

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. M. J. Lohse

**Kardiovaskuläre Phänotypisierung
von Angiotensin II AT₂-Rezeptor- und
adrenergen Rezeptor-„knockout“-Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Marc Brede
aus Würzburg

Würzburg, Februar 2001

Referent: Prof. Dr. M. J. Lohse
Koreferent: Prof. Dr. L. Neyses
Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 6.November 2001

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vorbemerkungen	1
1.2	Transgene Tiermodelle	1
1.2.1	Angiotensin II-Rezeptoren	4
1.2.2	β -adrenerge Rezeptoren	9
1.2.3	α_2 -adrenerge Rezeptoren	13
1.3	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Genotypisierung von Knockouttieren	19
2.1.1	Genotypisierung	19
2.1.1.1	DNA-Isolierung	19
2.1.1.2	Polymerasekettenreaktion	20
2.1.1.3	Agarosegelelektrophorese	22
2.2	Untersuchung isolierter Blutgefäße	23
2.2.1	Mulvany Myograph	23
2.2.1.1	Präparation der Gefäße	24
2.2.1.2	Stimulation der Gefäße	25
2.3	In vivo Herzkatheteruntersuchungen	27
2.4	Morphologische Untersuchungen von Gefäßen	28
2.5	Induktion einer kardialen Hypertrophie durch Aortenstenose	30
2.6	Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach Induktion einer Aortenstenose bei WT- und α_2 -KO-Mäusen	31
2.7	Morphologische Untersuchung von Herzen	31
2.8	Bestimmung von Plasmakatecholaminen mittels HPLC	33
2.9	RNA-Isolierung und RT-Polymerasekettenreaktion zur Darstellung des AT ₂ -Rezeptors aus isolierten Femoralarterien	34

2.10	Aktivität und Expression der P70S6-Kinase aus Aorten von WT- und AT ₂ -KO-Mäusen _____	37
2.10.1	Protein-Extraktion _____	37
2.10.2	Proteinmengen-Bestimmung _____	38
2.10.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese _____	38
2.10.4	Immunoblotting _____	39
2.11	Statistik _____	40
3	Ergebnisse _____	42
3.1	Kardiovaskuläre Funktion des AT ₂ -Rezeptors _____	42
3.1.1	Genotypisierung der AT ₂ -Knockouttiere _____	42
3.1.2	In vivo Hämodynamik bei AT ₂ -KO-Mäusen _____	43
3.1.3	Funktion isolierter Blutgefäße von AT ₂ -KO-Mäusen _____	45
3.1.4	Morphologische Untersuchung von Femoralarterien der AT ₂ -KO-Tiere _____	46
3.1.5	Expression des AT ₂ -Rezeptors in Femoralarterien _____	48
3.1.6	Aktivität und Expression der P70S6-Kinase in Aorten von WT- und AT ₂ -KO-Tieren _____	49
3.2	Gefäßrelaxation durch β -adrenerge Rezeptorsubtypen _____	52
3.3	In vivo-Funktion der α_{2A} - und α_{2C} -adrenergen Rezeptoren _____	56
3.3.1	Modell der chronischen Druckbelastung durch Aortenstenose _____	56
3.3.2	In vivo Herzkatheteruntersuchungen bei α_2 -KO-Tieren _____	58
3.3.3	Morphologische Untersuchung von Herzen bei α_2 -KO- und WT-Mäusen nach Aortenstenose _____	59
3.3.4	Vergleich der Plasmakatecholamine bei WT- und α_2 -KO-Tieren _____	61
4	Diskussion _____	63
4.1	Untersuchungen bei AT ₂ -Rezeptor KO-Mäusen _____	63
4.2	Untersuchungen bei β -Rezeptor KO-Mäusen _____	68
4.3	Untersuchungen bei α_2 -Rezeptor KO-Mäusen _____	70
5	Zusammenfassung _____	75
6	Literaturverzeichnis _____	77
7	Abkürzungsverzeichnis _____	100

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkungen

Die Untersuchung des Herz-Kreislauf-System und die Entstehung von Krankheitsprozessen ist für den Menschen von außerordentlicher Bedeutung. So standen auch im Jahre 1998 wie bereits in den Jahren zuvor Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems „an der Spitze“ der Todesursachenstatistik der Bundesrepublik Deutschland (Statistisches Bundesamt 1998). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass neben exogenen Risikofaktoren wie zum Beispiel Rauchen, Stress und Ernährungsgewohnheiten vor allem die genetische Prädisposition für das Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen hauptverantwortlich zu sein scheint (Donati et al. 2000; McCaffery et al. 1999). So konnten auf chromosomaler Ebene Polymorphismen gefunden werden, die mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten assoziiert sind (Ferrieres et al. 1995; Andersson et al. 1999; Liggett et al. 1998).

Die Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen, die zum Entstehen von kardiovaskulären Erkrankungen führen, ist von herausragender Bedeutung für Prävention und Therapie. Seit mehreren Jahren erlauben transgene Tiermodelle einen genaueren Einblick in die pathophysiologischen Vorgänge auf molekularer Ebene zu gewinnen.

1.2 Transgene Tiermodelle

Die Möglichkeit, das Genom von Säugetieren gezielt zu verändern, gelang erstmals 1980 (Gordon et al. 1980), ein Jahr bevor der Begriff des „transgenen Tieres“ erstmals in der Literatur zu finden ist (Gordon et al. 1981). Dieser Terminus wird weitläufig für zwei unterschiedliche molekulare Techniken verwandt, sogenannte „Pronukleus-Transgene“ und „Stammzell-Transgene“. Abb. 1 stellt die beiden Techniken zur Generierung von transgenen Tieren schematisch gegenüber.

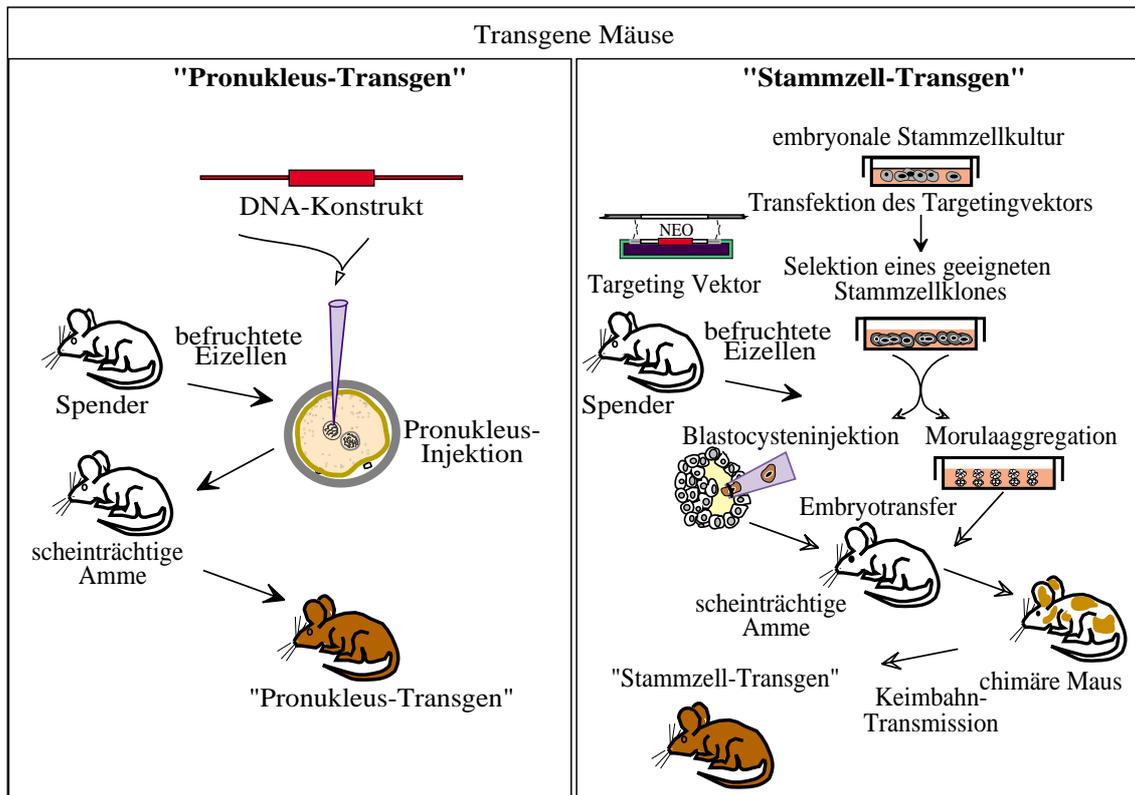


Abbildung 1: Herstellung von Pronukleus- und Stammzell-transgenen Mäusen (Erklärungen siehe Text).

Auf der einen Seite handelt es sich dabei um genetisch veränderte Tiere, bei denen ein rekombinantes Gen, dem ein gewebespezifischer Promotor vorgeschaltet ist, durch direkte Injektion in den Vorkern einer befruchteten Eizelle eingebracht wird (Pronukleus-Injektion). Das injizierte DNA-Konstrukt wird hierbei an einer beliebigen Stelle in das Genom der befruchteten Zelle integriert und durch den vorgeschalteten Promotor in den für diesen spezifischen Geweben exprimiert. Erstmals gelang dies 1981 durch Brinster, der die kodierende Sequenz des Thymidinkinasegens des Herpes simplex Virus in befruchtete Eizellen injizierte (Brinster et al. 1981). Die Anzahl der zur Zeit vorhandenen „Pronukleus-Transgene“, die ein Gen gewebespezifisch überexprimieren, ist kaum mehr überschaubar, ebenso wenig wie die damit assoziierten Phänotypen, die durch die Manipulation der genetischen Information hervorgerufen werden.

Einleitung

Auf der anderen Seite wird der Begriff „transgenes Tier“ auch für sogenannte „Stammzell-Transgene“ verwandt („knockout“-Tiere). Hier wird zunächst das auszuschaltende endogene Gen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durch homologe Rekombination verändert. Die embryonalen Stammzellen, die in Kultur gehalten werden können, ohne sich weiter zu differenzieren, werden dabei mittels eines Vektors transfiziert, der lange Fragmente des Gens mit einer spezifischen Modifikation trägt, die zum Funktionsverlust des Gens führt. Hierzu muß das zu modifizierende Gen sehr genau charakterisiert sein, da man in einem späteren Schritt zeigen muß, dass das entsprechende Genprodukt nicht mehr vorhanden ist.

In einem zweiten Schritt werden die zuvor manipulierten embryonalen Stammzellen entweder direkt in Blastozysten injiziert oder mit befruchteten Eizellen im Morulastadium (Achtzellstadium) in einer Zellkulturschale aggregiert (Wood et al. 1993). Da die embryonalen Stammzellen die Tendenz haben, in fremdes Gewebe einzuwachsen und sich in jedes Gewebe differenzieren können (Evans et al. 1981; Martin 1981), erhält man so, nachdem man die Blastozysten in eine scheinträchtige Amme transferiert hat, chimäre Tiere (Bradley et al. 1984). Diese sind teils aus Zellen des Spendertieres teils aus genetisch modifizierten Zellen aufgebaut. Im nächsten Schritt überprüft man, ob manipulierte Zellen auch zu den Keimzellen beitragen und somit die Möglichkeit besteht, dass sich die Genmutation in die nächste Generation weitervererbt. Erstmals konnte im Jahre 1989 eine durch gezielte homologe Rekombination erzeugte Mutation eines Gens über die Keimbahn weitervererbt werden (Thompson et al. 1989), nachdem dies bereits zwei Jahre zuvor mit spontan mutierten oder retroviral veränderten ES-Zellen gelungen war (Hooper et al. 1987; Kuehn et al. 1987). Nach Keimbahntransmission vererbt sich das modifizierte Gen (meist rezessiv) nach den Mendelschen Gesetzen. Den Nachweis führt man mit molekularbiologischen Techniken, z.B. Polymerasekettenreaktion (PCR) oder durch Southernblotanalyse, mit deren Hilfe man das mutierte Gen detektieren kann. In manchen Fällen führt die

Genmutation zu embryonaler Letalität, so dass die Auswirkungen der Mutation auf den adulten Organismus nicht untersucht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Knockout-Linien untersucht, die entweder den Angiotensin II AT₂-Rezeptor, den β_1 -adrenergen Rezeptor oder jeweils einen der drei α_2 -adrenergen Rezeptoren (α_{2A} -, α_{2B} - bzw. α_{2C} -AR) nicht mehr exprimieren, die alle zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gezählt werden. In den nächsten Abschnitten der Einleitung sollen die wichtigsten Funktionen dieser Rezeptoren im Organismus sowie die Phänotypen vorgestellt werden, die durch das Ausschalten dieser Rezeptoren im transgenen Tiermodell zu beobachten sind.

1.2.1 Angiotensin II-Rezeptoren

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System hat sowohl für die Kontrolle des arteriellen Blutdruckes, des Wasser- und Elektrolythaushaltes, als auch für neurohumorale Regulationsvorgänge, wie die Freisetzung von Renin durch das sympathische Nervensystem am juxtaglomerulären Apparat der Niere, eine herausragende Bedeutung. Bereits 1898 extrahierten Tigerstedt und Bergman aus Nierengewebe das Renin (Tigerstedt et al. 1898). Zunächst ging man davon aus, dass die extrahierte Substanz selbst für die vasokonstriktorische Reaktion verantwortlich sei. 1940 wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen gefunden, dass das Renin vielmehr am Beginn einer Kaskade enzymatischer Reaktionen steht und die eigentliche Gefäßwirkung hauptsächlich vom Angiotensin II ausgeübt wird (Braun-Mendez et al. 1940; Page et al. 1940). Das Oktapeptid Angiotensin II ist einer der stärksten Vasokonstriktoren. Zusätzlich zu seiner direkten gefäßverengenden Wirkung setzt es aus der Nebennierenrinde das Hormon Aldosteron frei, das im Bereich des distalen Tubulus der Niere die Rückresorption von Na⁺ und H₂O fördert und dadurch das Blutvolumen erhöht.

Die Zielstruktur für Angiotensin II ist eine Gruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Sasaki et al. 1991; Murphy et al. 1991), die sich pharmakologisch und genetisch in

Einleitung

AT₁- und AT₂-Rezeptoren einteilen läßt. Bevor unterschiedliche Angiotensin II-Rezeptorsubtypen kloniert werden konnten, war eine Unterscheidung aufgrund unterschiedlicher Affinitäten zu verschiedenen Liganden möglich (Lin et al. 1970; Timmermans et al. 1993).

Der Großteil der bekannten Wirkungen des Angiotensin II wird vom AT₁-Rezeptor übernommen: Vasokonstriktion der arteriellen Widerstandsgefäße, Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, Aktivierung des sympathischen Nervensystems, Vermittlung von Zellwachstum (Timmermans et al. 1993). Im Gegensatz dazu sind die Funktionen des AT₂-Rezeptors noch weitgehend unbekannt (Brede et al. 2001). Der Angiotensin II AT₂-Rezeptor zeigt am Ende der Embryonalentwicklung seine stärkste Expression (Grady et al. 1991), was den Schluß nahelegt, dass er an embryonalen Entwicklungsprozessen maßgeblich beteiligt ist. Im adulten Organismus wird er zum Beispiel im Bereich verschiedener geweblicher Reparaturprozesse in der Haut, in Blutgefäßen und in atretischen Ovarialfollikeln wieder verstärkt exprimiert (Mukoyama et al. 1993). Darüber hinaus ist er in verschiedenen Bereichen des ZNS und der Niere nachweisbar (Gibson et al. 1991; Leung et al. 1991). Dem AT₂-Rezeptorsubtyp scheint in einigen Fällen die Rolle eines Gegenspielers zum AT₁-Rezeptor zuzukommen, da AT₂-Rezeptoren in vitro die proliferativen Effekte von AT₁-Rezeptoren antagonisieren (Nakajima et al. 1995; Stoll et al. 1995).

Die medikamentöse Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems ist auf mehreren Ebenen möglich. Zur Zeit sind ACE-Hemmer fester Bestandteil der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz (CONSENSUS-Trail 1987), des Myokardinfarktes (Rutherford et al. 1994) und der arteriellen Hypertonie (Liebson et al. 1995). Darüber hinaus wird die Progression der diabetischen Nephropathie durch ACE-Hemmer verlangsamt (Lewis et al. 1993). Eine neue Substanzgruppe, die AT₁-Rezeptorantagonisten, steht seit kurzer Zeit zur Verfügung. Die ELITE I-Studie an einem relativ kleinen Kollektiv herzinsuffizienter Patienten zeigte eine stärkere

Verringerung der Mortalität durch einen AT₁-Rezeptorantagonisten im Vergleich zum ACE-Hemmer (Pitt et al. 1997), während eine Folge-Studie (ELITE II) an einem größeren Patientenkollektiv dies nicht bestätigen konnte (Pitt et al. 2000). Mittlerweile gibt es erste Hinweise, dass die Kombination aus ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptorantagonist einen Fortschritt für die Therapie der Herzinsuffizienz darstellen könnte. Auf der einen Seite könnte der ACE-Hemmer systemisch die Bildung des Angiotensin II aus dem Vorläufermolekül Angiotensin I hemmen, auf der anderen Seite könnte das lokal weiterhin gebildete Angiotensin II am nicht blockierten AT₂-Rezeptor seine hypothetische protektive Funktion ausüben (McKelvie et al. 1999).

Viele Erkenntnisse auf dem Gebiet des Renin-Angiotensin-Systems konnten erst durch Untersuchungen an transgenen Tieren gewonnen werden. Mittlerweile konnten alle Gene dieses Systems entweder ausgeschaltet werden oder gewebespezifisch überexprimiert werden. Es wird allgemein angenommen, dass der Mensch im Vergleich zum Nager nur einen AT₁-Rezeptorsubtyp besitzt. Bei Ratte und Maus wurden zwei AT₁-Rezeptorsubtypen kloniert, die als AT_{1A}-Rezeptoren und AT_{1B}-Rezeptoren klassifiziert werden (Iwai et al. 1991; Sasamura et al. 1992). Diese werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert und sind durch eine Genduplikation entstanden (Yoshida et al. 1992). Trotz weitgehender Homologie der AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren variiert ihre Gewebeverteilung erheblich (Kitami et al. 1992). Im Gegensatz dazu konnte bis jetzt sowohl beim Menschen als auch bei Nagern nur ein AT₂-Rezeptorsubtyp gefunden werden (Kambayashi et al. 1993; Mukoyama et al. 1993).

Die Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems an embryonalen Entwicklungsprozessen und an der Herz-Kreislauf-Regulation konnte in unterschiedlichen transgenen Modellen auf eindruckliche Weise belegt werden. Während AT_{1A}-Rezeptor-„knockout“-Mäuse (AT_{1A}-KO) eine geringe vorgeburtliche Letalität zeigten (Oliverio et al. 1998), war der Ausfall beider AT₁-Rezeptoren (AT_{1AB}-KO) viel dramatischer für die Entwicklung der Maus (Tsuchida et al. 1998). Im Gegensatz dazu zeigten Angiotensin

Einleitung

AT_{1B}-Rezeptor-„knockout“-Mäuse (AT_{1B}-KO) keine Entwicklungsdefekte (Chen et al. 1997). Bei Mäusen, die den AT₁-Rezeptor mittels eines spezifischen Promoters im Herzen überexprimieren (α MHC-AT₁-TG) konnten proliferative Effekte des murinen AT_{1A}-Rezeptors bzw. des menschlichen AT₁-Rezeptors auf den Herzmuskel gezeigt werden (Hein et al. 1997; Paradis et al. 2000). Der AT₂-Rezeptor ist für die vorgeburtliche Differenzierung des Urogenitaltraktes von Bedeutung (Nishimura et al. 1999).

Neben embryonalen Entwicklungsvorgängen stehen die physiologischen Funktionen der Angiotensin-Rezeptoren im Herz-Kreislauf-System im Mittelpunkt des Interesses. Der AT_{1A}-Rezeptor ist der wichtigste Rezeptorsubtyp im Herz-Kreislauf-System der Maus. So war es nicht verwunderlich, dass AT_{1A}-KO-Mäuse sowohl einen niedrigeren basalen Blutdruck aufwiesen als vergleichbare Tiere ohne Rezeptorverlust, als auch auf die Gabe von Angiotensin II mit einer reduzierten Blutdrucksteigerung reagierten (Ito et al. 1995; Oliverio et al. 1997). Obwohl AT_{1B}-KO-Mäuse keine Veränderung dieser Parameters zeigten (Chen et al. 1997), führte die Ausschaltung beider AT₁-Rezeptoren (AT_{1AB}-KO) zu einer weiteren Reduktion der basalen Blutdruckwerte und zu einer fehlenden Blutdruckantwort auf die Gabe von Angiotensin II, was zumindest für eine Beteiligung des AT_{1B}-Rezeptor an der Blutdruckkontrolle sprach. Außerdem wiesen diese Tiere renale Entwicklungsdefekte auf (Oliverio et al. 1998; Tsuchida et al. 1998).

Die Beteiligung des AT₂-Rezeptors an der Blutdruckregulation konnte sowohl in „knockout“-Tieren als auch in transgenen Mäusen mit Rezeptorüberexpression eindeutig belegt werden (Tabelle 1). Dass der genetische Hintergrund bei der Generierung von transgenen Tieren nicht unbeachtet bleiben darf, sah man ebenfalls bei der Charakterisierung von AT₂-KO-Mäusen, die unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen generiert wurden (Hein et al. 1995; Ichiki et al. 1995). Obwohl in beiden Modellen die Blutdruckantwort auf Angiotensin II erhöht war, stimmten die basalen Blutdruckwerte nicht überein. Der Mechanismus der veränderten

Einleitung

Blutdruckantwort bei AT₂-KO-Mäusen ist bislang völlig unklar. Transgene Tiere mit einer Überexpression von Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems konnten in vielen Aspekten die Funktionen der entsprechenden Rezeptorsubtypen belegen (Masaki et al. 1998; Tsutsumi et al. 1999). Tab. 1 fasst die erwähnten Phänotypen der transgenen Mausmodelle zusammen.

Tabelle 1: Transgene Maus-Modelle von Angiotensin II AT-Rezeptoren

Stammzell-Transgene (KO)	Phänotyp
AT _{1A} -KO	<ul style="list-style-type: none"> • Reduktion des systolischen Blutdruckes und minimaler Blutdruckanstieg auf Angiotensin II (Ito et al. 1995; Oliverio et al. 1997) • gering ausgeprägte pränatale Letalität und renale Entwicklungsdefekte (Oliverio et al. 1998)
AT _{1B} -KO	<ul style="list-style-type: none"> • keine Entwicklungsdefekte und normale Blutdruckregulation (Chen et al. 1997)
AT _{1AB} -KO	<ul style="list-style-type: none"> • postnatale Letalität mit renalen und kardialen Entwicklungsdefekten und fehlende Blutdruckantwort auf Angiotensin II (Tsuchida et al. 1998; Oliverio et al. 1998)
AT ₂ -KO	<ul style="list-style-type: none"> • verstärkte Blutdruckantwort auf Angiotensin II-Infusionen bei normalen (Hein et al. 1995) bzw. erhöhten (Ichiki et al. 1995) basalen Blutdruckwerten
Pronukleus-Transgene (TG)	Phänotyp
αMHC(„α-myosin-heavy-chain“)-AT ₁ -TG	<ul style="list-style-type: none"> • Vergrößerung der Herzvorhöfe, Bradykardie, Hyperplasie der Myozyten und nachgeburtliche Letalität der Mäuse bei kardialer Überexpression des Maus-AT_{1A}-Rezeptors (Hein et al. 1997) • Hypertrophie und Remodeling mit erhöhter ANF-Expression und interstitieller Kollagenablagerung und frühzeitige Letalität der Mäuse bei kardialer Überexpression des humanen AT₁-Rezeptors (Paradis et al. 2000)
αMHC(„α-myosin-heavy-chain“)-AT ₂ -TG	<ul style="list-style-type: none"> • verminderte Blutdruckantwort auf Angiotensin II bei kardialer Überexpression des Maus-AT₂-Rezeptors (Masaki et al. 1998)
SMαA(„smooth-muscle-α-actin“)-AT ₂ -TG	<ul style="list-style-type: none"> • fehlende Blutdruckantwort auf Angiotensin II bei vaskulärer Überexpression des Maus-AT₂-Rezeptors (Tsutsumi et al. 1999)

1.2.2 β -adrenerge Rezeptoren

β -adrenerge Rezeptoren übertragen die Wirkungen der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im sympathischen Nervensystem und im ZNS. 1948 wurde das erste Mal von Ahlquist (Ahlquist 1948) eine funktionelle Unterteilung adrenerger Rezeptoren in α - und β -adrenerge Rezeptoren getroffen. Die Klassifikation β -adrenerger Rezeptoren in einen β_1 -adrenergen und einen β_2 -adrenergen Rezeptor wurde erst viele Jahre später vorgenommen (Lands et al. 1967a, b).

β -adrenerge Rezeptoren sind beteiligt an embryonalen Entwicklungsprozessen, an der Regulation des zentralen Nervensystems, an verschiedenen Stoffwechselfvorgängen, vor allem aber an der Regulation des Herz-Kreislauf-Systems (Rohrer 1998). Die Bedeutung β -adrenerger Rezeptoren spiegelt sich in der Therapie der koronaren Herzkrankheit (Wilhelmsen et al. 1987) und der Herzinsuffizienz (Gilbert et al. 1996; Heidenreich et al. 1997), der arteriellen Hypertonie (Mason et al. 1987), kardialer Arrhythmien (Propafenone Study Group 1995), des Asthma bronchiale (Empfehlungen der Deutschen Atemwegsliga) und der Tokolysebehandlung (Souney et al. 1983) wieder. Wie bereits eingangs erwähnt, gehören sie zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Strader et al. 1995). Es konnten bis zum heutigen Zeitpunkt drei unterschiedliche β -adrenerge Rezeptoren kloniert werden (Frielle et al. 1987; Dixon et al. 1986; Emorine et al. 1989). Über einen vierten β -adrenergen Rezeptor wird noch immer spekuliert, nachdem Kaumann 1997 einen solchen postuliert hat (Kaumann et al. 1997), der jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt nicht kloniert werden konnte. Wahrscheinlich stellt der β_4 -adrenerge Rezeptor eine pharmakologische Variante des β_1 -adrenergen Rezeptors dar (Kaumann et al. 2001).

Durch pharmakologische Methoden können die einzelnen β -adrenergen Rezeptorsubtypen mittels spezifischer Agonisten und Antagonisten untersucht und klassifiziert werden. Da die verwendeten Substanzen außerordentlich selektiv sind,

Einleitung

können die Funktionen der β -adrenergen Rezeptorsubtypen in verschiedenen Geweben durch diese Liganden untersucht werden (Brodde 1991).

In der Herz-Kreislauf-Forschung nahm man früher vereinfachend an, dass der β_1 -adrenerge Rezeptor für die Wirkungen der Katecholamine am Herzmuskel verantwortlich ist (Steigerung von Chronotropie und Inotropie), der β_2 -adrenerge Rezeptor hingegen vor allem die Erschlaffung glatter Muskelzellen (Bronchialmuskulatur, arterielles Gefäßbett) vermittelt. Der β_3 -adrenerge Rezeptor steigert die Freisetzung freier Fettsäuren, erhöht die Insulinfreisetzung aus dem Pankreas und beeinflusst die Motilität des Gastrointestinaltraktes (Fletcher et al. 1998; Grujic et al. 1997; Revelli et al. 1997; Susulic et al. 1995). In vivo Untersuchungen an Hund und Ratte haben gezeigt, dass dieses stark vereinfachte Modell so nicht aufrecht zu erhalten ist, da neben β_2 -adrenergen Rezeptoren auch β_1 - und β_3 -adrenerge Rezeptoren an der Erschlaffung der Gefäßmuskulatur beteiligt sind (Vatner et al. 1985; Shen et al. 1994; Shen et al. 1996).

