

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression von Genen des Endothelin-, Renin-Angiotensin- und
Stickstoffmonoxidsystems in Mäusen mit Endothelin-Typ B-
Rezeptor-Defizit

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von
Juliane Rettig-Zimmermann
Berlin

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. A. Patzak
2. Prof. Dr. med. B. Hoher
3. Prof. Dr. med. F. Schweda

Datum der Promotion: 03.09.2010

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Ang	Angiotensin
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	<i>activator protein 1</i>
AP-2	<i>activator protein 2</i>
AT ₁	Angiotensin Typ 1 Rezeptor
AT _{1A}	Angiotensin Typ 1 Rezeptor Subtyp A
AT _{1B}	Angiotensin Typ 1 Rezeptor Subtyp B
AT ₂	Angiotensin Typ 2
BK(Ca)	kalziumaktivierter Kaliumkanal
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD31	entspricht PECAM (siehe dort)
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	<i>C-type natriuretic peptide</i>
CPI-17	Phosphoproteininhibitor 17
DAG	Diazylglycerol
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECE	<i>endothelin converting enzyme</i>
ECE-1	<i>endothelin converting enzyme 1</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase (Syn. NOS 3)
ET	Endothelin
ET-1	Endothelin 1
ET-2	Endothelin 2
ET-3	Endothelin 3
ET _A R	Endothelin-A-Rezeptor
ET _B R	Endothelin-B-Rezeptor

ET _C R	Endothelin-C-Rezeptor
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
20-HETE	20-Hydroxy-Arachidonsäure
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
iNOS	induzierbare NO-Synthase (Syn. NOS 2)
JAK	Januskinase
K-H-P	Krebs-Henseleit-Puffer
LPS	bakterielle Lipopolysaccharide
MMP	Magermilchpulver
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NF-1	<i>nuclear factor 1</i>
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nNOS	neuronale NO-Synthase (Syn. NOS 1)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
p38 MAPK	<i>p38 mitogen activated protein kinase</i>
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PECAM	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SHR	spontan hypertensive Ratte

TGF *tubuloglomerular feedback* (tubuloglomeruläre Rückkopplung)

TNF- α Tumornekrosefaktor alpha

VSMC *vascular smooth muscle cells* (glatte Gefäßmuskelzellen)

WKY-Ratte Wistar-Kyoto-Ratte

Im Übrigen wurden die gebräuchlichen physikalischen und chemischen Abkürzungen verwendet.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Endothelinsystem	1
1.2	Renin-Angiotensin-System	8
1.3	Stickstoffmonoxidsystem	13
1.4	Regulation der Nierendurchblutung	16
1.5	Herleitung der Fragestellung	19
2	Methoden	20
2.1	Versuchstiere.....	20
2.2	ET _B - <i>knock out</i> -Modell	20
2.3	Evaluation der Eisenoxid-Isolation.....	21
2.3.1	Modell der Eisenoxid-perfundierten Aorta abdominalis.....	21
2.3.2	Gewebebegewinnung	22
2.3.3	Funktionelle Testung der Endothelfunktion von Aortenringen.....	22
2.3.4	Expression von Markergenen des Endothels.....	24
2.3.5	Histologische Aufarbeitung der präglomerulären Gefäße	28
2.4	Expressionsanalyse in präglomerulären Gefäßen	30
2.4.1	Isolation der präglomerulären Gefäße	30
2.4.2	mRNA-Expression von ET _A -Rezeptoren und eNOS in Arteriolen	31
2.5	Expressionsanalyse in der Gesamtniere	32
2.5.1	Isolation von Gesamtnieren	32
2.5.2	mRNA Expression in den Gesamtnieren	32
2.6	Proteingewinnung und –bestimmung, Western Blot	33
2.6.1	Proteinexpression des ET _A -Rezeptors.....	33
2.6.2	Proteinexpression von Endothelin in der Gesamtniere	35
2.7	Statistik.....	36
3	Ergebnisse	36
3.1	Evaluation der Eisenoxid-Isolation.....	36
3.1.1	Dilatationsfähigkeit der isolierten Aorten.....	36
3.1.2	Expression von Markergenen des Endothels.....	37
3.1.3	Histologie der präglomerulären Gefäße	38
3.1.4	Reinheit der Isolation der präglomerulären Gefäßen	40
3.2	Genexpression von Endothelin-, Angiotensin,- und NO-System	41

3.2.1	Expression der Gene des Endothelinsystems	41
3.2.2	Expression von Endothelin im Nierengewebe.....	43
3.2.3	Expression der NOS-Synthasen	43
3.2.4	Expression von Angiotensinrezeptoren.....	45
4	Diskussion	47
4.1	Evaluation der Isolation präglomerulärer Gefäße mittels Eisenoxid	47
4.1.1	Dilatationsfähigkeit der isolierten Aorten.....	47
4.1.2	Expression von Markergenen des Endothels.....	47
4.1.3	Histologie der präglomerulären Gefäße	48
4.1.4	Reinheit der Isolation	49
4.2	Genexpression in den ET _B -Rezeptor-defizienten Mäusen und Wildtypen	49
4.2.1	Endothelinsystem.....	49
4.2.2	Expression der NOS-Isoformen	51
4.2.3	Expression der Angiotensinsysteme	53
5	Zusammenfassung.....	55
6	Literaturverzeichnis	57
7	Anhang	78
7.1	Publikationen und Abstracts	78
7.2	Lebenslauf.....	79
7.3	Danksagung	80
7.4	Erklärung	81

1 Einleitung

Endothelin ist an der Pathogenese arterieller Hypertonie, pulmonalen Hochdruckes, akuten Lungenversagens, koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz sowie chronischen Nierenversagens beteiligt (117; 152).

Diese Krankheitsbilder sind von erheblicher gesundheitspolitischer Bedeutung. Die Prävalenz der arteriellen Hypertonie in Deutschland beträgt in der Altersgruppe von 55 bis 64 Jahren etwa 55 % (82). Arterieller Bluthochdruck zählt zu den wichtigen Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen, die einen vorderen Platz in der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistik einnehmen.

Chronisches Nierenversagen gehört zu den bekannten Ursachen einer arteriellen Hypertonie und besitzt ebenfalls eine große gesundheitsökonomische Relevanz. 65000 Patienten sind derzeit in Deutschland auf eine Dialyse infolge Nierenversagens angewiesen; und deren Zahl vergrößert sich ständig (1).

Die Pathogenese chronischer Niereninsuffizienz ist nicht vollständig aufgeklärt. Das Endothelinsystem wird als ein wichtiger Faktor bei der Entstehung dieses Krankheitsbildes diskutiert. Dabei sind sowohl die vasoaktiven Eigenschaften des Endothelins als auch seine Rolle bei der Entstehung einer Nierenfibrose von Bedeutung.

Renin-Angiotensin- und Stickstoffmonoxid-System interagieren bei der Regulation von renalem Blutfluß und glomerulärer Filtrationsrate mit dem Endothelinsystem (69; 117; 133; 210). In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von Endothelin, der Endothelin- und Angiotensinrezeptoren sowie der Stickstoffmonoxidsynthasen in einem Modell der Endothelin-Typ-B-Rezeptor-defizienten Maus untersucht. Dieses Projekt ist Bestandteil eines Projektes zur Charakterisierung der Funktion der Endothelinrezeptoren bei der Kontrolle glomerulärer Arteriolen, die eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Nierendurchblutung haben.

1.1 Endothelinsystem

Die Rolle von Endothelin in der Pathogenese von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und der Niere ist in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden, jedoch sind bei weitem nicht alle Effekte und Wirkmechanismen dieses Proteins bekannt. Die Wirkungen von Endothelin auf das Nierengewebe sind vielfältig. Endothelin erhöht zum Bei-

1 Einleitung

spiel, exogen appliziert, den renalen Widerstand (189). Mäßige chronische Erhöhungen der Endothelingewebekonzentration in der Niere führen zu Nierenfibrose (87).

An der Endothelinwirkung sind zwei Rezeptortypen beteiligt, ET_A - und ET_B -Rezeptoren. In den Gefäßen werden ET_A -Rezeptoren, welche eine Konstriktion vermitteln, in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (214). ET_B -Rezeptoren, die sowohl dilatatorische als auch konstriktorische Effekte vermitteln können, findet man in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen (94; 143; 214). Endothelin bewirkt eine Kontraktion sowohl der afferenten als auch efferenten Arteriole. Die ET_A - und ET_B -Rezeptoren wirken aber partiell gegensätzlich an den Gefäßen. Die quantitative Verteilung in den verschiedenen Gefäßabschnitten entscheidet über den Nettoeffekt des Endothelins auf den Gefäßtonus.

Struktur/Vorkommen von Endothelin

Endothelin besteht aus 21 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von circa 2,5 kDA. Es kommt in den drei Isoformen ET-1, ET-2 und ET-3 vor (Abb. 1.1.).

ET-1 und ET-2 unterscheiden sich durch 2 Aminosäuren voneinander, während sich ET-2 von ET-3 in 6 verschiedenen Aminosäuren unterscheidet. Durch zwei Disulfidbrücken zwischen Cys1-Cys15 und Cys3-Cys11 erhält Endothelin eine Haarnadelschleifen-Konfiguration (49). Das COOH-terminale Ende des Peptids ist für die biologische Aktivität des Endothelins notwendig.

In der Gefäßwand kommt Endothelin vorwiegend in den Endothelzellen vor. Es konnte ebenfalls in glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert werden (107; 160). Die Endothelinfreisetzung in den Endothelzellen ist jedoch 100-fach höher als die in den glatten Gefäßmuskelzellen. Endothelin wurde unter anderem auch in Myozyten, Nierenepithelzellen, Mesangiumzellen, Trachealepithelzellen und Darmepithelzellen nachgewiesen (194). Plasmakonzentrationen von Endothelin-1 liegen bei Mensch und Tier im Bereich 10^{-12} bis 10^{-11} mol/l (168; 218).

Synthese/Sekretion/Elimination von Endothelin

Im menschlichen Erbgut und im Genom einiger Säugetiere wurden drei Gene für Endothelin entdeckt, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden (93).

Das Gen für ET-1 liegt auf Chromosomen 6, für ET-2 auf Chromosomen 1 und für ET-3 auf Chromosomen 20. Bei Mäusen und Ratten wurde ein Endothelin identifiziert, das

1 Einleitung

als „vasoactive intestinal constrictor“ bezeichnet wird (ET-4) und welches dem humanen ET-2 identisch ist (18; 167).

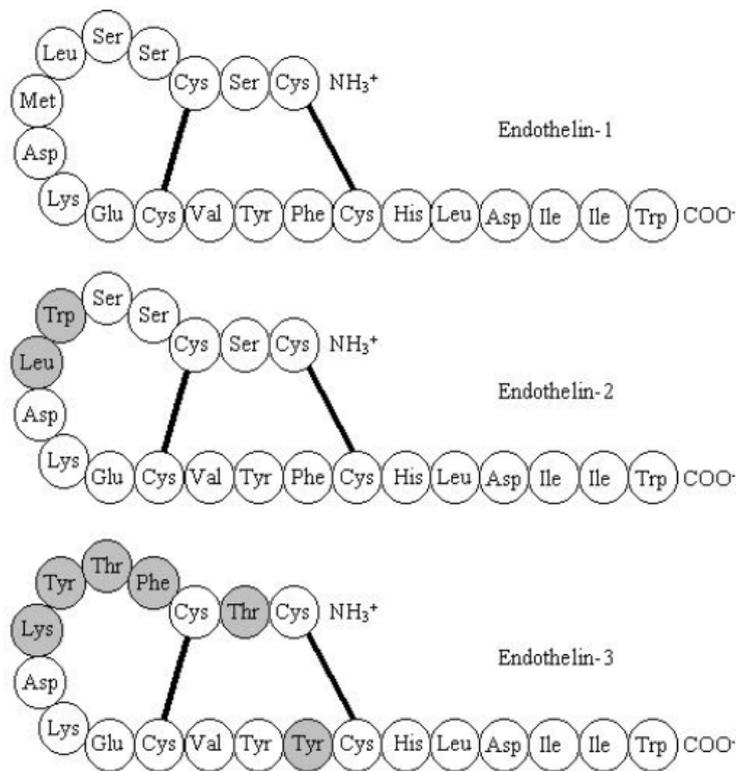


Abb. 1.1: Aminosäurestruktur von ET-1, ET-2 und ET-3. Grau unterlegt sind die von ET-1 abweichenden Aminosäuren (verändert nach (112)).

Das am besten untersuchte ET-1 besitzt fünf Exons und vier Introns mit einer Länge von 6,5 kb. Die ET-Isopeptide entstehen durch posttranslationale Prozessierung der großen Vorläufermoleküle. Das Präpro-ET-1 ist das primäre Produkt und besteht aus 212 Aminosäuren. Durch Abspaltungen des Signalpeptids und eines Aminosäurerestes durch Endopeptidasen entsteht das Pro-ET-1, auch Big-ET-1 genannt, welches nur eine geringe biologische Aktivität entfaltet. Das „endothelin converting enzyme“ (ECE), eine neutrale Metalloprotease, hydrolysiert Big-ET-1 zu ET-1. Vom ECE sind bisher drei Isoformen bekannt, die in verschiedenen Zellkompartimenten und auch membranständig vorkommen (176).

Es ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt, ob eine Speicherung von Endothelin in Zellen stattfindet. In manchen Geweben, wie den Endothelzellen aus Rinderaorten, konnten jedoch mittels Ultrazentrifugation ET-1 und Big-ET-1 enthaltene Vesikel identifiziert

1 Einleitung

werden (79). Für eine ständige Neubildung spricht die Abhängigkeit der Endothelinsekretion vom mRNA-Spiegel (216). Das Endothelin wird von den Endothelzellen hauptsächlich nach basal sezerniert und entfaltet seine Wirkung vorwiegend parakrin und autokrin (206). Für den Abbau von Endothelin wurde eine membranständige Metalloprotease beschrieben. Die Degradierung erfolgt anschließend im Lysosomen.

Endothelinrezeptoren/Signaltransduktion/Funktion

ET-1 ist der stärkste bekannte Vasokonstriktor. Aufgrund dieser Eigenschaft galt das ET-System lange Zeit als ein rein kardiovaskuläres System. Inzwischen wurde deutlich, daß Endotheline auch viele nicht-kardiovaskuläre Funktionen haben. Sie sind an zahlreichen pathologischen Vorgängen beteiligt und spielen eine bedeutende Rolle bei Wachstumsvorgängen und der Apoptose. Innerhalb der Endotheline besitzt ET-1 die stärkste vasokonstriktorische Potenz und ET-3 die schwächste.

Es sind drei Subtypen von ET-Rezeptoren bekannt: ET_A-, ET_B- und ET_C-Rezeptoren, welche die Endothelinwirkungen vermitteln. Bei Säugetieren gibt es ET_A und ET_B-Rezeptoren, die sich in ihrer Affinität zu den Endothelin-Isoformen (169) sowie funktionell in ihrer Wirkung auf die Gefäße unterscheiden (94).

Für die Bindung an den ET_A-Rezeptor gilt: ET-1>ET-2>ET-3, während der ET_B-Rezeptor alle 3 Isoformen mit gleicher Affinität bindet (169). Der ET_C-Rezeptor wurde in der Froschart *Xenopus laevis* nachgewiesen. Er hat eine besondere Affinität zu ET-3 (ET_C-Rezeptor: ET-1=ET-2<<ET-3) (108).

Die Rezeptoren haben ein Molekulargewicht von ca 50kDa und sind sich in ihrer Aminosäurestruktur zu ungefähr 50 % ähnlich. ET_A und ET_B-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der rhodopsinartigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben hydrophoben transmembranen Helices, einem extrazellulären N- und einem intrazellulären C-Terminus sowie jeweils drei extra- und intrazellulären Schleifen (16). Weiterhin enthalten beide Rezeptortypen je zwei Glykosylierungsstellen am N-Terminus (*Asn 29, Asn 62*), 5 Cysteinreste im C-terminalen Bereich in der Nähe der 7. Schleife sowie einige Serinreste, und damit mögliche Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domäne. Nach Bindung von Endothelin ist die Dissoziation eher langsam (85; 208). Es erfolgt eine schnelle Internalisierung des ET-Rezeptor-Komplexes.

1 Einleitung

Die durch ET-1 vermittelte Vasokonstriktion durch den ET_A-Rezeptor erfolgt rasch. Der lang anhaltende vasokonstriktorisches Effekt lässt sich auch durch die langfristige Bindung von ET-1 an seine Rezeptoren erklären. Über spezifische G-Proteine erfolgt die Aktivierung der Phospholipase C, Bildung von Inositoltriphosphat und letztlich die Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dies führt zur ersten Phase der Vasokonstriktion. Die zweite Phase ist vom extrazellulären Ca²⁺-Einstrom abhängig (Abb. 1.2). Die Aktivität der Phospholipasen A₂ und D wird ebenfalls über die ET_A- und ET_B-Rezeptoren stimuliert. Außerdem existiert ein Stickstoffmonoxid-abhängiger Weg über die Guanylatzyklase (156).

Die Aktivierung der ET_B-Rezeptoren fördert auch die NO- und Prostazyklin-Synthese über die Aktivierung der kalziumabhängigen NO-Synthase (eNOS) und der Phospholipase A₂ (83; 209). Das freigesetzte NO diffundiert über die Zellmembran in glattmuskuläre Zellen, aktiviert die lösliche Guanylatzyklase, wobei dann zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzelle über verschiedene Mechanismen inhibiert. Zu den vasoaktiven Substanzen, die via Phospholipase A₂ entstehen, gehören Thromboxan A₂ und Prostaglandin E₂ (Gefäßkonstriktion) sowie Prostazyklin (Dilatation). ET_B-Rezeptoren aktivieren auch die Phospholipase C. Infolge dessen erhöht sich die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die glattmuskuläre Kontraktion wird verstärkt.

ET_B-Rezeptoren sind an der Regulation der ET-1-Plasmakonzentration beteiligt. Verschiedene Studien zeigen eine *clearance*-Funktion von ET_B-Rezeptoren, wobei die Lungenstrombahn am Gesamteffekt zu etwa 50 % beteiligt ist (44; 207). Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über die Signalwege von ET_A und ET_B Rezeptoren.

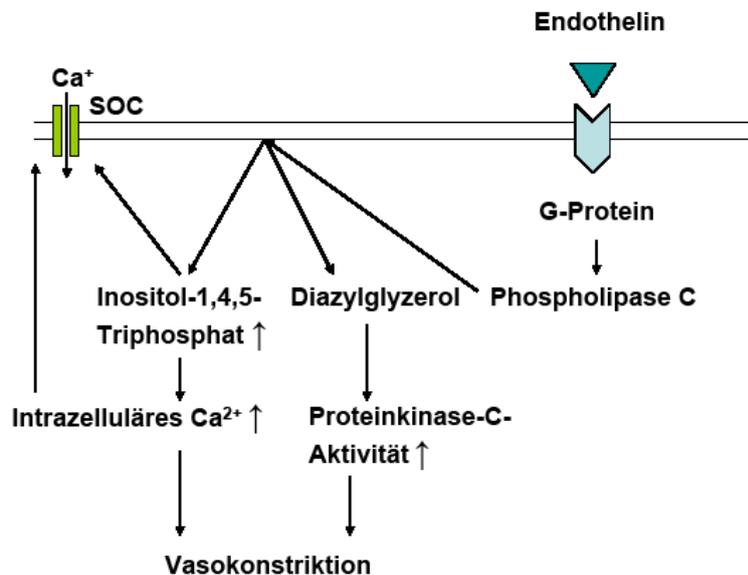


Abb. 1.2: Inhaltlich stark reduzierte Darstellung der Signaltransduktion von ET-Rezeptoren, die zur Kontraktion von glatten Muskelzellen führt: Der aktivierte ET-Rezeptor stimuliert über einen G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionsweg die Hydrolyse von Phospholipase C. Dieses führt zu einem Anstieg von Inositoltriphosphat und Diacylglycerol. Inositoltriphosphat führt zu einer Freisetzung von Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern. Die von Diacylglycerol und Ca²⁺ aktivierte Proteinkinase C sensitiviert den kontraktile Apparat für Kalzium. Das freigesetzte Kalzium führt zur Kontraktion der Muskelzellen (SOC – „store operate calcium channel“, Abbildung verändert nach (118)).

ET_A- und ET_B-Rezeptoren können konstitutive Homo- und Heterodimere bilden. Dies wurde unter anderem funktionell, mittels FRET-Analyse, konfokaler Mikroskopie und Bindungsstudien gezeigt (70; 71). Dimerizationen gibt es möglicherweise auch zwischen ET_A- und AT₁-, D₃- oder alpha1-Rezeptoren. Hierzu liegen Ergebnisse histochemischer Studien bzw. Hinweise aus funktionellen Experimenten vor (33; 65; 162; 220). Solche Rezeptorinteraktionen sind möglicherweise für die zum Teil schwer zu interpretierenden experimentellen Ergebnisse verantwortlich, bei denen keine klare Zuordnung der Funktion von ET_A- und ET_B-Rezeptoren getroffen werden konnte (94; 102).

1 Einleitung

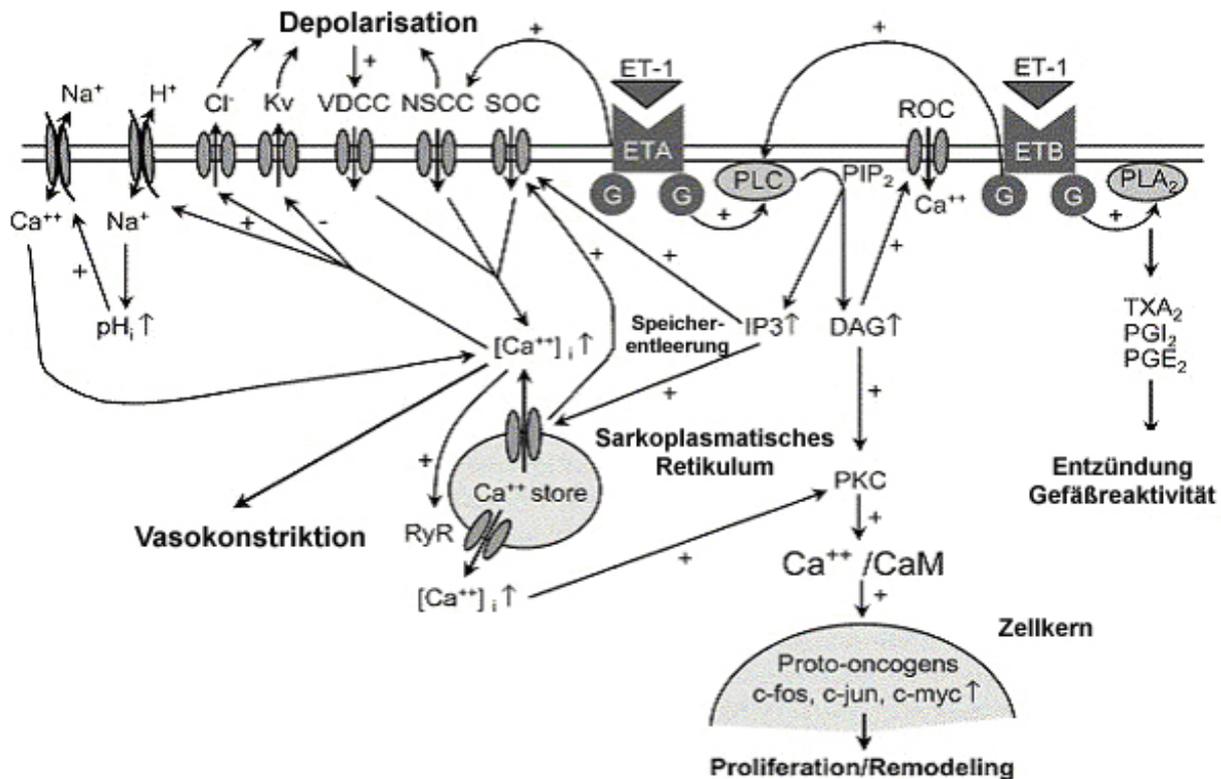


Abb.1.3: Signaltransduktion der ET_A- und ET_B-Rezeptoren (verändert nach (130)). Abkürzungen: CaM – Calcium-Calmodulin-Komplex, DAG – Diacylglycerol, G - G-Protein, IP₃ – Inositoltriphosphat, Kv – „voltage gated potassium channel“, NSCC – „non selective cationic channel“, PIP₂ – Phosphatidylinositolbiphosphate, PKC – Proteinkinase C, PGE₂ – Prostaglandin E₂, PGI₂ – Prostaglandin I₂ (Prostazyklin), PLA₂ – Phospholipase A₂, PLC – Phospholipase C, ROC – „receptor operated calcium channel“, RyR – Ryanodinreceptor, TXA₂ – Thromboxan A₂, VDCC – „voltage-dependent calcium channel“, c-foc, c-jun, c-myc - Transkriptionsfaktoren.

