und apoptotischen Prozessen zugesprochen werden (CAREY et al., 2000). Zu den Effekten der AT_4 -Rezeptoren sind im Gegensatz zu den beiden vorherig beschriebenen wenig bekannt. Der Rezeptor wird in den verschiedensten Geweben exprimiert. Bisher wurde ihm eine Beteiligung an der Kognition (CHAI et al., 2004) und an der kardiovaskulären Regulation zugesprochen (KERINS et al., 1995; WATANABE et al., 2005).

Neben diesem zirkulierenden RAAS findet man bis auf Renin alle Komponenten des RAAS auch im Gewebe verschiedener Organe einschließlich Gehirn, Herz, Gefäße, Niere, Nebenniere und Fettgewebe (PHILLIPS et al., 1993). Sowohl die physiologische Funktion, als auch die gewebespezifische Kontrolle des lokalen RAAS ist unzureichend bekannt. Die Annahme, dass dieser lokale Mechanismus eine pathogenetische Bedeutung bei der Entwicklung bestimmter Hypertonieformen und Nephropathien besitzt sowie an den Hypertonie-assoziierten Endorganschäden beteiligt ist, konnte in verschiedenen Untersuchungen bestätigt werden (PINTO et al., 1997; LUFT et al., 1999; PARK et al., 2003).

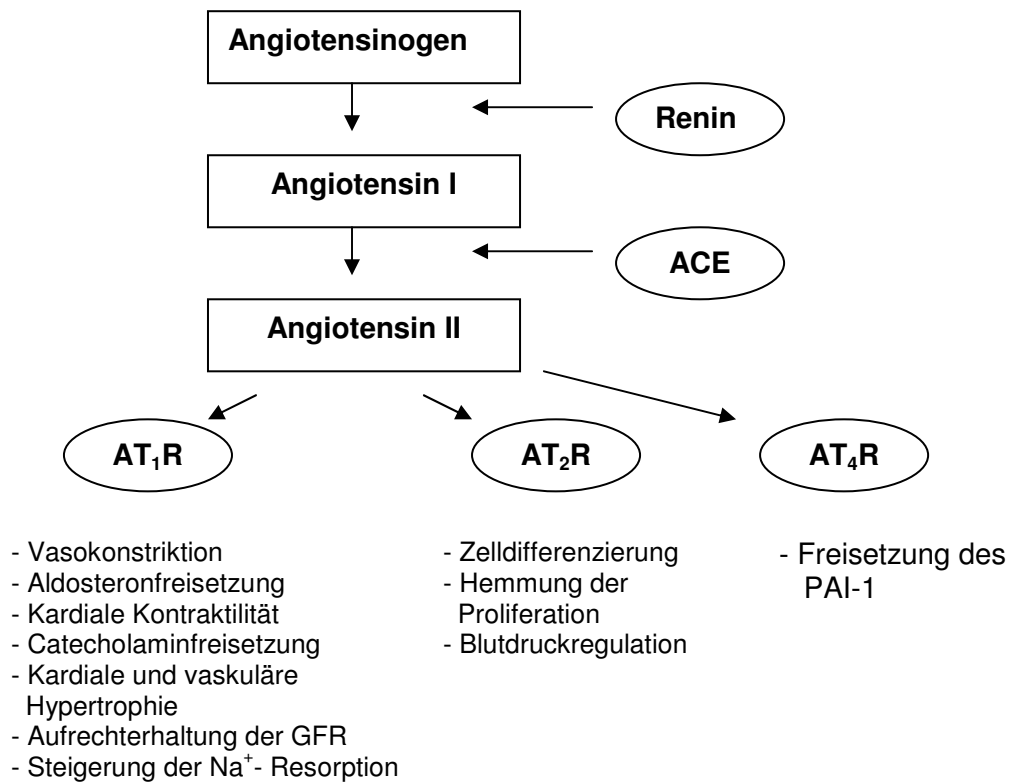


Abbildung 3: Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS). ACE: Angiotensin-Converting-Enzym; AT₁R: Angiotensin-Rezeptor Typ I; AT₂R: Angiotensin-Rezeptor Typ II; AT₄R: Angiotensin-Rezeptor Typ IV; GFR: glomeruläre Filtrationsrate; PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1.

2.3.1.1 Aldosteron

Vor mehr als 50 Jahren isolierten und charakterisierten Sylvia und Jim Taits in Zusammenarbeit mit Tadeusz Reichstein das Hormon Aldosteron (SIMPSON et al., 1953a; Tait et al., 2004). Es ist bekannt für seine essentielle Bedeutung für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts.

Aldosteron ist ein Steroidhormon, welches aufgrund seiner speziellen Wirkung auf den Elektrolythaushalt auch als Mineralokortikoid bezeichnet wird. Die Biosynthese dieses lipophilen Moleküls erfolgt in der Nebenniere über Zwischenprodukte aus dem Ausgangssubstrat Cholesterin. Über die Substrate Pregnenolon und Progesteron entsteht 11-Desoxycorticosteron, aus welchem sowohl Corticosteron als auch Aldosteron gebildet werden kann (VOET u. VOET, 2002). Zwei Enzyme, die unterschiedlich in der Nebenniere lokalisiert sind, vollziehen die Umwandlung in

Corticosteron bzw. Aldosteron. Die 11 β -Hydroxylase CYP11B1, die in Zellen der Zona fasciculata exprimiert wird, katalysiert die Bildung der Glucokortikoide Corticosteron und Cortisol. Die Aldosteronsynthase CYP11B2 kommt ausschließlich in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde vor und ist verantwortlich für die letzten Aldosteronsyntheseschritte (MULLER, 1998).

Die Biosynthese von Aldosteron unterliegt der Kontrolle eines multifaktoriellen Systems, welches für die Anpassung der Plasmaaldosteronkonzentration an akute und chronische Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushalts sorgt. Angiotensin II, die extrazelluläre Kaliumkonzentration und ACTH stellen die wichtigsten Regulatoren der Aldosteronproduktion- und -sekretion dar (MULLER, 1998; QUINN u. WILLIAMS, 1988). Das im Hypophysenvorderlappen synthetisierte Peptidhormon ACTH, welches als wichtiger Regulator der Glucocortikoidproduktion bekannt ist, stimuliert akut die Aldosteronproduktion (COZZA et al., 1990; COOKE, 1999). Chronisch infundiert konnte sowohl in humanen als auch in Tiermodellen gezeigt werden, dass ACTH die Aldosteronproduktion inhibiert (FUCHS-HAMMOSER et al., 1980; HOLLAND u. CARR 1993; AGUILERA et al., 1990). Es besteht kein Zweifel daran, dass ACTH in der Regulation der Aldosteronproduktion involviert ist. So schwankt zum Beispiel die Aldosteronsekretion tagesabhängig mit höheren Konzentrationen morgens und niedrigeren abends, was im Einklang mit Veränderungen im ACTH-Spiegel steht (RICHARDS et al., 1986). Die Erkenntnis, dass Pro-Opiomelanocortin (POMC) – Knockout Mäuse eine anomale adrenocorticale Morphologie und reduzierte Aldosteronkonzentrationen aufwiesen, bestätigte die Hypothese, dass ACTH für eine normale Aldosteronsekretion essentiell ist (COLL et al., 2004).

Auf zellulärer Ebene erfüllen die drei Hauptregulatoren ihre Funktion über verschiedene Signalkaskaden. Die Stimulierung der Aldosteronsekretion mittels Angiotensin II wird unter anderem über den Phosphatidylinositolmechanismus vermittelt, die ACTH-Wirkung über cAMP (SPÄT, 1988; SPÄT et al., 1991). Erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen führen zur Öffnung spannungsabhängiger L- und T – Typ Ca²⁺ Kanäle. Diese führen zusammen mit nichtselektiven Kationenkanälen (LOTSHAW u. LI, 1996) und der Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Calciumspeichern (BARRETT et al., 1989) zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration, die die Aldosteronsekretion stimulieren kann (SPÄT et al., 1991; ROSSIER et al., 1996 a).

Zu den Substanzen, die außerdem die Aldosteronproduktion beeinflussen, gehören Vasopressin (GALLO-PAYET u. GUILLON, 1998), Adrenomedullin (NUSSDORFER et

al., 1997) und Prolactin (GLASOW et al., 1996). Weiterhin konnten in zahlreichen Experimenten zur Untersuchung der Aldosteronregulation den Faktoren Endothelin, Stickoxid und ANP ein modulierender Effekt auf die Aldosteronsekretion zugesprochen werden (ROSOLOWSKY u. CAMPBELL, 1990; HANKE u. CAMPBELL, 2000; ATARASHI et al., 1985). Versuche an kultivierten adrenalen Glomerulosazellen der Ratte zeigten, dass auch Veränderungen der extrazellulären Osmolalität Effekte auf die Aldosteronproduktion haben (MAKARA et al., 2000). Zudem wurde herausgefunden, dass auch Faktoren, „lipid-derived factors“ genannt, die aus dem Fettgewebe sezerniert werden, die Aldosteronsynthese akut stimulieren können (GOODFRIEND et al., 1998).

Auf klassischem Wege bindet Aldosteron an spezifische Mineralokortikoidrezeptoren, die im Zytosol der Zielepithelzellen lokalisiert sind. Der gebildete Steroid-Rezeptor-Komplex translociert in den Zellkern und moduliert dort die Expression und Translation von spezifischen „Aldosteron-induzierten Proteinen“, die dann durch Beeinflussung entsprechender Kanäle die Flüssigkeits- und Elektrolytbalance aufrechterhalten. Die wichtigste systemische Funktion des Aldosterons besteht in der Steigerung des transepithelialen Ionentransports vor allem in der Niere, jedoch auch im Kolon, den Speicheldrüsen und den Schweißdrüsen. Dadurch bedingt ist eine Veränderung der Ionenkonzentration im Plasma, im extrazellulären Flüssigkeitsvolumen und im Blutdruck (PEARCE et al., 2003). So wird zum Beispiel im distalen Nephron der Niere durch Aktivierung des Amilorid-sensitiven Epithelialen Natriumkanals „ENaC“ (KAMYNINA u. STAUB, 2002; ROSSIER et al., 2002), der Ouabain-sensitive Na⁺/ K⁺-ATPase (VERRY et al., 2003), des Thiazid-sensitiven Na⁺/ Cl⁻ - Cotransporter (KIM et al., 1998; VERRY et al., 2003) und des Cl⁻/HCO₃⁻/ OH⁻ - Austauschers „Pendrin“ (VERLANDER et al., 2003; WALL, 2006; WAGNER, 2007) aldosteronabhängig die Na⁺-Reabsorption und die K⁺-Sekretion reguliert.

Durch zahlreiche Untersuchungen konnten darüber hinaus Mineralokortikoidrezeptoren auf nicht-epithelialen Geweben, einschließlich kardiovaskulärem System und ZNS identifiziert werden (DE KLOET et al., 1987; GOMEZ-SANCHEZ, 1997). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Effekten auf den Elektrolythaushalt in epithelialen Geweben soll Aldosteron im kardiovaskulären System pathologische Prozesse, wie Herzhypertrophie, Fibrosen und anomale vaskuläre Endothelfunktionen begünstigen (BRILLA et al., 1992; ROBERT et al., 1994). Im ZNS scheint Aldosteron in homöostatischen Mechanismen, einschließlich Blutdruckregulation, Durstverhalten,

Salzappetit und Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse involviert zu sein.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Aldosteron unabhängig von dem beschriebenen klassischen Wirkungsweg auch über einen schnellen nicht-genomischen Mechanismus wirken kann. Diese innerhalb von wenigen Minuten beobachteten Effekte sind unabhängig von Gentranskription und Translation und wurden vornehmlich in nicht-epithelialen Geweben aber auch in epithelialen Geweben gefunden (WEHLING 1997; FALKENSTEIN et al., 2000; Losel et al., 2004). Die Effekte wurden bisher nur *in vitro* beobachtet und die physiologische Relevanz ist nicht geklärt.

2.4 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die pathophysiologischen Mechanismen der hypotensiven Dysregulation bei FGF-2 defizienten Mäusen aufzuklären.

Aufgrund vorheriger Untersuchungen an FGF-2 defizienten Mäusen wurde die Hypothese entwickelt, dass die Hypotension und die eingeschränkte reflektorische Blutdruckregulation die Folge einer Dysfunktion präganglionärer intermediolateraler Neurone im Rückenmark darstellt. Ein erniedrigter sympathoadrenerger Tonus könnte folglich für den kardiovaskulären Phänotyp bei FGF-2 defizienten Mäusen verantwortlich sein.

Vor diesem Hintergrund soll geklärt werden, ob das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, welches unter anderem unter der Kontrolle des vegetativen Nervensystems steht, in den FGF-2 defizienten Mäusen beeinträchtigt ist. Weiterhin sollen die geplanten Experimente mit Hilfe des telemetrischen Messverfahrens Aufschluss darüber geben, ob die chronische Defizienz von FGF-2 zu einer Beeinträchtigung der beim Stress aktivierten Sympatho-Adrenomedullären-Achse führt. Schließlich soll untersucht werden, ob der Tag-Nacht-Rhythmus, der sich als ein sensitiver Marker für Störungen der Kreislaufhomöostase erwiesen hat, bei den FGF-2 defizienten Mäusen gestört ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese

Loading-Buffer

Glycerol	50 %
Bromphenolblau, gesättigt	1 %
Xylenecyanol (10 %)	1 %
50 x TAE	2 %
H ₂ O, steril	ad 100 ml

TAE (50x)

Tris	242 g
Eisessig	57,1 g
EDTA (0,5 M), pH 8,0	100 ml
H ₂ O, destilliert	ad 1000 ml

TBE (0,5x)

Tris	242 g
Borsäure	27,5 g
EDTA (0,5 M), pH 8	20 ml
H ₂ O, destilliert	ad 1000 ml
	1:10 verdünnt

3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Sämtliche Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Invitrogen, Serva, Calbiochem, Braun und Merck in p.a. oder reinst-Qualität bezogen. Die Nukleinsäuren und Nukleotidtriphosphate wurden bei den Firmen Invitrogen, Pharmacia Biotech und MWG Biotech erworben.

3.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden zwei verschiedene Mausmodelle benutzt. Das erste Mausmodell bestand aus C57BL/6J x 129/Sv Mäusen mit genetischer Inaktivierung des FGF-2 Proteins (Knockout Mäuse: FGF-2 $-/-$). Als Kontrolle dienten männliche C57BL/6J x 129/Sv Mäuse (Wildtyp Mäuse: FGF-2 $+/+$). Das zweite Modell bestand aus FGF-2 Wildtyp und Knockout Mäusen, bei denen ein Hühner FGF-2 (cFGF-2) Transgen unter der Kontrolle des Wnt-1 Promotors im zentralen Nervensystem während der embryonalen Entwicklung zwischen Tag 9.5 und 14.5 exprimiert wurde. Dabei wurden alle drei Isoformen (18.5, 20 und 21.5 kDa) des Proteins exprimiert. Die Knockout Mäuse, die folglich nur das cFGF-2 Transgen exprimierten, wurden als FGF-2 $-/-$ TgC bezeichnet, während die Kontrolltiere, die sowohl das physiologische FGF-2 Gen, als auch das cFGF-2 exprimierten, als FGF-2 $+/+$ TgC benannt wurden.

Die Versuchstiere wurden in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Fa. Techniplast) des Types II long (365 x 207 x 140 mm) auf staubfreiem Weichholzgranulat und bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (Licht: 7.00-19.00 Uhr) gehalten. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 2^\circ\text{C}$, und die relative Luftfeuchtigkeit belief sich auf $60 \pm 5\%$. Zur Beschäftigung der Tiere wurden die Käfige zusätzlich mit Zellstoffblättern und Häusern aus Kunststoff (Fa. Techniplast) ausgestattet.

Die Ernährung der Tiere erfolgte mit standardisierten, pelletierten Trockenfutter (Ssniff R/M-H, extrudiert) und Leitungswasser ad libitum. Das Futter bestand aus 22,7 % Rohprotein, 4 % Rohfett, 5,6 % Rohfaser und 7,6 % Rohasche (Angaben in % des Trockengewichts). Die Tiere wurden auf das Freisein von Erregern entsprechend der Liste GV-SOLAS 2006 kontrolliert.

Die Mäuse wurden mindestens eine Woche vor Beginn der Versuche aus der Tierhaltung in das Institut für vegetative Physiologie und Pathophysiologie transportiert. Damit wurde eine vollständige Erholung von dem Transport und eine Eingewöhnung an die neue Umgebung ermöglicht. Auf diese Weise sollte eine stressbedingte Beeinflussung der Messergebnisse ausgeschlossen werden. Die Haltung und Fütterung der Versuchstiere erfolgte wie vorher beschrieben.

Die Behörde für Wissenschaft und Gesundheit in Hamburg erteilte die Tierversuchsgenehmigungen mit den Aktenzeichen 03/05 und 14/07.

3.2.1 Versuchsserien und Stichprobenumfang

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf den in der folgenden Tabelle dargestellten Versuchsserien.

Tabelle 2: Übersicht über die Versuchsserien mit durchgeführten Bestimmungen

Chronische Katheter	
Versuchsserie 1	Basisuntersuchungen (FGF-2 WT und KO) <ul style="list-style-type: none">- hämodynamische / morphometrische Untersuchungen- Bestimmung der Plasmaaldosteronkonzentration- Bestimmung der renalen mRNA-Konzentration von Renin
Versuchsserie 2	Transgen-Modell (FGF-2 WT TgC und KO TgC) <ul style="list-style-type: none">- hämodynamische / morphometrische Untersuchungen- Bestimmung der Plasmaaldosteronkonzentration
Versuchsserie 3	Elektrolyt- und Kreatininbestimmung (FGF-2 WT und KO)
Telemetrie	
Versuchsserie 4	Basisuntersuchungen (FGF-2 WT und KO) <ul style="list-style-type: none">- hämodynamische Untersuchungen<ul style="list-style-type: none">- Tagesmittelwerte- Zirkadianer Rhythmus- Stresstest

Für die Untersuchungen der Versuchsserien 1-2 wurden pro Serie und Genotyp 13 Tiere benötigt. Ergebnisse in der Literatur haben eine mittlere interindividuelle Variabilität des Blutdrucks mit einem Variationskoeffizient von ~ 5-8 % bei wachen Mäusen aufgezeigt (Plüger et al., 2000). Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass aus nicht vermeidbaren methodischen Gründen (Operationskomplifikationen, Katheterverschluss) etwa 10-20 % der operierten Tiere nicht mit in den Versuch aufgenommen werden können. Die eingeplante Anzahl von Tieren ermöglicht es, bei dieser Varianz einen Blutdruckunterschied von 10 mmHg statistisch auf dem Signifikanzniveau zu identifizieren.

Für die Untersuchungen an der Versuchsserie 3 wurden pro Genotyp 8 Tiere benötigt. Bei der telemetrischen Untersuchungsmethode wurden 6 Tiere pro Genotyp eingeplant.

3.3 Methoden

3.3.1 Genotypisierung der Mäuse

Um den Genotyp der Zuchttiere bestimmen zu können, entnahmen die Tierpfleger der Versuchstierhaltung mit Hilfe einer speziellen Lochzange bei ca. 6 Wochen alten Zuchttieren eine Ohrbiopsie. Zudem wurde von den Versuchsmäusen nach Abschluss der Experimente eine Ohrbiopsie entnommen.

Nach Lysierung der Ohrprobe wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) überprüft, ob der Genlocus, der für FGF-2 codiert, bei den Tieren vorhanden war bzw. fehlte. Bei den FGF-2 transgenen Tieren wurde in der PCR zusätzlich die Expressionstärke des Transgens ermittelt.

3.3.1.1 Lysierung der Ohrprobe

Für den Verdau einer Ohrprobe wurde folgender Ansatz verwendet:

NP-40 (0,5 %)	0,5 µl
Tween® 20 (0,5 %)	0,5 µl
10x PCR RXN Puffer (-Mg ²⁺)	10 µl
Proteinase K	0,03 mg
H ₂ O, steril	ad 100 µl

Mit Hilfe eines Thermomixers (Eppendorf Gerätebau) erfolgte der Verdau auf Stufe 11 (11x100/min) bei 65° C für 2 h 50 min und wurde abgeschlossen bei 95°C für 10 min. In den Fällen, in denen die Polymerase-Kettenreaktion nicht direkt im Anschluss erfolgte, fand eine Lagerung des Lysats bei -20°C statt.

3.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Folgender Standardansatz (100 µl Gesamtvolumen) wurde für die Amplifikation von DNA durch die PCR verwendet:

FGF-2 +/-

Ohrprobenlysat	4 µl
10x PCR Puffer	10 µl

20 mM dNTPs	1 µl
Primer WT PCR 6 (20 µM)	1,5 µl
Primer WT PCR 5 (20 µM)	1 µl
Primer Neo 6	1µl
Taq Polymerase (5 Units/µl)	0,5 µl
H ₂ O	81 µl

FGF-2 Transgene

Ohrprobenlysat	2 µl
10x PCR Puffer	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Primer FGF-2 tg Direct (20 µM)	0,5 µl
Primer FGF-2 tg Reverse (20 µM)	0,5 µl
Taq Polymerase	0,05 µl
H ₂ O, steril	40,5 µl

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH bezogen und hatten folgende Sequenzen:

FGF-2 +/-

Primer	5` - CAA GTT TCT AAC TTT CTC CGC TCC TGC C -3`
Primer	5` - CAA TCT ATT GGG GTC AAG CCT ATT GGG - 3`
Primer	5` - GAT CTG GAC GAA GAG CAT CAG GGG - 3`

FGF-2 Transgene

Primer	5` - TTC AAG GAC CCC AAG CGG CTC TAC - 3`
Primer	5` - AGC GGT CAG TGC CAG TAG CAA CG - 3`

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Nach der anfänglichen Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten folgte die PCR in 40 Amplifikationszyklen mit folgenden Temperaturschritten:

30``	95°C	(Denaturierung)
30``	61°C	(Primerhybridisierung)
1`30``	72°C	(Extension)

Im Anschluß an die 40 Zyklen wurde der Amplifikationsprozess mit einer Extensionsphase, die sich über 10 Minuten erstreckte, bei 72 °C beendet. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Proben auf 4 °C. Bis zur Analyse des Produktes durch Gelelektrophorese erfolgte die Lagerung bei -20 °C. Um eventuell stattgefundene Kontaminationen zu erkennen, wurde für jeden PCR-Ansatz eine Negativkontrolle mitamplifiziert. Diese Negativkontrolle enthielt bis auf die cDNA alle für die PCR notwendigen Reagenzien.

3.3.1.3 Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in 1,2 %igen horizontalen Agaroseflachbett-Gelen in EPS 600- Kammern (Pharmacia Biotech) in 0,5x TBE mit 6 µl/100 ml Ethidiumbromid präparativ getrennt und analysiert.

Von dem Ansatz wurden 10 µl mit 1,5 µl DNA-Loading-Buffer versetzt und davon anschließend 11 µl in die Probenaschen des Agarose-Gels pipettiert.

Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 110 V innerhalb von 45 min. Um die DNA anzufärben, wurde Ethidiumbromid (Sigma) in einer Konzentration von 0,5 µl/ml in das Agarosegel einpolymerisiert. Mit Hilfe von UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (UV-Transilluminator KAISER RS 1, Biometra) wurde die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA- Amplifikate sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einer CCD-Kamera (Computar) fotografiert. Die Identifizierung der Fragmente erfolgte anhand ihrer Länge nach Anzahl von Basenpaaren. Als Größenstandard wurde eine „1 kb Plus DNA-Leiter“ (Invitrogen) verwendet.

3.3.2 Hämodynamische Untersuchungen an wachen Mäusen

3.3.2.1 Chronische Katheter

3.3.2.1.1 Katheterherstellung

Für die Herstellung des Katheterpaares mussten zuerst die Katheterspitzen aus einem Polyurethanschlauch (0,004“ O.D., 0,025“ I.D., Braintree Scientific, INC.) geformt werden. Dazu wurde mit Hilfe eines Heißluftgebläses ein ca. 6 cm langes Schlauchstück angeschmolzen. Anschließend mussten die Schlauchstücke leicht gedehnt und halbrund geformt werden. Nach der Durchtrennung des Schlauches in der Mitte entstanden zwei Spitzen, die so gekürzt werden mussten, dass das Originalende und die leicht gebogenen verjüngten Spitzen jeweils ca. 1,5 cm betragen. Für das weitere Vorgehen sollten möglichst parallel verlaufende Spitzenpaare ausgewählt werden.

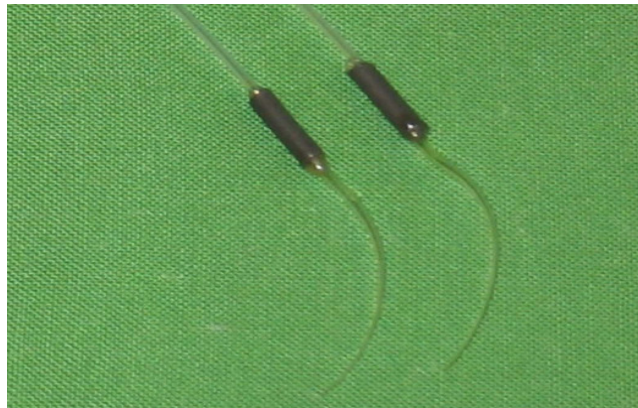


Abbildung 4: Darstellung der selbstgefertigten Katheterspitzen.

Die Spitzen wurden mittels eines ca. 8 mm langen metallenen Verbindungsstifts mit einem Polyethylen-Schlauch (1,0 mm O.D., 0,5 mm I.D., Portex) verbunden. Über den dadurch entstandenen Überlappungsbereich zwischen der Spitze und dem Polyethylenschlauch wurde mittels eines 2 Komponentenklebers (UHU plus Endfest 300) ein Heat Shrink Tubes geklebt, der die Katheter im Verbindungsbereich abdichtete. Anschließend folgte eine 12- stündige Trocknungsphase.