Die moderne Mausgenetik ermöglicht es, die früher gewonnenen Erkenntnisse auf Rezeptorebene auf andere Weise verifizieren zu können. Neben β_1 - und β_2 -transgenen Tieren, die den jeweiligen β -adrenergen Rezeptor im Herzmuskel überexprimieren (Bertin et al. 1993; Milano et al. 1994; Engelhardt et al. 1999; Bisognano et al. 2000), wurden mittlerweile alle drei β -adrenergen Rezeptorgene durch homologe Rekombination ausgeschaltet (Rohrer et al. 1996; Chruscinski et al. 1999; Susulic et al. 1995). Durch Verpaarung von β_1 -KO- und β_2 -KO-Mäusen konnten darüber hinaus Mäuse generiert werden, bei denen die β_1 - und β_2 -adrenergen Rezeptoren fehlen ($\beta_1\beta_2$ -KO) (Rohrer et al. 1999).

Die kardiovaskuläre Charakterisierung stand sowohl bei der Untersuchung der β_1 -KO-Tiere als auch beim β_2 -KO und dem $\beta_1\beta_2$ -KO eindeutig im Vordergrund (Chruscinski et al. 1999; Rohrer et al. 1996, 1998, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Maus die Steigerung von Chronotropie und Inotropie auf die Gabe von Isoprenalin, einem β_1 -

und β_2 -Rezeptoragonisten, allein durch den β_1 -adrenergen Rezeptor ausgelöst wird, da bei β_1 -KO-Tieren weder eine inotrope noch eine chronotrope Reaktion ausgelöst werden konnte (Rohrer et al. 1996). Im Gegensatz dazu konnte durch alle drei β -adrenergen Rezeptoren eine Hypotension ausgelöst werden, wobei durch Stimulation der β_2 -adrenergen Rezeptoren eindeutig die stärkste Reaktion ausgelöst wurde (Chruscinski et al. 1999). Unklar ist, welcher β -adrenerge Rezeptorsubtyp an der direkten Vasodilatation am glatten Gefäßmuskel beteiligt ist. β_2 -KO-Tiere zeigten auf Isoprenalin eine deutlich verminderte hypotensive Reaktion. Im $\beta_1\beta_2$ -KO war die Antwort auf Isoprenalin zwar noch weiter eingeschränkt, jedoch nicht vollständig aufgehoben. Dies weist darauf hin, dass auch der β_3 -adrenerge Rezeptor an der blutdrucksenkenden Wirkung beteiligt ist (Rohrer et al. 1999).

Untersuchungen von β_3 -KO Mäusen bestätigten die Beteiligung des β_3 -adrenergen Rezeptors an der Freisetzung freier Fettsäuren aus dem Fettgewebe (Grujic et al. 1997; Susulic et al. 1995). Darüber hinaus steigert der β_3 -adrenerge Rezeptor die Insulinausschüttung aus der Bauchspeicheldrüse. Weiterhin wurde der Sauerstoffverbrauch durch Stimulation des β_3 -adrenergen Rezeptor erhöht (Susulic et al. 1995) sowie die Passagezeit von aufgenommener Nahrung im Magen-Darm Trakt durch Stimulation des β_3 -adrenergen Rezeptors verzögert (Fletcher et al. 1998).

Mit Hilfe der Mausgenetik ist es möglich, am lebenden Organismus das diffizile Zusammenspiel einzelner Rezeptoren an der Regulation des sympathischen Nervensystems zu untersuchen und besser zu verstehen. Tab. 2 gibt einen Überblick der Phänotypen β -adrenerger Stammzell- und Pronukleus-transgener Tiere.

Einleitung

Tabelle 2: Transgene Maus-Modelle β -adrenerger Rezeptoren

Stammzell-Transgene (KO)	Phänotyp
β_1 -KO	<ul style="list-style-type: none"> • partielle embryonale Letalität, Verlust der inotropen und chronotropen Antwort auf Isoprenalin, sowie eingeschränkte hypotensive Reaktion auf die Gabe von Isoprenalin (Rohrer et al. 1996) • normale Belastungsfähigkeit und metabolische Kontrolle bei fehlender chronotroper Reaktion bei körperlicher Anstrengung (Rohrer et al. 1998)
β_2 -KO	<ul style="list-style-type: none"> • eingeschränkte hypotensive Reaktion auf die Gabe von Isoprenalin • normale Belastungsfähigkeit • verminderter respiratorischer Sauerstoffverbrauch bei körperlicher Anstrengung • verstärkte hypertensive Reaktion bei körperlicher Belastung oder Adrenalinzufuhr (Chruscinski et al. 1999)
$\beta_1\beta_2$ -KO	<ul style="list-style-type: none"> • normale basale Herzkreislaufparameter • aufgehobene chronotrope Antwort auf Isoprenalin und verminderte hypotensive Reaktion auf Adrenalingabe • unveränderte körperliche Belastungsfähigkeit • verstärkte hypotensive β_3-adrenerge Rezeptorfunktion (Rohrer et al. 1999)
β_3 -KO	<ul style="list-style-type: none"> • fehlender Anstieg von freien Fettsäuren und Insulin sowie verminderter Sauerstoffverbrauch nach β_3-Stimulation (Grujic et al. 1997; Susulic et al. 1995) • fehlende Hemmung der Magen-Darm-Motilität --> Wiederherstellung durch Überexpression β_3-adrenerger Rezeptoren in braunem und weißem Fettgewebe (Fletcher et al. 1998) • erhöhte Körperfettmasse und Nahrungsaufnahme ohne Veränderungen im Leptinhaushalt (Revelli et al. 1997)
Pronukleus-Transgene (TG)	Phänotyp
α MHC(„ α -myosin-heavy-chain“)- β_1 -TG	<ul style="list-style-type: none"> • verbesserte kardiale Kontraktilität beim Jungtier • Entwicklung einer Herzmuskelhypertrophie und Herzinsuffizienz (Engelhardt et al. 1999; Bisognano et al. 2000)
α MHC(„ α -myosin-heavy-chain“)- β_2 -TG	<ul style="list-style-type: none"> • verbesserte atriale Kontraktilität und linksventrikuläre Herzfunktion (Milano et al. 1994) • Entwicklung einer Herzmuskelhypertrophie und Herzinsuffizienz bei massiver kardialer Überexpression (Liggett et al. 2000)

1.2.3 α_2 -adrenerge Rezeptoren

Neben β -adrenergen Rezeptoren spielen im sympathischen Nervensystem weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine wichtige Rolle (Bylund et al. 1994): Neben den α_1 -adrenerge Rezeptoren, die vor allem den peripheren Gefäßwiderstand beeinflussen (Piascik et al. 1990), sind α_2 -adrenerge Rezeptoren an verschiedensten physiologischen Funktionen des kardiovaskulären und zentralen Nervensystems beteiligt. α_2 -adrenerge Rezeptoren werden in verschiedenen Geweben in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert (Nicholas et al. 1993; Perala et al. 1992), was auf eine Aufgabenteilung α_2 -adrenerger Rezeptoren hinweist. α_2 -adrenerge Rezeptoren greifen an der prä- oder postsynaptischen Seite von Neuronen modulatorisch in die Funktion ein. Im zentralen Nervensystem werden den α_2 -adrenergen Rezeptoren hauptsächlich inhibitorische Funktionen zugeschrieben (Langer et al. 1985). So wird die Aktivität des Sympathikus von zentraler Seite durch Clonidin, einem α_2 -adrenergen Rezeptoragonisten, gehemmt (Guyenet et al. 1981). Im peripheren sympathischen Nervensystem wird die Freisetzung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt durch präsynaptische α_2 -adrenerge Rezeptoren gehemmt (Starke et al. 1975). α_2 -adrenerge Rezeptoren helfen dadurch, den Noradrenalin-Spiegel im Blut zu regulieren. Die ständige Erhöhung des Plasmanoradrenalin-Spiegels wird mit der Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht (Cohn et al. 1984). Auch in anderen Organsystemen übernehmen α_2 -adrenerge Rezeptoren eine wichtige Aufgabe. Therapeutisch ausgenutzt wird z.B. die vasokonstringierende abschwellende Wirkung der α_2 -adrenergen Rezeptoren an der Nasenschleimhaut und den Konjunktiven (Birchall et al. 1996; Duzman et al. 1986).

α_2 -adrenerge Rezeptoragonisten werden vor allem zur Therapie von erhöhtem Blutdruck (Fillastre et al. 1988) eingesetzt. Auch bei der Behandlung von Schmerzzuständen (Khan et al. 1999), zur Senkung des Augeninnendruckes (Schuman 1996) sowie zur Behandlung von Opiat-Entzugserscheinungen (Gold et al. 1978; Bjorkqvist 1975) erweisen sich α_2 -adrenerge Rezeptoragonisten als überaus

wirkungsvoll. Darüber hinaus werden α_2 -adrenerge Rezeptoragonisten in der Anästhesiologie sehr gerne eingesetzt, da hier gleichzeitig sedierende, analgetische und blutdrucksenkende Wirkungen von α_2 -adrenergen Agonisten ausgenutzt und Inhalationsnarkotika durch die Kombination mit α_2 -adrenergen Rezeptoragonisten eingespart werden können (Sung et al. 2000).

Derzeit werden drei α_2 -adrenerge Rezeptoren unterschieden: α_{2A} -, α_{2B} - und α_{2C} -adrenerge Rezeptoren. Da sich das Ligandbindungsverhalten von α_{2A} -Rezeptoren von Mensch und Maus voneinander unterscheidet, wurde ein vierter α_2 -adrenerger Rezeptorsubtyp (α_{2D}) postuliert, der jedoch nur eine Variante des α_{2A} -adrenergen Rezeptors mit geänderten Bindungseigenschaften darstellt (Lomasney et al. 1990; Regan et al. 1988; Kobilka et al. 1987). Eine partielle Unterscheidung der einzelnen Subtypen ist anhand verschiedener pharmakologischer Agonisten und Antagonisten möglich (Lomasney et al. 1991), ist jedoch aufgrund der fehlenden absoluten Spezifität der verfügbaren Liganden für diese Rezeptoren nur sehr unzureichend möglich. Zusätzlich sind zahlreiche Liganden, die eine gewisse Subtyp-Selektivität für α_2 -Rezeptoren besitzen (z.B. Oxymetazolin, Prazosin), auch gute Liganden für α_1 -adrenerge Rezeptoren.

Die Klonierung der drei unterschiedlichen α_2 -adrenergen Rezeptorsubtypen (Kobilka et al. 1987; Regan et al. 1988; Lomasney et al. 1991) und die nachfolgende Deletion der dazugehörigen Gene im Tiermodell liefert ein ausgezeichnetes Werkzeug, den verschiedenen α_2 -adrenergen Rezeptoren spezifische Funktionen zuordnen zu können, gerade weil spezifische Liganden für diese Rezeptoren fehlen. Alle drei α_2 -adrenergen Rezeptoren konnten mittlerweile durch homologe Rekombination bei der Maus ausgeschaltet werden (Hein 2000). Zuvor schon konnten Mäuse generiert werden, die eine Mutation im α_{2A} -adrenergen Rezeptor aufweisen, die zu dessen teilweisem Funktionsverlust führt (α_{2A} -D79N) (Lakhlani et al. 1997). Neben diesen Knockouttieren gibt es derzeit nur eine Mauslinie, die den endogenen murinen α_{2C} -adrenergen Rezeptor

Einleitung

überexprimiert, der zusätzlich mit einem Hämagglutinin-Epitop versehen ist (α_{2C} -TG) (Sallinen et al. 1997). Es konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine Mauslinie generiert werden, die ganz ohne α_2 -adrenerge Rezeptoren auskommt. Dies legt den Schluß nahe, dass α_2 -adrenerge Rezeptoren auch für die regelhafte embryonale Entwicklung der Maus von Bedeutung sind.

Die meisten Wirkungen von α_2 -Agonisten im adulten Tier, wie Analgesie, Hypotension und Sedierung, können zum derzeitigen Zeitpunkt eindeutig dem α_{2A} -adrenergen Rezeptor zugewiesen werden (Hein 2000). Die Bedeutung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors für die zentrale Blutdruck- und Herzfrequenzkontrolle konnte sowohl bei α_{2A} -KO-Tieren als auch bei Mäusen, welche die α_{2A} -D79N Rezeptormutante tragen, eindeutig gezeigt werden (Altman et al. 1999; MacMillan et al. 1996). Im Gegensatz dazu vermittelt der α_{2B} -adrenerge Rezeptor den initialen Blutdruckanstieg auf die Gabe eines unspezifischen α_2 -adrenergen Agonisten (Link et al. 1996). α_{2C} -KO-Tiere verhalten sich von Seiten des Herz-Kreislauf Systems weitgehend unauffällig (Link et al. 1996). Durch Doppelknockout für die α_{2A} - und α_{2C} -adrenergen Rezeptoren (α_{2AC} -KO) konnte die Beteiligung von α_{2A} - und α_{2C} -adrenergen Rezeptoren an der prä-synaptischen Regulation der Noradrenalin-Freisetzung gezeigt werden (Hein et al. 1999).

Die Bedeutung der α_2 -adrenergen Rezeptoren für die Kreislaufregulation konnte mit Hilfe transgener Tiermodelle auf eindrucksvolle Weise belegt werden. Inwieweit α_2 -adrenerge Rezeptoren an der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beteiligt sind, wird im Moment von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Tab. 3 gibt einen Überblick zu den einzelnen transgenen Tieren.

Tabelle 3: Transgene Maus-Modelle α_2 -adrenerger Rezeptoren

Stammzell-Transgene (KO)	Phänotyp
α_{2A} -KO	<ul style="list-style-type: none"> • verstärkte sympathische Aktivierung mit Tachykardie, Gewebeverarmung an Noradrenalin in Herz und Niere, Downregulation kardialer β-adrenerger Rezeptoren (Altman et al. 1999) • Verlust der hypotensiven Reaktion auf α_2-Agonisten, Reduktion der präsynaptischen Autoinhibition (Altman et al. 1999) • Verlust der Hemmung der Transmitterfreisetzung bei hohen Stimulationsfrequenzen, leicht erhöhte Plasmanoradrenalin-Spiegel (Hein et al. 1999)
α_{2B} -KO	<ul style="list-style-type: none"> • aufgehobene hypertensive Reaktion und verstärkte hypotensive Antwort auf α_2-Agonisten (Link et al. 1996)
α_{2C} -KO	<ul style="list-style-type: none"> • keine Veränderungen von seiten des Herz-Kreislauf-Systems (Link et al. 1995; Link et al. 1996) • Verlust der Hemmung der Transmitterfreisetzung bei niedrigen Stimulationsfrequenzen (Hein et al. 1999)
α_{2AC} -KO	<ul style="list-style-type: none"> • deutlicher Anstieg des Plasmanoradrenalin-Spiegels, Entwicklung einer kardialen Hypertrophie mit verminderter Kontraktilität (Hein et al. 1999)
Pronukleus-Transgene (TG)	Phänotyp
α_{2C} -TG („endogener Promotor“)	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderung der Temperaturkontrolle auf die Gabe von α_2-Agonisten sowie erhöhte Homovanillinsäure-Spiegel (Sallinen et al. 1997)

1.3 Zielsetzung

Die transgene Technologie hat ganz neue Möglichkeiten eröffnet, die physiologische Funktion einzelner Proteine zu klären. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der kardiovaskulären Charakterisierung von drei unterschiedlichen transgenen Mauslinien. Es sollten dabei unterschiedliche Schwerpunkte verfolgt werden, da die Gendelektionen die Herz-Kreislauf-Regulation an verschiedenen Punkten beeinflusste und bei der Erstbeschreibung unterschiedliche Funktionsstörungen beschrieben wurden. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Deletion kardiovaskulärer Rezeptoren auf die Effekte von Rezeptoragonisten hat und welche Langzeiteffekte im Herz-Kreislauf-System zu beobachten sind. Weiterhin sollte in einem experimentellen Herzinsuffizienz-Modell geprüft werden, welchen Einfluss die Deletion α_2 -adrenerger Rezeptorgene für die kardiale Funktion hat.

Seit längerem ist bekannt, dass Angiotensin II AT_2 -Rezeptor-KO-Tiere auf die Gabe von Angiotensin II mit einer verstärkten Blutdrucksteigerung reagieren, so dass dem AT_2 -Rezeptorsubtyp die Rolle eines Gegenspielers zum AT_1 -Rezeptor zugeschrieben werden muss. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob sich für die gesteigerte Blutdruckreaktion ein funktionelles oder morphologisches Korrelat im Gefäß finden läßt und ob es durch Deletion des AT_2 -Rezeptors zur Veränderung der Signaltransduktion in arteriellen Gefäßen kommt, die für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein könnte.

Aus Voruntersuchungen an β -adrenergen „knockout“-Mäusen war bekannt, dass die blutdrucksenkende Wirkung von Isoprenalin *in vivo* durch alle drei β -adrenergen Rezeptorsubtypen vermittelt wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollte an isolierten Gefäßen von β_1 - und β_2 -KO-Mäusen untersucht werden, in welchem Verhältnis β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren an der Vermittlung der Gefäßrelaxation *in vitro* beteiligt sind. Es wurden hierzu unterschiedliche Abschnitte des arteriellen Gefäßbaumes der Maus systematisch untersucht.

Einleitung

Die Rolle des α_{2C} -Rezeptors für die Herz-Kreislauf-Regulation konnte Ende letzten Jahres erstmals im Mausmodell gezeigt werden (Hein et al. 1999). Anhand eines Modells der chronischen Drucküberlastung des linken Ventrikels durch Aortenstenose bei der Maus sollte die Beteiligung des α_{2C} -Rezeptors an der Entstehung von kardiovaskulären Veränderungen belegt werden, die bisher nur in Kombination mit dem α_{2A} -Rezeptor zu finden waren. Hierbei stand die kardiovaskuläre Charakterisierung unterschiedlicher α_2 -KO-Tiere und WT-Kontrollen im Vordergrund.

2 Material und Methoden

Alle nicht gesondert aufgeführten Gebrauchsmaterialien wurden von den Firmen Gibco (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma (Taufkirchen, D) in größtmöglichem Reinheitsgrad bezogen. Essentielle Chemikalien sind mit der jeweiligen Produktbezeichnung, Konzentration und Herstellernamen bei den einzelnen Methoden aufgeführt. Verwandte Geräte sowie Computerprogramme sind bei den einzelnen Methoden zu finden.

2.1 Genotypisierung von Knockouttieren

2.1.1 Genotypisierung

Zur Untersuchung der Funktion des Angiotensin II AT₂-Rezeptors wurden zwei Mauskollektive gleicher Größe benötigt, AT₂-„knockout“-Mäuse (AT₂-KO) und Wildtypkontrollmäuse (WT). Da sich das Gen des AT₂-Rezeptors auf dem X-Chromosom befindet (Lazard et al. 1994; Hein et al. 1995), konnten durch geeignete Verpaarung eines weiblichen heterozygoten AT₂-KO-Tieres und eines männlichen WT-Tieres im gleichen Wurf sowohl männliche WT-Mäuse als auch männliche AT₂-KO-Mäuse in gleicher Anzahl erhalten werden. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden nur männliche Geschwistertiere eingesetzt, die für mindestens sechs Generationen auf den FVB/N-Hintergrund zurückgekreuzt worden waren. β-Rezeptor-KO-Tiere und α₂-Rezeptor-KO-Mäuse wurden wie bei der initialen Generierung beschrieben (Rohrer et al. 1996; Chruscinski et al. 1999; Altman et al. 1999; Link et al. 1995; Link et al. 1996) als homozygote Linien gezüchtet.

2.1.1.1 DNA-Isolierung

Obwohl sich WT- und AT₂-KO-Tiere äußerlich nicht unterscheiden, war die Detektion der Genmutation mit molekularen Techniken schnell und sicher möglich. Hierfür war die Isolierung genomischer DNA Grundvoraussetzung. Zu diesem Zweck wurde den

Material und Methoden

Mäusen im Alter von drei Wochen ein 0,5cm langes Stück Schwanz entfernt und über Nacht in 750µl Lysis-Puffer (0,5% SDS, 0,1M NaCl, 50mM Tris, 3mM EDTA) unter Zugabe von 4µl Proteinase K (20mg/ml) bei 50°C inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurden 400µl Phenol (pH 7,5-8,0) der über Nacht inkubierten Biopsie zugesetzt und die Proben 10 Minuten bei 1700g zentrifugiert. Die Nukleinsäuren blieben hierbei im wäßrigen Überstand gelöst, von dem 600µl abgenommen, erneut mit 300µl Phenol vermischt und bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert wurden. Wiederum wurden 400µl des Überstandes entnommen und zur Entfernung des noch in der wässrigen Phase befindlichen Phenols mit 300µl eines 25:1 Gemisches aus Chloroform/Iso-Amylalkohol versetzt, gemischt und erneut zentrifugiert. Im folgenden Schritt wurden 300µl des Überstandes abpipettiert und die darin gelöste DNA mittels 750µl 100% Ethanol ausgefällt. Die präzipitierte DNA wurde anschließend eine Minute lang bei 1700g abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und der am Boden des Gefäßes befindlichen DNA 75% Ethanol zugesetzt. Die DNA wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgekippt. Die am Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzte DNA wurde nun fünf Minuten bei 50°C getrocknet und abschließend bei 37°C für 30 Minuten in 50µl Aqua dest. gelöst. Für die anschließende Polymerasekettenreaktion wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Eine Bestimmung der isolierten DNA-Menge war für die Genotypisierungsversuche der WT- und AT₂-KO-Tiere nicht nötig.

2.1.1.2 Polymerasekettenreaktion

Nach der DNA-Isolierung wurden die Proben mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht. Diese Technik ermöglicht es, aus geringen Mengen von genomischer DNA durch sequenzspezifische Primer beliebig kurze DNA-Fragmente des Genoms in großen Mengen herzustellen und in einer anschließenden Reaktion sichtbar zu machen (Saiki et al. 1985). Bei der Generierung der AT₂-„knockout“-Tiere wurde im Bereich des dritten Exons des AT₂-Gens eine Neomycinresistenzkassette durch homologe Rekombination inseriert, welche die Expression des AT₂-Rezeptors verhindert (Hein et

Material und Methoden

al. 1995). Diese Insertion machte man sich bei der Genotypisierung der Tiere zunutze. Da sowohl die Sequenz als auch die Lage der Resistenzkassette in der DNA genau bekannt war, konnte man nun durch geeignete Wahl der PCR-Primer exakt zwischen Wildtypieren und „knockout“-Tieren unterscheiden. Eine schematische Darstellung der PCR-Strategie findet sich im Ergebnisteil (Kapitel 3.1.1).

Bei der Durchführung der PCR wurde ein dreiphasiger Reaktionszyklus wiederholt durchlaufen, der sich aus einem Denaturierungsschritt der doppelsträngigen DNA, einem Anlagerungsschritt der sequenzspezifischen Primer an die einzelsträngige DNA und einem Amplifikationschritt des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts zusammensetzte. Dieser Zyklus wurde mehrmals in dieser Reihenfolge durchlaufen und vermehrte das gesuchte DNA-Produkt exponentiell. Die optimale Anlagerungstemperatur T_m (in °C) der Primer wurde nach der „2+4-Regel“ ($((A+T)*2+(G+C)*4)$) bestimmt. Das Protokoll für die Polymerasekettenreaktion sah wie folgt aus:

1µl AT₂-WT Vorwärts-Primer (0,5µM)
1µl AT₂-WT Rückwärts-Primer (0,5µM)
1µl AT₂-KO Vorwärts-Primer (0,5µM)
2µl dNTP (0,2mM)
2µl 10x PCR Puffer
0,2µl Taq-Polymerase (0,05Units/µl)
11µl Aqua dest.
+ 2µl genomische DNA (1:100 verdünnt)

Sowohl dNTP, PCR-Puffer als auch die Taq-Polymerase wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim, D) bezogen. Die Primer wurden bei Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D) hergestellt und hatten folgende Sequenz:

Material und Methoden

AT ₂ -WT Vorwärts-Primer	5'-CCTTGGCTGACTTACTCCTT-3'
AT ₂ -WT Rückwärts-Primer	5'-GAACTACATAAGATGCTTGCC-3'
AT ₂ -KO Vorwärts-Primer	5'-TAGTTGCCAGCCATCTGTTG-3'

Die Proben wurden in einem programmierbaren Thermocycler (GeneAmp 2400, Perkin Elmer, Branchburg, USA) nach folgendem Protokoll amplifiziert:

- 1) Denaturierungsschritt: 94 °C für 15 Sekunden
- 2) Anlagerungsschritt: 55 °C für 20 Sekunden
- 3) Amplifikationsschritt: 72 °C für 30 Sekunden

Dieser Zyklus wurde insgesamt 30 mal durchlaufen und die Proben wurden anschließend in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und die gesuchten DNA-Produkte durch Ethidiumbromid (0,5µg/µl) (Serva, Heidelberg, D) sichtbar gemacht.

2.1.1.3 Agarosegelelektrophorese

DNA besitzt negative Nettoladung und kann dadurch in einem elektrischen Feld wandern. Zur Darstellung der zuvor amplifizierten DNA-Abschnitte wurde die Agarosegelelektrophorese benutzt, mit deren Hilfe man die DNA nach ihrer Größe auftrennen kann. Der Anteil an Agarose im Gel beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit der PCR-Produkte. Zur Genotypisierung des AT₂-Rezeptorgens wurde aufgrund der geringen Größe der gewählten DNA-Produkte ein 2% Agarosegel verwendet. 15µl des PCR-Reaktionsansatzes wurden in die dafür vorgesehene Taschen des Gels eingebracht und bei 90V für 50 Minuten horizontal aufgetrennt. Um die Größe des Konstruktes exakt bestimmen zu können, wurde ein 1:10 verdünnter 100bp Größenmarker (New England BioLabs, Beverly, USA) neben den Proben aufgetragen. Abschließend konnten die nach ihrer Größe aufgetrennten Produkte durch Ethidiumbromid (0,5µg/µl), das zuvor in das Agarosegel eingebracht worden

war, unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und dokumentiert werden. Dies wurde mit Hilfe eines E.A.S.Y.-UV-Detektors Typ RH3 und einer E.A.S.Y.-Kamera Typ 429K (Herolab Instruments, Wiesloch, D) durchgeführt.

