

**Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl**

**Bedeutung des Endothelin_B-Rezeptors für Endothelfunktion
und Blutdruckregulation**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von
Christoph Carl Wunderlich
aus München**

Würzburg, Juni / 2005

Referent: Prof. Dr. med. J. Galle

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Gekle

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2005

Der Promovend ist Arzt

In Liebe
meinen Eltern
und
meinem Bruder
gewidmet

Abkürzungen und Erläuterungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Big-ET-1	Synthesevorstufe zu ET-1
c	Konzentration
c(NOS)	konstitutionelle NO-Synthase
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈	EDTA
C ₆ H ₁₂ O ₆	D(+)-Glucose-Monohydrat
ca.	zirka
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerol
DBH	Dopamine-β-Hydroxylase
EDRF	Endothelin-derived-relaxing-factor
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ENS	enterisches Nervensystem
ET	Endothelin
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ET-4	Endothelin-4
ET _A -Rezeptor	Endothelin _A -Rezeptor
ET _B -ko	Endothelin _B -Rezeptor-knock-out
ET _B -Rezeptor	Endothelin _B -Rezeptor
g	Gramm
HF	Herzfrequenz (Schläge/min)
HZV	Herzzeitvolumen
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ktrl	Kontrollgruppe
l	Liter
L-MNNA	L-M-Monomethylarginin
L-NAME	L-Nitroargininmethylester

Abkürzungen

M	Molare Masse (g/mol)
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	millimolar (mol/l)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger-RNA
mV	Millivolt
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NE	Norepinephrin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O ₂	Sauerstoff
OE	Organentnahme
pD ₂	Sensitivität
PGI ₂	Prostacyclin
Prepro-ET-1	Synthesevorstufe zu ET-1
RNA	Ribonukleinsäure
RR	systolischer Blutdruck
SEM	Standardabweichung
sec.	Sekunde
SNP	Natrium-Nitroprussid
t _{1/2}	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TPR	totaler peripherer Widerstand
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung und Fragestellung	1
1.2 Physiologie der Blutgefäße.....	3
1.2.1 Aufbau der Blutgefäße	3
1.2.2 Glatte Gefäßmuskelzellen	3
1.2.3 Funktion des Endothels	5
1.2.4 Regulation des Gefäßtonus	6
1.2.5 Mediatoren der Vasodilatation	7
1.2.6 Mediatoren der Vasokonstriktion	10
1.3 Physiologische Bedeutung von Endothelin.....	11
1.3.1 Verschiedene Endothelin-Formen	11
1.3.2 Endothelin-Rezeptoren	13
1.3.3 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten	18
1.4 Pathophysiologie der Hypertonie.....	20
1.4.1 Verschiedene Hypertonieformen	20
1.4.3 Bedeutung von Endothelin-1 in der Hypertonie.....	21
1.5 Salz-induzierte Hypertonie	24
1.6 ET_B-Rezeptor-knockout-Mäuse	26
2. Material	29
2.1 Geräte	29
2.2 Lösungen und Substanzen	29
2.2.1 Krebs-Henseleit-Puffer	29
2.2.2 Anästhetika	31
2.2.3 Vasoaktive Substanzen	31
2.3 Versuchstiere.....	33
2.4 Verbrauchsmaterialien	34
3. Methoden.....	35
3.1 Versuchsaufbau	35
3.1.1 Organkammeranordnung.....	35
3.1.2 Versuchsgruppen	36

3.2 Versuchsablauf	36
3.2.1 Messung der Vitaldaten	36
3.2.2 Anästhesie der Mäuse	37
3.2.3 Präparation der Gefäße	37
3.2.4 Fixation der Gefäßsegmente im Organbad	38
3.2.5 Versuchsdurchführung im Organbad	38
3.3 Statistik	40
4. Ergebnisse	42
4.1 Vitaldaten	42
4.2 Relaxationen	44
4.2.1 Endothel-abhängige Relaxationen auf Achetylcholin	44
4.2.2 Endothel-unabhängige Relaxationen auf Natrium-Nitroprussid	46
4.3 Kontraktionen	47
4.3.1 Kontraktionen auf Norepinephrin	47
4.3.2 Kontraktionen auf Endothelin-1	48
5. Diskussion	50
6. Zusammenfassung	56
7. Anhang	58
7.1 Tabellenverzeichnis	58
7.2 Abbildungsverzeichnis	59
7.3 Literaturverzeichnis	62

1. Einleitung

1.1 Einführung und Fragestellung

Kardiovaskuläre Erkrankungen führen die Liste der Todesursachen in den westlichen Industrieländern und Mitteleuropa an. Rund die Hälfte der Krankenhauseinweisungen sind auf Herz- und Kreislauferkrankungen zurückzuführen. Faktoren wie z.B. Geschlecht, Alter [1;2], arterielle Hypertonie [3;4], Diabetes mellitus [5], Adipositas und Rauchen [6] gelten dabei als Risikofaktoren für die Entstehung von Gefäßerkrankungen, indem sie artherosklerotische Veränderungen begünstigen [7]. Die hohe Morbidität der Herz- und Kreislauferkrankungen ist dabei auf die weite Verbreitung kardiovaskulärer Risikofaktoren in der Bevölkerung und deren oft multiples, gemeinsames Vorkommen zurückzuführen. Ihre hohe Mortalität ist hingegen zurückzuführen auf die mit der Beeinträchtigung des Herzens und des Blutkreislaufes assoziierten Organschädigungen. So stellt die arterielle Hypertonie, obwohl sie in der Regel keine subjektiven Beschwerden verursacht, einen signifikanten Risikofaktor für z.B. Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Apoplex und Nierenversagen dar.

In den letzten Jahren wurde die Erforschung der Wechselwirkungen auf Zell- respektive molekularer Ebene forciert und hat das Verständnis für kardiovaskuläre Erkrankungen, aber auch das Wissen über deren Komplexität stark erweitert [8;9]. Die vom Endothel physiologischerweise übernommenen regulatorischen Funktionen im kardiovaskulären System sind sehr vielfältig und wurden in zahlreichen Studien aufgezeigt [10]. Es zeigte sich, dass der Gefäßtonus nicht nur vom vegetativen Nervensystem oder zirkulierenden Hormonen, sondern auch durch Faktoren reguliert wird, die direkt vom Gefäßendothel freigesetzt werden (z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1). Insbesondere die für die Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutdrucks notwendige Regulation der Gefäßweite wird im Wesentlichen vom Endothel bestimmt [11;12].

Im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen und den damit assoziierten atherosklerotischen Gefäßveränderungen kommt es sowohl zu Alterationen der einzelnen Endothelzellen [13] als auch zur Beeinflussung des Endothels als Zellverband [14;15]. Die Beeinträchtigung oder Verletzung von Endothelzellen stört deren Funktionalität und kann zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion führen [16]. Direkt nachweisbar ist diese Funktionsstörung des Endothels durch die Messung des qualitativ und quantitativ sich verändernden Gefäßtonus nach Zugabe von vasoaktiven

Substanzen (z.B. Acetylcholin [17], oder Bradykinin [18]) am isolierten Gefäßabschnitt. Hierbei kann sich die endotheliale Dysfunktion sowohl in einer Veränderung der Gefäß-Relaxation als auch der Gefäß-Kontraktion manifestieren. Vom Endothel abhängiges, relaxierend wirkendes Stickstoffmonoxid [19] und vasokonstriktorisch wirkendes Endothelin-1 [20;21] spielen dabei, nebst zahlreichen anderen Transmittern, als Mediatoren der Vasomotion sowohl bei Gesundheit als auch bei kardiovaskulären und renalen Erkrankungen eine wichtige Rolle [22-24].

Man kennt heute drei Isoformen von Endothelin: Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). In den Gefäßendothelzellen wird in einem mehrstufigen Prozess in erster Linie Endothelin-1 produziert [25], ein 21-Aminosäure-Peptid, welches den stärksten bisher bekannten Vasokonstriktor darstellt. Die Wirkungen von Endothelin werden über mindestens zwei verschiedene Endothelin-Rezeptoren, den ET_A- und ET_B-Rezeptor, vermittelt [26;27]. In den letzten Jahren wurden Substanzen entwickelt, die in vitro die Wirkung von Endothelin am Rezeptor hemmen können [28]. Diese sogenannten Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ET-Antagonisten) werden herangezogen um die Bedeutung der Endothelin-Rezeptoren bei der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen näher zu untersuchen. Die genaue Funktion dieser Rezeptoren am Endothel ist in Bezug auf die Pathogenese der Hypertonie bis dato nicht eindeutig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung des Endothelin_B-Rezeptors (ET_B-Rezeptor) für die Endothelfunktion und die Blutdruckregulation am Tiermodell untersucht. Als Versuchstiere werden transgenetisch veränderte ET_B-ko-Mäuse und deren Wildtyp Geschwistertiere eingesetzt. Die Endothelfunktion wird, mittels Einsatz der Organkammer, anhand von mit vasoaktiven Substanzen induzierten Gefäßreaktionen charakterisiert. Gleichzeitig wird die Bedeutung des ET_B-Rezeptors für die Pathogenese der Salz-induzierten Hypertonie untersucht, indem die Auswirkungen eines erhöhten (4% NaCl) gegenüber eines normalen (0,2% NaCl) Salzgehaltes im Futter auf das Blutdruck-Verhalten von ET_B-ko-Mäusen bzw. deren Wildtyp Geschwistertieren untersucht werden. Es wird geprüft, ob in diesem Versuchsmodell ein ursächlicher Zusammenhang zwischen einer auftretenden endothelialen Dysfunktion und der Salz-induzierten Hypertonie besteht.

1.2 Physiologie der Blutgefäße

1.2.1 Aufbau der Blutgefäße

Der Aufbau der Blutgefäße ist je nach ihrer Lage im Systemkreislauf und bedingt durch ihre zu differenzierenden Funktionen als arterielle, venöse oder kapilläre Gefäße, unterschiedlich. Generell kann der Aufbau der Blutgefäße nach histologischen Kriterien in drei Schichten unterteilt werden. Von der Gefäßinnenseite nach außen gehend handelt es sich hierbei um die Tunica intima (Intima), die Tunica media (Media) und die Tunica externa (Adventitia).