3.3.2.1.2 Operative Katheterimplantation

Zur Erhebung von Blutdruck- und Herzfrequenzdaten wurde den Tieren ein arterieller Katheter in die A. femoralis implantiert. Um eine größtmögliche Lagestabilität des arteriellen Katheters gewährleisten zu können und somit die Gefahr eines Abknickens des Katheters zu minimieren, erfolgte zusätzlich eine Katheterimplantation in die V. femoralis. Die Katheter wurden vor der Operation auf Durchgängigkeit geprüft. Der Katheter, der für die Arterie bestimmt war, wurde farbig markiert, um später eine Zuordnung zu ermöglichen. Anschließend wurden die Katheter luftblasenfrei mit einer Heparin-NaCl-Lösung (5000 I.E. Heparin/100 ml NaCl-Lösung) gefüllt, die die Gefahr einer Thrombenbildung in der Spitze des Katheters reduzieren sollte.

Die Narkose der Tiere erfolgte durch i.p. Gabe eines Narkosegemisches, bestehend aus 10%-igem Ketamin® (120 mg/kg KGW, Albrecht) und 2%-igem Rompun® (16 mg/kg KGW, Bayer). Als Schmerzprophylaxe wurde den Mäusen präoperativ Carprofen (5 mg/kg KGW) s.c. injiziert. Während der Operation lagen die Tiere auf einer 37°C warmen Wärmeplatte, die die Körpertemperatur konstant halten sollte.

Vor der Operation wurden der Nacken und der linke Leistenbereich der Tiere rasiert und anschließend mit Betaisadona® desinfiziert. Es folgte eine Inzision der Haut kaudal des Os occipitale. Von dort wurde die Haut subkutan bis zum linken Hinterbein mobilisiert. Danach erfolgte die Positionierung und Fixierung der Versuchstiere in Rückenlage. Die Haut im Bereich der Leiste wurde ca. 5 mm inzidiert und durch Entfernen von Fett- und subkutanen Bindegewebe der N. femoralis sowie die A. und V. femoralis proximal vom Lig. inguinale bis distal zur V. saphena medialis dargestellt. Die Verbindung der beiden Inzisionsstellen erfolgte durch einen runden, innen hohlen Metallstab. Mit Hilfe dessen konnten die Katheter von der Leiste zur Öffnung im Nacken geschoben werden. Die Katheter mussten so positioniert werden, dass der venöse Katheter ohne Kreuzung parallel zum arteriellen Katheter verlaufend, außen zu liegen kam.

Die Durchführung der weiteren Operationsvorgänge erfolgte unter stereomikroskopischer Aufsicht (LEICA MZ 75). Das Ziel der folgenden Präparation bestand in der vollständigen Trennung von Nerv, Vene und Arterie. Anschließend wurden die Gefäße proximal der V. saphena einzeln mit einem Faden (Haltezügel) abgebunden. Eine zusätzliche Unterbindung der Arterie erfolgte direkt distal des Leistenbandes, damit bei ihrer Eröffnung eine Unterbrechung des Blutflusses gesichert war. Mittels einer Irisschere wurde die Vene bzw. die Arterie in der Mitte des

dargestellten Bereiches eröffnet und die Katheterspitzen einige Millimeter unter das Leistenband hindurch vorgeschoben. Die Haltezügel sowie zwei zusätzlich weiter proximal positionierte Haltezügel ermöglichten die Fixierung der Katheter. Eine zusätzliche Stabilisierung der Katheter gelang durch Verbinden der beiden Katheter im freien Bereich der Spitzen, sowie an der Austrittsstelle im Nacken.

Als antibiotische Prophylaxe, wurde den Tieren 0,7 mg Cefazolin, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, über den venösen Katheter infundiert.

Bevor die Operationswunde mit einer Einzelknopfnah (Mersilene 5-0, Ethicon) zugenäht wurde, mussten die Katheter mit Hilfe von Metallstößeln verschlossen werden. Dabei war darauf zu achten, dass kein Blut, sondern nur Heparin-NaCl-Lösung in den Katheterspitzen verblieb, um das Risiko einer Thrombenbildung zu reduzieren. Anschließend erfolgte die Einführung der Katheterenden in eine innen hohle Metallfeder, die vor Benagung und anderen mechanischen Belastungen schützen sollte. Die Metallfeder wurde in der Nackenmuskulatur festgenäht. Anschließend folgte der Wundverschluss um die Feder mit einer Einzelknopfnah. Die Wunde wurde mit Betaisadona® desinfiziert. Um einer postoperativen Dehydratation vorzubeugen, wurde den Tieren 1 ml NaCl subkutan injiziert.

Die Katheterenden, die aus der Metallfeder herausragten, mussten mit einem Klebestreifen an der Feder befestigt werden, um eine Rotation der Katheter in der Feder zu verhindern.

Die Metallfeder wurde mit Hilfe eines Zweikanal-Swivels (TSE-System) fixiert, so dass die Tiere die Möglichkeit hatten, sich frei in ihren Einzelkäfigen zu bewegen. Postoperativ wurden die Tiere über 12 Stunden warm gehalten und während der Aufwachphase regelmäßig kontrolliert.

Die Futter- und Wasseraufnahme erfolgte ad libitum. Täglich wurde ein Protokoll über die Wasseraufnahme und das Allgemeinbefinden geführt. Befunde, die auf mittelgradige bzw. hochgradige pathologische Veränderungen hinwiesen, führten zum Ausschluss der Tiere aus der Versuchsreihe.

3.3.2.1.3 Blutdruckmessung

Die Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen erfolgten an wachen und freibeweglichen Mäusen kontinuierlich über 1-2 Stunden am 2. bzw. 3. postoperativen Tag. Dazu musste der chronisch arterielle Katheter an den Swivel angeschlossen werden. Die gemessenen Daten wurden permanent mittels eines Softwareprogramms (Labtech

Notebook®) registriert. Die anschließende Auswertung erfolgte durch das Datenverarbeitungsprogramm Igor®.

Die Aufnahme der Messungen erfolgte in einem Raum, in dem die Temperatur von $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ konstant war. Die Tiere hatten während der Messzeit uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter. Eine Voraussetzung für die Erhebung der Kreislaufparameter war die ruhige Atmosphäre im Labor, um die sensiblen Messgrößen nicht zu beeinflussen. Der zirkadiane Rhythmus der Tiere wurde berücksichtigt, indem die Messungen in einem dreistündigen Zeitfenster zwischen 16.00 und 19.00 Uhr stattfanden.

Die bei den Messungen gewonnene Blutdruckamplitude wurde mit Hilfe eines Blutdrucktransducers (Typ DPT-6100, Föhr Medical Instruments) in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dazu musste der Transducer vor der Messung luftblasenfrei mit entionisiertem Wasser gefüllt werden. Anschließend wurde er durch einen Polyethylen-Schlauch mit dem Swivel verbunden. Das Anschließen des arteriellen Katheters an die zweite Öffnung des Swivel-Kanals erfolgte über ein kurzes Verbindungsstück.

Nach Abschluss des 1. Meßtages musste der Katheter wieder mit einem Metallstöpsel verschlossen werden. Um eine Thrombosierung zu verhindern, war zu beachten, dass kein Blut in der Katheterspitze verblieb.

Die gewonnenen Daten gaben Auskunft über den mittleren arteriellen Blutdruck und die durchschnittliche Herzfrequenz der Tiere.

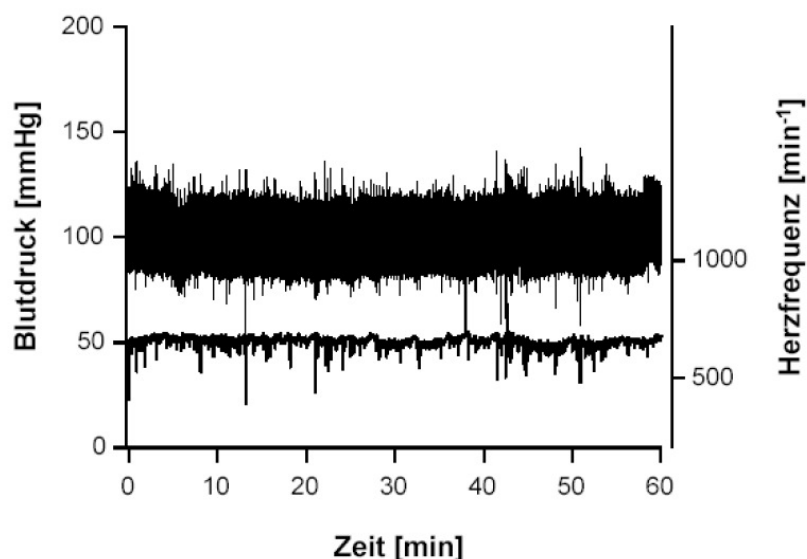


Abbildung 5: Beispiel einer Blutdruck-/Herzfrequenzmessung über einen Zeitraum von 60 Minuten. Die Messdaten stammen von einer wachen Wildtyp Maus und wurden am 3. postoperativen Tag über den arteriellen Katheter registriert.

3.3.2.2 Telemetrie

3.3.2.2.1 Maus-Blutdruck-Transmitter

Für die radiotelemetrische Blutdruckmessung wurden die Transmitter (PhysioTel® PA Implants) vom Typ TA11PA-C20 genutzt. Diese wogen 3,4 g, die Katheterlänge betrug 5 cm und der Katheterdurchschnitt maß 4 mm.

Vor Beginn einer Messung erfolgte die Aktivierung des Transmitters magnetisch. Anschließend nahm er die Parameter Blutdruck, Herzfrequenz und lokomotorische Aktivität auf und übertrug die Informationen digital über das radiotelemetrische Messverfahren auf einen Receiver. Dieser konvertierte die telemetrischen Daten in eine für den Computer lesbare Form. Die Daten wurden über eine Matrix an den Computer weitergegeben und dort mit Hilfe des Dataquest A.R.T. System gesammelt und gespeichert.

Um die Nulllinie der jeweiligen Transmitter ermitteln zu können, wurden diese vor der Implantation 24 Stunden lang gemessen. Anschließend mussten die Telemetriesender 12 Stunden vor dem Operationstermin bei Raumtemperatur in NaCl-Lösung eingelegt werden, um das Kathetermaterial zu stabilisieren.

3.3.2.2.2 Operative Implantation

Die Narkose und die Schmerzprophylaxe erfolgten wie unter 3.3.2.1.2 beschrieben.

Die Tiere wurden vom Processus angularis mandibulae bis zum Sternum rasiert. Die Fläche wurde mit Betaisadona® desinfiziert. Daraufhin erfolgte die Lagerung der Mäuse in Rückenlage, dabei wurden die Beine mit Hilfe von Klebeband fixiert. Mit Hilfe eines Fadens, der um die oberen Incisivi gelegt wurde, gelang die Streckung des Halses und die Stabilisierung des Kopfes. Während der Operation erfolgte die Lagerung der Mäuse auf einer 37°C temperierten Wärmeplatte, um eine Auskühlung zu verhindern.

In der ventralen Mittellinie wurde die Haut submandibulär beginnend bis zum Sternum (ca. 3 cm) inzisiert. Von dieser Inzisionsstelle ausgehend erfolgte die Mobilisation der Haut im linken Flankenbereich des Tieres. Dort wurde nach der Implantation des Katheters der Telemetriesender platziert.

Die weitere Präparation wurde unter stereomikroskopischer Aufsicht (LEICA MZ 75) durchgeführt.

Die Trennung der submandibulären Speicheldrüsen geschah behutsam mit Hilfe von sterilen Wattestäbchen. Die linke A. carotis communis wurde freipräpariert, ohne die parallel verlaufenden Nervenfasern zu beschädigen. Zwei Haltefäden dienten der Ligation bzw. der Retraktion des Gefäßes. Der vordere Haltefaden wurde direkt kaudal der Bifurkation der A. carotis interna und externa positioniert. Die Platzierung des hinteren Haltefadens erfolgte ca. 0,5 cm vom ersten entfernt, auf Höhe des Schlüsselbeins. An die Enden der Haltefäden wurden Klemmen befestigt, durch deren entsprechende Positionierung eine leichte Spannung des Gefäßes erzeugt werden konnte. Dabei musste der hintere Haltefaden so gespannt sein, dass bei der folgenden Katheterimplantation der Blutfluss unterbrochen wurde.

Anschließend erfolgte die Lagerung des Telemetriesenders auf einer sterilen Kompresse rechts neben den Kopf des Tieres. Der Sender wurde mit NaCl-Lösung feucht gehalten. Nachdem die Schutzhülle des Katheters vorsichtig entfernt worden war, erfolgte die Füllung der Katheterspitze mit biokompatiblen Gel. Mit Hilfe einer an der Spitze abgeknickten Kanüle (Sterican® 25 G, Braun) wurde die Arterie direkt hinter dem vorderen Haltefaden eröffnet und anschließend der Katheter mit einer Spezialpinzette implantiert.

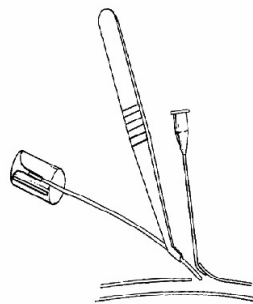


Abbildung 6: Implantation des Telemetriekatheters und Lokalisation im Gefäßbett.
Bildquelle: Data Sciences International, Minnesota, USA

Der hintere Haltefaden wurde gelockert und der Katheter soweit vorgeschoben bis die Katheterspitze ca. 2 mm in den Aortenbogen hineinreichte. Die zwei Haltefäden wurden um den Katheter bzw. das Gefäß geknotet. Eine weitere Fixierung des Katheters erfolgte durch einen dritten Haltefaden, der in der Mitte des dargestellten Bereiches positioniert wurde. Die Knoten wurden anschließend mit Gewebekleber (Histoacryl®) gefestigt. Anschließend erfolgte die Platzierung des Telemetriesenders im linken Flankenbereich des Tieres, wobei darauf zu achten war, dass der Sender möglichst nahe am linken Hinterbein zu liegen kam. Der Sender wurde mittels Gewebekleber (Histoacryl®), der zwischen Sender und subkutanen Gewebe platziert wurde, in seiner Lage stabilisiert.

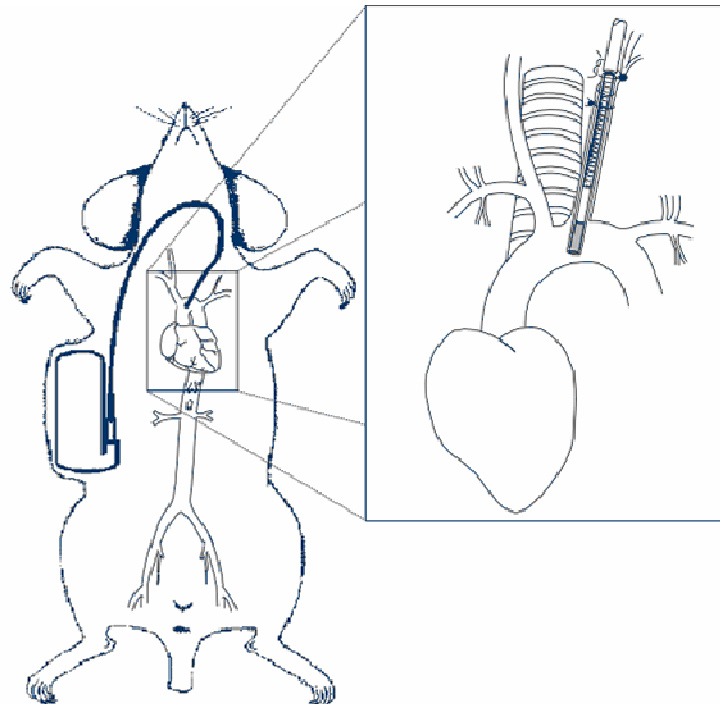


Abbildung 7: Lokalisation des Telemetriesenders in der Maus. Bildquelle: Data Sciences International, Minnesota, USA

Die Speicheldrüsen wurden reponiert und die Wunde mit einer Einzelknopfnah (Mersilene 5-0, Ethicon) verschlossen. Abschließend erfolgte die Desinfektion der Wunde mit Betaisadona®.

Um die postoperative Hydratation zu sichern, bekamen die Tiere 1 ml NaCl subkutan gespritzt. Die Tiere wurden in ihre Käfige zurückgesetzt und über einen 24-stündigen

Zeitraum warm gehalten. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. In den folgenden Tagen musste das Verhalten der Tiere aufmerksam beobachtet werden, um Hinweise auf eventuelle Schmerzpräsenz zu bekommen. Die Tiere wurden bei mittelgradigen bzw. hochgradigen Störungen des Allgemeinbefindens euthanasiert.

3.3.2.2.3 Blutdruckmessung

Die Messungen begannen 5-7 Tage postoperativ, da nachgewiesen wurde, dass erst nach dieser Zeit der zirkadiane Rhythmus wieder ausgebildet ist. Die Tiere verblieben während der Messungen in ihren Einzelkäfigen und hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter. Die Aufnahme der Messungen erfolgte in einem bei $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperierten Raum. Der Messraum wurde ausschließlich für die telemetrischen Messungen genutzt, wodurch eine stressfreie und ruhige Atmosphäre gesichert war.

Die Übertragung der radiotelemetrischen Daten erfolgte kontinuierlich über den implantierten Telemetriesender auf einen Computer. Mit Hilfe eines Softwareprogrammes wurden die gemessenen Daten automatisch gespeichert (Dataquest A.R.T Data Aquisition, Data Sciences International, Minnesota, USA). Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Dataquest A.R.T. Data Analysis. Dabei konnten die gewünschten Zeitintervalle, in denen gemessen wurde, je nach Versuchsreihe ausgewählt werden.

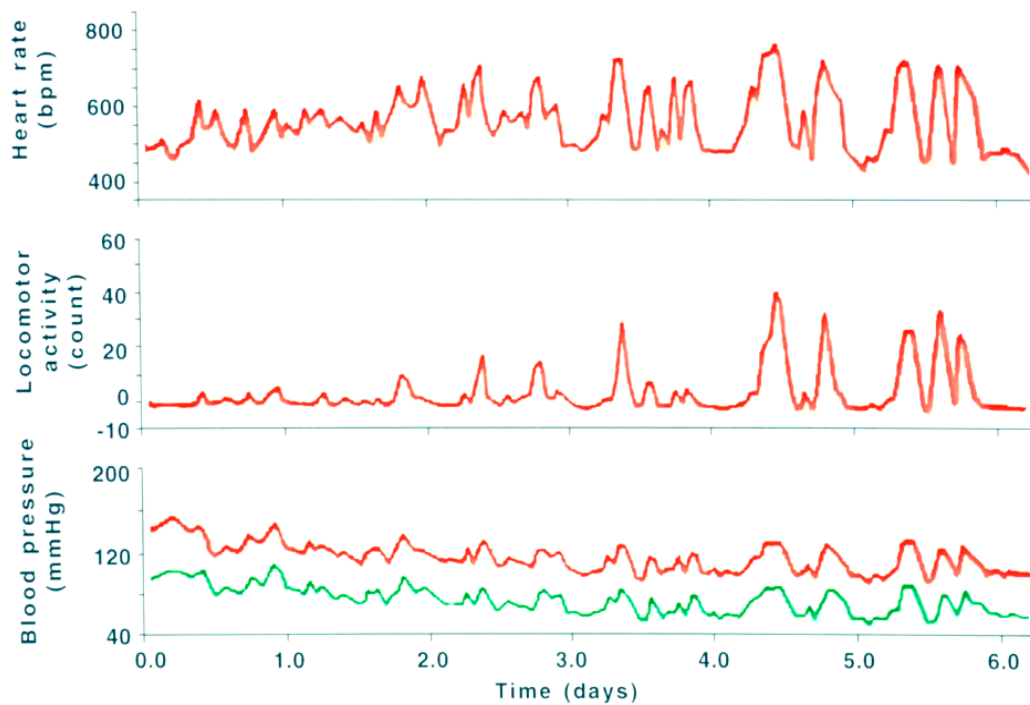


Abbildung 8: Beispiel einer Registrierung der Blutdruck-/Herzfrequenzdaten und der Aktivität. Im Bild oben ist die Herzfrequenz, in der Mitte die lokomotorische Aktivität und unten der Blutdruck dargestellt. Bildquelle: Data Sciences International, Minnesota, USA

3.3.2.2.4 Stresstest

Als Stresstest wurde der Resident-Intruder-Test ausgewählt, der darauf basiert, dass bei den Versuchstieren sozial-emotionaler Stress ausgelöst wurde. Dieser Stressinduktion liegt das natürliche Territorial- und Rangordnungsverhalten der Tiere zugrunde.

Bei diesem Test wurde eine männliche, möglichst gleichaltrige, in einer Gruppe gehaltene Maus (Intruder) für die Dauer von 5 min zu dem Versuchstier mit dem implantierten Telemetriesender (Resident) in den Käfig gesetzt. Die kardiovaskulären Reaktionen wurden mit "Resident Response" betitelt.

Vor dem Zusammensetzen der Tiere wurden die hämodynamischen Parameter für 10 Minuten registriert. Nachdem die Tiere wieder getrennt worden waren, folgte eine 45 - minütige Nachlaufzeit.

3.3.3 Bestimmung von Blutparametern

Im Anschluss an die Blutdruckmessungen wurden den Mäusen, denen ein chronischer Katheter implantiert worden war, Blutproben entnommen. Die Blutproben dienten der Bestimmung der Aldosteronkonzentration im Plasma.

3.3.3.1 Blutentnahme

3.3.3.1.1 Blutentnahme für die Aldosteronbestimmung

Die Blutentnahme für die Aldosteronbestimmung fand bei allen Versuchstieren zwischen 17.00 und 19.00 Uhr statt. Die Blutentnahme musste an wachen und ungestressten Tieren erfolgen, um eine abnahmebedingte Erhöhung der Blutparameter verhindern zu können. Von den Tieren unbemerkt, wurde aus dem arteriellen Katheter spontan ohne mechanische Manipulation Vollblut gewonnen.

Für die Analyse wurden 120 µl Plasma benötigt. Ausgehend von einem durchschnittlichen Hämatokrit von ca. 40 %, wurden, um sicher das für die Bestimmung des Blutparameters benötigte Plasma gewinnen zu können, 250 µl Vollblut entnommen. Dazu wurde der Polyethylenschlauch, der die Verbindung zwischen Blutdrucktransducer und Swivel herstellte, so bemessen, dass er 300 µl fasste. Vom Swivel ausgehend erfolgte die Markierung des Verbindungsschlauches bei 250 µl.

An die Blutdruckmessungen anschließend, wurde der Verbindungsschlauch kurz vor dem Transducer durchtrennt. Aufgrund des arteriellen Blutdrucks floss das Blut aus dem arteriellen Katheter in den Polyethylenschlauch. Sobald die gewünschte Markierung erreicht war, wurde der Blutfluss durch Abklemmen des Katheters gestoppt. Das gewonnene Blut wurde aus dem Verbindungsschlauch in einen 500 µl Tube (Fa. Eppendorf), der mit 5 µl 0,3 M Na₄-EDTA gefüllt war, überführt.

Die Blutproben wurden bei 20°C bei 4200 Umdrehungen für 10 min zentrifugiert. Die Plasmaproben wurden bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3.1.2 Blutentnahme für die Elektrolyt-/ Kreatininbestimmung

Für die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium, Chlorid und Kreatinin wurden 250 µl Plasma benötigt. Für die Blutentnahme wurden Katheter benutzt, deren Herstellung in 3.3.2.1.1 beschrieben wurde. Die Tiere wurden auf die gleiche Weise wie in 3.3.2.1.2 beschrieben narkotisiert. Vor der OP wurde der linke Leistenbereich der Tiere rasiert. Die Tiere lagen während der OP auf einer 37°C temperierten Wärmeplatte. Die Haut im Bereich der Leiste wurde ca. 5 mm inzidiert und durch Entfernen von Fett- und subkutanen Bindegewebe der N. femoralis sowie die A. und V. femoralis proximal vom Lig. inguinale bis distal zur V. saphena medialis dargestellt. Anschließend wurde die A. femoralis proximal der V. saphena mit einem Faden (Haltezügel) abgebunden. Eine zusätzliche Unterbindung erfolgte distal des Leistenbandes. Dadurch war bei der Eröffnung der Arterie eine Unterbrechung des Blutflusses gesichert. Anschließend wurde die Arterie eröffnet und der Katheter implantiert. Das gewonnene Blut wurde in einem Lithium-Heparin präparierten Gefäß (15 I.E. Heparin/ml Blut, Firma Sarstedt) aufgefangen. Unmittelbar nach der Gewinnung erfolgte die Zentrifugation (4200 x g / 10 min) des Blutes bei Raumtemperatur (20°C). Das gewonnene Plasma wurde bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren

3.3.3.2 Analyse

3.3.3.2.1 Aldosteron

Die molekularbiologische Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Blank in unserer Abteilung durchgeführt.

Die Bestimmung des Hormons Aldosteron erfolgte mit Hilfe von Radioimmunoassays (RIAs) nach dem Coat-a-count-Verfahren. Bei diesem Verfahren sind Kunststoffröhrchen mit einem Aldosteronantikörper beschichtet und radioaktives ¹²⁵J-markiertes Aldosteron konkurriert mit dem Aldosteron in der zu analysierenden Probe um die Bindung an den Antikörper. Die zu bestimmenden Aldosteronkonzentrationen wurden nach der Messung des freien oder gebundenen ¹²⁵J- Aldosteron mit Hilfe von Standardkurven errechnet.

Die Bestimmung der Aldosteronkonzentration erfolgte in den Plasmaproben der Versuchsserie 1 und 2. Für die Analyse des Aldosterons wurde der RIA-Kit der Firma

Immunotech (Beckman Coulter, USA) benutzt, für den ein Probenvolumen von 50 μ l ausreichend war.

Um für den Assay eine Standardkurve erstellen zu können, wurden verschiedene Konzentrationen von Aldosteron (10-2000 pg/ml) eingesetzt und die gebundene Aktivität des markierten Aldosterons im Verhältnis zur gebundenen Aktivität (B) einer aldosteronfreien Probe (B_0) ermittelt. Die $\text{Logit}(B/B_0)$ -Werte als Funktion des Logarithmus der Aldosteronkonzentration wurden einer Kurvenanpassung (TableCurve®, SPSS Inc., USA) unterworfen und durch eine Geradengleichung ($y=a+bx$) approximiert. Die Konzentration von Aldosteron in der jeweiligen Probe konnte dann über die Parameter „a“ und „b“ errechnet werden.