2.2 Untersuchung isolierter Blutgefäße

2.2.1 Mulvany Myograph

Zur *in vitro* Untersuchung kleiner Blutgefäße gehört der von Mulvany entwickelte Myograph seit nunmehr über zwanzig Jahren zu den Standardmethoden (Mulvany et al. 1977). Er beruht auf dem Prinzip, isolierte Gefäße durch unterschiedliche Substanzen isometrisch zu kontrahieren und die vom Gefäß erzeugte Wandspannung zu bestimmen. Außerdem kann die Abnahme der Wandspannung des Gefäßes durch Zugabe relaxierender Substanzen bestimmt werden. Abb. 2 zeigt die Versuchsanordnung schematisch auf. Durch die 2mm langen Gefäßsegmente wurden 2 dünne Drähte geführt, die an zwei Halterungen befestigt wurden. Die eine Halterung war mit einem Mikrometer-Schrittmotor, die andere Halterung mit einem Kraftaufnehmer verbunden. Somit konnten gleichzeitig der Abstand der beiden Halterungen voneinander und die Kraft bestimmt werden, die durch die Dehnung des Gefäßes erzeugt wurde. Beide Parameter ermöglichten die Berechnung der durch die Gefäßwand erzeugten Wandspannung. Darüber hinaus konnte aus dem Abstand der beiden Halterungen der innere Umfang des eingespannten Gefäßes bei einem intraluminären Druck von 100mmHg bestimmt werden (IU_{100}), aus dem anschließend der Gefäßinnendurchmesser berechnet werden konnte.

Für die Messungen stand ein automatisierter Myograph (Modell 500A, J.P.Trading, Aarhus, Dänemark) zur Verfügung, der sowohl den inneren Gefäßumfang automatisiert bestimmte als auch das Gefäß anschließend für die Untersuchung optimal vordehnte.

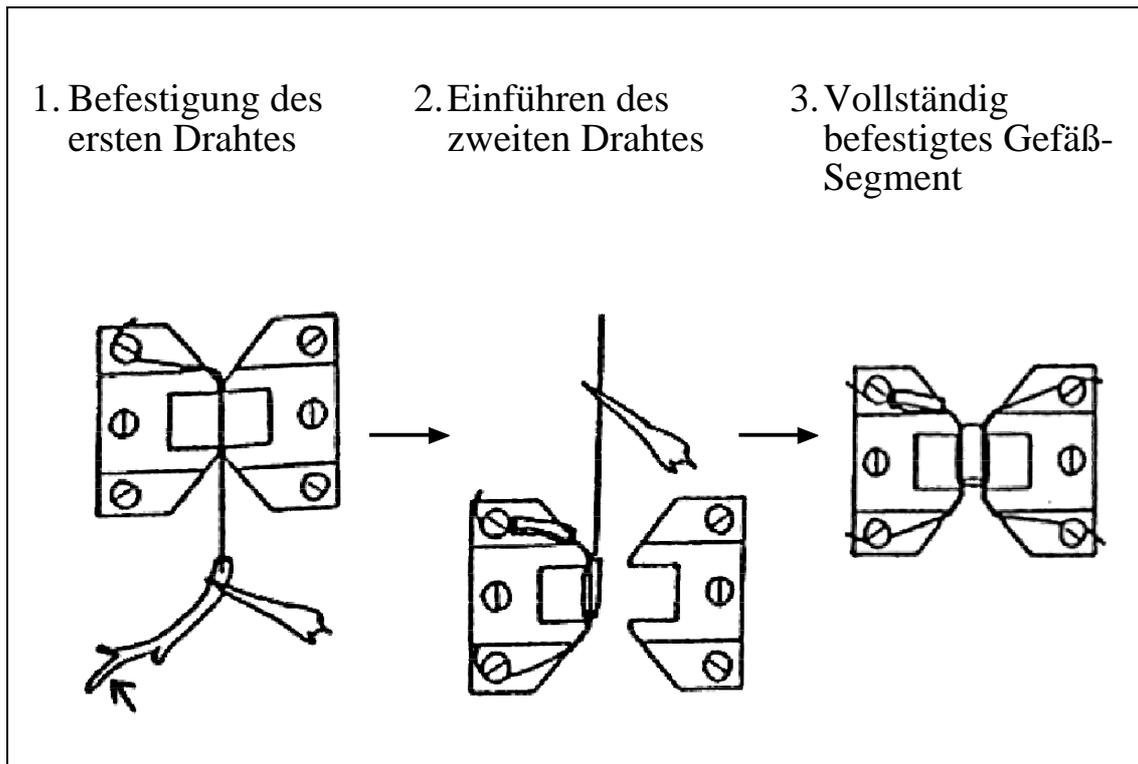


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Myographen. Von links nach rechts sind die einzelnen Schritte aufgezeigt, wie ein isoliertes Gefäß zwischen die beiden Halterungen des Myographen eingespannt wird. Die eine Vorrichtung besitzt einen integrierten Spannungsmesser, die andere Seite ist mit einem Mikrometer-Schrittmotor versehen, der den Abstand beider Vorrichtungen voneinander bestimmt.

2.2.1.1 Präparation der Gefäße

Die Untersuchungstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das zu untersuchende Gefäß makroskopisch freipräpariert und grob vom umliegenden Gewebe getrennt. Sollten bei einer Maus mehrere Gefäßregionen untersucht werden, wurden die isolierten Gefäße bis zur Untersuchung bei 4°C gelagert (McIntyre et al. 1998). Das Gefäß wurde zur weiteren Präparation in eine mit gekühltem Krebs-Henseleit-Puffer (s.u.) gefüllte beschichtete Petrischale überführt und dort zur weiteren Präparation fixiert. Anschließend wurde unter einer Stereolupe umliegendes überschüssiges Gewebe vom Gefäß entfernt. Nach Eröffnung des Gefäßes wurde ein 40µm dicker Draht in das eröffnete Gefäß eingeführt und ein ungefähr 2mm langes Stück des Gefäßes abgetrennt. Dieses wurde dann in die auf 37°C vorgewärmte, mit

Material und Methoden

Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Untersuchungskammer des Myographen eingebracht.

Der Krebs-Henseleit-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

Krebs-Henseleit-Puffer (KCl 4,7mM)

Substanz	Endkonzentration
NaCl	118mM
KCl	4,7mM
CaCl ₂	2,5mM
MgSO ₄	1,18mM
KH ₂ PO ₄	1,18mM
NaHCO ₃	25mM
EDTA	0,03mM
Glukose	10mM

Nach Befestigung des Drahtes an der dafür vorgesehenen Vorrichtung (Abb. 2) wurde ein zweiter Draht in das Gefäß eingeführt. Dieser Vorgang wurde für ein zweites korrespondierendes Gefäßstück wiederholt, das in der zweiten Meßeinheit des Myographen befestigt wurde. Somit konnten gleichzeitig zwei Gefäße untersucht werden. Nach Bestimmung der exakten Gefäßlänge unter der Stereolupe Typ MZ6 (Leica, Wetzlar, D) und Einstellung des Myographen wurde in die Untersuchungskammer ein Sauerstoff-Kohlendioxid-Gemisch (95% O₂/5% CO₂) eingeleitet, das während der gesamten Versuchszeit konstante physiologische Pufferbedingungen für das Gefäß lieferte.

2.2.1.2 Stimulation der Gefäße

Vor der eigentlichen Untersuchung wurde ein Normalisierungsprotokoll durchgeführt. Dieses beruhte auf einem Längen-Spannungs-Verhältnis (Mulvany et al. 1977), das die Berechnung des Gefäßinnendurchmessers ermöglichte. Die Gefäße wurden hierbei schrittweise gedehnt; gleichzeitig wurden der erzeugte Druck und der Abstand zwischen den Halterungen im Falle des hier verwandten Myographen automatisiert bestimmt. Wurde ein dieser Dehnung entsprechender intraluminaler Druck von 100 mmHg erreicht, konnte hieraus der innere Umfang (IU₁₀₀) des Gefäßes bestimmt werden. Für

Material und Methoden

die folgenden Messungen wurde das Gefäß auf eine Vordehnung eingestellt, bei der der innere Umfang 90% der bei 100mmHg gemessenen Vordehnung betrug ($0,9 \cdot IU_{100}$). Bei dieser Vordehnung zeigten arterielle Gefäße eine optimale Kraftentwicklung. Zur Untersuchung der Stimulierbarkeit der isolierten Gefäße wurde kurzzeitig Krebs-Henseleit-Puffer mit erhöhter Kaliumchlorid-Konzentration in die Kammer eingeleitet.

Krebs-Henseleit-Puffer (KCl 122,7mM)

Substanz	Endkonzentration
KCl	122,7mM
CaCl ₂	2,5mM
MgSO ₄	1,18mM
KH ₂ PO ₄	1,18mM
NaHCO ₃	25mM
EDTA	0,03mM
Glukose	10mM

Stimulierbare Gefäße reagierten auf die erhöhte KCl-Konzentration mit einer isometrischen Kontraktion, die durch die Kraftaufnehmer des Myographen registriert und an ein MacLab/4S-System (AD-Instruments, Castle Hill, Australien) übertragen wurde. Nur stimulierbare Gefäße (entwickelte Wandspannung > 1mN/mm) wurden für die anschließenden Messungen verwendet. In einem weiteren Schritt wurden die Gefäße für 30-60 Minuten equilibriert. Nach der Erholungsphase wurden die Gefäße zur Untersuchung der β -KO-Tiere entweder durch den α_1 -Agonisten Phenylephrin (10 μ M) oder durch das gefäßverengende Prostaglandin F_{2 α} (3 μ M) vorkontrahiert. Nach Erreichen der maximalen Kontraktionsamplitude wurde die Reaktion der Gefäße auf die Zugabe von steigenden Konzentrationen von Isoprenalin, einem β_1 - und β_2 -Rezeptor-Agonisten, untersucht. Bei Verwendung von Prostaglandin F_{2 α} zur Vorkontraktion wurde 15 Minuten vorher Prazosin (0,3 μ M) zur Blockade von α_1 -Rezeptoren zugegeben (Russell et al. 2000), um die Aktivierung α_1 -adrenerger Rezeptoren durch Isoprenalin zu vermeiden. Im Falle einer fehlenden Gefäßrelaxation wurde Forskolin

(1 μ M) zugegeben, welches rezeptorunabhängig die Adenylylcyclase stimulierte und damit zur Erschlaffung eines Gefäßes führte.

Bei den *in vitro* Messungen an Gefäßen von AT₂-KO-Tieren und deren WT-Kontrollen sollte die absolute Spannungsentwicklung von Femoralarterien auf 122,7mM Kaliumchlorid, steigende Konzentrationen von Noradrenalin (1x10⁻⁷M bis 3x10⁻⁵M) und Angiotensin II (1x10⁻⁹M bis 3x10⁻⁷M) im Vergleich untersucht werden. Die Testung auf statistisch signifikante Unterschiede wurde für die Kaliumchlorid-Messung mit einem zweiseitigen t-Test durchgeführt, für den Vergleich der Noradrenalin- und Angiotensin II-Messergebnisse wurde eine zweiseitige Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni´s-Test durchgeführt (GraphPad Software, San Diego, USA).

2.3 In vivo Herzkatheteruntersuchungen

Bei den AT₂-„knockout“- und WT-Mäusen sollten *in vivo* Unterschiede von Blutdruck, Herzfrequenz und Kontraktilität des Herzmuskels untersucht werden. Für diese Messungen stand ein 1,4F Millar-Druckkatheter zur Verfügung (Millar Instruments, Houston, USA). Die Mäuse wurden mit 2,5% Tribromethanol (15 μ l/g Körpergewicht) (Aldrich, Deisenhofen, D) narkotisiert. Hierzu mußte die rechte A. carotis freipräpariert und kanüliert werden. Der Katheter wurde anschließend in Richtung Herz vorgeschoben und währenddessen die Druckverhältnisse in der Aorta von der Drucksonde des Katheters kontinuierlich mit Hilfe eines MacLab/4S-Systems (AD Instruments, Castle Hill, Australien) aufgezeichnet. Nach Passage der Aortenklappe konnten die Druckveränderungen im linken Ventrikel bestimmt werden. Um die Veränderungen unterschiedlicher Kreislaufparameter auf die Gabe von Pharmaka untersuchen zu können, wurde ein venöser Katheter implantiert. Verwendet wurde hierzu ein Polyethylenkatheter (Eppendorf, Hamburg, D), der in die linke freipräparierte V. jugularis eingeführt wurde. Über diesen venösen Zugang wurde in steigenden Dosen Phenylephrin (10 μ g/kg-500 μ g/kg Körpergewicht) über eine Mikroinfusionspumpe (Braun, Melsungen, D) infundiert. Die Dokumentation wurde wiederum mit einem

MacLab-System durchgeführt. Aus den erhobenen Daten konnten sowohl systolischer und diastolischer Blutdruck als auch die Kontraktilität und Relaxation über die Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeiten gemessen werden. Zum Vergleich von WT- und „knockout“-Tieren wurde ein t-Test bzw. eine zweiseitige Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni´s-Test durchgeführt (GraphPad Software, San Diego, USA).

Bei der Untersuchung der α_2 -Rezeptor-KO-Tiere wurde wie eben beschrieben vorgegangen. Es wurden allerdings nur basale Herzkreislaufparameter im linken Ventrikel aufgezeichnet, so die Implantation eines venösen Katheters entfiel. Für die statistische Auswertung wurde hier eine einseitige Varianzanalyse mit anschließendem Dunnett´s-Test verwendet (GraphPad Software, San Diego, USA). Nach Versuchsende wurden die Herzen der Mäuse für histologische Untersuchungen entnommen. Für die anschließende Färbung wurden die Herzen, nachdem sie für mehrere Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert worden waren, im Routine-Labor des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg in Paraffin eingebettet und quer angeschnitten.

2.4 Morphologische Untersuchungen von Gefäßen

Im Anschluß an die *in vivo* und *in vitro* Messungen an AT₂-KO- und WT-Mäusen wurden Femoralarterien morphologisch untersucht. Um bessere Fixierungsbedingungen zu erhalten, wurden die Mäuse zunächst mit 2,5% Tribromethanol (15 µl/g Körpergewicht) (Aldrich, Deisenhofen, D) narkotisiert. Danach wurde die Brusthöhle der Maus eröffnet und über ein kleines Loch in der Herzspitze 4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (pH 7,4) unter konstantem Druck (100mmHg) infundiert. Nach zehn Minuten wurden beide Femoralarterien herauspräpariert, eine halbe Stunde in 4% Paraformaldehyd immersionsfixiert und über Nacht in einer mit Phosphatpuffer gefüllten Petrischale bei 4°C gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Gefäße über eine aufsteigende Ethanolreihe (30%-100%) dehydriert und in ein Propylenoxid-Epon-Gemisch 2:1 (Roth, Karlsruhe, D) eingebettet. Die Gefäße wurden anschließend mit

Material und Methoden

einem Mikrotom in 1µm dünne Scheiben geschnitten und bei 80°C auf einem Objektträger mit 1% Methylblau (Merck, Darmstadt, D) angefärbt, dem 1% Borax (Natriumtetraborat Decahydrat) (Roth, Karlsruhe, D) zugesetzt worden war, und getrocknet. Zur Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger wurde ein Deckglas aufgebracht und dieses mittels Roti®-Histokitt (Roth, Karlsruhe, D) befestigt.

Die gefärbten Gefäße wurden unter einem hochauflösenden Mikroskop (Zeiss IM35, Jena, D) verglichen und jeweils verschiedene Bereiche bei 1575facher Vergrößerung mit einer an das Mikroskop verbundenen Kamera aufgenommen. Die daraus entstandenen Diapositive wurden digitalisiert und mittels geeigneter Software (Adobe Photoshop 4.0) quantifiziert. Der Längenmaßstab der Abb. 7 wurde durch Vergleich mit einem Erythrozyten mit bekanntem Durchmesser von 7,8µm ermittelt.

Neben dem Hauptstamm sollten kleinere Äste der A. femoralis morphologisch untersucht werden. Hierfür wurden, wie zuvor beschrieben, die zu untersuchenden Mäuse zunächst mit 2,5% Tribromethanol narkotisiert und wiederum mit 4% Paraformaldehyd perfusionsfixiert. Daraufhin wurden die Hinterläufe der Tiere im ganzen abgetrennt, der Knochen nach zweitägiger Fixierung in 4% Paraformaldehyd durch einen Längsschnitt vom umliegenden Gewebe herausgeschält und der übriggebliebene Haut-Muskel-Gefäßschlauch wieder zusammengenäht. Dieser Block wurde im Pathologischen Institut der Universität Würzburg in vier unterschiedlichen Ebenen in mehrere 5µm dicke Scheiben geschnitten und anschließend routinemäßig mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt. Die Schnitte wurden anschließend mikroskopiert und die Bilddaten digital über eine an das Mikroskop angeschlossene Videokamera (Leica, Wetzlar, D) auf einen Computer übertragen und anschließend ausgewertet. Es wurden nur solche Gefäße digital fotografiert und ausgewertet, die exakt quer angeschnitten worden waren. Aus den Gefäßquerschnitten wurde anschließend die Fläche der Media, der Mediadurchmesser, Zellkernanzahl und Gefäßinnendurchmesser mit geeigneter Software (Adobe Photoshop 4.0) bestimmt und auf Unterschiede zwischen den AT₂-

KO- und WT-Gefäßen mit dem Programm Prism (GraphPad Software, San Diego, USA) mit einem t-Test statistisch gegeneinander auf signifikante Unterschiede getestet. Als statistisch relevantes Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 angenommen.

2.5 Induktion einer kardialen Hypertrophie durch Aortenstenose

Die Induktion einer Aortenstenose bei Nagern ist seit mehreren Jahren ein anerkanntes Modell, die Adaptionsmechanismen des linken Herzventrikels auf eine künstlich erzeugte Nachlasterhöhung im Blutkreislauf zu untersuchen. Hierzu wurde im Bereich des Aortenbogens zwischen den Abgängen der rechten und linken A. carotis eine künstliche Verengung erzeugt. Die Tiere wurden inhalativ narkotisiert. Als Zugang zum Aortenbogen wurde eine mediane zervikale Inzision gewählt und der Aortenbogen unter Schonung des umliegenden Gewebes dargestellt. Zwischen den Abgängen wurde das Gefäß mit Hilfe einer stumpfen 27G dicken Nadel von außen ligiert, indem diese an das Gefäß angelegt und das Gefäß mit einem 7-0 Nylonfaden eingeengt wurde. Die Nadel wurde anschließend wieder entfernt, so eine Verengung im Gefäß zurückblieb, die etwa dem Nadeldurchmesser entsprach. Anschließend wurde der Brustkorb verschlossen und die Narkose ausgeleitet. Der Großteil (95%) der operierten Mäuse überstand die Operation gut.

Die Aortenstenosen-OP wurde bei vier genetisch unterschiedlichen Mauskollektiven (α_{2A}^- , α_{2B}^- , α_{2C} -KO- und WT-Tiere) durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Operation ungefähr 20g wogen und im Alter von vier Wochen waren. Die Operation wurde von Frau Dienisch aus der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg durchgeführt. Die Tiere wurden einen Tag vor Operationsbeginn in die Medizinische Klinik transferiert und am Tag nach der Operation wieder in das Institut für Pharmakologie zurückgebracht, wobei darauf geachtet wurde, den Transport möglichst schonend durchzuführen, um die operierten Mäuse möglichst wenig zusätzlich zu belasten. In den darauffolgenden zwölf Wochen wurden die Tiere täglich kontrolliert. Sie konnten Nahrung und Wasser in beliebiger Menge zu sich nehmen. Die Herzen der in diesem

Zeitraum verstorbenen Mäuse wurden entnommen und in 4% Paraformaldehyd fixiert. Um die Anpassung des Herz-Kreislauf-Systems auf die Aortenstenose zu untersuchen, wurde am Ende des Beobachtungszeitraums eine Herzkatheteruntersuchung an den unterschiedlichen Kollektiven durchgeführt, wie sie bereits in Kapitel 2.3 methodisch beschrieben wurde.

2.6 Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach Induktion einer Aortenstenose bei WT- und α_2 -KO-Mäusen

Zur Abschätzung, ob es in den 12 Wochen nach der Operation zu Unterschieden in der Sterblichkeit zwischen den verschiedenen Mauskollektiven gekommen war, wurde die Mortalität nach Kaplan-Meier aufgetragen. Hierzu wurde jede Maus nach der Operation als Tag Null in die Statistik aufgenommen. In den darauffolgenden Wochen wurde die Sterblichkeit der einzelnen Mäuse mit dem jeweiligen Tag des Absterbens protokolliert. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurde aus den gesammelten Ergebnissen eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier mit Hilfe des Programms Prism (GraphPad Software, San Diego, USA) erstellt. Aus den erhobenen Ergebnissen konnten statistisch relevante Unterschiede zwischen den Untersuchungskollektiven berechnet werden. Als statistischer Test wurde ein Logrank-Test durchgeführt. Als Nullhypothese wurde eine gleiche Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen den Kollektiven angenommen, die es mittels des zweiseitigen Logrank-Tests auf signifikante Unterschiede zu widerlegen galt. Als statistisch relevantes Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 angenommen.

2.7 Morphologische Untersuchung von Herzen

Um morphologische Veränderungen der Herzarchitektur zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt eine Sirius-Rot-Färbung der Herzen durchgeführt. Die histologischen Schnitte wurden von Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg angefertigt. Das Protokoll für die anschließende Färbung wurde mir

Material und Methoden

freundlicherweise von Dr. Stefan Engelhardt zur Verfügung gestellt. In dieser Färbung wurden Kollagenfasern durch den Farbstoff Sirius-Rot F3B (Sigma, Taufkirchen, D) rot dargestellt. Das Zytoplasma wurde durch die Picrinsäurelösung (Merck, Darmstadt, D) in strahlendem Gelb und die Zellkerne durch die Weigert'sche Lösung in Braun angefärbt. Die verwendeten Färbesubstanzen wurden wie folgt hergestellt:

Sirius-Rot-Lösung

1 Teil 1% Sirius-Rot F3B in Aqua dest.

9 Teile gesättigte Picrinsäurelösung

Weigert'sche Lösung

1Teil 1% Hämatoxin in 100% Ethanol

1 Teil 11,6g Fe(III)-Chlorid/1l 0,1% HCl

Das Protokoll setzte sich aus mehreren Schritten zusammen. Zunächst wurden die Schnitte 10 Minuten in 100% Xylol zur Entfernung des Paraffin eingelegt und anschließend mehrmals in Ethanol getränkt, um das Xylol zu entfernen. Nach einem kurzen Spülen in Aqua dest. wurden die Objektträger für 30 Minuten in Sirius-Rot-Lösung gefärbt. Anschließend wurde nach einem erneuten kurzen Waschvorgang die Kernfärbung mit der Weigert'schen Lösung durchgeführt, bevor nochmals mit Sirius-Rot gegengefärbt wurde. Nun wurden die Objektträger zur Säuberung kurz fünfmal nacheinander in 100% Ethanol getaucht, bevor die Objektträger mit 100% Xylol benetzt wurden. Die Deckgläser wurden durch den Roti[®]-Histo-Kit (Roth, Karlsruhe, D) befestigt. Die gefärbten Objektträger wurden, wie oben bei der Untersuchung der A. femoralis bei AT₂-KO-Mäusen erwähnt, mikroskopiert und photographiert.

2.8 Bestimmung von Plasmakatecholaminen mittels HPLC

Die Konzentration der Katecholamine wurde im Plasma von WT-Mäusen und α_2 -Rezeptor-KO-Tieren bestimmt. In Zusammenarbeit mit Carsten Arnolt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Graefe (Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg) wurden die Plasmaspiegel der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin mittels „High-Performance-Liquid-Chromatography“ (HPLC) bestimmt. Die Mäuse wurden zur Blutgewinnung mit 2,5% Tribromethanol narkotisiert und Blut aus der eröffneten A. carotis mittels heparinisierter Spritzen entnommen und anschließend 5 Minuten bei 10000xg bei 4°C zentrifugiert und das Plasma im Überstand für die Bestimmung der Katecholamine entnommen. Pro Maus konnten zwischen 300µl und 400µl Plasma gewonnen werden. Anschließend wurden zu jeweils 150µl Plasma 30µl Dihydroxybenzylamin als Standard, 300µl Stabilisatormix (1% EDTA, 1,25% Na₂SO₃) und 850µl Aqua dest. zugesetzt und die Proben an Carsten Arnolt übergeben, der die HPLC-Untersuchungen durchführte. Nach Aufbereitung der Proben (2M Tris, pH 8,7) wurden die Katecholamine nach Zugabe von Al₂O₃ über einen Filter (GF52, Schleicher & Schuell, Dassel, D) gereinigt. 175µl-Fractionen des Eluates wurden für die HPLC eingesetzt. Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe Typ 515 (Waters, Eschborn, D), einem automatisierten Injektor WISP 717 (Waters, Eschborn, D) und einem elektrochemischen Detektor (Coulochem II), der an ein Dreifachelektrodensystem angeschlossen war (ESA, Bedford, USA). Die Daten wurden mit einem Millennium 2010 Chromatograph-Manager (Waters, Eschborn, D) ausgewertet. Unter Berücksichtigung des Standards konnten die Plasmakonzentrationen der Katecholamine exakt bestimmt werden. Die Genauigkeit der Messung wurde durch Doppelbestimmungen bestätigt.

Die erhaltenen Meßergebnisse der verschiedenen „knockout“-Kollektive wurden gegenüber den WT-Kontrollwerten auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

Verwandt wurde hierzu eine einseitige Varianzanalyse, gefolgt von einem post-hoc-Test (GraphPad Software, San Diego, USA).

2.9 RNA-Isolierung und RT-Polymerasekettenreaktion zur

Darstellung des AT₂-Rezeptors aus isolierten Femoralarterien

Mittels RT-Polymerasekettenreaktion können kleinste Mengen von mRNA zunächst durch das Enzym reverse Transkriptase (RT) in die entsprechende cDNA umgeschrieben und die erhaltenen DNA-Fragmente anschließend durch eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert werden.

Die Isolation von Gesamt-RNA orientierte sich am Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al. 1987). Femoralarterien wurden nach der Präparation und Zerkleinerung zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert. Jeweils drei Femoralarterienpaare gleichaltriger männlicher Mäuse des gleichen Genotyps wurden zunächst in einem 2ml Glashomogenisator mit 1ml Trizol-Aufschlüsslösung (Gibco, Karlsruhe, D) homogenisiert, in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des in der Aufschlüsslösung enthaltenen Phenols wurden 200µl Chloroform zugegeben und die Proben 15 Sekunden gemischt. Anschließend wurden die Gefäße nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 12000xg zentrifugiert und 500µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die darin gelöste RNA mit 500µl 100% Isopropanol präzipitiert. Nach erneuter Inkubation (10 Minuten) und Zentrifugation (12000xg für 10 Minuten) wurde das am Boden abgesetzte RNA-Pellet mittels 2000µl 75% Ethanol von der Wand abgelöst und erneut zentrifugiert (7500xg für 5 Minuten) und anschließend für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 20 µl Aqua dest. gelöst. Für die reverse Transkription kann die Menge und Reinheit an isolierter RNA photometrisch durch Aufnahme eines Spektrums zwischen 200nm und 340nm bestimmt werden. Zur Bestimmung der isolierten RNA-Menge wurde die Absorption der

Material und Methoden

verdünnten RNA (5µl RNA auf 1000µl Aqua dest.) bei 260nm ermittelt, die dem RNA-Gehalt proportional ist. Ein Absorptionswert von 1,0 entspricht einer RNA-Menge von 40µg/ml. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors konnte so die gesamte isolierte RNA-Menge bestimmt werden. Durch Division der photometrisch bestimmten Absorption bei 260nm und bei 280nm wurde die Reinheit der isolierten RNA überprüft. Es wurde hierzu ein Photometer Typ UV 1601 (Shimadzu, Columbia, USA) verwendet.