Die Tunica intima setzt sich aus der Basalmembran, der Membrana elastica interna und dem einschichtigen Endothel zusammen, welches die Gefäßinnenwand vollständig auskleidet. Die Längsachsen der Endothelzellen liegen dabei parallel zur Blutflussrichtung. Die Tunica media besteht aus meist ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen, zwischen denen in unterschiedlicher Menge Elastin, Kollagen und Proteoglykane gelagert sind. Das Verhältnis von elastischem Bindegewebe zu glatter Muskulatur ist vom jeweiligen Gefäßtyp abhängig und richtet sich nach der spezifischen Funktion des Gefäßes im Systemkreislauf. In größeren Gefäßen lässt sich oft eine dünne Membrana elastica externa finden, die die Tunica media von der Tunica externa trennt. Die Tunica adventitia ist als äußerste Schicht hauptsächlich für die Verankerung der Blutgefäße im umliegenden Gewebe verantwortlich. Sie besteht zu einem großen Teil aus den Bindegewebsfasern Elastin und Kollagen und enthält vegetative Fasern zur Steuerung des Gefäßtonus und Vasa vasorum zur nutritiven Versorgung der Gefäße selbst.

1.2.2 Glatte Gefäßmuskelzellen

Je nach Lage und Funktion des Gefäßes im Systemkreislauf enthält die Tunica media in unterschiedlichem Ausmaß glatte Muskulatur. Sie besteht aus spindelförmigen, etwa 50-400 µm langen und etwa 2-10 µm dicken Zellen, die ein durch besondere Zellkontakte (Desmosomen) verknüpftes Netzwerk bilden.

Die Kontraktion erfolgt wie im Skelettmuskel durch den Gleitfilamentmechanismus, ist aber wesentlich langsamer, weniger energieaufwendig und deshalb besonders für lang

anhaltende Haltefunktionen geeignet. Das Ruhemembranpotential einer glatten Muskelzelle beträgt etwa -60 mV. Durch Einwirkung von aus Nervenendigungen freigesetzten Transmittern, durch im Blut zirkulierende Hormone oder aber auch spontan können Depolarisationen der Zellmembran auftreten, in deren Folge es zur Kontraktion der Muskelzelle kommt. Die Konzentration an freien Calciumionen im Zytosol spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontraktion einer glatten Muskelzelle. In Ruhe beträgt die intrazelluläre Calciumkonzentration etwa 10^{-7} mol/l. Als Calcium-Quelle für die zur Kontraktion benötigte Calciumerhöhung kommt neben dem sarkoplasmatischen Retikulum dem Extrazellulärraum große Bedeutung zu. Bei Auslösung der Muskelkontraktion erhöht sich die Ca^{2+} -Konzentration durch zwei verschiedene Mechanismen auf $0,5-1$ $\mu\text{mol/l}$. Zum einen entweder durch elektromechanische Koppelung während der Aktionspotentiale oder durch lang andauernde Depolarisation der Zellmembran, bei der spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet werden, so dass Ca^{2+} -Ionen vom Extrazellulärraum in das Myoplasma strömen können. Zum anderen führt eine Pharmakomechanische Koppelung zur Erhöhung des intrazellulären Calciums. Diese kann durch Pharmaka, Neurotransmitter oder Hormone ausgelöst werden [29]. Die Reaktion der Agonisten mit dem Membranrezeptor führt zur Öffnung rezeptorgesteuerter Calciumkanäle oder zur Bildung des intrazellulären Botenstoffes Inositoltriphosphat (IP_3). IP_3 entsteht zusammen mit Diacylglycerol (DAG) aus Phospholipiden der Zellmembran unter Einwirkung des Enzyms Phospholipase C. IP_3 setzt aus dem sarkoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} frei. Die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die Reaktionsfähigkeit der Myofilamente gegenüber Ca^{2+} ist für den Kontraktionszustand (Tonus) entscheidend. Dabei bindet Ca^{2+} an Kalmodulin. Dieser Ca^{2+} -Kalmodulin-Komplex aktiviert die Myosin-Leicht-Ketten-Kinase, die ihrerseits die leichten Ketten des Myosins phosphoryliert. Im Anschluss interagieren diese mit Aktin, und es werden die so gebildeten Myosinquerbrücken unter ATP-Spaltung zyklisch tätig, so dass der glatte Muskel kontrahiert. DAG aktiviert die Proteinkinase C, welche – ohne Ca^{2+} -Freisetzung – eine lang anhaltende tonische Kontraktion auslöst.

Glatte Muskeln erschlaffen, wenn die elektrische Aktivität endet und die Zellmembran repolarisiert oder hyperpolarisiert. Manche Pharmaka, Hormone und Neurotransmitter bewirken eine Relaxation, indem sie die glatten Muskelzellen durch Öffnen von Kaliumkanälen hyperpolarisieren oder aber eine Erhöhung der Konzentration zyklischer

Nukleotide, cAMP und cGMP, im Zytoplasma auslösen. cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) ist ein sekundärer Botenstoff, der G-Protein-vermittelt durch Aktivierung der Adenylatzyklase aus ATP entsteht. Dagegen wird der sekundäre Botenstoff cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) beispielsweise unter der Einwirkung von Stickstoffmonoxid (NO) produziert, welches vom Gefäßendothel freigesetzt wird. Der Grund für die relaxierende Wirkung der beiden cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP besteht zum einen in einer Förderung der Calciumrückresorption ins sarkoplasmatische Retikulum, zum anderen in einer Hemmung der Myosinkinase-Aktivität, indem die Calciumsensitivität der Myofilament verringert wird.

1.2.3 Funktion des Endothels

Das Blutgefäßsystem ist mit einem einschichtigen Plattenepithel aus Endothelzellen ausgekleidet, dem Endothel. Dieser geschlossene Zellverband setzt sich im Körper eines Erwachsenen aus ca. 6×10^{23} Zellen zusammen, was einem Gewicht von etwa 1,5 kg entspricht und eine Fläche von annähernd 5000m^2 bedeckt.

Es hat nicht nur die Aufgabe das Blut als mechanische Barriere zu kanalisieren [30], sondern spielt auch durch seine strategisch bedeutende Lage zwischen dem Blut (mit seinen zellulären Bestandteilen) und der glatten Gefäßmuskelschicht eine zentrale Rolle bei der Modulation des Gefäßtonus und Gefäßwachstums sowie bei der Abwehr potentiell schädlicher Einflüsse [30;31]. Das Endothel schützt z.B. die glatten Gefäßmuskelzellen vor luminalem oxidativem Stress [32]. Weiterhin ist es an der Fibrinolyse, der Thrombozytenaktivierung und -inhibition sowie der Monozytenadhäsion [33] beteiligt. Die Regulationsmechanismen und Interaktionen zwischen dem Endothel, den glatten Gefäßmuskelzellen und den im Blut zirkulierenden zellulären Bestandteilen wurden erst in den letzten Jahren erkannt und gewinnen zunehmend an Bedeutung [34;35].

Das Gefäßendothel ist in der Lage, sowohl vasodilatierend wirkende (z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin) als auch vasokonstriktorisch wirkende Substanzen (z.B. Thromboxane oder Endothelin-1) zu synthetisieren und zu sezernieren [13]. Hierbei regulieren die vom Endothel gebildeten Faktoren nicht nur den Blutdruck,

sondern beeinflussen auch die Plättchenadhäsion und -aggregation. Außerdem sind sie an der Entstehung und Progression von atherosklerotischer Gefäßveränderung und Thromben sowie der Zellproliferation beteiligt. Bei intaktem Gefäßendothel und unter physiologischen Bedingungen wird einerseits die Thrombozytenaggregation und Monozytenadhäsion unterdrückt, andererseits besteht ein Überschuss an Substanzen, welche die Migration und Zellproliferation glatter Gefäßmuskelzellen unterbinden. Im Alter, bei Hypertonie und bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen kann es zu Dysregulationen dieser gefäßeigenen Regulationsmechanismen kommen [36].

1.2.4 Regulation des Gefäßtonus

Über eine Modulation des Kontraktionszustandes der Gefäßmuskelzellen kann der Blutgefäßtonus variiert werden, was insbesondere für die Regulation der lokalen Durchblutung und damit für die adäquate Perfusion der Organe von Bedeutung ist. Während die großen herznahen Arterien den pulsatilen Blutfluss in den gleichmäßigen, peripheren Fluss umwandeln, sind die kleinen Widerstandsgefäße entscheidend für die Regulation des peripheren Widerstandes und die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutdrucks. Dieser konstante Blutdruck wird durch physiologische Kontrollsysteme über die Variation der Weite der Gefäßlumina gewährleistet und kontrolliert [37].

Die verschiedenen Regulationsmechanismen können auf der einen Seite einem lokalen, auf der anderen Seite einem systemischen Kontrollmechanismus unterworfen werden, wobei beim lokalen Kontrollmechanismus die myogene Autoregulation von der metabolischen, beim systemischen die nervale von der humoralen Regulation zu unterscheiden ist.

Die myogene Antwort (Bayliss-Effekt) beruht auf einer dehnungsinduzierten Kontraktion der Gefäßmuskulatur, die somit den Grundmechanismus für die Autoregulation der Organdurchblutung darstellt. Hierdurch kann die Durchblutung der nachgeschalteten Gefäße bei Blutdruckänderungen weitgehend konstant gehalten werden.

Die metabolische Kontrolle spiegelt die Regulation der lokalen Durchblutung aufgrund der momentanen Stoffwechselrate wider. Grundsätzlich wirken eine Erhöhung des CO₂-Partialdrucks bzw. der H⁺-Konzentration, eine Erhöhung der K⁺-Konzentration, eine

Steigerung der Gewebeosmolarität sowie eine Herabsetzung des arteriölen O_2 -Partialdrucks lokal vasodilatatorisch. In einigen Organen (Herz, Skelettmuskel, Gehirn) kommt außerdem dem Adenosin, welches beim zellulären Abbau von ATP gebildet wird, eine wichtige Rolle als metabolischer Dilator zu.

Eine nervale Kontrolle erfolgt primär über das sympathische Nervensystem, wobei hauptsächlich Arterien und Arteriolen durch dieses innerviert werden. Hierbei werden die Gefäße ständig auf einem vasokonstriktorischem Grund- oder Ruhetonus gehalten, der sowohl gesteigert als auch herabgesetzt werden kann [38].

Bei der humoralen Kontrolle können verschiedene endokrine Systeme über ihre zirkulierenden Hormone den Tonus der peripheren Gefäße beeinflussen. Diese wird durch Katecholamine, Kinine, Histamin, Prostaglandine und Serotonin vermittelt. Der vasokonstriktorischem und vasodilatatorische Effekt hängt dabei hauptsächlich von der Rezeptorbesetzung der Zielorgane ab.