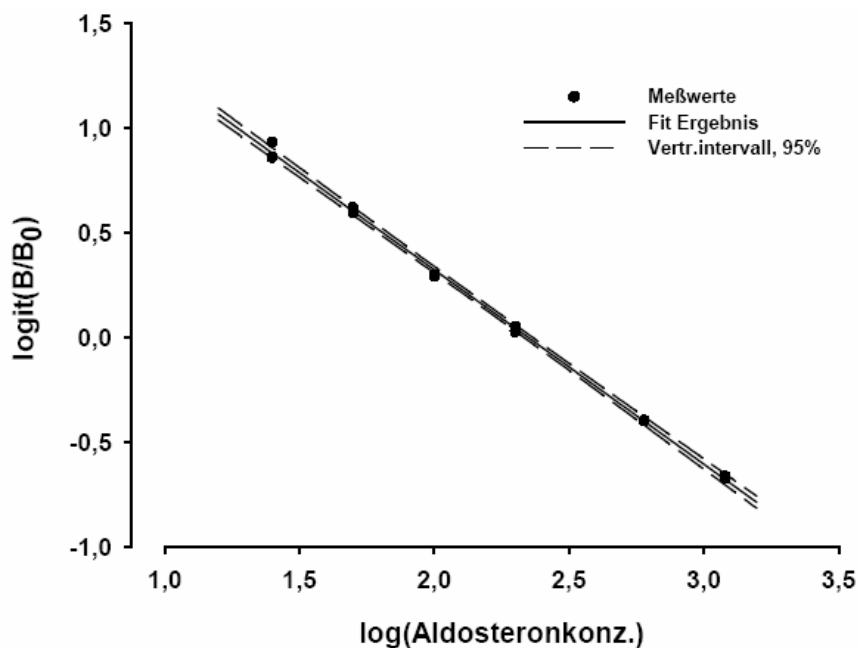


Abbildung 9: Standardkurve. Dargestellt ist eine typische Kalibrierkurve für einen ^{125}J -RIA von Aldosteron. Der $\text{logit}(\text{logit}(y)=\log(y/1-y))$ des Quotienten aus der gebundenen Aktivität des Standards zur gebundenen Aktivität einer aldosteronfreien Probe ist gegen den Logarithmus der Aldosteronkonzentration aufgetragen (als Doppelbestimmung) und kann an eine Geradengleichung ($y=a+bx$) approximiert werden ($r^2= 0,9985$); Vertr.intervall: Vertrauensintervall.

3.3.3.2 Elektrolyte und Kreatinin

Die Messung der Elektrolyt- und Kreatininkonzentration wurde mit ionensensitiven Elektroden durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit einem Roche/Hitachi Modular Analytics System bei LABOKLIN (Bad Kissingen).

3.3.4 Bestimmung der renalen mRNA von Renin

3.3.4.1 RNA-Isolierung

Die Extraktion der RNA von den bei -80°C eingefrorenen Nieren erfolgte auf folgende Weise. Die Organe wurden in einem Polypropylenzentrifugenröhrchen mit 4 ml GTC-Lösung, gemischt mit Mercaptoethanol, aufgenommen und mit einem Homogenisator vollständig vermischt. Anschließend wurden nacheinander folgende Reagenzien zugefügt:

- 400 μl (= 1/10 Volumen) Natriumacetat (2 M, pH 4,8)
- 4 ml (= 1 Volumen) saures Phenol (wassergesättigt)
- 800 μl (= 2/10 Volumen) Chloroform

Die Suspension wurde anschließend für 15 Minuten auf Eis gestellt und danach für 20 Minuten bei 4°C und 10000 g zentrifugiert. Dadurch entstanden zwei Phasen, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthielt. Diese wurde pipettiert und mit 4 ml (100%) Isopropanol versetzt. Die Fällung sollte mindestens 1 Stunde bei -20°C in Anspruch nehmen. Nach dem Fällungsprozess wurde die Probe 20 Minuten bei 4°C und 10000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Pellet, die gefällte RNA beinhaltend, in 400 μl GTC-Lösung mit Mercaptoethanol resuspendiert. Nach Zugabe von 40 μl Natriumacetat und 440 μl (1 Volumen) Ethanol (100%) wurde erneut bei -20°C für mindestens 1 Stunde gefällt. Es folgte eine Zentrifugationsphase für 20 Minuten bei 4°C und 10000 g. Anschließend wurde das Pellet mit 500 μl Ethanol (70%) gewaschen und unter den gleichen Bedingungen wie eben beschrieben zentrifugiert. Nachdem das gewonnene Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 3 – 5 Minuten getrocknet wurde, begann die Resuspension in RNase-freiem Wasser. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur Weiterverwendung bei -80°C .

Die Konzentration der isolierten RNA wurde im UV-Photometer bei 260 nm ermittelt.

3.3.4.2 Reverse Transkription (RT)

Für die RT-Reaktion wurden 0,25 μg RNA und 1 μl Oligo(dt) (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) verwendet und mit RNase-freiem Wasser auf 10 μl aufgefüllt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 65°C für 5 Minuten.

Zu jedem Ansatz wurden 12 µl der folgenden RT-Mischung gegeben:

- 4 µl dNTP (2,5 mM)
- 4 µl First Strand Buffer (5 x)
- 2,5 µl DEPC-Wasser
- 0,5 µl RNasin
- 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, wodurch eine Anpolymerisation der Desoxyribonukleotide in 5' → 3' Richtung durch die RT erfolgte. Die anschließende Erwärmung auf 94°C führte zur Denaturierung des Proteins.

Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der cDNA bei -20°C.

Um eine Standardkurve für das Haushaltsgen L32 und Renin zu erhalten, wurden unterschiedliche RNA Mengen (1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,02; 0,01 µg) in cDNA (20 µl) umgeschrieben.

3.3.4.3 Analyse der Real-time PCR

Die RT-PCR wurde mit dem Light Cycler (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Durchführung aller Experimente erfolgte mit dem QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN, Hilden) unter genauer Berücksichtigung der Herstellerhinweise. Die Proben für die Analyse enthielten 2 µl cDNA und folgende Zusätze:

- 10 µl Master Mix Qiagen
- 1 µl sens Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl antisens Primer (10 pmol/µl)
- 6 µl RNase-freies Wasser

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH bezogen und hatten folgende Sequenzen:

sens Primer:

mRenin/1: 5'-CGG GAT CCG TGC AGC CGC CTC TAC CTT GCT TGT-3'

L32-Intron/for: 5'- CGG GAT GGAGGT GCT GCT GA – 3'

antisens Primer:

mRenin/2: 5'-GGA ATT CGC AGC TCG GTG ACC TCT CCA AAG G-3'

L32-Intron/rev: 5`-GGA ATT CGC CAG CTG TGC TCT TTC – 3`

Als Negativkontrolle diente Wasser und 1,0 µl RNA ohne reverse Transkription. Um die Genauigkeit der amplifizierten PCR Produkte zu verifizieren, wurden sie zusätzlich auf Agarosegel aufgetragen.

Die Datenanalyse erfolgte mit der Light Cycler Software. Die Daten wurden ins Verhältnis gesetzt zu der L32 mRNA oder zu dem Wert der RNA in µg und als relativer mRNA Gehalt für die Auswertung festgehalten.

3.3.5 Morphometrische Untersuchungen

Nach Beendigung der Blutentnahme wurden die Versuchstiere über den venösen Katheter narkotisiert. Anschließend erfolgte die Entnahme der Herzen und Nieren.

Die Versuchstiere wurden auf dem Rücken gelagert und die Bauchhöhle eröffnet. Die Nieren wurden entnommen und die Nierenkapsel entfernt. Anschließend wurden die Organe gewogen und in Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Verarbeitung bei – 80 °C.

Anschließend erfolgten die Eröffnung des Brustkorbes und die Entnahme des Herzens. Begleitende Gefäßstrukturen und die Vorhöfe wurden entfernt und das in dem Organ noch enthaltene Blut ausgewaschen. Das gesamte Herzgewicht wurde dokumentiert. Anschließend wurde der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel freipräpariert und auch deren Einzelgewichte notiert. Die gewonnenen Proben wurden in Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C aufbewahrt.

3.3.6 Statistik

Die in dieser Arbeit aufgeführten Werte repräsentieren jeweils den arithmetischen Mittelwert ± Standardfehler (des Mittelwerts). Die Evaluation der Daten erfolgte in Abhängigkeit der zugrunde liegenden Fragestellung durch zwei unterschiedliche statistische Verfahren.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen der 4 Versuchsserien wurde mittels t-Test für ungepaarte Daten nach Student (Students` t-Test) auf ihre Signifikanz getestet.

Die gewonnenen Daten zum Zirkadianen Rhythmus wurden mittels zweiseitiger Multivarianzanalyse (two-way ANOVA, GRAPHPAD PRISM®) miteinander verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Genotypisierung

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an männlichen C57BL6/6J x 129/Sv Mäusen mit genetischer Deletion des Fibroblastenwachstumsfaktor-2 vorgenommen. Als Kontrolltiere dienten männliche C57BL6/6J x 129/Sv Mäuse. Weiterhin wurden Untersuchungen an C57BL6/6J x 129/Sv Mäusen mit genetischer Deletion des Fibroblastenwachstumsfaktor-2 vorgenommen, bei denen das Hühner FGF-2 Transgen C reexprimiert wurde. Als Kontrolltiere wurden C57BL6/6J x 129/Sv Mäuse untersucht, bei denen ebenfalls das Transgen C reexprimiert wurde.

Um sowohl die Zuchttiere als auch die Tiere, an denen die beschriebenen Experimente durchgeführt werden, sicher einem der Genotypen zuordnen zu können, wurde anhand einer Ohrbiopsie mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion nachgewiesen, ob der Genlocus, der für den Fibroblastenwachstumsfaktor-2 codiert, bei den Tieren vollständig vorhanden oder durch genetische Manipulation verändert war. Bei transgenen Tieren wurde zusätzlich getestet, ob das Transgen C vorhanden war.

Mit Hilfe der in den Methoden beschriebenen Primern konnten die Genfragmente mit unterschiedlicher Länge nachgewiesen werden. Bei Wildtyp Mäusen konnte dementsprechend ein Genfragment mit 300 Basenpaaren, bei Knockout Tieren mit 800 bp amplifiziert werden. Bei transgenen Tieren erfolgte zusätzlich der Nachweis des 500 Basenpaaren langen Genabschnittes.

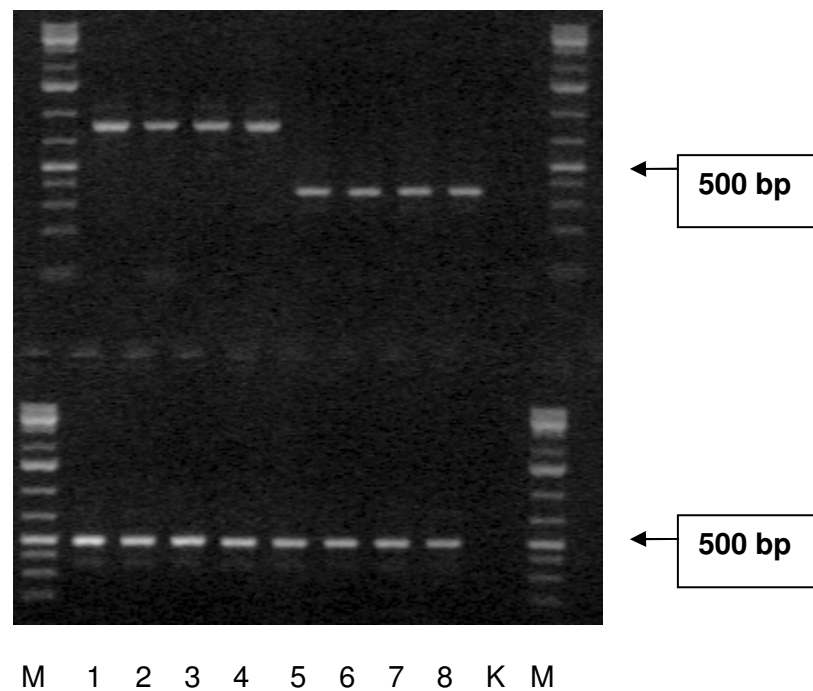


Abbildung 10: PCR Analyse von Ohrbiopsien. In der Abbildung sind die mittels PCR amplifizierten Genfragmente aus Ohrbiopsien von FGF-2 Mäusen, die das Transgen C tragen, dargestellt. In der oberen Abbildung sind die Proben 1-4 von Knockout Mäusen, deren Genfragmente bei 800 bp liegen. Die Proben 5-8 stammen von Wildtyp Mäusen, deren Genfragmente bei 300 bp liegen. Die untere Abbildung zeigt, dass die Proben 1-8 das Transgen C ausdrücken. Die Genfragmente für das Transgen liegen bei 500 bp.

4.2 Ergebnisse Chronischer Katheter

4.2.1 Versuchsserien 1 und 2

Um aussagekräftige Kreislaufparameter zu gewinnen, wurden die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse ausschließlich von Tieren gewonnen, die ein ungestörtes bis geringgradig verändertes Allgemeinbefinden aufwiesen. Zur Beurteilung des Allgemeinbefindens wurde mehrmals am Tag der Habitus der katheterisierten Tiere beurteilt und die tägliche Wasseraufnahme dokumentiert. Die Tiere aus der ersten Versuchsreihe wiesen am ersten postoperativen Tag eine normale Wasseraufnahme auf (WT: $4,0 \pm 0,7$ ml u. KO: $3,5 \pm 0,4$ ml). Die Trinkmenge blieb am 2. postoperativen Tag (WT: $4,4 \pm 0,6$ ml u. KO: $3,9 \pm 0,4$ ml) konstant. Am 3. postoperativen Tag nahm sie leicht ab (WT: $3,5 \pm 0,6$ ml u. KO: $3,1 \pm 0,3$ ml). In der ersten Versuchsreihe konnte bezüglich der Wasseraufnahme kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Die Versuchstiere aus der zweiten Versuchsreihe zeigten eine geringere Wasseraufnahme als die aus der ersten Versuchsreihe. Die Trinkmenge am 1. postoperativen Tag (WT TgC: $2,0 \pm 0,1$ ml u. KO TgC: $2,2 \pm 0,3$ ml) blieb am 2. Tag (WT TgC: $2,5 \pm 0,3$ ml u. KO TgC: $2,1 \pm 0,3$ ml) konstant. Am 3. postoperativen Tag stieg die Wasseraufnahme leicht an (WT TgC: $2,8 \pm 0,3$ ml u. KO TgC: $2,66 \pm 0,2$ ml).

4.2.1.1 Hämodynamische Daten

In der folgenden Tabelle sind die hämodynamischen Daten der Versuchsserien 1 und 2 dargestellt. Es wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen der Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt.

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardfehler der hämodynamischen Daten der Versuchsserie 1 und 2. (* P < 0,05)

Versuchsserie	n	1. Messtag		2. Messtag		
		MAD [mmHg]	Herzfrequenz [min ⁻¹]	MAD [mmHg]	Herzfrequenz [min ⁻¹]	
Serie 1	WT	8	$109,5 \pm 2,6$	$560 \pm 36,1$	$111,0 \pm 4,2$	$582 \pm 14,4$
	KO	11	$106,1 \pm 1,3$	$566 \pm 15,3$	$99,5 \pm 2,7$ *	$580 \pm 17,9$
Serie 2	WT TgC	14	$113,3 \pm 2,1$	$566 \pm 11,9$	$106,8 \pm 1,3$	$570 \pm 13,4$
	KO TgC	12	$111,6 \pm 2,3$	$568 \pm 11,5$	$104,4 \pm 1,9$	$598 \pm 21,9$

Die Daten der Basisuntersuchungen zeigten am 2. Messtag eine signifikante Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks um ca. 10 mmHg bei den FGF-2 Knockout Mäusen im Vergleich zu den FGF-2 Wildtyp Mäusen. Die Herzfrequenzen zwischen den beiden Genotypen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, dass im Rahmen der Blutdruck- und Herzfrequenzbestimmung der 2. Serie kein signifikanter Unterschied zwischen den FGF-2 Wildtyp TgC und den FGF-2 Knockout TgC Tieren festgestellt werden konnte.

Die Auswertung der Mittelwerte über beide Messtage ergab bei der ersten Versuchsreihe eine signifikante Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks (WT: $110,3 \pm 3,1$; $n=8$ und KO: $102,8 \pm 1,7$; $n=11$; $P < 0,05$; Abb. 11).

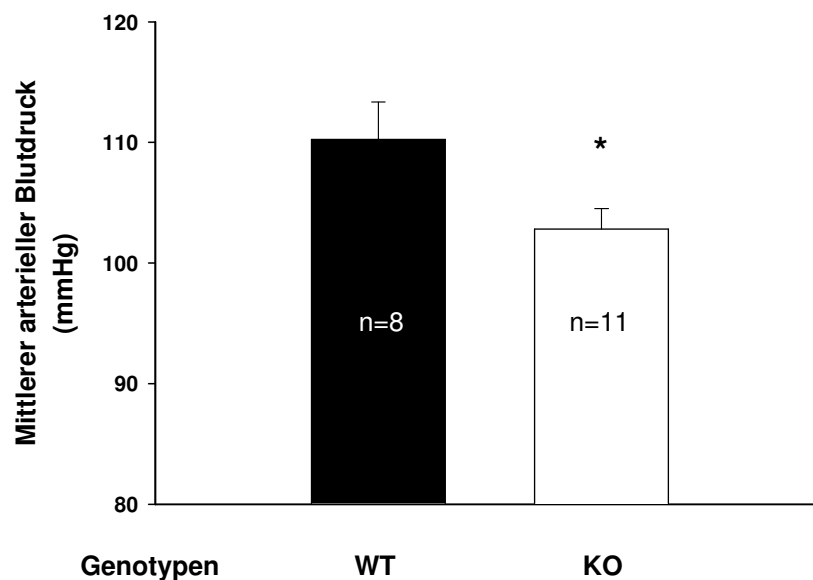


Abbildung 11: Mittlerer arterieller Blutdruck. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte von zwei Messtagen mit Standardfehlern von FGF-2 WT und FGF-2 KO Mäusen; * $P < 0,04$.

In Abbildung 12 ist die Auswertung der Mittelwerte über beide Messtage bei der Versuchsserie 2 dargestellt. Die Auswertung des mittleren arteriellen Blutdrucks ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen (WT TgC: $111,6 \pm 2,1$; $n=14$ und KO TgC: $108,0 \pm 2,0$; $n=12$; Abb. 12).

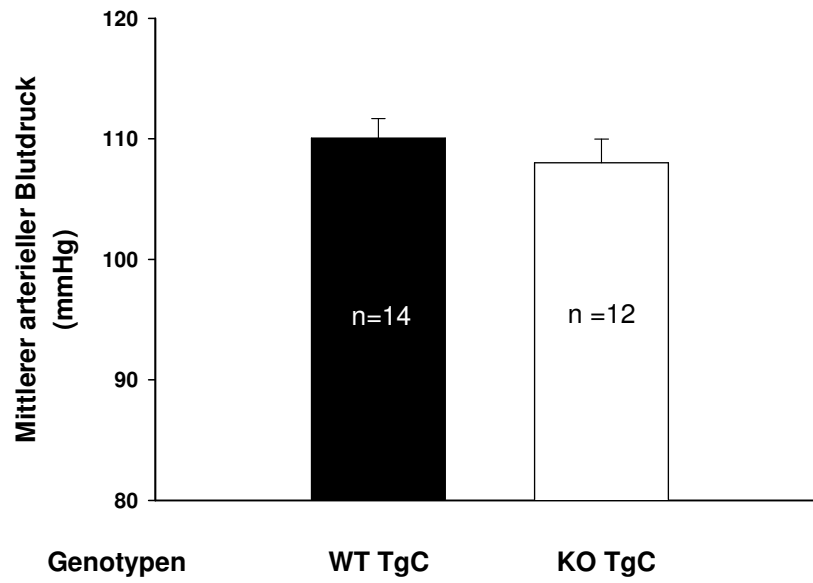


Abbildung 12: Mittlerer arterieller Blutdruck. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte von zwei Messtagen mit Standardfehlern von FGF-2 WT TgC und FGF-2 KO TgC Mäusen.

4.2.1.2 Morphometrische Daten

In der ersten und zweiten Versuchsreihe wurden das Gewicht des Herzens und das Gewicht des linken und des rechten Ventrikels bestimmt und zum Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardfehler der Herzgewichte. (*P < 0,05)

Versuchs- serie		n	HGW [mg]	li Ventrikel [mg]	re Ventrikel [mg]	HGW/KGW [mg/g]	LV/KGW [mg/g]	RV/KGW [mg/g]
Serie 1	WT	12	137,0 ± 3,4	105,0 ± 3,7	27,9 ± 1,9	5,1 ± 0,2	3,9 ± 0,1	1,0 ± 0,07
	KO	10	122,1 ± 3,7 *	91,4 ± 4,3 *	25,1 ± 1,5	4,4 ± 0,1 *	3,3 ± 0,1 *	0,9 ± 0,04
Serie 2	WT TgC	8	136,6 ± 7,1	111,9 ± 5,0	25,0 ± 2,0	4,2 ± 0,2	3,5 ± 0,2	0,8 ± 0,04
	KO TgC	9	134,0 ± 6,5	104,6 ± 5,0	27,2 ± 1,4	4,4 ± 0,2	3,4 ± 0,2	0,9 ± 0,04

Die Daten der Serie 1 zeigten eine signifikante Abnahme des Herzgewichtes und des linken Ventrikels der FGF-2 Knockout Mäuse. Unter Berücksichtigung des ähnlichen Körpergewichts der Tiere (FGF-2 WT: 32,1 ± 1,0 g vs FGF-2 KO: 32,5 ± 1,1 g) zeigte sich auch im Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht und im Verhältnis des linksventrikulären Gewichtes zum Körpergewicht eine signifikante Senkung bei den Knockout Tieren. Die Berechnung des rechtsventrikulären Gewichtes im Verhältnis zum Körpergewicht ergab dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen.

Die Herzgewichte der Serie 2 ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den FGF-2 Knockout TgC und FGF-2 Wildtyp TgC Mäusen. Auch das ermittelte Körpergewicht der beiden Genotypen war vergleichbar (FGF-2 WT TgC: 32,5 ± 2,1 g vs FGF-2 KO TgC: 28,1 ± 0,8 g). Folglich wiesen auch die errechneten Herzparameter keinen signifikanten Unterschied auf.

4.2.1.3 Plasmaaldosteronkonzentration

Die Knockout Mäuse der ersten Versuchsreihe zeigten gegenüber den Wildtyp Tieren eine signifikante Senkung der Plasmaaldosteronkonzentration (KO: $47,6 \pm 12,9$ pg/ml, $n=14$ vs WT: $129,8 \pm 21,0$ pg/ml, $n=9$; $P = 0,002$; Abb. 13).

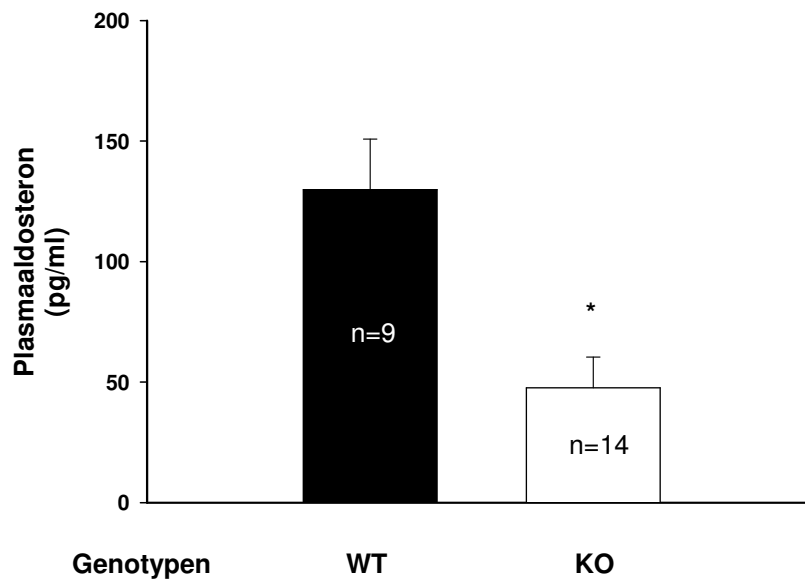


Abbildung 13: Aldosteronkonzentration im Plasma. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Aldosteronkonzentration von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) Mäusen; * $P = 0,002$.

Die Plasmaaldosteronkonzentrationen in der zweiten Versuchsreihe wiesen dagegen keine signifikanten Abweichungen zwischen den beiden Genotypen auf (WT TgC: $105,0 \pm 44,2$ pg/ml, $n=9$ vs KO TgC: $108,3 \pm 30,3$ pg/ml, $n=11$; Abb. 14).

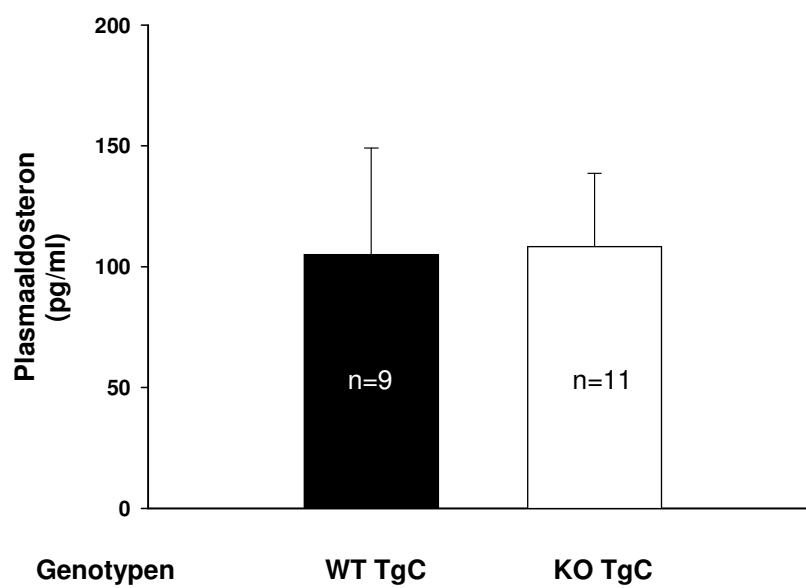


Abbildung 14: Aldosteronkonzentration im Plasma. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler der Aldosteronkonzentration von transgenen Wildtypen (WT TgC) und Knockout Mäusen (KO TgC).