Für die reverse Transkription wurde 1µg RNA eingesetzt. Um aus der gelösten Gesamt-RNA, die zuvor photometrisch ermittelt worden war, nur die mRNA zu transkribieren, wurde ein 15bp langer Oligo-d(T)₁₅-Primer verwendet, der sich spezifisch an den Poly(A)-Schwanz am mRNA-3'-Ende anlagert. Hierzu wurden 2µl Oligo-d(T)₁₅ in einem 500µl Eppendorfgefäß vorgelegt, 1µg RNA hinzugegeben und der Reaktionsansatz mittels Aqua dest. auf ein Volumen von 11µl aufgefüllt und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden nach erfolgter Inkubation kurz abzentrifugiert. Danach wurde jedem Reaktionsgefäß 9µl Mastermix zugegeben, der sich wie folgt zusammensetzte:

4 µl 1st Strand-Puffer
2µl DTT
1µl Nukleotide (0,5mM)
0,1µl RNase Inhibitor (0,5U/µl)
1µl reverse Transkriptase (0,5U/µl)
0,9µl Aqua dest.

DTT, 1st Strand-Puffer und Superskript™ reverse Transkriptase wurden von Gibco (Karlsruhe, D) geliefert, der RNase Inhibitor wurde von Promega (Mannheim, D) bezogen. Dieser Ansatz wurde nun 60 Minuten bei 42°C und abschließend erneut bei 70°C für wiederum 10 Minuten inkubiert. Für die folgende PCR wurden dem Reaktionsansatz 50 µl Aqua dest. zugegeben und davon 7µl für die Polymerasekettenreaktion verwendet. Hierfür wurden PCR-Primer eingesetzt, die aus

Material und Methoden

genomischer DNA ein mehr als 2kb langes Stück amplifizieren würden (Tanaka et al. 1999). Aus cDNA aber lässt sich nur ein ca. 1kb großes Stück amplifizieren, da sich zwischen den beiden Primern ein nichtkodierendes Intron befindet, welches während des Transkriptionsvorganges herausgeschnitten wird. Dadurch ist es möglich die mRNA-Expression des AT₂-Rezeptors zu bestimmen. Diese darf nur im WT-Gefäß zu finden sein, da beim „knockout“-Tier keine Expression des Rezeptors mehr möglich ist.

Der PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

- 1µl AT₂-Rezeptor Vorwärts-Primer (0,5µM)
- 1µl AT₂-Rezeptors Rückwärts-Primer (0,5µM)
- 2µl dNTP (0,2mM)
- 2µl 10 X PCR Puffer
- 0,2µl Taq-Polymerase (0,05U/µl)
- 7µl Aqua dest.
- + 7µl genomische cDNA aus reverser Transkription

Die folgende Tabelle zeigt die Sequenzen der verwandten Primer für die RT-PCR auf, die wiederum von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D) bezogen wurden:

Oligo d(T) ₁₅ -Primer	5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'
AT ₂ -Rezeptor Vorwärts-Primer (cDNA 309-328)	5'-GCTGAGTAAGCTGATTTATG-3'
AT ₂ -Rezeptor Rückwärts-Primer (cDNA 2646-2665)	5'-TTAAGACACAAAGGTGTCCA-3'

Die Amplifikation wurde wiederum in einem programmierbaren Thermocycler (Perkin Elmer, Branchburg, USA) nach folgendem Protokoll durchgeführt (40 Zyklen):

Material und Methoden

- 1) Denaturierungsschritt: 94 °C für 15 Sekunden
- 2) Anlagerungsschritt: 55 °C für 30 Sekunden
- 3) Amplifikationsschritt: 72 °C für 75 Sekunden

Dargestellt wurde das amplifizierte Produkt aufgrund seiner Größe von zirka 1200bp in einem 0,8% Agarosegel. Das erzeugte DNA-Produkt konnte wiederum durch den Einsatz von Ethidiumbromid (0,5µg/µl) sichtbar gemacht werden, welches sich in die DNA einlagerte und durch ultraviolettes Licht angeregt wurde. Die Dokumentation wurde mit dem bereits erwähnten E.A.S.Y.Herolab-System (Herolab, Wiesloch, D) durchgeführt.

2.10 Aktivität und Expression der P70S6-Kinase aus Aorten von WT- und AT₂-KO-Mäusen

2.10.1 Protein-Extraktion

Zur Bestimmung zytoplasmatischer Enzyme aus Gefäßen von WT- und AT₂-KO-Tieren mußte zunächst die zytoplasmatische Proteinfraction isoliert werden. Gleichaltrigen Mäusen wurde hierzu nach Tötung durch zervikale Dislokation die Aorta entnommen und in flüssigem N₂ schockgefroren. Zur Isolierung wurden jeweils zwei Aorten eines Genotyps zusammengenommen und zunächst in 500µl Proteinlysepuffer (50mM Tris/HCl (pH 6,7), 2% SDS, 1mM Na₃VO₄) aufgenommen und mittels eines 2ml Glashomogenisators zerkleinert. Vom Lysat wurden 50µl für die anschließende Proteinmengenbestimmung abgenommen. Anschließend wurde den Proben 10µl β-Mercaptoethanol zugesetzt und die Proben 5 Minuten lang geschüttelt. Danach wurde den Proben jeweils 100µl 6% Benzonalösung (Merck, Darmstadt, D) zugesetzt und nach erneutem Schütteln 70µl Laufpuffer (Bromphenolblau in 50% Glycerin) zugesetzt und 10 Minuten bei 60°C inkubiert und abschließend bis zum Immunoblotting bei -20°C tiefgefroren.

2.10.2 Proteinmengen-Bestimmung

Um gleiche Mengen Protein für den anschließenden Immunoblot einsetzen zu können, mußte zunächst die Proteinmenge in den Lysaten bestimmt werden. Proteinmengen wurden mit dem Protein Assay Reagenz BCA (Pierce, Rockford, USA) nach Smith bestimmt (Smith et al. 1985). Die Proteinmenge der Lysate wurde in jeweils 1 ml Reagenz (1:25 in Aqua dest.) photometrisch bei 562nm vermessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

2.10.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese in 1,5mm dicken 5% Sammel- und 10% Trenngelen (Laemmli 1970). Zur Denaturierung der Proteine war bereits bei der Proteinisolierung SDS zugegeben worden. Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 150V für circa 60 Minuten durchgeführt. Sammel- und Trenngel setzten sich wie folgt zusammen:

Sammelgel: 125mM Tris/HCl (pH 6,8)

0,2% (w/v) SDS

5% Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) (Rotiphorese-Gel 30)

pro 3ml: 3µl TEMED; 30µl 10% Ammoniumperoxodisulfat

Trenngel: 375mM Tris/HCl (pH 8,8)

0,4% (w/v) SDS

10% Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) (Rotiphorese-Gel 30)

pro 7,5ml: 3,75µl TEMED; 50µl 10% Ammoniumperoxodisulfat

Pro Spur wurden jeweils 40µg Protein aufgetragen. Als Standard wurde eine 10kDa Protein-Größenmarker (Gibco, Karlsruhe, D) verwendet.

2.10.4 Immunoblotting

Nach erfolgter Auftrennung im Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran mit Hilfe einer Biorad-Naßblotapparatur (Biorad, Hercules, USA) transferiert. Vor dem Gebrauch der wasserabweisenden PVDF-Membranen (Millipore, Bedford, USA) wurden diese in Methanol getränkt. Die Membranen wurden auf der Anode zugewandten Seite des Gels aufgelegt und das Gel mit PVDF-Membran anschließend zwischen mit Transferpuffer (25mM Tris, 150mM Glycin, 10% Methanol, pH 8,3) getränkte Whatmann 3MM-Filterpapier gelegt und in die Biorad-Transferapparatur (Biorad, Hercules, USA) gespannt. Der eigentliche Transfer wurde bei 300mA für 1,5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen mit 0,2% PonceauS-Lösung (Serva, Heidelberg, D) reversibel angefärbt, das anschließend wieder durch PBS-Puffer (140mM NaCl, 30mM KCl, 65mM Na₂HPO₄, 15mM KH₂PO₄) abgewaschen wurde. Die PVDF-Membranen wurden danach zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen 2 Stunden in PBS-Puffer, dem 2% (w/v) Magermilchpulver zugesetzt worden war, inkubiert.

Anschließend wurden die Membranen mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde der jeweilige primäre Antikörper zugegeben und die Membranen über Nacht im Kühlraum inkubiert. Als primäre Antikörper wurden in folgender Verdünnung verwendet:

Phospho-P70S6-Kinase-AK (1:500, New England BioLabs, Beverly, USA)

P70S6-Kinase-AK (1:400, Santa Cruz Biotechnology, Beverly, USA)

β-Actin-AK (1:1000, Sigma, Deisenhofen, D)

Material und Methoden

Die Membranen wurden mehrmals gewaschen (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 0,2% NP40, 0,25% BSA) und daraufhin mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten, sekundären Antikörper (anti-Kaninchen-IgG, 1:10000) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde mit Hilfe des SuperSignal®West Pico Chemolumineszenz-Detektions-Kitt (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Die Chemolumineszenz wurde durch aufgelegte Röntgenfilme sichtbar gemacht. Im Anschluß an die Detektion des ersten primären Antikörpers wurde die Reaktion für die beiden anderen primären Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden die gebundenen Antikörper durch die Inkubation von 100 mM Glycin (pH 2,5) für 60 Sekunden von den Membranen entfernt, so die Reaktion erneut mit den gleichen PDFV-Membranen wiederholt werden konnte. Zur Auswertung wurden die Intensitäten der gewonnenen Banden mit geeigneter Software (Adobe Photoshop 4.0) bestimmt. Als statistischer Test zum Vergleich von „knockout“- und WT-Signalen wurde ein zweiseitiger t-Test gewählt (GraphPad Software, San Diego, USA).

2.11 Statistik

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden als arithmetische Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler in den einzelnen Abbildungen dargestellt. Signifikanzangaben beziehen sich auf Unterschiede zwischen „knockout“-Tieren und den dazugehörigen WT-Kontrollen. Unterschiede eines Einzelparameters zwischen einer „knockout“-Linie und den entsprechenden WT-Kontrolltieren wurden mit einem zweiseitigen Student-t-Test verglichen. Zur statistischen Berechnung von mehr als zwei Untersuchungskollektiven wurde eine einseitige Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit einem anschließenden post-hoc-Test (Dunnett´s-Test) durchgeführt. Wurden allerdings mehr als zwei Parameter zwischen den Untersuchungskollektiven in die statistischen Berechnungen einbezogen, musste eine zweiseitige Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit entsprechendem post-hoc-Test (Bonferroni´s-Test) durchgeführt werden. Die Mortalitätskurve wurde nach Kaplan-Meier aufgetragen und zur Testung

Material und Methoden

auf statistische Signifikanz wurde ein zweiseitiger Logrank-Test verwendet (GraphPad Software, San Diego, USA). Für alle statistischen Tests wurde als statistisch relevantes Signifikanzniveau ein p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen. In den einzelnen Legenden der Abbildungen sind jeweils die Größe des Untersuchungskollektivs und der zur statistischen Berechnung verwendete Test angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Kardiovaskuläre Funktion des AT₂-Rezeptors

3.1.1 Genotypisierung der AT₂-Knockouttiere

Am Beginn der Untersuchung der AT₂-„knockout“-Tiere (AT₂-KO) und ihrer Wildtypkontrollen (WT) stand die Genotypisierung. In Abb. 3 ist die Strategie zur Genotypisierung von AT₂-KO und WT-Tieren schematisch dargestellt.

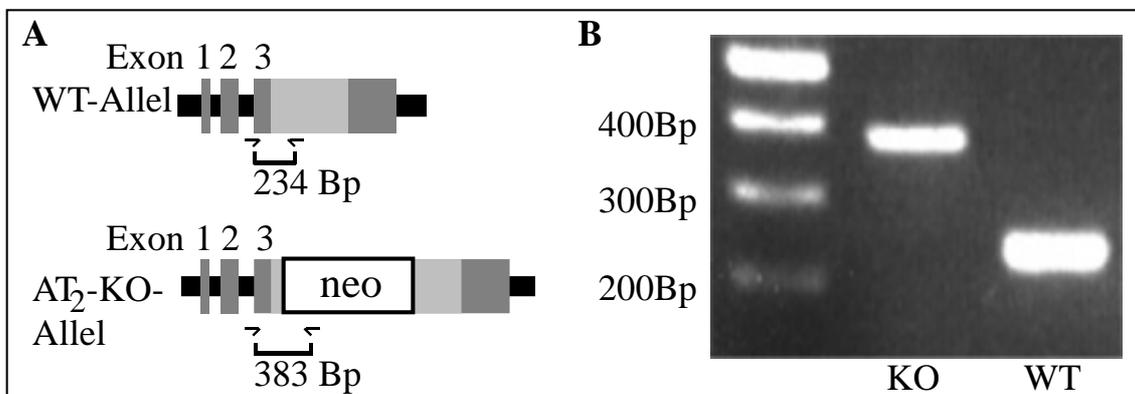


Abbildung 3: Genotypisierung des Angiotensin II AT₂-KO per PCR. A) Schematische Darstellung des normalen (Wildtyp)-Allels des AT₂-Rezeptorgens und des AT₂-KO-Allels. Ein Teil der kodierenden Sequenz des AT₂-Rezeptors (hellgrau) wurde im Knockout durch eine Neomycin-Resistenzkassette (neo) ersetzt, so dass durch spezifische Primerpaare (Pfeile) WT- und KO-Allele durch die Polymerasekettenreaktion aus genomischer DNA dargestellt werden konnten. B) Ergebnis einer PCR-Reaktion aus genomischer DNA. Dargestellt sind die spezifischen WT- und AT₂-KO-PCR-Produkte in einem 2% Agarosegel. Zur exakten Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde als Standard eine 100bp-Leiter verwendet.

Durch die Auswahl geeigneter Primer, wie in Abb. 3 zu sehen ist, konnten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion WT- und AT₂-KO-Tiere sicher identifiziert werden. Da die Größe der PCR-Produkte für WT- und AT₂-KO-Allele unterschiedlich ist (234 vs. 383 Basenpaare), wurde ein gemeinsamer Ansatz mit drei Primern gewählt, der die Genotypisierung der DNA-Proben in einer einzigen Reaktion ermöglichte. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, die aus

der Verpaarung von heterozygoten AT₂-KO-Weibchen mit WT-Männchen gewonnen wurden.

3.1.2 In vivo Hämodynamik bei AT₂-KO-Mäusen

Nach erfolgter Genotypisierung wurde in vivo die Herz-Kreislauf-Funktion von AT₂-KO-Mäusen und ihren WT-Geschwistertieren gemessen und miteinander verglichen. Bisher war bekannt, dass die AT₂-KO-Tiere auf die Infusion von Angiotensin II mit einer stärkeren Blutdrucksteigerung reagierten als normale WT-Kontrollen (Hein et al. 1995; Ichiki et al. 1995). Nun sollte geklärt werden, ob dieser Effekt durch eine veränderte kardiale Funktion oder durch einen vaskulären Effekt der AT₂-Rezeptordeletion bedingt wurde. Außerdem sollte untersucht werden, ob die gesteigerte Blutdruckempfindlichkeit in vivo auf Angiotensin II beschränkt ist, oder ob dieser Effekt auch durch andere Pharmaka ausgelöst werden kann. Die Mäuse wurden hierzu in Narkose versetzt und ein Herzkatheter über die rechte A. carotis eingeführt, der je nach Position des Drucksensors sowohl kontinuierliche Messungen des systolischen und diastolischen Drucks in der Aorta als auch der Herzfrequenz und der Druckveränderungen im linken Ventrikel ermöglichte. Abb. 4 zeigt die basalen Herz-Kreislauf-Parameter von zehn Monate alten WT- und AT₂-KO-Tieren. Es konnten keine Unterschiede von Seiten der linksventrikulären Kontraktilität (dp/dt_{max}), der Herzfrequenz und des systolischen Blutdrucks zwischen AT₂-KO- und WT-Tieren gefunden werden.

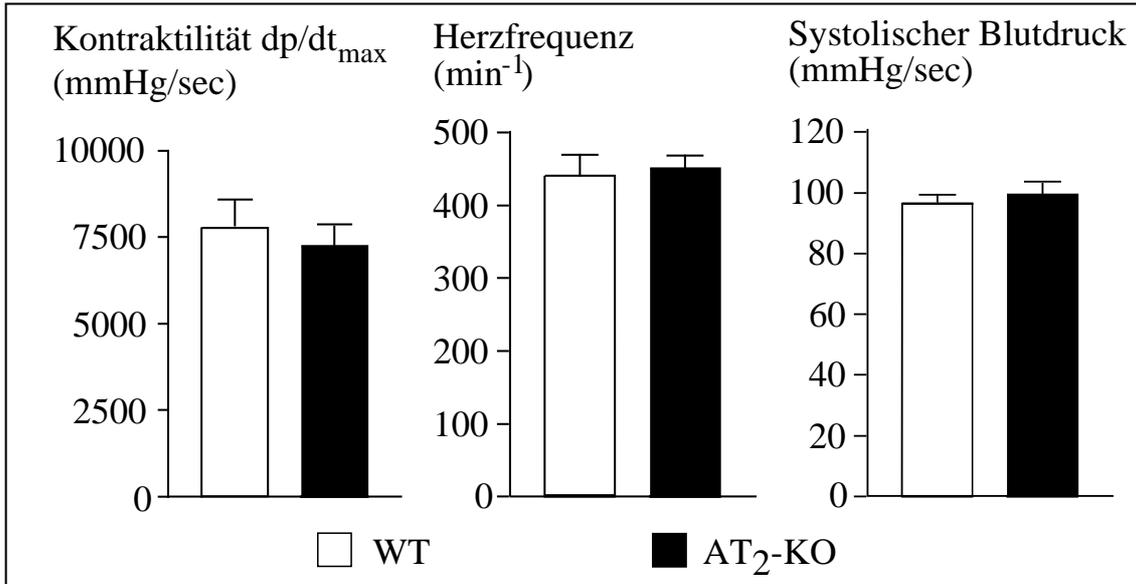


Abbildung 4: Herzkatheteruntersuchungen durch einen 1,4F Millar-Herzkatheter an AT₂-KO und Kontrollmäusen. Dargestellt sind basale Herz-Kreislauf-Parameter (linksventrikuläre Kontraktilität dp/dt_{max}, Herzfrequenz und systolischer Blutdruck) von Wildtyp (WT) und „knockout“-Tieren (AT₂-KO) (n=5, Alter 10 Monate, t-Test, kein signifikanter Unterschied).

Allerdings zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen AT₂-KO- und Wildtyp-tieren, wenn der Effekt des α_1 -adrenergen Agonisten Phenylephrin auf den Aortendruck gemessen wurde. Infundierte man den Tieren in steigender Dosis Phenylephrin (Abb. 5), so zeigten die „knockout“-Tiere einen deutlich verstärkten Anstieg des systolischen und des diastolischen Blutdrucks im Vergleich zu ihren Geschwisterwildtyp-tieren.

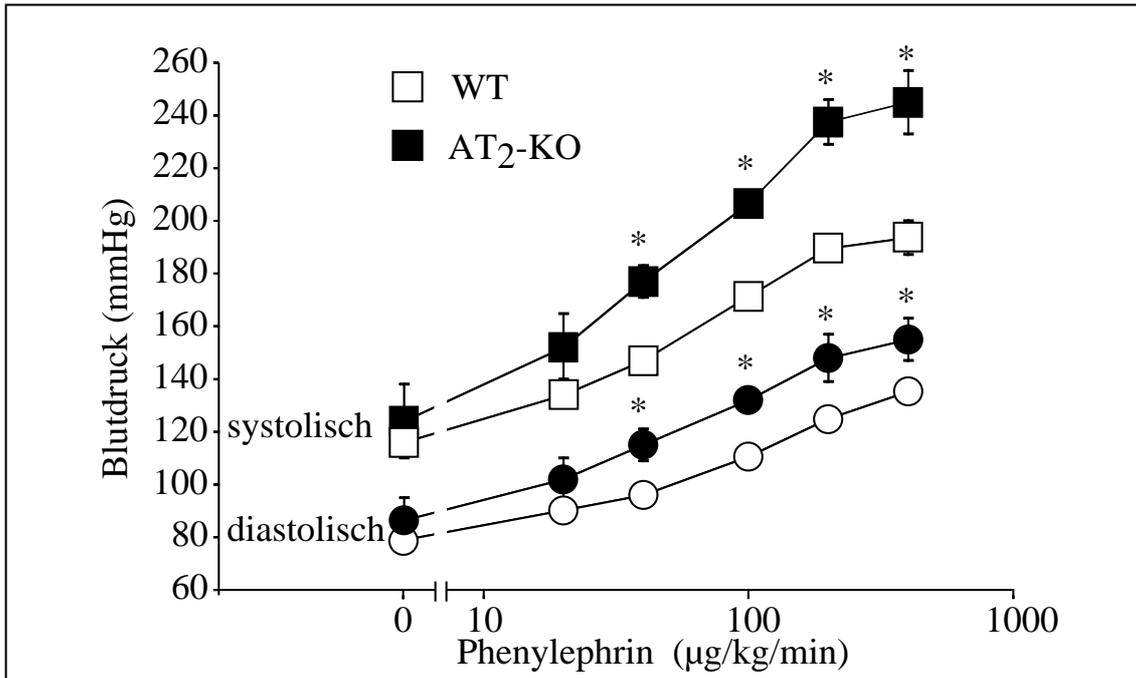


Abbildung 5: In vivo Blutdruck-Untersuchungen an Wildtyp- und AT₂-KO-Tieren. Infundiert wurden steigende Mengen von Phenylephrin, einem peripheren α_1 Rezeptoragonisten. Die Messungen wurden an narkotisierten Tieren durchgeführt, denen ein 1,4F Herzkatheter über die rechte A. carotis in die Aorta eingeführt wurde (n=5, Alter 10 Monate, two-way ANOVA und Bonferroni's-Test, *p≤0,05).

3.1.3 Funktion isolierter Blutgefäße von AT₂-KO-Mäusen

Um zu überprüfen, ob diese in vivo zu beobachtende Überempfindlichkeit des Blutdruckes von AT₂-KO-Tieren auf eine veränderte vaskuläre Funktion bei diesen Tieren zurückzuführen war, wurden isolierte Gefäßsegmente in einem Gefäßmyographen funktionell untersucht. Als geeignetes Gefäß wurde die A. femoralis gewählt, die entweder durch 122,7mM K⁺, welches durch Depolarisation zu einer Vasokonstriktion führt, durch Angiotensin II oder durch Noradrenalin stimuliert wurde. Das Ergebnis war eindeutig. Die AT₂-KO-Gefäße zeigten auf alle drei Substanzen eine verstärkte Spannungsentwicklung im Vergleich zu den WT-Gefäßen (Abb. 6)

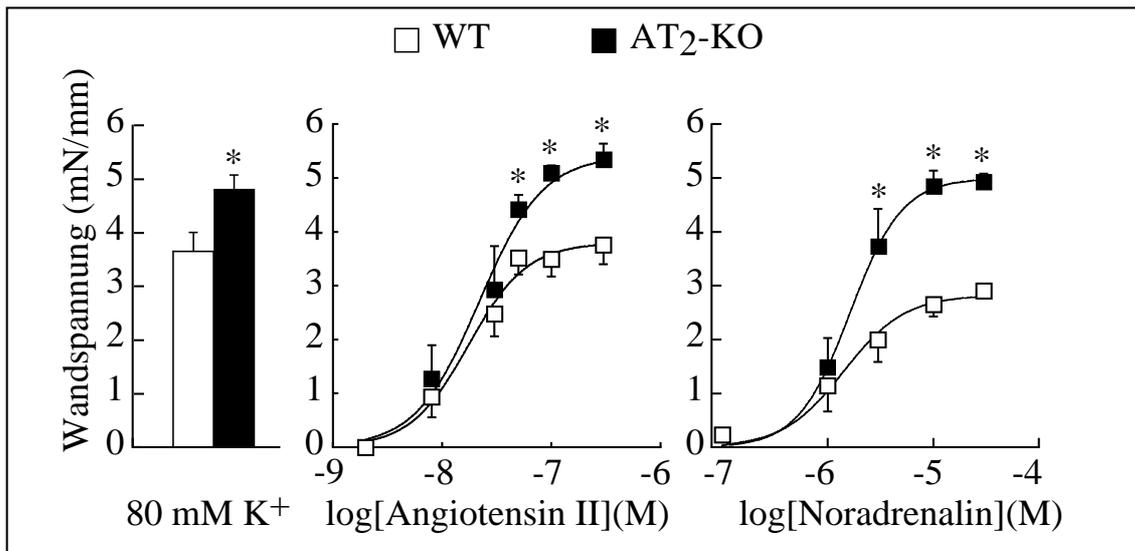


Abbildung 6: In vitro Untersuchungen an Femoralarterien in einem Mulvany-Myographen. AT_2 -KO- und Wildtypgefäße wurden nacheinander auf ihre maximale Spannungsentwicklung durch 80mM K^+ (t-Test, $*p \leq 0,05$), steigende Konzentrationen von Angiotensin II und Noradrenalin getestet (two-way ANOVA und Bonferroni's-Test, $*p \leq 0,05$).

3.1.4 Morphologische Untersuchung von Femoralarterien der AT_2 -KO-Tiere

Die gesteigerte Vasokonstriktion bei AT_2 -KO-Tieren auf die Gabe verschiedener Vasokonstriktoren legte die Vermutung nahe, dass bei AT_2 -KO nicht eine selektive Veränderung der intrazellulären Signaltransduktion sondern möglicherweise eine strukturelle Veränderung der Blutgefäße vorliegt. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Tiere mit 4% Paraformaldehyd bei einem konstanten Druck von 100 mmHg perfundiert, die Femoralarterien entnommen und in Kunststoff eingebettet. Abb. 7 zeigt exemplarisch zwei Semidünnschnitte proximaler Femoralarterien korrespondierender Wildtyp- und AT_2 -„knockout“-Tiere. Es fiel eine deutliche Verdickung der Gefäßmedia bei den AT_2 -KO-Tieren auf, die bei näherer Betrachtung durch eine massive Größenzunahme der einzelnen glatten Gefäßmuskelzellen erklärt werden kann, die im Vergleich zu den Wildtypzellen fast die doppelte Größe aufwiesen. Von Seiten der Intima und Adventitia fielen keine Veränderungen bei den AT_2 -KO-Tieren auf. Dieser Befund konnte in mehreren Femoralarterien von unterschiedlichen AT_2 -KO-Mäusen gleichen Alters gefunden werden.

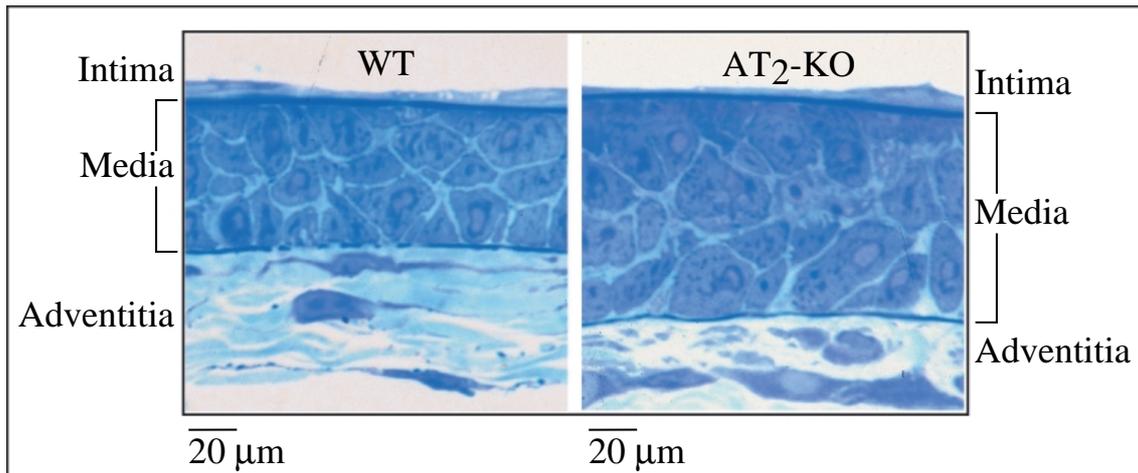


Abbildung 7: Längsschnitte durch die Wand der Femoralarterien von Wildtyp (WT)- und AT₂-„knockout“-Tieren (AT₂-KO). Von oben nach unten sind Intima, Media und Adventitia angeschnitten.