Regulation der Expression von ET-1 und ET-Rezeptoren

Extrazelluläres ET-1 beeinflusst die ET-1-mRNA-Menge in endothelialen Zellen der Lungenstrombahn durch Modulation der RNA-Stabilität und Transkription. Signalwege schließen den ET_B-Rezeptor und seine Endozytose (ET-1/ET_B-Rezeptor-Komplex) sowie ERK und p38 MAPK-Aktivierung ein (52). Dieser negative Rückkopplungsmechanismus, über den die ET-1-Expression reguliert wird, ist für die normale Funktion des Endothelsystems von Bedeutung (171). Die ET-1-Expression wird auch über andere Wege beeinflusst. Ang II zum Beispiel induziert eine ET-Expressions-Steigerung über Redox-sensitive ERK-Signalwege in aortalen glatten Muskelzellen der Ratte (88). Die Expression von ET-Rezeptoren in glatten Muskelzellen verschiedener Gewebe wird durch Langzeittherapie mit ET-1 deutlich vermindert (38; 84; 198). Diese Beobachtung-

gen sprechen für eine autologe Regulation der ET-Rezeptorexpression. ET-1/Rezeptor-Internalisation und Verminderung der mRNA-Expression via ET-1-induzierten Signalwegen sind wesentliche Mechanismen des Effektes (161; 169).

ETA-Rezeptor-mRNA kann durch cAMP erhöht werden, während Dexamethason vermindern wirkt (134; 138). Die Promotorregion der ET-Rezeptorgene ist vermutlich für ihre gewebsspezifische Expression verantwortlich (66).

1.2 Renin-Angiotensin-System

Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems

Das Enzym Renin bewirkt die Bildung von Angiotensin I (Ang I) aus Angiotensinogen. Ang I ist ein Substrat des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) und wird in Ang II umgewandelt. Ang II kann auch über andere Wege unter Umgehung des ACE gebildet werden (21; 47; 195). Hauptquelle für Angiotensinogen ist die Leber. Renin wird in größerem Umfang in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere synthetisiert. Seine Bildung und Ausschüttung unterliegt verschiedenen intrarenalen, sympathischen und humoralen Einflüssen (34).

Ang II hat viele Effekte (Abb. 1.4). Es ist ein Vasokonstriktor, erhöht die Aldosteronbiosynthese, -sekretion und damit die Natriumretention. Beide Wirkungen sind blutdrucksteigernd. Ang II kann die Katecholaminfreisetzung, Sekretion von adrenokortikotropem Hormon (ACTH) sowie von Vasopressin stimulieren und hat eine dispogene Wirkung (58; 73). Ang II besitzt darüber hinaus wachstumsfaktorähnliche Wirkungen und stimuliert die Hypertrophie und Proliferation von Zellen (55; 190).

Durch Abbau des Ang II mit Hilfe verschiedener Aminopeptidasen entstehen Angiotensinfragmente wie das Angiotensin 2-8 (Ang III), Angiotensin 3-8 (Ang IV) und Angiotensin 1-7, für die ebenfalls eine biologische Aktivität nachgewiesen werden konnte (58; 73). Die Degradierung der Substanzen führt schließlich zum inaktiven Metaboliten.

Es gibt neben dem systemischen Renin-Angiotensin-System (RAS) auch lokale RAS in verschiedenen Organen, deren Regulation möglicherweise unabhängig von zirkulierenden Komponenten des RAS erfolgt (24; 46; 149). Lokal produziertes Ang II kann in diesen Organen als para- und autokrines Hormon wirken und beispielsweise Zellwachstum und Proliferation stimulieren (50; 72).

Eine weitere Komponente des RAS ist das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2). Es ist an der Bildung vasodilatatorisch wirkender Mediatoren beteiligt. Neuere

Untersuchungen deuten auf eine Bedeutung des ACE2 bei der Regulation kardialer Funktionen hin (31; 35; 41; 201; 212).

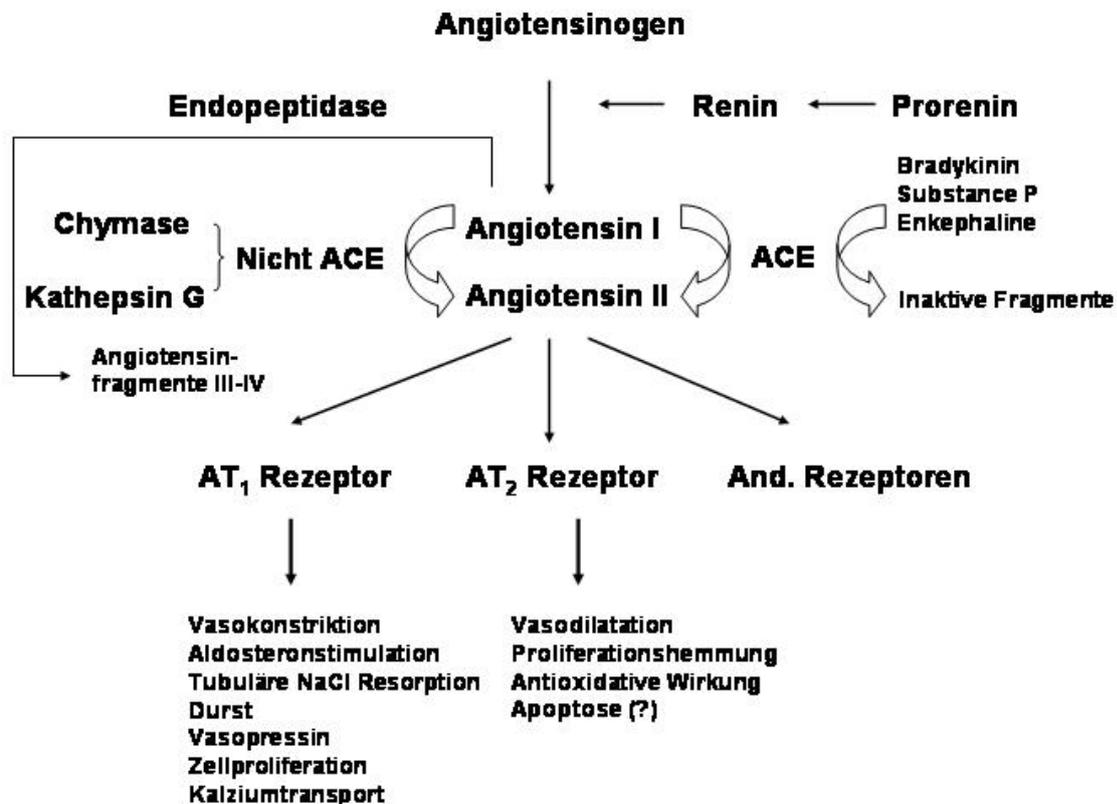


Abb.1.4: Die enzymatische Proteinkaskade des Renin-Angiotensin- Systems (RAS) und seine Funktionen: Das proteolytische Enzym Renin spaltet aus dem Angiotensinogen, welches in der Leber synthetisiert wird, das Angiotensin I ab. Dieses wird dann durch das ACE, das größtenteils an der luminalen Oberfläche des Endothels lokalisiert ist, in das Angiotensin II umgewandelt. AT II ist das biologisch aktive Peptid, welches durch spezifische Bindung an verschiedenen Rezeptoren die Effekte an Herz, Gefäßen, Niere und anderen vermittelt. Es besteht eine höhere Affinität zum AT₁ Rezeptor als zum AT₂ Rezeptor (verändert nach (204))

Angiotensin-Rezeptoren

Es gibt zwei Rezeptortypen: Typ 1 (AT₁) und Typ 2 (AT₂). Der AT₁-Rezeptor vermittelt die meisten der bekannten Wirkungen von Ang II. Es wurden zwei Subtypen des AT₁-Rezeptors, AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren, beschrieben. Diese sind in ihrer Aminosäurestruktur zu mehr als 95 % identisch. Die Differenzierung von AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren mittels pharmakologischer Methoden ist aufgrund gleicher Bindungseigenschaften schwierig (37; 172; 217). Beide Rezeptorsubtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer

1 Einleitung

Expression im Gewebe und Expression in verschiedenen Spezies, der chromosomalen Lokalisation und Regulation (80; 98; 98). AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptor-mRNA wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wobei AT_{1A} -Rezeptoren, außer in der Hypophyse und den Nebennieren, dominieren.

AT₁-Rezeptoren

Die Expression von AT_1 -Rezeptoren wird durch negative Rückkopplung durch Agonisten (Ang II) kontrolliert. Akute Ang II-Behandlungen erhöhen die Rezeptordichte, während chronische Ang II-Konzentrationserhöhungen mit einer Verminderung der Expression von AT_1 -Rezeptoren einhergehen. Es gibt zudem hormonale Regulationsmechanismen und Wachstumsfaktoren, welche die AT_1 -Rezeptorexpression beeinflussen (42; 75). An glatten Gefäßmuskelzellen führten NO, Schilddrüsenhormone, PGF, EGF, und Östrogene zu einer Verminderung der AT_{1A} -Rezeptorexpression (105), während LDL, Progesteron und Insulin sie erhöhen (siehe (124)).

Entsprechend seiner vielfältigen Funktionen aktiviert Ang II eine ganze Reihe von Signalkaskaden. Diese sind G-Protein vermittelt oder laufen über andere Wege. AT_1 -Rezeptoren können unter anderem auch mit Tyrosinkinasen, FAK oder JAK interagieren. Viele Effekte von Ang II finden in glatten Muskelzellen statt. Da Gefäßmuskelzellen und ihre Funktion bei der Einstellung des Gefäßtonus in der vorliegenden Schrift im Mittelpunkt stehen, wird auf Signalwege eingegangen, die für diese Funktion eine Rolle spielen.

Die Agonist- AT_1 -Rezeptor-Interaktion aktiviert G-Proteine, deren Zielstrukturen Phospholipasen (PLC, PLA_2 , PLD) sind. PLC produziert Diazylglyzerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3), welches sarkoplasmatische Kalziumkanäle öffnet und die zytoplasmatische Kalziumkonzentration erhöht. Das Kalzium verbindet sich mit Calmodulin. Dieser Komplex aktiviert die Myosinleichtkettenkinase (MLCK), wobei die Phosphorylierung der Leichtkette zur Verstärkung der Interaktion von Myosin und Aktin führt und damit den kontraktile Status erhöht (215).

Ein anderer wichtiger Weg führt zur Hemmung des Gegenspielers der MLCK – der Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP), mit dem Ergebnis der Erhöhung der Kalziumsensitivität des kontraktile Apparates. Dieser Mechanismus spielt für die Aufrechterhaltung der Kontraktion eine Rolle. Die MLCP kann via Rho-kinase und Proteinkinase (PKC) gehemmt werden. Der Phosphoproteininhibitor CPI-17 hemmt auch die MLCP

1 Einleitung

und wird unter anderem durch PKC-Signalwege aktiviert. Eine Übersicht über weitere Signalwege des AT₁-Rezeptors, die für die Kontraktion ebenfalls von Bedeutung sein können, gibt Abbildung 1.5.

AT₂-Rezeptoren

Über die biochemischen und physiologischen Funktionen von AT₂-Rezeptoren ist immer noch verhältnismäßig wenig bekannt. AT₂-Rezeptoren sind in der Fötalperiode stark exprimiert, weshalb eine Beteiligung an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen angenommen wird (4; 62; 202). Postnatal nimmt die Expression des AT₂-Rezeptors innerhalb weniger Wochen ab und beschränkt sich auf bestimmte Organe und Gehirnregionen (68; 203).

Möglicherweise ist in der Signalkaskade ein inhibitorisches G- Protein eingeschaltet, welches vor allem Phosphatasen aktiviert. Diese können durch Dephosphorylierung die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen hemmen, die eine wichtige Rolle bei der Proliferation spielen. Ebenfalls kommt es zur Inaktivierung der ERK, zur Öffnung von „*delayed rectifier*“ Kaliumkanälen und zur Inhibition von T-Typ-Kalziumkanälen (99).

AT₂-Rezeptoren induzieren die Freisetzung zahlreicher Substanzen in Gefäßen wie z.B. Bradykinin oder NO und können an Gefäßen vasodilatatorisch wirken (25; 39; 64).

Die Lokalisation des AT₂-Rezeptors in der Niere ist nicht gut untersucht. Es wird eine entwicklungsabhängige Expression diskutiert. *In situ*-Hybridisierungsexperimente von Shanmugam et al. (185) wiesen AT₂-Rezeptoren nur in fetalen und unreifen Rattennieren nach. In jüngster Zeit gelang der immunhistochemische Nachweis des AT₂-Rezeptors in Glomeruli sowie proximalen und distalen Tubuli adulter Ratten (127; 187). Die RT-PCR von isolierten afferenten Arteriolen zeigte, dass die AT₂-mRNA in nur sehr geringen Mengen in präglomerulären Gefäßen von Ratten zu finden ist (144). Der AT₂-Rezeptor konnte nicht oder nur in geringem Ausmaß in einigen Bindungsstudien nachgewiesen werden (3; 166; 182). In Glomeruli, Markstrahlen und der Medulla von Mäusen wurde dagegen Rezeptorprotein mittels fluoreszierender Antikörper identifiziert (5).

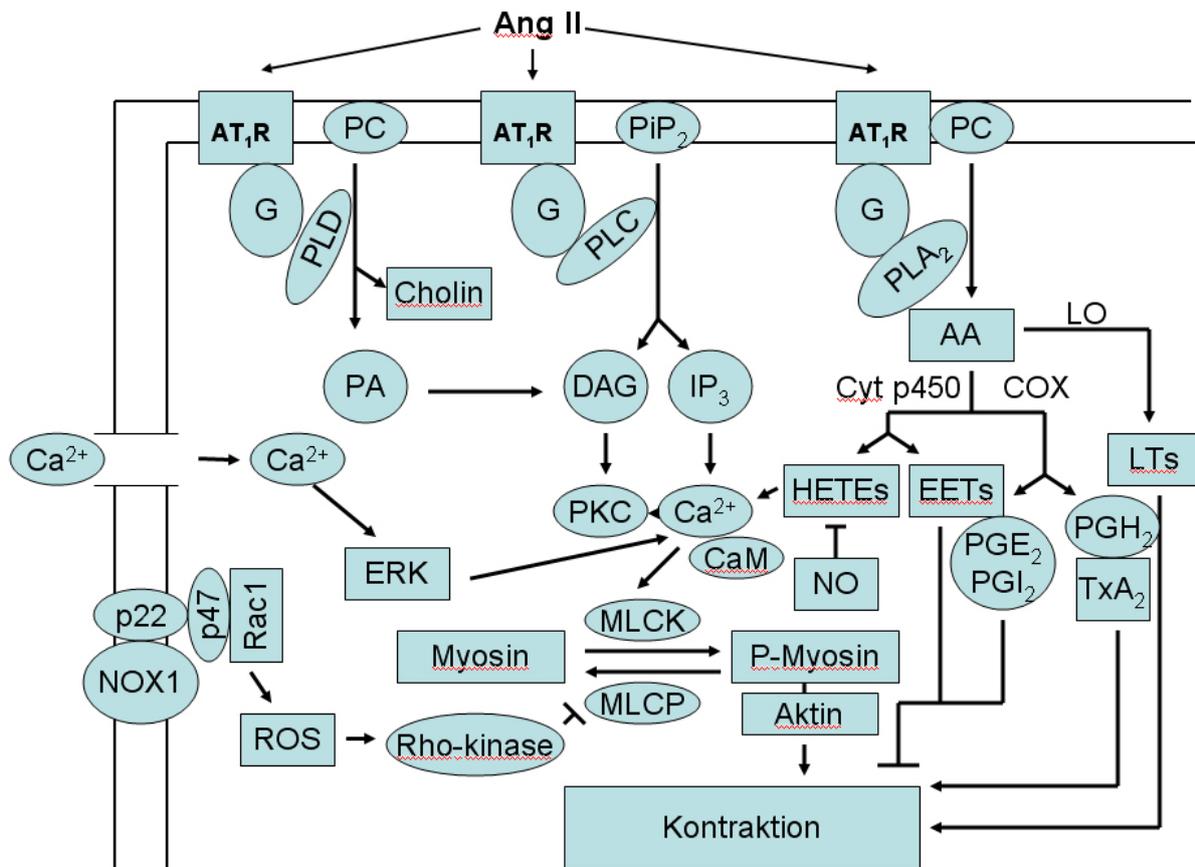


Abb. 1.5: Signalwege für die Ang II-induzierte Kontraktion. PC – Phosphatidylcholine, PIP₂ – Phosphatidylinositolbisphosphat, G – G-Protein, PLD – Phospholipase D, PLC – Phospholipase C, PLA₂ – Phospholipase A₂, PA – phosphatidische Säure, DAG – Diacylglycerol, IP₃ – Phosphatidylinositoltriphosphat, AA – Arachidonsäure, LO – Lipoxygenase, Cyt p450 – Cytochromoxidase p450, COX – Cytochrom-c-oxidase, LTs – Leukotriene, HETEs – „Hydroxyeicosatetraenoic acid“, EETs - epoxyeicosatrienoic acid, PGE₂ – Prostaglandin E₂, PGI₂ – Prostaglandin I₂ (Prostazyklin), PGH₂ – Prostaglandin H₂, TxA₂ – Thromboxan A₂, ERK – „extracellular signal-regulated kinases“, PKC – Proteinkinase C, CaM – Calmodulin, NO- Stickstoffmonoxid, NOX1 – NADPH-oxidase 1, p22 - p22 Phagozytenoxidase (phox), p47 – p47 phox, Rac1 - Ras-related-C3-Botulinumtoxinsubstrat 1, MLCK - Myosinleichtkettenkinase, MLCP – Myosinleichtkettenphosphatase, ROS – „reactive oxygen species“.

Interaktion von Endothelin- und Renin-Angiotensin-System

ET-1 und Ang II haben eine Reihe von funktionellen Gemeinsamkeiten, zum Beispiel hinsichtlich ihres vasokonstriktorisches Effektes, des fibroseinduzierenden Einflusses auf Zellen und ihrer Rolle bei der Hypertoniepathogenese. *In vivo*-Experimente weisen zudem auf Interaktionen beider Substanzen hin, die über eine rein additive Wirkung hinausgehen (165). Das Renin-Angiotensin- und Endothelinsystem interagieren bei einer Reihe von Hypertonie-modellen. Hemmung der ET_A- und ET_B-Rezeptoren durch Bosen-

tan verminderte den Ang II induzierten Blutdruckanstieg in SHR und WKY-Ratten (11). Salzreiche Diät allein oder in Kombination mit Ang II erhöhte die Endothelinausscheidung und ET-1 Immunreaktivität im Kortex und in der äußeren Medulla bei Sprague-Dawley-Ratten (173). Ebenfalls in Sprague-Dawley-Ratten führte eine Ang II-Behandlung (5 Tage) zur Erhöhung der ET-1 Expression in glattmuskulären Zellen (158). Der Blutdruckanstieg wurde hier durch ET_A- und AT₁-Antagonisten vermindert. In einem ähnlichen Modell führte eine Ang II-Behandlung (2 Wochen) zum Anstieg der renalen und mesenterialen ET-1- und ECE-Konzentration (12; 129). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Teil der Ang II-Effekte durch das Endothelinsystem vermittelt werden.

Ang II stimuliert die ET-1- (prepro ET-1) und ECE-1-Synthese möglicherweise durch Modulation der Transkription beider Gene. Untersuchungen in Endothel- und glattmuskulären Zellkulturen zeigen, dass AT₁-Rezeptor induzierte Signalwege über AP-1/PKC und ERKs dabei eine Rolle spielen (29; 76; 88; 92; 95; 165; 192).

ET-1 hemmt die Sekretion von Renin aus juxtaglomerulären Zellen der Niere. Dieser Effekt konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden (2; 14; 111; 128). Potentielle Signalwege dieser ET-1-Aktion schließen ET_A- und ET_B-Rezeptoren ein, welche die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen (via ET_A) und damit die Reninsekretion hemmen (74). ET_B-Rezeptoren können die NO-Freisetzung stimulieren und hemmen somit die Reninfreisetzung (170). Ein anderer möglicher Weg verläuft über die Aktivierung der PKC (siehe auch (165)).

1.3 Stickstoffmonoxidsystem

Stickstoffmonoxid (NO) (56) wird im Wesentlichen durch die drei Isoformen der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) gebildet, nämlich den beiden konstitutiven Formen der endothelialen (eNOS) und neuronalen NOS (nNOS), sowie der induzierbaren NOS (iNOS). NO ist ein farbloses Gas mit einem Molekulargewicht von ca 30 Da. Die Halbwertszeit beträgt im Schnitt nur wenige Sekunden (122).

NO hat eine ganze Reihe von Funktionen. Es spielt unter anderem eine Rolle bei der Gedächtnisbildung durch Verstärkung der Langzeitpotenzierung (53), moduliert den TGF (151), beeinflusst die Reninfreisetzung (151) (nNOS-Effekte) und ist ein wichtiger Faktor bei der Regulation der Gefäßweite (eNOS) (56).

1 Einleitung

NO entsteht, indem die semi-essentielle Aminosäure L-Arginin durch die NOS zu L-Citrullin und NO verstoffwechselt wird (9).

Der grundsätzliche biologische Unterschied der NOS-Isoformen besteht darin, dass die konstitutiven NOS durch biologische Stimuli NO nur über einen begrenzten Zeitraum von Sekunden und in der Größenordnung von picomolaren Konzentrationen synthetisieren, während die iNOS nach der Induktion in der Lage sind, über Stunden bis Tage NO in nanomolaren, also wenigstens drei Zehnerpotenzen höheren Konzentrationen, zu produzieren (153). Die konstitutiv exprimierten Isoformen sind dabei Calmodulin-abhängig, unterliegen also einer Kontrolle durch den intrazellulären Kalzium-Stoffwechsel (115).

Die eNOS ist funktionell mit der Regulation der lokalen und systemischen Hämodynamik verbunden. Die NO-Effekte werden überwiegend durch eine Aktivierung der löslichen Form der Guanylatcyclase und Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration in den glatten Muskelzellen der Gefäße vermittelt. NO wirkt also auf den Gefäßtonus durch Bildung von cGMP, welches phosphorylierende Enzyme aktiviert. Die Mechanismen, die zur Gefäßdilataion führen sind vielfältig und reduzieren im Ergebnis die zytosolische Kalziumkonzentration. Dazu gehören die Stimulation der Kalziumpumpe und der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher an der Plasmamembran (57) sowie ein Anstieg der Aktivität der sarkoplasmatischen Kalziumpumpe (30). Ein anderer Signalweg betrifft die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), welche kalziumaktivierte Kaliumkanäle (BK(Ca)) aktiviert, hyperpolarisiert und damit Gefäßmuskelzellen relaxiert (67). Die dilatative Wirkung von NO/cGMP ist aber auch mit einer Verminderung der Kalziumsensitivität des kontraktile Apparates verbunden (20; 175).

Die iNOS, welche zunächst in Makrophagen entdeckt wurde (191), kann in vielen Körperzellen exprimiert werden. Die NO-Synthese erfolgt offensichtlich nur nach Stimulation, z.B. durch LPS und Zytokine. NO, das von der iNOS produziert wird, spielt unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle. Dies schließt sowohl die Blutdruckregulation, als auch Entzündungen, Infektionen und die Entstehung maligner Erkrankungen ein. Die iNOS ist ein Mediator unspezifischer Abwehr und hat für die Bekämpfung von Bakterien, Viren und Parasiten Bedeutung (119).

Während iNOS und nNOS nur zytosolisch lokalisiert sind, kommt die eNOS sowohl zytosolisch als auch membrangebunden vor. Die iNOS ist im Gegensatz zu den anderen

1 Einleitung

Formen nicht Kalzium/Calmodulin-abhängig. In der Niere ist die eNOS unter anderem im Endothel der Nierenarterien und Arteriolen (8; 91) und die nNOS vorrangig in der Macula densa exprimiert (9). Die iNOS ist unter physiologischen Bedingungen nur gering exprimiert und findet sich in infiltrierenden Makrophagen, Tubuluszellen und in Mesangialzellen.

Regulation der Expression und Interaktion mit dem Endothelinsystem

Der Genlocus der NOS-Isoformen ist verschieden. Die eNOS wird auf Chromosom 7, nNOS auf Chromosom 12 und iNOS auf Chromosom 17 codiert. Das Molekulargewicht der NOS beträgt 130000-160000 Da.