4.2.1.4 Renale mRNA Konzentration von Renin

Bei den Tieren der ersten Versuchsreihe wurde weiterhin die renale mRNA Konzentration von Renin bestimmt. Die Ergebnisse zeigten ein leicht erniedrigtes Verhältnis von Renin zu L32 bei den Knockout Tieren (WT: $1,18 \pm 0,07$, $n=11$ u. KO: $1,08 \pm 0,07$, $n=11$; Abb. 15).

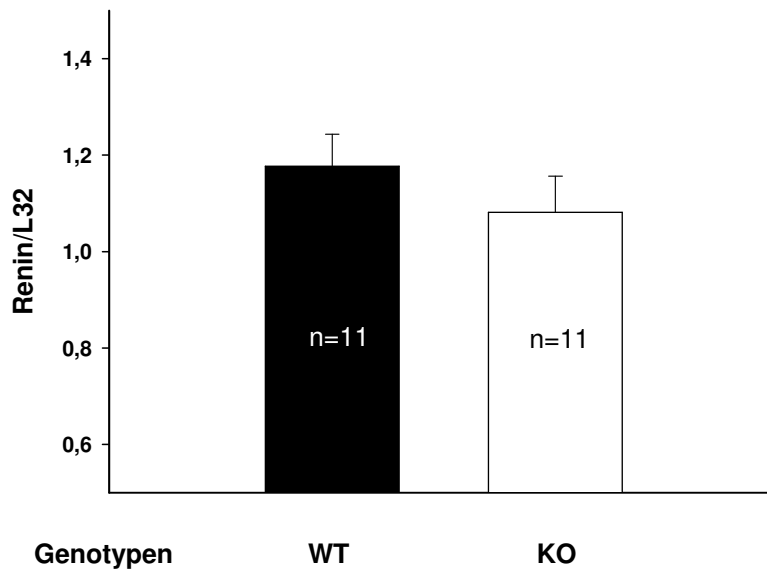


Abbildung 15: Renale mRNA Konzentration von Renin. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) Mäusen.

4.2.2 Versuchsserie 3

4.2.2.1 Elektrolyte und Kreatinin

In der folgenden Tabelle sind die Plasmakonzentrationen der untersuchten Elektrolyte und des Kreatinins der Versuchsserie 3 dargestellt.

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardfehler der Elektrolyt-/ Kreatininkonzentration im Plasma.

Genotyp	n	Natrium [mmol/l]	Kalium [mmol/l]	Chlorid [mmol/l]	Kreatinin [μmol/l]
WT	8	148 ± 0,7	5,2 ± 0,2	117 ± 0,5	8,0 ± 1,0
KO	8	150 ± 3,0	5,1 ± 0,2	119 ± 3,0	9,0 ± 3,8

Die Plasmakonzentrationen der Elektrolyte und die Plasmakonzentration von Kreatinin zeigten im t-Test keine signifikanten Abweichungen zwischen den Genotypen.

4.3 Ergebnisse Telemetrie

4.3.1 Versuchsserie 3

4.3.1.1 Tagesmittelwerte

Bei den telemetrischen Versuchstieren wurden 4 Wochen post operationem über drei Tage Messdaten aufgenommen.

Die Auswertung der Blutdruckbasisdaten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Sowohl der mittlere arterielle Blutdruck (WT: $103,9 \pm 1,0$ mmHg, n=4 u. KO $105,8 \pm 1,1$ mmHg, n=5; Abb. 16) als auch der systolische (WT: $120,0 \pm 3,8$ mmHg, n=4 u. KO $123,8 \pm 1,3$ mmHg, n=5; Abb.16) und diastolische Druck (WT: $88,9 \pm 1,2$ mmHg, n=4 u. KO $86,9 \pm 0,7$ mmHg, n=5; Abb. 16) waren bei Wildtypen und Knockout Mäusen vergleichbar.

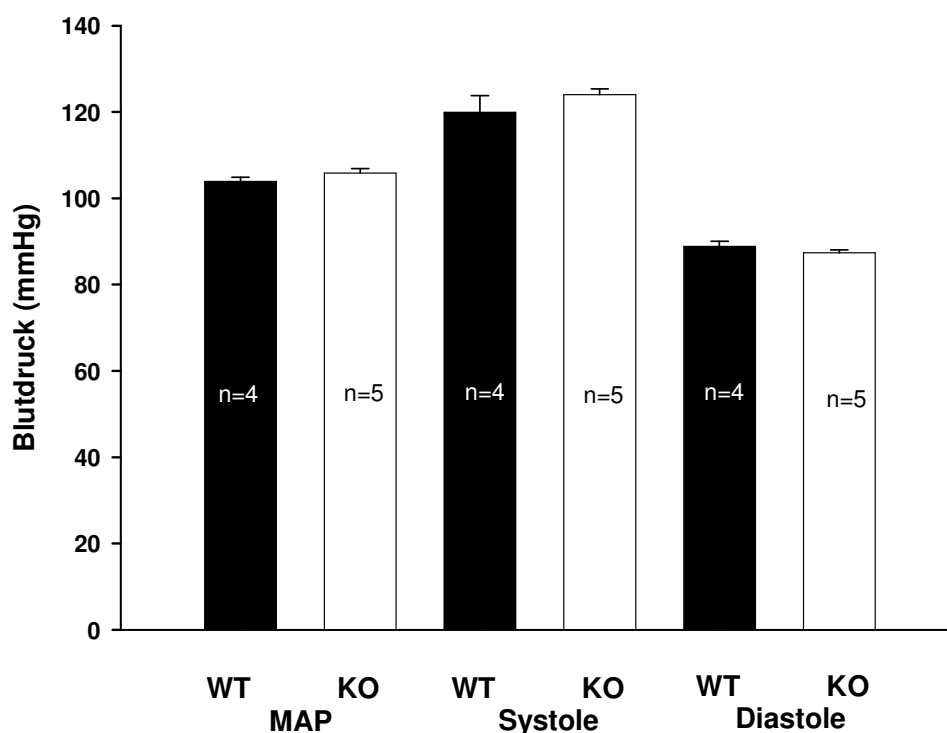


Abbildung 16: Tagesmittelwerte der Blutdruckdaten über 3 Tage registriert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern von 4 Wildtyp (WT) und 5 Knockout Mäusen (KO).

Der Vergleich der Herzfrequenzen zwischen den Wildtypen und Knockout Mäusen wies keinen Unterschied auf (WT: $518 \pm 15,6$ 1/min, $n=4$ vs KO: $515 \pm 7,8$ 1/min, $n=5$; Abb. 17 a). Auch die Aktivitätsdaten waren durch ähnliche Werte gekennzeichnet (WT: $4,4 \pm 0,41$ counts/min, $n=4$ vs KO: $4,5 \pm 0,22$ counts/min, $n=5$; Abb. 17 b).

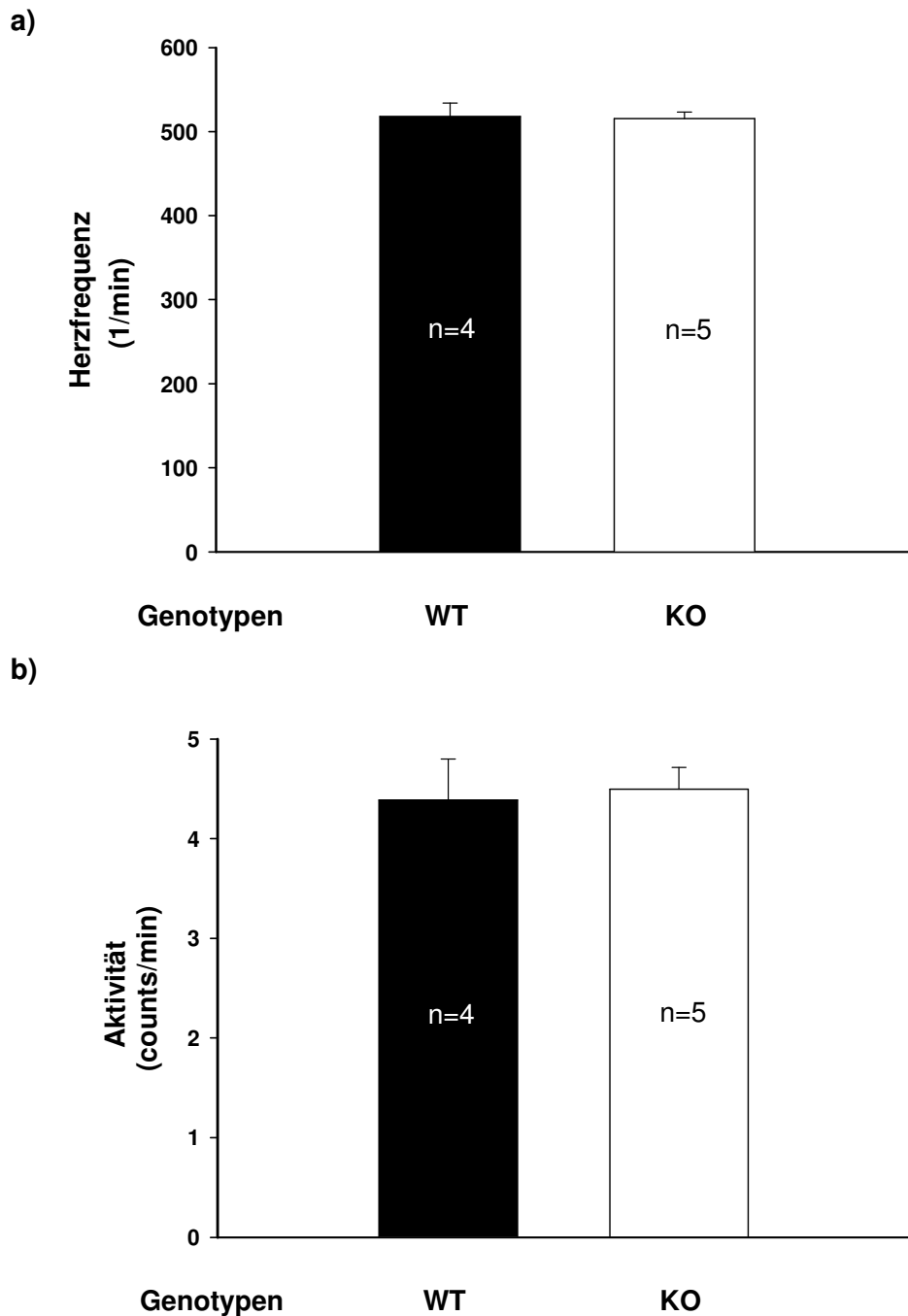


Abbildung 17: Tagesmittelwerte der Herzfrequenzmessung sowie der Aktivitätsmessung über 3 Tage. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern von 4 Wildtyp (WT) und 5 Knockout Mäusen (KO).

4.3.1.2 Zirkadianer Rhythmus

Um den Tag-/Nachtrhythmus der Tiere zu untersuchen, wurden über 24 Stunden alle 30 Minuten die Blutdruck-/Herzfrequenzdaten sowie die Aktivitätsdaten aufgenommen. Die Messung begann morgens um 7.15 Uhr.

Der Vergleich des Tag-/Nachtrhythmus der beiden Genotypen ergab weder bei den hämodynamischen Daten, noch bei den Aktivitätsdaten einen signifikanten Unterschied (Tabelle 5). Der Verlauf der zirkadianen Rhythmik bei den FGF-2 defizienten Mäusen zeigte einen signifikanten Anstieg in der Nachtphase sowohl bei den Blutdruckwerten ($P=0,0016$) als auch bei den Herzfrequenzwerten ($P=0,0035$) und den Aktivitätsdaten ($P=0,0025$). Der Vergleich des Tag-/Nachtrhythmus bei den Wildtypen ergab einen signifikanten Anstieg der Aktivitätsdaten ($P=0,0065$) nicht aber der hämodynamischen Daten in der Nachtphase.

Die durchgeführte zweiseitige Varianzanalyse zeigte, dass der Genotyp keinen Einfluss auf die Parameter besitzt, während der Tag-/Nachtrhythmus eindeutig einen Einfluss auf die gemessenen Daten ausübt.

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardfehler der hämodynamischen Daten sowie der Aktivitätsdaten über 24 Stunden.

Genotyp	n	MAP Tag [mmHg]	MAP Nacht [mmHg]	Hf Tag [min ⁻¹]	Hf Nacht [min ⁻¹]	Akt Tag [counts/min]	Akt Nacht [counts/min]
WT	4	100,6 ± 5,0	107,5 ± 5,4	502 ± 10,0	543 ± 18,9	2,1 ± 0,4	5,8 ± 0,7
KO	5	99,7 ± 1,5	110,7 ± 1,8	510 ± 10,7	580 ± 13,5	3,0 ± 0,5	7,4 ± 1,1

In Abbildung 18 ist der Verlauf der hämodynamischen Parameter beider Genotypen während des Tag-/Nachtrhythmus graphisch dargestellt.

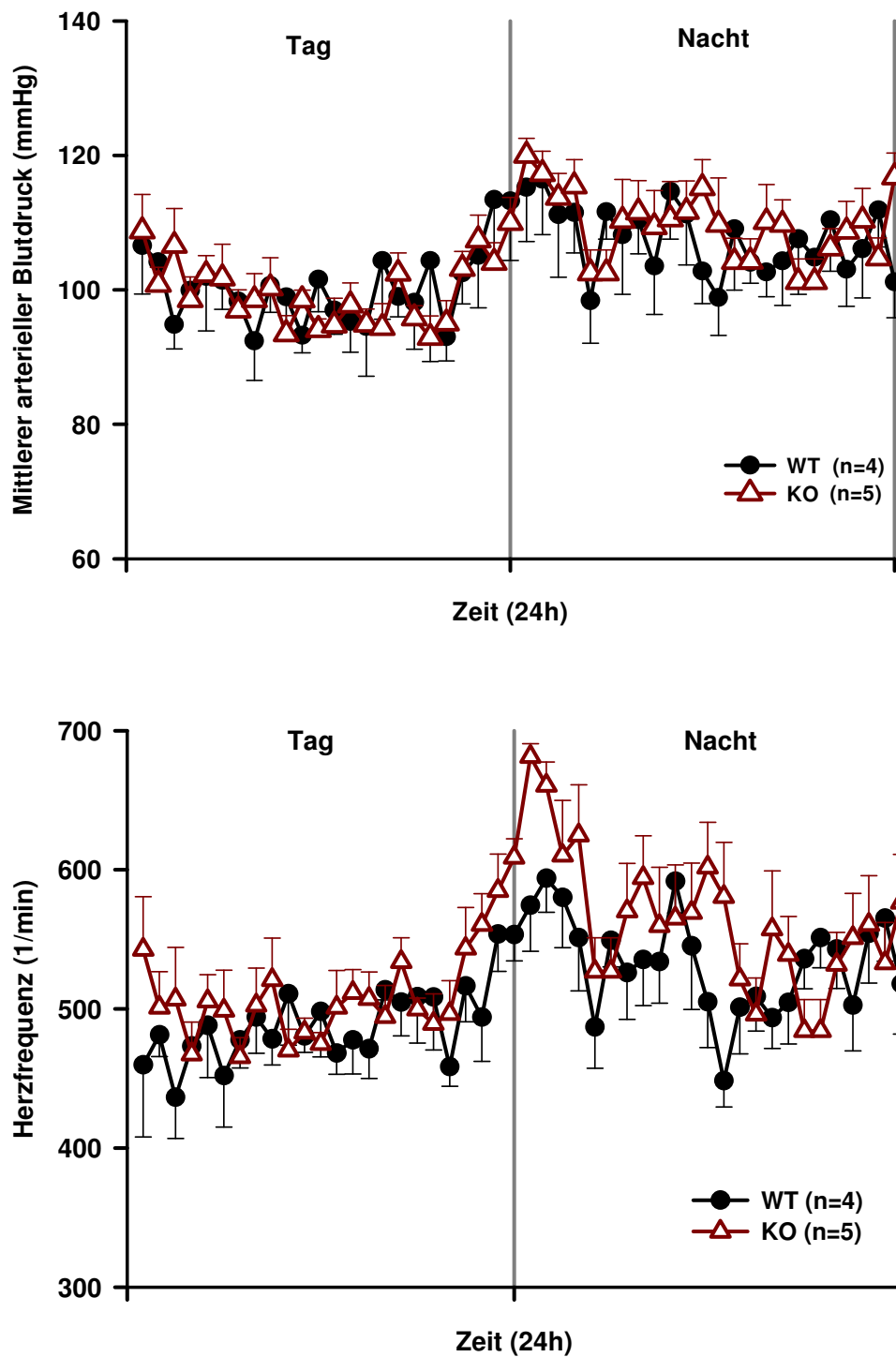


Abbildung 18: 24 Stundenverlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz unter dem Aspekt der zirkadianen Rhythmik. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern von FGF-2 WT und KO Mäusen.

In Abbildung 19 sind die Aktivitätsdaten in der Tag- und Nachtphase in Bezug zum mittleren arteriellen Blutdruck gesetzt. Die Abbildung verdeutlicht, dass die erhöhten Aktivitätsdaten in der Nachtphase bei beiden Genotypen mit erhöhten Werten des mittleren arteriellen Blutdrucks in Verbindung stehen. Wenn man die Einzeldaten aller Knockout Tiere betrachtet, scheint der Zusammenhang zwischen Aktivität und erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck deutlicher zu sein als bei den Wildtypen.

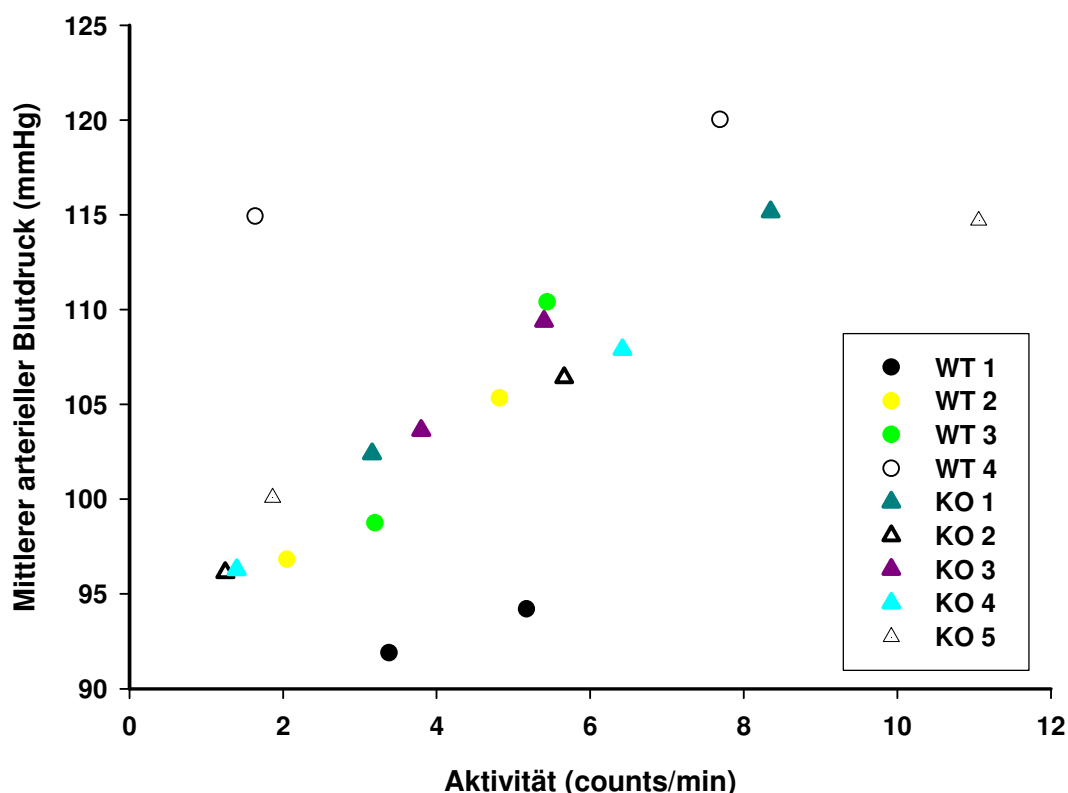


Abbildung 19: Aktivitätsdaten in der Tag- und Nachtphase jedes einzelnen Versuchstieres in Bezug auf den mittleren arteriellen Blutdruck. Dargestellt sind der Mittelwert der Aktivität in der Tagphase in Bezug auf den jeweiligen Mittelwert des mittleren arteriellen Blutdrucks in der Tagphase und der Mittelwert der Aktivität in der Nachtphase in Bezug auf den jeweiligen Mittelwert des mittleren arteriellen Blutdrucks in der Nachtphase jedes einzelnen Tieres.

In der Abbildung 20 sind die Aktivitätsdaten der Tiere in Bezug auf die Herzfrequenz dargestellt. Beide Genotypen zeigten in der Nachtphase deutliche Anstiege in der Aktivität, die mit erhöhten Herzfrequenzwerten einhergingen. Dabei scheint der

Zusammenhang zwischen der Aktivitätssteigerung und erhöhten Herzfrequenzwerten bei den Knockout Tieren deutlicher zu sein.

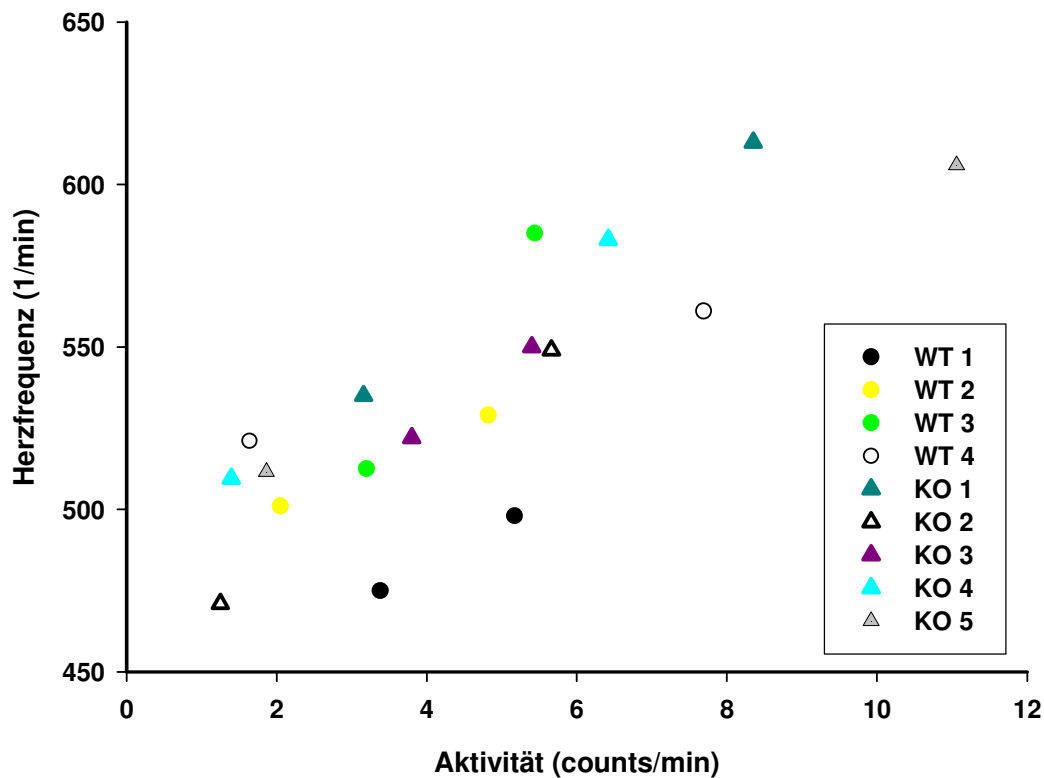
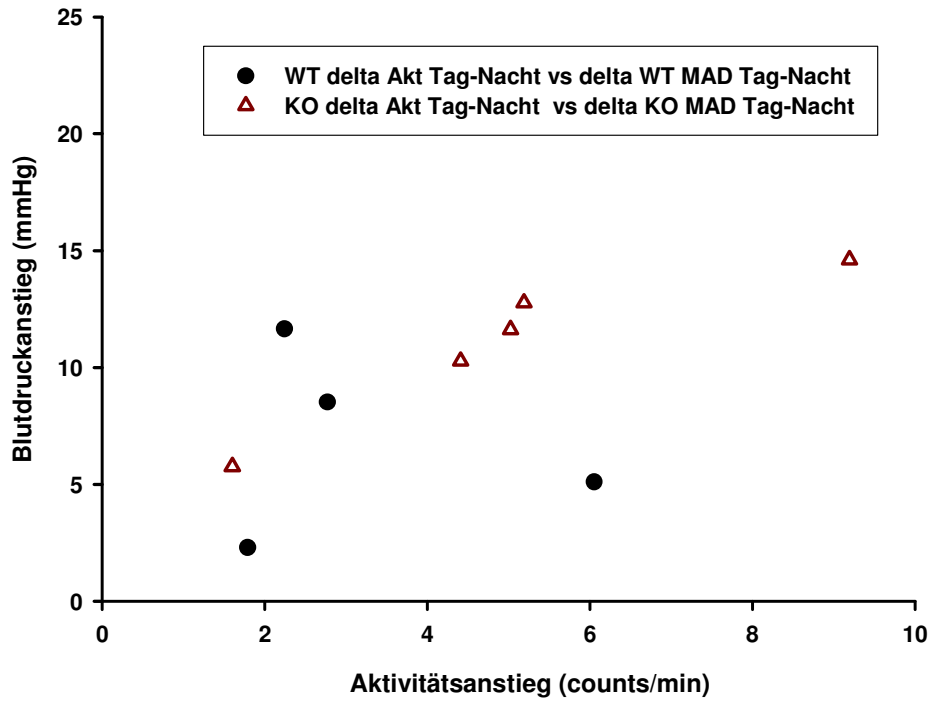


Abbildung 20: Aktivitätsdaten in der Tag- und Nachtphase jedes einzelnen Versuchstieres in Bezug auf die Herzfrequenz. Dargestellt ist der Mittelwert der Aktivität in der Tagphase in Bezug auf den jeweiligen Mittelwert der Herzfrequenz in der Tagphase und der Mittelwert der Aktivität in der Nachtphase in Bezug auf den jeweiligen Mittelwert der Herzfrequenz in der Nachtphase jedes einzelnen Tieres.