Die Verbreiterung der Media von AT₂-KO-Gefäßen beruhte auf einer Zunahme der Mediazellgröße (Hypertrophie) und nicht auf einer Vermehrung der Zellzahl der Media. Weiterhin galt es zu klären, ob sich diese morphologischen Veränderungen auch in noch kleineren Gefäßen wiederfinden lassen. Hierzu wurden kleine Seitenäste der Femoralarterien genauer histologisch untersucht. Insgesamt wurden 42 Wildtyp und 52 AT₂-KO-Gefäße von jeweils drei AT₂-KO-Mäusen und drei WT-Kontrolltieren in die Auswertung aufgenommen, die zum einen exakt quer angeschnitten worden waren und zum anderen annähernd den gleichen Außendurchmesser besaßen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Bestimmung der Mediadicke und des jeweiligen Gefäßlumens gelegt. Um zu testen, ob die beobachteten Veränderungen auf einer Hypertrophie oder Hyperplasie der glatten Muskelzellen in der Media beruhen, wurde die Anzahl der Zellkerne im Gefäßanschnitt auf die Mediafläche bezogen. Die Zahl der Kerne pro Gefäßquerschnitt war nicht signifikant verschieden zwischen AT₂-KO-Tieren und deren Kontrollen. Als eindeutiges Zeichen der Muskelzellhypertrophie war die Mediafläche pro Zellkern bei den AT₂-KO-Tieren erhöht (Tab. 4). Wäre es hingegen zu einer Hyperplasie der Gefäßmuskelzellen gekommen, hätte sich der Quotient aus Mediafläche und Zellkernanzahl nicht verändern dürfen.

Morphometrie kleiner Femoralarterien	WT (n=42)	AT₂-KO (n=52)
Äußerer Gefäßdurchmesser (µm)	77,4 ± 4,7	77,9 ± 4,2
Gefäßlumendurchmesser (µm)	53,1 ± 4,3	47,5 ± 3,6
Media-Dicke (µm)	12,1 ± 0,4	15,2 ± 0,6 *
Media/Lumendurchmesser (%)	22,8 ± 0,8	31,9 ± 1,3 *
Mediafläche/Nukleus (µm ²)	586 ± 41	1065 ± 91 *

Tabelle 4: Morphologischer Vergleich zwischen Wildtyp- und AT₂-Knockout-Gefäßen kleiner Seitenäste von Femoralarterien (t-Test, *p≤0,05) (n=42 bzw. 52 von jeweils drei AT₂-KO-Mäusen und drei WT-Tieren).

3.1.5 Expression des AT₂-Rezeptors in Femoralarterien

Da sich der Phänotyp in Femoralarterien manifestiert hatte, sollte mittels RT-PCR überprüft werden, ob der AT₂-Rezeptor in WT-Arterien, nicht aber in AT₂-KO-Arterien exprimiert wird. Da die maximal extrahierbare RNA-Menge einer einzelnen A. femoralis zu gering war, um mit den mir zur Verfügung stehenden Geräten ein Signal zu detektieren, wurden jeweils drei Femoralarterienpaare zusammen genommen und daraus die RNA isoliert. Hiervon wurde jeweils 1µg RNA für die reverse Transkription mit Oligo-d(T)₁₅-Primern verwendet und die AT₂-Rezeptor-mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend die gewonnene AT₂-Rezeptor-cDNA durch eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Abb. 8 zeigt, dass in Femoralarterien von WT-Kontrolltieren auf mRNA-Ebene eine deutliche Expression des AT₂-Rezeptors nachgewiesen werden konnte, die erwartungsgemäß in Femoralarterien von AT₂-KO-Tieren nicht zu detektieren war. Da sich zwischen Exon 2 und Exon 3 des AT₂-Rezeptorgens, aus dessen Bereich die spezifischen Primer für die RT-PCR gewählt worden waren, ein circa 1000bp großes Intron befindet, das während der mRNA-Prozessierung entfernt wird, kann das 1,2kb große PCR-Produkt eindeutig der mRNA

des AT₂-Rezeptors zugewiesen werden (Abb. 8). Als Negativkontrolle wurde anstelle von RNA Wasser in der Reaktion eingesetzt.

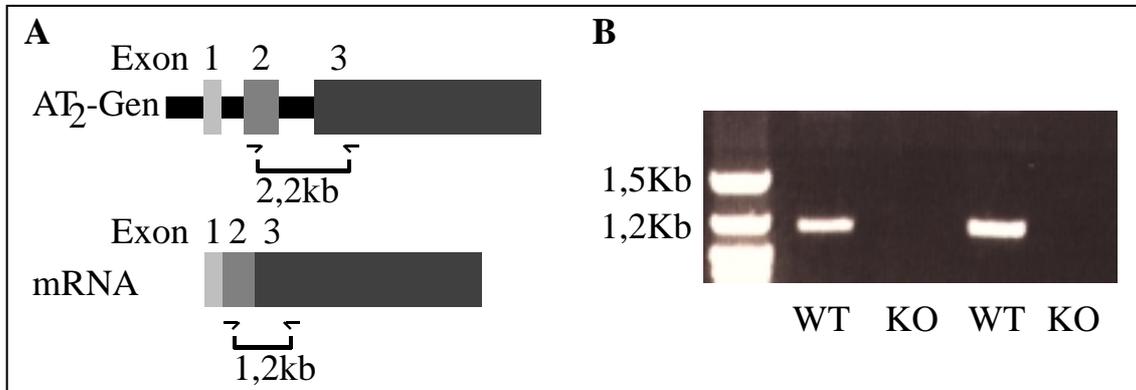


Abbildung 8: A) Schematische Darstellung der Amplifikation von AT₂-Rezeptor-mRNA durch RT-PCR. Da sich die genomische DNA (AT₂-Gen) von der mRNA durch zusätzliche Introns auszeichnet, ist das cDNA-Produkt der PCR um ca. 1000 Basenpaare kürzer als das Produkt der genomischen Amplifikation. B) RT-PCR des Angiotensin II AT₂-Rezeptors in Femoralarterien. In den Bahnen 2 und 4 wurden Wildtyp-RNA (WT), in den Bahnen 3 und 5 AT₂-Knockout-RNA (KO) revers transkribiert und das PCR-Produkt in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt und sichtbar gemacht. In Bahn 1 wurde ein Größenmarker aufgetragen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass in Femoralarterien der Maus der Angiotensin II AT₂-Rezeptor auf mRNA-Ebene exprimiert wird. Eine quantitative Aussage war aus diesem Versuch nicht möglich. Außerdem ließ sich anhand der RT-PCR nicht klären, ob es sich um eine Expression in endothelialen, glattmuskulären oder mesenchymalen Zellen handelt. Ein direkter Nachweis der AT₂-Rezeptoren durch Radioligand-Bindungsversuche war leider nicht möglich, da die aus den Femoralarterien gewonnenen Membranproteinmengen zu gering waren.

3.1.6 Aktivität und Expression der P70S6-Kinase in Aorten von WT- und AT₂-KO-Tieren

Um einen molekularen Mechanismus für die vaskuläre Hypertrophie zu finden, wurden Aorten von WT- und AT₂-KO-Tieren auf Veränderungen der Signaltransduktion hin untersucht. Als ein geeigneter Kandidat wurde die P70S6-Kinase ausgewählt, die sich

bereits bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie als eines der Schlüsselenzyme erwiesen hat (Sadoshima et al. 1995) und auch im glatten Gefäßmuskel an der Regulation der Proteinsynthese (Yamakawa et al. 2000) maßgeblich beteiligt ist. Hierzu wurde Zellprotein aus der Aorta von WT- und AT₂-KO-Mäusen im Alter von 3-4 Monaten isoliert. Es sollten Veränderungen der Signaltransduktion detektiert werden, die den morphologischen Veränderungen im Gefäß vorausgehen. Als geeignetes Gefäß wurde die Aorta gewählt, da die aus Femoralarterien zu isolierende Proteinmenge für den Immunoblot zu gering war. Aus Untersuchungen, die in dieser Arbeit nicht beschrieben werden, war es ebenso zu einer signifikanten Zunahme der Mediafläche in Aorten gekommen, so dass mir für die Untersuchungen der Signaltransduktion dieses Gefäß optimal erschien. Verglichen wurden jeweils Aorten von 6 WT- und 6 AT₂-KO-Geschwistertieren. Für den Immunoblot wurden jeweils 40µg Protein eingesetzt, das aus jeweils zwei Aorten isoliert worden war. Zur Aktivierung der P70S6-Kinase muß diese an mehreren Stellen phosphoryliert werden (Dufner et al. 1999). Es wurde ein Antikörper eingesetzt (p-P70S6), der spezifisch die an Threonin⁴²¹ und Serin⁴²⁴ phosphorylierte Form der P70S6-Kinase erkennt. Es konnte so eine Aussage über die Aktivität der P70S6-Kinase getroffen werden. Als Maß für die Expression des Enzyms wurde ein konventioneller P70S6-Kinase-Antikörper eingesetzt (P70S6). Als Standard diente β-Aktin. Die Immunoblots wurden jeweils sechsmal unabhängig wiederholt und die Intensitätsunterschiede der detektierten spezifischen Signale ausgewertet. Abb. 9 zeigt drei repräsentative Immunoblots mit Antikörpern gegen p-P70S6-Kinase, P70S6-Kinase und β-Aktin sowie die Auswertung der Intensitätsunterschiede von sechs unabhängig durchgeführten Immunoblots.

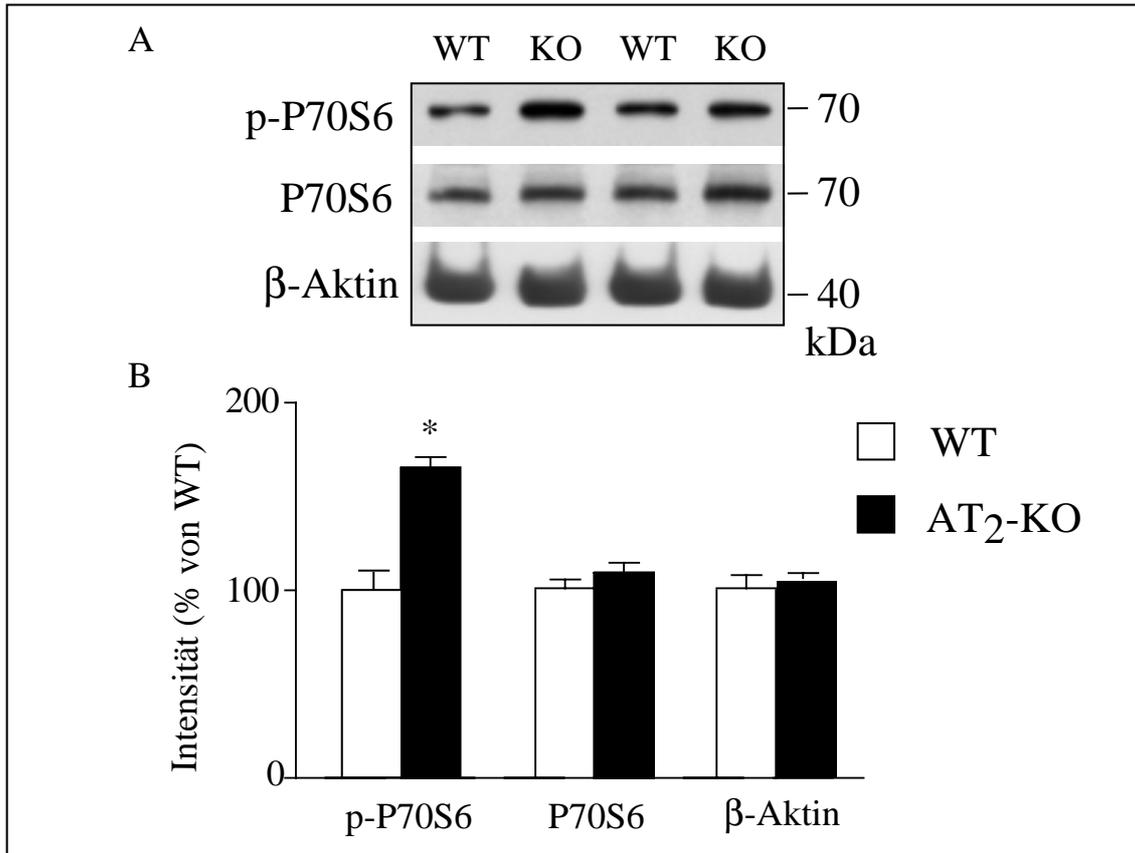


Abbildung 9: A) Expression und Aktivität der P70S6-Kinase aus Aortenlysaten von 4 Monate alten Wildtyp (WT)- und AT₂-KO-Mäusen. Dargestellt sind repräsentative Immunoblots mit Antikörpern gegen pP70S6-Kinase (pP70S6), P70S6-Kinase (P70S6) und als Kontrolle gegen β -Aktin. B) Quantitative Auswertung von sechs unabhängig durchgeführten Immunoblots (n=6). (t-Test, *p<0,05).

Es konnte eine statistisch signifikante Zunahme der Aktivität der P70S6-Kinase (p-P70S6) in den Aortenlysaten der AT₂-KO-Jungtiere um 66% gefunden werden. Da auch die Gesamtintensität des p70S6-Kinase-Signals (P70S6) als Ausdruck der Expression der Kinase bei den AT₂-KO-Tieren beim Vergleich der Mittelwerte minimal erhöht (10%) war, wurde abschließend der Unterschied zwischen pP70S6-Kinase und P70S6-Kinase der AT₂-KO-Lysate auf statistische Signifikanz getestet (t-Test). Auch hier war die Zunahme der pP70S6-Kinase gegenüber der P70S6-Kinase signifikant erhöht. Das β -Aktin-Kontroll-Signal war zwischen den beiden Kollektiven gleich, was bewies, dass pro Spur eine gleich große Menge an Protein aufgetragen worden war, unter der Annahme, dass die Expression von β -Aktin zwischen AT₂-KO und WT unverändert war.

3.2 Gefäßrelaxation durch β -adrenerge Rezeptorsubtypen

Um die Subtypen β -adrenerger Rezeptoren zu untersuchen, die bei der Maus die Vasodilatation vermitteln, wurden kurze Segmente arterieller und venöser Gefäße von Wildtyp- und „knockout“-Tieren präpariert und in einem Gefäßmyographen untersucht. In Voruntersuchungen hatte A. Chruscinski an diesem System gezeigt, dass die durch Isoprenalin ausgelöste Vasodilatation bei β_2 -KO-Gefäßen ebenso ausgeprägt war wie bei Kontrollgefäßen aus Wildtyp-Tieren. Um zu untersuchen, ob tatsächlich der β_1 -adrenerge Rezeptor die überragende Rolle bei der Isoprenalin-vermittelten Vasodilatation spielt, wurden Gefäße von β_1 -KO-Tieren in die Untersuchungen miteinbezogen und direkt mit Gefäßen von β_2 -KO und von $\beta_1\beta_2$ -KO-Tieren verglichen. Dazu wurden zwei 40 μ m dünne Drähte unter einer Stereolupe in die Gefäßsegmente eingeführt und zwischen einem Kraftaufnehmer und einem Mikrometer-Schrittmotor befestigt. Nachdem die Gefäße auf eine Vordehnung eingestellt worden waren, bei der der innere Umfang 90% der bei 100mmHg gemessenen Vordehnung betrug (0,9* IU₁₀₀), wurden die einzelnen Gefäße mit verschiedenen Vasokonstringentien stimuliert. Bei allen untersuchten Gefäßen war die maximale Wandspannung, die durch K⁺-Depolarisation bzw. durch Stimulation mit Phenylephrin oder Prostaglandin F_{2 α} erreicht wurde, bei Wildtyp- und KO-Tieren identisch. Nach Vasokonstriktion mit Phenylephrin oder Prostaglandin F_{2 α} konnte bei allen WT-Gefäßen eine Vasodilatation durch Isoprenalin ausgelöst werden. Bei der Femoralarterie senkte Isoprenalin den Tonus auf 55% des Ausgangswertes, bei Pulmonalarterien auf 21%, und bei Carotisarterien wurden 51% erreicht. Bei Gefäßen von β_1 -KO-Tieren war der relaxierende Effekt von Isoprenalin deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 10-12). Bei Gefäßen von $\beta_1\beta_2$ -KO-Tieren konnte Isoprenalin keine signifikante Vasodilatation auslösen.

Überraschenderweise wurde die Relaxation der A. femoralis und der A. pulmonalis nahezu ausschließlich durch den β_1 -adrenergen Rezeptor vermittelt. Bei Femoralarterien und Pulmonalarterien von β_2 -KO-Tieren war der vasodilatierende Effekt von

Isoprenalin nicht von der Wirkung an WT-Gefäßen unterscheidbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Vasodilatation in diesen Gefäßen vor allem durch den β_1 -Subtyp vermittelt wird. Entsprechend sind in β_1 -KO- und $\beta_1\beta_2$ -KO-Gefäßen keine Relaxationen durch Isoprenalin mehr auszulösen.

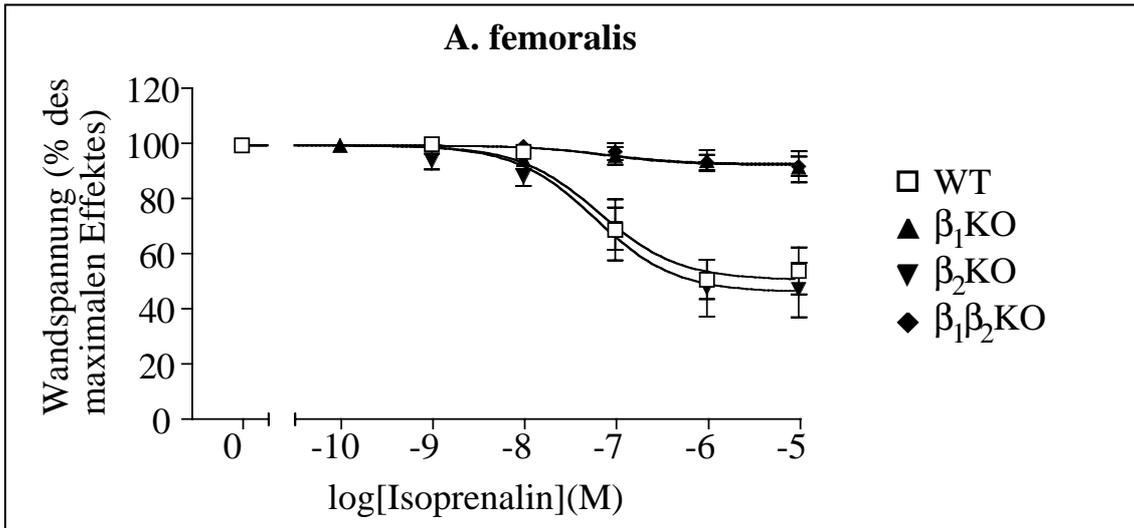


Abbildung 10: Relaxation von Gefäßsegmenten der A. femoralis durch Isoprenalin. 2mm lange Segmente der A. femoralis wurden im Gefäßmyographen vorgedehnt und mit $10\mu\text{M}$ Phenylephrin stimuliert. Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums (Wandspannung 100%) wurde Isoprenalin dem Organbad in steigenden Konzentrationen zugegeben und die Relaxation des Gefäßes gemessen. Dargestellt sind Ergebnisse für 5-13 Segmente von Wildtyp-Tieren (WT), β_1 -KO-, β_2 -KO- und $\beta_1\beta_2$ -KO-Tieren.

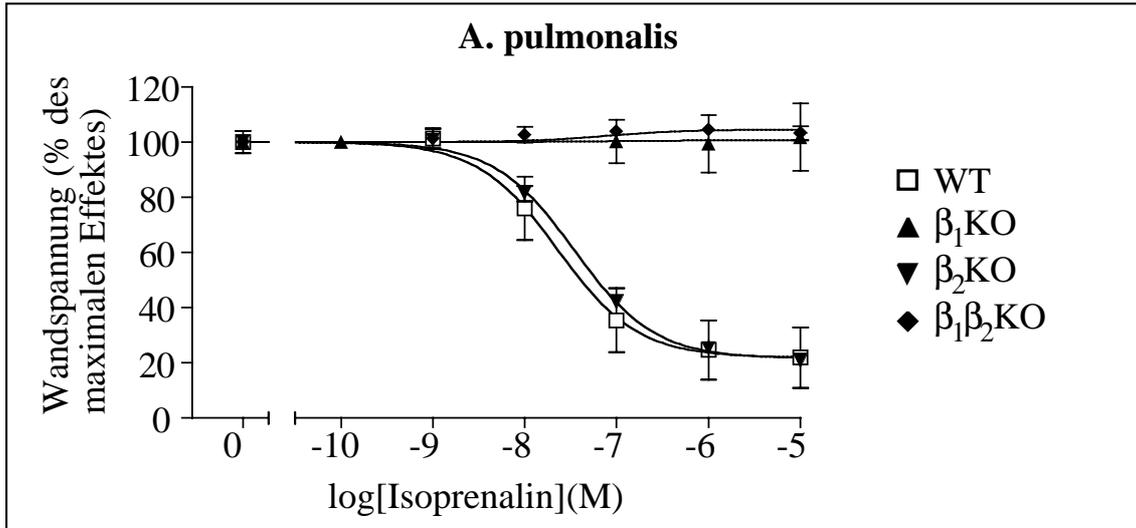


Abbildung 11: Relaxation isolierter Segmente der A. pulmonalis von Wildtyp- und β -adrenergen Rezeptor-KO-Tieren durch Isoprenalin. Die GefäÙe wurden in vitro mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3\mu\text{M}$) isometrisch kontrahiert und die Relaxation wurde daraufhin mit Isoprenalin in steigenden Konzentrationen ausgelöst. Dargestellt sind die Ergebnisse von mindestens drei ($n \geq 3$) GefäÙsegmenten von Wildtyp und verschiedenen β -KO-Mäusen.

Bei der A. carotis war ebenfalls der β_1 -adrenerge Rezeptor für den Großteil der Relaxation verantwortlich, doch war hier auch eine deutliche Beteiligung des β_2 -adrenergen Rezeptors nachzuweisen.

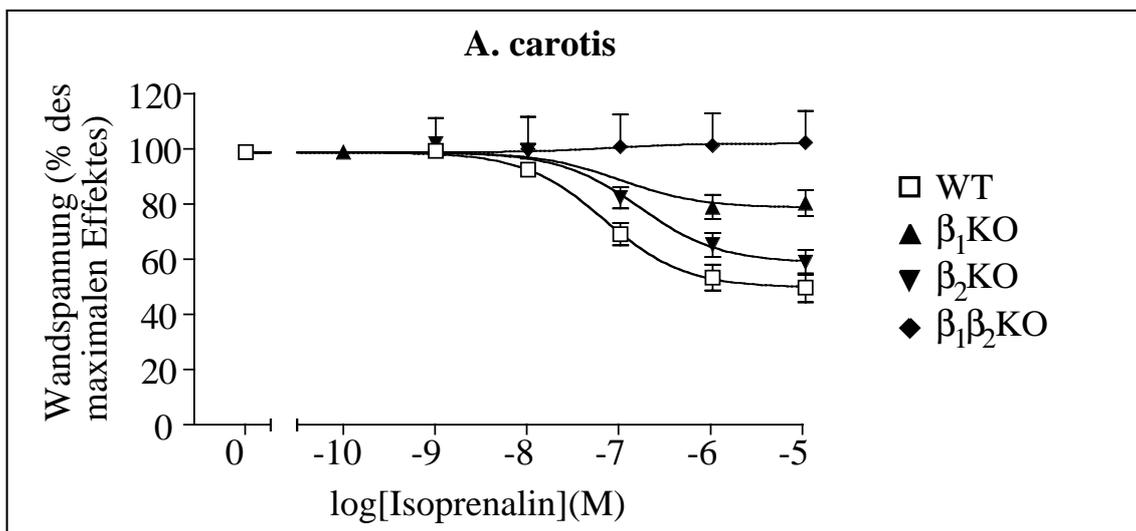


Abbildung 12: Relaxation von GefäÙsegmenten der A. carotis von Wildtyp (WT)- und β -adrenergen Rezeptor-KO-Mäusen. Die GefäÙsegmente wurden mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3\mu\text{M}$) isometrisch kontrahiert und Isoprenalin in steigenden Konzentrationen in das Organbad zugegeben. Gemessen wurde wiederum die Relaxation durch steigende Mengen Isoprenalin. Untersucht wurden jeweils zwischen 4-8 Segmente von Wildtyp (WT), β_1 -KO-, β_2 -KO- und $\beta_1\beta_2$ -KO-GefäÙen.

Zusätzlich wurden venöse Gefäße in die Untersuchungen einbezogen. Bereits bei den Voruntersuchungen von A. Chruscinski war aufgefallen, dass von Seiten der venösen Gefäße bei WT-Mäusen nur die V. portae auf die Zugabe von Isoprenalin relaxierte. Deshalb wurde die V. portae als einziges venöses Gefäß für die Messungen an den verschiedenen β -KO-Mäusen und WT-Kontrolltieren herangezogen. Bei der V. portae führte die Stimulation mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ zu einer Vasokonstriktion mit einem Anstieg des Basaltonus und zu rhythmischen Kontraktionen der Gefäßsegmente (Abb. 13). Sowohl Basaltonus als auch spontane Kontraktionen wurden bei Wildtyp-Gefäßen komplett durch $1\mu\text{M}$ Isoprenalin gehemmt (Abb. 13a). Ein ähnlicher Effekt konnte durch Isoprenalin auch bei Portalvenen von β_1 -KO (Abb. 13b) und von β_2 -KO-Tieren (Abb. 13c) erzielt werden. Nur bei Portalvenen von $\beta_1\beta_2$ -KO-Mäusen war kein Isoprenalin-Effekt mehr zu sehen, was darauf schließen ließ, dass sowohl β_1 -adrenerge Rezeptoren als auch β_2 -adrenerge Rezeptoren an der Regulation des Portalvenentonus beteiligt waren (Abb. 13d). Die direkte Stimulation der Adenylylcyclase in $\beta_1\beta_2$ -KO-Gefäßen durch Forskolin führte zur vollständigen Aufhebung der Kontraktion, was bewies, dass der intrazelluläre Signaltransduktionsweg intakt war.