Obwohl eNOS und nNOS als konstitutiv exprimierte NOS-Isoformen bekannt sind, unterliegt ihre Expression verschiedenen Einflußfaktoren. Für das eNOS-Gen sind *consensus sites* für die Kontrolle durch AP-1, AP-2, NF-1 und *acute phase reactants* sowie durch Scherkraft vorhanden. Experimentelle Befunde deuten auf eine Erhöhung des Transkripts durch Scherkräfte (137), physische Aktivität (184) und Hypoxie hin. TNF- α vermindert die eNOS-Expression durch Verminderung der RNA-Stabilität (219). Die Ergebnisse zur Rolle von Östrogenen sind widersprüchlich (6; 110). Scherkraft und Endothelzellproliferation sind die starken Einflussfaktoren, die ihre Wirkung über die transkriptionelle und postranskriptionelle Mechanismen entfalten.

Die Aktivitätsmodifikation der eNOS hat möglicherweise eine größere Bedeutung als die Kontrolle der Transkription/Translation für die NO-Produktion (7). Posttranslationelle Mechanismen, wie zum Beispiel eNOS-Phosphorylierung, sind daran beteiligt und vermitteln auch akute Scherkraftwirkungen (126). Die räumliche Beziehung zu Caveolae der Zellmembran moduliert ebenfalls die Aktivität der eNOS. Das Enzym interagiert mit Caveolin-1, das einen hemmenden Einfluß ausübt. Dieser Effekt wird durch Ca^{2+} -Calmodulin aufgehoben, ist ein wesentlicher Teil des Signalweges verschiedener Agonisten an Endothelzellen und wird auch bei der Scherkraft-induzierten vermehrten Freisetzung von NO diskutiert (125).

Hohe ET-1-Konzentrationen können die endotheliale NO-Produktion über eine isoform-spezifische PKC-vermittelte Hemmung der eNOS-Expression in humanen endothelialen Zellen der V. saphena vermindern (159). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass ET-1 die Expression von Caveolin-1 and eNOS verringert. BQ788, ein ET_B -

1 Einleitung

Rezeptorantagonist, und das radikalvermindernde Apocynin unterdrücken die ET-1-Wirkung (40).

Wie schon erwähnt, wird die iNOS vorrangig nach Stimulation exprimiert. Zu den Stimulatoren zählen Interleukin-1, Interferon- γ , TNF- α , cAMP, cGMP, NF κ B, während eine hemmende Wirkung für NO und Glukokortikoide beschrieben wurde. Mechanismen der Genregulation schließen Transkriptions- und mRNA-Stabilitätsmodulation ein.

1.4 Regulation der Nierendurchblutung

Autoregulation der Nierendurchblutung

Die Nieren (2 % der Körpermasse) erhalten 25 % des Herzminutenvolumens. Dieser beträchtliche Blutfluß wird durch den systemischen Blutdruck getrieben. Die Autoregulation der Nierendurchblutung, d.h. Aufrechterhaltung stabiler Perfusion und stabilen Druckes, bei wechselnden systemischen Blutdrücken, ermöglicht eine konstante Filtrationsrate und damit Resorption wichtiger Elektrolyte (32).

An der Regulation der Nierendurchblutung sind verschiedene Systeme beteiligt. Dazu gehören systemische Komponenten wie das Renin-Angiotensin-System, Vasopressin, efferente sympathische Aktivität, sowie die natriuretischen Peptide ANP, BNP, CNP, lokale oder parakrine Komponenten wie Faktoren aus dem Endothel (NO, Endothelin, Arachidonsäurederivate) und lokale Renin-Angiotensin-Systeme (135). Der renale Perfusionsdruck stellt ebenfalls einen Regulationsfaktor dar (32). Obwohl die regulatorische Potenz dieser Systeme in vielen Untersuchungen gezeigt wurde, sind sie letztlich der Autoregulation untergeordnet.

An der renalen Autoregulation sind drei Mechanismen beteiligt: eine schnelle myogene Antwort der glatten Muskulatur der Nierengefäße (insbesondere der afferenten Arteriolen)(81; 100), die tubuloglomeruläre Rückkopplung (179), sowie ein vermutlich metabolisch getriebener Einfluß auf die Gefäßweite (101; 183).

Rolle des Renin-Angiotensin-, Endothelin und Stickoxidsystems

Ang II konstringiert die renalen Arterien und Arteriolen dosis- bzw. konzentrationsabhängig (4; 145; 147; 148), erhöht damit den totalen Widerstand der Niere und vermindert die Nierendurchblutung (109; 136; 164). Diese experimentellen Befunde weisen auf eine wichtige Rolle von Ang II bei der Regulation von Nierendurchblutung und Filtration

1 Einleitung

hin. Quellen des Ang II sind das systemische „klassische“ Renin-Angiotensin II-System und lokale Systeme. Renin wird durch sympathische Aktivierung, den intrarenalen Drucksensormechanismus bzw. durch Signale von Macula densa Zellen (Prostaglandine) - bei chronisch niedrigen NaCl-Konzentrationen im distalen Tubulus – aus den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole freigesetzt (181). Die Reninfreisetzung wird durch negative Rückkopplungsmechanismen begrenzt: Ang II, ein höherer Blutdruck, Erhöhung der NaCl-Bestandes und Zunahme des extrazellulären Volumens vermindern die Reninfreisetzung (181).

Die Ang II-induzierte Gefäßkonstriktion in der Niere wird über AT_1 -Rezeptoren vermittelt. Parallele NO-Freisetzung dämpft die konstriktorische Wirkung, wie in Modellen isoliert perfundierter Arterien und Arteriolen der Niere gezeigt wurde (146; 155; 199). Möglicherweise wird aber auch durch Aktivierung des AT_2 -Rezeptors NO in der Niere freigesetzt, wie es andere Studien unter Verwendung einer renalen Dialysemethode beschrieben (25; 188).

Ang II moduliert den TGF, der eine Verbindung zwischen der NaCl-Konzentration/Beladung des distalen Tubulus, als Ergebnis von glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Resorptionsrate, und dem Kontraktionszustand der afferenten Arteriole herstellt. Erhöhte Konzentration/Beladung mit NaCl führt zur Kontraktion der afferenten Arteriole und damit Reduktion der GFR. Damit können kurzfristig NaCl-Verluste vermieden werden (179). Transmitter zwischen den Sensorzellen des distalen Tubulus (Macula densa) und den glattmuskulären Zellen der afferenten Arteriole sind Adenosine und ATP (15; 77; 78; 113). Die Mehrzahl der experimentellen Arbeiten sprechen für eine synergistische und mehr als additive Wirkung von Ang II auf den TGF bzw. die Adenosinwirkung an der afferenten Arteriole (77; 114; 213). AT_{1A} -Rezeptor-Defizit oder AT_1 -Rezeptor-Inhibition gehen mit vermindertem TGF unter *in vitro*-Bedingungen einher (180; 213). Die Befunde unterstreichen die große Bedeutung von Ang II für den TGF und die renale Autoregulation.

Exogen zugeführtes ET-1 führt ebenfalls zu einer Verminderung von renalem Blutfluß und GFR (23; 103; 104; 154; 205). Diese Eigenschaft wird als pathogenetischer Faktor für chronisches Nierenversagen angesehen (19; 22; 43; 63; 117). Dafür spricht auch, daß selektive ET_A -Rezeptorinhibition oder nichtselektive ET-Rezeptorblockade die eingeschränkte Nierendurchblutung verbessert (26; 123; 140). ET_B -Rezeptoren-Blockade verstärkt dagegen eher ET-1-bedingte Gefäß- und Perfusionsveränderungen (123). ET-

1 Einleitung

1-Effekte auf die renale Hämodynamik sind speziesspezifisch: Während eine ET_B -Rezeptorblockade bei Ratten eher geringe Auswirkungen auf den Blutfluß hat, kommt es beim Menschen zu einer deutlichen Vasokonstriktion. ET_B -Rezeptoren haben offensichtlich einen Einfluß auf den (Ruhe)Gefäßtonus bei Menschen (63).

Zwei ET-Rezeptorsubtypen mit multiplen Funktionen sowie deren ungleiche Expression in vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen sind ein Grund für Schwierigkeiten bei der Interpretation von ET-1-Effekten in verschiedenen experimentellen Modellen. Es wurde schon oben erwähnt, dass auch homologe oder heterologe Rezeptordimerisationen in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein können. Funktionelle und histologischen Studien weisen auf konstriktorische Effekte von ET_A - und ET_B -Rezeptoren in glatten Gefäßmuskeln hin (54; 214). ET_B -Rezeptoren werden aber auch in Endothelzellen exprimiert und sind hier vasodilatatorisch wirksam (214). Der dilatatorische Effekt wird vermutlich durch NO und Prostaglandine vermittelt (141) Die differentielle ET-Rezeptorexpression im Vergleich von afferenten und efferenten Arteriolen ist Ursache unterschiedlicher Wirkung von ET-1 auf beide Gefäßtypen und damit auf die GFR. Allerdings sind die dazu erhobenen Befunde in der Literatur widersprüchlich, sowohl Erhöhungen als Erniedrigungen der GFR wurden beobachtet (48; 94; 116; 121). Endothelin hat einen Einfluß auf die renale Autoregulation. Blockade des ET_B -Rezeptors führte bei Ratten zu einer Verstärkung der myogenen Komponente (186). Hinsichtlich möglicher ET-1-Wirkungen auf den TGF liegen keine eindeutige Daten vor (163; 193).

Wichtige Gegenspieler vasokonstriktorischer Aktivität von Agonisten in der Niere sind die konstitutiven NO-Systeme. NO dilatiert renale Gefäße. Es gibt sowohl eine tonische Komponente als auch Agonist-induzierte NO-Freisetzungen in renalen Gefäßen (13; 90; 96; 97). Sowohl Ang II als auch ET-1 können über AT_{1-} , AT_{2-} bzw. ET_B -Rezeptoren eigene konstriktorische Effekte durch Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit im Gefäß balancieren (90; 146). Im Bereich des juxtaglomerulären Apparates der Niere respektive der glomerulären Arteriolen sind sowohl die eNOS als auch nNOS an der Generierung von NO und Einstellung des Gefäßtonus beteiligt (148). Insbesondere von der nNOS produziertes NO aus den Macula densa-Zellen moduliert den TGF im Sinne einer Abschwächung. Die Regulationsmechanismen der NO-Freisetzung hierbei sind im Detail noch nicht bekannt (17; 178; 200).

1.5 Herleitung der Fragestellung

Die Literaturübersicht zeigt, dass das Renin-Angiotensin-, Endothelin- und NO-System und deren Interaktion für die Autoregulation und Modifikation der Nierendurchblutung wichtig sind. Dabei spielen nicht nur synergistische und antagonistische Funktionen bei der Einstellung von Gefäßtonus und -reaktivität eine Rolle. Es gibt vielmehr auch Hinweise auf gegenseitige Beeinflussungen der Expression von Rezeptoren und Enzymen.

Im Rahmen eines Projektes zur Untersuchung der physiologischen Rolle des Endothelinsystems bei der Regulation glomerulärer Arteriolen werden ET_B -Rezeptor-defiziente Mäuse (142) als ein Modell zur Untersuchung von Rezeptorfunktionen an diesen Gefäßen verwendet.

Es wird die Hypothese aufgestellt, dass ein (angeborenes) ET_B -Rezeptor-Defizit die Expression der ET-1-Gewebekonzentration in der Niere, die Expression von ET_A -, Angiotensin-Rezeptoren sowie von NOS-Isoformen in den glomerulären Arteriolen verändert. Dies ist Gegenstand der vorliegenden Schrift. Kenntnisse über die erwarteten Genexpressionsänderungen sind für die Interpretation funktioneller Untersuchungen an Gefäßen notwendig.

Daraus werden folgende Aufgabenstellungen abgeleitet:

1. Etablierung einer Methode zur Gewinnung einer adäquaten Menge und Qualität glomerulärer Arteriolen (afferente Arteriolen).
2. Überprüfung der Verwendbarkeit der Methode für die quantitative Bestimmung der Expression auf mRNA- und Protein-Ebene.
3. Bestimmung der mRNA-Expression für die relevanten Gene in ET_B -defizienten Mäusen und Wildtypen mit *real-time*-RT-PCR
4. Bestimmung der Protein-Expression für die relevanten Gene in ET_B -defizienten Mäusen und Wildtypen mittels Western-Blot

2 Methoden

2.1 Versuchstiere

Es wurden C57BL6-Mäuse im Alter von ca. 6 Monaten (25-30 g Körpermasse) für die methodischen Arbeiten zu den Eisenoxideffekten bei der Isolation von afferenten Arteriolen verwendet. Die Bestimmung der Gen-Expression erfolgte an genetisch veränderten männlichen und weiblichen Mäusen (*rescued* ET_B-knock out-Mäuse) und Wildtypen (Körpermasse 20–25g). Alle Mäuse lebten in Käfighaltung mit einem geregelten Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten Trockenfutter und Wasser *ad libitum*. Sämtliche Tierexperimente fanden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes vom 01.01.1987, herausgegeben vom Bundesministerium der Justiz, statt. Die Tiertötung wurde durch das LAGESO (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, T 003/06) genehmigt. Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden beachtet.

2.2 ET_B-knock out-Modell

Die DNA der ET_B-Rezeptorproteine besteht aus einem Promoter und 8 Exons, die für ein funktionelles ET_B-Rezeptorprotein kodieren. Bei der Herstellung des *knock-out*-Modells erfolgt eine Deletion von Exon 3 und Exon 4. Die Enden von Exon 2 und Exon 5 werden miteinander verbunden. Das durch Transkription und Translation exprimierte Protein führt in allen Geweben zu einem funktionslosen ET_B-Rezeptor. ET_B-Rezeptor-Defizit geht unter anderem mit einem Megakolon („Hirschsprung Disease“) einher (89). Die Tiere überleben nur einige Tage. Um die Entstehung eines Megakolons zu verhindern, wurde in die genomische DNA ein „*rescue*“ durch Einkreuzen transgener Tiere eingebaut. Dieser besteht aus einem Dopamin-β-Hydroxylase-Promotor mit den Sequenzen von Exon 1-Exon 8. Die Introns zwischen den Exons wurden deletiert (Abb. 2.1). Dieser Dopamin-β-Hydroxylase-Promotor wird nur in Zellen des autonomen Nervensystems aktiviert, so dass dort ein funktioneller ET_B-Rezeptor exprimiert wird, der die Ausbildung des Megakolons verhindert. In den Endothelzellen u.a. der glomerulären Arteriolen wird nur der funktionslose ET_B-Rezeptor exprimiert (59; 142).

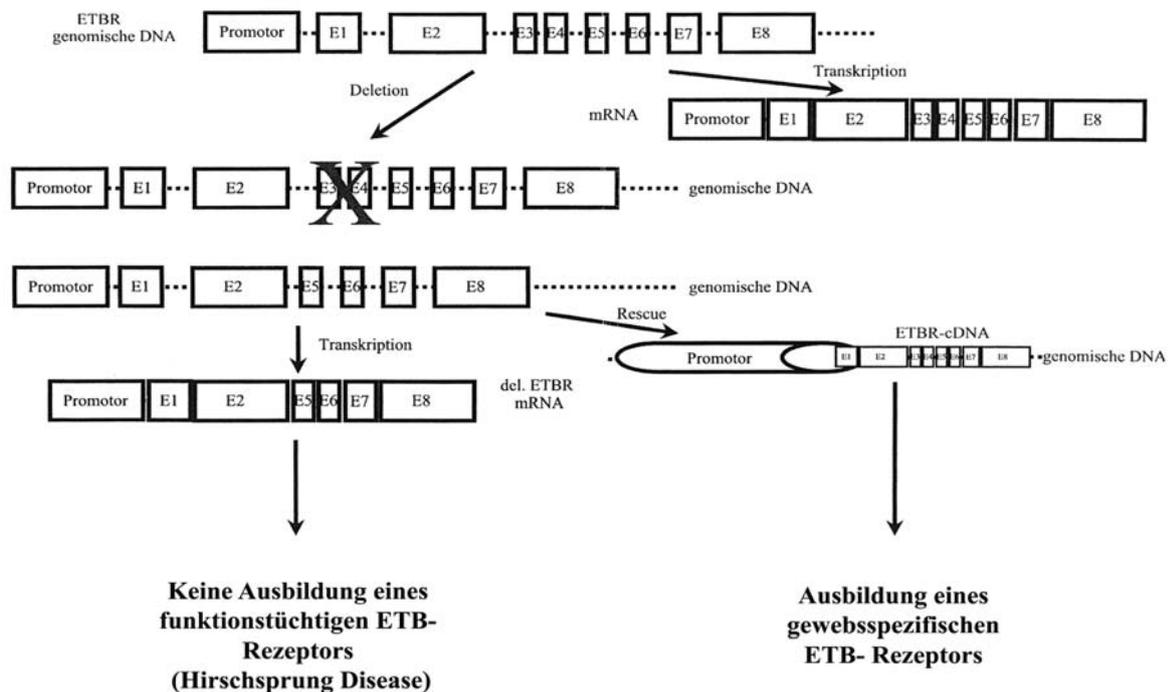


Abb. 2.1: Grafische Darstellung der Bildung des *knock out*-Modells. Nach der Deletion von Exon 3 und Exon 4 aus den ET_B-Rezeptoren in der genomischen DNA kommt es zur Ausbildung zu einem funktionsuntüchtigen ET_B-Rezeptors in alle Geweben. Das führt zur Ausbildung eines Megacolon (Morbus Hirschsprung) und somit zu einer verkürzten Lebensdauer der transgenen *knock out*-Mäusen. Durch den Einbau von einem „rescue“ in der genomischen DNA, welcher einen gewebspezifischen Promotor mit der kompletten ET_B-Rezeptor-cDNA besitzt, ist die Ausbildung von einem ET_B-Rezeptor in bestimmten Geweben gewährleistet. Es kommt u.a. nicht zu einer Ausbildung eines Megacolon. (Abb. mit freundlicher Genehmigung durch Dr. Andreas Steege).

2.3 Evaluation der Eisenoxid-Isolation

2.3.1 Modell der Eisenoxid-perfundierten Aorta abdominalis

Zur Abschätzung des methodischen Einflusses, den die auf Eisenoxid basierende Methode zur Isolation von präglomerulären Gefäßen aus der Mausniere ausübt, wurden funktionelle Messungen und Expressionsuntersuchungen an Aorten sowie histologische Untersuchungen des Nierengewebes (Arteriolen) durchgeführt. Da es keine Möglichkeit gibt, glomeruläre Arteriolen ohne Eisenoxid zu isolieren, wurde ein Modell an großen Gefäßen entwickelt, welche alternativ mit und ohne Eisenoxid isoliert und deren Funktion und Genexpression analysiert werden können. Die Aorta abdominales diente als Versuchsmodell.

Die Versuchstiere wurden narkotisiert und durch zervikale Translokation getötet. Nach einer Laparotomie wurde die Aorta freigelegt, unterhalb der Nieren abgebunden und der Brustkorb eröffnet. Mit einer Kanüle wurde in die linke Herzkammer eingestochen und 20 ml reine PBS-Lösung (Biochrom AG, D) perfundiert. Durch Öffnen der Vena cava im Lumbalbereich erfolgte ein Auswaschen des Blutes der Maus. Nach der PBS-Perfusion wurde die Eisenoxidlösung (Zusammensetzung siehe 2.3.1) perfundiert.

In der Kontrollgruppe wurde eine gleiche Lösung, aber ohne Eisenoxid, perfundiert.

Zusammensetzung der Eisenoxidlösung:

50 ml	PBS
5g	Eisenoxid-Pulver (Fa. Serva, D)
5g	Albumin (bovines Serumalbumin, SERVA, D)

2.3.2 Gewebegewinnung

Die präparierten Aorten wurden für die spätere RNA-Isolation in einem Eppendorf-Gefäß mit 1000 µl TRIZOL[®]-Reagenz (Biozol, D) eingebracht, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.3.3 Funktionelle Testung der Endothelfunktion von Aortenringen

Die Aorten wurden hinsichtlich ihrer Dilatationsfähigkeit untersucht. Als Methode zur *in vitro*-Messung der Gefäßkontraktion bzw. -dilatation diente der von Mulvany und Halpern entwickelte Myograph (131). Zum Einsatz kam ein automatisierter Myograph Modell 500A (J.P.Trading, Aarhus, Dänemark).

Aortensegmente von ca. 2 mm Länge wurden mittels zweier Wolframdrähte (Durchmesser 40µm) im Myographen befestigt. Die Drähte waren auf der einen Seite mit einem Mikrometer-Schrittmotor, auf der anderen Seite mit einem Kraftaufnehmer gekoppelt (Abb. 1.3).

Vor der eigentlichen Untersuchung wurde ein auf einem Längen-Spannungs-Verhältnis beruhendes Normalisierungsprotokoll durchgeführt. Es diente dazu, eine dem physiologischen intravaskulären Druck von 100mmHg entsprechende Vordehnung des Gefäßes zu erzeugen.

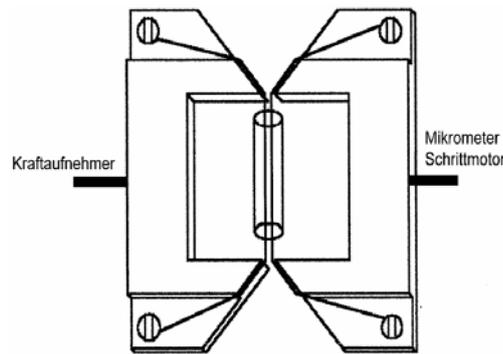


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Myographen (Modell 500A, J.P.Trading, Aarhus, Dänemark)

Versuchsprotokoll

Nach dem Einspannen der Gefäßringe in den Myographen wurde die Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung (K-H-P) auf 37°C erwärmt und eine gleichmäßige Karbogenzufuhr (95 % O₂, 5 % CO₂) gewährleistet. Dies führte zur Pufferbildung, zu konstanten pH-Wert-Bedingungen (pH 7,4) und ausreichender Oxygenierung der Gefäße.

Danach wurde die Normalisierung durchgeführt. Es folgte eine Stabilisierungsphase von vierzig Minuten mit zweimaligem Austausch des K-H-P. Die Aortenringe wurden dann mit KCl (100mol/l) (Carl Roth GmbH, D) stimuliert und die Depolarisationskontraktion gemessen. Dies diente der Testung der Gefäßintegrität. Nach Auswaschen wurde mit Phenylephrin (10⁻⁵ M) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, D) auf etwa 50 % der KCl-Kontraktion vorkontrahiert. Die Applikation von Acetylcholin (10⁻⁶ M) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, D) zur Testung der Endothel-abhängigen Dilatation erfolgte bei Erreichen eines Kontraktionsplateaus.

Zusammensetzung des K-P-H-Puffers:

NaCl	112 mM (Carl Roth GmbH, D)
KCL	4,9 mM (Carl Roth GmbH, D)
CaCl ₂	2,5 mM (Sigma Aldrich Chemie, D)
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,2 mM (Carl Roth GmbH, D)
K ₂ PO ₄	1,19 mM (Carl Roth GmbH, D)
NaHCO ₃	24,67 mM (Carl Roth GmbH, D)
Glukose	11,5 mM (Merck, D)

Datenerfassung und Analyse

Für die Datenaufzeichnung stand ein PowerLab System (ADInstruments GmbH, D) zur Verfügung. Die Analyse der Daten übernahm das Programm XmAna (programmiert von Dr. Harald M. Stauß). Zur statistischen und graphischen Aufbereitung der Ergebnisse diente das Tabellen- und Kalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corporation).

2.3.4 Expression von Markergenen des Endothels

RNA-Isolierung mittels TRIZOL[®]-Reagenz

Mit Hilfe von TRIZOL[®]-Reagenz wurde die gesamte RNA aus den isolierten Aorten gewonnen. TRIZOL[®]-Reagenz führt durch Proteindenaturierung zur Lyse von Zellen und Zellkompartimenten, so dass die RNA zugänglich wird. Durch Zusatz von Chloroform (Carl Roth, D) und Zentrifugieren wird das Zelllysate in eine wässrige Phase, eine Interphase und eine organische Phase aufgetrennt. In der wässrigen Phase befindet sich die RNA, die durch Zusatz von Isopropanol (Carl Roth, D) ausgefällt wird.

Die isolierten präglomerulären Gefäße wurden in ein Reaktionsgefäß mit 1000µl TRIZOL[®]-Reagenz gegeben, 200µl Chloroform (Carl Roth, D) hinzugefügt und die Probe gevortext, bis eine homogene milchige Lösung entstand. Nach einer 3-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 12000*g 15 Minuten zentrifugiert. Die Temperatur in der Zentrifuge (Sigma, D) betrug 4°C, um die RNAase-Aktivität gering zu halten. Die wässrige Phase wurde nach dem Zentrifugieren in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol zur Fällung der RNA versetzt. Dieser Schritt diente der RNA-Präzipitation. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut 15 Minuten lang mit 15000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das abgesetzte Pellet wurde mit 75 % Ethanol in DEPC-H₂O (500µl) gewaschen, kurz gevortext und erneut für 5 Minuten bei 75000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Dann erfolgte die Lufttrocknung des Pellets, welches in 10µl DEPC-H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurde.

Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes

1µl der Probe wurden in eine Küvette gegeben, mit DEPC-H₂O auf 50µl verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 260\text{nm}$ (spezifische Wellenlänge für Nukleinsäuren) und $\lambda = 280\text{nm}$ (spezifische Wellenlänge für Proteine) in einem Photometer (Analytical Instruments, USA) gemessen. Der RNA-Gehalt wurde errechnet, indem die Extinktion bei

2 Methoden

$\lambda = 260\text{nm}$ mit dem Verdünnungsfaktor (1:50) und dem Extinktionskoeffizienten für RNA (40 $\mu\text{g/ml}$) multipliziert wurde. Dies ergab den RNA-Gehalt in $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis der Extinktion $\lambda = 260$ zur Extinktion $\lambda = 280$ wurde ermittelt, um den Reinheitsgrad der RNA zu überprüfen. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 war die Reinheit der RNA ausreichend.

Mit DEPC- H_2O wurde die RNA-Konzentration in den Proben anschließend auf $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und bei -80°C gelagert.

DNA-Synthese (Reverse Transkription)

Die reverse Transkription diente der cDNA-Synthese an einer RNA-Matritze. Für diese Versuche wurde SuperScriptTM II reverse Transkriptase (Invitrogen, D) eingesetzt.

In einem ersten Schritt wurden durch Erhitzen der RNA die Sekundärstrukturen aufgelöst und Primer (MWG- Biotech AG, D) an die RNA gebunden. Als Primer dienten *random*-Hexamere, ein Gemisch von Hexanucleotiden unterschiedlicher Sequenzen, die sich zufällig an die RNA binden. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

RNA	1 μg
Random Hexamere (50 ng)	1 μl
dNTP Mix (je 10mM)	1 μl
DEPC- H_2O	7 μl

Dieser Ansatz wurde 5min auf 65°C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Im zweiten Schritt wurde die cDNA synthetisiert. Dazu wurden dem obigen Ansatz folgende Komponenten zugesetzt.

5x First- Stand Buffer	4 μl
0,1 M DTT	2 μl
<i>RNase OUT</i> TM (40U/ μl)	1 μl
SuperScript TM II RT (200U)	1 μl

Dieser Ansatz wurde 10min bei 25°C und 50 min bei 42°C inkubiert. Eine Temperaturerhöhung auf 70°C für 15 min stoppte die Reaktion. Anschließend wurden die Proben

2 Methoden

mit DEPC-H₂O auf 20 ng cDNA/μl eingestellt. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

Real-time PCR

Die *real-time* PCR ermöglicht eine Vervielfältigung von beliebigen DNA-Sequenzen. Als Matrize der Polymerasenkettenreaktion (PCR) wurden spezifische intronüberspannende Primerpaare für eNOS, PECAM-1, Edn-1 (ET-1), und β-Aktin verwendet. β-Aktin ist unter den gegebenen Bedingungen in konstanter Menge vorhanden und kann damit zur indirekten Quantifizierung der jeweiligen Rezeptor-mRNA eingesetzt werden. SYBR® Green (Applied Biosystems, USA) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle interkaliert und bei Anregung Licht emittiert. Die Lichtintensität ist ein Maß für die Menge an doppelsträngiger DNA. Die quantitative PCR wurde mit dem GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Es wurden jeweils drei Ansätze mit der gleichen cDNA-Matrize pipettiert. Wasser diente als Negativprobe.

Liste der verwendeten Primer

gene bank access number	Primer
NM_001032378	PECAM-1 vorwärts: 5'-TGA AGG AGT TTT CCT CAG CCT GGA G-3' PECAM-1 rückwärts: 5'-GCC TCA GTC GGC AGA CAA GAT GCT-3'
NM_010104	Edn-1 vorwärts: 5'-GGG CCC TGA GTT CTT TTC CTG CTT-3' Edn-1 rückwärts: 5'-AGT TAG ATG TCA GTG CGC TCA CCA AA-3'
NM_008713	eNOS vorwärts: 5'-GTT TGT CTG CGG CGA TGT C-3' eNOS rückwärts: 5'-CAT GCC GCC CTC TGT TG-3'
NM_007393	β-Aktin vorwärts: 5'-CAC CCG CGA GCA CAG CTT CTT T-3' β-Aktin rückwärts: 5'-AAT ACA GCC CGG GGA GCA TC-3'

2 Methoden

Der PCR- Ansatz bestand aus folgenden Substanzen

SYBR® Green PCR Master Mix	12,5 µl
Primer vorwärts	1 µl
Primer rückwärts	1 µl
cDNA	1 µl = 20 ng
DEPC- H ₂ O	9,5 µl

Der Ansatz wurde 2 min bei 50°C erwärmt. Die initiale Denaturierungsphase erfolgte 10 min bei 95°C. Die cDNA in 45 Zyklen amplifiziert. Zeiten und Temperaturen sind vorher für die einzelnen Gene optimiert worden.

Auswertung der PCR

Mit der GeneAmp®5700 SDS Software Version1.3 (Applied Biosystems, USA) erfolgte die Auswertung der PCR. Aus der gemessenen Emission von SYBR® Green wurden Amplifikationskurven erstellt. Durch Einsetzen eines Schwellenniveaus durch den linearen Anstieg der Amplifikationskurven konnten die C_T-Werte (Schnittpunkt des Schwellenniveaus mit der Amplifikationskurve) ermittelt werden (grüne Linie in Abb .2.3). Sie entsprechen der Anzahl an Zyklen, die notwendig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Die Differenz der C_T-Werte der einzelnen gemessenen Gene und des C_T-Wertes von β-Aktin liefert die ΔC_T-Werte (siehe Abb. 2.3). Diese sind ein Maß für die relative mRNA-Menge der untersuchten Gene.

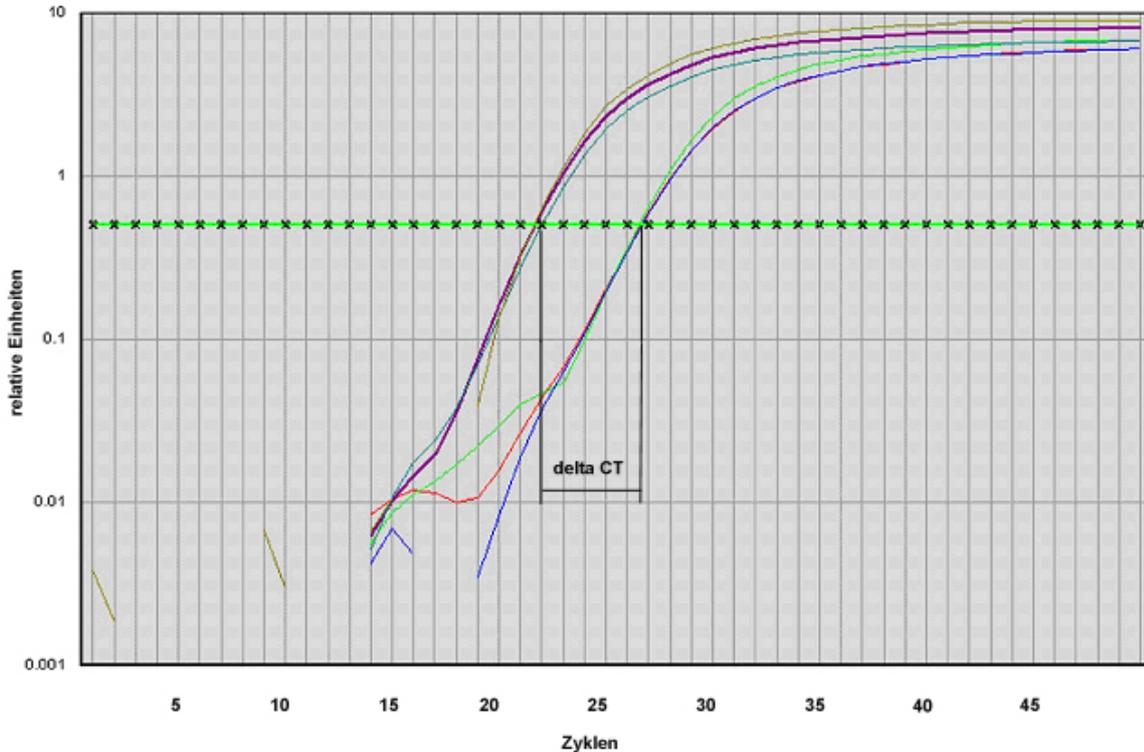


Abb. 2.3: Darstellung der Amplifikationskurven eines Gens (rechte Kurvenschar) im Vergleich mit β -Aktin (linke Kurvenschar, Originalabbildung aus dem Softwareprogramm GeneAmp[®]5700). Die Differenz zwischen den CT-Werten der einzelnen Gene und des Referenzgens β -Aktin liefert die ΔC_T -Werte (delta CT).

2.3.5 Histologische Aufarbeitung der präglomerulären Gefäße

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Nieren nach der Perfusion mit Eisenoxidlösung (siehe Abschnitt 2.3.1) entnommen und aufgearbeitet. Die Nieren wurden längs geteilt und fixiert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um die in 3 % Paraformaldehydlösung fixierten Gewebestücke in Paraffin einzubetten zu können, wurde eine Entwässerung mit aufsteigenden Ethanolverdünnungen durchgeführt. Die Entwässerung wurde durch Behandlung erreicht. Dies erfolgte schrittweise von 50 % bis 100 % aufwärts. Ethanol wurde anschließend durch das Intermedium Xylol und dieses schließlich durch flüssiges Paraffin ersetzt, das nach Abkühlung aushärtet.

Um den Gewebekblock in eine Konsistenz zu überführen, die hart genug für die Herstellung von dünnen Schnitten ist, härtete er 12 Stunden aus. Der Block wurde zum

2 Methoden

Schneiden in einem Leica-Paraffinmikrotom eingespannt und auf 3 µm Dicke geschnitten. Die Paraffinschnitte wurden auf Glasobjektträger aufgebracht. Vor dem Färben, das meist in wässrigen Lösungen stattfindet, wurde das Paraffin mittels Xylol aus den Schnitten herausgelöst (Entparaffinieren).

Die Färbung erfolgte mit dem dem basischen Farbstoff Hämatoxylin (Kerne blau), sowie in dem sauren Farbstoff Eosin (rotes Zytoplasma).

Semidünnschnitte

Die geschnittenen Nierenstücke wurden in 1,5 % Glutardialdehyd (feine Vernetzung und starke Denaturierung der Proteine), 1,5 % Formaldehyd und PBS immersionsfixiert.

Nach der Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Einbettung der jeweiligen Nierenstücke in Epoxidharz (Epon[®]). Von den so eingebetteten Nierenstücken wurden 0,5 - 1 µm dicke Semidünnschnitte am Leica-Mikrotom mit einem Glasmesser angefertigt, in destilliertem Wasser aufgefangen und auf Objektträger aufgezogen. Nach der Trocknung wurden die Semidünnschnitte mit 1 %iger Methylenblau- und 1 %iger Azur-II-Lösung (Verhältnis 1:1) gefärbt (Färbung nach Richardson).

Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf der Identifizierung und histologischen Lokalisierung eines Stoffes mittels der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression von PECAM-1 wurde an Schnitten, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet waren, durchgeführt. Als Primärantikörper diente das CD31 (=PECAM), als Sekundärantikörper das Dianova Esel-anti Ratte-HRP.

Es wurden 5 µm dicke Cryostatschnitte angefertigt, bei Raumluft getrocknet und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Vor der Färbung wurden die Schnitte zunächst mit einem PAP-Stift voneinander getrennt und dann für 5 Minuten in PBS rehydriert. Mit einer Vakuumpumpe wurden die Schnitte anschließend abgesaugt und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 100 µl einer 5 % Trockenmilchpulverlösung in PBS überschichtet. Die Schnitte wurden 2 Stunden inkubiert. Danach folgte ein 3x5 minütiger Waschschrift in PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit der Primärantikörperfärbung in 5 % Trockenmilch in PBS überschichtet. Die Schnitte wurden zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur

auf einem Schüttler und dann bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgten erneut 3 Waschschriffe in PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit 50 µl Trockenmilch-PBS-Lösung und dem entsprechenden Sekundärantikörper überschüttet und für 2 Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in einer dunklen Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit einem Tropfen 1:1 Lösung von Glycerin und PBS überschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Um ein Verblässen der Fluoreszenz zu vermeiden, wurden die Schnitte bei 4°C in Dunkelheit gelagert und innerhalb von 3 Tagen ausgewertet.

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von zwei unabhängigen Beobachtern beurteilt.

2.4 Expressionsanalyse in präglomerulären Gefäßen

2.4.1 Isolation der präglomerulären Gefäße

Die Isolation der präglomerulären Gefäße (afferente Arteriolen und Aa. interlobulares) erfolgte durch Perfusion mit einer auf Eisenoxid basierenden Lösung, nachfolgender Zerkleinerung bzw. Gewebeseperation, Magnetisierungsschritten und durch Sieben der Gewebeteile. Die für Kaninchennieren entwickelte Methode (28) wurde in verschiedenen Punkten modifiziert (z. B. Größe der Siebe, Zusatz von Albumin zur Perfusionslösung). Das Albumin legt sich um die Fe^{3+} -Partikel und soll vor Endothelschädigungen schützen.

Die mit Eisenoxid perfundierten Nieren wurden dem Körper entnommen, das Hilum abgetrennt und die Nierenkapsel entfernt. Die äußeren Rindenzonen wurden mit einer scharfen Rasierklinge fünf Minuten gehackt. Anschließend erfolgte der erste Magnetisierungsschritt, der die mit Eisenoxid enthaltenen Arteriolen aus der PBS-Lösung mit dem zerhackten Material isoliert. Das so isolierte eisenoxidhaltige Gewebe wurde durch 0,9 mm und 0,6 mm große Spritzenkanülen gepreßt, was zur weiteren Trennung der Gefäße von größeren Bestandteilen, wie z.B. Tubuli führte. Wiederholte Magnetisierungsschritte sowie ein Abtrennen des übrig gebliebenen Materials mit Hilfe eines 100 µm und 80 µm großen Maschennetzes (Verseid-Techfab GmbH, D) erhöhte den Reinheitsgrad der eisenoxidhaltigen Arteriolen. Abbildung 2.4 zeigt Aufnahmen isolierter Gefäße, bei denen die Eisenoxidfüllung erhalten ist. Diese wurden mit 1 ml TRIZOL[®]-Reagenz versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.



Abb. 2.4: Darstellung der isolierten Aa. interlobulares und afferenten Arteriolen (Endvergrößerung etwa 1000 fach). Die Arteriolen sind vollständig mit Eisenoxidlösung gefüllt.

2.4.2 mRNA-Expression von ET_A-Rezeptoren und eNOS in Arteriolen

RNA-Isolation/DNA-Synthese/real-time PCR

Die mRNA-Menge, die aus den isolierten Arteriolen (präglomeruläre Gefäße) gewonnen wurde, gestattete nur zwei Genexpressionsanalysen. Es wurden die ET_A-Rezeptor- und eNOS-Expression bestimmt. Die Isolation, Synthese und real-time PCR erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

Liste der verwendeten Primer:

gene bank access number	Primer
NM_010332	ET _A vorwärts: 5'-TAT CCT GCA CCA TTT TCA TCG TGG G-3' ET _A rückwärts: 5'-ATA AGG TCT CCA AGG GCC AGG CT-3'
NM_008713	eNOS vorwärts: 5'-GTT TGT CTG CGG CGA TGT C-3' eNOS rückwärts: 5'-CAT GCC GCC CTC TGT TG-3'
NM_007393	β-Aktin vorwärts: 5'-CAC CCG CGA GCA CAG CTT CTT T-3' β-Aktin rückwärts: 5'-AAT ACA GCC CGG GGA GCA TC-3'

2.5 Expressionsanalyse in der Gesamtniere

2.5.1 Isolation von Gesamtnieren

Für die Messung von Genexpressionen in der Gesamtniere wurden die Mäuse durch zervikale Translokation getötet, die Nieren sofort entnommen und in einem Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren sowie bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.5.2 mRNA Expression in den Gesamtnieren

RNA-Isolierung/DNA-Synthese/Real-time PCR

Die Isolation, Synthese und Real-time PCR erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

Liste der verwendeten Primer:

gene bank access number	Primer
NM_177322	AT _{1A} vorwärts: 5'-GAT TGG TAT AAA ATG GCT GG-3' AT _{1A} rückwärts: 5'-TCT GGG TTG AGT TGG TCT CA-3'
NM_007429	AT ₂ vorwärts: 5'-GCT TAC TTC AGC CTG CAT TT-3' AT ₂ rückwärts: 5'-GGA CTC ATT GGT GCC AGT TG-3'
NM_010332	ET _A vorwärts: 5'-TAT CCT GCA CCA TTT TCA TCG TGG G-3' ET _A rückwärts: 5'-ATA AGG TCT CCA AGG GCC AGG CT-3'
NM_008713	eNOS vorwärts: 5'-GTT TGT CTG CGG CGA TGT C-3' eNOS rückwärts: 5'-CAT GCC GCC CTC TGT TG-3'
NM_010927	iNOS vorwärts: 5'-GGC AGC CTG TGA GAC CTT TG-3' iNOS rückwärts: 5'-CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG-3'
NM_008712	nNOS vorwärts: 5'-TCG GCT GTG CTT TGAT GGA-3' nNOS rückwärts: 5'-TTG AAT CGG ACC TTG TAG CTC TTC-3'
NM_007393	β -Aktin vorwärts: 5'-CAC CCG CGA GCA CAG CTT CTT T-3' β -Aktin rückwärts: 5'-AAT ACA GCC CGG GGA GCA TC-3'

2.6 Proteingewinnung und –bestimmung, Western Blot

2.6.1 Proteinexpression des ET_A-Rezeptors

Proteingewinnung: Das tiefgefrorene Gewebe (Niere) wurde im flüssigen Stickstoff zermörsert und das feinpulverisierte Gewebe in SDS-Probenpuffer lysiert. Das Lysat wurde für 15 min mit Ultraschall auf Eis behandelt und anschließend für 3 min gekocht. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 12000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das Proteingehalt photometrisch gemessen.

Proteinbestimmung: Die photometrische Bestimmung des Proteingehalts wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280\text{nm}$ (spezifische Wellenlänge für Proteine) gemessen.

Western-Blot-Methode

Die Gelplatten wurden in die Gelapparatur (Bio-Rad, D) eingesetzt, das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eventuelle Unebenheiten zu vermeiden. Nach der Polymerisation des Trenngels, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen und die Kämme eingesetzt.

Die Proteinproben wurden mit 4 x Probenpuffer versetzt, für 5min bei 95°C inkubiert und danach auf Eis gestellt und vor dem Auftragen kurz abzentrifugiert. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde 1x Laufpuffer in den Gelapparaturbehälter gegeben und die Kämme gezogen. Nach kurzem Ausspülen erfolgte das Pipettieren der Proteinproben (15-30µg pro Tasche). Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde eine Proteinleiter aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 150 V für ca. 60min.

Antikörperinkubation: Das Gel wurde zunächst in einer vorbereiteten Blotting-Apparatur mit einem passenden Stück Nitrocellulose (Schleicher & Schuell, D) zusammen geblottet (45 min bei 220 mA für Proteine bis zu einer Länge von 100 kD). Größere Proteine wurden 60-70 min geblottet.

Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers (Schleicher & Schuell, D) wurde mit Ponceau-Lösung für 1-2min inkubiert, anschließend zunächst in Wasser und später mit dem Waschpuffer entfärbt. Zur Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungen wurde der Blot für 30 min bei Raumtemperatur in 5 %iger Magermilch (Fluka Chemie, D) geschüttelt (alternativ Inkubation auch bei 4°C über Nacht), dann dreimal für 5min mit Waschpuffer (TBS Tween 0,1 %) (Sigma, D) gewaschen und schließlich mit dem Erst-Antikörper mit entsprechender Konzentration inkubiert. Die Inkubation wurde entweder

2 Methoden

für 45 min bei Raumtemperatur oder über bei Nacht bei 4°C durchgeführt. Es folgte ein dreimaliges Waschen für je 10min. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper entsprach der gleichen Prozedur. Jedoch betrug hier die Inkubationszeit maximal 1 h. Nach dem letzten Waschgang wurde auf den Blot das Substrat (ECL-Lösung, 4min; Amersham Biosciences, D) für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase gegeben.

Der Blot wurde eingeschweißt und schließlich in eine Filmkassette gelegt. Die Belichtung und Entwicklung des Filmes variierte in Abhängigkeit von der Signalstärke. Die Bilder wurden digitalisiert und densitometrisch ausgewertet.

Zusammensetzung:

Trenngel (15 %)		Puffer 1 (500ml)	
PAA	4 ml	Trizma Base	43,43g (0,75 M)
4 x Puffer 1	6 ml, pH 8,8	SDS	10 ml, 10 %
H ₂ O	2 ml	-> pH 8,8 einstellen	
APS	100 µl		
TEMED	10 µl		
Sammelgel (6 %)		Puffer 2 (250ml)	
H ₂ O	2,6 ml	Trizma Base	7,57g (0,25 M)
4x Puffer 2	3,75 ml, pH 6,8	SDS	5 ml, 10 %
PAA	1 ml	-> pH 6,8 einstellen	
APS	75 µl		
TEMED	13,5 µl		
Laufpuffer (<i>running-buffer</i>)		Blockierungslösung:	
Trizma Base	25 mM	5 % Magermilchpulver, TBS-Tween 20	
SDS	0,1 %	(0,1 %)	
Glycin	250 mM		

Probenpuffer		Stripping-Lösung	
TrisHCl	5 mM (pH 6,8)	NaOH in H ₂ O	0,2 M
SDS	6 %		
Glycerin	20 %		
Bromphenol blau	0,02 %		

Alle oben aufgeführten Substanzen sind von Carl Roth, Deutschland.

Antikörper und Verdünnungen:

1. Antikörper: ET_A-Rezeptor (M-60) Santa Cruz 33536, 1:300 in MMP (1 %)
2. Antikörper g-anti-rabbit POD Santa Cruz 2030, 1: 5000 In MMP (2,5 %)

Referenzprotein β -Aktin

1. Antikörper: β -Aktin Chemicon Mab 1501, 1:2000 in MMP (1 %)
2. Antikörper anti-Maus POD Santa Cruz 2031, 1: 40000 in MMP (1 %)

2.6.2 Proteinexpression von Endothelin in der Gesamtniere

Proteingewinnung: Für die Proteingewinnung zur Bestimmung des Endothelins wurde eine ganze Niere (ca 100 mg) mit 1 ml Gemisch von Trichloressigsäure (10 %) und Aceton (90 %) versetzt. Dies führte zur Denaturierung des Gewebes. Das Gemisch wurde abgenommen und 3x mit Aceton (Carl Roth, D) gewaschen. Nach dem Abdampfen des Acetons wurde der Lysepuffer dazugegeben, 40 min bei 95°C gekocht und währenddessen geschüttelt. Nach dem Kochen wurde der Überstand entnommen und der Proteingehalt gemessen.

Zusammensetzung des Lysepuffers:

Tris	25 mM (Sigma, D)
Glycin	250 mM (Carl Roth, D)
SDS	1 %

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch gemessen (siehe 2.6.1).

Western *Blotting*: Die Prozeduren entsprachen den unter 2.6.1 aufgeführten Schritten.

3 Ergebnisse

Antikörper und Verdünnungen:

1. Antikörper: EDN1 monoclonal antibody (MO1) Abnova, clone 3D6, 1:1000 in MMP (1 %) über Nacht bei 4°C
 2. Antikörper: goat anti mouse (sc 20 31, 1:2000 in MMP (2 %)
Referenzprotein β -Aktin
1. Antikörper: β -Aktin Chemicon Mab 1501, 1:2000 in MMP (1 %)
 2. Antikörper anti Maus POD Santa Cruz 2031, 1: 40000 in MMP (1 %)

2.7 Statistik

Funktionelle Untersuchungen der Aortenringe: Die Ergebnisse der Dilatationsexperimente pro Tier (jeweils ein Aortenring) gingen in die statistische Analyse ein.

PCR: Es wurden jeweils für jedes Gen, inklusive des Referenzgens β -Aktin, und für jedes Tier drei Ansätze für die *real-time* PCR pipettiert und gemessen. Die Werte der ΔC_T -Analyse (Mittelwert aus drei Ansätzen) wurden für die Statistik verwendet. Die Mittelwerte der in relative Expressionseinheiten transformierten ΔC_T -Werte wurden dann graphisch dargestellt.

Western-*Blot*: Es wurde ein Ansatz pro Tier pipettiert. Die densitometrischen Werte (im Vergleich zu β -Aktin) gingen in die statistische Auswertung ein.