In Abbildung 21 ist der Aktivitätsanstieg zwischen der Tag- und Nachtphase der Genotypen in Bezug zu den Anstiegswerten der hämodynamischen Daten zwischen der Tag- und Nachtphase dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, dass die Knockout Tiere eine höhere Aktivität aufweisen, die mit entsprechend höheren Werten der hämodynamischen Parameter verbunden ist.

a)



b)

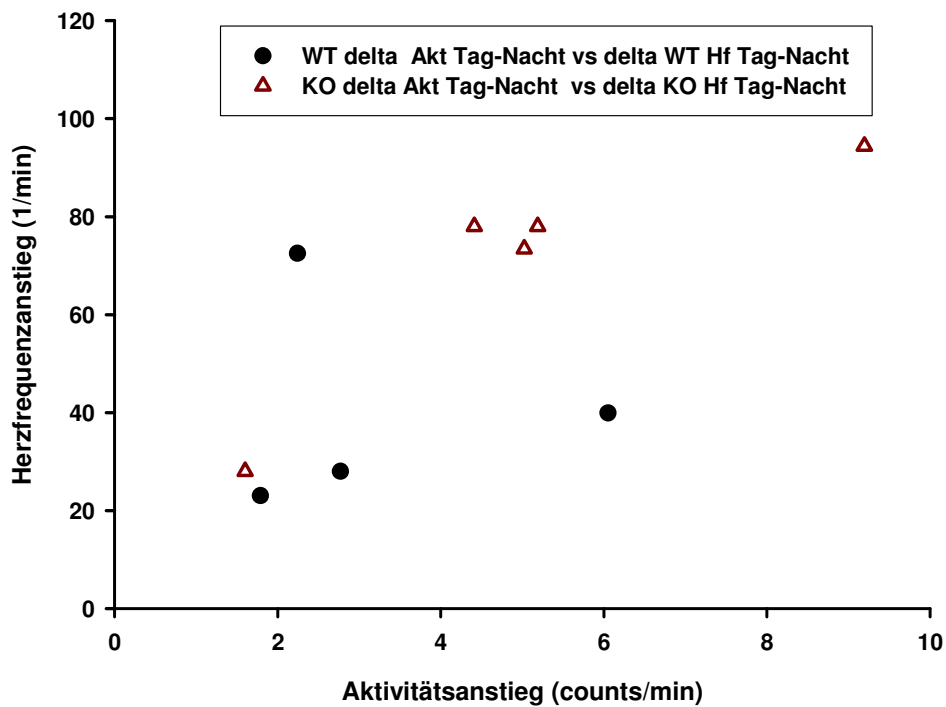


Abbildung 21: Anstieg der Aktivitätsdaten zwischen Tag- und Nachtphase in Bezug auf den Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (Abb. 21 a) und der Herzfrequenz (Abb. 21b). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der jeweiligen Einzeltiere.

4.3.1.3 Stresstest

Bei den Tieren, bei denen ein Telemetriesender implantiert worden war, wurde des Weiteren ein Resident-Intruder-Test gemacht. Bei dem Test gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Durchführung. In dieser Arbeit wurde die Testvariante „Resident Response“ gewählt. Diese Variante repräsentiert die Veränderungen der hämodynamischen Daten sowie der Aktivitätsdaten in dem Falle, dass eine fremde Maus („Intruder“) in den Käfig einer anderen Maus („Resident“) gesetzt wird. Bei diesem Test werden die telemetrischen Daten des „Residents“ aufgenommen.

Der Verlauf der hämodynamischen Daten und der Aktivitätsdaten während des Stresstests sind in Abbildung 22 und 23 dargestellt. In der 10-minütigen Registrierung vor dem eigentlichen Stresstest sind keine Unterschiede in den Blutdruckwerten zwischen den beiden Genotypen zu erkennen.

Wenn der „Resident“ mit dem „Intruder“ konfrontiert wird, steigen sowohl die Blutdruckwerte als auch die Herzfrequenz- und Aktivitätswerte deutlich an. Dabei reagieren Wildtyp und Knockout Mäuse auf den Stressor in gleicher Weise. Bei der Betrachtung der graphischen Darstellungen des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz ist zu erkennen, dass die Wildtyp Tiere in der Nachlaufphase schneller als die Knockout Tiere zu den Basalwerten zurückkehren. Die Knockout Tiere weisen am Ende der Messzeit deutlich höhere Aktivitätswerte als die Wildtypen auf (Abb. 23).

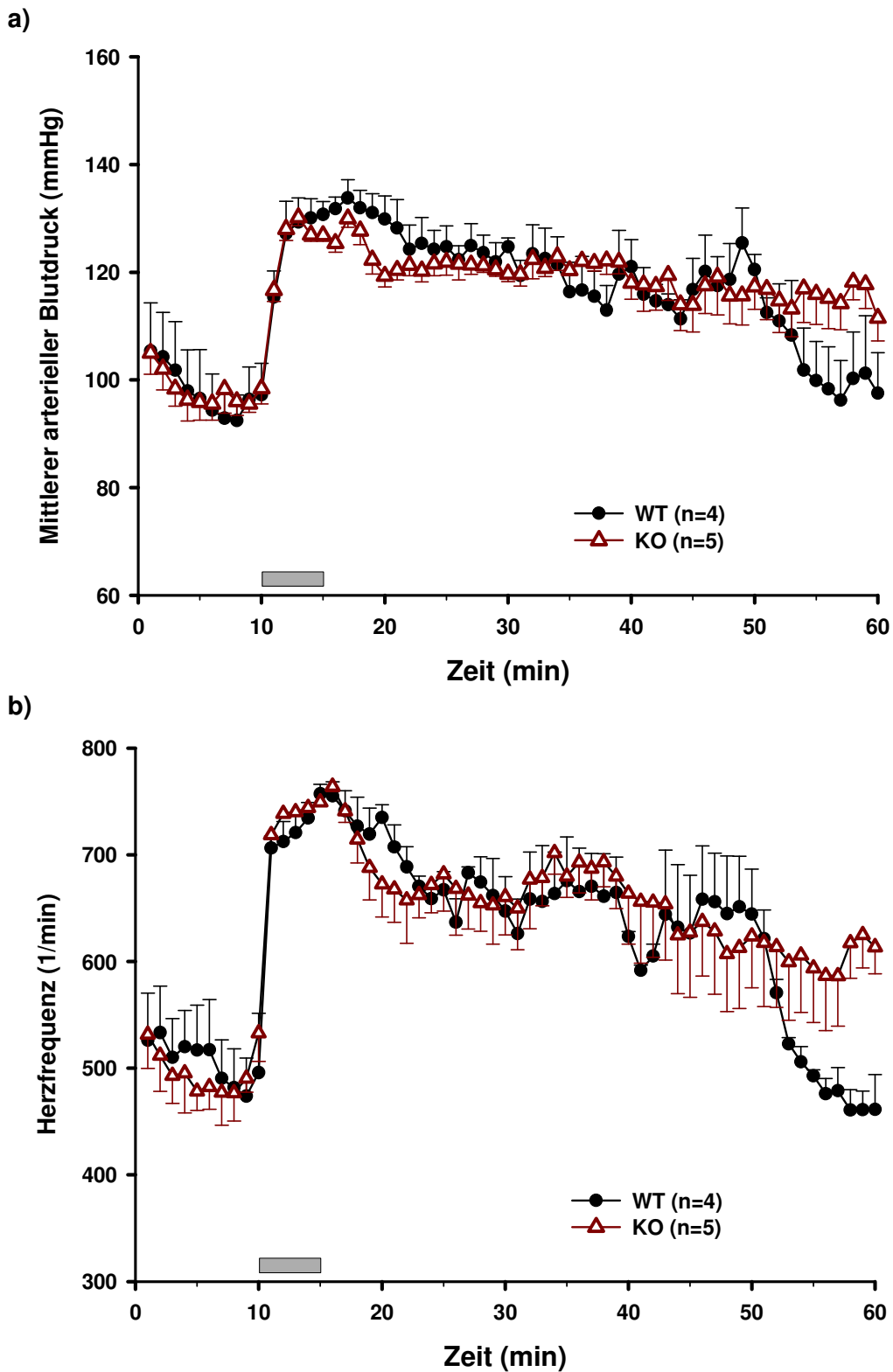


Abbildung 22: Verlauf der hämodynamischen Daten beim Stresstest „Resident Response“. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern des mittleren arteriellen Blutdrucks (Abb. 22a) und der Herzfrequenz (Abb. 22b). Das graue Kästchen gibt den fünfminütigen Zeitraum an, in dem die beiden Tiere miteinander konfrontiert worden sind.

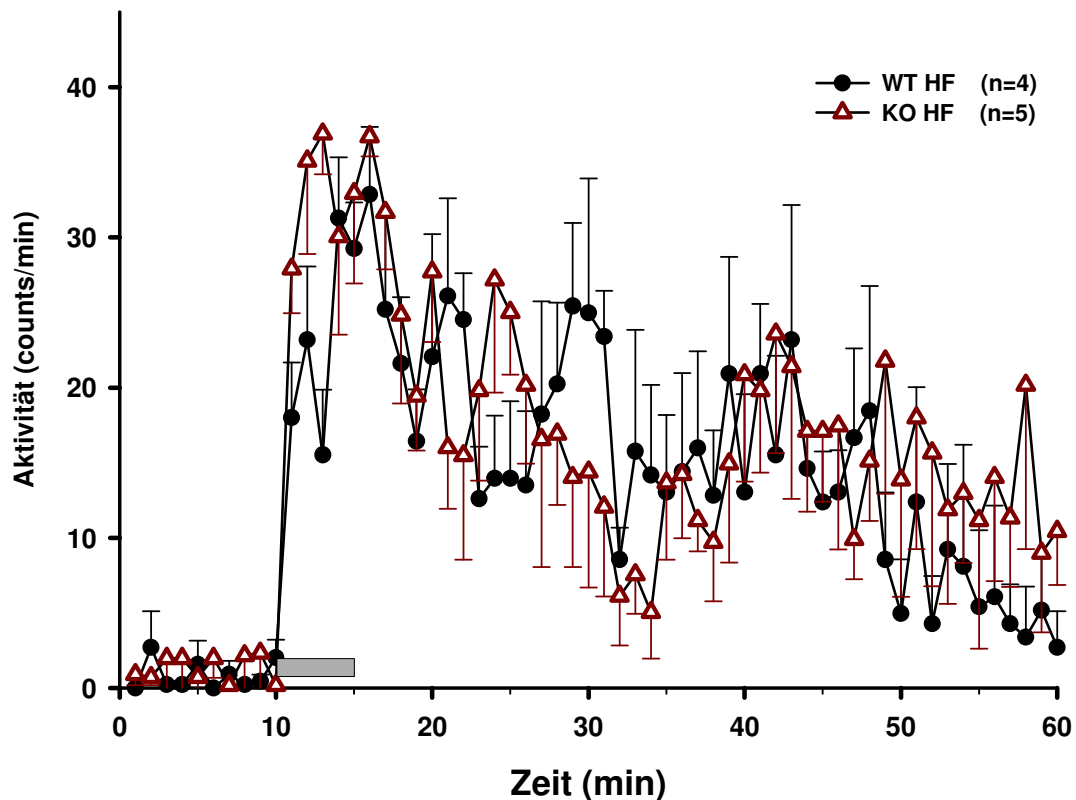
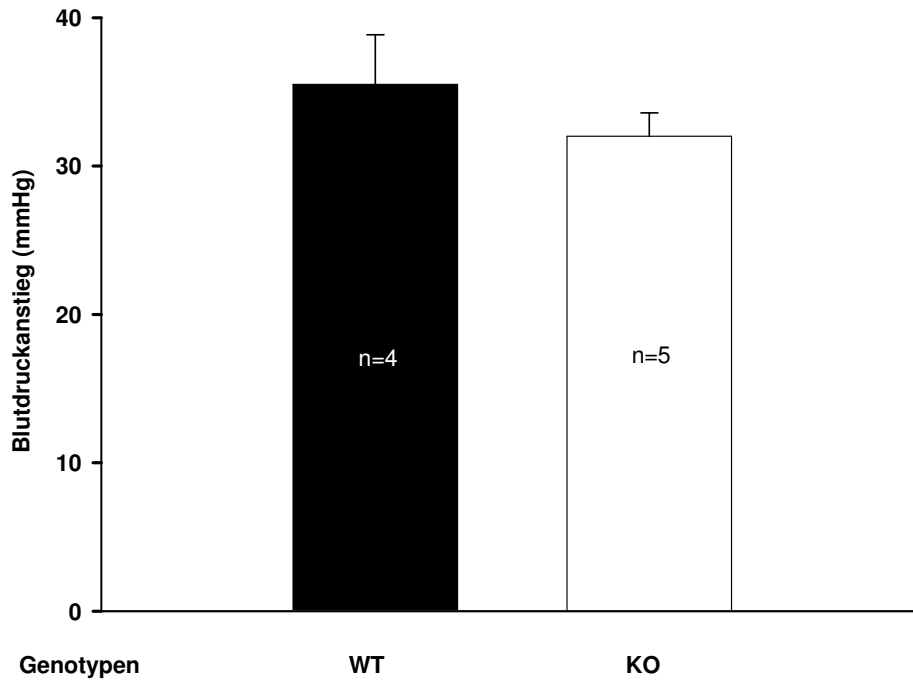


Abbildung 23: Verlauf der Aktivitätsdaten beim Stresstest „Resident Response“. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehlern der Aktivitätsdaten beider Genotypen. Das graue Kästchen gibt den fünfminütigen Zeitraum an, in dem die beiden Tiere miteinander konfrontiert worden sind.

In Abbildung 24 ist der maximale Anstieg der hämodynamischen Daten als Antwort auf die Stressinduktion dargestellt. Der Anstieg wurde berechnet als Differenz zwischen dem maximalen Parameter während des Stresstests abzüglich des Mittelwertes vor Beginn des Tests. Der Blutdruck stieg bei den Wildtypen und den Knockouts bei Konfrontation mit dem anderen Tier um mehr als 30 mmHg an (WT: von $97,9 \pm 6,5$ mmHg auf $133,4 \pm 3,5$ mmHg; $n=4$; KO: von $98,2 \pm 2,8$ mmHg auf $130,2 \pm 1,5$ mmHg; $n=5$). Bezüglich der Herzfrequenz reagieren die beiden Genotypen bei Stressinduktion mit ähnlichen Anstiegswerten (WT: von 506 ± 29 1/min auf 743 ± 23 1/min; $n=4$; KO: von 497 ± 24 1/min auf 763 ± 5 1/min; $n=5$).

a)



b)

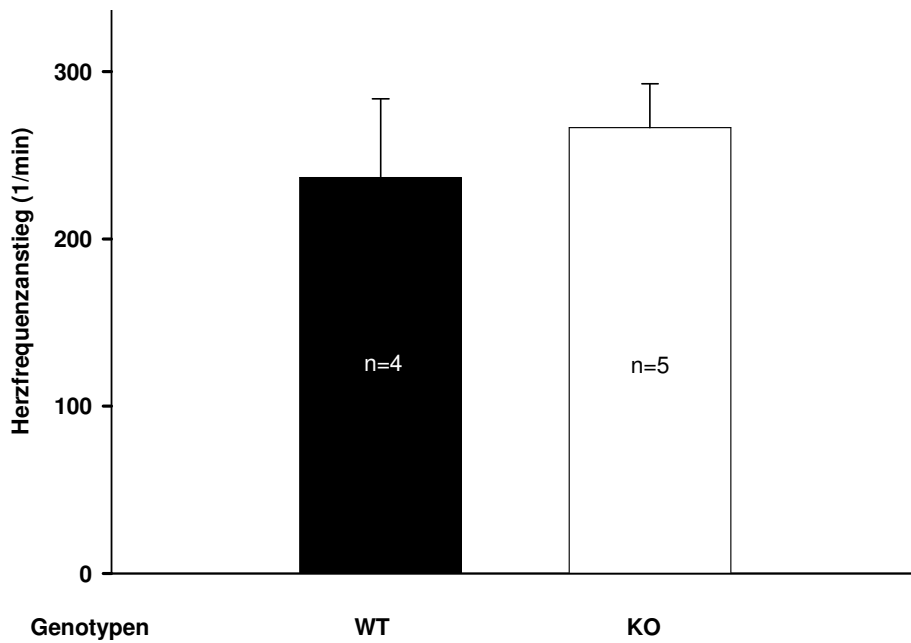


Abbildung 24: Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (Abb. 24a) und der Herzfrequenz (Abb. 24b) beim Stresstest „Resident Response“. Der Anstieg wurde berechnet als Differenz zwischen dem maximalen Parameter während des Stresstests abzüglich des Mittelwertes der Vorlaufphase. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler von Wildtyp und Knockout Mäusen.

In Abbildung 25 ist der maximale Anstieg der Aktivität als Antwort auf die Stressinduktion dargestellt. Deutlich ist eine höhere Aktivitätssteigerung der Knockout Mäuse gegenüber den Wildtyp Mäusen zu erkennen (WT: von $0,9 \pm 0,08$ counts/min auf 43 ± 4 counts/min; n=4; KO: von $1,5 \pm 0,2$ counts/min auf 50 ± 4 counts/min; n=5).

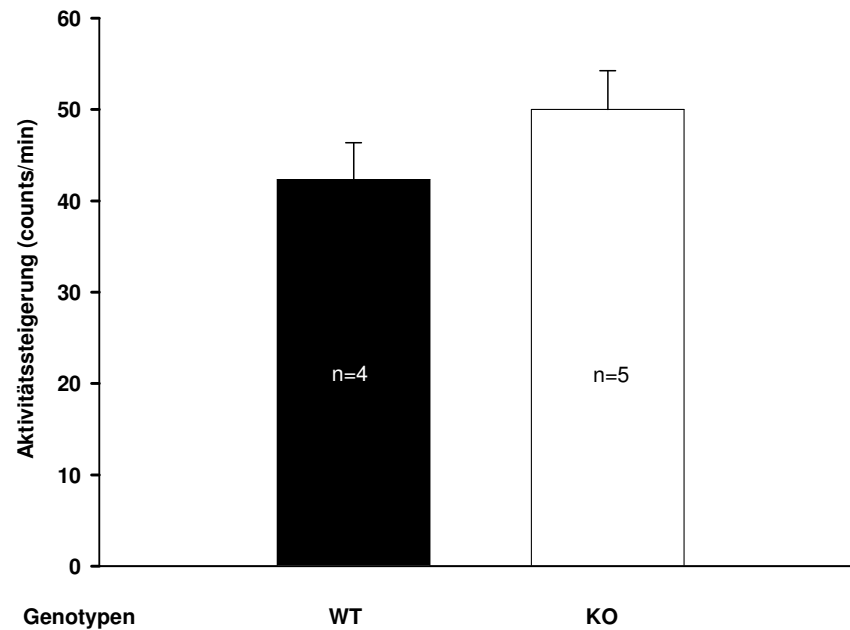


Abbildung 25: Anstieg der Aktivität im Stresstest „Resident Response“. Der Anstieg wurde berechnet als Differenz zwischen dem maximalen Parameter während des Stresstests abzüglich des Mittelwertes der Vorlaufphase. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler von Wildtyp und Knockout Mäusen.

5 Diskussion

Der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 ist in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. Durch die gezielte Ausschaltung dieses Gens konnten physiologische Prozesse, in denen das Protein eine essentielle Rolle spielt, charakterisiert werden. Histologische Untersuchungen an FGF-2 defizienten Tieren zeigten, dass die Deletion des FGF-2 Gens zu einer gestörten Entwicklung des zentralen Nervensystems führt. Gleichzeitig weisen die Tiere eine arterielle Hypotonie und eine eingeschränkte reflektorische Blutdruckregulation auf. Die gezielte Reexpression des FGF-2 Gens während der embryonalen Entwicklung führte dazu, dass die Tiere eine intakte Reflexkontrolle und bei hoher Expression des FGF-2 Transgens eine Normalisierung des Ruheblutdrucks zeigten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die chronische Defizienz von FGF-2 zu einer Beeinträchtigung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und der beim Stress aktivierten Sympatho-Adrenomedullären-Achse führt. Zudem sollte untersucht werden, ob der Tag-Nacht- Rhythmus bei FGF-2 defizienten Mäusen gestört ist.

Der Nachweis eines hypotensiven Phänotyps in den FGF-2 Knockout Mäusen erfolgte an wachen Mäusen über einen chronisch implantierten Katheter in der Arteria femoralis. Diese Messmethode ist nach heutigem Wissensstand neben der radiotelemetrischen Messung die präziseste Methode zur Bestimmung des Blutdrucks und der Herzfrequenz bei Mäusen (VLIET et al., 2000; BUTZ u. DAVISSON, 2001).

Im Vergleich zu der Schwanzplethysmographie, bei der die Tiere fixiert und einer erhöhten Umgebungstemperatur ausgesetzt sind, erfolgt die Kathetermessung ohne Störung der Tiere. Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass keine stressbedingten Veränderungen der Messparameter infolge eines erhöhten Sympathikotonus erwartet werden müssen. Die aus den Messungen ermittelten Herzfrequenzen von ca. 600 Schlägen pro Minute stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten überein (TIAN et al., 1997; LI et al., 1999; PLÜGER et al., 2000; MATTSON, 2001; CHOLEWA u. MATTSON, 2005). Mäuse kann man im Gegensatz zu Ratten schwer an die erforderlichen Manipulationen bei der Schwanzplethysmographie gewöhnen, deshalb liegen die gemessenen Blutdruckwerte häufig über dem in der Literatur angegebenen mittleren arteriellen Blutdruck der Mäuse von ca. 108 mmHg (MILLS et al., 1993; PLÜGER et al., 2000; JUST et al., 2000;

CHOLEWA u. MATTSON, 2001; MATTSON, 2001; CHOLEWA u. MATTSON, 2005; BEK et al., 2005; SCHWEDA et al., 2005; OPPERMANN et al., 2006; RUST et al., 2006). Der Vergleich mit Werten aus der Literatur, die mittels *Tail cuff* Methode oder durch Messungen über chronisch implantierte Katheter an wachen Mäusen durchgeführt wurden, bestätigt die Überlegenheit der ausgewählten Methode (MATTSON, 1998; QUASCHNING et al., 2001). Ein weiterer wichtiger Vorteil der chronisch implantierten Katheter besteht darin, dass Blutproben von wachen und ungestressten Mäusen gewonnen werden können.

Die tägliche Beurteilung des Habitus und die Bestimmung der täglichen Wasseraufnahme ließen erwarten, dass sich die Mäuse von der Narkose und der Operation weitestgehend erholt hatten. Am zweiten und dritten postoperativen Tag nahmen die Tiere aus der ersten Versuchsreihe ca. 4,0 ml Wasser zu sich, was einer normalen physiologischen Flüssigkeitsaufnahme (15 ml/100 g KM/Tag) entspricht (GÖBEL u. EWRINGMANN, 2005). Die Tiere aus der zweiten Versuchsreihe zeigten eine geringere Wasseraufnahme, die am zweiten und dritten postoperativen Tag ca. 2,5 ml betrug. Die verminderte Wasseraufnahme der zweiten Versuchsreihe betrifft beide Genotypen, so dass spekuliert werden kann, dass die transgenen Tiere per se weniger trinken.

Aufgrund der Tatsache, dass die Mäuse den Habitus eines gesunden bzw. geringgradig kranken Tieres zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Blutdruckdaten durch die durchgeführte Implantation nur unwesentlich beeinträchtigt wurden. Um eine möglichst schnelle Regeneration der Tiere nach der Operation zu gewährleisten, war eine zügige und routinierte Implantation der Katheter Voraussetzung.

Die Auswertung der beiden Messtage der Versuchsserie 1 zeigte einen signifikant erniedrigten Blutdruck bei den FGF-2 Knockout Mäusen im Verhältnis zu den FGF-2 Wildtyp Mäusen. Der signifikante Blutdruckunterschied zwischen den beiden Genotypen ist am ersten Messtag nicht nachzuweisen. Das spricht dafür, dass sich die Tiere und insbesondere die Knockout Mäuse zu diesem Zeitpunkt (2. postoperativer Tag) noch nicht vollständig von der Operation erholt hatten und deshalb höhere Blutdruckwerte als am dritten postoperativen Tag aufwiesen.

Die gemessenen Blutdruckdaten am zweiten Messtag stimmen mit veröffentlichten Werten von DONO u. FAULHABER et al. (2001) überein, die die Blutdruckdaten ebenfalls mittels chronisch implantierter Katheter zum selben Zeitpunkt erhoben haben.

Die Überlegung, dass ein Defekt der glatten Muskelzellen der primäre Grund für die Hypotension darstellt (ZHOU et al., 1998), erscheint unwahrscheinlich, da die FGF-2 defizienten Mäuse auf einen exogen zugeführten Vasokonstriktor mit einem deutlichen Anstieg des Blutdrucks reagieren konnten (DONO et al., 1998).