1.2.5 Mediatoren der Vasodilatation

Bereits 1980 stellten Furchgott und Zawadzki fest, dass eine gefäßerweiternde Wirkung an isolierten Blutgefäßen nur in Gegenwart des Endothels auftritt [17]. Unterschiedliche Substanzen wie Neurotransmitter, Hormone und von Thrombozyten sezernierte Stoffe können zu einer Endothel-abhängigen Gefäßerweiterung führen [17;39]. Ebenso kann es durch vom zirkulierenden Blut hervorgerufene Scherkräfte oder Hypoxie zu einer Endothel-vermittelten Gefäßerweiterung kommen. Dieser Mechanismus spielt bei blutdrucksteigernden Situationen, insbesondere bei körperlicher Belastung eine entscheidende Rolle. Der dominierende Mediator in Bezug auf Endothel-abhängige Vasodilatation ist Stickstoffmonoxid (NO) [40-42].

Stickstoffmonoxid (NO):

Die Endothelzellen können die darunter liegende Schicht glatter Muskulatur durch Abgabe vasodilatierender Substanzen beeinflussen. Der wichtigste Mediator hierfür ist eine sehr kurzlebige Substanz ($t_{1/2} < 5\text{sec}$), die im amerikanischen Sprachgebrauch EDRF genannt [17] und als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert wurde [19].

Gebildet wird NO mittels der enzymatischen Aktivität der NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin [43] durch Oxidation des Guanidinnitrogen-Endes [44]. Der Katalysator NO-Synthase kommt in drei verschiedenen Isoformen [45] in Endothelzellen, Thrombozyten, Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und im Gehirn vor [46;47].

Es existieren außerdem eine konstitutionelle und eine induzierbare Form. Die konstitutionelle Form der NO-Synthase (cNOS) ist hauptsächlich an die Zellmembran gebunden und nur zu einem geringen Teil im Zytoplasma der Zellen gelöst [48]. Rezeptor-abhängige Transmitter wie Acetylcholin, Bradykinin, Substanz P und von Thrombozyten abhängige Substanzen wie Thrombin und Adenosindiphosphat sind in der Lage, das freie intrazelluläre Calcium zu erhöhen und damit indirekt die endotheliale NOS zu aktivieren, was zu einer Gefäß-Relaxation führt [49]. Zudem wird die Expression des NO-Synthase-Gens in Endothelzellen durch Scherkräfte verstärkt, die das zirkulierende Blut erzeugt und damit zu einer blutfluss-abhängigen Vasodilatation führt [50]. Des Weiteren wirken Hypoxämie und Östrogene verstärkend auf die NO-Synthase Genexpression.

Die induzierbare Form der NO-Synthase (iNOS), welche vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen, im Gefäßendothel und in Makrophagen gefunden wird, ist hingegen von Calcium unabhängig und in der Lage, große Mengen NO zu bilden. Ihre Expression wird durch Zytokine, beispielsweise Endotoxin, Interleukin-1b und Tumornekrosefaktoren induziert.

In Endothelzellen erfolgt die Sezernierung des gebildeten NOs sowohl auf der luminalen (endokrinen) als auch auf der abluminalen (parakrinen) Seite. Luminal in die Blutbahn freigesetzt wirkt es als antithrombotischer Faktor hemmend auf die Plättchenaggregation [43]. Auf der abluminalen Seite kommt dem Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks zu. Durch seine basale Freisetzung aus intakten Endothelzellen erfolgt eine kontinuierliche lokale Vasodilatation. So diffundiert NO zu den gefäßeigenen glatten Muskelzellen, welche anschließend durch Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase relaxieren. Hierbei kommt es zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), das eine Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration auslöst [51]. Die Bildung von NO kann pharmakologisch durch eine falsche, dem L-Arginin ähnliche Aminosäure, L-M-Monomethylarginin (L-MNNA) oder L-Nitroargininmethylester (L-NAME) gehemmt

werden. An der katalytischen Stelle der NO-Synthase führt dies zu einer kompetitiven Hemmung [52]. Bei Stickstoffmonoxid handelt es sich um eines der wichtigsten bekannten gefäßrelaxierenden Hormone [53]. Außer NO werden in den Endothelzellen noch weitere gefäßerweiternde Substanzen wie z.B. Prostacyclin, ein Prostaglandinderivat, synthetisiert.

Acetylcholin (Ach)

Beim Acetylcholin handelt es sich um den Essigsäureester des Cholins, das als physiologischer Neurotransmitter an zahlreichen Nervenendigungen freigesetzt wird und Überträgerfunktionen ausübt. Acetylcholin kommt als Transmitter an den effektorischen Synapsen des Parasympathikus, an allen prä- und einigen postganglionären effektorischen Synapsen des Sympathikus und an den motorischen Endplatten in der Muskulatur vor. Acetylcholin wird durch die Cholinacetylase synthetisiert, an den Übertragungsstellen in Vesikeln gespeichert und bei Nervenregung in Quanten freigesetzt. Durch Bindung an nikotin- oder muskarinerge Rezeptoren des Erfolgsorgans öffnet oder moduliert es Ionenkanäle in der Membran. Die Wirkungsdauer des Acetylcholins ist wegen des schnellen hydrolytischen Abbaus durch die Acetylcholinesterase in Cholin und Acetat sehr kurz. Seine pharmakologische Wirkung besteht in einer Blutdrucksenkung durch Vasodilatation, Bronchokonstriktion, Tonussteigerung des Darmes, Zunahme der Drüsensekretion und einer negativ chronotropen sowie negativ inotropen Wirkung am Herzen.

Natrium-Nitroprussid (SNP)

Natrium-Nitroprussid ist eine anorganische, lichtempfindliche Komplexverbindung, die durch NO-Freisetzung zu einer Vasodilatation arterieller Widerstands- und venöser Kapazitätsgefäße führt. Die Substanz wird medikamentös in Form einer Infusionslösung zur akuten Blutdrucksenkung eingesetzt. Die Wirkungsweise von Natrium-Nitroprussid ist streng dosisabhängig, die Wirkungsdauer sehr kurz. Da im Körper aus Natrium-Nitroprussid neben NO auch noch Zyanid freigesetzt wird, kann eine Überdosierung durch Überlastung der Rhodanid-Synthetase zu einer Zyanid-Vergiftung führen.

1.2.6 Mediatoren der Vasokonstriktion

Das Endothel produziert außer vasodilatierende Substanzen auch vasokonstriktorische Faktoren, wie Endothelin oder Metaboliten des Zyklooxygenasestoffwechsels (z.B. Thromboxan A₂ und Prostaglandin H₂) und das Angiotensin-Converting-Enzym, welches die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems reguliert.

Norepinephrin (NE)

Norepinephrin stellt ein pharmakologisches Analogon zu Noradrenalin (NA) dar, ein zu den Katecholaminen gehörender Neurotransmitter des Sympathikus. Noradrenalin wird sowohl in den Ganglienzellen des gesamten sympathischen Nervensystems als auch in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks neben Adrenalin gebildet. Im Rahmen der Biosynthese entsteht Noradrenalin über die Zwischenstufen 3,4-Dihydrophenylalanin und Dopamin aus der essentiellen Aminosäure L-Tyrosin. Chemisch betrachtet fehlt dem Noradrenalin im Unterschied zu Adrenalin eine Methylgruppe an der Aminogruppe, was seine schwächeren und zum Teil gegensätzlichen Wirkungen erklärt. Nach Zufuhr von Noradrenalin steigen systolischer und diastolischer Blutdruck unter anderem durch kontraktionsbedingte Verengung der Widerstandsgefäße an. Vermittelt wird die Kontraktion über α_1 -Rezeptoren, die G-Protein gekoppelt die Phospholipase C aktivieren. Daraufhin kommt es zur intrazellulären IP₃- und DAG-Erhöhung, was wiederum zu einem Anstieg von intrazellulärem Calcium und damit zur Kontraktion führt.

Endothelin-1

Bei Endothelin-1, dem bedeutendsten Vertreter der Endothelin-Familie, handelt es sich um den stärksten Vasokonstriktor in vivo [54] und um ein Hormon dessen Bedeutung und Interesse in den letzten Jahren stetig zugenommen hat (siehe 1.3.1).

1.3 Physiologische Bedeutung von Endothelin

1.3.1 Verschiedene Endothelin-Formen

Im Jahre 1985 wurde erstmals eine vasokonstriktorisch enzymatische Aktivität beschrieben, deren Produktionsursprung sich in den Endothelzellen befindet [20;21]. Kurze Zeit später gelang es M. Yanagisawa dieses Peptid aus 21 Aminosäuren, namens Endothelin (ET), aus Gefäßzellen zu isolieren und zu identifizieren [55].

Zur Familie der Endotheline gehören inzwischen vier 21-Aminosäure Peptide: ET-1, ET-2, ET-3 [56] und ET-4 [57]. Bei ET-4 handelt es sich um einen vasoaktiven intestinalen Konstriktor, welcher bei Maus und Ratte vorkommt und welcher ein Analogon zum humanen ET-2 darstellt [56;58].

Endothelin-1

Bei ET-1 handelt es sich um die dominierende Isoform aus der Endothelin-Peptid-Familie bei Säugetieren [25;59]. Es ist der stärkste bisher bekannte Vasokonstriktor in vivo [54] und außerdem der einzige ET-Vertreter, der auch in den Gefäßendothelzellen produziert wird, welche gleichzeitig seine größte Quelle im Organismus darstellen [60]. Dort wird ET-1 nach Bedarf synthetisiert, erfährt also keinerlei granuläre Speicherung

[61]. Die ET-1 Synthese wird reguliert durch physikalisch-chemische Faktoren [62] (z.B. Hypoxie), durch Vasokonstriktoren [63;64], Wachstumsfaktoren [65], pH [66], Zytokine [67] und Adhäsionsmoleküle [68]. Diese induzieren die Transkription von ET-1-messenger-RNA (mRNA) und damit die innerhalb von Minuten einsetzende Synthese und Sekretion von ET-1. Die Halbwertszeit der mRNA beträgt zwischen 15 und 20 Minuten [69]. Es werden mehrere weniger wirksame Vorstufen, das Prepro-Endothelin sowie das Big-Endothelin, durchlaufen, bevor es durch Abspaltung mittels des Endothelin-Converting-Enzyms (ECE) zur Bildung des

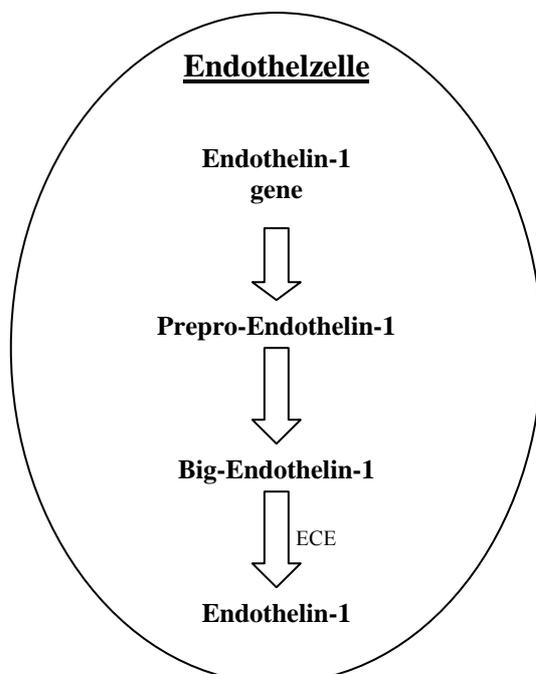


Abb. 1.1: Biosynthese des Endothelin-1 über seine Vorstufen.