Der Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben (Mann-Whitney-U-Test). Aufgrund der Gruppengröße von $n=4$ bis $n=14$ (siehe Ergebnisabschnitt) wurde nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen. Die Analyse erfolgte deshalb mit einem nichtparametrischen Prüfverfahren. Alle Daten werden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluation der Eisenoxid-Isolation

3.1.1 Dilatationsfähigkeit der isolierten Aorten

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um im Modell der Aorta Aussagen über eine Beeinflussung der Endothelzellschicht durch das Eisenoxid zu untersuchen. Als Maß für die funktionelle Integrität des Endothels diente die maximale Dilatation auf Acetylcholin nach etwa 50 % Vorkontraktion (relativ zur KCl-Kontraktion) des Gefäßes mit Phenylophrin.

Azetylcholin dilatierte die Aortenringe um etwa 60 % (relativ zur Kontraktion durch Phenylephrin); sowohl in der Gruppe der eisenoxidbehandelten Mäuse als auch in der Kontrollgruppe (Abb. 3.1).

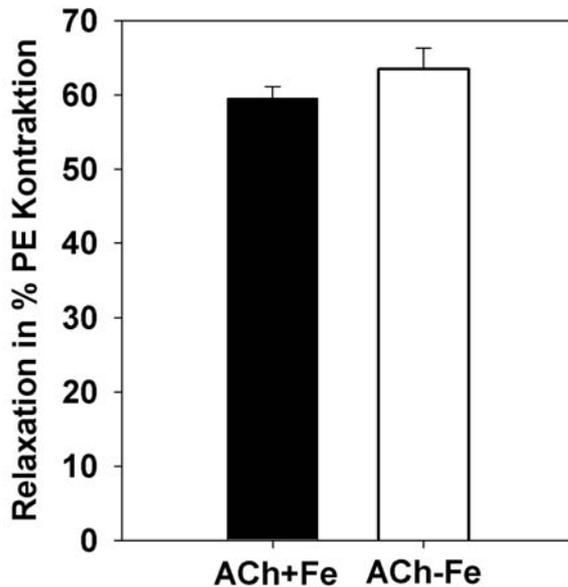


Abb. 3.1: Nach der Zugabe von Acetylcholin (10^{-6} M) dilatierten die Gefäße der Eisenoxid-Gruppe (ACh+Fe, n=14) um $63\% \pm 2$. In Kontrollgruppe betrug die Gefäßdilataion $60\% \pm 2$ (ACh-Fe, n=4). Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Phenylephrinkontraktion (Mittelwert \pm SEM).

3.1.2 Expression von Markergenen des Endothels

Es wurden die Expressionen der Zielgene PECAM-1, eNOS und Edn1 (ET-1) im Vergleich zum Referenzgen β -Aktin in Aorten eisenoxidperfundierter Tiere sowie unbehandelter Tiere analysiert. Ziel war es, eine mögliche Schädigung des Endothels durch das Eisenoxid und damit verbundene deutliche Verminderung der RNA-Expression von endothelspezifischen Genen auszuschließen. Die Werte für ET-1 (Edn1) und eNOS zeigten keine Unterschiede im Vergleich der Gruppen. PECAM-1 (PECAM) war in der eisenoxidperfundierten Gruppe etwas geringer exprimiert (Abb. 3.2).

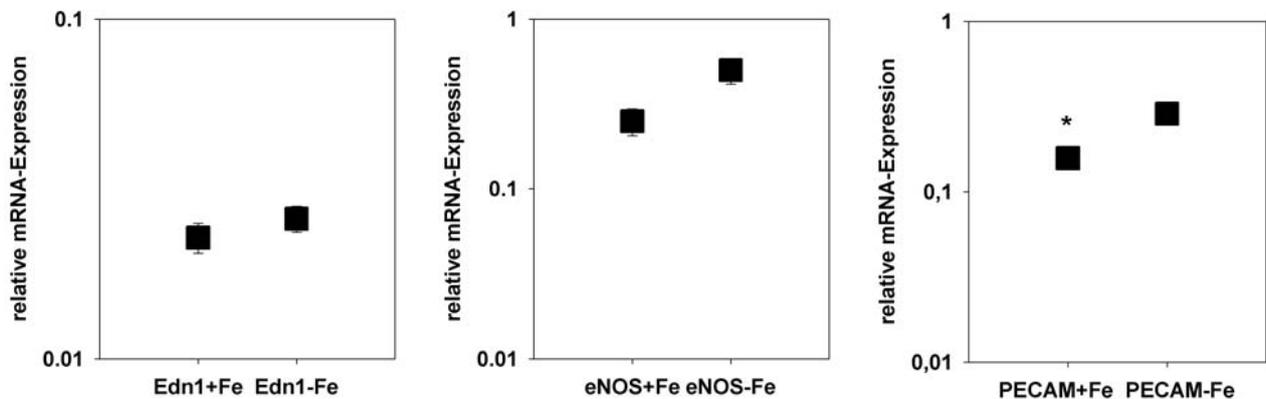


Abb. 3.2: Relative mRNA-Expression der mit (+Fe, n=6) und ohne Eisen (-Fe, n=6) perfundierten Aorten für ET-1 (Edn1), eNOS und PECAM-1 (* $p < 0,05$).

3.1.3 Histologie der präglomerulären Gefäße

Hämtoxylin-Eosin-Färbung

Nierenschnitte: Die Eisenoxid-Lösung fand sich in allen größeren und kleinen Arterien der Niere. Die glomerulären Kapillaren sind teilweise gefüllt. Im Interstitium waren keine Eisenoxidpartikel erkennbar (Abb. 3.3 und 3.4).

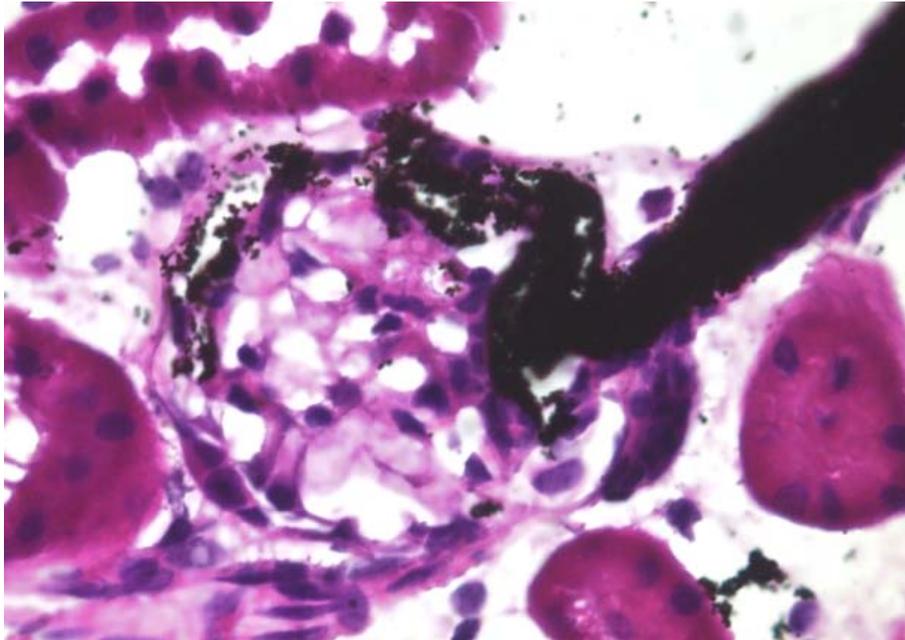


Abb. 3.3: Glomerulus mit zuführender afferenter Arteriole im H.E.-Schnitt. Im Präparat ist deutlich zu erkennen, dass sich das perfundierte Eisenoxid in der afferenten Arteriole befindet. Einige Kapillarschlingen im Glomerulus sind ebenfalls gefüllt (Endvergrößerung ca. 2000x).

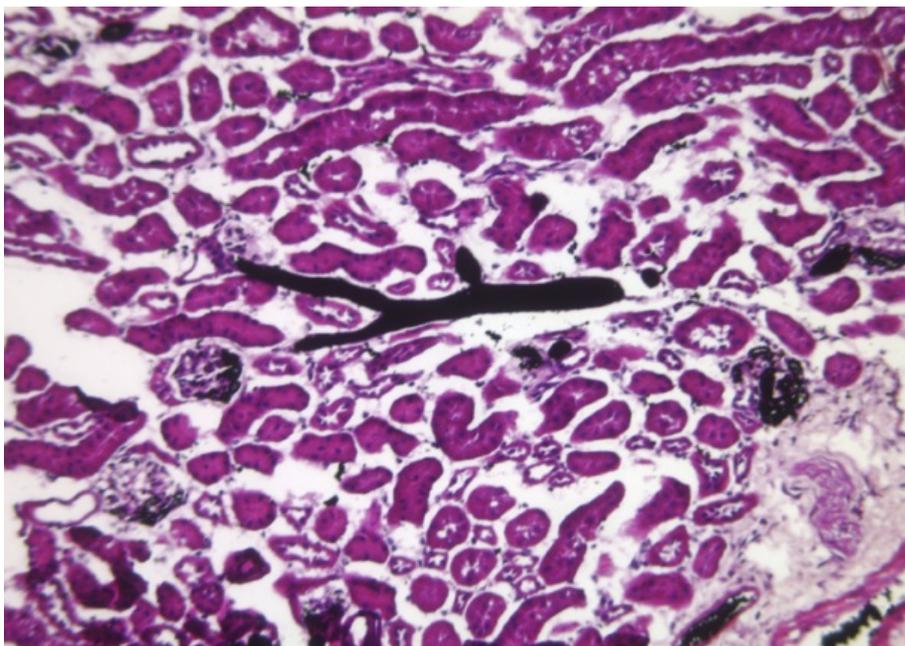


Abb. 3.4: H.E.-Schnitt der Niere zur Darstellung der vaskulären Verteilung des Eisenoxids. In der Bildmitte ist eine Interlobulararterie mit abgehenden afferenten Arteriolen zu sehen. Im Anschnitt einiger Glomeruli sieht man eisenoxidgefüllte Kapillaren. Im Interstitium befindet sich kein Eisenoxid (Endvergrößerung etwa 500x).

Semidünnschnitte

Die Semidünnschnitte (0,5-1 μm) wurden nach Richardson blau gefärbt. Durch die geringe Dicke der Schnitte ist es möglich, einzelne Zellen genau zu betrachten und Aussagen zur Beschaffenheit der Endothelzellen zu treffen.

Es zeigten sich gut erhaltene und gleichmäßig angeordnete Endothelzellen in den mit Eisenoxid-gefüllten afferenten Arteriolen (Abb. 3.5 und 3.6.)

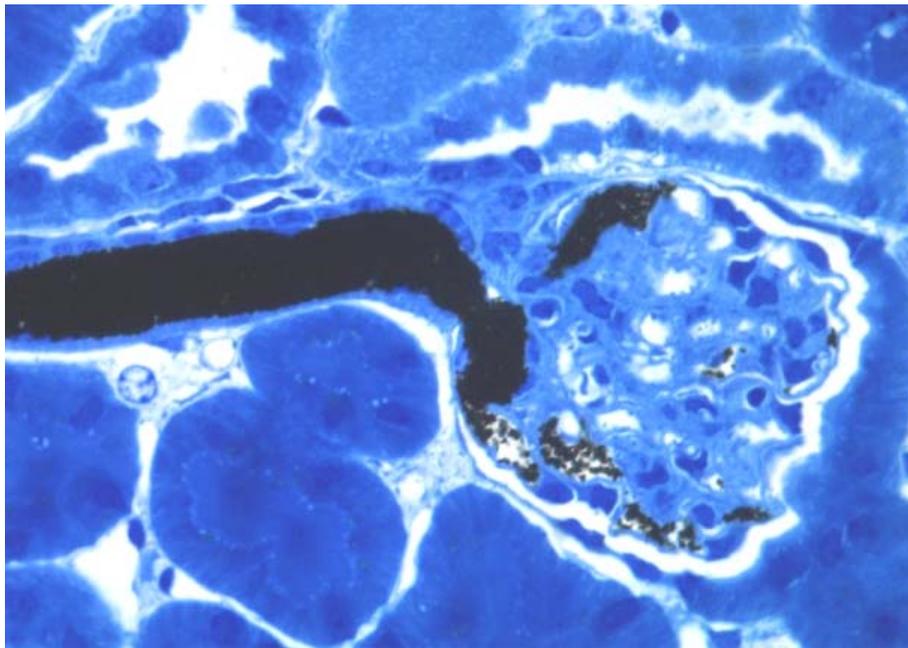


Abb. 3.5: Darstellung einer afferenten Arteriole mit zugehörigen Glomerulus im Semidünnschnitt. Die Arteriole ist vollständig mit Eisenoxid gefüllt. In den Kapillaren des Glomerulus befindet sich ebenfalls Eisenoxid. An der Arteriolenwand sind die Zellkerne der Endothelzellen gleichmäßig angeordnet (Endvergrößerung etwa 2000x).

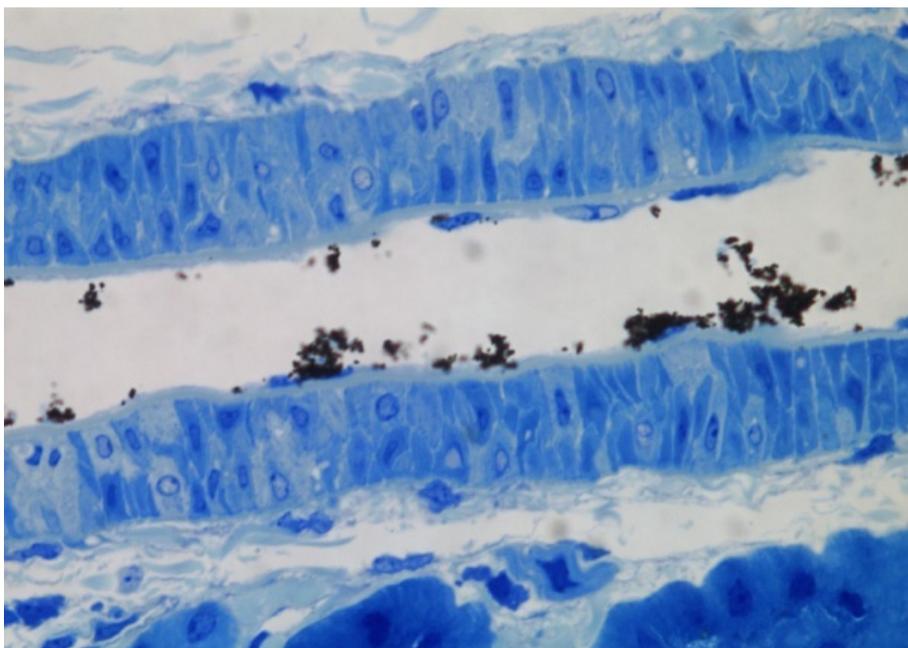


Abb. 3.6: Darstellung einer Interlobulararterie im Semidünnschnitt (Färbung nach Richardson). Es ist eine gleichmäßige Endothelstruktur zu erkennen (Endvergrößerung etwa 2000x).

Immunhistochemie

Die Integrität des Endothels wurde auch mittels immunhistochemischer Methoden geprüft. CD31 (PECAM) diente als Fluoreszenzindikator für Endothelzellen. Abb. 3.7 zeigt das Fluoreszenzbild eines Nierenschnittes, auf dem glomeruläre Strukturen (links) und die Endothelzellschicht der afferenten Arteriole (Mitte bis rechts) zu erkennen sind. Das Endothel der afferenten Arteriole ist durchgehend erhalten.

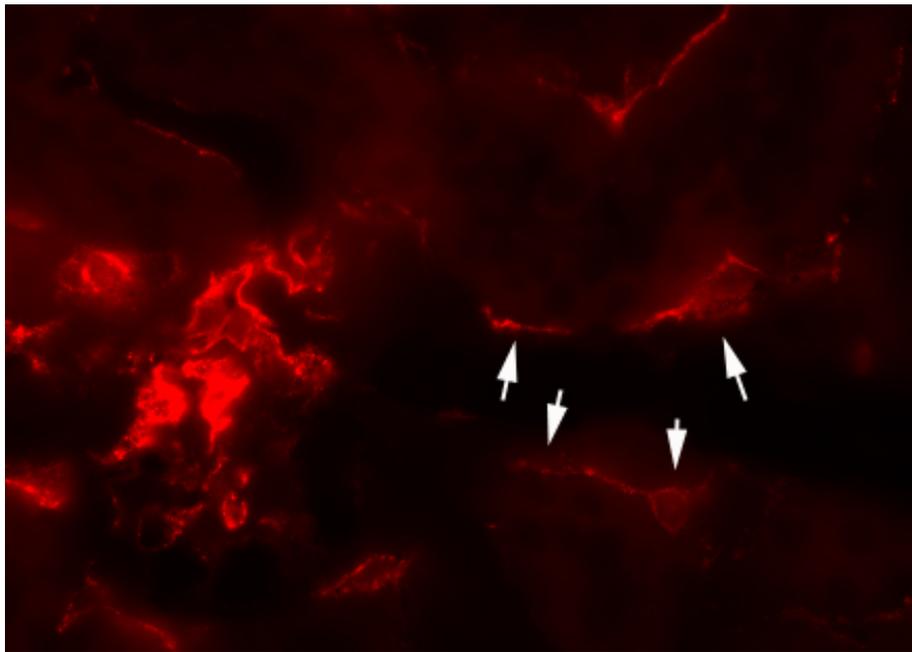


Abb. 3.7: Darstellung eines Glomerulus mit zuführender afferenter Arteriole im Fluoreszenzbild von CD31. Es ist eine durchgehende Fluoreszenz im Bereich der Endothelzellen sichtbar (siehe Pfeile, Endvergrößerung ca. 2000x).

3.1.4 Reinheit der Isolation der präglomerulären Gefäßen

Das im Ergebnis der Isolation entstandene Material wurde stichprobenartig in einer Petrischale mit 5 ml PBS aufgeschwemmt und im Stereomikroskop begutachtet. Dabei interessierte der relative Anteil von präglomerulären Gefäßen im Vergleich zum Tubulungewebe. In mehreren Blickfeldern, die die Gesamtfläche der Schale abdeckten, wurde der relative Gefäßanteil geschätzt. Nach Optimierung aller Schritte der Isolationsmethode betrug die Reinheit > 80 %.

3.2 Genexpression von Endothelin-, Angiotensin,- und NO-System

3.2.1 Expression der Gene des Endothelinsystems

ET_A-Rezeptor-mRNA in isolierten afferenten Arteriolen

In den Arteriolen der ET_B-Rezeptor-defizienten Mäuse fand sich eine signifikant geringere Menge ET_A-Rezeptor-mRNA im Vergleich zu den Wildtypen (Abb. 3.8).

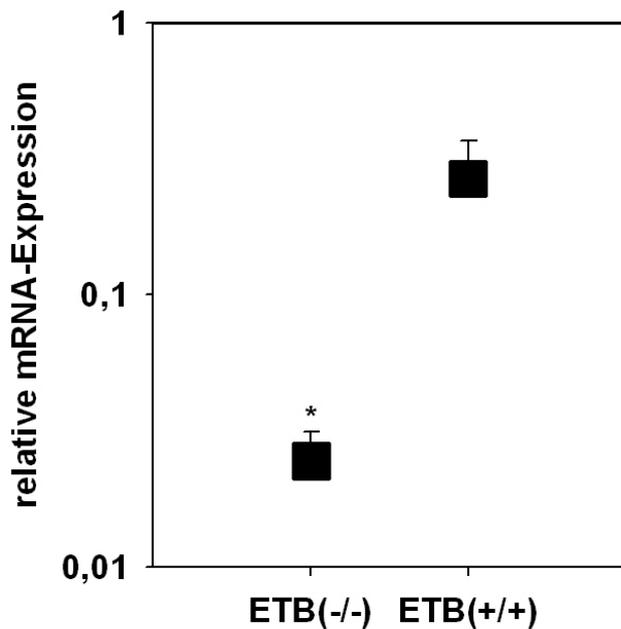


Abb. 3.8: Die ET_A-Rezeptorexpression wurde in isolierten präglomerulären Gefäßen untersucht. Es zeigt sich eine signifikant niedrigere Expression in den Gefäßen der ET_B-Rezeptor-defizienten Mäuse (ETB(-/-), n=9) im Vergleich zu den Wildtypen (ETB(+/+), n=11, * p<0,05).

ET_A-Rezeptor-mRNA im Nierengewebe

Im Gewebe der gesamten Niere der ET_B-Rezeptor-defizienten Mäuse war ebenfalls signifikant weniger ET_A-Rezeptor-mRNA im Vergleich zu den Wildtypen vorhanden (Abb. 3.9)

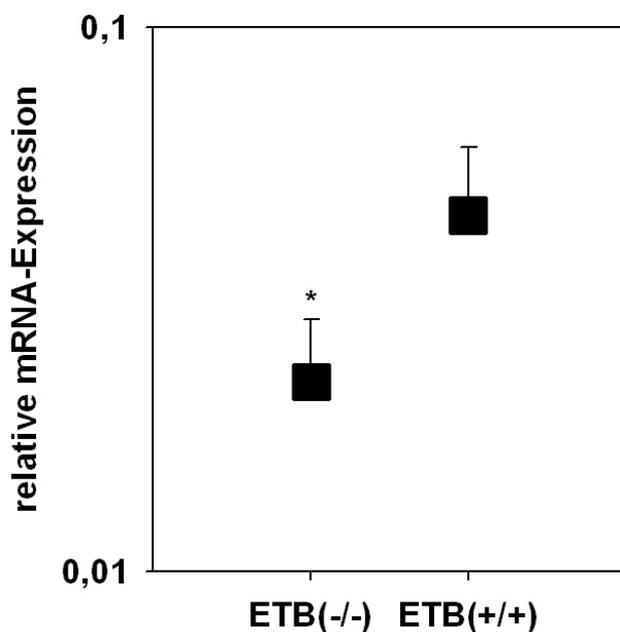


Abb. 3.9: ET_A-Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene im gesamten Nierengewebe. Es zeigt sich eine signifikant niedrigere Expression in den Gefäßen der ET_B-Rezeptor-defizienten Mäuse (ETB(-/-), n=10) im Vergleich zu den Wildtypen (ETB(+/+), n=6, * p<0,05)

3 Ergebnisse

ET_A-Rezeptor-Protein im Nierengewebe

Da die durch die Eisenoxid-Sieb-Technik gewonnenen Gewebemengen zu klein waren, um Rezeptor- oder Enzymproteine mittels der Western Blot-Technik zu analysieren, wurde Gewebe einer ganzen Niere verwendet. Die Proteinmenge des ET_A-Rezeptors der ET_B-Rezeptor-defizienten Mäuse war signifikant geringer als die der Wildtypen (Abb. 3.10).

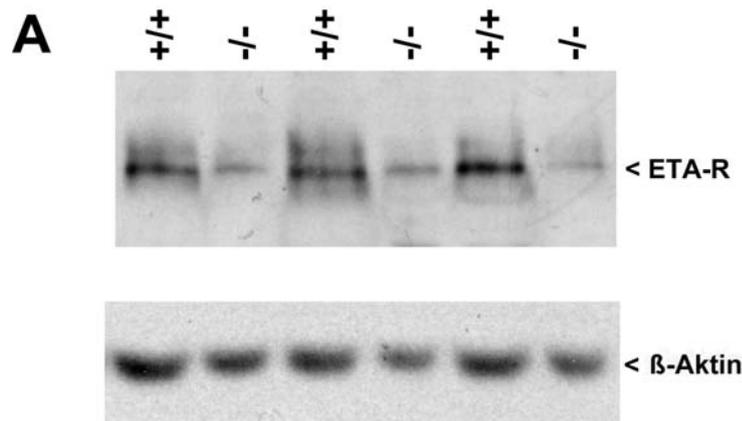
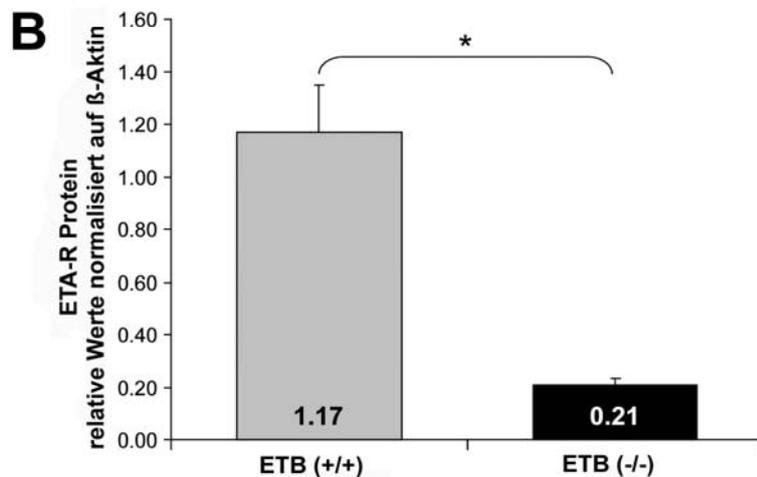


Abb. 3.10: ET_A-Proteinexpression im gesamten Nierengewebe. Es zeigt sich eine signifikant niedrigere ET_A-Rezeptor-Proteinmenge (ETA-R) in den ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen (ETB(-/-), n=7) im Vergleich zu den Wildtypen (ETB(+/-), n=7, * p<0,05).