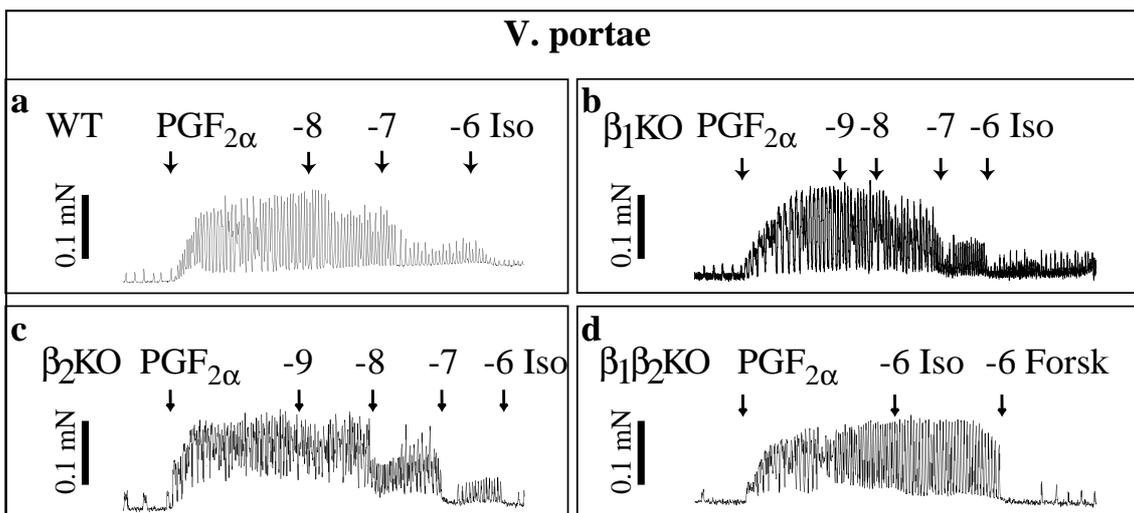


Abbildung 13: Myograph-Originalaufzeichnungen der V.portae. Jeweils ein WT- (a) β_1 -KO- (b) β_2 -KO- (c) und $\beta_1\beta_2$ -KO-Gefäß (d) wurden durch die Zugabe von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3\mu\text{M}$) isometrisch kontrahiert. Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums wurde Isoprenalin in steigenden Konzentrationen zugegeben und die Relaxation gemessen.

Diese Untersuchungen zeigten, dass β_1 -adrenerge und β_2 -adrenerge Rezeptoren in arteriellen Blutgefäßen und auf venöser Seite zumindest in der V. portae in unterschiedlichem Ausmaß die Vasodilatation regulieren.

3.3 In vivo-Funktion der α_{2A} - und α_{2C} -adrenergen Rezeptoren

3.3.1 Modell der chronischen Druckbelastung durch Aortenstenose

Eine Korrelation zwischen erhöhten Plasmakatecholamin-Spiegeln und dem Schweregrad der Prognose einer chronischen Herzinsuffizienz konnte schon vor Jahren hergestellt werden und geht mit einem deutlichen Mortalitätsanstieg einher (Cohn et al. 1984). Da präsynaptische α_2 -adrenerge Rezeptoren in vitro an der Regulation der Noradrenalin-Freisetzung maßgeblich (Starke et al. 1975; Langer et al. 1985; Hein et al. 1999) beteiligt sind, sollte die pathophysiologische Rolle der präsynaptische α_2 -adrenerge Rezeptoren nun in vivo untersucht werden. Hierzu wurde ein Modell der chronischen Druckbelastung des linken Ventrikels gewählt. WT-Mäusen und α_2 -Rezeptor-KO-Mäusen wurde im Alter von 3-4 Wochen eine Einengung der thorakale Aorta zugefügt und die Auswirkungen der Aortenstenose in den darauffolgenden 12 Wochen beobachtet. Zur Unterscheidung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Aortenstenose wurde eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier erstellt. Jede einzelne Maus der vier Untersuchungskollektive wurde hierzu in die Auswertung einbezogen. Die einzelnen Punkte des Graphen geben den genauen Tag des Absterbens der Tiere an. Als Tag 0 galt der Operationstag. Der Beobachtungszeitraum wurde zwischen den Tagen 90 bis 96 beendet, als die bis zu diesem Zeitpunkt überlebenden Mäuse in die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen aufgenommen wurden. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kollektiven zu bestimmen, wurde ein Logrank-Test durchgeführt. Zwischen den WT- und α_{2B} -KO-Tieren konnte kein Unterschied in der Mortalität gefunden werden. Bei Mäusen mit einer Deletion der α_{2A} - oder α_{2C} -Rezeptoren zeigte sich in den drei Monaten nach Aortenstenose-Operation

ein deutliche Mortalität. Statistisch signifikante Unterschiede zuungunsten der KO-Tiere fanden sich, wenn man das WT-Kollektiv mit den jeweiligen α_{2A} - und α_{2C} -Kollektiven einzeln verglich. Es konnte somit ein deutlich verstärktes Absterben der α_{2A} - und α_{2C} -KO-Mäuse durch chronische linksventrikuläre Druckbelastung gefunden werden. Zwischen α_{2A} - und α_{2C} -KO-Tieren bestand kein Unterschied. Abbildung 14 zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurven der vier untersuchten Mauskollektive. Überraschenderweise war die Mortalität bei α_{2A} -KO- und bei α_{2C} -KO-Mäusen in gleichem Maße erhöht. Dieses war aus Voruntersuchungen von α_{2A} -KO- und α_{2C} -KO-Mäusen nicht erwartet worden, da es nur bei α_{2A} -KO-Mäusen durch den Verlust des präsynaptischen Rezeptors zu Veränderungen der basalen Kreislaufparameter (z.B. basale Herzfrequenz) gekommen war (Altman et al. 1999; Hein et al. 1999).

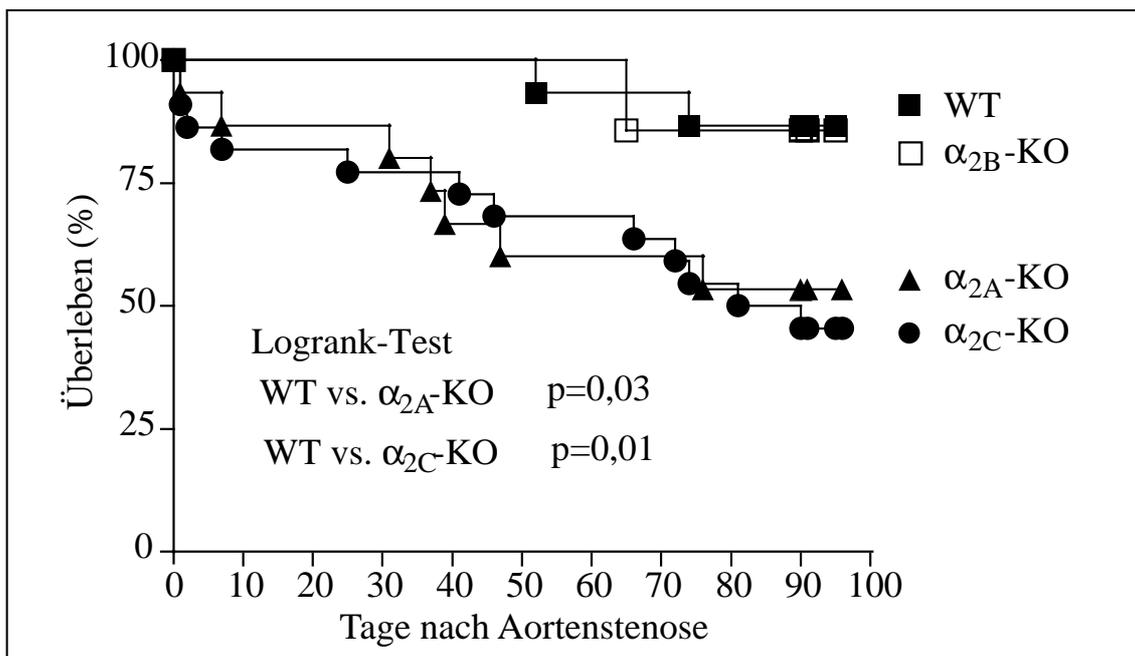


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve nach Induktion einer Aortenstenose bei α_2 -KO- und WT-Mäusen. Dargestellt sind Überlebenskurven von 15 WT-, (■) 15 α_{2A} -KO-, (▲) 7 α_{2B} -KO- (□) und 22 α_{2C} -KO- (●) Tieren. Die einzelnen Symbole geben die verschiedenen Genotypen mit dem jeweiligen Tag des Absterbens an. Zwischen den Tagen 90-96 wurden die lebenden Tiere weiter untersucht und die Überlebenskurve beendet.

3.3.2 In vivo Herzkatheteruntersuchungen bei α_2 -KO-Tieren

Um einen Grund für das verstärkte Absterben nach Aortenstenose zu finden, wurden die unterschiedlichen Kollektive einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen. Hierzu wurde den Versuchstieren in Narkose ein 1,4F Druckkatheter über die rechte A. carotis eingeführt und kontinuierlich Herzfrequenz und Kontraktilität (dp/dt_{\max}) im linken Ventrikel aufgezeichnet. Im Vergleich zu WT-Tieren zeigte sich eine deutlich verminderte linksventrikuläre Kontraktilität (dp/dt_{\max}) bei α_{2A} -KO- und α_{2C} -KO-Tieren. Die Kontraktilitätsparameter der α_{2B} -KO-Mäuse waren nicht verändert (Abb. 15a). Auch war die Herzfrequenz bei α_{2A} - und α_{2C} -KO-Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu ihren WT-Kontrolltieren (Abb. 15b). Wiederum zeigten α_{2B} -KO-Mäuse keine Unterschiede gegenüber WT-Mäusen. Die Befunde wiesen eindeutig auf eine stark eingeschränkte linksventrikuläre Funktion der α_{2A} - und α_{2C} -KO-Mäuse nach Aortenstenose hin. Nach Beendigung der Herzkathetermessungen wurden die Herzen der Mäuse entnommen und für die anschließende histologische Untersuchung in 4% Paraformaldehyd fixiert.

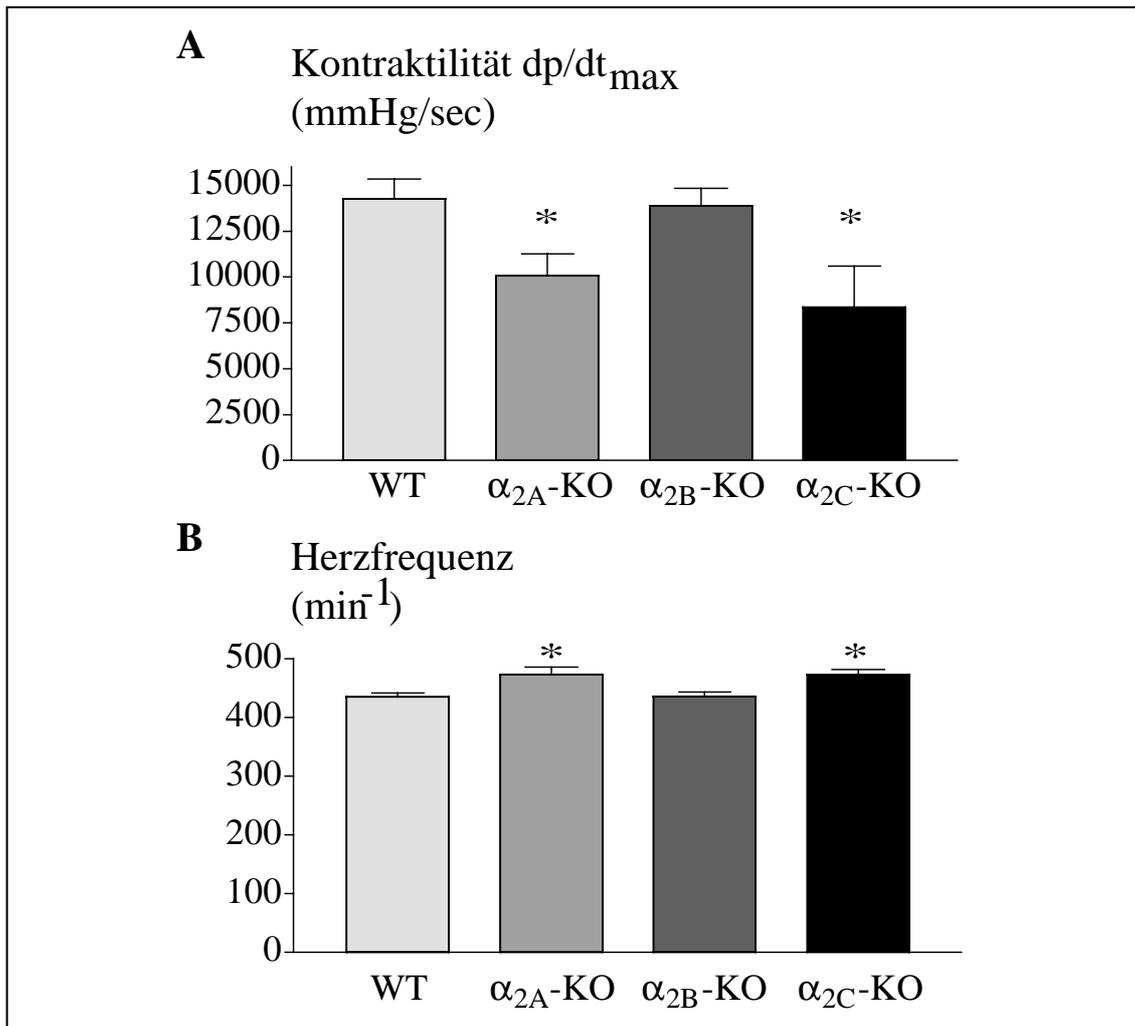


Abbildung 15: Herzkatheeteruntersuchungen durch einen 1,4F Millar-Herzkatheter an WT- und α_2 -KO-Tieren 3 Monate nach Induktion einer Aortenstenose. Dargestellt sind basale Herzkreislaufparameter (linksventrikuläre Kontraktilität dp/dt_{max} und Herzfrequenz) von Wildtyp (WT) und α_{2A} -KO- α_{2B} -KO- und α_{2C} -KO-Mäusen. ($n \geq 7$, Alter 4 Monate, one-way ANOVA und Dunnett's-Test, $*p \leq 0,05$)

3.3.3 Morphologische Untersuchung von Herzen bei α_2 -KO- und WT-Mäusen nach Aortenstenose

Die fixierten Herzen wurden in der äquatorialen Ebene quer angeschnitten und in Paraffin eingebettet, so dass beide Ventrikel gut zu beurteilen waren. Die Präparate wurden anschließend durch Sirius-Rot-Lösung angefärbt. Durch die Aortenstenose war es zu einer manifesten Herzinsuffizienz mit einer ausgeprägten interstitiellen Fibrose bei α_{2A} - und α_{2C} -KO Mäusen im Vergleich zu α_{2B} - und WT-Mäusen gekommen (Abb. 16).

Ergebnisse

Das fibrotische Gewebe wurde in den Schnitten rot, das Zytoplasma der Herzmuskelzellen gelb angefärbt (Sirius-Rot-Färbung). Abb. 16 stellt exemplarisch den morphologischen Befund einer WT-Maus dem einer α_{2C} -KO gegenüber. Der histologische Befund bei α_{2A} -KO-Mäusen war identisch zur Morphologie bei α_{2C} -KO-Tieren und wurde deshalb nicht gesondert dargestellt. Die linksventrikuläre Histologie von α_{2B} -KO-Mäusen unterschied sich nicht von dem histologischen Befund bei WT-Tieren.

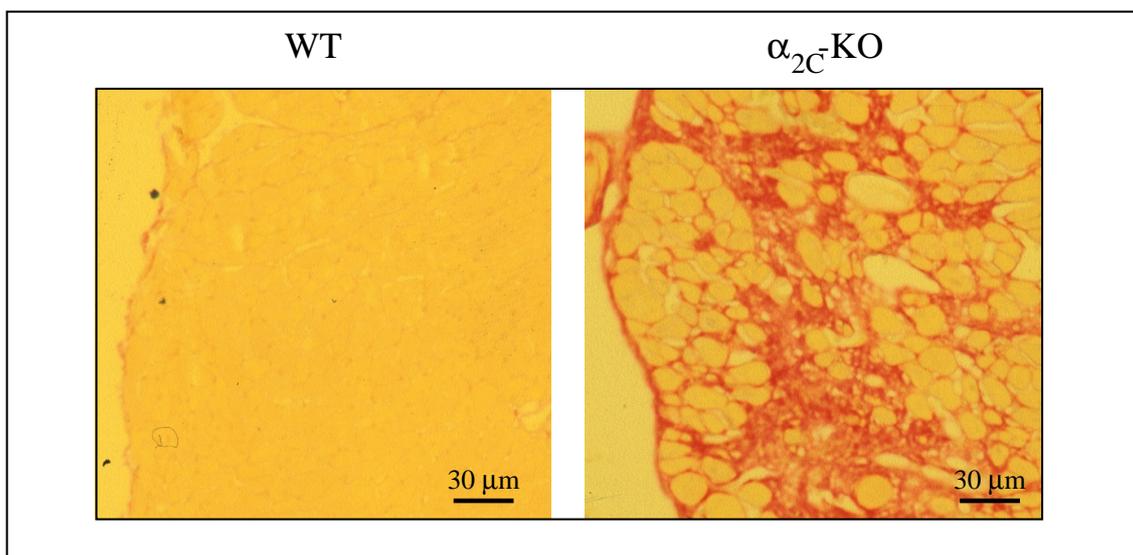


Abbildung 16: Querschnitt durch den linken Ventrikel von Wildtyp- und α_{2C} -KO-Tieren nach Aortenstenose (Alter 16 Wochen). Zwischen den durch Picrinsäure gelb angefärbten Herzmuskelzellen war eine deutliche interstitielle Fibrose (rot) bei α_{2C} -KO-Mäusen entstanden im Vergleich zu WT-Mäusen.

Aufgrund dieser Befunde kann den beiden präsynaptischen α_2 -adrenergen Rezeptoren α_{2A} und α_{2C} eine Schutzfunktion gegen eine erhöhte Sympathikusaktivität bei einer chronischen Druckbelastung des linken Ventrikels zugeschrieben werden. Durch den Ausfall eines der beiden präsynaptischen α_2 -adrenergen Rezeptoren war es nach Induktion einer Aortenstenose zu einer deutlichen Einschränkung der kardialen Funktion gekommen, die durch eine massive linksventrikuläre Fibrose zu erklären ist und bei WT- und α_{2B} -KO-Mäusen nicht in diesem Maße aufgetreten war.

Da auch bei der menschlichen Herzinsuffizienz die Plasmakatecholamin-Spiegel deutlich erhöht sind und mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren (Cohn et al. 1984), sollte nun untersucht werden, ob sich Unterschiede der Plasmakatecholamine bei den α_2 -KO-Tieren finden lassen, welche die erhöhte Empfindlichkeit für das Entstehen einer Herzinsuffizienz bei α_{2A} - und α_{2C} -KO-Mäusen erklären könnten.

3.3.4 Vergleich der Plasmakatecholamine bei WT- und α_2 -KO-Tieren

Die in vivo Daten hatten bis zu diesem Punkt auf eindrückliche Weise zeigen können, dass eine künstlich erzeugte Nachlastserhöhung zu einer deutlich verminderten Herzfunktion bei α_{2A} - und α_{2C} -KO-Tieren im Vergleich zu WT- und α_{2B} -KO-Mäusen führte. Abschließend sollte untersucht werden, ob Unterschiede der basalen Plasmakatecholamin-Spiegel zwischen den Kollektiven bestanden, welche die erhöhte Sensibilität der α_{2A} - und α_{2C} -KO-Tiere für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach Aortenstenose erklären könnten. Durch den Ausfall des α_{2A} -adrenergen Rezeptors kam es bei α_{2A} -KO-Tieren zu einer deutlichen Erhöhung der basalen Plasmanoradrenalin-Spiegel um 121% gegenüber dem WT-Kollektiv, was die Bedeutung des α_{2A} -adrenergen Rezeptors für die präsynaptische Autoinhibition der Freisetzung von Noradrenalin bereits unter Ruhebedingungen beweist (Abb. 17a). α_{2B} -KO- und α_{2C} -KO-Mäuse zeigten keinen Anstieg dieses Parameters. Im Gegensatz dazu scheint die Adrenalin-Freisetzung aus dem Nebennierenmark unter Ruhebedingungen allein durch den α_{2C} -adrenergen Rezeptor reguliert zu werden (Abb. 17b), da nur bei α_{2C} -KO-Mäusen ein signifikanter Anstieg des Plasmaadrenalin um 125% zu finden war. Abb. 17 veranschaulicht graphisch die Veränderungen der Plasmakatecholamin-Spiegel zwischen den Untersuchungskollektiven.

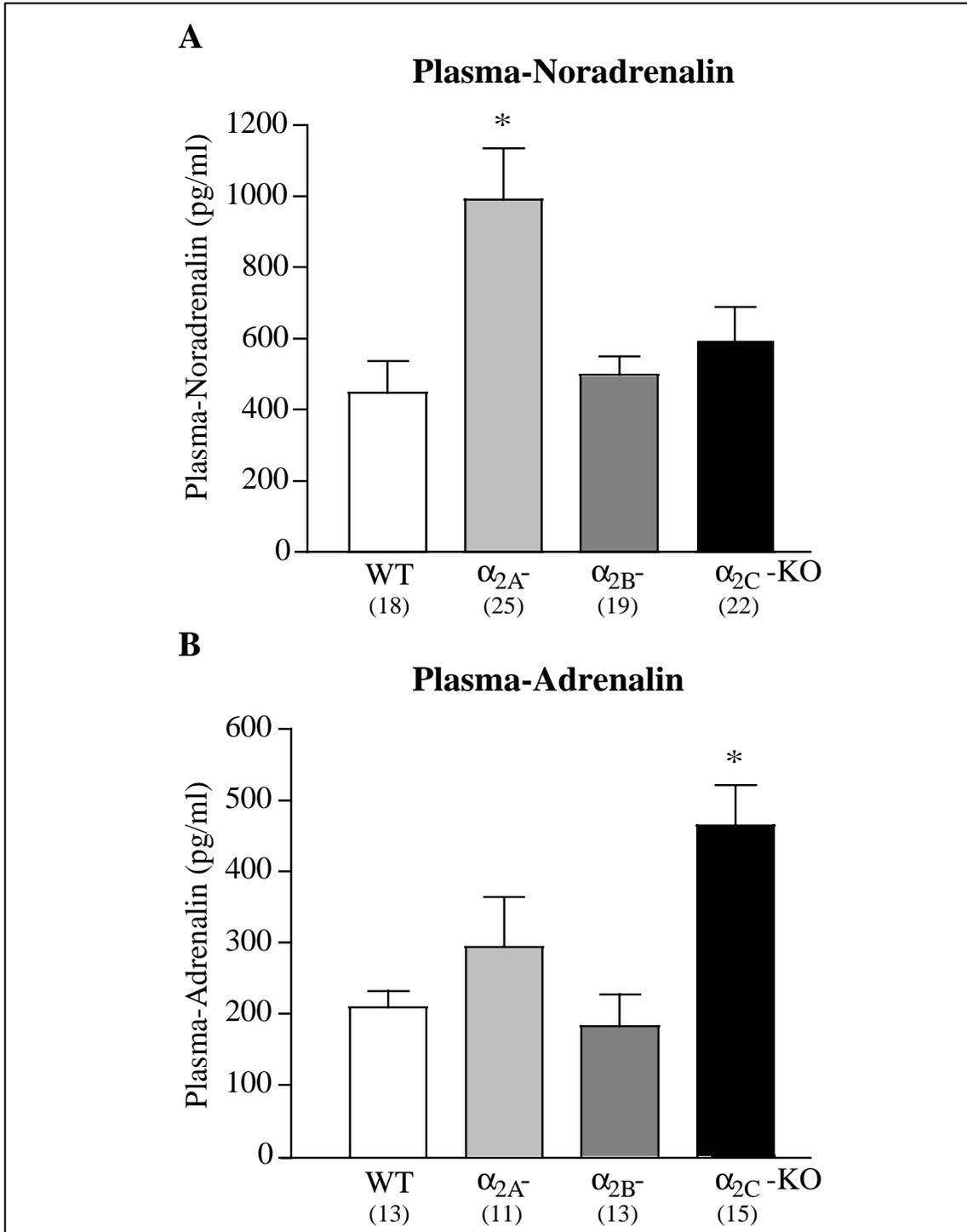


Abbildung 17: Basale Plasmakatecholamin-Spiegel bei narkotisierten WT-, α_{2A} -KO-, α_{2B} -KO- und α_{2C} -KO-Mäusen. In Klammern ist die Anzahl der untersuchten Mäuse aufgeführt. A) Erhöhte basale Noradrenalin-Plasmaspiegel bei α_{2A} -KO-Mäusen. B) Erhöhte basale Adrenalin-Plasmaspiegel bei α_{2C} -KO-Mäusen (Alter 3-4 Monate, one-way ANOVA und Dunnett's-Test, * $p \leq 0,05$).

4 Diskussion

Die Untersuchung transgener Mäuse hat in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse für die Herz-Kreislauf-Forschung geliefert. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse an transgenen Tieren konnten demonstrieren, wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Regulation des Herz-Kreislauf-Systems beeinflussen und an der Entstehung von Krankheitsprozessen beteiligt sind.