ET-1 kommt [70] (Abb. 1.1). Hemmend auf die ET-1 Synthese wirken NO [71], Prostacycline [72], ANP [73] und Östrogene [74].

Nahezu 75% der ET-1 Sekretion erfolgt in Richtung glatter Muskulatur, d.h. auf die abluminale Seite [75]. Dort kann es an spezifische Rezeptoren der Muskelzellen anbinden und für Vasokonstriktion sorgen. Die physiologisch basale Konzentration von Endothelin im Blutserum ist sehr gering und bewegt sich im pikomolaren Bereich. Insofern handelt es sich bei ET-1 eher um ein parakrines als um ein endokrines Hormon. Der Abbau von Endothelin-1 erfolgt vorwiegend (ca. 70%) in der Lunge, [76] der Leber und den Nieren [77;78]. Nachdem das Hormon durch die Zellen aufgenommen worden ist, wird es durch eine neutrale Endopeptidase hydrolysiert. Infolge der schnellen Aufnahme in die Zielzellen hat Endothelin-1 nur eine kurze Plasmazirkulations-Halbwertszeit von ca. 3-4 Minuten [79]. Obwohl das Peptid bereits nach kurzer Zeit metabolisiert wird, hält seine Wirkung noch lange an, was nach gegenwärtigem Stand des Wissens auf einen Post-Rezeptor-Effekt zurückzuführen ist.

Insofern können die Gefäßendothelzellen auf Grund der innerhalb von Minuten einsetzenden Synthese und Sekretion sowie der kurzen Halbwertszeit von ET-1, dessen Produktion auf lokaler Ebene rasch an den Regulationsbedarf des Gefäßtonuses anzupassen. Neben den hier primär behandelten Endothelzellen wird ET-1 von Neuronen und Astrozyten im ZNS, in den Mesangialzellen der Nieren, in den Zellen des Endometriums und in den Hepatozyten der Leber sowie in den Sertoli-Zellen des Hodens als auch in den Epithelzellen der Brust gebildet [80;81].

Endothelin-2

ET-2 wird hauptsächlich im Darm und den Nieren [82] produziert und in geringerem Umfang im Myokard, der Plazenta und dem Uterus. Der genaue zelluläre Produktionsort ist bis dato jedoch nicht bekannt. Verglichen mit ET-1 kann ET-2 keine eindeutige physiologische Funktion zugeordnet werden.

Endothelin-3

ET-3 wurde in hohen Konzentrationen im ZNS [83] nachgewiesen. Es wird vermutet, dass es dort wichtige Funktionen bei der Entwicklung und Proliferation von Astrozyten und Neuronen mitsteuert. Außerdem ließ sich ET-3 im Gastrointestinaltrakt, der Lunge und in den Nieren [82] nachweisen.

1.3.2 Endothelin-Rezeptoren

Die biologischen Effekte der Endotheline werden durch Aktivierung von spezifischen Rezeptoren vermittelt. Der erste molekulare Beweis für die Existenz zweier unterschiedlicher Rezeptortypen (ET_A- und ET_B-Rezeptor) konnte 1990 durch H. Arai und T. Sakurai et al. erstellt werden [26;27]. Seitdem ist es gelungen diese zwei Endothelin-Rezeptoren in vielen Tieren, unter anderem auch Säugetieren, nachzuweisen [26;27;84;85]. Auf molekularer Ebene handelt es sich um membrangebundene, aus sieben Transmembran-Domänen bestehende Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind. In vielen Versuchsreihen konnten unterschiedliche Lokalisationen und Funktionen dieser Rezeptoren in unterschiedlichsten Spezies detektiert werden [86].

In Bezug auf das Gefäßsystem werden ET_A-Rezeptoren hauptsächlich der glatten Muskulatur exprimiert [87]. ET_B-Rezeptoren finden sich dagegen in erster Linie auf Endothelzellen und in kleinerem Umfang auf Zellen der glatten Muskulatur und Makrophagen [87]. Am ET_A-Rezeptor binden ET-1 und ET-2 mit 100fach höherer Affinität als ET-3. Im Gegensatz dazu weist der ET_B-Rezeptor für alle drei Endothelin-Isoformen die gleiche Affinität auf [88].

ET_A-Rezeptoren spielen hauptsächlich bei der Vasokonstriktion [20;25;26] und Zellproliferation [89] eine Rolle. Bei Bindung von ET-1 am ET_A-Rezeptor wird die Vasokonstriktion G-Protein-gekoppelt über Aktivierung der Phospholipase C vermittelt. Diese Phospholipase führt einerseits zur Akkumulation von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und somit zur Erhöhung von intrazellulärem Calcium, was eine lang anhaltende Vasokonstriktion zur Folge hat [20;25;90]. Andererseits wird Diacylglycerol aktiviert, welches neben Calcium ebenfalls die Proteinkinase C stimuliert und damit für den zellproliferativen Effekt von ET-1 verantwortlich ist [91]. Selbst nach Entfernung von ET-1 vom Rezeptor bleibt die Vasokonstriktion bestehen, zurückzuführen wahrscheinlich auf eine gleich bleibend erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration [92]. NO verkürzt hingegen die Kontraktionsdauer durch Beschleunigung des Konzentrationsabfalls von intrazellulärem Calcium auf dessen Ausgangswert [93].

Der ET_B-Rezeptor wird in charakteristischer Weise in den Zellen exprimiert, die eine wichtige Funktion bei der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse spielen, wie z.B. bei der Modulation der Gefäßwiderstandes, der Natriurese, der Leberfunktion oder der neuronalen Aktivität [94-97].

In Bezug auf den Gefäßwiderstand konnten ET_B -Rezeptoren auf dem Endothel und der Tunica media von Blutgefäßen nachgewiesen werden [87]. Die Affinität aller drei Endothelin-Isoformen zum Rezeptor ist gleich stark ausgeprägt [88].

ET-1 bewirkt durch Bindung an den Endothelzellen lokalisierten ET_B -Rezeptoren eine Freisetzung von Vasodilatoren wie NO, Prostacyclin und Adrenomedullin [98-100]. Durch diese Wirkung kommt es vermutlich bei systemischer Gabe von ET-1 initial zu einem leichten Blutdruckabfall. Die Prostacyclin-Erhöhung führt cAMP-vermittelt, die NO-Erhöhung cGMP-vermittelt zur Vasodilatation (Abb. 1.2). NO wirkt zum einen als physiologischer Antagonist in Bezug auf die Vasokonstriktion, zum anderen hat es einen negativen Effekt auf die Transkription von ET-1-Vorstufen und damit auf die ET-1 Synthese [101]. Auch konnte eine Expressionshemmung des Endothelin-Converting-Enzyms durch NO in Endothelzellen nachgewiesen werden [102].

Ebenfalls ET_B -Rezeptor vermittelt ist die Wiederaufnahme von ET-1 in die Endothelzellen [103] und die pulmonale Clearance von im Plasma zirkulierendem ET-1 [104]. Nahezu 50 % des gesamten Endothels des Gefäßbaumes beim Menschen befindet sich in der Lunge. Diese besitzt damit die größte Dichte an ET_B -Rezeptoren. Obgleich andere Organe wie Niere und Milz ebenfalls an der Clearance von ET-1 beteiligt sind, bindet sie bei jeder Lungenpassage etwa 60% des zirkulierenden ET-1 [76;105]. Diese pulmonale Clearance-Kapazität ist bei Tieren, behandelt mit einem selektiven ET_B -Rezeptor-Antagonist gegenüber denjenigen Tieren, die mit einem selektiven ET_A -Rezeptor-Antagonisten behandelt, wurden signifikant verringert. Diese Beobachtung bestätigten Gratton et al. [106], die einen L-NAME-abhängigen Anstieg von zirkulierendem Big-ET-1 nachweisen konnten. Dies zeigt die Bedeutung des ET_B -Rezeptors für die Aufrechterhaltung eines niedrigen Plasmalevels von ET-1.

Normalerweise existiert eine Balance zwischen Produktion und ET_B -Rezeptor-vermittelter Clearance von ET-1, so dass das zirkulierende ET-1 auf einem niedrigen Level gehalten wird. Im physiologischen Normalzustand wird durch die Stimulation der auf den glatten Muskelzellen exprimierten ET_A -Rezeptoren vasokonstriktorische und mitogene Effekte vermittelt, welche durch Aktivierung der ET_B -Rezeptoren auf den Endothelzellen gegensätzlich beeinflusst werden (Abb. 1.2) [107].