3.2.2 Expression von Endothelin im Nierengewebe

Die mittels Western-Blot-Technik bestimmte ET-1-Proteinmenge war in der Niere der ET_B-Rezeptor-defizienten Mäuse deutlich größer als bei den Wildtypen (Abb. 3.11).

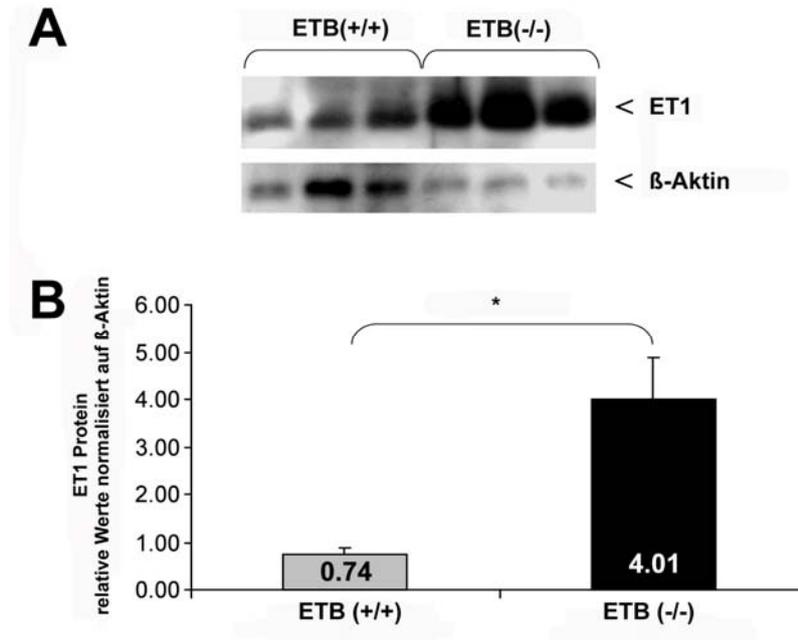


Abb. 3.11: Expression von Endothelin-1-Protein (ET1) im Nierengewebe von ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen (ETB(-/-), n=10) und Wildtypen (ETB(+/+), n=10, * p<0,05)

3.2.3 Expression der NOS-Synthasen

eNOS-mRNA in isolierten afferenten Arteriolen

ET_B-Rezeptor-defiziente Mäuse hatten weniger eNOS-mRNA in afferenten Arteriolen als Wildtypen (Abb. 3.11).

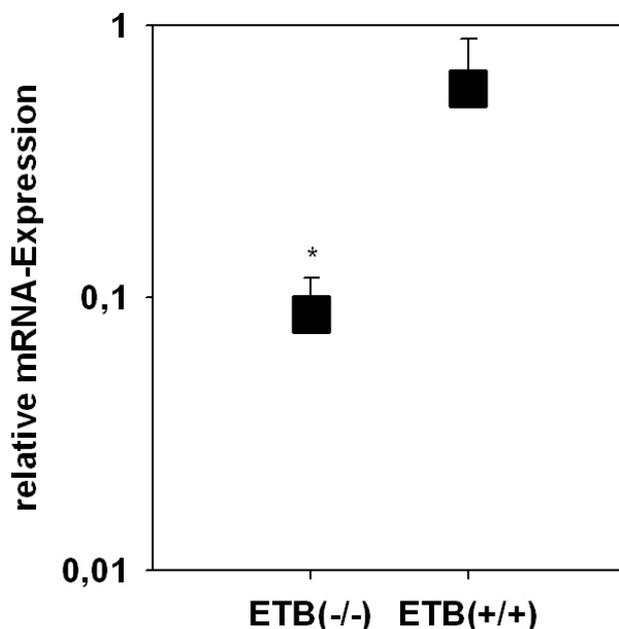


Abb. 3.11: eNOS-mRNA in isolierten afferenten Arteriolen. ET_B-Rezeptor-defiziente Mäuse (ETB(-/-) n=5) exprimieren weniger eNOS-mRNA als Wildtypen (ETB(+/+), n=5, * p<0,05).

3 Ergebnisse

eNOS-mRNA im Nierengewebe

In der Gesamtniere war die eNOS-mRNA in ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen und in Wildtypen ähnlich (Abb. 3.12).

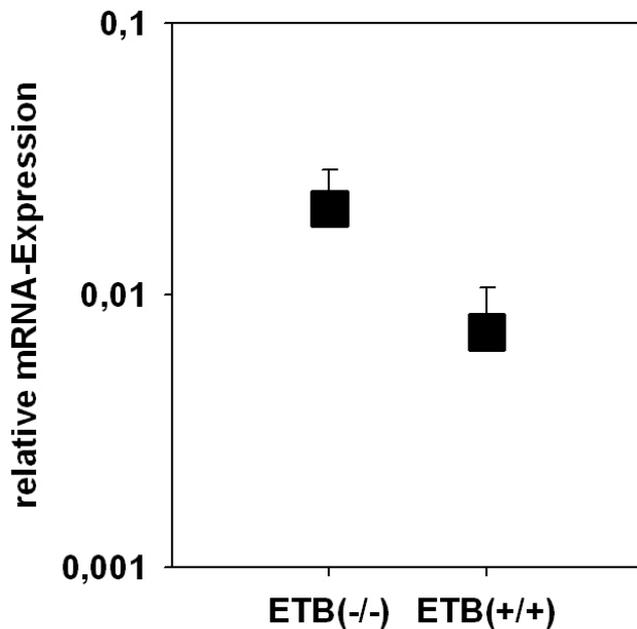


Abb. 3.12: eNOS-mRNA in der Gesamtniere. Die eNOS-Expression ist in den ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen (ETB(-/-), n=10) im Vergleich zu den Wildtypen (ETB(+/+), n=4) nicht verändert.

iNOS-mRNA im Nierengewebe

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Menge von iNOS-mRNA im Vergleich von ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen und Wildtypen (Abb. 3.13).

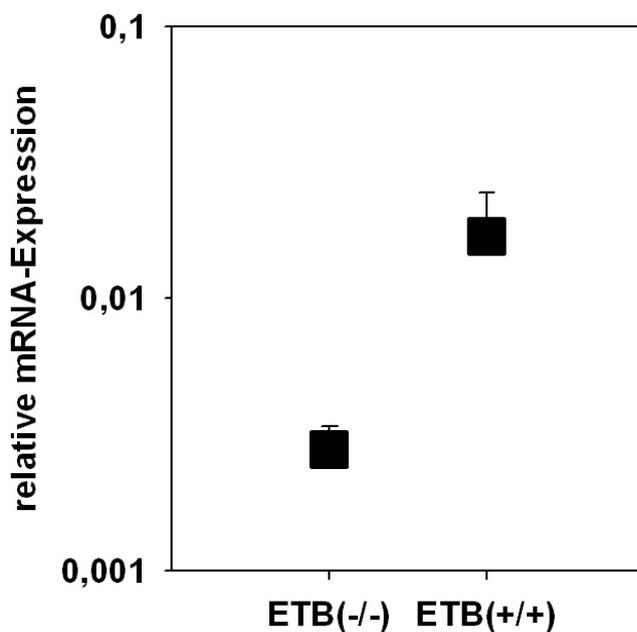


Abb. 3.13: Expression von iNOS-mRNA in der Gesamtniere. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen (ETB(-/-), n=14) und Wildtypen (ETB(+/+), n=9).

3 Ergebnisse

nNOS-mRNA im Nierengewebe

ET_B-Rezeptor-defiziente Mäuse und Wildtypen wiesen ähnliche nNOS-mRNA-Mengen im Nierengewebe auf (Abb. 3.14).

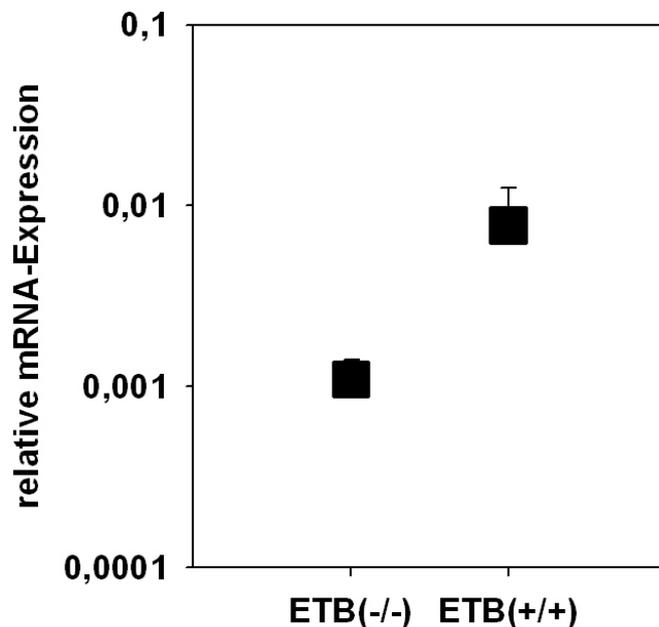


Abb. 3.14: nNOS-mRNA im Nierengewebe. Es gibt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich von ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen (ETB(-/-), n=14) und Wildtypen (ETB(+/+), n=9).

3.2.4 Expression von Angiotensinrezeptoren

AT_{1A}-Rezeptor-mRNA im Nierengewebe

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression des AT_{1A}-Rezeptors auf mRNA-Ebene im Nierengewebe (Abb. 3.15).

AT₂-Rezeptor-mRNA im Nierengewebe

Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression des AT₂-Rezeptors auf mRNA-Ebene im Vergleich von ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen und Wildtypen gefunden (Abb. 3.16).

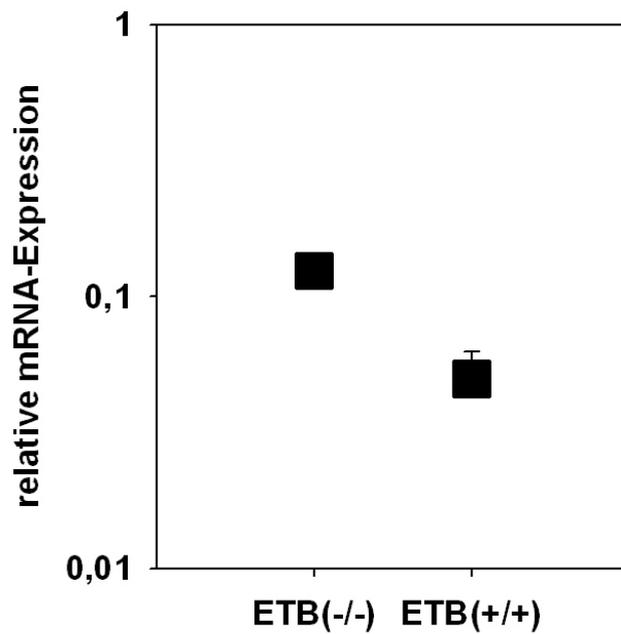


Abb. 3.15: AT_{1A} -Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene im Nierengewebe. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von ET_B -Rezeptor-defizienten Mäusen ($ET_B(-/-)$, $n=13$) und Wildtypen ($ET_B(+/+)$, $n=9$)

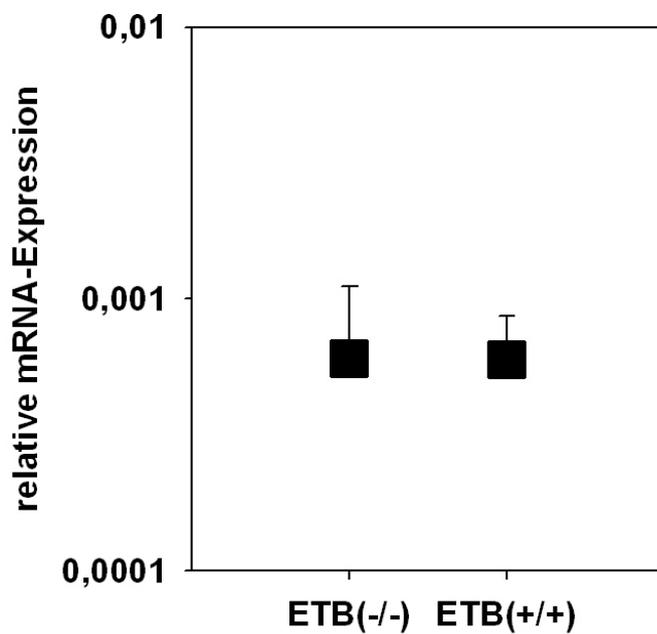


Abb. 3.16: AT_2 -Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene im Nierengewebe. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen ET_B -Rezeptor-defizienten Mäusen ($ET_B(-/-)$, $n=12$) und Wildtypen ($ET_B(+/+)$, $n=4$).

4 Diskussion

4.1 Evaluation der Isolation präglomerulärer Gefäße mittels Eisenoxid

4.1.1 Dilatationsfähigkeit der isolierten Aorten

Die Isolation von präglomerulären Gefäßen der Niere mit der Eisenoxid-Sieb-Methode nach Chaudhari und Mitarb. (28) ist ein Verfahren, das der Gewinnung einer größeren Anzahl dieser Gefäße aus der Niere dient. In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob das von uns modifizierte Verfahren für die molekularbiologische Analyse von Gefäßen, d.h. der Genexpression auf mRNA- und Proteinebene, geeignet ist. Da präglomeruläre Gefäße in dieser Menge nur durch das Verfahren nach Chaudhari und Mitarb. gewonnen werden können und kein „Goldstandard“ zu Verfügung steht, wurde ein Aortenmodell für die funktionelle Testung der eisenoxidperfundierten Gefäße verwendet. Dies diente der Prüfung der Funktion von Endothelzellen und ihrer Genexpression. Die endothelabhängige Dilatation von isometrisch arbeitenden Aortenringen durch Gabe von Azetylcholin war mit und ohne Eisenoxid in der Perfusionslösung gleich. Die Wirkung von Azetylcholin wird in der thorakalen Aorta von Nagetieren hauptsächlich über die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase vermittelt (51; 120). In *eNOS-knock out*-Mäusen wurde gezeigt, dass sich in der Aorta keine Endothel-vermittelte Relaxation durch Azetylcholin auslösen lässt (27). Die Dilatation durch Azetylcholin ist also von einer funktionsfähigen Endothelzellschicht abhängig. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen deshalb auf eine weitestgehende Integrität des Endothels in den Aorten hin.

Andere Untersuchungen der Zellfunktion von Gefäßen, die mit der Eisenoxidmethode isoliert wurden, zeigen, dass in Endothelzellen und glatten Muskelzellen wahrscheinlich keine schwerwiegenden Schäden durch diese Methode auftreten (106; 139). In der Ratte wurden auch erfolgreich Untersuchungen an Kalzium-aktivierten Kaliumkanälen glatter Muskelzellen durchgeführt (61) bzw. die Bildung von 20-HETE in isolierten präglomerulären Gefäßen gemessen (222).

4.1.2 Expression von Markergenen des Endothels

ET-1 (Edn1), eNOS und PECAM-1 werden exklusiv in Endothelzellen exprimiert und können deshalb als Markergene verwendet werden. Die mRNA-Expression dieser Gene wurde relativ zum β -Aktin gemessen. Die Expression von Edn1 und eNOS in den mit Eisenoxid behandelten Aorten unterschied sich nicht signifikant von derjenigen der un-

behandelten Aorten. PECAM-1 war etwas geringer (signifikant) in den Eisenoxid-behandelten Aorten exprimiert. Diese Befunde sprechen eher für eine geringfügige Beeinträchtigung der Endothelzellschicht in den Eisenoxid-perfundierten Aorten durch die von uns verwendete Perfusionsmethode. Eine der Modifikationen der von Chaudhari und Mitarb. (28) inaugurierten Methode bestand in der Zugabe von Albumin zur Perfusionslösung, mit dem Ziel der Albuminschichtbildung um die Eisenpartikel. Inwieweit hierdurch ein Schutz für die Endothelzellen erreicht wurde, haben wir jedoch systematisch nicht untersucht.

Obwohl die Ergebnisse des Aortenmodells auf einen insgesamt geringen Effekt des Eisenoxids schließen lassen, können sie nur bedingt auf die wesentlich kleineren präglomerulären Gefäße übertragen werden. Gründe liegen im unterschiedlichen Wand- und Endothelaufbau sowie in der Hämodynamik. In kleinen Arterien und Arteriolen sind die Flussgeschwindigkeiten geringer und es gibt zahlreiche Aufzweigungen, die einen höheren Anteil turbulenter Komponenten des Blutstroms bzw. im Strömungsprofil der Perfusionslösung erzeugen können. Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse des Aortenmodells wurden histologische und immunhistologische Untersuchungen von Eisenoxid-perfundierten Nieren durchgeführt.

4.1.3 Histologie der präglomerulären Gefäße

Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte der Niere zeigten, dass sich die Perfusionslösung, inklusive des Eisenoxids, ausschließlich intravaskulär verteilt. Im interstitiellen Raum fanden sich keine Eisenoxidpartikel. Das spricht für eine intakte Gefäßwand auch der kleinen Gefäße in der Nierenrinde. Afferent Arteriolen wurden regelmäßig mit Eisenoxid perfundiert, während die Kapillaren der Glomeruli nicht immer vollständig gefüllt waren. Es wurden keine Eisenoxid-gefüllte efferenten Arteriolen gefunden. Mit der kompletten Füllung der präglomerulären Gefäße ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche Isolation mit Hilfe der Magneten gegeben.

Die 0,5 – 1 µm starken Semidünnschnitte ermöglichten es, insbesondere die Beschaffenheit der Endothelzellen der Gefäße zu beurteilen. Diese waren gut erhalten. Auch immunhistochemische Färbungen mit CD31 (PECAM) zeigten eine durchgehende Fluoreszenz im Bereich der Endothelzellschicht. Dies sind Hinweise auf ein intaktes Endothel nach Eisenoxidperfusion in präglomerulären Gefäßen der Niere. Andere Studien stützen diese Aussage. Tarnawski und Mitarb. (196) verwendeten in ihren Untersu-

chungen ebenfalls eine Eisenoxid-basierte Methode für die Isolation von Mikrogefäßen der Magenmukosa. Drei Stunden nach der Isolation wurde ihre morphologische Unversehrtheit mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Das Zytoplasma, der Zellkern und die Zellmembran der Endothelzellen wiesen keine Veränderungen auf. Nach einem Tag bzw. drei und fünf Tagen Kultivierung besaßen die Gefäße eine basale Prostazyklinproduktion, die durch ein Kalzium-Ionophor aktiviert werden konnte.

4.1.4 Reinheit der Isolation

Ein wesentliches Kriterium für die Verwendbarkeit der isolierten Gefäße ist die Reinheit der Präparation. Chaudhari und Mitarb. (28) berichten von mehr als 95 % Gefäßanteil am Ende des Isolationsprozesses. Durch Optimierung der verwendeten Präparationsgefäße, Magnetstärke, verwendeten Kanülen, Siebgrößen und Prozeduren liegt die Reinheit des von uns gewonnen Materials bei über 80 %. Stichprobenartige Tests wurden durchgeführt, um die Qualität zu prüfen. Ursachen für die geringere Reinheit unserer Isolation liegen vermutlich in den Unterschieden in den Bindegewebsanteilen des Nierenparenchyms. Eigene Erfahrungen bei der manuellen Präparation von Kaninchen und Mäusenieren sprechen für eine bessere Separation von Parenchymanteilen in der Kaninchenniere (unpubliziert).

4.2 Genexpression in den ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen und Wildtypen

4.2.1 Endothelinsystem

Expression von ET-1 und ET_A-Rezeptor

In den ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen der vorliegenden Studie wies das Nierengewebe mehr ET-1-Protein auf als das der Wildtypen.

ET_B-Rezeptoren in den Endothelzellen, vor allem der Lunge, bewirken die Entfernung (Clearance) von Endothelin aus der Blutbahn und damit dessen Abbau. Dies stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus für ET-1 und seine Wirkung auf die Gefäße dar (44; 45; 207). Obgleich andere Organe wie Niere und Milz ebenfalls an der Clearance von ET-1 beteiligt sind, ist die Lungenpassage, bei der etwa 50 % des zirkulierenden ET-1 entfernt wird, von besonderer Bedeutung (207). Die erhöhte ET-1-Proteinmenge im Nierengewebe in der vorliegenden Arbeit beruht vermutlich auf der verminderten Clearance

von ET-1. Erhöhte ET-1-Plasmakonzentrationen wurden auch in anderen ET_B-Rezeptor-*knock-out*-Modellen gesehen (60), darunter in einem Modell des selektiven ET_B-Rezeptor-*knock outs* im Endothel (10). Einige pathologische Zustände wie z.B. pulmonale Hypertonie im Tiermodell oder chronische Herzinsuffizienz (dilatative Kardiomyopathie) gehen mit einer Verminderung von ET_B-Rezeptoren in der Lungenstrombahn bzw. linken Ventrikel einher. Die ET-1 Konzentrationen sind hier erhöht (174; 221). Die Gesamtheit dieser Befunde unterstützt die Annahme einer ET-1-Konzentrationserhöhung infolge ET_B-Rezeptormangels.

Protein und mRNA des ET_A-Rezeptors waren in der Gesamtniere von ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen in der vorliegenden Studie vermindert. Eine geringere Rezeptor-mRNA-Expression fand sich ebenso in den isolierten präglomerulären Gefäßen dieser Tiere. Davenport und Mitarb. berichteten über eine geringere ET_A-Rezeptordichte im Zentralnervensystem und in anderen Organen ET_B-Rezeptor-defizienter Mäuse. Das Verteilungsmuster war dabei nicht verändert (36). Auch in ET_B-Rezeptor-defizienten-Ratten („*rescue*“-Modell) wurden geringere Expressionen des ET_A-Rezeptors im Nierenkortex und in der äußeren Medulla gesehen (197). Die Ergebnisse weisen auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen ET_B-Rezeptor-Defizit und Verminderung der ET_A-Rezeptor-Dichte/Menge hin. Da sowohl das Gewebe der gesamten Niere, das überwiegend aus Tubuli besteht, die auch ET-Rezeptoren exprimieren, als auch isolierte Arteriolen diesen Effekt auf mRNA-Ebene aufweisen, handelt es sich eher um einen allgemeinen Regulationsmechanismus der Rezeptorexpression. Es ist nicht ganz klar, ob Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen (Proteinebene oder via Transkriptionskontrolle), oder eher die durch das ET_B-Rezeptor-Defizit erhöhte ET-1 Konzentration für diesen Befund verantwortlich sind. Studien an isolierten glatten Muskelzellen zeigten eine Verminderung der ET-Rezeptorexpression bei langfristiger Behandlung mit ET-1 (84). Dies spricht für eine ET-1-vermittelte Suppression der ET_A-Rezeptoren. In kleinen mesenterialen Gefäßen ET_B-Rezeptor-defizienter Ratten fand man geringere Mengen ET_A-Rezeptor-Protein (Western Blot) (150). Dies steht im Gegensatz zu den Befunden der Niere. Die wenigen experimentellen Arbeiten zu diesem Thema lassen allerdings nur die Spekulation zu, dass es organspezifische Unterschiede hinsichtlich eines Einflusses des ET_B-Rezeptor-Defizits (bzw. der ET-1-Konzentration) auf die ET_A-Rezeptor-Expression gibt.

Die verminderte ET_A-Rezeptor-Expression in den ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen stellt einen wichtigen Befund in Bezug auf die Verwendung des Modells für die Untersuchung der ET-Rezeptor-Funktionen im renalen Gefäßsystem dar. Pilotstudien zeigen, dass sich die ET-1-Gefäßreaktivität afferenter Arteriolen, welche ET_A- und ET_B-Rezeptoren in der glatten Muskulatur sowie ET_B-Rezeptoren im Endothel exprimieren (54; 214), in ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen nicht unterscheidet (177). In dem gleichen Modell fanden Quaschnig und Mitarb. (157) eine geringere ET-1-Antwort (max. Kontraktion) in Aorten ET_B-Rezeptor-defizienter Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen. Weder in den defizienten Mäusen noch in den Wildtypen beeinflusste die ET_B-Rezeptorblockade die ET-1-induzierten Antworten, die ET_A-Rezeptorblockade unterdrückte sie dagegen vollständig. Dies spricht für eine wichtige Rolle von ET_B-Rezeptoren bei der kontraktilen Antwort auf ET-1 in der Aorta. Ein ähnlicher Befund liegt für ET_B-Rezeptor-defiziente Ratten vor, bei denen eine verringerte ET-1-Antwort in kleinen mesenterialen Arterien beobachtet wurde, obwohl die ET_A-Rezeptor-Expression erhöht war. Die Autoren vermuten eine durch erhöhte ET-1-Plasmakonzentration verursachte Entkopplung der ET_A-Rezeptoren von den nachgeschalteten Signalwegen (150).