Wie im Literaturteil beschrieben, weisen FGF-2 defiziente Mäuse eine gestörte Entwicklung des Nervensystems auf (DONO et al., 1998; ORTEGA et al., 1998; VACCARINO et al., 1999). Des Weiteren wurde bei den Tieren neben der Hypotension eine Beeinträchtigung des Barosensorenreflexes gefunden (DONO et al., 1998; DONO u. FAULHABER et al., 2002). Um herauszufinden, ob die beiden beschriebenen Befunde mit einer gestörten Entwicklung des zentralen Nervensystems in Verbindung stehen, wurde ein Tiermodell entwickelt, bei dem ein Hühner FGF-2 Transgen unter der Kontrolle des Wnt-1 Promotors während der embryonalen Entwicklung des ZNS reexprimiert wurde. In diesem Tiermodell zeigten die FGF-2 KO TgC Mäuse weder einen erniedrigten Blutdruck noch eine Beeinträchtigung des Barosensorenreflexes (DONO u. FAULHABER et al., 2002). Auch in den Blutdruckmessungen der vorliegenden Arbeit, die ebenfalls mittels Implantation eines Katheters in die Arteria femoralis erfolgten, weisen die Blutdruckwerte der zweiten Versuchsreihe weder am ersten noch am zweiten Messtag Unterschiede zwischen den Genotypen FGF-2 WT TgC und FGF-2 KO TgC auf. Beide Genotypen zeigen am ersten Messtag höhere Blutdruckwerte auf als am zweiten Messtag, was darauf hin deutet, dass auch hier eine noch nicht vollständige Regeneration von der Operation zu höheren Blutdruckwerten führt. Die erhobenen Blutdruckdaten am zweiten Messtag stimmen mit veröffentlichten Werten von DONO u. FAULHABER et al. (2002) überein.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Deletion des Wachstumsfaktors, der wie im Literaturteil beschrieben eine essentielle Rolle bei der Neurogenese spielt, bei den Mäusen zu einer autonomen Dysfunktion führt. In Verbindung mit der gestörten Entwicklung des zentralen Nervensystems und dem Befund, dass FGF-2 von präganglionären intermediolateralen Neuronen im Rückenmark exprimiert wird (STAPF et al., 1997), wäre eine eingeschränkte Funktionalität dieser Neurone bei FGF-2 Defizienz denkbar. Eine Beeinträchtigung dieser Neurone reduziert den sympathischen Tonus sowie die exzitatorische Reflexkontrolle und kann sowohl mit einer Beeinträchtigung des Barosensorenreflexes als auch mit einer Hypotension einhergehen (BANNISTER u. MATHIAS, 1992).

Hypotonien können ätiologisch aus kardiovaskulären, neurogenen oder endokrinen Erkrankungen entstehen. Um beurteilen zu können, ob eventuell kardiale

Fehlbildungen zu der beobachteten Hypotension beitragen, wurde in dieser Arbeit an isolierten Herzen der Versuchsserien 1 und 2 morphometrische Untersuchungen vorgenommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Herzgewichte sowie die Gewichte des linken Ventrikels der FGF-2 defizienten Mäuse signifikant erniedrigt waren. Auch das Verhältnis von Herzgewicht und Gewicht des linken Ventrikels zum Körpergewicht wies bei den Knockout Mäusen eine signifikante Senkung auf. Während die morphometrischen Daten des Wildtyps mit veröffentlichten Daten von AMANN et al., 2005 übereinstimmen, liegen die Herzgewichte bei den FGF-2 Knockout Mäusen, die in dieser Arbeit untersucht wurden darunter. Das Alter der untersuchten Tiere liegt bei beiden Studien zwischen 4 und 5 Monaten, so dass altersbedingte Unterschiede als Ursache nicht in Frage kommen. Allerdings sind die Herzgewichte von Mäusen per se sehr gering, weshalb individuelle Präparationsunterschiede leicht zu unterschiedlichen Ergebnissen führen könnten.

Der morphometrische Befund und die damit eventuell verbundene kardiale Dysfunktion könnte Ursache der beobachteten Hypotonie sein. FGF-2 wird eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Differenzierung von Myozyten zugesprochen (PASUMARTHI et al., 1996), so dass vorstellbar wäre, dass eine Deletion des FGF-2 Gens direkt Einfluss auf das myokardiale Wachstum nimmt und somit das verringerte Herzgewicht erklärt. Die Möglichkeit, dass eine beeinträchtigte linksventrikuläre Funktion zu der Hypotonie beiträgt, wird durch Untersuchungen gefestigt, in denen nachgewiesen wurde, dass FGF-2 Knockout Mäuse auf mechanische Überbelastung mit einem beeinträchtigten myokardialen Wachstum reagieren (SCHULTZ et al., 1999). Andererseits könnte das verringerte Herzgewicht eine sekundäre Folge des Hypotonus der Knockout Mäuse sein. Diese Hypothese wird durch die Befunde der morphometrischen Untersuchungen bei den FGF-2 transgenen Mäusen gefestigt. Diese Tiere, die während der embryonalen Entwicklung das Hühner FGF-2 Transgen reexprimiert bekamen, sind normoton und weisen bezüglich der Herzgewichte keine Unterschiede auf. Die Untersuchungen lassen zwei mögliche Erklärungen für die kardialen Befunde zu. Das verringerte Herzgewicht ist eine sekundäre Folge der neurogenen Hypotonie oder ist durch eine kardiale Entwicklungsstörung aufgrund der FGF-2 Defizienz verursacht. Für eine weitere Aufklärung werden weiterführende Untersuchungen erforderlich sein.

Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist von zentraler Bedeutung für die mittel- bis langfristige Blutdruckregulation und die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts des Organismus (HALL et al., 1990; COWLEY, 1992; PERSSON,

1996; CROWLEY et al., 2005; SEELIGER et al., 2005). Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob bei FGF-2 defizienten Mäusen die Funktionsfähigkeit des unter anderem auch unter der Kontrolle des vegetativen Nervensystems (CAMPESE u. PARK, 2006; KIM et al., 2007) stehenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems beeinträchtigt ist.

Die Blutentnahme für die Analyse der Plasmaaldosteronkonzentration wurde unter stressfreien Bedingungen über den chronisch implantierten arteriellen Katheter vorgenommen. Auf die stressfreie Abnahme wurde ausgesprochen großen Wert gelegt, da seit langem bekannt ist, dass eine Aktivierung des Sympathikus innerhalb kürzester Zeit über direkte und indirekte Signalwege zu einer Stimulierung der Aldosteronsekretion führt (DUNN, 1970; TAUGNER et al., 1984). Diese Tatsache wird in Publikationen widerspiegelt, in denen je nach Methode der Blutgewinnung sehr unterschiedliche Werte für die Plasmaaldosteronkonzentration ermittelt wurden (CHOLEWA u. MATTSON, 2001; HEIKKILÄ et al., 2002; MASUZAKI et al., 2003; OPPERMANN et al., 2006; DUAN et al., 2007; EGECIOGLU et al., 2007; KIM et al., 2007). Dementsprechend konnte bei Mäusen noch kein einheitlicher Referenzwert für die Plasmaaldosteronkonzentration gefunden werden.

Um das Risiko, durch die Blutentnahme eine Erhöhung des Hormonwertes zu verursachen, weitestgehend zu minimieren, wurde auf absolute Ruhe im Labor geachtet. Zudem wurden die Blutabnahmebedingungen in der Weise optimiert, dass die Blutentnahme von den Tieren unbemerkt durchgeführt werden konnte. Die Blutentnahme erfolgte zwischen 17.00 -19.00 Uhr, um den zirkadianen Rhythmus der Aldosteronfreisetzung zu berücksichtigen. Unter Einbeziehung des durchgeführten Lichtregimes im Messraum findet während dieses Zeitfensters ein Sekretionsmaximum der Nebennierenrindenhormone statt (DROSTE et al., 2003), wodurch mögliche Unterschiede in der Aldosteronsekretion am präzisesten erfasst werden können. Das für die Analyse zur Verfügung stehende Probenvolumen beinhaltete weniger als 150 µl, weshalb für die Untersuchung der Aldosteronkonzentration der Radioimmunoassay der Firma Immunotech ausgewählt wurde. Dieser wird von mehreren Arbeitsgruppen zur Bestimmung der Aldosteronkonzentration bei verschiedenen Spezies verwendet und zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit (6 pg/ml) aus.

In der vorgelegten Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass FGF-2 defiziente Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Tieren eine signifikant verringerte Plasmaaldosteronkonzentration aufwiesen. Eine verringerte Konzentration von Aldosteron im Plasma kann primär durch endogene Defekte der Nebennierenrinde mit

einhergehender fehlender oder verminderter Produktion der Nebennierenrinden-Hormone verursacht werden. Sekundär können erhöhte Konzentrationen von ANP, ein primärer Reninmangel oder eine verminderte Reninsekretion für die verringerte Plasmaaldosteronkonzentration verantwortlich sein. Die Reninsekretion wird durch einen verminderten Nierenperfusionsdruck und durch eine verminderte NaCl Konzentration im proximalen Tubulus stimuliert. Weiterhin erfolgt über eine gesteigerte Sympathikusaktivität mit einer Aktivierung β_1 adrenerger Rezeptoren in den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates eine Stimulation der Reninsekretion. Aufgrund vorheriger Untersuchungen wurde die Vermutung angestellt, dass FGF-2 defiziente Tiere einen erniedrigten sympathoadrenergen Tonus haben könnten. Infolgedessen könnten die Reninsekretion und dadurch auch die Aldosteronfreisetzung vermindert sein. Diese Hypothese wird durch das Ergebnis der Plasmaaldosteronkonzentration in der zweiten Versuchsreihe gestützt. FGF-2 Knockout Mäuse, bei denen während der embryonalen Entwicklung das Hühner FGF-2 Transgen reexprimiert wurde, zeigten keine verminderte Plasmaaldosteronkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Befunde sprechen für einen neurogenen Mechanismus, der dem erniedrigten Plasmaaldosteron in den FGF-2 Knockout Mäusen zugrunde liegt.

Um diese Hypothese auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden von einer separaten Versuchsserie die renale mRNA von Renin bestimmt (VITZTHUM et al., 2003; KLAR et al., 2003). Diese molekularbiologische Methode wurde hier am Institut von Frau Dr. Vitzthum etabliert. Wie schon bei der Beurteilung der Plasmaaldosteronkonzentration diskutiert, musste die Gewinnung der Nieren aus den gleichen Gründen unter stressfreien Bedingungen erfolgen. Ebenso wichtig war die zügige Probengewinnung mit anschließend schnellem Einfrierungsprozess, um postmortale intrazelluläre Veränderungen, insbesondere den mRNA Abbau durch RNAsen zu minimieren.

Der Vergleich der Wildtypen und Knockouts zeigt eine tendenziell leicht erniedrigte renale mRNA von Renin in den FGF-2 Knockout Tieren, wobei dieser Unterschied zwischen den Versuchsgruppen das Signifikanzniveau von $P < 0,05$ jedoch nicht erreicht. Dieser Befund schließt die oben ausgeführte primäre Ursache einer erniedrigten Plasmaaldosteronkonzentration durch eine Nebennierenrindeninsuffizienz aus, da diese mit erhöhten Reninkonzentrationen verbunden sind. Auf der anderen Seite müsste bei den sekundären Formen die Reninkonzentration erniedrigt sein. Die Hypothese, dass die FGF-2 Knockout Mäuse aufgrund des erniedrigten sympathoadrenergen Tonus eine verminderte Stimulation der Reninfreisetzung

aufweisen, kann durch die fehlende Signifikanz der verminderten renalen mRNA im Vergleich zum Wildtyp nicht eindeutig bestätigt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass eine erniedrigte Reninkonzentration bei den FGF-2 Knockout Mäusen auf mRNA Ebene aufgrund mangelnder Sensitivität des Testverfahrens (qualitative PCR) nicht aufgelöst werden kann. Diese Überlegung wird gestützt durch Untersuchungen, bei denen sowohl Plasmaaldosteronkonzentrationen als auch Plasmareninkonzentrationen signifikant verändert waren, diese Signifikanz aber auf Genexpressionsebene nicht nachzuweisen war (DUAN et al., 2007). Auch bei anderen Arbeitsgruppen wurde beobachtet, dass bei Mäusen Blutdruck- und/oder Aldosteronwerte nicht im Einklang mit beobachteten Reninwerten stehen (RUST et al., 2006; EGECIOGLU et al., 2007). Eventuell spielen speziebedingte Besonderheiten eine Rolle. So wird diskutiert, dass bei Mäusen die Reninkonzentration nicht der bestimmende Schritt für die Menge des freigesetzten Aldosterons ist.

In dieser Arbeit wurde bei den FGF-2 defizienten Mäusen eine signifikant erniedrigte Plasmaaldosteronkonzentration gefunden. Wie bereits im Literaturteil beschrieben ist Aldosteron essentiell an der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts beteiligt. Auf zellulärer Ebene wird die pathologische Wirkung von veränderten Aldosteronkonzentrationen auf die Elektrolyt- und Volumenhomöostase in erster Linie durch eine Funktionsänderung des epithelialen Natriumkanals sowie der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase im distalen Tubulussystem der Niere verursacht (ROSSIER et al. 2002; CONNELL u. DAVIES et al., 2005). Durch verringerte Aldosteronkonzentrationen erfolgt eine verminderte Reabsorption von Na^+ und sekundär, durch Abnahme des transepithelialen Potentials, eine Verminderung der transepithelialen Diffusion von Cl^- (Silbernagl u. Lang, 2005). Aufgrund der verminderten Reabsorption von NaCl werden über sekundäre Prozesse vermindert Kaliumionen über einen ROMK-Kanal (renal outer medullary K^+ channel) in das Tubulolumen sezerniert. So erfolgt im Rahmen eines Hypoaldosteronismus eine Verschiebung der Elektrolytkonzentrationen im Plasma, die sich in der Regel mit Hilfe labordiagnostischer Untersuchungen durch den Nachweis einer Hyponatriämie und einer Hyperkaliämie bestätigen lässt. Die in dieser Arbeit bestimmten Elektrolytkonzentrationen wiesen bei den FGF-2 defizienten Mäusen keine signifikanten Abweichungen auf. Die bestimmten Parameter lagen sowohl bei den Wildtypen als auch bei den Knockout Tieren im Referenzbereich (BOEHM et al., 2007). Die verminderte Aldosteronkonzentration bei den Knockout Tieren hat keine Veränderungen in der Elektrolytkonzentration zur Folge. Die verminderte Aldosteronkonzentration bei den Knockout Tieren hat keine Veränderungen in der

Elektrolytkonzentration zur Folge. Möglicherweise kompensieren Aldosteron unabhängige Mechanismen, wie beispielsweise der Na⁺-K⁺-Cl⁻-Kotransporter (NKCC2) in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife und der Na⁺-Cl⁻-Kotransporter (NCC) im distalen Konvolut eventuelle Elektrolytverschiebungen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin zu untersuchen, ob FGF-2 Knockout Mäuse eine Beeinträchtigung der Sympatho-Adrenomedullären-Achse zeigen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die chronische Defizienz von FGF-2 bei den Mäusen zu Störungen des zirkadianen Rhythmus führt. Diese Untersuchungen erfolgten mittels der telemetrischen Messmethode.

Die Radiotelemetrie wird als „state of the art“ für das Monitoring physiologischer Funktionen bei wachen frei beweglichen Labortieren beschrieben (KRAMER u. KINTER, 2003). Bereits 1959 haben Russel und Burch das wissenschaftliche „Prinzip der 3 R“ zur Reduktion von Tierversuchen gefordert (RUSSEL u. BURCH, 1959). In diesem Konzept stehen die „3R“ für die englischen Ausdrücke Reduction, Refinement und Replacement. Das radiotelemetrische Messverfahren entspricht bezogen auf die ersten beiden Punkte dem entwickelten Konzept. Die Methode ermöglicht es, solange die technischen Voraussetzungen (Batterielaufzeit) gegeben sind, unterschiedliche Versuche an einem Tier durchführen zu können, während diese in ihren gewohnten Käfigen verweilen können.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich der Tag-/Nachtrhythmus erst nach 5-7 Tagen post operationem wieder einstellt (KRAMER et al., 2000; VAN VLIET et al., 2000; BUTZ u. DAVISSON, 2001; WHITESALL et al., 2004). Deshalb wurde den Tieren vor dem Messbeginn eine Erholungsphase von 10 Tagen gewährt. Die Implantation des Katheters in die linke A. carotis verursachte bei den Tieren keine neurogenen Ausfallserscheinungen, so dass anzunehmen ist, dass über die A. vertebralis die linke Hälfte des Kopfes mitversorgt werden kann.

Der Habitus der Tiere wurde täglich beurteilt. Die aktuellen Blutdruck- und Herzfrequenzdaten jedes einzelnen Tieres konnten auf dem Messcomputer verfolgt werden und daraus zusätzlich ein Eindruck über das Allgemeinbefinden der Tiere abgeleitet werden.

Bei Untersuchungen von Herrn Dr. Faulhaber (nicht veröffentlichte Daten), bei denen die beiden Messmethoden miteinander verglichen wurden, konnte festgestellt werden, dass der mittlere arterielle Blutdruck in der Telemetrie Versuchsgruppe um ca. 4-5 mmHg niedriger war. Eine andere Arbeitsgruppe ermittelte eine teilweise mehr als 10 mmHg große Differenz zwischen den beiden Methoden, wobei auch hier die

Versuchsgruppe aus dem telemetrischen Messverfahren die niedrigeren Werte aufwies (BALAKRISHNAN et al., 1998; VAN VLIET et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für den Unterschied ist, dass die mit der Methode der chronisch implantierten Katheter einhergehenden Interventionen, wie beispielsweise die notwendigen Spülungen der Katheter mit heparinisierter NaCl Lösung zu den erhöhten Blutdruckwerten bei dieser Messmethode beitragen können.

Die Vergleichbarkeit der beiden Methoden ist bereits aufgrund der unterschiedlichen postoperativen Messzeitpunkte schwierig. Man kann davon ausgehen, dass die telemetrischen Versuchstiere durch eine wesentlich längere Regenerationsphase nach der Operation und durch eine bewegungsuneingeschränkte Haltung in ihren gewohnten Käfigen weniger gestresst sind als die Kathetertiere, was den Blutdruckunterschied zwischen den beiden Messmethoden ebenfalls erklären könnte. Letztendlich sind für eine Aufklärung Vergleichsstudien mit beiden Messmethoden notwendig.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Wildtypen im telemetrischen Messverfahren im Vergleich zu der anderen Methode ebenfalls niedrigere Blutdruckwerte. Die Blutdruckwerte der Wildtypen sind ähnlich mit solchen, die von anderen Arbeitsgruppen mit der telemetrischen Messmethode gewonnen wurden (KRAMER et al., 2000; BUTZ u. DAVISSON, 2001; VAN VLIET et al., 2003; OBST et al., 2005). Beim Vergleich ist der zum Teil unterschiedliche genetische Hintergrund der Wildtyp Mäuse zu beachten. Auffällig ist, dass die Knockout Mäuse gegenüber den Wildtypen in der Telemetrie keine verringerten Blutdruckwerte zeigten und infolgedessen kein Blutdruckunterschied zwischen den beiden Genotypen nachzuweisen war. Es wäre vorstellbar, dass der durch den Katheter in der A. carotis unterbrochene Blutfluss von den Knockout Mäusen, die Störungen des zentralen Nervensystems aufweisen, nicht auf die gleiche Weise wie bei den Wildtyp Mäusen kompensiert werden kann. Daraus könnten sich Veränderungen in den hämodynamischen Parametern erklären.

Innerhalb der telemetrischen Untersuchungen wurde weiterhin untersucht, ob die chronische Defizienz von FGF-2 zu Störungen des zirkadianen Rhythmus führt. Der zirkadiane Rhythmus wird über die HPA (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren)-Achse gesteuert. Dabei wird über CRH und ADH die zirkadiane Sekretion von ACTH und in Verbindung damit auch die zirkadiane Sekretion von Cortisol moduliert. Der Tag-/Nachtrhythmus hat sich als ein sehr sensibler Marker für Störungen der Kreislaufhomöostase erwiesen. So konnte gezeigt werden, dass eine große Subpopulation von hypotonen Patienten ein deutlich verändertes Tages-Blutdruckprofil

aufwiesen (CARVALHO et al., 2000). Die FGF-2 Knockout und Wildtyp Mäuse zeigten einen ausgeprägten Tag-/Nachtrythmus mit speziesbedingten niedrigeren hämodynamischen Daten am Tag und höheren in der Nacht.

Auffälligerweise konnten bei den FGF-2 defizienten Tieren beim Vergleich der Tag-Nachtphasen ein signifikanter Anstieg der hämodynamischen Parameter und der Aktivität in der Nachtphase beobachtet werden. Eine weitere Auswertung des Versuches zeigte bei den Knockout Tieren einen deutlicheren Zusammenhang zwischen der Aktivität und den hämodynamischen Daten als bei den Wildtypen. Erhöhte Aktivitätswerte sind bei den Knockout Tieren mit deutlich erhöhten Werten im mittleren arteriellen Blutdruck und in der Herzfrequenz verbunden. Eine mögliche Erklärung dafür könnten Untersuchungen bieten, die bei FGF-2 defizienten Tieren einen beeinträchtigten Barosensorenreflex nachweisen konnten (DONO u. FAULHABER et al., 2002). Folglich führen Aktivitätssteigerungen und die damit verbundene sympathische Aktivierung bei den Knockout Mäusen zu höheren Blutdruck- und Herzfrequenzwerten als bei den Wildtypen, bei denen der Blutdruckanstieg durch eine intakte Reflexkontrolle reguliert wird.

Erhöhte Aktivitätswerte bei FGF-2 defizienten Mäusen könnten auch eine mögliche Erklärung für das Fehlen des Blutdruckunterschieds zwischen den beiden Genotypen in der Telemetrie darstellen. Eine erhöhte Aktivität führt bei den Knockout und Wildtyp Tieren zu höheren Blutdruckwerten. Die Aktivität ist jedoch bei Knockout Mäusen höher und folglich auch deren Blutdruckwerte. Der Blutdruckunterschied zwischen den Genotypen ist folglich mittels der telemetrischen Messmethode, bei dem sich die Tiere frei bewegen können nicht mehr nachzuweisen, sondern nur mittels chronischer Katheter, bei der die Tiere sich wesentlich weniger bewegen, da sie über eine Metallfeder im Nacken an dem Zweikanal-Swivel-System fixiert sind.

Um zu untersuchen, ob FGF-2 Knockout Mäuse auf einen Stressstimulus adäquat mit einem Anstieg des MAP und der Herzfrequenz reagieren können, wurde bei diesen Tieren ein Stresstest durchgeführt. In akuten Stresssituationen werden die HPA (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren)- Achse und die SAM (Sympatho-Adrenomedulläre)- Achse aktiviert. Dadurch wird die so genannte „fight or flight“ Antwort induziert, die durch einen koordinierten Anstieg des arteriellen Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Atemfrequenz charakterisiert ist. Die beiden Genotypen reagierten auf die Stressinduktion mit fast identischem Anstieg der hämodynamischen Werte. FGF-2 defiziente Tiere konnten in ähnlicher Weise wie die Wildtypen auf Stressinduktion reagieren. Bei der Stressantwort der Knockout Tiere konnte eine

höhere Aktivitätssteigerung als bei der Kontrollgruppe beobachtet werden. Diese Aktivitätssteigerung ist, wie im Falle des zirkadianen Rhythmus festgestellt, bei den FGF-2 defizienten Tieren höher. So wäre vorstellbar, dass Knockout Mäuse durch ihre erhöhte Aktivität verbunden mit Anstiegen der hämodynamischen Werte, die durch die Beeinträchtigung des Barorezeptorenreflexes nicht wie bei den Wildtypen reguliert werden, letztendlich dieselbe Stressantwort zeigen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Studie nachgewiesen werden, dass der hypotensive Phänotyp mit einem verminderten linksventrikulären Herzgewicht verbunden ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die chronische Defizienz von FGF-2 zu einer neurogen bedingten Beeinträchtigung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems führt. Für die weitere Aufklärung der hypotensiven Dysregulation bei FGF-2 defizienten Mäusen ist es notwendig weitere Untersuchungen durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Pathogenese der hypotensiven Dysregulation bei FGF-2 Defizienz.

FGF-2 ist in zahlreichen Signalprozessen, die das embryonale Wachstum und die Differenzierung, die Physiologie des adulten Organismus und die Pathologie betreffen, involviert. Die gezielte genetische Deletion des FGF-2 Gens ermöglichte es neue Erkenntnisse über die *in vivo* Funktionen dieses vielfältigen Proteins gewinnen zu können. Histologische Studien an FGF-2 KO Mäusen zeigten, dass die Tiere eine gestörte Entwicklung des cerebralen Kortex und eine drastische Reduktion der Zahl von Rückenmarksneuronen aufwiesen. *In-vivo* Untersuchungen ergaben, dass FGF-2 defiziente Mäuse eine arterielle Hypotonie und eine eingeschränkte reflektorische Blutdruckregulation zeigten. Diese Befunde sprechen dafür, dass FGF-2 eine essentielle Bedeutung in der Entwicklung neuronaler Gewebe, welche an der Blutdruckregulation beteiligt sind, zukommt. Diese Hypothese wurde durch ein weiteres Mausmodell, bei dem ein Hühner FGF-2 Transgen C unter der Steuerung eines Wnt-1 Promotors zwischen dem Tag 9.5 und 14.5 selektiv im Neuralrohr von FGF-2 defizienten Embryonen reexprimiert wurde, bestätigt. Diese Tiere zeigten eine normale Entwicklung des zentralen Nervensystems und wiesen eine intakte Blutdruckregulation auf. Zudem konnte bei hoher Expression des FGF-2 Transgens eine Normalisierung des Ruheblutdrucks beobachtet werden.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit zu klären, ob bei den FGF-2 KO Mäusen eine Beeinträchtigung des für die mittel- bis langfristige Blutdruckregulation bedeutende Renin-Angiotensin-Aldosteron-System vorliegt. Weiterhin sollten die Untersuchungen Aufschluss darüber geben, ob die chronische Defizienz von FGF-2 zu Störungen des zirkadianen Rhythmus führt. Schließlich sollte untersucht werden, ob FGF-2 KO Tiere eine Beeinträchtigung der beim Stress aktivierten Sympatho-Adrenomedullären-Achse aufweisen.