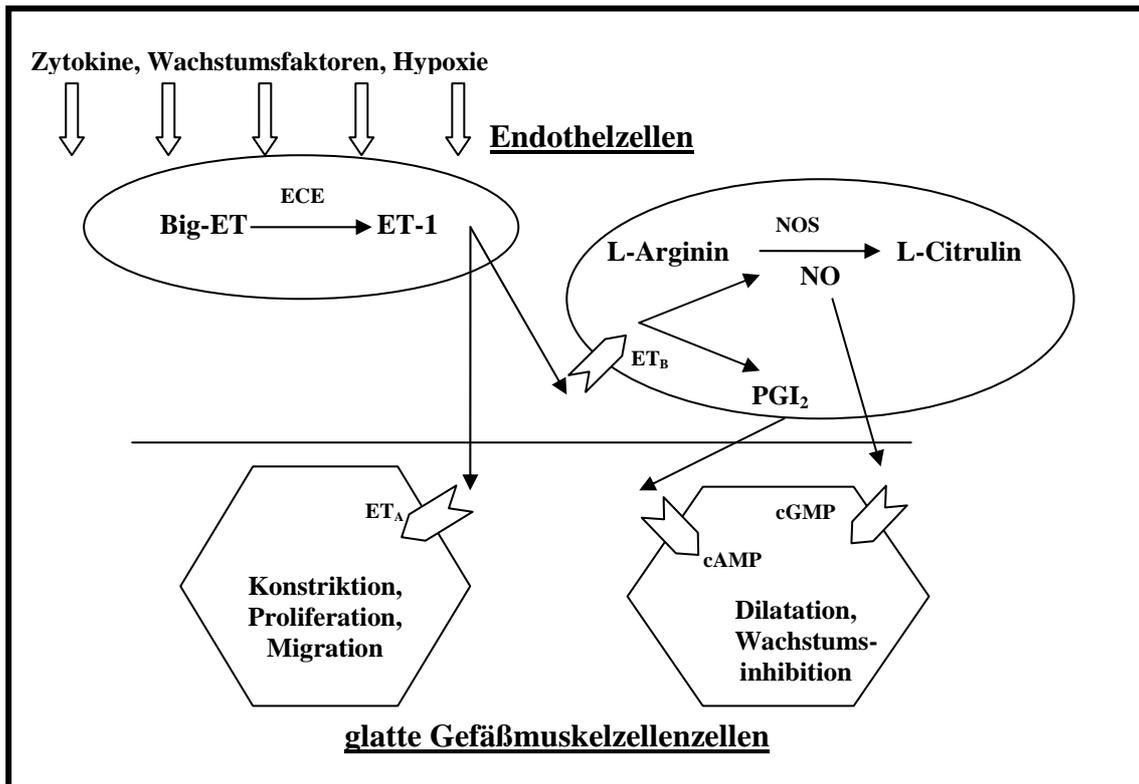


Abb. 1.2: Interaktion zwischen ET-1 auf Endothel- und glatten Gefäßmuskulzellen mittels der ET_A- und ET_B-Rezeptoren. Hierbei wird die potentielle Rolle von ET-1 bei der Regulation des Gefäßtonuses gezeigt. Physiologischer Weise reagieren die Endothelzellen nach Stimulation durch z.B. Zytokine, Hypoxie oder Wachstumsfaktoren mit einer erhöhten ET-1 Produktion. Der Nettoeffekt wird zum einen reflektiert durch die ET_A-Rezeptor Expression auf den glatten Gefäßmuskulzellen, die Konstriktion, Proliferation und Migration vermitteln, zum anderen durch die ET_B-Rezeptoren auf den Endothelzellen, die indirekt Wachstums-hemmung und Vasodilatation durch NO- und Prostacyclin Produktion vermitteln.
ECE: ET-Converting Enzym, NOS: NO-Synthase, PGI₂: Prostacyclin, cAMP: zyklisches AMP, cGMP: zyklisches GMP.

Der ET_B-Rezeptor hat somit eine dynamische Funktion bei Aufrechterhaltung des systemischen Blutdrucks bei Tieren [106;108;109] und des totalen peripheren Widerstandes beim Menschen [94]. Im Tiermodell konnte durch systemische Gabe eines selektiven ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ 788 ein signifikanter Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks und zusätzlich ein erhöhter Plasmalevel an immunoreaktivem ET-1 und seinem Vorläufer Big-ET-1 verursacht werden [106]. Des Weiteren konnte eine Reduktion des brachialen arteriellen Blutflusses durch lokale Verabreichung eines selektiven ET_B-Rezeptor-Antagonisten bei gesunden Probanden beobachtet werden [110]. Strachnan et al. [94] konnten zeigen, dass eine systemische Verabreichung von BQ 788 bei gesunden Probanden sowohl zu einem Anstieg des

totalen peripheren Widerstandes als auch zu einer Absenkung des renalen Blutflusses führte, was ebenfalls für eine vasodilatatorische Wirkungsvermittlung durch den ET_B-Rezeptor spricht.

Bei partieller fehlender Expression des ET_B-Rezeptors bei heterozygoten knockout Mäusen kam es im Vergleich mit ihren Wildtyp Geschwistertieren zu einem signifikant höheren arteriellen Blutdruck [109]. Der Bluthochdruck war unter Gabe eines selektiven ET_A-Rezeptor-Antagonisten oder eines gemischten ET_A-/ET_B-Rezeptor-Antagonisten vollständig reversibel. Bei Verabreichung eines selektiven ET_B-Rezeptor-Antagonisten war kein Einfluss erkennbar. Dies lässt vermuten, dass in Verhältnissen, in denen 40-50% der ET_B-Rezeptor-Proteine eine Mutation aufweisen, sich die blutdruckändernde Wirkung von zirkulierendem ET-1 hauptsächlich über die ET_A-Rezeptoren der Widerstandsgefäße bemerkbar macht. Bei Behandlung dieser heterozygoten knockout Mäuse und deren Wildtyp Geschwistertieren mit BQ 788 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Clearance von intravaskulärem radioaktiv markiertem ET-1. Diese bisherigen Ergebnisse verdeutlichen eine vasodilatatorische und blutdrucksenkende Rolle des ET_B-Rezeptors *in vivo*.

Des weitern konnten ET-Rezeptoren in der Niere nachgewiesen werden. Im Rahmen mehrerer Studien [111-114], die sich mit der Bedeutung von ET-1 bei der Nierenfunktion beschäftigten, konnten zwei direkte Hauptaufgaben für ET-1 klar identifiziert werden. Zum einen besteht eine Beziehung zwischen der renalen Hämodynamik und den vasoaktiven Fähigkeiten von ET-1, zum anderen wird die Wasser- und Natriumausscheidung durch die Wirkung von ET-1 an den tubulären Epithelzellen moduliert. Betrachtet man die ET-Rezeptor-Expression in der Niere, so zeigt sich, dass ET-1 bei der Modulation der Nierenfunktion lokal fungiert [113]. So lässt sich der ET_A-Rezeptor auf glatten Gefäßmuskel- und glomerulären Mesangialzellen nachweisen, wohingegen der ET_B-Rezeptor hauptsächlich auf den Endothelzellen lokalisiert ist. Beide Rezeptoren sind hierbei an der Regulation der renalen Hämodynamik und glomerulären Filtrationsrate beteiligt. Im Rahmen der renalen Hämodynamik wird der vasokonstriktorische Effekt von ET-1 hauptsächlich über den ET_A-Rezeptor vermittelt [115;116]. So konnte nachgewiesen werden, dass eine systemische und intrarenale Infusion von ET-1 den renalen Gefäßwiderstand erhöhte und damit eine Verminderung der Nierendurchblutung und glomerulären Filtrationsrate durch Konstriktion der afferenten und efferenten Arteriolen wie auch der glomerulären Mesangialzellen

verursachte [117]. Kompensiert wird dieser vasokonstriktorisches Effekt durch ET_B -Rezeptor-vermittelte Freisetzung von Endothel-abhängigen relaxierenden Faktoren wie NO, Prostacyclin (PGI_2), c-typisches natriuretisches Peptid und Adrenomedullin [76;99;100;106;118]. Es konnte gezeigt werden, dass sich die renale Hämodynamik unter konstantem vasodilatatorischem Einfluss von NO befindet [119]. Des Weiteren ist der ET_B -Rezeptor in geringem Ausmaß an den Epithelzellen des proximalen Tubulus, in größerem Umfang an den Epithelzellen des innermedulären Sammelrohres exprimiert und somit in die Regulation der Natrium und Wasser Reabsorption eingebunden [97;113;120].

Obwohl eine hämodynamische Veränderung - durch ET-1 Infusion induziert - zu einer Verringerung der Urin- und Natriumausscheidung führt [121], bewirkt die lokale ET-1 Produktion (durch Osmolarität reguliert) entgegengesetzte Wirkungen in Form von Diurese und Natriurese [122-124]. Zum einen verhindert ET-1 durch direkte Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase Aktivität im proximalen Tubulus und Sammelrohr [125] die Natriumreabsorption, zum anderen unterbricht ET-1 die vasopressin-induzierte cAMP-Akkumulation und Wasserreabsorption im innermedulären Sammelrohr [126;127]. Diese Effekte kommen durch ET_B -Rezeptor vermittelte NO-Freisetzung und cGMP-Akkumulation in Epithelzellen der Niere zustande [128;129].

Die Regulation der Endothelin-Rezeptor-Produktion läuft häufig parallel zu der des Endothelins. So stellen Hypoxie und Cyclosporine ein Stimulanzium sowohl für die Produktion von ET-1 als auch für die von ET_A -Rezeptoren auf Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur dar [80]. Epidermaler Wachstumsfaktor, Fibroblastenwachstumsfaktor, zyklisches AMP und Östrogene führen zur erhöhten Expression von ET_A -Rezeptoren, dagegen kommt es durch den Einfluss von Endothelinen, Angiotensin II und Platelet Growthfactor β zu einer Runterregulation. Induziert wird die Synthese des ET_B -Rezeptors durch C-type natriuretisches Hormon, Angiotensin II und Fibroblastenwachstumsfaktor, die Runterregulation erfolgt durch zyklisches AMP und Katecholamine [130].

1.3.3 Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

Zur pharmakologischen Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen konnten seit der Identifizierung und Isolierung von Endothelin zwei Substanztypen entwickelt werden. Eine Substanzgruppe sind die ECE-Hemmer, durch welche die Bildung von ET-1 aus Big-ET-1, vermittelt durch das Endothelin-Converting-Enzym selektiv gehemmt wird [131-134]. Die derzeit verfügbaren Stoffe hemmen die ECE allerdings noch nicht spezifisch genug und stehen noch nicht für klinische Studien zur Verfügung. Bei der anderen Substanzgruppe handelt es sich um die sogenannten Endothelin-Rezeptor-Antagonisten. Sie sind Substanzen, die kompetitiv an Endothelin-Rezeptoren binden. Einige dieser Antagonisten hemmen spezifisch den ET_A-Rezeptor, während andere sowohl den ET_A- als auch den ET_B-Rezeptor oder nur den ET_B-Rezeptor hemmen [28]. Diese bieten nicht nur die Möglichkeit, die physiologische und pathophysiologische Rolle der einzelnen Rezeptoren im Organismus verschiedener Spezies zu untersuchen, sondern stellen mittlerweile einen neuen Therapieansatz bei verschiedenen Krankheitsbildern dar [135]. Eine Reihe dieser Substanzen werden heute in unterschiedlichsten Studien eingesetzt. Pharmakologisch können diese Stoffe nach ihrer Rezeptorspezifität eingeteilt werden. Chemisch können Sie zusätzlich in Peptid- und Nicht-Peptid-Moleküle unterteilt werden (Tab. 1.1).

ET Rezeptorspezifität

ET _A	ET _B	ET _A /ET _B
Peptid-Molekül		
BQ 123	BQ 788	PD 142893
BQ 485	IRL 1038	PD 145065
BQ 610		TAK 044
FR 139317		
Nicht-Peptid-Molekül		
PD 155080		Bosentan
PD 156707		R O46-2005
BMS 182874		L - 754142
A - 127722		L - 751281
		SB 209670
		SB 217242
		RO 470203
		CP 170687
		LU 135252

Tab. 1.1: Rezeptor-selektive und Rezeptor-unselektive Substanzen in Bezug auf den ET_A und ET_B-Rezeptor in der Übersicht [136].