4.2.2 Expression der NOS-Isoformen

Expression der eNOS auf mRNA-Ebene in der isolierten präglomerulären Gefäßen und der Gesamtniere

Die eNOS-mRNA war in den präglomerulären Gefäßen von ET_B-defizienten Mäusen vermindert, während es im Gewebe der gesamten Niere keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Wildtypen gab.

Die eNOS wird ganz überwiegend in den Endothelzellen der Nierengefäße exprimiert (8). Ihre Aktivierung ist für die Induktion einer Gefäßdilataion durch eine ganze Reihe von Agonisten verantwortlich. Endothelständige ET_B-Rezeptoren vermitteln ihren vasodilatatorischen Effekt zu einem großen Teil über die Freisetzung von NO, welches durch die eNOS gebildet wird (211). Die Expressionsreduktion von eNOS in kleinen Nierenarterien von ET_B-defizienten Mäusen weist auf eine direkte oder indirekte (via ET-1) Beziehung zwischen ET_B-Rezeptor und eNOS hin. Tatsächlich wurde in humanen endothelialen Zellen gezeigt, dass hohe ET-1-Konzentrationen die endotheliale NO-Produktion über eine Hemmung der eNOS-Expression vermindern (159). Allerdings war

der deprimierende Effekt von ET-1 auf die Expression von Caveolin-1 and eNOS in HUVEC-Zellen einer anderen Studie ET_B-Rezeptor-abhängig (40). Letztere Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie an isolierten präglomerulären Gefäßen der Niere. Zwei weitere Studien fanden ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Endothelzell dysfunktion und ET_B-Rezeptor-Defizit. In Aorten ET_B-Rezeptor-defizienter Mäuse war die endothelabhängige Dilatation eingeschränkt (157), ebenso wie in Aorten von Mäusen mit endothelspezifischem ET_B-Rezeptor-Defizit (10). In beiden Modellen wird eine geringere Bioverfügbarkeit von NO, gebildet durch die eNOS, als Ursache diskutiert.

Im Material der Gesamtniere fand sich kein Unterschied in der eNOS-mRNA-Expression im Vergleich beider Gruppen. Da die Endothelschicht einen geringen Anteil am Parenchym der Niere einnimmt, wird der in den isolierten Gefäßen beobachtete Unterschied im gesamten Nierengewebe vermutlich maskiert.

Expression von iNOS und nNOS in der Gesamtniere

Beide NOS-Isoformen sind nicht differentiell im Vergleich zwischen ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen und Wildtypen auf mRNA-Ebene exprimiert.

Die konstitutive nNOS kommt in der Niere hauptsächlich in den Maculas densa-Zellen und im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife vor (8; 132). Genregulationsmechanismen dieser sonst vorrangig im Nervensystem exprimierten NOS in Nierenepithelzellen sind in der Literatur nicht beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten suggerieren keine Beziehung zwischen ET_B-Rezeptor(defizit) und nNOS. Es wurden jedoch keine isolierten Zellen bzw. Tubuli untersucht. Deshalb kann ein möglicher Effekt durch die Verwendung ganzer Nieren maskiert sein.

Die nicht-konstitutive, induzierbare iNOS wird durch Entzündungsmediatoren und verschiedene andere Signalwege aktiviert, aber möglicherweise auch durch ET-1 in ihrer Expression beeinflusst. In Nierenarterien ET-1-transgener Mäuse (87), deren ET-1-Konzentration im Nierengewebe erhöht ist, wurden stärkere iNOS-Expressionen als in Wildtypen mittels Immunohistologie gefunden (86). Es fanden sich dagegen keine Unterschiede der iNOS-mRNA-Mengen im gesamten Nierengewebe solcher ET-1-transgenen Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen in einer anderen Studie (145). Denkbar ist, dass iNOS nur in Gefäßen ET_B-Rezeptor-defizienter Mäuse stärker exprimiert

wird. Die Literatur kann hier nicht zu einer weiteren Klärung der Beziehung zwischen ET_B-Rezeptor-Defizit und iNOS-Expression beitragen.

4.2.3 Expression der Angiotensinsysteme

Expression von AT_{1A}- und AT₂-mRNA in der Gesamtniere

Für beide Rezeptortypen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression im Vergleich von ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen und Wildtypen.

ET-1 hemmt die Sekretion von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen (2; 14; 111; 128). Da ET_B-Rezeptoren an diesem Effekt beteiligt sind (170), könnte es in ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen zu Erhöhungen der Ang I- und damit Ang II-Konzentrationen im Plasma kommen. Änderungen der Angiotensin-Rezeptorexpression wären die Folge (42). Diese Befunde lassen sich aufgrund fehlender Daten über Ang II-Konzentrationen bei ET_B-Rezeptordefizit oder bei ET-1-Konzentrationserhöhung nur ungenügend interpretieren.

Einschränkungen der Studie

Quantitative Beurteilungen der Expression von Genen/Proteinen sind mit Methoden möglich, die eine Messung der Proteinmenge ermöglichen. Dazu ist der Western Blot prinzipiell geeignet, wenn Bedingungen wie Selektivität der Antikörper, eine geeignete Normalisierung usw. gegeben sind. Die Empfindlichkeit dieser Methode reichte in der vorliegenden Studie jedoch nicht aus, um Rezeptor- oder Enzymproteine in isolierten präglomerulären Gefäßen zu bestimmen. Strukturproteine und Proteine des kontraktiven Apparates, die in wesentlich höherer Konzentration in Gefäßen bzw. glatten Muskelzellen vorliegen, können mit dem Western Blot auch aus isolierten kleinsten Nierengefäßen (Eisenoxid-Sieb-Technik) beurteilt werden (113). Die *real time* PCR gestattet die Bestimmung der Genexpression auf mRNA-Ebene. Aussagen zur Proteinexpression sind nur bedingt möglich, da translationelle und posttranslationelle Modifikationen die Endkonzentration des Proteins beeinflussen. Bei transgenen Tieren mit angeborenem Defekt kann man von einem *steady state* der Genexpressionsmechanismen ausgehen und die Beurteilung der Expression auf mRNA-Ebene ist möglich.

Die in Mäusenieren gewonnenen Gewebemengen bzw. Zellzahl gestattete die Analyse mittels *real time* PCR nur für 2 Gene. Es wurden ganze Nieren verwendet, um die weitere interessierende Gene zu untersuchen. Gefäße haben nur einen geringen Anteil am

4 Diskussion

Nierengewebe, deshalb sind Maskierungen von Genexpressionänderungen bei diesem Vorgehen möglich und schränken die Aussage der Studie hier ein.

Schlussfolgerungen

ET_B-Rezeptor-defiziente Mäuse weisen Expressionsveränderungen von Genen des Endothelin- und Stickstoffmonoxidsystems auf. Dazu gehören die Verminderung des ET_A-Rezeptors in präglomerulären Gefäßen, erhöhte ET-1-Konzentrationen in der Niere sowie eine verminderte eNOS-mRNA-Expression in den Gefäßen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Verwendung von *knock-out*-Tiermodellen für physiologische Untersuchungen der Rolle des Endothelinsystems bei der Regulation der Nierendurchblutung und GFR eine gründliche Kenntnis der durch das Gendefizit induzierten Änderungen im Funktionssystem des betroffenen Genes als auch anderer physiologischer Systeme bedarf. In diesem Sinne trägt die Schrift zu einer weiteren Aufklärung der funktionellen Interaktionen vasoaktiver Systeme in der Niere bei.

5 Zusammenfassung

Hintergrund und Aufgabenstellung

1. Das Endothelinsystem hat für die physiologische Funktion der Niere als auch für die Entstehung von Nierenerkrankungen eine große Bedeutung. Endothelineffekte an Nierenarterien und –arteriolen werden über zwei Rezeptortypen, den Endothelinrezeptor Typ A (ET_A) und Typ B (ET_B) vermittelt. Der Beitrag dieser Rezeptortypen zu den Endothelinwirkungen ist auch aufgrund begrenzter Selektivität von Rezeptoragonisten und -antagonisten nicht vollständig bekannt.
2. Im Rahmen eines Projektes, das sich mit den Wirkungen von Endothelin auf die Nierendurchblutungsregulation beschäftigt, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welchen Einfluß ein ET_B-Rezeptor-Defizit auf die Expression von Komponenten des Endothelin-, Renin-Angiotensin- und Stickstoffmonoxidsystems in präglomerulären Gefäßen hat. Diese Systeme sind entscheidend an der Regulation der Nierendurchblutung beteiligt und interagieren auf systemischer und zellulärer Ebene.

Methoden

3. Die Experimente wurden an ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen und Wildtypen durchgeführt. Bei den ET_B-Rezeptor-defizienten Mäusen handelte es sich um ein „rescue“-Modell, bei dem im sympathischen Nervensystem ET_B-Rezeptoren selektiv exprimiert werden, um die Ausbildung eines Megakolons zu vermeiden.
4. Genexpressionen wurden auf mRNA-Ebene mittels *real time* PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert. Zur Isolation präglomerulärer Gefäße diente eine modifizierte Eisenoxid-Sieb-Technik.
5. Ein möglicher Effekt des Eisenoxids auf die Gefäße, insbesondere auf die Endothelschicht, wurde in zwei Modellen untersucht. Aortenringe von Mäusen, die eine Perfusion mit oder ohne Eisenoxid erhielten, wurden unter isometrischen Bedingungen hinsichtlich ihrer endothelabhängigen Dilatation durch Azetylcholingabe untersucht. Die mRNA-Expression der endothelialen Markergene endotheliale Stickoxidsynthese (eNOS), PECAM-1 und Endothelin-1 wurde in beiden Gruppen gemessen. Histologische und immunhistologische Methoden dienten der Beurteilung des Nierengewebes dieser Tiere.

Ergebnisse

6. Die Dilatation der Aorta als auch die Expression der Markergene unterschieden sich nicht wesentlich zwischen beiden Gruppen. Hämatoxylin-Eosin-Schnitte, Semi-Dünnschnitte und PECAM-1 (CD31) Immunfärbungen des Nierengewebes weisen auf ein intaktes Endothel nach Eisenoxidperfusion hin.
7. ET_B-Rezeptor-defiziente Mäuse zeigten eine geringere ET_A-Rezeptorexpression in den präglomerulären Gefäßen (mRNA) und gesamten Nierengewebe (mRNA und Protein mittels Western Blot) im Vergleich zu den Wildtypen. Das Endothelinprotein war im Nierengewebe erhöht.
8. Die eNOS-mRNA war in den präglomerulären Gefäßen der ET_B-Rezeptor-defizienten Mäuse vermindert, jedoch nicht in der gesamten Niere.
9. Die mRNA-Mengen von neuronaler NOS (nNOS), induzierbarer NOS (iNOS), Angiotensin Typ 1A Rezeptor (AT_{1A}) und Typ 2 Rezeptor (AT₂) wurden ausschließlich im gesamten Nierengewebe gemessen und differierten zwischen den Gruppen nicht.

Schlußfolgerungen

10. Die Arbeit zeigt, dass die verwendete Isolationsmethode mittels Eisenoxid keine wesentlichen Auswirkungen auf das Gewebe hat und für die Genexpressionsanalyse geeignet ist.
11. ET_B-Rezeptordefizit geht mit Änderungen der Genexpression des Endothelin- und Stickstoffmonoxidsystems einher. Die fehlende *Clearance*-Funktion bei Fehlen des ET_B-Rezeptors führt zum Anstieg der Endothelin-1 (ET-1)-Konzentration. Dies ist eine Ursache verminderter ET_A-Rezeptorexpression.
12. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen auf deutliche Änderungen der Genexpression im Endothelinsystem und der eNOS von Nieren ET_B-Rezeptor-defizienter Mäuse hin. Diese Kenntnisse sind für die Interpretation funktioneller Untersuchungen an ET_B-Rezeptor-defizienter Mäusen von Bedeutung. Sie zeigen zugleich, dass selektiver *Gen-knock out* zu umfangreichen Veränderungen der Genexpressionen und damit zur Modulation physiologischer Funktionen führt.

6 Literaturverzeichnis

1. Dialyse: Ursachen des Nierenversagens haben sich gewandelt. Deutsches Ärz-
telatt: <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/35721/> 2009.
2. **Ackermann M, Ritthaler T, Riegger G, Kurtz A and Kramer BK.** Endothelin
inhibits cAMP-induced renin release from isolated renal juxtaglomerular cells.
3. **Amiri F and Garcia R.** Differential regulation of renal glomerular and preglome-
rular vascular angiotensin II receptors. *Am J Physiol* 270: E810-E815, 1996.
4. **Arendshorst WJ, Brannstrom K and Ruan X.** Actions of angiotensin II on the
renal microvasculature. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S149-S161, 1999.
5. **Armando I, Jezova M, Juorio AV, Terron JA, Falcon-Neri A, Semino-Mora C,
Imboden H and Saavedra JM.** Estrogen upregulates renal angiotensin II AT(2)
receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F934-F943, 2002.
6. **Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami JP,
Salvayre R and Bayard F.** Ethinylestradiol does not enhance the expression of
nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bio-
active nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci U
S A* 93: 4108-4113, 1996.
7. **Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B and Rami J.** Endothelium-
derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 55:
1078-1087, 1999.
8. **Bachmann S, Bosse HM and Mundel P.** Topography of nitric oxide synthesis
by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 268:
F885-F898, 1995.
9. **Bachmann S and Mundel P.** Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization,
and function. *Am J Kidney Dis* 24: 112-129, 1994.
10. **Bagnall AJ, Kelland NF, Gulliver-Sloan F, Davenport AP, Gray GA, Yanagi-
sawa M, Webb DJ and Kotelevtsev YV.** Deletion of endothelial cell endothelin
B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension* 48:
286-293, 2006.
11. **Balakrishnan SM, Wang HD, Gopalakrishnan V, Wilson TW and McNeill JR.**
Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II.
Hypertension 28: 806-809, 1996.

12. **Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P and Luscher TF.** Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 861-865, 1997.
13. **Baumann JE, Persson PB, Ehmke H, Nafz B and Kirchheim HR.** Role of endothelium-derived relaxing factor in renal autoregulation in conscious dogs. *Am J Physiol* 263: F208-F213, 1992.
14. **Beierwaltes WH and Carretero OA.** Nonprostanoid endothelium-derived factors inhibit renin release. *Hypertension* 19: II68-II73, 1992.
15. **Bell PD, Lapointe JY, Sabirov R, Hayashi S, Peti-Peterdi J, Manabe K, Kovacs G and Okada Y.** Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4322-4327, 2003.
16. **Birnbaumer L, Abramowitz J and Brown AM.** Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1031: 163-224, 1990.
17. **Blantz RC, Deng A, Lortie M, Munger K, Vallon V, Gabbai FB and Thomson SC.** The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int* 61: 782-785, 2002.
18. **Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB and Quertermous T.** cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 10: 236-242, 1991.
19. **Bloom IT, Bentley FR, Wilson MA and Garrison RN.** In vivo effects of endothelin on the renal microcirculation. *J Surg Res* 54: 274-280, 1993.
20. **Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Derwand R, de Wit C, Loirand G and Pohl U.** Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation* 107: 3081-3087, 2003.
21. **Boucher R, Asselin J and Benest J.** A new enzyme leading to direct formation of angiotensin II. *Circ Res* 34 (Suppl.): 1203-1209, 1974.
22. **Brochu E, Lacasse S, Lariviere R, Kingma I, Grose JH and Lebel M.** Differential effects of endothelin-1 antagonists on erythropoietin-induced hypertension in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 10: 1440-1446, 1999.
23. **Brooks DP, DePalma PD, Pullen M, Elliott JD, Ohlstein EH and Nambi P.** SB 234551, a novel endothelin--A receptor antagonist, unmasks endothelin-induced

- renal vasodilatation in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1: S339-S341, 1998.
24. **Campbell DJ**. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 79: 1-6, 1987.
 25. **Carey RM, Jin X, Wang Z and Siragy HM**. Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT₂) angiotensin receptor. *Acta Physiol Scand* 168: 65-71, 2000.
 26. **Chade AR, Best PJ, Rodriguez-Porcel M, Herrmann J, Zhu X, Sawamura T, Napoli C, Lerman A and Lerman LO**. Endothelin-1 receptor blockade prevents renal injury in experimental hypercholesterolemia. *Kidney Int* 64: 962-969, 2003.
 27. **Chataigneau T, Feletou M, Huang PL, Fishman MC, Duhault J and Vanhoutte PM**. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol* 126: 219-226, 1999.
 28. **Chaudhari A and Kirschenbaum MA**. A rapid method for isolating rabbit renal microvessels. *Am J Physiol* 254: F291-F296, 1988.
 29. **Chua BH, Chua CC, Diglio CA and Siu BB**. Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1178: 201-206, 1993.
 30. **Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C and Bolotina VM**. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res* 84: 210-219, 1999.
 31. **Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y and Penninger JM**. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417: 822-828, 2002.
 32. **Cupples WA and Braam B**. Assessment of renal autoregulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1105-F1123, 2007.
 33. **D'Angelo G, Pollock JS and Pollock DM**. In vivo evidence for endothelin-1-mediated attenuation of alpha₁-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1251-H1258, 2006.

34. **Dahlof B, Keller SE, Makris L, Goldberg AI, Sweet CS and Lim NY.** Efficacy and tolerability of losartan potassium and atenolol in patients with mild to moderate essential hypertension. *Am J Hypertens* 8: 578-583, 1995.
35. **Danilczyk U, Eriksson U, Crackower MA and Penninger JM.** A story of two ACEs. *J Mol Med* 81: 227-234, 2003.
36. **Davenport AP and Kuc RE.** Down-regulation of ETA receptors in ETB receptor-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1: S276-S278, 2004.
37. **de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW and Unger T.** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-472, 2000.
38. **Devesly P, Phillips PE, Johns A, Rubanyi G and Parker-Botelho LH.** Receptor kinetics differ for endothelin-1 and endothelin-2 binding to Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 126-134, 1990.
39. **Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI and Fabiani ME.** Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 100: 481-492, 2001.
40. **Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z and Ren J.** Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol* 145: 323-333, 2005.
41. **Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE and Acton S.** A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87: E1-E9, 2000.
42. **Douglas JG and Brown GP.** Effect of prolonged low dose infusion of angiotensin II and aldosterone on rat smooth muscle and adrenal angiotensin II receptors. *Endocrinology* 111: 988-992, 1982.
43. **Dumont Y, D'Amours M, Lebel M and Lariviere R.** Supplementation with a low dose of L-arginine reduces blood pressure and endothelin-1 production in hypertensive uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant* 16: 746-754, 2001.
44. **Dupuis J, Goresky CA and Fournier A.** Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 81: 1510-1515, 1996.

45. **Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P and Gosselin G.** Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* 94: 1578-1584, 1996.
46. **Dzau VJ.** Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77: 14-13, 1988.
47. **Dzau VJ, Sasamura H and Hein L.** Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens Suppl* 11: S13-S18, 1993.
48. **Endlich K, Hoffend J and Steinhausen M.** Localization of endothelin ETA and ETB receptor-mediated constriction in the renal microcirculation of rats. *J Physiol* 497: 211-218, 1996.
49. **Endo S, Inooka H, Ishibashi Y, Kitada C, Mizuta E and Fujino M.** Solution conformation of endothelin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *FEBS Lett* 257: 149-154, 1989.
50. **Engeli S, Negrel R and Sharma AM.** Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 1270-1277, 2000.
51. **Faraci FM and Sigmund CD.** Vascular biology in genetically altered mice : smaller vessels, bigger insight. *Circ Res* 85: 1214-1225, 1999.
52. **Farhat N, Matouk CC, Mamarbachi AM, Marsden PA, Allen BG and Thorin E.** Activation of ETB receptors regulates the abundance of ET-1 mRNA in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 153: 1420-1431, 2008.
53. **Feil R and Kleppisch T.** NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol* 529-560, 2008.
54. **Fellner SK and Arendshorst WJ.** Endothelin A and B receptors of preglomerular vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 65: 1810-1817, 2004.
55. **Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A and Tallant EA.** Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* 18: III126-III133, 1991.
56. **Furchgott RF and Vanhoutte PM.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-2018, 1989.
57. **Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y and Shigekawa M.** Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem* 266: 12337-12341, 1991.

58. **Gallinat S, Edling O and Unger Th.** Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems. In: AT1-Rezeptorantagonisten Angiotensin II, edited by Dominiak P and Unger Th. Steinkopff, Darmstadt, 1999, p. 13-27.
59. **Gariepy CE, Ohuchi T, Williams SC, Richardson JA and Yanagisawa M.** Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest* 105: 925-933, 2000.
60. **Gariepy CE, Williams SC, Richardson JA, Hammer RE and Yanagisawa M.** Transgenic expression of the endothelin-B receptor prevents congenital intestinal aganglionosis in a rat model of Hirschsprung disease. *J Clin Invest* 102: 1092-1101, 1998.
61. **Gebremedhin D, Kaldunski M, Jacobs ER, Harder DR and Roman RJ.** Coexistence of two types of Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat renal arterioles. *Am J Physiol* 270: F69-F81, 1996.
62. **Gehlert DR, Gackenheim SL and Schober DA.** Autoradiographic localization of subtypes of angiotensin II antagonist binding in the rat brain. *Neuroscience* 44: 501-514, 1991.
63. **Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, Rankin AJ and Webb DJ.** Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation* 109: 1186-1193, 2004.
64. **Gohlke P, Pees C and Unger T.** AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 31: 349-355, 1998.
65. **Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Rios C, Trapaidze N and Devi LA.** G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med* 79: 226-242, 2001.
66. **Goto K, Hama H and Kasuya Y.** Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol* 72: 261-290, 1996.
67. **Gragasin FS, Michelakis ED, Hogan A, Moudgil R, Hashimoto K, Wu X, Bonnet S, Haromy A and Archer SL.** The neurovascular mechanism of clitoral erection: nitric oxide and cGMP-stimulated activation of BKCa channels. *FASEB J* 18: 1382-1391, 2004.

68. **Grammatopoulos TN, Johnson V, Moore SA, Andres R and Weyhenmeyer JA.** Angiotensin type 2 receptor neuroprotection against chemical hypoxia is dependent on the delayed rectifier K⁺ channel, Na⁺/Ca²⁺ exchanger and Na⁺/K⁺ ATPase in primary cortical cultures. *Neurosci Res* 50: 299-306, 2004.
69. **Granger JP, Abram S, Stec D, Chandler D and LaMarca B.** Endothelin, the kidney, and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 8: 298-303, 2006.
70. **Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W and Oksche A.** Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem* 279: 27679-27687, 2004.
71. **Gregan B, Schaefer M, Rosenthal W and Oksche A.** Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1: S30-S33, 2004.
72. **Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ and Lever AF.** Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 17: 626-635, 1991.
73. **Grobecker H.** Physiologie und Biochemie des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). In: Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, edited by Grobecker H. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2009, p. 17-27.
74. **Grunberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A and Schweda F.** The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res* 99: 1197-1206, 2006.
75. **Guo DF, Uno S and Inagami T.** Steroid hormones upregulate rat angiotensin II type 1A receptor gene: role of glucocorticoid responsive elements in rat angiotensin II type 1A promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 69-73, 1995.
76. **Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y and Buhler FR.** Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1: 649-659, 1990.
77. **Hansen PB, Hashimoto S, Briggs J and Schnermann J.** Attenuated renovascular constrictor responses to angiotensin II in adenosine 1 receptor knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R44-R49, 2003.

78. **Hansen PB and Schnermann J.** Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F590-F599, 2003.
79. **Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R and Vane JR.** Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6344-6348, 1995.
80. **Harrison-Bernard LM, el Dahr SS, O'Leary DF and Navar LG.** Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 33: 340-346, 1999.
81. **Hayashi K, Epstein M and Loutzenhiser R.** Pressure-induced vasoconstriction of renal microvessels in normotensive and hypertensive rats. Studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Circ Res* 65: 1475-1484, 1989.
82. **Hense HW.** Epidemiologie der arteriellen Hypertonie und Implikationen für die Prävention. 10-Jahres-Ergebnisse der MONICA-Studie Augsburg. *Dtsch Med Wochenschr* 125: 1397-1402, 2000.
83. **Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K and Marumo F.** Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91: 1367-1373, 1993.
84. **Hirata Y, Yoshimi H, Takaichi S, Yanagisawa M and Masaki T.** Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 239: 13-17, 1988.
85. **Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Watanabe TX, Kumagai S, Nakajima K and Sakakibara S.** Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 868-875, 1988.
86. **Hofer B, Schwarz A, Slowinski T, Bachmann S, Pfeilschifter J, Neumayer HH and Bauer C.** In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin. *J Hypertens* 22: 111-119, 2004.
87. **Hofer B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD and Theuring F.** Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 99: 1380-1389, 1997.