Hierzu wurden in drei Versuchsserien an adulten männlichen FGF-2 WT Mäusen und FGF-2 KO Mäusen sowie an FGF-2 WT Transgen C Mäusen und FGF-2 KO Transgen C Mäusen folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz an wachen und ungestressten Mäusen über einen chronischen Katheter am 2. und 3. postoperativen Tag.
2. Entnahme von Blutproben über den arteriellen Katheter mit anschließender Bestimmung der Plasmakonzentration von Aldosteron, Elektrolyten und Kreatinin.
3. Entnahme der Herzen mit Bestimmung des gesamten Herzgewichtes sowie des linksventrikulären und rechtsventrikulären Gewichtes. Anschließende Berechnung des Verhältnisses von Herzgewicht bzw. Gewicht des linken Ventrikels zum Körpergewicht.
4. Entnahme der Nieren mit anschließender Bestimmung der renalen mRNA von Renin.
5. Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Aktivität mittels radiotelemetrischen Messverfahrens;
 - a. Auswertung der Tagesmittelwerte
 - b. Auswertung des Zirkadianen Rhythmus
 - c. Auswertung des Stresstests

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Bei den FGF-2 KO Mäusen konnte der erniedrigte mittlere arterielle Blutdruck bestätigt werden. Die Befunde der morphometrischen Untersuchungen ergaben ein verringertes linksventrikuläres Herzgewicht.
2. FGF-2 KO Mäuse wiesen eine verringerte Plasmaaldosteronkonzentration auf.
3. Die renale mRNA von Renin war in den FGF-2 KO Mäusen tendenziell erniedrigt.
4. Bei den FGF-2 KO Mäusen wiesen die Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium, Chlorid und Kreatinin keine signifikanten Abweichungen vom Normbereich auf.
5. FGF-2 KO TgC Mäusen waren normoton. Die morphometrischen Befunde zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Plasmaaldosteronkonzentrationen der KO TgC und WT TgC Mäuse waren nahezu identisch.

6. Der hypotensive Phänotyp der FGF-2 KO Mäuse war in der radiotelemetrischen Blutdruckmessung nicht nachweisbar.
7. FGF-2 KO Tiere zeigten einen ihrer Spezies entsprechenden Tag-/Nachtrhythmus.
8. FGF-2 KO Mäuse reagierten auf einen Stressstimulus mit einer der Kontrollgruppe vergleichbaren Stressantwort.

Zusammenfassend zeigen die vorgelegten Untersuchungen, dass eine chronische Defizienz von FGF-2 bei Mäusen zu einer neurogen bedingten Beeinträchtigung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems führt. Dieser Defekt ist nicht mit Störungen des zirkadianen Rhythmus oder der akuten Stressantwort verbunden.

7 Summary

Pathogenesis of the hypotensive dysregulation in FGF-2 deficiency.

FGF-2 has been implicated in various signaling processes which control embryonic growth and differentiation, adult physiology and pathology. The genetic deletion of FGF-2 offers a possibility to achieve further knowledge about the *in vivo* functions of this multifunctional protein. Histological studies have shown that FGF-2 deficient mice have an impaired cerebral cortex development and a reduced number of spinal cord neurons. In addition *in-vivo* studies showed that FGF-2 deficient mice have an arterial hypotension and an impaired blood pressure regulation. These studies suggest that FGF-2 is essential for the development of neuronal circuits regulating blood pressure. This hypothesis was further confirmed using a second mouse model where a chicken FGF-2 transgene under control of the Wnt-1 promotor was reexpressed in the neural tube of FGF-2 deficient mice between day 9.5 and 14.5 of embryonal development. These mice have a normal development of the CNS, are normotensive and have an intact blood pressure regulation.

The aim of this study was to clarify if FGF-2 deficient mice have an impaired renin-angiotensin-aldosterone-system. Furthermore the effects of FGF-2 deficiency on the circadian rhythm and the sympatho-adrenomedullary axis were investigated.

Three experimental series were performed on adult male FGF-2 WT mice and FGF-2 KO mice as well as on FGF-2 WT TgC mice und FGF-2 KO TgC mice using the following investigations:

1. Measurement of mean arterial blood pressure and heart rate in conscious and unstrained mice by a chronic arterial catheter on day 2 and 3 after surgery.
2. Determination of the plasma concentration of aldosterone, electrolytes and creatinine in blood samples drawn through the arterial catheter.
3. Determination of heart weight and mass of the left and right ventricle for calculation of heart to body weight ratio and ventricular weight to body weight ratio.
4. Determination of renal renin mRNA.
5. Telemetric measurement of the mean arterial blood pressure, heart rate and activity:

- a. Analysis of the diurnal data
- b. Evaluation of the circadian rhythm
- c. Evaluation of the stress test

The results of this work can be summarized as follows:

1. The reduced mean arterial blood pressure in FGF-2 KO mice was confirmed. The results of the morphometric investigation showed a reduced weight of the left ventricle and a reduced left ventricular weight to body weight ratio.
2. The concentration of plasma aldosterone in FGF-2 KO mice was reduced.
3. The renal mRNA of renin in FGF-2 KO mice tended to be lower.
4. The concentrations of plasma sodium, potassium, chloride and creatinine did not show any significant difference between FGF-2 KO and FGF-2 WT mice.
5. FGF-2 KO TgC mice were normotensive. The morphometric results did not show any significant difference between FGF-2 WT TgC and FGF-2 KO TgC.
6. The hypotensive phänotyp of the FGF-2 KO mice could not be confirmed in the telemetry.
7. FGF-2 KO mice had a species specific circadian rhythm.
8. FGF-2 KO mice showed a normal response to an acute stress stimulus.

In summary the investigations show that the deficiency of FGF-2 results in a neurogenic impairment of the renin-angiotensin-aldosterone-system. In contrast FGF-2 deficiency does not affect the circadian rhythm or the acute hemodynamic response to stress.

8 Literaturverzeichnis

ALLOCHE, M. u. A. BIKFALVI (1995):

The role of fibroblast growth factor-2 in hematopoiesis.

Prog. Growth factor Res. 6: 35-48

AMANN, K., J. FAULHABER, V. CAMPEAN, V. BALAJEW, R. DONO, G. MALL u. H. EHMKE (2006):

Impaired myocardial capillarogenesis and increased adaptive capillary growth in fgf-2 deficient mice.

Laboratory Investigation 86: 45-53

AMAYA, E., P.A. STEIN, T.J. MUSCI u. M. KIRSCHNER (1993):

FGF signaling in the early development of mesoderm in *Xenopus*.

Development 118: 477-487

ANDERSON, D.J. (1993):

Cell fate determination in the peripheral nervous system: the sympathoadrenal progenitor.

J. Neurobiol. 24: 185-198

ARNAUD, E., C. TOURIOL, C. BOUTONNET, M. C. GENSAC, S. VAGNER, H. und A.C. PRATS (1999):

A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non- AUG start codon and behaves as a survival factor.

Mol Cell Biol 19, 505-14

ATARASHI, K., G.A. ROBERTSON u. B. GANETZKY (1991):

Effect of atrial peptides on aldosterone production.

J. Clin. Invest. 76, 1807-1811

BAIRD, A. (1994):

Fibroblast growth factors; activities and significance of non-neurotrophin neurotrophic growth factors.

Curr. Opin. Neurobiol. 4: 78-86

BALAKRISHNAN, S., R. TATCHUM-TALOM u. J.R. MCNEILL (1998):
Radiotelemetric versus externalized catheter monitoring of blood pressure: Effect of vasopressin in spontaneous hypertension.
J. Pharmacol. and Toxicol. Methods 40: 87-93

BANNISTER, R. u. C.J. MATHIAS (1992):
Autonomic failure: A Textbook of Clinical Disorders of the Autonomic Nervous System,
3rd ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 531-547

BARAJAS, L. (1979):
Anatomy of the juxtaglomerular apparatus.
Am. J. Physiol. 268, F333-F343

BARETT, P.Q., W.B. BOLLAG, C.M. ISALES, R.T. MCCARTHY u. H. RASMUSSEN
(1989):
Role of calcium in Angiotensin II-mediated aldosterone secretion.
Endocrin. Rev. 10: 496-518

BASILICO, C. u. D. MOSCATELLI (1992):
The FGF family of growth factors and oncogenes.
Adv. Cancer Res. 59, 115-165

BAYER, S.A. u. J. ALTMAN (1991):
Neocortical development.
Raven Press, Ltd, New York

BEK, M.J., X. WANG, L.D. ASICO, J.E. JONES, S. ZHENG, X.LI, G.M. EISNER, D.K.
GRANDY, R.M. CAREY, P.SOARES-DA-SILVA u. P.A. JOSE (2005):
Angiotensin-II type 1 receptor- mediated hypertension in D4 Dopamine receptor-
deficient mice.
Hypertension 47: 288-295

BIEGER, S.C., A.W. HENKEL u. K. UNSICKER (1995):
Localization of basic fibroblast growth factor in bovine adrenal chromaffin cells.
J. Neurochem. 64: 1521-1527

BIKFALVI, A. (1997):

Biological roles of fibroblast growth factor-2.

Endocr Rev 18, 26-45

BIKFALVI, A. u. Z.C. HAN (1994):

Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa.

Leukemia 3: 523-529

BISHOP, V.S., J.R. HAYWOOD, R.E. SHADE, M. SIEGEL u. C. HAMM (1986):

Aortic baroreceptor deafferentation in the baboon.

J Appl. Physiol. 60(3): 798-801

BOEHM, O., B. ZU, A. KOCH, N. TRAN, R. FREYENHAGEN, M. HARTMANN u. K. ZACHAROWSKI (2007):

Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice.

Biol. Chem. 388: 547-554

BONNET, H., O. FILHOL, I. TRUCHET (1996):

Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activated toward nucleolin.

J. Biol. Chem. 271: 24781-24787

BOTTCHER, R.T. u. C. NIEHRS (2005):

Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development.

Endocr. Rev. 26: 63-77

BRILLA, C.G. u. K.T. WEBER (1992):

Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis.

J. of Laboratory and Clinical Medicine 120: 893-901

BRUNO, R., R.J. COOPER, E.L. WILSON, J.L. GABRILOVE u. R. HOFFMANN (1993):

Basic fibroblast growth factor promotes the proliferation of human megakaryocytic progenitor cells.

Blood 82: 430-435

BUGLER, B., F. AMALRIC u. H. PRATS (1991)

Alternative initiation of translation determines cytoplasmatic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor.

Mol Cell Biol 11: 573-577

BURDINE, R.H., E.B. CHEN, S.F. KWOK u. M.J. STERN (1997):

Egl-17 encodes an invertebrate fibroblast growth factor family required specifically for sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans*.

Proc. Natl. Acad Sci USA 94: 2433-2437

BURSON, J.M., G. AGUILERA, K.W. GROSS u. C.D. SIGMUND (1994):

Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse.

Am J Physiol. 267: E260-7

BUTZ, G.M. u. R.L. DAVISSON (2001):

Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool.

Physiol Genomics 5: 89-97

CAMPESE, V.M. u. J. PARK (2006):

The kidney and hypertension: over 70 years of research.

J Nephrol. 19: 691-698

CASSCELS, W., E. SPEIR, J. SASSE, M. KLAGSBRUN, P. ALLEN, M. LEE, B. CALVO, M. CHIBA, L. HAGGROTH, J. FOLKMAN et al., (1990):

Isolation, characterization, and localization of heparin-binding growth factors in the heart.

J. Clin. Invest. 85: 433-441

CAREY, R.M., Z.Q. WANG u. H.M. SIRAGY (2000):

Role of the angiotensin type II receptor in the regulation of blood pressure and renal function.

Hypertension 35, 155-163

CARVALHO, M.J., A.H. VAN DEN MEIRACKER, F. BOOMSMA, M. LIMA, J. FREITAS (2000):

Diurnal blood pressure variation in progressive autonomic failure.
Hypertension 35: 892-897

CHAI, S.Y., R. FERNANDO, G. PECK, S.Y. YE, F. A. MENDELSON, T.A. JENKINS u. A.L. ALBISTON (2004):

The angiotensin IV/AT4 receptor.
Cell Mol Life Sci. 61: 2728-37

CHEN A. u. S.K. MCCONNELL (1995):

Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch-1 immuno-reactivity in mammalian neurogenesis.
Cell 82: 631-641

CHIANG, C., K. LITINGTUNG, E. LEE, K.E. YOUNG, J.L. CORDEN, H. WESTPHAL u. P.A. BEACHY (1996):

Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function.
Nature 383: 407-413

CHOLEWA, B.C. u. D.L. MATTSON (2001):

Role of the renin-angiotensin system during alterations of sodium intake in conscious mice.
Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 281, R987-R993

CHOLEWA, B.C. u. D.L. MATTSON (2005):

Influence of elevated renin substrate on angiotensin II and arterial blood pressure in conscious mice.
Experimental Physiology 90.4: 607-612

CHRIST, B. u. F. WACHTLER (1998):

Medizinische Embryologie
Ullstein Medical Wiesbaden

CLARKE, M.S.F., R.W. CALDWELL, H. CHIAO, K. MIYAKE u. P.L. MCNEIL (1995):
Contraction-induced cell wounding, and release of fibroblast growth factor in heart.
Circ. Res. 76: 927-934

COLL, A.P., B.G. CHALLIS, G.S. YEO, K. SNELL, S.J. PIPER, D. HALSALL, R.R.
THRESHER u. S. O`RAHILLY (2004):
The effects of proopiomelanocortin deficiency on murine adrenal development and
responsiveness to adrenocorticotropin.
Endocrinology 145: 4721-4727

COWLEY, A.W. JR. (1992):
Long-term control of arterial blood pressure.
Physiol. Rev. 72, 231-300

COWLEY, A.W., J.F. LIARD u. A.C. GUYTON (1973):
Role of the baroreceptor reflex in daily control of arterial pressure and other variables in
dogs.
Circ. Res. 32, 564-576

CROWLEY, S.D., S.B. GURLEY, M.I. OLIVERIO, A.K. PAZMINO, R. GRIFFITHS, P.J.
FLANNERY, R.F. SPURNEY, H.S. KIM, O. SMITHIES, T.H. LE u. T.M. COFFMAN
(2005):
Distinct role for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the
renin-angiotensin system.
J Clin Invest 115: 1092-1099

CUEVAS, P., F. CARCELLER, S. ORTEGA, M. ZAZO, I. NIETO u. G. GIMENEZ-
GALLEGO (1991):
Hypotensive activity of fibroblast growth factor.
Science 254, 1208-1210

DAVIS, M.G., M. ZHOU, S. ALI, J.D. COFFIN, T. DOETSCHMANN u. G.W. DORN (1997):

Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells.

J. Mol. Cell. Cardiol. 29, 1061-1072

DIMICCO, J.A., B.C. SAMUELS, M.V. ZARETSKAIA u. D.V. ZARETSKY (2001):

The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution.

Pharmacol. Biochem. Behav. 71: 469-480

DONO R., G. TEXIDO, R. DUSSEL, H. EHMKE u. R. ZELLER (1998):

Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2 deficient mice.

EMBO J. 1998; 17:4213-4225

DONO R., J. FAULHABER, A. GALLI, A. ZUNIGA, T. VOLK, G. TEXIDO, R. ZELLER, u. H. EHMKE (2002):

FGF-2 signaling is required for the development of neuronal circuits regulating blood pressure.

Circ Res. 2002; 90: e5-e10

DONO, R. u. R. ZELLER (1994):

Cell-type-specific nuclear translocation of fibroblast growth factor-2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis.

Dev. Biol. 163, 316-330

DROSTE, S.K., A. GESING, S. ULBRICHT, M.B. MÜLLER, A.C.E. LINTHORST u. J.M.H. REUL (2003):

Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.

Endokrinology 144, 3012-3023

DUAN, S.Z., C.Y. IVASHCHENKO, S.E. WHITESALL, L.G. D`ALECY, D.C. DUQUAINE, F.C. BROSIUS, F.J. GONZALEZ, C. VINSON, M.A. PIERRE, D.S. MILSTONE u. R.M. MORTENSEN (2007):

Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPAR γ -deficient mice rescued from embryonic lethality.

J. Clin. Invest. 117: 812-822

DUNN, T.B. (1970)

Normal and pathologic anatomy of the adrenal gland of the mouse, including neoplasm.

J. Natl. Cancer Inst. 44, 1323-1389

DUPREZ, D.A. (2006):

Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodelling and inflammation: a clinical review.

J. Hypertens. 24: 983-991

EGECIOGLU, E., I.J. ANDERSSON, E. OLLANO, V. PALSDOTTIR, B.G. GABRIELSSON, J.J. KOPCHICK, O. SKOTT, P. BIE, J. ISGAARD, M. BOHLOOLY, G. BERGSTRÖM u. A. WICKMAN (2007):

Growth hormone receptor deficiency in mice results in reduced systolic blood pressure and plasma renin, increased aortic eNOS expression, and altered cardiovascular structure and function.

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab 292: E1418-E1425

ELTON, T.S., C.C. STEPHAN, G. R. TAYLOR, M.G. KIMBALL, M.M. MARTIN, J.N. DURAND u. S. OPARIL (1992):

Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes.

Biochem Biophys Res Commun. 184: 1067-73

ERNFORS, P., P. LONNERBERG, C. AYER-LE-LIEVRE u. H. PERSSON (1990):

Development and regional expression of basic fibroblast growth factor mRNA in the rat central nervous system.

J. Neurosci Res. 27: 10-15

FAKTOROVICH, E.G., R.H. STEINBERG, D. YASUMURA u. M.T. MATTES (1992):
Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptor from light damage
in the rat.

J. Neurosci. 12: 3554-3567

FALKENSTEIN, E., H.C. TILLMANN, M.CHRIST, M. FEURING u. M. WEHLING
(2000):

Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects.

Pharmacological Reviews 52: 513-556

FERING, D.G. u. J.T. GALLAGHER (1994):

Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue
growth, morphogenesis and repair.

Prog. Growth Factor Res. 5:353-377

FINKE, R., R. GROSS, E. HACKENTHAL, J. HUBER u. H.R. KIRCHHEIM (1983):

Threshold pressure for the pressure- dependent renin release in the autoregulating
kidney of conscious dogs.

Pflugers Arch. 399 (2): 102-110

FLORKIEWICZ; R. Z., R. A. MAJACK, R. D. BUECHLER, R. D. u. E. FLORKIEWICZ
(1995)

Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-
ER/Golgi pathway.

J Cell Physiol 162, 388-99

FLORKIEWICZ, R.Z. u. A. SOMMER (1989):

Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate
translation from non-AUG codons.

Proc. NATL. Acad. Sci USA 86: 3978-3981

FRAUTSCHY, S.A., P.A. WALICKE u. A. BAIRD (1991):

Localization of basic fibroblast growth factor and its mRNA after CNS injury.

Brain Res. 553: 291-299

FRIIS, U.G., B.L. JENSEN, S. SETHI, D. ANDREASEN, P.B. HANSEN u. O. SKØTT (2002):

Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases.

Circ. Res. 90, 996-1003

FROLIK, C.A, L.L. DART, C.A. MEYERS, D.M. SMITH u. M.B. SPORN (1983):

Purification and initial characterisation of type β transforming growth factor from human placenta.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 80: 3676-3680

FUKS, Z., R.S. PERSAUD, A. ALFIERI, M. MCLOUGHLIN, D. EHLEITER, J.L. SCHWARTZ, A.P. SEDDON, C. CORDON-CARDO u. A. HAIMOVITZ-FRIEDMAN (1994):

Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo.

Cancer Res. 54: 2582-2590

FUCHS-HAMMOSER, R., M. SCHWEIGER u. W. OELKERS (1980):

The effect of chronic low-dose infusion of ACTH (1-24) on renin, renin substrate, aldosterone and other corticosteroids in sodium replete and deplete man.

Acta Endocrinol. (Copenh) 95 (2): 198-206

GALLO-PAYET, N., u. G. GUILLON (1998):

Regulation of adrenocortical function by vasopressin.

Horm. Metab. Res. 30, 360-367

GANGEMI, R.M.R., M. PERERA u. G. CORTE (2004):

Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells.

Journal of Neurochemistry 89: 286-306

de GASPARO M., K.J. CATT, T. INAGAMI, J.W. WRIGHT u. T. UNGER (2000):

International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.

Pharmacol Rev. 52: 415-72

GAVALAS, A. u. R. KRUMLAUF (2000):

Retinoid signaling and hindbrain patterning.

Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 380-386

GHOSH, A. u. M.E. GREENBERG (1995):

Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis.

Neuron, 15: 89-103

GENSBURGER, C., G. LABOURDETTE, M. SENSENBRENNER (1987):

Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vivo.

FEBS Lett 217: 1-5

GLASOW, A., M. BREIDERT, A. HAIDAN, U. ANDEREGG, P.A. KELLY u. S.R. BORNSTEIN (1996):

Functional aspects of the effect of prolactin (PRL) on adrenal steroidogenesis and distribution of the PRL receptors in the human adrenal gland.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 81, 3103-3111

GLOBUS, R.K., P. PATTERSON-BUCKENDAHL u. D. GOSPODAROWICZ (1988):

Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor- β .

Endocrinology 123: 98-105

GÖBEL u. EWRINGMANN, 2005

Heimtierkrankheiten

Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

GOMEZ-PINILLA, F., J.W. LEE u. C.W. COTMANN (1994):

Distribution of basic fibroblast growth factor in the developing rat brain.

Neuroscience 61: 911-923

GOMEZ-SANCHEZ, E.P. (1997):

Central hypertensive effects of aldosterone.

Frontiers in Neuroendocrinology 18: 440-462

GONZALEZ, A.M., A. LOGAN, W. YING, D.A. LAPPI, M. BERRY u. A. BAIRD (1994):
Fibroblast growth factor in the hypothalamic-pituitary axis: differential expression of
fibroblast growth factor-2 and a high affinity receptor.

Endocrinology 134: 2289-2297

GOODFRIEND, T.L., B.M. EGAN u. D.E. KELLEY (1998):

Aldosterone in obesity.

Endocrine Research 24 789-796

GOSPODAROWICZ, D., K. L. JONES, G. SATO (1974)

Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands.

Proc Natl Acad Sci USA 71, 2295-2299

GREEN, P.L., A. WALSH u. P. DOHERTY (1996):

Promiscuity of fibroblast growth factor receptors.

Bioessays 18: 639-693

GROSE, R. u. C. DICKSON (2005):

Fibroblast growth factor signalling in tumorigenesis.

Cytokine Growth Factor Rev. 16: 179-86

GROTHER, C. u. WEWWTZER (1996):

Fibroblast growth factor and its implications for developing and regenerating neurons.

Int. J. Dev. Biol. 40: 403-410

HACKENTHAL, E., M. PAUL, D. GANTEN u. R. TAUGNER (1990):

Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion.

Physiol. Rev. 70, 1067-1116

HALABAN, R., B. FAN, J. AHN, Y. FUNASAKA, H. GITAY-GOREN u. G. NEUFELD
(1992):

Growth factors, receptor kinase and protein tyrosine phosphatase in normal and
malignant melanocytes.

J. Immunopathol. 12: 154-161

HANKE, C.J. u. W.B. CAMBELL (2000):

Endothelial cell nitric oxide inhibits aldosterone synthesis in zona glomerulosa cells: modulation by oxygen.

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279, E846-E854

HEIKKILÄ, M., H. PELTOKETO, J. LEPPÄLUOTO, M. ILVES, O. VUOLTEENAHO u. S.VAINIO (2002):

Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production.

Endocrinology 143: 4358-4365

HERBERT, J.M., C. BASILICO, M. Goldfarb, O. HAUB u. G.R. MARTIN (1990):

Isolation of cDNAs encoding four mouse FGF family members and characterization of their expression pattern during embryogenesis.

Dev. Biol. 138: 454-463

HOLLAND, O.B. u. B. CARR (1993):

Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin.

Endocrinology 132: 2666-2673

HOLLOWACZ, T. u. S. SOKOL (1999):

FGF is required for posterior neural patterning but not for neural induction.

Dev. Biol. 15: 296-308

ITO, C.S., u. A.M. SCHER (1978):

Regulation of arterial blood pressure by aortic baroreceptors in the unanesthetized dog.

Circ. Res. 42, 230-236

ITOH, N. u. ORNITZ, DM. (2004):

Evolution of the Fgf and Fgfr gene families.

Trends Genet 20: 563-569

IWAI, N., T. INAGAMI, N. OHMACHI, Y. NAKAMURA, Y. SAEKI u. M. KINOSHITA (1992):

Differential regulation of rat AT1a and AT1b receptor mRNA.

Biochem Biophys Res Commun. 188, 298-303

JAYE, M., J. Schlessinger u. C. Dionne (1992):

Fibroblast growth factor receptor for acidic and basic fibroblast growth factors.

Biochem Biophys Acta 1135, 185-199

JESSEL, T.M., P. BOVOLENTA, M. PLACZEK, M. TESSIER-LAVIGNE u. J. DODD (1989):

Polarity and patterning in the neural tube: The origin and function of the floor plate.

Ciba Found Symp 144: 255-276

JUST, A., J. FAULHABER u. H. EHMKE (2000):

Autonomic cardiovascular control in conscious mice.

Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 279: R2214-R2221

KALCHEIM, C. (1996):

The role of neutrophins in development of neural-crest cells that become sensory ganglia.

Soc. Lond. B. Biol. Sci. 351: 375-381

KALIL, K., G. SZEBENVI u. E.W. DENT (2000):

Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching.

J. Neurobiol. 44: 145-158

KAMYNINA, E. u. O. STAUB (2002):

Concerted action of ENaC, Nedd4-2, and Sgk1 in transepithelial Na⁺ transport.

Am. J. Physiol. Renal Physiol. 283: F377-F387

KARDAMI, E. u. R.R. FANDRICH (1989):

Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart.

J. Cell Biol., 109, 1865-1875

KASCHINA, E., u. T. UNGER (2003):

Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.

Blood Press. 12, 70-88

KERINS, D.M., Q. HAO u. D.E. VAUGHAN (1995):

Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV.

J Clin Invest. 96: 2515-20

KEYNES, R. u. A. LUMSDEN (1990):

Segmentation and the origin of regional diversity in the vertebrate central nervous system.

Neuron 4: 1-9

KIM, H. u. T. SCHAGAT (1996):

Neuroblasts: a model for the asymmetric division of cells.

Trends Genet 13: 33-39

KIM, S.M., L. CHEN, R. FAULHABER-WALTER, M. OPPERMANN, Y. HUANG, D. MIZEL, J. P. BRIGGS u. J. SCHNERMANN (2007):

Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in β 1- and β 2-adrenergic receptors.

Hypertension 50: 1-7

KLAR, J., H. VITZTHUM u. A. KURTZ (2003):

Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells.

Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 286: F349-F355

KLEIN, S., F.G. GIANCOTTI, M. PRESTA, S.M. ALBELDA, C.A. BUCK u. D.B. RIFKIN (1993):

Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells.