In der vorliegenden Arbeit wurde BQ 788 als selektiver ET_B-Rezeptor-Antagonist und BQ 123 als selektiver ET_A-Rezeptor-Antagonist eingesetzt.

1.3.3.1 BQ 123

BQ 123 verursacht eine extrem starke kompetitive Hemmung der ET-1 Bindung an den ET_A-Rezeptor. Die Bindung von ET-1 an den ET_B-Rezeptor sowie die Bindung einer großen Anzahl anderer Peptide an deren Rezeptoren wird dagegen nicht oder nur geringfügig gehemmt [137]. Durch BQ 123 wurde die Konzentrationsantwortkurve von ET-1 bei isolierten Schweine-Koronararterien nach rechts verschoben, d. h. es waren höhere ET-1 Konzentrationen bei Inkubation mit BQ 123 nötig um eine gleich starke Kontraktion wie bei der ohne Inkubation zu erreichen, was den kompetitiven Antagonismus am ET_A-Rezeptor beweist [137]. Außerdem konnte durch BQ 123 sowohl der Effekt von ET-1 auf den systemische Blutdruck [138] als auch die durch ET-1 induzierte Mitogenese von Zellen der glatten Muskulatur [139] verhindert werden. Dieser potente selektive ET_A-Rezeptor-Antagonist ermöglicht somit die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des ET_A-Rezeptors zu untersuchen.

1.3.3.2 BQ 788

Bei BQ 788 handelt es sich um einen umfangreich verwendeten Stoff zur Untersuchung von endogenem oder exogenem Endothelin in vitro und in vivo. In vitro kommt es bei Cirrardi-Herzzellen zu einer potenten und kompetitiven Hemmung des ET_B-Rezeptors gegenüber ET-1. Die Bindung von ET-1 am ET_A-Rezeptor an humanen Neuroblastomazellen wurde jedoch kaum gehemmt [140]. An isolierten Hulmoalarterien konnte nach BQ 788-Gabe auf Grund seiner kompetitiven Hemmung kein agonistischer Effekt durch einen spezifischen ET_B-Rezeptor-Agonisten nachgewiesen werden [140]. BQ 788 hemmt neben einigen biologischen Aktivitäten von ET-1, wie zum Beispiel Bronchokonstriktion und Zellproliferation auch die Clearance von zirkulierendem ET-1. In vivo inhibierte BQ 788 im Rattenmodell komplett die ET_B-Rezeptorantwort auf eine pharmakologische ET-1 Dosis, wobei die blutdrucksenkende Wirkung im Gegensatz zur blutdruckerhöhenden vollständig aufgehoben war. Des Weiteren erhöhte BQ 788 merklich die Plasmakonzentration von

ET-1, dieses kann als Hinweis auf eine potente Blockade des ET_B -Rezeptors angesehen werden. In Dahl Salz-sensitiven hypertensiven Ratten wurde der Blutdruck durch die Gabe von BQ 788 um 20 mmHg erhöht [140]. Außerdem wird berichtet, dass BQ 788 sowohl die ET-1 induzierte Brochokonstriktion als auch Tumorwachstum und Lipopolysaccharid-induzierte Organschäden hemmt [140].

1.4 Pathophysiologie der Hypertonie

1.4.1 Verschiedene Hypertonieformen

Der arterielle Blutdruck setzt sich beim Säugetier aus dem Produkt von Herzzeitvolumen (HZV) und totalem peripheren Widerstand (TPR) zusammen (Ohm-Gesetz), wobei es sich bei dem Herzzeitvolumen um ein Produkt aus Schlagvolumen und Herzfrequenz (HF) handelt. Unter Hypertonie versteht man definitionsgemäß einen zu hohen Druck im arteriellen Kreislaufsystem. Beim Menschen wird die Hypertonie in Bezug auf Schweregrad der Symptomatik in ein differenziertes Stufenschema eingeteilt. Der Hypertonus ist physiologisch äthiologisch entweder bedingt durch eine Erhöhung des HZV oder des TPR, oder beiden Faktoren in Kombination. Im ersteren Fall handelt es sich um einen sogenannten hyperdynamischem Hochdruck, der entweder auf einer gesteigerten HF oder einem erhöhten Extrazellulärvolumen beruht, im zweiten Fall um einen sogenannten Widerstands-Hochdruck, der neben einer Viskositäts-erhöhung des Blutes vor allem eine abnormal starke periphere Vasokonstriktion zur Ursache haben kann.

In 95% der Fälle ist die Äthiologie des Hypertonus unbekannt, d.h. es handelt sich um eine sogenannte essentielle Hypertonie.

Nur bei einem kleinen Teil (ca. 5%) der Patienten kann eine hormonale (z.B.: Phäochromozytom, Cushing-Syndrom) oder renale (z.B.: Nierenarterienstenose) Erkrankung als Ursache eines Hypertonus detektiert werden (sekundäre Hypertonie)

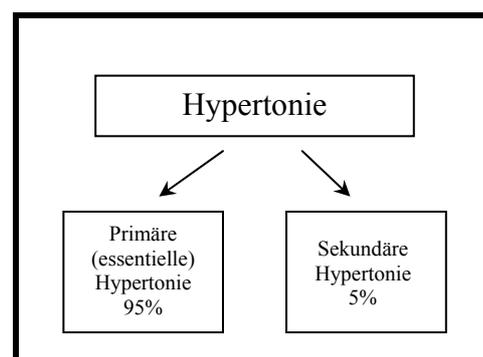


Abb. 1.3: Einteilung der Hypertonieformen.

(Abb. 1.3). Zu den wichtigsten ätiologischen Faktoren der Hypertonie zählen die

Kardialer Auswurf
Peripherer Widerstand
Renin-Angiotensin-Adosteron-System
Autonomes Nervensystem
Andere Faktoren
Bradykinin
Endothelin
EDRF oder NO
ANP
Quabain

Abb. 1.4: Physiologische Faktoren, deren Dysregulation u. a. zur Entstehung einer hypertonen Kreislaufsituation führen können.

Salzzufuhr, das Renin-Angiotensin-System und eine Dysregulation des sympathischen Nervensystems. In den letzten Jahren konnten weitere Faktoren identifiziert werden, die an der Entstehung eines Hypertonus beteiligt sind. Hierzu gehören genetische Mechanismen, die endotheliale Dysfunktion, geringes Geburtsgewicht und neurovaskuläre Anomalien [141]. Die Endothelzellen nehmen in Bezug auf die kardiovaskuläre Regulation durch

Produktion einer Reihe potenter lokal wirksamer vasoaktiver Substanzen eine Schlüsselrolle ein. Zu diesen vasoaktiven Substanzen zählen unter anderem insbesondere der Vasodilatator NO und das vasokonstriktorische Protein Endothelin (Abb. 1.4).

1.4.3 Bedeutung von Endothelin-1 in der Hypertonie

1.4.3.1 Endothelin-1 und experimentelle Hypertonie

Es liegt gedanklich nahe, dass eine Dysregulation der Endothelin-Produktion oder – Sekretion an der Entstehung eines Bluthochdrucks beteiligt ist. In den letzten Jahren konnte in mehreren Studien eine direkte Beziehung zwischen Endothelin-1 und einem experimentell induziertem Bluthochdruck belegt werden. In verschiedenen Salzsensitiven Hypertoniemodellen ist das Endothelin-System hierbei deutlich aktiviert. Dies ist z.B. bei Desoxykortikosteronacetat (DOCA)-Salz hypertensiven Ratten [142-144], bei DOCA behandelten spontan hypertensiven Ratten (SHR) [145], bei Dahl Salzsensitiven Ratten [146], bei 1-Niere 1-Clip Goldblatt hypertensiven Ratten [147] und bei Schlaganfall-SHR [148] der Fall. In diesen Studien wurde eine erhöhte Aktivierung des Endothelin-Systems belegt, zum einen durch den Nachweis einer erhöhten endothelialen Expression von ET-1mRNA und zum anderen durch den Nachweis einer gesteigerten hypotensiven Antwort auf Endothelin-Rezeptor-Antagonisten [144;149;150] (Tab. 1.2).

Endothelin-abhängige Komponenten

DOCA-Salz hypertensive Ratte
 DOCA Salz-behandelte SHR
 1-Niere 1-Clip Goldblatt hypertensive Ratte
 Dahl Salz-sensitive Ratte
 Schlaganfall SHR
 Angiotensin II-Infusion hypertensive Ratte

Endothelin-unabhängige Komponenten

SHR
 2-Nieren 1-Clip Goldblatt hypertensive Ratte
 Langzeit L-NAME-induzierte Hypertonie
 L-NAME-behandelte SHR

Tab. 1.2: Formen der experimentellen Hypertonie mit und ohne Endothelin abhängiger Komponenten.

Des Weiteren konnte durch Infusion von Angiotensin II bei Ratten eine Überexpression von Prepro-ET-1 nachgewiesen werden. Auch hierbei kam es nach Gabe eines Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zu einer deutlichen Reduktion des Blutdrucks [151;152].

Im Gegensatz dazu kommt es bei anders induzierten experimentellen Hypertonieformen durch Verabreichung von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zu keiner Blutdrucksenkung. Dies zeigte sich bei Renin-abhängigen 2-Nieren 1-Clip Goldblatt hypertensiven Ratten [153;154], bei transgenetischen (mREN2)²⁷ Ratten [155] und bei chronisch L-NAME-behandelten Ratten [156]. Auch bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) scheint das Endothelin-System keine große Rolle zu spielen [142;145;157;158].

Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung von Endothelin und deren Rezeptoren im Rahmen des Hypertonus wurden Studien mit transgenetisch veränderten Tieren durchgeführt. Hierbei konnte bei ET_B-Rezeptor defizienten Ratten ein erhöhter ET-1 Level und eine hypotensive Antwort auf Gabe von ET-Rezeptor-Antagonisten beobachtet werden [159]. In dieser Arbeit galt es die Bedeutung des ET_B-Rezeptors für die Pathogenese der Hypertonie zu eruieren. Dies wird im Rahmen eines Versuchsmodells mit transgenetisch veränderten ET_B-ko-Mäusen untersucht.