88. **Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG and Cheng TH.** Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 61: 159-168, 2004.
89. **Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A and Yanagisawa M.** Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79: 1267-1276, 1994.
90. **Ichihara A, Imig JD, Inscho EW and Navar LG.** Interactive nitric oxide-angiotensin II influences on renal microcirculation in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 31: 1255-1260, 1998.
91. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9269, 1987.
92. **Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T and Marumo F.** Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 19: 753-757, 1992.
93. **Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K and Masaki T.** The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2863-2867, 1989.
94. **Inscho EW, Imig JD, Cook AK and Pollock DM.** ETA and ETB receptors differentially modulate afferent and efferent arteriolar responses to endothelin. *Br J Pharmacol* 146: 1019-1026, 2005.
95. **Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F and Hiroe M.** Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92: 398-403, 1993.
96. **Ito S, Carretero OA and Abe K.** Nitric oxide in the juxtaglomerular apparatus. *Kidney Int Suppl* 55: S6-8, 1996.
97. **Ito S, Johnson CS and Carretero OA.** Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 87: 1656-1663, 1991.

98. **Iwai N and Inagami T.** Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 298: 257-260, 1992.
99. **Johren O and Saavedra JM.** Gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the cerebellar cortex of young rats. *Neuroreport* 7: 1349-1352, 1996.
100. **Juncos LA, Garvin J, Carretero OA and Ito S.** Flow modulates myogenic responses in isolated microperfused rabbit afferent arterioles via endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 95: 2741-2748, 1995.
101. **Just A.** Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1-17, 2007.
102. **Just A, Olson AJ and Arendshorst WJ.** Dual constrictor and dilator actions of ET(B) receptors in the rat renal microcirculation: interactions with ET(A) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F660-F668, 2004.
103. **Just A, Whitten CL and Arendshorst WJ.** Reactive oxygen species participate in acute renal vasoconstrictor responses induced by ETA and ETB receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F719-F728, 2008.
104. **Kaasjager KA, Shaw S, Koomans HA and Rabelink TJ.** Role of endothelin receptor subtypes in the systemic and renal responses to endothelin-1 in humans. *J Am Soc Nephrol* 8: 32-39, 1997.
105. **Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC and Neill JD.** Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 1090-1096, 1992.
106. **Kamanna VS, Vora S, Roh D and Kirschenbaum MA.** Comparative studies on acid cholesterol esterase in renal blood vessels and aorta of control and hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 94: 27-33, 1992.
107. **Kanse SM, Takahashi K, Warren JB, Perera T, Porta M, Ghatei M and Bloom SR.** Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7: S113-S116, 1991.
108. **Karne S, Jayawickreme CK and Lerner MR.** Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 268: 19126-19133, 1993.
109. **Keil J, Lehnfeld R, Reinhardt HW, Mohnhaupt R and Kaczmarczyk G.** Acute effects of angiotensin II on renal haemodynamics and excretion in conscious dogs. *Ren Physiol Biochem* 12: 238-249, 1989.

110. **Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H and Forstermann U.** Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension* 31: 582-588, 1998.
111. **Kramer BK, Schricker K, Scholz H, Clozel M, Riegger GA and Kurtz A.** Role of endothelins for renin regulation. *Kidney Int Suppl* 55: S119-21, 1996.
112. **Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao WH, Kamada N and .** Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368: 703-710, 1994.
113. **Lai EY, Martinka P, Fahling M, Mrowka R, Steege A, Gericke A, Sendeski M, Persson P.B., Persson A.E. and Patzak A.** Adenosine restores angiotensin II-induced contractions by receptor-independent enhancement of calcium sensitivity in renal arterioles. *Circ Res* 99(10): 1117-1124, 2006.
114. **Lai EY, Patzak A, Steege A, Mrowka R, Brown R, Spielmann N, Persson PB, Fredholm BB and Persson AE.** Contribution of adenosine receptors in the control of arteriolar tone and adenosine-angiotensin II interaction. *Kidney Int* 70: 690-698, 2006.
115. **Lane P and Gross SS.** The autoinhibitory control element and calmodulin conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity. *Acta Physiol Scand* 168: 53-63, 2000.
116. **Lanese DM, Yuan BH, McMurtry IF and Conger JD.** Comparative sensitivities of isolated rat renal arterioles to endothelin. *Am J Physiol* 263: F894-F899, 1992.
117. **Lariviere R and Lebel M.** Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 607-621, 2003.
118. **Levin ER.** Endothelins. *N Engl J Med* 333: 356-363, 1995.
119. **Lirk P, Hoffmann G and Rieder J.** Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1: 89-108, 2002.
120. **Liu LH, Paul RJ, Sutliff RL, Miller ML, Lorenz JN, Pun RY, Duffy JJ, Doetschman T, Kimura Y, MacLennan DH, Hoying JB and Shull GE.** Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca²⁺ signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 3. *J Biol Chem* 272: 30538-30545, 1997.

121. **Loutzenhiser R, Epstein M, Hayashi K and Horton C.** Direct visualization of effects of endothelin on the renal microvasculature. *Am J Physiol* 258: F61-F68, 1990.
122. **Luscher TF and Barton M.** Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20: II-10, 1997.
123. **Matsumura Y, Hashimoto N, Taira S, Kuro T, Kitano R, Ohkita M, Opgenorth TJ and Takaoka M.** Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Hypertension* 33: 759-765, 1999.
124. **Mehta PK and Griending KK.** Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-C97, 2007.
125. **Michel JB, Feron O, Sacks D and Michel T.** Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272: 15583-15586, 1997.
126. **Michel T, Li GK and Busconi L.** Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6252-6256, 1993.
127. **Miyata N, Park F, Li XF and Cowley AW, Jr.** Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* 277: F437-F446, 1999.
128. **Moe O, Tejedor A, Campbell WB, Alpern RJ and Henrich WL.** Effects of endothelin on in vitro renin secretion. *Am J Physiol* 260: E521-5, 1991.
129. **Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M and Luscher TF.** Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation* 96: 1593-1597, 1997.
130. **Motte S, McEntee K and Naeije R.** Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 110: 386-414, 2006.
131. **Mulvany MJ and Halpern W.** Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19-26, 1977.

132. **Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B and Kriz W.** Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42: 1017-1019, 1992.
133. **Naicker S and Bhoola KD.** Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol Ther* 90: 61-88, 2001.
134. **Nambi P, Pullen M, Wu HL, Nuthulaganti P, Elshourbagy N and Kumar C.** Dexamethasone down-regulates the expression of endothelin receptors in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 267: 19555-19559, 1992.
135. **Navar LG.** Integrating multiple paracrine regulators of renal microvascular dynamics. *Am J Physiol* 274: F433-44, 1998.
136. **Navar LG and Rosivall L.** Contribution of the renin-angiotensin system to the control of intrarenal hemodynamics. *Kidney Int* 25: 857-868, 1984.
137. **Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW and Murphy TJ.** Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90: 2092-2096, 1992.
138. **Nishimura J, Chen X, Jahan H, Shikasho T, Kobayashi S and Kanaide H.** cAMP induces up-regulation of ETA receptor mRNA and increases responsiveness to endothelin-1 of rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 719-726, 1992.
139. **Novak J, Rajakumar A, Miles TM and Conrad KP.** Nitric oxide synthase isoforms in the rat kidney during pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 11: 280-288, 2004.
140. **Ohno A, Naruse M, Kato S, Hosaka M, Naruse K, Demura H and Sugino N.** Endothelin-specific antibodies decrease blood pressure and increase glomerular filtration rate and renal plasma flow in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 10: 781-785, 1992.
141. **Ohno T, Katori M, Majima M, Hayashi H and Saigenji K.** Different responses of arterioles and venules in rat gastric mucosal microcirculation to endothelin-1 and endothelin-3. *J Clin Gastroenterol* 21 Suppl 1: S56-S65, 1995.
142. **Ohuchi T, Yanagisawa M and Gariepy CE.** Renal tubular effects of endothelin-B receptor signaling: its role in cardiovascular homeostasis and extracellular volume regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 435-439, 2000.

143. **Ozawa Y, Hasegawa T, Tsuchiya K, Yoshizumi M and Tamaki T.** Effect of endothelin-1 (1-31) on the renal resistance vessels. *J Med Invest* 50: 87-94, 2003.
144. **Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM and Carey RM.** Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 30: 1238-1246, 1997.
145. **Patzak A, Bontscho J, Lai E, Kupsch E, Skalweit A, Richter CM, Zimmermann M, Thone-Reineke C, Joehren O, Godes M, Steege A and Hocher B.** Angiotensin II sensitivity of afferent glomerular arterioles in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 20: 2681-2689, 2005.
146. **Patzak A, Lai EY, Mrowka R, Steege A, Persson P.B. and Persson A.E.G.** AT1 receptors mediate angiotensin II induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney Int* 66: 1949-1958, 2004.
147. **Patzak A, Mrowka R, Storch E, Hocher B and Persson PB.** Interaction of angiotensin II and nitric oxide in isolated perfused afferent arterioles of mice. *J Am Soc Nephrol* 12: 1122-1127, 2001.
148. **Patzak A, Steege A, Lai EY, Brinkmann JO, Kupsch E, Spielmann N, Gericke A, Skalweit A, Stegbauer J, Persson PB and Seeliger E.** Angiotensin II response in afferent arterioles of mice lacking either the endothelial or neuronal isoform of nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R429-R437, 2008.
149. **Peach MJ.** Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 57: 313-370, 1977.
150. **Perry MG, Molero MM, Giulumian AD, Katakam PV, Pollock JS, Pollock DM and Fuchs LC.** ET(B) receptor-deficient rats exhibit reduced contraction to ET-1 despite an increase in ET(A) receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2680-H2686, 2001.
151. **Persson AE, Brown R, Liu R and Ollerstam A.** Nitric oxide modulates and adenosine mediates the tubuloglomerular feedback mechanism. *Acta Physiol Scand* 176: 91-94, 2002.
152. **Persson PB, Hansell P and Liss P.** Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int* 68: 14-22, 2005.
153. **Pfeilschifter J, Kunz D and Muhl H.** Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron* 64: 518-525, 1993.

154. **Pollock DM, Jenkins JM, Cook AK, Imig JD and Inscho EW.** L-type calcium channels in the renal microcirculatory response to endothelin. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F771-F777, 2005.
155. **Pueyo ME, Arnal JF, Rami J and Michel JB.** Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol* 274: C214-C220, 1998.
156. **Pussard G, Gascard JP, Gorenne I, Labat C, Norel X, Dulmet E and Brink C.** Endothelin-1 modulates cyclic GMP production and relaxation in human pulmonary vessels. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 969-975, 1995.
157. **Quaschnig T, Rebhan B, Wunderlich C, Wanner C, Richter CM, Pfab T, Bauer C, Kraemer-Guth A, Galle J, Yanagisawa M and Hocher B.** Endothelin B receptor-deficient mice develop endothelial dysfunction independently of salt loading. *J Hypertens* 23: 979-985, 2005.
158. **Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A and Harrison DG.** Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 30: 29-34, 1997.
159. **Ramzy D, Rao V, Tumiati LC, Xu N, Sheshgiri R, Miriuka S, Delgado DH and Ross HJ.** Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation* 114: I319-I326, 2006.
160. **Resink TJ, Hahn AW, Scott-Burden T, Powell J, Weber E and Buhler FR.** Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 1303-1310, 1990.
161. **Resink TJ, Scott-Burden T and Buhler FR.** Activation of multiple signal transduction pathways by endothelin in cultured human vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem* 189: 415-421, 1990.
162. **Riggelman A, Harvey J and Baylis C.** Endothelin mediates some of the renal actions of acutely administered angiotensin II. *Hypertension* 38: 105-109, 2001.
163. **Romano G, Giagu P, Favret G and Bartoli E.** Effect of endothelin 1 on proximal reabsorption and tubuloglomerular feedback. *Kidney Blood Press Res* 23: 360-365, 2000.

164. **Rosivall L, Rinder DF, Champion J, Khosla MC, Navar LG and Oparil S.** Intrarenal angiotensin I conversion at normal and reduced renal blood flow in the dog. *Am J Physiol* 245: F408-F415, 1983.
165. **Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M and Pessina AC.** Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res* 43: 300-307, 1999.
166. **Ruan X, Wagner C, Chatziantoniou C, Kurtz A and Arendshorst WJ.** Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet. *J Clin Invest* 99: 1072-1081, 1997.
167. **Saida K, Mitsui Y and Ishida N.** A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem* 264: 14613-14616, 1989.
168. **Saito Y, Nakao K, Shirakami G, Jougasaki M, Yamada T, Itoh H, Mukoyama M, Arai H, Hosoda K, Suga S and .** Detection and characterization of endothelin-1-like immunoreactivity in rat plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 1512-1516, 1989.
169. **Sakurai T, Yanagisawa M and Masaki T.** Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13: 103-108, 1992.
170. **Sallstrom J, Carlstrom M, Jensen BL, Skott O, Brown RD and Persson AE.** Neuronal nitric oxide synthase-deficient mice have impaired renin release but normal blood pressure. *Am J Hypertens* 21: 111-116, 2008.
171. **Sanchez R, MacKenzie A, Farhat N, Nguyen TD, Stewart DJ, Mercier I, Calderone A and Thorin E.** Endothelin B receptor-mediated regulation of endothelin-1 content and release in cultured porcine aorta endothelial cell. *J Cardiovasc Pharmacol* 39: 652-659, 2002.
172. **Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK and Dzau VJ.** Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 253-259, 1992.
173. **Sasser JM, Pollock JS and Pollock DM.** Renal endothelin in chronic angiotensin II hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R243-R248, 2002.

174. **Sauvageau S, Thorin E, Villeneuve L and Dupuis J.** Change in pharmacological effect of endothelin receptor antagonists in rats with pulmonary hypertension: role of ETB-receptor expression levels. *Pulm Pharmacol Ther* 22: 311-317, 2009.
175. **Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P and Loirand G.** Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 275: 21722-21729, 2000.
176. **Schiffrin EL and Touyz RM.** Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 Suppl 3: S2-13, 1998.
177. Schildroth, J, Rettig, J, Steege, A., Kalk, P, Hocher, B., Persson, P. B., and Patzak, A. Effect of ET-1 on afferent and efferent renal arterioles in ETB-receptor knockout mice. *Eur.J.Physiol.(Pflüger Arch., Suppl.)* . 2007.
178. **Schnermann J and Levine DZ.** PARACRINE FACTORS IN TUBULOGLOMERULAR FEEDBACK: Adenosine, ATP, and Nitric Oxide. *Annu Rev Physiol* 65: 501-529, 2003.
179. **Schnermann J, Traynor T, Yang T, Arend L, Huang YG, Smart A and Briggs JP.** Tubuloglomerular feedback: new concepts and developments [In Process Citation]. *Kidney Int Suppl* 67: S40-5, 1998.
180. **Schnermann JB, Traynor T, Yang T, Huang YG, Oliverio MI, Coffman T and Briggs JP.** Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 273: F315-F320, 1997.
181. **Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O and Kurtz A.** Renin release. *Physiology (Bethesda)* 22: 310-319, 2007.
182. **Sechi LA, Grady EF, Griffin CA, Kalinyak JE and Schambelan M.** Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am J Physiol* 262: F236-F240, 1992.
183. **Seeliger E, Wronski T, Ladwig M, Dobrowolski L, Vogel T, Godes M, Persson PB and Flemming B.** The renin-angiotensin system and the third mechanism of renal blood flow autoregulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F1334-F1345, 2009.
184. **Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J and Hintze TH.** Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 74: 349-353, 1994.

185. **Shanmugam S, Llorens-Cortes C, Clauser E, Corvol P and Gasc JM.** Expression of angiotensin II AT₂ receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am J Physiol* 268: F922-F930, 1995.
186. **Shi Y, Lau C and Cupples WA.** Interactive modulation of renal myogenic auto-regulation by nitric oxide and endothelin acting through ET-B receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R354-R361, 2007.
187. **Sigmon DH, Carretero OA and Beierwaltes WH.** Angiotensin dependence of endothelium-mediated renal hemodynamics. *Hypertension* 20: 643-650, 1992.
188. **Siragy HM and Carey RM.** The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100: 264-269, 1997.
189. **Smith FG, van d, V and Sener A.** Nitric oxide modulates renal vasoconstrictor effect of endothelin-1 in conscious lambs. *Pediatr Nephrol* 20: 1545-1551, 2005.
190. **Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R and Unger T.** The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95: 651-657, 1995.
191. **Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF and Nathan CF.** Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7773-7777, 1991.
192. **Sung CP, Arleth AJ, Storer BL and Ohlstein EH.** Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 429-437, 1994.
193. **Takabatake T, Ise T, Ohta K and Kobayashi K.** Effects of endothelin on renal hemodynamics and tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 263: F103-F108, 1992.
194. **Takuwa Y, Yanagisawa M, Takuwa N and Masaki T.** Endothelin, its diverse biological activities and mechanisms of action. *Prog Growth Factor Res* 1: 195-206, 1989.
195. **Tang SS, Loscalzo J and Dzau VJ.** Tissue plasminogen activator activates renin-angiotensin in vitro. *J Vasc Med Biol* 1: 67-74, 1989.

196. **Tarnawski A, Arakawa T, Sekhon S, Ichikawa Y, Szabo I and Sarfeh IJ.** Isolation of morphologically and functionally intact gastric mucosal microvessels rapid communication. *J Physiol Pharmacol* 51: 167-175, 2000.
197. **Taylor TA, Garipey CE, Pollock DM and Pollock JS.** Unique endothelin receptor binding in kidneys of ETB receptor deficient rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R674-R681, 2003.
198. **Thomas CP, Baldi E, Simonson MS, Kester M and Dunn MJ.** Endothelin receptors and coupled GTP-binding proteins in glomerular mesangial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7: S79-S84, 1991.
199. **Thorup C, Kornfeld M, Goligorsky MS and Moore LC.** AT1 receptor inhibition blunts angiotensin II-stimulated nitric oxide release in renal arteries. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S220-S224, 1999.
200. **Thorup C and Persson AE.** Inhibition of locally produced nitric oxide resets tubuloglomerular feedback mechanism. *Am J Physiol* 267: F606-F611, 1994.
201. **Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G and Turner AJ.** A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275: 33238-33243, 2000.
202. **Tsutsumi K and Saavedra JM.** Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *Am J Physiol* 261: R209-R216, 1991.
203. **Tsutsumi K, Stromberg C, Viswanathan M and Saavedra JM.** Angiotensin-II receptor subtypes in fetal tissue of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology* 129: 1075-1082, 1991.
204. **Volpe M, Savoia C, De Paolis P, Ostrowska B, Tarasi D and Rubattu S.** The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 3: S173-S178, 2002.
205. **Vuurmans JL, Boer P and Koomans HA.** Effects of endothelin-1 and endothelin-1-receptor blockade on renal function in humans. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2742-2746, 2004.

206. **Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhausl W and Binder BR.** Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 16066-16068, 1992.
207. **Wagner OF, Vierhapper H, Gasic S, Nowotny P and Waldhausl W.** Regional effects and clearance of endothelin-1 across pulmonary and splanchnic circulation. *Eur J Clin Invest* 22: 277-282, 1992.
208. **Wang J, Chiou WJ, Gagne GD and Wu-Wong JR.** Internalization of type-A endothelin receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: S61-S65, 2000.
209. **Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G and Vane JR.** Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5: S85-S88, 1989.
210. **Wassef L, Langham RG and Kelly DJ.** Vasoactive renal factors and the progression of diabetic nephropathy. *Curr Pharm Des* 10: 3373-3384, 2004.
211. **Webb DJ.** Endothelin: from molecule to man. *Br J Clin Pharmacol* 44: 9-20, 1997.
212. **Weber KT, Sun Y, Katwa LC and Cleutjens JP.** Connective tissue: a metabolic entity? *J Mol Cell Cardiol* 27: 107-120, 1995.
213. **Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP and Schnermann J.** Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. *Am J Physiol* 266: F227-F239, 1994.
214. **Wendel M, Knels L, Kummer W and Koch T.** Distribution of endothelin receptor subtypes ETA and ETB in the rat kidney. *J Histochem Cytochem* 54: 1193-1203, 2006.
215. **Yan C, Kim D, Aizawa T and Berk BC.** Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 26-36, 2003.
216. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
217. **Ye MQ and Healy DP.** Characterization of an angiotensin type-1 receptor partial cDNA from rat kidney: evidence for a novel AT1B receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 204-210, 1992.

218. **Yoshibayashi M, Nishioka K, Nakao K, Saito Y, Temma S, Matsumura M, Ueda T, Shirakami G, Imura H and Mikawa H.** Plasma endothelin levels in healthy children: high values in early infancy. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7: S404-S405, 1991.
219. **Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Jr. and Lee ME.** Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 73: 205-209, 1993.
220. **Zeng C, Hopfer U, Asico LD, Eisner GM, Felder RA and Jose PA.** Altered AT1 receptor regulation of ETB receptors in renal proximal tubule cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 46: 926-931, 2005.
221. **Zolk O, Quatteck J, Sitzler G, Schrader T, Nickenig G, Schnabel P, Shimada K, Takahashi M and Bohm M.** Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation* 99: 2118-2123, 1999.
222. **Zou AP, Imig JD, Kaldunski M, Ortiz de Montellano PR, Sui Z and Roman RJ.** Inhibition of renal vascular 20-HETE production impairs autoregulation of renal blood flow. *Am J Physiol* 266: F275-F282, 1994.

7 Anhang

7.1 Publikationen und Abstracts

Publikationen

J. Schildroth, **J. Rettig-Zimmermann**, P. Kalk, A. Steege, S. Schmidt, M. Fähling, M. Sendeski, A. Paliege, E. Y. Lai, K. Relle, S. Bachmann, J. Sällström, P. B. Persson, B. Hocher, and A. Patzak: Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. In Revision, Amer J Physiol Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2009

Abstracts, Poster, Vorträge

J. Schildroth, **J. Rettig**, A. Steege, P. Kalk, B. Hocher, P.B. Persson, A. Patzak: Effect of ET-1 on afferent and efferent renal arterioles in ETB-receptor knockout mice. 86. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Hannover 2007; Vortrag, Abstract in Eur.J.Physiol.(Pflüger Arch., Suppl.),2007

J. Schildroth, **J. Rettig**, A. Steege, P.Kalk, P.B. Persson, B. Hocher, A. Patzak: Effect of ET-1 in renal arterioles of ET_B- receptor deficient mice. Rostocker Gespräche, Rostock 2007; Vortrag

J. Rettig, S. Schmidt, P. Martinka, M. Sendeski, P.B. Persson, and A. Patzak: Vascular dilation and endothelial mRNA expression in iron oxide perfused arteries of mice. FASEB Summer Reseach Conference, Vermont, USA 2007, Poster

J. Rettig, J. Schildroth, S. Schmidt, A. Paliege, P. Martinka, M. Sendeski, P.B. Persson, and A. Patzak: Effect of iron oxide perfusion on renal microvessel morphology, and dilatory function and endothelial mRNA expression of mouse aorta, Experimental Biologie, San Diego, USA 2008, Poster

J. Rettig-Zimmermann, J. Schildroth, P. Kalk, A. Steege, M. Fähling, P. B. Persson, B. Hocher, and A. Patzak: Expression of endothelin, endothelin type A receptor, isoforms of nitric oxide synthase, and angiotensin receptors in endothelin type B receptor deficient mice. Experimental Biology, New Orleans, 2009, Poster

7.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.3 Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Andreas Patzak, der das Projekt angeregt, begleitet und unterstützt hat.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Herrn Prof. Dr. Pontus B. Persson für die Möglichkeit, im Institut für Vegetative Physiologie die Experimente durchzuführen,

Herrn Dr. Mauricio Sendeski und Herrn Dr. Peter Martinka für die Hilfe bei der Eisenoxidperfusion,

Herrn Dr. Andreas Steege und Frau Ulrike Neumann für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Analysen,

Herrn Sebastian Schmidt für die Hilfe bei den funktionellen Untersuchungen an den Aorten, und

Herrn Alexander Paliege für die histologische Aufarbeitung der Nieren.

Meinen Eltern, Großeltern und meinem Mann Thomas Zimmermann möchte ich insbesondere für die hilfreiche Unterstützung bei der Betreuung unserer beiden Kinder und für ihre aufmunternden Worte während der Arbeit an der Dissertationsschrift danken.

7.4 Erklärung

„Ich, Juliane Rettig-Zimmermann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Expression von Genen des Endothelin-, Renin-Angiotensin- und Stickstoffmonoxidsystems in Mäusen mit Endothelin-Typ B-Rezeptor-Defizit“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 01.07.09

Unterschrift