Mol. Biol. Cell 4: 973-82

KLINKE, R. u. S. Silbernagel (2005):

Physiologie

5. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart, New York

DE KLOET, E.R., A. RATKA, J.M.H.M. REUL, W. SUTANTO u. J.A.M. VAN EEKELEN (1987):

Corticoid receptor types in brain: regulation and putative function.

Annals of the New York Academy of Sciences 512: 351-361

KOEPPE, B.M. u. B.A. STANTON (2001):

Renal Physiology

3. Aufl. Mosby, Inc., St. Louis, Missouri

KRAMER, K., H.P. VOSS, J.A. GRIMBERGEN, P.A. MILLS, D. HUETTEMAN, L. ZWIERS u. B. BROCKWAY (2000):

Telemetric monitoring of blood pressure in freely moving mice: a preliminary study.

Laboratory Animals 34: 272-280

KRAMER, K. u. L.B. KINTER (2003):

Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals.

Physiol Genomics. 13: 197-205

KURTZ A. u. C. WAGNER (1999):

Cellular control of renin secretion.

J Exp Biol. 202, 219-225

KUSHIMA, Y., C. NISHIO, T. NONOMURA u. M. HATANAKA (1992):

Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor on the survival of cultured septal cholinergic neurons from adult rats.

Brain Res. 598: 264-270

LAUNEY, C. V. FROMMENTOUX, D.L. SHI u. J.C. BOUCAUT (1996):

A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous Xenopus inducers.

Develop. 122: 869-880

LAVAIL, M.M., K. UNNOKO, D. YASUMURA, M.T. MATTES, G. JANCOPOULUS u. R.H. STEINBERG (1992):

Multiple growth factors, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 11249-11253

LAZAROUS, D.F., M. SCHEINOWITZ, M. SHOU, E. HODGE, S.M.A.H.S. RAJANAYAGAM, G. ROBISON, J.A. STIBER, R. CORREA, S.E. EPSTEIN u. E.F. UNGER (1995):

Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast factor on collateral development in the canine heart.

Circulation 91, 145-153

LAZAROUS, D.F., E.F. UNGER, S.E. EPSTEIN, A. STINE, J.L. AREVALO, E.Y. CHEW, A.A. QUYYUMI (2000):

Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial.

J. Am. Coll. Cardiol. 36: 1239-1244

LEBECHE, D, S. MALPEL u. W.V. CARDOSO (1999):

Fibroblast growth factor interaction in the developing lung.

Mech. Dev. 86: 125-136

LEVICK, J.R. (2003):

An introduction to cardiovascular physiology.

4. Aufl., ARNOLD, London

LI, P., S.H. SUR, R.E. MISTLBERGER u. M. MORRIS (1999):

Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice.

Am. J. Physiol. 276: R500-R505

LOSEL R., A. SCHULTZ u. M. WEHLING (2004):

A quick glance at rapid aldosterone action.

Molecular and Cellular Endocrinology 217: 137-141

LOTSCHAW, D.P. u. F. LI (1996):

Angiotensin II activation of Ca^{2+} - permanent nonselective cation channels in rat adrenal glomerulosa cells.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 271, C1705-1715

LUFT, F.C., E. MERVAALA, D.N. MÜLLER, V. GROSS, F. SCHMIDT, J.K. PARK, C. SCHMITZ, A. LIPPOLDT, V. BREU, R. DECHEND, D. DRAGUN, W. SCHNEIDER, D. GANTEN u. H. HALLER (1999):

Hypertension-induced end-organ damage. A new transgenic approach to an old problem.

Hypertension 33, 212-218

LUMSDEN, A. (1991):

Cell lineage restrictions in the chick embryo hindbrain.

Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. 331: 281-286

MADEN, M (2006):

Retinoids and spinal cord development.

J. Neurobiol. 66: 726-738

MAKARA, J.K., G.L. PETHEÖ, A. TOTH u. A. SPÄT (2000):

Effect of osmolarity on aldosterone production by rat adrenal glomerulosa cells.

Endocrinology 141, 1705-1710

MARSHALL, H., A. MORRISON, M. STUDER, H. PÖPPERL, R. KRUMLAUF (1996):

Retinoids and HOX genes.

FASEB J. 10, 969-978

MASUZAKI, H., YAMAMOTO, C.J. KENYON, J.K. ELMQUIST, N.M. MORTON, J.M. PATERSON, H. SHINYAMA, M.G.F. SHARP, S. FLEMING, J.J. MULLINS, J.R. SECKL u. J.S. FLIER (2003):

Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice.

J.Clin.Invest. 112, 83-90

MATTSON, D.L. (1998):

Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice.

Am. J. Physiol. 274: R564-570

MATTSON, D.L. (2001):

Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice.

Am. J. Hypertens. 14: 405-408

MCCONNELL, S.K., C.E. KAZNOWSKI, N.A. O'ROURKE, M.E. DAILEY u. J.S.C. ROBERTS (1996):

Neurogenesis, determination and migration during cerebral cortical development.

Molecular basis of morphogenesis. Edited by Bernfield, 135-154

MCGREW, L.L., S. HOPPLER u. R.T. MOON (1997):

Wnt and FGF pathways cooperatively pattern anteroposterior neural ectoderm in *Xenopus*.

Mech. Dev. 69: 105-114

MONTERO, A., Y. OKADA, M. TOMITA, M. ITOH, H. TSURUKAMI, T. NAKAMURA, T. DOETSCHMAN, J.D. COFFIN u. M.M. HURLEY (2000):

Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation.

J. Clin. Invest. 105: 1085-1093

MONTESANO, R. (1992):

Regulation of angiogenesis in *vitro*.

Eur. J. Clin. Invest. 22: 504-515

MOSCATELLI, D., M. PRESTA, J. JOSEPH-SILVERSTEIN u. D.B. RIFKIN (1986):

Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor.

J. Cell Physiol. 129: 273-276

MULLER J. (1998):

Regulation of aldosterone biosynthesis: the end of the road?

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 25, S79-85

MURANO, E.P., A.L. WASHBURN, D.P. GOFORTH u. N. WU (1992):

Evidence for bFGF receptors in cultured immature Leydig cells.

Mol. Cell Endocrinol. 88: 39-45

NAKAMOTO, T., C.S. CHANG, A.K. LI u. G.W. CHODAK (1992):

Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells.

Cancer Res. 52: 571-577

NUSSDORFER, G.G., G.P. ROSSI u. G. MAZZOCCHI (1997):

Role of adrenomedullin and released peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis.

Peptides 18, 1079-1089

OBST, M., J. TANK, R. PLEHM, K.J. BLUMER, A. DIEDRICH, J. JORDAN, F.C. LUFT u. V. GROSS (2005):

NO-dependent blood pressure regulation in RGS2-deficient mice.

Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol: 290: 1012-1019

OHSUMI, H., u. A.M. SCHER (1992):

Recovery of arterial pressure control after partial baroreceptor denervation in awake rabbits.

Am. J. Physiol. 263, H697-702

OKUMURA, N., K. TAKIMOTO, M. OKADA u. H. NAKAGAWA (1989):

C6 glioma cells produce basic fibroblast growth factor that can stimulate their own proliferation.

J. Biochem. 106: 904-909

OPPERMANN, M., D. MIZEL, G. HUANG, C. LI, C. DENG, F. THEILIG, S. BACHMANN, J. BRIGGS, J. SCHNERMANN u. H. CASTOP (2006):

Macula densa control of renin secretion and preglomerular resistance in mice with selective deletion of the b isoform of the Na, K, 2Cl Co-transporter.

J. Am. Soc. Nephrol. 17: 2143-2152

ORNITZ, D.M. u. N. ITOH (2001):

Fibroblast growth factors.

Genome Biology, 2: 3005.I-3005.I2

ORTEGA, S., M. ITTMANN, S.H. TSANG, M. EHRLICH u. C. BASILICO (1998):

Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5672-5677

OTTO, D., M. FROTSCHER u. K. UNSICKER (1989):

Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel foam rescue medial septal neurons after fimbria fornix transection.

J. Neurosci. Res. 22: 83-91

PARK, S.Y., C.Y. SONG, B.C. KIM, H.K. HONG u. H.S. LEE (2003):

Angiotensin II mediates LDL-induced superoxide generation in mesangial cells.

Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 285, F909-915

PASUMARTHI, K.B., E. KARDAMI u. P.A. CATTINI (1996):

High and low molecular weight fibroblast growth factor-2 increase proliferation of neonatal rat cardiac myocytes but have differential effects on binucleation and nuclear morphology. Evidence for both paracrine and intracrine actions of fibroblast growth factor-2.

Circ. Res. 78: 126-136

PEARCE, D., A. BHARGAVA u. T.J. COLE (2003):

Aldosterone: its receptor, target genes and actions.

Vitam. Horm. 66, 29-76

PERSSON, P.B. (1996):

Modulation of cardiovascular control mechanisms and their interaction.

Physiol. Rev. 76, 193-244

PERRONE-CAPANO, C., U. DI PORZIO (2000):

Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development.

Int. J. Dev. Biol. 44: 679-687

PETROSKI, R.E., J.P. GRIERSON, S. CHOI-KWON u. H.M. GELLER (1991):
Basic fibroblast factor regulates the ability of astrocytes to support hypothalamic neuronal survival in vitro.

Dev. Biol. 147, 1-13

PHILLIPS, M.I., E.A. SPEAKMAN u. B. KIMURA (1993):
Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems.

Regul. Pept. 43, 1-20

PINTO, Y.M., H. BUIKEMA, W.H. VAN GILST, E. SCHOLTENS, P.P. VAN GEEL, P.A. DE GRAEFF, J. WAGNER u. M. PAUL (1997):

Cardiovascular end-organ damage in *REN-2* transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats.

J. Mol. Med. 75, 371-377

PIOTROWICZ, R.S., J.L. MARTIN, W.H. DILLMANN u. E.G. LEVIN (1997):

The 27-kDa heat shock protein facilitates basic fibroblast growth factor release from endothelial cells.

J. Biol. Chem. 272: 7042-7047

PLOUET, J., F. MASCARELLI, M.D. LORET, J.P. FAURE u. Y. COURTOIS (1990):

Regulation of eye derived growth factor binding to membrane by light, ATP or GTP in photoreceptor outer segments.

EMBO J. 7: 373-376

PLÜGER, S., J. FAULHABER, M. FÜRSTENAU, M. LÖHN, R. WALDSCHÜTZ, M. GOLLASCH, H. HALLER, F.C. LUFT, H. EHMKE u. O. PONGS (2000):

Mice with disrupted bk channel $\beta 1$ subunit gene feature abnormal Ca^{2+} spark/STOC coupling and elevated blood pressure.

Circ. Res. 87: 53-60

POWELL, P.P. u. M. KLAGSBRUN (1991):

Three forms of rat basic fibroblast growth factor are made from a single mRNA and localize to the nucleus.

J. Cell Physiol. 148: 202-210

QIAN, X., A.A. DAVIS, S.K. GODERIE u. S. TEMPLE (1997):

FGF-2 concentration regulates the generation of neurons and glial from multipotent cortical stem cells.

Neuron, 18: 81-93

QUASCHNING, T., F. RUSCHITZKA, S. SHAW u. T.F. LÜSCHER (2001):

Aldosterone receptor antagonism normalizes vascular function in liquorice-induced hypertension.

Hypertension 37: 801-805

QUINN, S.J. u. G.H. Williams (1988):

Regulation of aldosterone secretion.

Annu Rev Physiol., 50: 409-26

RABALLO, R., J. RHEE, R. LYN-COOK, J.F. LECKMAN, M.L. SCHWARTZ u. F.M. VACCARINO (2000):

Basic fibroblast growth factor is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex.

J. of Neuroscience 20: 5012-5023

RAY, J., D.A. PETERSON, M. SCHINSTINE u. F.H. GAGE (1993):

Proliferation, differentiation and long-term culture of primary hippocampal neurons.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3602-3606

RENKO, M., N. QUARTO, T. MORIMOTO, DB. RIFKIN (1990)

Nuclear and cytoplasmatic localization of different basic fibroblast growth factor species.

J Cell Physiol 144: 108-114

RABALLO, R., J. RHEE, R. LYN-COOK, J.F. LECKMAN, M.L. SCHWARTZ u. F.M. VACCARINO (2000):

Basic fibroblast growth factor (fgf-2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex.

The Journal of Neuroscience, 20: 5012-5023

RICHARDS, A.M., M.G. NICHOLLS, E.A. ESPINER, H. IKRAM, M. CULLENS u. D. HINTON (1986):

Diurnal patterns of blood pressure, heart rate and vasoactive hormones in normal man.
Clin. Exp. Hypertens. A. 8: 153-66

ROBERT, V., N. VAN THIEM, S.L. CHEAV, C. MOUAS, B. SWYNGHEDAUW u. C. DELCAYRE (1994):

Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension.
Hypertension 8: 153-166

ROBERTS A.B. u. M.B. SPORN (1990):

The transforming growth factor-betas: past, present, and future.
Ann. N Y Acad Scie 593: 1-6

ROSOLOWSKY, L.J. u. W.B. CABELL (1990):

Endothelin enhances adrenocorticotropin-stimulated aldosterone release from cultured bovine adrenal cells.
Endocrinology 126, 1860-1866

ROSSIER, M.F., M.M. BURNAY, Y. BRANDENBURGER, N. CHERRADI, M.B. VALLOTTON u. A.M. CAPPONI (1996 a):

Sources and sites of action of calcium in the regulation of aldosterone biosynthesis.
Endocr. Res. 22, 579-588

ROSSIER, B.C., S. PRADERVAND, L. SCHILD u. E. HUMMLER (2002):

Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors.
Annu. Rev. Physiol. 64, 877-897

RUSSEL, W.M.S. u. R.L. BURCH (1959):

The Principles of Human Experimental Technique.
London: Methuen, 1959

RUST, M.B., J. FAULHABER, M.K. BUDACK, C. PFEFFER, T. MARITZEN, M. DIDIE, F.X. BECK, T. BOETTGER, R. SCHUBERT, H. EHMKE, T.J. JENTSCH, C.A. HÜBNER (2006):

Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-CL-cotransporter KCC3.

Circulation Research 98: 549-556

SAVAGE, M.P., C.E. HART, B.B. RILEY, J. SASSE, B.B. OLWIN u. J.F. FAON (1993):

Distribution of FGF-2 suggests it has a role in chick limb bud growth.

Dev. Dyn. 198: 159-170

SCHMIDT, R.F. u. K. UNSICKER (2003):

Lehrbuch Vorklinik; Teil C: Anatomie, Biochemie und Physiologie der vegetativen Organsysteme

Deutscher Ärzteverlag, Köln

SCHULTZ, J.E., S.A. WITT, M.L. NIEMAN, P.J. REISER, S.J. ENGLE, M. ZHOU, S.A.

PAWLOWSKI, J.N. LORENZ, T.R. KIMBALL u. T. DOETSCHMAN (1999):

Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response.

J. Clin. Invest. 104: 709-719

SCHWEDA ,F., u. A. KURTZ (2003):

Cellular mechanism of renin release.

Acta Physiol Scand 2004, 181, 383-390

SCHWEDA, F., F. SEGERER, H. CASTROP, J. SCHNERMANN u. A. KURTZ (2005):

Blood pressure-dependent inhibition of renin secretion requires A1 Adenosine Receptors.

Hypertension 46: 780-786

SCHWEIGERER, L., G. NEUFELD, J. FRIEDMAN, J.A. ABRAHAM, J.C. FIDDES u. D. GOSPODAROWICZ (1987):

Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth.

Nature 325: 257-259

SEELIGER, E., T. WRONSKI, M. LADWIG, T. REBESCHKE, P.B. PERSSON u. H.W. REINHARDT (2005):

The "body fluid pressure control system" relies on the renin-angiotensin-aldosterone system: balance studies in freely moving dogs.

Clin Exp Pharmacol Physiol 32: 394-399

SENGER, D.R., S.R. LEDBETTER, K.P. CLAFFEY, A. PAPADOPOULOS-SERGION, C.A PERUZZI u. M. DETMAR (1996):

Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta 3 integrin, osteopontin, and thrombin.

Am. J. Pathol. 149:293-305

SHADE, R.E., V.S. BISHOP, J.R. HAYWOOD u. C.K. HAMM (1990):

Cardiovascular and neuroendocrine responses to baroreceptor denervation in baboons.

Am. J. Physiol. 258, R930-938

Silbernagl, S. u. F. LANG (2005):

Taschenatlas der Pathophysiologie

2. Aufl. Thieme Verlag; Stuttgart, New York

SIMPSON, S.A. u. J.F. TAIT (1953):

The nature of the circulating hormones of the adrenal cortex in man.

Arch Middx Hosp 3: 209-218

SØRENSEN, V., T. NILSEN, A. WIEDLOCHA (2006):

Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting.

BioESSAYS 28: 504-514

SPÄT, A. (1988):

Stimulus-secretion coupling in angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells.

J. steroid.Biochem. 29: 443-453

SPÄT, A., P. ENYEDI, G. HAJNOCZKY u. L. HUNYADY (1991):

Generation and role of calcium signal in adrenal glomerulosa cells.

Exp. Physiol. 76: 859-885

SPANNA, E.P., C. KOPCZYNSKI, C. S. GOODMAN u. C.Q. DOE (1995):

Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS.

Development 121: 3489-3494

SPEIR, E., V. TANNER, A.M. GONZALEZ, J. FARRIS, A. BAIRD u. W. CASSCELLS (1992):

Acidic and basic fibroblast growth factors in adult rat heart myocytes. Localization, regulation in culture, and effects on DNA synthesis.

Circ. Res. 71: 251-259

STAPF, C., G. LUCK, M. SHAKIBAEI u. D. BLOTTNER (1997):

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and FGF-receptor (FGFR-1) immunoreactivity in embryonic spinal autonomic neurons.

Cell Tissue Res. 287: 471-480

STENBERG, B.D., L.G. PHILLIPS, J.A. HOKANSON, J.P. HEGGERS u. M.C. ROBSON (1991):

Effect of bfgf on the inhibition of contraction caused by bacteria.

J Surg Res 50: 47-50

SUTHERLAND, D., C. SAMAKOVLIS u. M.A. KRASNOW (1996):

Branchless encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching.

Cell 87: 1091-1101

TAIT, S.A., J.F. TAIT u. J.P. COGHLAN (2004):

The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function.

Mol. Cell. Endocrinol. 32, 217 (1-2): 1-21

TAKAGI, Y., I., K. NOZAKI, J. TAKAHASHI, J. YODOI, M. ISHIKAWA, N. HASHIMOTO (1999):

Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice.

Brain Res. 831: 283-287

TAUGNER, R., C.P. BUHRLE, E. HACKENTHAL, E. MANNEK u. R. NOIBILING (1984):

Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms.

Contrib. Nephrol. 43, 76-101

TESSIER-LAVIGNE M. u. C.S. GOODMAN (1996):

The molecular biology of axon guidance.

Science 274: 1123-1133

THOMSON, G.H. (1997):

Antagonism within and around the organizer: BMP inhibitors in vertebrate body patterning.

Trends Genet 13: 209-211

TIAN, B., Q.C. MENG, Y.F. CHEN, J.H. KREGE, O. SMITHIES u. S. OPARIL (1997):

Blood pressure and cardiovascular homeostasis in mice having reduced or absent angiotensin-converting enzyme gene function.

Hypertension 30: 128-133

TOURIOL, C., S. BORNES u. S. BONNAL (2003):

Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons.

Cell 96: 169-178

UNGER, E.F., L. GONCALVES, S.E. EPSTEIN, E.Y. CHEW, C.B. TRAPNELL, R.O. CANNON u. A.A. QUYYUMI (2000):

Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast factor in stable angina pectoris.

Am. J. Cardiol. 85: 1414-1419

UNSICKER, K. u. G. WESTERMANN (1992):

Basic fibroblast factor promotes transmitter storage and synthesis in cultured chromaffine cells.

Dev. Brain Res. 62: 211-216

VACCARINO, F.M., M.L. SCHWARTZ, R. RABALLO, J. NILSEN, J. RHEE, M. ZHOU, T. DOETSCHMANN, J.D. COFFIN, J.J. WYLAND u. Y.E. HUNG (1999):

Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis.

Nat. Neurosci. 2, 246-253

VACCARINO, F.M., Y. GANAT, Y. ZHANG u. W. ZHENG (2001):

Stem cells in neurodevelopment and plasticity.

Neuropsychopharmacology 25: 805-815

VAN DIISEL-EMILIANI, F.M., M. DE BOER-BROUWER u. D.G. DE ROOIJ (1996):

Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period.

Endocrinology 137: 647-654

VAN VLIET, B.N., L.L. CHAFE, V. ANTIC, S. SCHNYDER-CANDRIAN u. J.P. MONTANI (2000):

Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure.

J Pharmacological and Toxicological Methods 44: 361-373

VAN VLIET, B.N., L.L. CHAFE u. J.P. MONTANI (2003):

Characteristics of 24 h telemetered blood pressure in eNOS-knockout and C57Bl/6J control mice.

J. Physiol. 549: 313-325

VERLANDER, J.W., K.A. HASSELL, I.E. ROYLAUX, D.M. GLAPION, M.E. WANG, L.A. EVERETT, E.D. GREEN u. S.M. WALL (2003):

Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney. Role of Pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension.

Hypertension 42, 356-362

VERREY, F., J. LOFFING, M. ZECEVIC, D. HEITZMANN u. STAUB (2003):
SGK1: aldosterone-induced relay of Na⁺ transport regulation in distal kidney nephron cells.

Cell. Physiol. Biochem. 13, 21-28

VICARIO-ABEJON, C., K.K. JOHE, T.G. HAZEL, D. COLLAZO u. R.D.G. MCKAY (1995):

Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons.

Neuron 15: 105-114

VIIANUEVA, S., A. GLAVIC, P. RUIZ u. R. MAYOR (2002):

Posterization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction.

Dev. Biol. 15: 289-301

VITZTHUM, H., B. WEISS, W. BACHLEITNER, B.K. KRÄMER u. A. KURTZ (2004):

Gene expression of adenosine receptors along the nephron.

Kidney International 65, S1180-1190

VON DER MARK, K. u. S. GOODMAN (1993):

Adhesive glycoproteins.

In: Connective tissue and its heritable disorders, Royce, P.M. and B. Steinman 211-236

WAGNER, C.A. (2007):

The emerging role of pendrin in renal chloride reabsorption.

Am J Physiol Renal Physiol 292: F912-913

WAGNER, C., B.L. JENSEN, B.K. KRAMER u. A. KURTZ (1998):

Control of the renal renin system by local factors.

Kidney Int. Suppl. 67, S78-83

WALICKE P., W.M. COWAN, N. UENO, A. BAIRD u. R. GUILLEMIN (1986):

Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension.

Proc Natl Acad Sci USA 83: 3012-3016

WALL, S.M. (2006):

The renal physiology of pendrin (SLC26A4) and its role in hypertension.

Novartis Found Symp. 273: 231-239

WEHLING, M. (1997):

Specific, nongenomic actions of steroid hormones.

Annual Review of Physiology 59: 365-393

WEINMEISTER, G. (1998):

Notch signalling: direct or what?

Curr. Opin. Gen. Dev. 8: 436-442

WHITESALL, S.E., J.B. HOFF, A.P. VOLLMER u. L.G. D`ALECY (2004):

Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H2408-H2415

WIEDLOCHA A. u. V. SORENSEN (2004)

Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor.

Curr Top Microbiol Immunol 286: 45-79

WILLIAMS, E.J., J. FURNESS, F.S. WALSH u. P. DOHERTY (1994):

Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth by FGF.

Development 120: 1685-1693

YOSHIMURA, S., Y. TAGAGI, J. HARADA, T. TERAMOTO, S.S. THOMAS, C.

WAEBER, J.C. BAKOWSKA, X.O. BREAKEYFIELD u. M.A. MOSKOWITZ (2001):

FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 98: 5874-5879

ZHOU, M., R.L. SUTLIFF, R.J. PAUL, J.N. LORENZ, J.B. HOYING, C.C. HAUDENSCHILD, M. YIN, J.D. COFFIN, L. KONG, E.G. KRANIAS, W. LUO, G.P. BOIVIN, J.J. DUFFY, S.A. PAWLOWSKI u. T. DOETSCHMANN (1998):

Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone.

Nat. Med. 4: 201-207

ZIGMOND M.J., F.E. BLOOM, S.C. LANDIS, J.L. ROBERTS u. L.R. SQUIRE (1999):

Fundamental Neuroscience. San Diego, CA: Academic

ZIMMERMAN L., J. DE JESUS-ESCOBAR u. R. HARLAND (1996):

The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein.

Cell. 86: 599-606

ZILLES K. u. G. REHKÄMPER (1998):

Funktionelle Neuroanatomie

Springer-Lehrbuch, 3. Auflage

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ehmke danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und für seine stets freundliche und professionelle Betreuung.

Mein Dank gilt ebenso Frau Prof. Dr. Tönhardt für die Übernahme dieser Arbeit zur Vorlage beim Fachbereich der Freien Universität Berlin und für ihre herzliche und engagierte Beratung bei der Anfertigung der Dissertation.

Frau Dr. Mareike Budack möchte ich ganz herzlich für die praktische und theoretische Betreuung dieser Arbeit danken. Liebe Mareike, ich danke Dir für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und Deinen herzlichen und freundschaftlichen Beistand auf allen Ebenen.

Herrn Dr. Blank und Frau Kock möchte ich herzlich für die Unterstützung bei anfallenden Analysen im Labor danken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Universitätsklinikums Eppendorf möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bedanken. Besonders möchte ich mich bei Helga, Alex und Peter für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und für die amüsanten Kaffeepausen bedanken.

Meinen lieben Freunden danke ich ganz herzlich für die immer währende Unterstützung bei beruflichen sowie privaten Problemen. Insbesondere möchte ich Cordelia, Marco und meinem Schwager Nils Bretschneider für engagiertes Korrekturlesen und Michael Schulz für computertechnischen Beistand danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter und meiner Schwester für die stets liebevolle, motivierende und finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Ganz lieben Dank für Euer unermüdliches Daumendrücken und Korrekturlesen und vor allem für den unersetzlichen Rückhalt!

Selbständigkeitserklärung

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

Hamburg, den 3.07.2007

Heike Kilp