1.4.3.2 Endothelin-1 und endotheliale Dysfunktion

Eine Verschlechterung der funktionalen Integrität des Endothels, welches konstant vasoaktive Substanzen wie NO, ET-1, Angiotensin II und Prostaglandine absondert, scheint ebenfalls in die Pathogenese der essentiellen Hypertonie, der Nierenfunktionsstörung und der Atherosklerose involviert zu sein. Studien haben gezeigt, dass im Rahmen einer ET-1 Wirkungshemmung durch eine anhaltende Endothelin-Rezeptor Blockade die Endothel-abhängige Relaxation messbar verbessert

werden konnten bei essentieller Hypertonie [160;161], Hypercholesterinämie [162], Atherosklerose [163] und bei pulmonaler Hypertonie. Ein Effekt, bei dem die Modulation der NO Synthese und/oder deren Bioverfügbarkeit involviert ist [163-165]. Barton et al. fanden heraus, dass in Tiermodellen, bei denen ein chronischer NO-Mangel vorliegt, ein Zustand, der auch bei Menschen mit essentieller Hypertonie zu finden ist [166], die endotheliale Funktion durch einen selektiven ET_A-, nicht aber durch einen unselektiven ET_A-/ET_B-Rezeptor-Antagonisten [167] verbessert werden konnte. Bei den unselektiven ET-Antagonisten kommt es neben der ET_A-Rezeptor-Inhibition auch zu einer Blockade des ET_B-Rezeptors und damit zur Hemmung der ET_B-Rezeptor vermittelten Freisetzung der vasodilatierenden Substanzen NO und Prostacyclin [98]. Gleichartige Beobachtungen konnten beim Menschen [110] und bei Salz-sensitiven Formen experimenteller Hypertonie gemacht werden [161].

Als ein außergewöhnlich starker Vasokonstriktor und Agonist, sowohl am ET_A- als auch am ET_B-Rezeptor, wäre es möglich, dass ET-1 eine Rolle bei der Regulation der lokalen Hypertonie spielt. Dagegen spricht aber, dass bei den meisten Formen experimentell induzierter Hypertonie wie SHR, L-NAME [168;169], DOCA-Salz [170] und Ang II [160] sowie bei der essentiellen Hypertonie [171] eine Reduktion bei der maximalen Kontraktion auf ET nachgewiesen werden konnte.

Model	Gefäßtyp	Antagonist	Relaxation		Kontraktion	
			Ach	SNP	ET-1	NE
DOCA-Salz [144]	mesenterial	unbehandelt ET _{A/B}	↓ ↔		↓ ↑	
L-NAME [167]	mesenterial	unbehandelt ↓ ET _{A/B}	↔ ↔		↓ ↑	↔ ↔
L-NAME [167]	Aorta	unbehandelt ↓ ET _{A/B}	↔ ↔↓	↔	↓ ↔	↔ ↔
Dahl-SS [150]	mesenterial	unbehandelt ↓ ET _A	↓ ↑		↓ ↑	↓ ↑
Dahl-SS [161]	Aorta	unbehandelt ↓ ET _A	↔ ↑		↓ ↑	

Tab. 1.3: Effekte chronischer ET-Rezeptor Blockade in Bezug auf Gefäßantworten bei Tiermodellen mit experimentellen Hypertonus.

Die Pfeile zeigen die Veränderungen bei der Gefäßantwort. Verglichen werden zum einen unbehandelte hypertensive gegenüber unbehandelte normotensive Ratten, zum anderen hypertensive mit ET-Rezeptor-Antagonisten behandelte gegenüber hypertensive unbehandelte Ratten.

Ach: Acetylcholin, SNP: Natrium-Nitroprussid, ET-1: Endothelin-1, NE: Norepinephrin;
 ↑ Anstieg, ↓ Abfall, ↔ keine Änderung.

Einige der veröffentlichten Ergebnisse der Effekte bei dauerhafter Gabe von ET-Rezeptor-Antagonisten in Bezug auf vaskuläre Gefäßreaktion sind in Tabelle 1.3 zusammengefasst. Die meisten der pathologischen Veränderungen, die bei unbehandelten hypertensiven Tieren beobachtet werden konnten, verbesserten sich nach der Gabe von ET-Rezeptor-Antagonisten. Dies war sowohl bei solchen Versuchseihen der Fall, bei denen die Antagonistengabe einen antihypertensiven und antihypertrophischen Effekt [144;150;161] aufzeigte, als auch bei L-NAME-behandelten Ratten, bei denen solche Ergebnisse nicht nachweisbar waren [167]. Damit scheint in diesen Fällen die Verbesserung der Gefäßantwort weder vom Blutdruck noch sekundär von der Verbesserung der Gefäßstruktur abhängig zu sein. Von besonderem Interesse ist der Anstieg der ET-1 induzierten Gefäßkontraktionen nach Rezeptor-Antagonistengabe, trotz vermehrter ET-Expression und damit möglicher Runterregulation der Rezeptoren. Bei den bisher veröffentlichten Daten sind in erster Linie selektive ET_A- und unselektive ET_A/ET_B-Rezeptor-Antagonisten verwendet worden (Tab. 1.3).

Die Auswirkung einer dauerhaften selektiven ET_B-Rezeptor Blockade auf die vaskuläre Endothelfunktion wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung des ET_B-Rezeptors für die Endothelfunktion und Blutdruckregulation untersucht. Dies geschieht im Rahmen eines Versuchsmodells mit dauerhafter ET_B-Rezeptor Blockade, hervorgerufen durch ET_B-ko-Mäuse.

1.5 Salz-induzierte Hypertonie

Viele epidemiologische und Interventions-Studien haben eine klare Beziehung zwischen Salzaufnahme und Hypertonie aufgezeigt [172]. Auch ist seit langem bekannt, dass Bluthochdruck als einer der Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt. Die Antwort des Blutdrucks auf erhöhte Salzzufuhr, ein als Salz-Sensitivität bekanntes Phänomen [173;174], stellt sich jedoch heterogen dar. Obwohl die Salzempfindlichkeit als experimentelles Modell für Hypertonie gut etabliert ist, ist der genaue dem zu Grunde liegende pathophysiologische Mechanismus noch unbekannt [173;174]. Es wird vermutet, dass Dysregulationen im Renin-Angiotensin-System [175;176], im

sympathischen Nervensystem [177] und beim transmembranen Natriumtransport [178] von Bedeutung sind. Auch spielt die Natriumzufuhr eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Plasmavolumens und des Blutdrucks und induziert bei übermäßiger Aufnahme einen Bluthochdruck bei Salz-sensitiven, essentiell hypertensiven Patienten [174;179]. Obwohl bekannt ist, dass die vaskuläre Natriumkonzentration bei hypertensiven Patienten erhöht ist, ist bis heute unklar, ob und wenn ja durch welche Faktoren diese erhöhte Natriumkonzentration, die sowohl im Plasma als auch im Gewebe zu finden ist, im vaskulären Endothelin-Drucksystem interagiert. Es scheint aber das Gefäßendothel zu sein, das eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung des Gefäßtonuses spielt [17]. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Salz-sensitive Hypertonien [17;177;178] funktionale und strukturelle Veränderungen des Endothels an glatter Gefäßmuskulatur mit sich bringen, als Antwort auf die erhöhte Natriumchloridaufnahme [180;181]. Es konnten Dysfunktionen des Endothels dokumentiert werden, welches unter Normalbedingungen durch Abgabe von NO und ET-1 [182] den Gefäßtonus und Gefäßstruktur moduliert. Diese Dysfunktionen dienen als Parameter zur qualitativen Darstellung struktureller und funktionaler Gefäßveränderungen bei Salz-induzierter Hypertonie. Bei Ratten mit Salz-induzierter Hypertonie konnte eine verminderte NO-Produktion festgestellt werden [183], was auf eine verminderte Expression der NO-Synthase zurückzuführen ist [184]. Auch konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass eine Blockade der NO-Produktion die Entwicklung einer Salz-sensitiven Hypertonie fördert [182]. In anderen Studien wurde eine vermehrte vaskuläre Endothelin-1 Bildung [185] beschrieben. Außerdem konnte bei transgenen Mäusen, die eine Überproduktion von ET-1 aufwiesen, nach Salzzufuhr ebenfalls eine Erhöhung des Blutdrucks festgestellt werden [186]. Damit handelt es sich bei ET-1 eventuell auf Grund seiner proliferationsanregenden und vasokonstriktorisches Wirkung [187] um einen potentiellen Mediator für die Entstehung der Salz-induzierten Hypertonie.

1.6 ET_B-Rezeptor-knockout-Mäuse

Die Tatsache, dass ET_B-ko-Mäuse mit generalisiertem ET_B-Rezeptor-Defekt an den Folgen einer intestinalen Aganglionose versterben erschwerte die Untersuchung des ET_B-Rezeptors im Rahmen von ET_B-ko-Modellen. Eine Problematik, bei der erst vor kurzem durch M. Yanagisawa und seine Mitarbeiter ein Lösungsansatz entwickelt werden konnte, welcher das Auftreten der letalen Folgeerkrankungen verhindert.

Im Allgemeinen entspringen bei den Wirbeltieren sowohl die enterischen Ganglionzellen als auch die epidermalen Melanozyten aus der Neuralleiste [188]. Die Vorläuferzellen der Melanoblasten haben ihren Ursprung entlang der gesamten Länge der Neuralleiste und migrieren entlang des dorsolateralen Pfades um die Haut zu kolonisieren [189;190]. Die Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems (ENS) entstammen hauptsächlich der den Vagus betreffenden Neuralleiste. Sie folgen dem ventralen Entwicklungspfad, um in den Vorderdarm früher Embryonen einzutreten und den kompletten Darm in kaudaler Richtung zu kolonisieren [188;191-193]. Um die Kolonisierung abzuschließen müssen beide Zellreihen überleben, proliferieren und sich über relativ lange Distanzen ausbreiten. Sie müssen die vorgesehenen Zielorte erreichen und sich dort differenzieren. Wenn die Kolonisation des Darms aus der vagalen Neuralleiste inkomplett, ist verbleibt der distale Darmanteil aganglionotisch und funktionell gehemmt, was einen frühen Tod der Tiere zur Folge hat. Eine inkomplette Kolonisierung der Haut durch Melanoblasten führt zu Abnormalitäten in der Pigmentierung. Beeinflusst wird der Kolonisierungsprozess der Melanoblasten und der Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems durch sich überlappende genetische Pfade. Beobachtbar ist dieser Zusammenhang, bei angeborenen Syndromen mit Entwicklungsdefekten in beiden Reihen, mit der Folge von parallelem Auftreten lokaler Pigmentanomalien, gepaart mit intestinaler Aganglionose [194-196].