4.1 Untersuchungen bei AT₂-Rezeptor KO-Mäusen

Obwohl der AT₂-Rezeptor seine stärkste Expression am Ende der Embryonalentwicklung zeigt (Grady et al. 1991), muß ihm eine wichtige Funktion im adulten Organismus zugeschrieben werden. Bereits in Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass in vitro der AT₂-Rezeptor die proliferativen Wirkungen des AT₁-Rezeptors antagonisieren kann (Nakajima et al. 1995; Stoll et al. 1995). Es konnte nun in dieser Arbeit erstmals in einem in vivo Mausmodell der schon lange vermutete antiproliferative Effekt des AT₂-Rezeptors bestätigt werden. AT₂-KO-Mäuse entwickelten im Alter von zehn Monaten eine stark ausgeprägte vaskuläre Hypertrophie der A. femoralis im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren. Diese war durch eine deutliche Größenzunahme der glatten Gefäßmuskelzellen bedingt. Auf der Suche nach einem hierfür zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismus konnte die verstärkte Aktivität einer wachstumsinduzierenden Kinase gefunden werden, die für die Proteinsynthese essentiell ist. In Gefäßwänden der Aorta junger AT₂-KO-Mäuse kam es zu einer 66%igen Zunahme der aktivierten Form der P70S6-Kinase, die der Entwicklung der vaskulären Hypertrophie um mehrere Monate vorausging. Die P70S6-Kinase ist ein essentieller Regulator der Proteinsynthese und ist somit am Wachstum einer Zelle maßgeblich beteiligt. So wiesen P70S6-Kinase-KO-Mäusen ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zu ihren Geschwistertieren auf (Shima et al. 1998). Die Kinase muß nacheinander an mehreren Stellen phosphoryliert werden, um

katalytisch aktiv werden zu können (Dufner et al. 1999). Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweg durch Angiotensin II ist bereits beschrieben worden (Eguchi et al. 1998) und war auch in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen zu finden (Eguchi et al. 1999). In Zellkulturexperimenten an glatten Gefäßmuskelzellen konnte eine Hypertrophie sowohl durch spezifische AT₁-Rezeptorblocker als auch durch Zugabe von Rapamycin, welches spezifisch die Aktivierung der P70S6-Kinase antagonisiert, verhindert werden (Giasson et al. 1995). Dieser Signaltransduktionsweg war bei AT₂-KO-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Mäusen aktiviert. Für Aktivierung der P70S6-Kinase sind mehrere Phosphorylierungsschritte nötig, die in einer bestimmten Reihenfolge erfolgen müssen (Pullen et al. 1997). An diesem Aktivierungsvorgang sind unterschiedliche Signaltransduktionswege beteiligt, wie der MAP-Kinase- und der PI3-Kinase-Signaltransduktionsweg (Pullen et al. 1997; Eguchi et al. 2000). In unserer Arbeitsgruppe wurden die Expression und Aktivität der P70S6-Kinase nicht nur im Aortenlysat bestimmt, sondern auch im Herzgewebe von AT₂-KO- und WT-Tieren. Dort waren die Aktivität und die Expression unverändert zwischen den beiden Untersuchungskollektiven. Weiterhin konnte in ersten Experimenten auch kein Unterschied im Bereich der PI3-Kinase- und MAP-Kinase-Kaskade gefunden werden. So kann der exakte Mechanismus, dem die Aktivitätszunahme der P70S6-Kinase durch Wegfall des AT₂-Rezeptors im Gefäß zugrunde liegt, zum derzeitigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Es konnte für den AT₂-Rezeptor jedoch bereits gezeigt werden, dass dieser Rezeptor durch die Aktivierung von Phosphatasen (Nouet et al. 2000) die Aktivität unterschiedlicher Enzyme durch Dephosphorylierung vermindert. Da zur Aktivierung der P70S6-Kinase viele enzymatische Schritte nötig sind, kann nur spekuliert werden, ob die Aktivierung des AT₂-Rezeptor direkt zu einer Dephosphorylierung der P70S6-Kinase führt oder ob aktivitätsvermindernde Wirkungen auf vorgeschaltete Schritte des Signalweges ausgeübt werden. Derzeit ist nur der Umkehrschluß möglich, dass die Deletion des AT₂-Rezeptors aktivitätssteigernd wirkt

und die Entwicklung einer vaskulären Hypertrophie begünstigt. Erste Hinweise für Veränderungen im Bereich der Gefäße konnten bereits aus *in vitro* Myographmessungen der A. femoralis und deren Seitenästen gezogen werden. Isolierte Gefäßsegmente von AT₂-KO-Mäusen reagierten auf unterschiedliche vasokonstringierende Reagentien mit einer verstärkten Spannungsentwicklung zu einem Zeitpunkt, als bereits Veränderungen im Signaltransduktionsweg der P70S6-Kinase zu finden waren, die erst nach mehreren Monaten zur Entwicklung einer vaskulären Hypertrophie der A. femoralis führten. Der Mechanismus, dem diese Überempfindlichkeit der Femoralarterien zugrunde liegt, ist noch völlig unverstanden. Frühere Untersuchungen an AT₂-KO-Mäusen zeigten, dass es durch den Ausfall des AT₂-Rezeptors zu keiner Veränderung der Expression des AT₁-Rezeptors kommt (Yamada et al. 1999). Bis jetzt ist es uns nicht gelungen, die Signaltransduktionsveränderungen der Aorta im Lysat der A. femoralis zu bestätigen, da die aus diesen Gefäßen gewonnenen Proteinmengen für die Durchführung der Immunoblots nicht ausreichten. Allerdings konnte in Voruntersuchungen auch eine signifikante Zunahme der Mediafläche in der Aorta von 10 Monate alten AT₂-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen gesehen werden, so dass wir annehmen, dass die Signaltransduktionsveränderungen in der A. femoralis noch stärker ausgeprägt sein müssen.

Trotz der massiven Zunahme der Mediadicke in der A. femoralis waren basale Herz-Kreislauf-Parameter nicht verändert. Allerdings konnte durch die Infusion des vasokonstringierenden α_1 -Agonisten Phenylephrin ein verstärkter Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdruckes bei AT₂-KO-Mäusen im Vergleich zu deren WT-Kontrollen ausgelöst werden. Es bleibt abzuwarten, ob die Tiere nach Ausbildung der vaskulären Hypertrophie und der gesteigerten Empfindlichkeit der arteriellen Gefäße zu einem späteren Zeitpunkt Störungen der Herz-Kreislauf-Funktion entwickeln werden. Der Phänotyp bei AT₂-KO-Mäusen lenkte die Aufmerksamkeit auf den AT₁-

Rezeptor. Die vom AT₁-Rezeptor vermittelten Wirkungen sind gut bekannt. Seine Beteiligung an der Entwicklung einer Gefäßmuskelzellhypertrophie wird seit längerem vermutet. Erst kürzlich konnte an isolierten Gefäßen von hypertensiven Patienten gezeigt werden, dass durch die Blockade des AT₁-Rezeptors gefäßproliferative Prozesse reduziert werden können (Schiffrin et al. 2000). Im vorliegenden transgenen Tiermodell ist wahrscheinlich eine Störung des Gleichgewichts zwischen AT₁- und AT₂-Rezeptoren für die vaskuläre Hypertrophie verantwortlich. Die Aktivierung des P70S6-Kinase-Signalweges durch den AT₁-Rezeptor mit gesteigerter Proteinsynthese ist im Zellkulturmodell an Kardiomyozyten (Sadoshima et al. 1995) und isolierten glatten Gefäßmuskelzellen (Giasson et al. 1995) der Ratte bereits gezeigt worden und konnte nun erstmals in einem in vivo Mausmodell bestätigt werden. Entgegen den Zellkulturexperimenten, welche die Funktionen von Angiotensin II Rezeptoren durch Zugabe von Agonisten und Antagonisten untersuchten, bot das Tiermodell die Möglichkeit, die Adaptation des lebenden Organismus auf die Deletion des AT₂-Rezeptors zu untersuchen.

Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen stehen Untersuchungen einer konkurrierenden Arbeitsgruppe bei AT₂-KO-Mäusen (Senbonmatsu et al. 2000). Dort wurde überraschenderweise eine verminderte kardiale Hypertrophie bei AT₂-KO-Mäusen nach Aortenstenose gefunden, und auch die Aktivität der P70S6-Kinase war bei AT₂-KO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren deutlich erniedrigt. Diese Befunde stehen in deutlichem Widerspruch zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten und zu Daten an transgenen Modellen mit Überexpression der AT₁- bzw. AT₂-Rezeptoren. Wurde entweder der murine AT_{1A}-Rezeptor oder der humane AT₁-Rezeptor mit Hilfe des α -MHC-Promotors im Herzen der Maus überexprimiert, entwickelten die Mäuse eine starke Hyperplasie bzw. Hypertrophie der Kardiomyozyten (Hein et al. 1997; Paradis et al. 2000). Die kardiale Überexpression des AT₂-Rezeptors resultierte hingegen in einem

verminderten Druck- und Herzfrequenz-Anstieg auf die Infusion von Angiotensin II (Masaki et al. 1998).

Die Diskrepanz bei AT₂-KO-Tieren könnte durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund bei der Generierung der transgenen Mäuse bedingt worden sein (Hein et al. 1995; Ichiki et al. 1995). Die AT₂-KO-Mäuse von Inagami und Mitarbeitern zeigten bereits basal eine geringe Erhöhung des Blutdrucks, die durch eine erhöhte Expression des AT₁-Rezeptors bei deren AT₂-KO-Mäusen erklärt werden könnte (Tanaka et al. 1999). Bei unseren AT₂-KO-Mäusen war der Blutdruck auch im Alter von 10 Monaten unverändert im Vergleich zu WT-Kontroll-Tieren. Die künstlich erzeugte Druckbelastung des Herzens durch Einengung der Aorta darf mit den eigenen Veränderungen am glatten Gefäßmuskel nicht verglichen werden. In einer weiteren kürzlich erschienenen Untersuchung bei AT₂-KO-Mäusen ließ sich im Gegensatz zu den Befunden von Inagami keine Veränderung der kardialen Hypertrophie bei AT₂-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen finden (Akishita et al. 2000). Der im Rahmen dieser Arbeit detektierte Phänotyp wird weiterhin durch Untersuchungen an transgenen Mäusen mit einer Überexpression des AT₂-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen gestützt, bei denen die verstärkte Expression des AT₂-Rezeptors zu verstärkter Gefäßerschaffung durch die Bildung von NO/cGMP führt (Tsutsumi et al. 1999). Ob diese Relaxation direkt durch AT₂-Rezeptoren auf den glatten Gefäßmuskelzellen ausgelöst wird oder durch das Endothel vermittelt wird, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Bei der Ratte konnte der AT₂-Rezeptor immunhistochemisch sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Gefäßmuskelzellen kleiner Gefäße dargestellt werden (Nora et al. 1998).

Inwieweit diese neu gewonnen Erkenntnisse der gefäßprotektiven Wirkung des AT₂-Rezeptors auf den Menschen übertragbar sind, bleibt abzuwarten. Die derzeitige Diskussion, ob die Behandlung der Herzinsuffizienz und der arteriellen Hypertonie mit einem ACE-Inhibitor, einem AT₁-Rezeptorblocker oder einer Kombination aus beiden

Substanzklassen durchgeführt werden sollte, müssen weitere Studien am Menschen zeigen. Eine Kombination von ACE-Hemmer und AT_1 -Rezeptorantagonist könnte die Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz und der arteriellen Hypertonie weiter verbessern. Der Einsatz eines ACE-Hemmers würde die Bildung von Angiotensin II im Kreislauf hemmen. Da zum Beispiel im Herzmuskelgewebe Angiotensin II auch unter ACE-Hemmer-Therapie weiterhin gebildet werden kann (Dzau et al. 1993), könnte dort Angiotensin II seine protektive Wirkung am AT_2 -Rezeptor weiterhin entfalten, während der proliferationsfördernde AT_1 -Rezeptor durch den Einsatz des AT_1 -Rezeptorantagonisten blockiert würde. Im Rahmen der RESOLVD-Studie konnte die Überlegenheit der Kombinationstherapie bei herzinsuffizienten Patienten in Bezug auf reduziertes kardiales Remodeling durch Kombination eines ACE-Hemmers und eines AT_1 -Rezeptorantagonisten bereits an einem kleinen Untersuchungskollektiv gezeigt werden (McKelvie et al. 1999).

4.2 Untersuchungen bei β -Rezeptor KO-Mäusen

Bei der Untersuchung β_1 -adrenerger Rezeptoren sollte mit Hilfe transgener Tiere die Beteiligung der β -adrenergen Rezeptorsubtypen an der Vermittlung der Gefäßrelaxation untersucht werden, da bei der Generierung von β_1 -KO und β_2 -Mäusen ein Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks auf die Gabe von Isoprenalin ausgelöst werden konnte (Rohrer et al. 1996; Chruscinski et al. 1999) und die transgenen Tiere keine morphologischen Veränderungen des Herz-Kreislauf-Systems aufwiesen. Auch der β_3 -adrenerge Rezeptor scheint an der Regulation des peripheren Widerstandes beteiligt zu sein (Rohrer et al. 1999). Die stark vereinfachte Annahme, dass der β_1 -adrenerge Rezeptor für die kardiale Funktion verantwortlich sei, der β_2 -adrenerge Rezeptor hauptsächlich an der Vermittlung der vaskulären Vasodilatation beteiligt ist, kann aufgrund der Untersuchungen an transgenen Mäusen nicht mehr aufrecht erhalten werden. Zumindest der erste Teil dieser Annahme ließ sich bestätigen, da β_1 -KO-Mäuse bei normaler basaler Kreislauffunktion auf die Gabe von Isoprenalin keine inotrope und

chronotrope Antwort mehr zeigten (Rohrer et al. 1996). Die Messungen an isolierten Gefäßsegmenten bei β_1 -KO-, β_2 -KO-, $\beta_1\beta_2$ -KO- und WT-Mäusen zeigten eine eindeutige Dominanz des β_1 -adrenergen Rezeptors für die Vermittlung der Gefäßrelaxation. Bis auf die V. portae, in der die Erschlaffung zu gleichen Teilen durch β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren vermittelt wurde, zeigten die Aorta und die A. carotis ein starkes Übergewicht der β_1 -vermittelten Funktion, in der A. femoralis und der A. pulmonalis wurde die Gefäßerschaffung ausschließlich durch den β_1 -adrenergen Rezeptor vermittelt. Die Beteiligung des β_3 -adrenergen Rezeptors wurde hierbei nicht untersucht, obwohl auch diesem Rezeptor eine relaxierende Funktion zugeschrieben wird (Shen et al. 1994, 1996). Diese Befunde scheinen auf den ersten Eindruck sehr verwunderlich, da in den meisten pharmakologischen Lehrbüchern dem β_2 -adrenergen Rezeptor die Vasodilatation zugeschrieben wird. Auch beim Menschen gibt es Untersuchungen, welche die Beteiligung des β_1 -adrenergen Rezeptors an der Reduktion des peripheren Widerstandes belegen (Wellstein et al. 1988). Hunde reagierten in vivo auf die Infusion von Noradrenalin nach Blockade von peripheren α_1 -adrenergen Rezeptoragonisten mit einer deutlichen Reduktion des peripheren Widerstandes (Vatner et al. 1985). Durch die Untersuchungen der unterschiedlichen β -KO-Mäuse in dieser Arbeit konnte die Beteiligung des β_1 -adrenergen Rezeptors an der Vasodilatation bestätigt werden. Da der periphere Widerstand zu einem großen Teil in noch kleineren als den in dieser Arbeit untersuchten Gefäßen reguliert wird (Davis et al. 1986), müssen weitere Untersuchungen den hier gezeigten Befunden an transgenen Mäusen nachgehen. Die Datenlage zur Vasodilatation durch β -adrenerge Rezeptoren ist keineswegs einheitlich und variiert zwischen den untersuchten Gefäßbezirken bei verschiedenen Spezies. So scheint zum Beispiel die Relaxation von Koronararterien beim Kaninchen (Nakane et al. 1988) und beim Rind (Vatner et al. 1986) durch β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren vermittelt zu werden. Skelettmuskelgefäße hingegen relaxierten bei Hunden (Taira et al. 1977), Katzen (Hillman et al. 1981) und auch beim Menschen (Dawes et al.

1997) vornehmlich auf die Stimulation von β_2 -adrenergen Rezeptoren. Die Beurteilung früherer pharmakologischer in vivo und in vitro Untersuchungen von β -adrenergen Rezeptor-Wirkungen können neuerdings durch den Einsatz der transgenen Technologie weiter spezifiziert werden. Transgene Tiere mit Deletion der verschiedenen β -adrenergen Rezeptoren bieten ein ausgezeichnetes Werkzeug, die ausgelösten Effekte einem einzelnen Rezeptor eindeutig zuzuweisen. Es stellt sich abschließend die Frage, welche Bedeutung die Dominanz des β_1 -adrenergen Rezeptors für weitere pharmakologische Untersuchungen bei der Maus hat. Im Bereich der Herz-Kreislauf-Forschung und Therapie werden zur Stimulation und Blockade der Herzfunktion selektive Liganden für β_1 -adrenerge Rezeptoren verwendet, um die Aktivierung β_2 -adrenerger Rezeptoren an arteriellen Gefäßen zu vermeiden. Überträgt man die dargestellten Ergebnisse auf den Menschen, so müssen Auswirkungen auf den peripheren Widerstand durch den Einsatz β_1 -adrenergen Rezeptor-Agonisten/Antagonisten in Zukunft möglicherweise mehr Beachtung finden.

4.3 Untersuchungen bei α_2 -Rezeptor KO-Mäusen

Im Gegensatz zur Entwicklung einer vaskulären Hypertrophie bei AT_2 -KO-Mäusen, richtete sich das Augenmerk bei der Untersuchung von α_2 -KO-Mäusen auf die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Die Plasmanoradrenalin-Spiegel sind bei Patienten mit Herzinsuffizienz deutlich erhöht und mit einer schlechten Prognose verbunden (Cohn et al. 1984). Da α_2 -adrenerge Rezeptoren die Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin im sympathischen Nervensystem regulieren (Starke et al. 1975), bieten transgene Mäuse die Möglichkeit, den Verlust von α_2 -adrenergen Rezeptoren auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz gezielt zu untersuchen. Die Deletion des α_{2A} -adrenergen Rezeptors führte bereits unter Ruhebedingungen durch den Wegfall der präsynaptischen Hemmung zu einer gesteigerten Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit Tachykardie, Gewebeverarmung von Noradrenalin in Herz und Niere, sowie zur Downregulation kardialer β -adrenerger Rezeptoren

(Altman et al. 1999). Jedoch kam es erst durch den Ausfall von α_{2A} - und α_{2C} -adrenergen Rezeptoren zu massiven kardialen Veränderungen (Hein et al. 1999), obwohl die genaue Rolle des α_{2C} -adrenergen Rezeptors für die Entstehung der Herzinsuffizienz weitgehend unbekannt ist. In vitro Experimente konnten die Beteiligung des α_{2C} -adrenergen Rezeptors an der Freisetzung von Noradrenalin aus Vorhofmyozyten zeigen (Hein et al. 1999, Trendelenburg et al. 1999), obwohl Mäuse mit einer Deletion des α_{2C} -adrenergen Rezeptors in vivo keine Auffälligkeiten der Herz-Kreislauf-Funktion zeigten (Link et al. 1996). Durch eine künstlich erzeugte Nachlasterhöhung des Herzens durch Einengung der Aorta sollte die Rolle der verschiedenen α_2 -adrenergen Rezeptor-Subtypen für die Kreislauffunktion genauer untersucht werden. Im Verlauf von 12 Wochen nach der Induktion einer Aortenstenose kam es bei α_{2A} - und α_{2C} -KO-Mäusen zu einer deutlich erhöhten Mortalität im Vergleich zu α_{2B} -KO- und WT-Mäusen. Da der α_{2A} -adrenerge Rezeptor die stärkste Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung im Herzen ausübt (Link et al. 1996) und es bei α_{2A} -KO-Tieren bereits basal zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems gekommen war, war die erhöhte Sterblichkeit bei α_{2A} -KO-Mäusen nicht überraschend. Hingegen war die ausgeprägte Mortalität bei α_{2C} -KO-Mäusen nicht erwartet worden. Unter Ruhebedingungen scheint der Wegfall des α_{2C} -adrenergen Rezeptors ohne Folgen für die Herz-Kreislauf-Funktion kompensiert werden zu können (Link et al. 1996). Durch die Nachlasterhöhung scheint die Kompensation des α_{2C} -adrenergen Rezeptorverlustes jedoch zusammenzubrechen. Der Ausfall des α_{2B} -adrenergen Rezeptors hingegen spielte für die Entwicklung der Herzinsuffizienz bei der Maus keine Rolle. Auf der Suche nach dem zugrundeliegenden Pathomechanismus fielen deutliche Unterschiede in der Regulation der Transmitterfreisetzung des sympathischen Nervensystems auf. Unter Basalbedingungen scheint die Ausschüttung von Noradrenalin aus sympathischen Neuronen in den synaptischen Spalt zum Großteil vom α_{2A} -adrenergen Rezeptor reguliert zu werden. Die fehlende Autoinhibition der Noradrenalin-Freisetzung führte bei α_{2A} -KO-Mäusen zu

einem deutlichen Anstieg der Noradrenalin-Plasmaspiegel. Die Regulation der Adrenalin-Freisetzung scheint hingegen zum Großteil unter der inhibitorischen Kontrolle des α_{2C} -adrenergen Rezeptors zu stehen. Unter Ruhebedingungen war ausschließlich bei α_{2C} -KO-Mäusen ein signifikanter Anstieg des Plasmaadrenalin-Spiegels zu finden (Abb. 17). Zum derzeitigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, an welcher Stelle im Organismus der α_{2C} -adrenerge Rezeptor die Freisetzung von Adrenalin hemmt. Faßt man diese Befunde zusammen, so scheint die Transmitterfreisetzung im sympathischen Nervensystem unter Basalbedingungen unter der Kontrolle von zwei der drei α_2 -adrenergen Rezeptorsubtypen zu stehen. Vereinfacht kann man die Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung dem α_{2A} -adrenergen Rezeptor zuweisen, während das aus dem Nebennierenmark freigesetzte Adrenalin vornehmlich der Kontrolle des α_{2C} -adrenergen Rezeptors zu unterliegen scheint. Während Adrenalin hauptsächlich im Nebennierenmark gebildet wird, stammt das Plasmanoradrenalin sowohl aus sympathischen Neuronen als auch aus dem Nebennierenmark. Die Katecholamin-Freisetzung aus dem Nebennierenmark unterliegt einer differentiellen Regulation. Durch die Stimulation hypothalamischer Kerngebiete kann die Ausschüttung von Noradrenalin oder Adrenalin aus dem Nebennierenmark induziert werden (Robinson et al. 1983). Weiterhin kann durch die Gabe von Insulin die selektive Freisetzung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark der Ratte ausgelöst werden, ohne dass es zu einem Anstieg des Noradrenalin-Spiegels kommt. Durch Kälteexposition hingegen konnte die entgegengesetzte Reaktion ausgelöst werden, d.h. ein alleiniger Anstieg des Plasmanoradrenalin-Spiegels bei unveränderten Adrenalin-Spiegeln (Vollmer et al. 1992). All diese Befunde weisen darauf hin, dass für die Kontrolle der Plasmakatecholamin-Spiegel unterschiedliche Regulationsmechanismen notwendig sind. Durch die Untersuchung von α_2 -KO-Mäusen konnte auf Rezeptorebene eine differentielle Rolle der α_2 -Rezeptorsubtypen aufgezeigt werden und die Auswirkungen dieser Veränderungen für die Entstehung der Herzinsuffizienz gezeigt werden. Erhöhte

Noradrenalin-Spiegel stehen mit der Herzinsuffizienz beim Menschen in Verbindung (Cohn et al. 1984). Welche Bedeutung die isolierte Erhöhung des basalen Adrenalin-Spiegels auf die gesteigerte Prädisposition zur Entwicklung des kardialen Phänotyps bei α_{2C} -KO-Mäusen hat, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die Entstehung des Phänotyps bei α_{2C} -KO-Mäusen könnte man sich stark vereinfacht folgendermaßen vorstellen: Vermehrt aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn freigesetztes Adrenalin, das unter normalen Bedingungen der Kontrolle von α_{2C} -adrenergen Rezeptoren unterliegt, wird von sympathischen Nervenendigungen (z.B. im Herz) vermehrt aufgenommen. Bei Sympathikusaktivierung wird durch positive Rückkopplung die Konzentration von Noradrenalin im synaptischen Spalt erhöht und somit die Noradrenalin-Wirkung an der postsynaptischen Seite potenziert (Majewski et al. 1981). Die erhöhten Adrenalin-Spiegel reichten bei α_{2C} -KO-Mäusen unter Basalbedingungen entweder alleine nicht aus, die Herz-Kreislauf-Funktion maßgeblich zu beeinträchtigen, oder führten indirekt zu einer Inhibition des Sympathikus. Allerdings kam es durch die chronische Nachlastserhöhung zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems und zur Potenzierung der Adrenalin-Wirkung mit massiven Auswirkungen auf die kardiale Funktion. Die Befunde bei α_2 -KO-Mäusen konnten die Bedeutung α_2 -adrenerger Rezeptoren für die Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz aufzeigen. Auch bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz scheint die Regulation der Adrenalin-Freisetzung verändert zu sein. Während bei gesunden Menschen die Freisetzung von Adrenalin aus dem Herzen nur durch maximale körperliche Anstrengung ausgelöst werden konnte (Esler et al. 1991), wiesen Patienten mit Herzinsuffizienz einen deutlichen Anstieg der Adrenalin-Freisetzung aus dem Herzen auf (Kaye et al. 1995). Das vermehrt freigesetzte Adrenalin bei Patienten mit Herzinsuffizienz kann somit die für das insuffiziente Herz schädliche Noradrenalin-Wirkung verstärken, indem die Freisetzung von Noradrenalin über präsynaptische β_2 -adrenerge Rezeptoren verstärkt wird (Newton et al. 1996). Noradrenalin hingegen hemmt seine eigene Freisetzung über

präsynaptische α_2 -adrenerge Rezeptoren (Parker et al. 1995). Die erhobenen Befunde bei α_2 -KO-Mäusen bieten neue Einblicke in die Regulation der Transmitterfreisetzung im sympathischen Nervensystem und in die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass die basalen Plasmanoradrenalin-Spiegel durch den α_{2A} -Rezeptorsubtyp reguliert werden, die basalen Plasmaadrenalin-Spiegel hingegen hauptsächlich der Kontrolle des α_{2C} -Rezeptorsubtyps unterliegen.

Zur Zeit gehören die α_2 -adrenergen Rezeptoragonisten nicht zur Therapie der Herzinsuffizienz beim Menschen. Die Entwicklung selektiver α_2 -adrenerger Rezeptor-Agonisten könnte dennoch einen Fortschritt darstellen, da die Regulation der Plasmakatecholamine Adrenalin und Noradrenalin gezielter beeinflusst werden könnte, die bekanntermaßen mit der Herzinsuffizienz assoziiert sind. Weiterhin gilt es herauszufinden, welcher Mechanismus zum Versagen der Herzleistung geführt hat. So könnten beispielsweise Therapiestudien mit β -adrenergen Antagonisten an diesem Mausmodell den schädlichen Einfluß der erhöhten Katecholamispiegel auf die kardiale Funktion bestätigen.

5 Zusammenfassung

Transgene Tiermodelle bieten seit mehreren Jahren die Möglichkeit, den Einfluß von Deletion und Überexpression von Genen gezielt zu untersuchen. Das Herz-Kreislauf-System wird durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren des Renin-Angiotensin-Systems und des sympathischen Nervensystems kontrolliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen der Deletion des Angiotensin II AT₂-Rezeptorsubtyps, der verschiedenen β -adrenergen Rezeptorsubtypen und der α_2 -adrenergen Rezeptorsubtypen auf die kardiovaskuläre Regulation bei der Maus systematisch untersucht werden.

Angiotensin II vermittelt seine Wirkungen über zwei unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den AT₁-Rezeptorsubtyp und den AT₂-Rezeptorsubtyp. Der Großteil der uns bekannten Wirkungen wird hierbei dem AT₁-Rezeptorsubtyp zugeschrieben, während die Rolle des AT₂-Rezeptorsubtyps weitgehend unbekannt ist (Brede et al. 2001). Durch die Untersuchung von AT₂-KO-Tieren konnten neue Erkenntnisse für die Herz-Kreislauf-Regulation gewonnen werden. AT₂-KO-Mäuse zeigten eine verstärkte Spannungsentwicklung in isolierten Gefäßsegmenten auf verschiedene Vasokonstringentien, sowie eine gesteigerte Blutdruckantwort auf Phenylephrin. Als Ursache konnte eine massive vaskuläre Hypertrophie bei AT₂-KO-Mäusen gefunden werden, die mit einem erhöhten Phosphorylierungsgrad der P70S6-Kinase assoziiert war, von der bekannt ist, dass sie eine essentielle Rolle bei der Proteinsynthese und Hypertrophie der Zelle spielt. Diese Befunde bekräftigen die seit längerem vermutete antagonistische Funktion des AT₂-Rezeptors gegenüber dem AT₁-Rezeptorsubtyp, der an der Entstehung der Herzinsuffizienz und der arteriellen Hypertonie beteiligt ist und Angriffspunkt der Therapie dieser Erkrankungen darstellt.

Die frühere Annahme, dass die Vasodilatation von Gefäßen hauptsächlich durch den β_2 -adrenergen Rezeptorsubtyp vermittelt wird, konnte durch Untersuchungen an β -KO-

Zusammenfassung

Mäusen eindeutig widerlegt werden. Es zeigte sich, dass die Vasodilatation an vielen Blutgefäßen vor allem durch Stimulation des β_1 -adrenergen Rezeptors ausgelöst wird. Dieser Befund sollte in Zukunft mehr Beachtung beim Einsatz von β -adrenergen Agonisten/Antagonisten finden.

In einem weiteren transgenen Tiermodell wurde die Bedeutung von α_2 -adrenergen Rezeptorsubtypen (α_2 -KO-Tiere) für das Entstehen einer Herzinsuffizienz nach chronischer Druckbelastung des linken Ventrikels durch Aortenstenose untersucht. Erhöhte Plasmakatecholamin-Spiegel sind bekanntermaßen bei der Herzinsuffizienz mit einer schlechten Prognose assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmakatecholamin-Spiegel selektiv durch zwei der drei α_2 -Rezeptorsubtypen kontrolliert werden (α_{2A} - und α_{2C}). Beim α_{2A} -KO waren die Noradrenalin-Konzentrationen, beim α_{2C} -KO die Adrenalin-Konzentrationen im Blutplasma erhöht. Die Deletion der Gene für diese beiden Rezeptoren führte bei zusätzlicher Druckbelastung des linken Ventrikels durch eine Aortenstenose zur raschen Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

6 Literaturverzeichnis

Ahlquist RB (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 153: 586-600.

Akishita M, Iwai M, Wu L, Zhang L, Ouchi Y, Dzau VJ, Horiuchi M (2000) Inhibitory effect of angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice. *Circulation* 102: 1684-1689.

Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L, Starke K, Kobilka BK, Hein L (1999) Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in α_{2A} -adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 56: 154-161.

Andersson B, Blange I, Sylven C (1999) Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and long-term survival in patients with idiopathic congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 1: 363-369.

Bertin B, Mansier P, Makeh I, Briand P, Rostene W, Swynghedauw B, Strosberg AD (1993) Specific atrial overexpression of G protein coupled human β_1 -adrenoceptors in transgenic mice. *Cardiovasc Res* 27: 1606-1612.

Birchall MA, Henderson JC, Pride NB, Fuller RW (1996) A comparison of the effects of an α -agonist, an anti-muscarinic agent and placebo on intranasal histamine challenge in allergic rhinitis. *Clin Otolaryngol* 21: 212-217.

Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Reynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow

MR, Port DJ (2000) Myocardial-directed overexpression of the human β_1 -adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 32: 817-830.

Bjorkqvist SE (1975) Clonidine in alcohol withdrawal. *Acta Psychiatr Scand* 52: 256-263.

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309: 255-256.

Braun-Mendez E, Fasciolo, E., Leloir, J. C., and Munoz, J. M. (1940) The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 98: 283-298.

Brede M, Hein L (2001) Transgenic mouse models of angiotensin receptor subtype function in the cardiovascular system. *Regul Pept* 96: 125-132.

Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* 27: 223-231.

Brodde OE (1991) β_1 - and β_2 -adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43: 203-242.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 121-136.

Literaturverzeichnis

Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F, Okubo S, Fogo A, Matsusaka T, Ichikawa I (1997) Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 272: F299-304.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK (1999) Targeted disruption of the β_2 -adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 274: 16694-16700.

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T (1984) Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 311: 819-823.

CONSENSUS Trial (1987) Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med* 316: 1429-1435.

Davis MJ, Ferrer PN, Gore RW (1986) Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol* 250: H291-303.

Dawes M, Chowienczyk PJ, Ritter JM (1997) Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by β -adrenergic agonists in human forearm. *Circulation* 95: 2293-2297.

Literaturverzeichnis

Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321: 75-79.

Donati MB, Zito F, Castelnuovo AD, Iacoviello L (2000) Genes, coagulation and cardiovascular risk. *J Hum Hypertens* 14: 369-372.

Dufner A, Thomas G (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 253: 100-109.

Duzman E, Warman A, Warman R (1986) Efficacy and safety of topical oxymetazoline in treating allergic and environmental conjunctivitis. *Ann Ophthalmol* 18: 28-31.

Dzau VJ, Sasamura H, Hein L (1993) Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens Suppl* 11: S13-18.

Eguchi S, Inagami T (2000) Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept* 91: 13-20.

Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, Frank GD, Motley ED, Eguchi K, Marumo F, Hirata Y, Inagami T (1999) Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase and Akt. *J Biol Chem* 274: 36843-36851.

Literaturverzeichnis

Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273: 8890-8896.

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD (1989) Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 245: 1118-1121.

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in β_1 -adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7059-7064.

Esler M, Eisenhofer G, Chin J, Jennings G, Meredith I, Cox H, Lambert G, Thompson J, Dart A (1991) Is adrenaline released by sympathetic nerves in man? *Clin Auton Res* 1: 103-108.

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.

Ferrieres J, Lambert J, Lussier-Cacan S, Davignon J (1995) Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia patients with the same LDL-receptor gene mutation. *Circulation* 92: 290-295.

Fillastre JP, Letac B, Galinier F, Le Bihan G, Schwartz J (1988) A multicenter double-blind comparative study of rilmenidine and clonidine in 333 hypertensive patients. *Am J Cardiol* 61: 81D-85D.

Fletcher DS, Candelore MR, Grujic D, Lowell BB, Luell S, Susulic VS, Macintyre DE (1998) β_3 -adrenergic receptor agonists cause an increase in gastrointestinal transit time in wild-type mice, but not in mice lacking the β_3 -adrenergic receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 287: 720-724.

Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK (1987) Cloning of the cDNA for the human β_1 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7920-7924.

Giasson E, Meloche S (1995) Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270: 5225-5231.

Gibson RE, Thorpe HH, Cartwright ME, Frank JD, Schorn TW, Bunting PB, Siegl PK (1991) Angiotensin II receptor subtypes in renal cortex of rats and rhesus monkeys. *Am J Physiol* 261: F512-518.

Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P, Bristow MR (1996) Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation* 94: 2817-2825.

Gold MS, Redmond DE, Jr., Kleber HD (1978) Clonidine blocks acute opiate-withdrawal symptoms. *Lancet* 2: 599-602.

Literaturverzeichnis

Gordon JW, Ruddle FH (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214: 1244-1246.

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7380-7384.

Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE (1991) Expression of AT₂-receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88: 921-933.

Grujic D, Susulic VS, Harper ME, Himms-Hagen J, Cunningham BA, Corkey BE, Lowell BB (1997) β_3 -adrenergic receptors on white and brown adipocytes mediate β_3 -selective agonist-induced effects on energy expenditure, insulin secretion, and food intake. A study using transgenic and gene knockout mice. *J Biol Chem* 272: 17686-17693.

Guyenet PG, Cabot JB (1981) Inhibition of sympathetic preganglionic neurons by catecholamines and clonidine: mediation by an α -adrenergic receptor. *J Neurosci* 1: 908-917.

Heidenreich PA, Lee TT, Massie BM (1997) Effect of β -blockade on mortality in patients with heart failure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 30: 27-34.

Hein L (2000) Transgenic models of α_2 -adrenergic receptor subtype function. *Rev. Phxsiol. Biochem. Pharmacol.* 142: 162-185.

Literaturverzeichnis

Hein L, Altman JD, Kobilka BK (1999) Two functionally distinct α_2 -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402: 181-184.

Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK (1995) Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type 2 receptor in mice. *Nature* 377: 744-747.

Hein L, Dzau VJ, Barsh GS (1995) Linkage mapping of the angiotensin AT₂-receptor gene (*Agtr2*) to the mouse X chromosome. *Genomics* 30: 369-371.

Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ (1997) Overexpression of angiotensin AT₁-receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6391-6396.

Hillman J, Lundvall J (1981) Classification of β -adrenoceptors in the microcirculation of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 113: 67-71.

Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326: 292-295.

Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T (1995) Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type 2 receptor. *Nature* 377: 748-750.

Ito M, Oliviero MJ, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1995) Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3521-3525.

Iwai N, Yamano Y, Chaki S, Konishi F, Bardhan S, Tibbetts C, Sasaki K, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T (1991) Rat angiotensin II receptor: cDNA sequence and regulation of the gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 299-304.

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T (1993) Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 268: 24543-24546.

Kaumann AJ, Engelhardt S, Hein L, Molenaar P, Lohse MJ (2001) Abolition of (-)-CGP 12177 evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptors for putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363: 87-93

Kaumann AJ, Molenaar P (1997) Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355: 667-681.

Kaye DM, Lefkovits J, Cox H, Lambert G, Jennings G, Turner A, Esler MD (1995) Regional epinephrine kinetics in human heart failure: evidence for extra-adrenal, nonneural release. *Am J Physiol* 269: H182-188.

Khan ZP, Ferguson CN, Jones RM (1999) α_2 - and imidazoline-receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia* 54: 146-165.

Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, Hiwada K (1992) Differential gene expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 446-452.

Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW (1987) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet α_2 -adrenergic receptor. *Science* 238: 650-656.

Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, Evans MJ (1987) A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* 326: 295-298.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lakhlani PP, MacMillan LB, Guo TZ, McCool BA, Lovinger DM, Maze M, Limbird LE (1997) Substitution of a mutant α_{2A} -adrenergic receptor via "hit and run" gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9950-9955.

Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG, Jr. (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 597-598.

Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ (1967) Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci* 6: 2241-2249.

Literaturverzeichnis

Langer SZ, Duval N, Massingham R (1985) Pharmacologic and therapeutic significance of α -adrenoceptor subtypes. *J Cardiovasc Pharmacol* 7: S1-8.

Lazard D, Briend-Sutren MM, Villageois P, Mattei MG, Strosberg AD, Nahmias C (1994) Molecular characterization and chromosome localization of a human angiotensin II AT₂-receptor gene highly expressed in fetal tissues. *Receptors Channels* 2: 271-280.

Leung KH, Smith RD, Pieter, Timmermans BM, Chiu AT (1991) Regional distribution of the two subtypes of angiotensin II receptor in rat brain using selective nonpeptide antagonists. *Neurosci Lett* 123: 95-98.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD (1993) The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329: 1456-1462.

Liebson PR, Grandits GA, Dianzumba S, Prineas RJ, Grimm RH, Jr., Neaton JD, Stamler J (1995) Comparison of five antihypertensive monotherapies and placebo for change in left ventricular mass in patients receiving nutritional-hygienic therapy in the Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS). *Circulation* 91: 698-706.

Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, Walsh RA (1998) The Ile164 β_2 -adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 102: 1534-1539.

Lin SY, Goodfriend TL (1970) Angiotensin receptors. *Am J Physiol* 218: 1319-1328.

Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, Barsh GS, Kobilka BK (1996) Cardiovascular regulation in mice lacking α_2 -adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 273: 803-805.

Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, Scheinin M, Barsh GS, Kobilka BK (1995) Targeted inactivation of the gene encoding the mouse α_{2c} -adrenoceptor homolog. *Mol Pharmacol* 48: 48-55.

Lomasney JW, Cotecchia S, Lefkowitz RJ, Caron MG (1991) Molecular biology of α -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. *Biochim Biophys Acta* 1095: 127-139.

Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, King K, Regan JW, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Expansion of the α_2 -adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human α_2 -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5094-5098.

MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE (1996) Central hypotensive effects of the α_{2A} -adrenergic receptor subtype. *Science* 273: 801-803.

Majewski H, Rand MJ, Tung LH (1981) Activation of prejunctional β -adrenoceptors in rat atria by adrenaline applied exogenously or released as a co-transmitter. *Br J Pharmacol* 73: 669-679.

Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-7638.

Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H (1998) Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT₂-receptor causes attenuated response to AT₁-receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 101: 527-535.

Mason DT, Chan MC, Lee G (1987) Antihypertensive therapy and the concept of total cardiovascular protection. *Am J Cardiol* 60: 29E-32E.

McCaffery JM, Pogue-Geile MF, Debski TT, Manuck SB (1999) Genetic and environmental causes of covariation among blood pressure, body mass and serum lipids during young adulthood: a twin study. *J Hypertens* 17: 1677-1685.

McIntyre CA, Williams BC, Lindsay RM, McKnight JA, Hadoke PW (1998) Preservation of vascular function in rat mesenteric resistance arteries following cold storage, studied by small vessel myography. *Br J Pharmacol* 123: 1555-1560.

McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, Tsuyuki RT, White M, Rouleau J, Latini R, Maggioni A, Young J, Pogue J (1999) Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation* 100: 1056-1064.

Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ (1994) Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the β_2 -adrenergic receptor. *Science* 264: 582-586.

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ (1993) Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 268: 24539-24542.

Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19-26.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type 1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236.

Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ (1995) The angiotensin II type 2 (AT₂)-receptor antagonizes the growth effects of the AT₁-receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10663-10667.

Nakane T, Tsujimoto G, Hashimoto K, Chiba S (1988) β -adrenoceptors in the canine large coronary arteries: β_1 -adrenoceptors predominate in vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 936-943.

Newton GE, Parker JD (1996) Acute effects of β_1 -selective and nonselective β -adrenergic receptor blockade on cardiac sympathetic activity in congestive heart failure. *Circulation* 94: 353-358.

Nicholas AP, Pieribone V, Hokfelt T (1993) Distributions of mRNAs for α_2 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 328: 575-594.

Literaturverzeichnis

Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, Miyazaki Y, Ma J, Hunley TE, Yoshida H, Ichiki T, Threadgill D, Phillips JA, Hogan BM, Fogo A, Brock JW, Inagami T, Ichikawa I (1999) Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Mol Cell* 3: 1-10.

Nora EH, Munzenmaier DH, Hansen-Smith FM, Lombard JH, Greene AS (1998) Localization of the angiotensin II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *Am J Physiol* 275: H1395-1403.

Nouet I, Nahmias I (2000) Signal transduction from the angiotensin II AT₂-receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11: 1-6.

Oliverio MI, Best CF, Kim HS, Arendshorst WJ, Smithies O, Coffman TM (1997) Angiotensin II responses in AT_{1A}-receptor-deficient mice: a role for AT_{1B}-receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol* 272: F515-520.

Oliverio MI, Kim HS, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1998) Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT₂) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT_{1A}- and AT_{1B}-receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15496-15501.

Oliverio MI, Madsen K, Best CF, Ito M, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1998) Renal growth and development in mice lacking AT_{1A}-receptors for angiotensin II. *Am J Physiol* 274: F43-50.

Page IH, Helmer, OM (1940) A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J Exp Med* 71: 29-42.

Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M (2000) Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 931-936.

Parker JD, Newton GE, Landzberg JS, Floras JS, Colucci WS (1995) Functional significance of presynaptic α -adrenergic receptors in failing and nonfailing human left ventricle. *Circulation* 92: 1793-1800.

Perala M, Hirvonen H, Kalimo H, Ala-Uotila S, Regan JW, Akerman KE, Scheinin M (1992) Differential expression of two α_2 -adrenergic receptor subtype mRNAs in human tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 16: 57-63.

Piasek MT, Kusiak JW, Barron KW (1990) α_1 -adrenoceptor subtypes and the regulation of peripheral hemodynamics in the conscious rat. *Eur J Pharmacol* 186: 273-278.

Pitt B, Segal R, Martinez FA, Meurers G, Cowley AJ, Thomas I, Deedwania PC, Ney DE, Snively DB, Chang PI (1997) Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet* 349: 747-752.

Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez F A, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klingler GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B (2000) Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure:

randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 355: 1582-1587.

Propafenon GS (1995) A randomized, placebo-controlled trial of propafenone in the prophylaxis of paroxysmal supraventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. UK Propafenone PSVT Study Group. *Circulation* 92: 2550-2557.

Pullen N, Thomas G (1997) The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* 410: 78-82.

Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK (1988) Cloning and expression of a human kidney cDNA for an α_2 -adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 6301-6305.

Revelli JP, Preitner F, Samec S, Muniesa P, Kuehne F, Boss O, Vassalli JD, Dulloo A, Seydoux J, Giacobino JP, Huarte J, Ody C (1997) Targeted gene disruption reveals a leptin-independent role for the mouse β_3 -adrenoceptor in the regulation of body composition. *J Clin Invest* 100: 1098-1106.

Robinson RL, Culberson JL, Carmichael SW (1983) Influence of hypothalamic stimulation on the secretion of adrenal medullary catecholamines. *J Auton Nerv Syst* 8: 89-96.

Rohrer DK (1998) Physiological consequences of β -adrenergic receptor disruption. *J Mol Med* 76: 764-772.

Literaturverzeichnis

Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK (1999) Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both β_1 - and β_2 -adrenergic receptors. *J Biol Chem* 274: 16701-16708.

Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., Barsh GS, Bernstein D, Kobilka BK (1996) Targeted disruption of the mouse β_1 -adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7375-7380.

Russell A, Watts S (2000) Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 598-604.

Rutherford JD, Pfeffer MA, Moye LA, Davis BR, Flaker GC, Kowey PR, Lamas GA, Miller HS, Packer M, Rouleau JL (1994) Effects of captopril on ischemic events after myocardial infarction. Results of the Survival and Ventricular Enlargement trial. SAVE Investigators. *Circulation* 90: 1731-1738.

Sadoshima J, Izumo S (1995) Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 77: 1040-1052.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

Sallinen J, Link RE, Haapalinna A, Viitamaa T, Kulatunga M, Sjöholm B, Macdonald E, Pelto-Huikko M, Leino T, Barsh GS, Kobilka BK, Scheinin M (1997) Genetic alteration of α_{2C} -adrenoceptor expression in mice: influence on locomotor, hypothermic,

and neurochemical effects of dexmedetomidine, a subtype-nonspecific α_2 -adrenoceptor agonist. *Mol Pharmacol* 51: 36-46.

Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type 1 receptor. *Nature* 351: 230-233.

Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ (1992) Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT_1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 253-259.

Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM (2000) Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 101: 1653-1659.

Schuman JS (1996) Clinical experience with brimonidine 0.2% and timolol 0.5% in glaucoma and ocular hypertension. *Surv Ophthalmol* 41 Suppl 1: S27-37.

Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Jr., Gaffney FA, Inagami T (2000) Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest* 106: R25-R29.

Shen YT, Cervoni P, Claus T, Vatner SF (1996) Differences in β_3 -adrenergic receptor cardiovascular regulation in conscious primates, rats and dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 1435-1443.

Literaturverzeichnis

Shen YT, Zhang H, Vatner SF (1994) Peripheral vascular effects of β_3 -adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 466-473.

Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC (1998) Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J* 17: 6649-6659.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.

Souney PF, Kaul AF, Osathanondh R (1983) Pharmacotherapy of preterm labor. *Clin Pharm* 2: 29-44.

Starke K, Endo T, Taube HD (1975) Pre- and postsynaptic components in effect of drugs with α -adrenoceptor affinity. *Nature* 254: 440-441.

Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T (1995) The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95: 651-657.

Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 9: 745-754.

Sung CS, Lin SH, Chan KH, Chang WK, Chow LH, Lee TY (2000) Effect of oral clonidine premedication on perioperative hemodynamic response and postoperative

analgesic requirement for patients undergoing laparoscopic cholecystectomy. *Acta Anaesthesiol Sin* 38: 23-29.

Susulic VS, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, Harper ME, Himms-Hagen J, Flier JS, Lowell BB (1995) Targeted disruption of the β_3 -adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 270: 29483-29492.

Taira N, Yabuuchi Y, Yamashita S (1977) Profile of β -adrenoceptors in femoral, superior mesenteric and renal vascular beds of dogs. *Br J Pharmacol* 59: 577-583.

Tanaka M, Tsuchida S, Imai T, Fujii N, Miyazaki H, Ichiki T, Naruse M, Inagami T (1999) Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT_1 -receptor in AT_2 -knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 194-198.

Thompson S, Clarke AR, Pow AM, Hooper ML, Melton DW (1989) Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56: 313-321.

Tigerstedt R, Bergman, PG (1898) Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol* 7-8: 223-271.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45: 205-251.

Trendelenburg AU, Hein L, Gaiser EG, Starke K (1999) Occurrence, pharmacology and function of presynaptic α_2 -autoreceptors in α_{2AD} -adrenoceptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360: 540-551.

Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Fogo A, Utsunomiya H, Inagami T, Ichikawa I (1998) Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101: 755-760.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T (1999) Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest* 104: 925-935.

Vatner DE, Knight DR, Homcy CJ, Vatner SF, Young MA (1986) Subtypes of β -adrenergic receptors in bovine coronary arteries. *Circ Res* 59: 463-473.

Vatner SF, Knight DR, Hintze TH (1985) Norepinephrine-induced β_1 -adrenergic peripheral vasodilation in conscious dogs. *Am J Physiol* 249: H49-56.

Vollmer RR, Baruchin A, Kolibal-Pegher SS, Corey SP, Stricker EM, Kaplan BB (1992) Selective activation of norepinephrine- and epinephrine-secreting chromaffin cells in rat adrenal medulla. *Am J Physiol* 263: R716-721.

Wellstein A, Belz GG, Palm D (1988) Beta adrenoceptor subtype binding activity in plasma and β -blockade by propranolol and β_1 -selective bisoprolol in humans. Evaluation with Schild-plots. *J Pharmacol Exp Ther* 246: 328-337.

Wilhelmsen L, Berglund G, Elmfeldt D, Fitzsimons T, Holzgreve H, Hosie J, Hornkvist PE, Pennert K, Tuomilehto J, Wedel H (1987) β -blockers versus diuretics in hypertensive men: main results from the HAPPHY trial. *J Hypertens* 5: 561-572.

Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A (1993) Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature* 365: 87-89.

Yamada H, Akishita M, Ito M, Tamura K, Daviet L, Lehtonen JY, Dzau VJ, Horiuchi M (1999) AT_2 -receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. *Hypertension* 33: 1414-1419.

Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, Yamakawa Y, Motley ED, Ichihara S, Inagami T (2000) Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35: 313-318.

Yoshida H, Kakuchi J, Guo DF, Furuta H, Iwai N, van der Meer-de Jong R, Inagami T, Ichikawa I (1992) Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human). *Biochem Biophys Res Commun* 186: 1042-1049.

7 Abkürzungsverzeichnis

α -AR	α -adrenerger Rezeptor (α_1 -AR/ α_2 -AR)
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
A	(1) Adenin, (2) Arterie
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
α MHC	schwere Kette des α -Myosins
AT _{1/2} -R	Angiotensin II AT ₁ /AT ₂ -Rezeptor
β -AR	β -adrenerger Rezeptor (β_1 -AR/ β_2 -AR/ β_3 -AR)
BCA	Biscinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CO ₂	Kohlendioxid
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dp/dt _{max}	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
F	French
g	(1) Gramm; (2) Erdbeschleunigung
G	(1) Gauge; (2) Guanosin
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
HA	Hämagglutinin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IgG	Immunglobulin G

Abkürzungsverzeichnis

IU	innerer Umfang
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	„knockout“
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mN	Millinewton
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MAP-Kinase	mitogen aktivierte Proteinkinase
n	Anzahl
NO	Stickstoffmonoxid
NP40	Nonidet® P40
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
RT	reverse Transkriptase
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM- α A	α -Aktin des glatten Muskels
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Transgen
T	Thymin

Abkürzungsverzeichnis

Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
V	(1) Vene, (2) Volt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Betreuung von Prof. Dr M.J. Lohse und Priv.-Doz. Dr. L. Hein angefertigt.

- Mein besonderer Dank gilt Prof. Lohse, der mir ermöglicht hat, während meiner AIP-Zeit an seinem Institut zu promovieren. Er stand mir in dieser Zeit immer mit Rat und Tat zur Seite und ermöglichte mir mehrmals, die gewonnen Ergebnisse auf verschiedenen Tagungen zu präsentieren. Eigene Gedanken und Vorschläge wurden inhaltlich immer kritisch miteinander besprochen und für die weiteren Überlegungen miteinbezogen. Ich freue mich darüber, dass ich auch nach Abschluß dieser Dissertation mein Projekt bei Prof. Lohse als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie weiterführen kann.
- Neben Prof. Lohse möchte ich vor allem Priv. Doz. L. Hein für seine tägliche Zusammenarbeit danken. Er stand mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit seinen Ratschlägen zur Seite, lernte mich in die unterschiedlichsten methodischen Fragestellungen ein und war auch für Fragen ausserhalb der Arbeit immer ein guter Zuhörer und Gesprächspartner.
- Weiterhin möchte ich den weiteren Mitarbeitern im Labor danken, die ich hier nicht alle einzeln aufführen möchte. Kerstin Hadamek möchte ich dennoch erwähnen, da Sie die beste Frau an der „bench“ war und viele Versuche mit mir zusammen durchführte und mir dabei die wichtigen kleinen „Feinheiten“ beibrachte.
- Dank gilt auch den kooperierenden Arbeitsgruppen, hier insbesondere Frau Dienisch aus der Medizinischen Klinik, die die Aortenstenosen für uns durchführte, Carsten Arnold und Prof. Graefe für die HPLC-Untersuchungen und weiterhin den Mitarbeitern aus dem Pathologischen Institut, die für mich einen Großteil der histologischen Schnitte anfertigten.
- Meiner Familie und im besonderen meiner Verlobten Anja Flunt möchte ich für die Geduld und aufmunternden Worte danken und für die häufig im Zusammenhang mit dieser Arbeit auftretende Zerstretheit im Alltag um Nachsicht bitten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Elmar-Marc Brede
Geboren am: 9.3.1972 in Würzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978-1982 Hofecker Grundschule Hof/Saale
1982-1991 Jean-Paul-Gymnasium Hof/Saale

- Abitur am 10.7.1991

Wehrdienst:

1991-1992 Grundwehrdienst in Donauwörth und Hof/Saale

Studium:

1992-1999 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen-Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

- Physikum am 13.9.1994
- I. Staatsexamen am 21.3.1996
- II. Staatsexamen am 26.3.1998
- III. Staatsexamen am 27.5.1999

Ärztliche Weiterbildung:

1.7.1999 – 31.12.2000 Beschäftigung als Arzt im Praktikum am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

- Approbation als Arzt am 1.1.2001

seit 1.1.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

Auszeichnungen:

- 2000 Posterpreis, Workshop on Current Concepts and Methods in Cardiovascular Research, German and European Society of Cardiology, Hannover
- 2000 Posterpreis, Hypertonie 2000, Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks, Heidelberg
- 2000 Young Investigator Award, Hypertonie 2000, Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks, Heidelberg

Übersichtsartikel:

- Brede M, Hein L (2001) Transgenic mouse models of angiotensin receptor subtype function in the cardiovascular system. *Reg. Peptides* 96, 125-132

Vorträge, Poster:

- Brede M, Meinel L, Seubert K, Hein L (2000) Vascular hypertrophy in mice with targeted deletion of the angiotensin AT₂-receptor gene. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361, R80
- Bücheler M, Brede M, Kobilka BK, Hein L (2000) Zwei verschiedene α_2 -adrenerge Rezeptor-Subtypen regulieren die Funktion und Struktur des kardiovaskulären Systems. *Z. Kardiol.* 89
- Brede M, Meinel L, Hein L (2000) Vaskuläre Hypertrophie bei transgenen Mäusen mit einer Deletion des Angiotensin-AT₂-Rezeptors. *Z. Kardiol.* 89
- Hein L, Brede M, Chruscinski A, Kobilka BK (2000) Differential distribution of β -adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking β_1 - or β_2 -adrenergic receptors. *Dtsch. med. Wschr.* 125, S97
- Brede M, Seubert K, Wiesmann F, Haase A, Hein L (2000) Angiotensin II AT₂ receptors are essential for vascular structure and function in gene-targeted mice. *Dtsch. med. Wschr.* 125, S76