Bei Mäusen, Ratten, Pferden und beim Menschen wird das Auftreten einer intestinalen Aganglionose und gleichzeitiges Vorliegen eines Pigmentdefekts durch mangelhafte Signalübertragung durch den ET_B-Rezeptor verursacht. Mutationen des ET_B-Rezeptorgens oder des Gens einer seiner Liganden ET-3, die einen Funktionsverlust mit sich bringen, verursachen eine Aganglionose, (Morbus Hirschprung, manchmal assoziiert mit Pigmentabnormalitäten: Shah-Waardenburg Syndrom) [197-203]. Bei Mäusen verursacht eine solche Mutation des ET_B-Rezeptor- oder ET-3-Gens neben einem weiß-

braun gefleckten Fell, auch eine intestinale Aganglionose [204-206]. Diese führt kurz nach der Geburt im Rahmen eines angeborenen Megakolons zum Tod der Tiere [205]. Der genetische Hintergrund als Ursache dieser Erkrankung konnte erstmals an Ratten gezeigt werden [207]. So wiesen die untersuchten Ratten, die an einer Aganglionose verstorben waren, eine spontane 301-Basenpaar Deletion am 3'-Ende des ersten Exons des ET_B -Rezeptor-Gens auf. Diese Deletion umfasste die ersten zwei Transmembrandomänen des Rezeptors und führte zu einer Aktivierung einer verborgenen splice Donorstelle 15 Basenpaare oberhalb der Deletion. Das entstehende verkürzte Transkript kodierte für einen funktionsunfähigen ET_B -Rezeptor [207]. Diese autosomal rezessive vererbte Mutation (sl) führte zu einer Reduktion der pigmentierten Hautareale und zu aganglionotischen Darmanteilen. In den meisten Fällen kam es zu einer Aganglionose des gesamten Kolons. Nur 10% der homozygoten Ratten (sl/sl) hatten Ganglionzellen in der proximalen Hälfte des Kolons [208].

Die Mehrheit der ENS Vorläuferzellen, die der vagalen Neuralleiste entstammen, exprimieren während der Kolonisierung des Darms das katecholaminerge Enzym Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) [209-211]. Bei Mäusen exprimieren sie unter der transkriptionalen Kontrolle eines humanen 5.8-kb DBH Promoterfragmentes zusätzlich nlacZ. Die Expression der nlacZ-DBH beginnt, nachdem die Zellen der Neuralleiste den Vorderdarm besiedelt haben und hält den gesamten Zeitraum in dem die ENS-Vorläuferzellen den sich entwickelnden Darm kolonisieren an. Weder endogenes DBH noch DBH-nlacZ-Transgene lassen sich in Melanozyten oder ihren Vorläuferzellen nachweisen [193;212].

Diese Beobachtung war der Ausgangspunkt, den man sich bei der transgenetischen Veränderung der Tiere zu Nutze macht. Um die Mäuse (sl/sl) vor den gastrointestinalen Konsequenzen, resultierend aus dem ET_B -Rezeptor-Defekt, zu bewahren, wurden sie auf zellulärer Ebene in Richtung einer selektiven Expression von ET_B -Rezeptoren auf intestinalen Ganglionzellen verändert. Hiefür wurde der humane Promotor DBH (Dopamin- β -Hydroxylase) verwendet. Dieser führte zu transgenetischen Expressionen der ET_B -Rezeptoren, so dass die ENS-Vorläuferzellen der genetisch defekten Mäuse (sl/sl) kolonisiert wurden [159].

Die DBH- ET_B -Rezeptor Transgene kompensieren den endogenen Mangel an ET_B -Rezeptoren und verhindern den intestinalen Defekt und damit das frühe Versterben der Tiere. Die Fleckengebung des Fells blieb davon unbeeinflusst [205]. Somit besteht

nunmehr die Möglichkeit transgenetisch veränderte Tiere zu züchten, die mit Ausnahme des intestinalen ET_B-Rezeptors einen generalisierten ET_B-Rezeptor-Defekt aufweisen und damit den Weg für eine präzisere Untersuchung des ET_B-Rezeptors im Rahmen von knock-out-Modellen eröffnen.

2. Material

2.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Experimente in der Organkammer eingesetzt:

Blutdruckmessgerät	Rat Tail Blood Pressure, Monitor, Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge Kent, England
Organbad 6 Kammern	10A-5306 isolierte Organ Apparatur, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Wärmebad	HAAKE B3, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
Waagen	Sauter Feinwaage Typ 404/13, Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland Chyo MP-3000, Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland
Sonifikator	Bandelin Sonoplus GM70, Bandelin GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland

2.2 Lösungen und Substanzen

2.2.1 Krebs-Henseleit-Puffer

Folgende Substanzen fanden bei der Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers

Verwendung:

NaCl	Natriumchlorid (M= 58,44g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	Calciumchlorid (M=110,99g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
KCl	Kaliumchlorid (M=74,85g/mol), Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat (M=136,09g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland

NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat (M=84,01g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgSO_4	Magnesiumsulfat (M=120,4g/mol) Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$	EDTA Titriplex (M=372,24g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	D(+)-Glucose-Monohydrat (M=198,17g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland

Die Herstellung der Stammlösungen mit den jeweiligen Substanzen folgte den in Tabelle 2.1 angegebenen Konzentrationsangaben. Hierzu wurde die entsprechende Menge des Stoffes auf 5 Liter (l) mit 2fach destilliertem Wasser (aqua bidest) aufgefüllt und bei 4°C gelagert.

Stammlösungen

NaCl 9%:	450g NaCl ad 5l aqua bidest
CaCl ₂ 1,2%:	61g CaCl ₂ ad 5l aqua bidest
KCl 1,15%:	57,5g KCl ad 5l aqua bidest
MgSO ₄ 1,9%:	95g MgSO ₄ ad 5l aqua bidest
KH ₂ PO ₄ 2,11%:	105,3g KH ₂ PO ₄ ad 5l aqua bidest
NaHCO ₃ 6,5%:	325g NaHCO ₃ ad 5l aqua bidest

Tab. 2.1: Zusammensetzung der Stammlösungen mit den zugrunde liegenden Stoffmengen.

Zur Herstellung des Krebs-Henseleit-Puffers wurden die Stammlösungen, wie in Tabelle 2.2 angegeben gemischt, zusätzlich mit EDTA und Glucose versetzt. Daraufhin mit aqua bidest auf 20l verdünnt und schließlich für 30 min mit Carbogen, einem Gemisch aus 95% Sauerstoff (O₂) und 5% Kohlendioxid (CO₂), begast. Die Herstellung des Puffers erfolgte jeden Tag frisch.

Stammlösung	Menge
NaCl 9%	1925 ml
CaCl ₂ 1,2%	575 ml
KCL 1,15%	775 ml
MgSO ₄ 1,9%	192 ml
KH ₂ PO ₄ 2,11%	192 ml
NaHCO ₃ 6,5%	807 ml
EDTA	250 mg
C ₆ H ₁₂ O ₆	50 g

Tab. 2.2: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers mit den jeweiligen Anteilen der einzelnen Stammlösungen und Zusatzsubstanzen, insgesamt mit aqua bidest aufgefüllt auf 20 l.

2.2.2 Anästhetika

Folgende Anästhetika fanden Anwendung:

Rompun 2%	Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Ketavet	Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
Metofane	Methoxyfluran, Janssen – Cilag GmbH, Neuss, Deutschland

Alle oben aufgeführten Präparate wurden bei 4°C gelagert.

2.2.3 Vasoaktive Substanzen

Folgende vasoaktive Substanzen wurden eingesetzt:

Vasokontrahierende Substanzen:

KCl	Kaliumchlorid (74,85g/mol), Merk, KGaA, Darmstadt, Deutschland
NE	Norepinephrin, Sigma –Aldrich CO, St. Louis MO, USA

ET-1	humanes Endothelin-1, Novalbiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland
------	-----------------------------------------------------------------

Vasodilatierende Substanzen:

Ach	Acetylcholin Chloride, Sigma Diagnostics, St. Louis MO, USA
SNP	Nitroprussid-Na[Natrium-pentacyanonitrosylferrat(II)], Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland

Von allen Substanzen - mit Ausnahme von SNP und KCl - wurde initial jeweils eine einzige Stammlösung angesetzt (c(mol/l): Ach 10^{-3} ; NE 10^{-4} ; ET-1 10^{-6}), aliquotiert (Menge in μ l: Ach 120; NE 120; ET-1 40) und bei -20°C gelagert. SNP-Lösung wurde täglich frisch in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l angesetzt. Als Lösungssubstanz diente aqua bidest. An den einzelnen Versuchstagen wurden von diesen die im Versuch verwendeten Konzentrationsreihen mit Krebs-Henseleit-Puffer als Verdünnungssubstanz angefertigt. Zur Bestimmung der Referenzkontraktion (Vorkontraktion eines jeden Ringes) wurde eine 1 molare KCl-Lösung (74,6 g/l aqua bidest) hergestellt und bei 4°C gelagert. Alle Angaben zu Substanzkonzentrationen beziehen sich auf die sich in den Organbädern befindenden finalen Konzentrationen.

Inkubationssubstanzen

Bei einem Teil der Versuche wurden die Gefäßringe vorinkubiert. Folgende Substanzen fanden Verwendung:

BQ 788	ET _B -Rezeptor-Antagonist, N-cis-2,6-Dimethylpiperidino carbonyl- β -tBu-Ala-D-Trp(1-methoxycarbonyl)D-Nle-OH, Bachem Biochemie GmbH, Heidelberg, Deutschland
BQ 123	ET _A -Rezeptor-Antagonist, Cyclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu), Bachem Biochemie GmbH, Heidelberg, Deutschland

L-NAME	kompetetiver Hemmer der NO-Synthase, N ω -Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Indo	Indometacin, 1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolessigsäure, Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA

Von BQ 788 und BQ 123 wurden Aliquots (60 μ l) der Stammlösung in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l hergestellt und bei -20 °C gelagert. Als Verdünnungssubstanz diente bei BQ 788 Methanol und bei BQ 123 Dimethylsulfidoxid. L-NAME (c: 10^{-4} mol/l) und Indometacin (c: 10^{-4} mol/l) wurden täglich frisch mit aqua bidest angesetzt.

2.3 Versuchstiere

Es wurden 12 männliche ET_B-ko-Mäuse sowie 12 männliche Wildtyp Mäuse im Alter von 7-9 Wochen als Versuchstiere in dieser Arbeit eingesetzt.

Die Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von M. Yanagisawa (Universität von Texas, Fakultät für Molekulargenetik, Dallas, Texas, USA) hergestellt und im Tierstall der freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von B. Hocher gezüchtet. Von dort wurden sie zwei Wochen vor Versuchsbeginn bezogen und im optimalen Haltungsbereich des Tierstalles der Universitätsklinik Würzburg bei konstanter Temperatur (21°C), Luftfeuchtigkeit (50-60%), Belüftung sowie geregelter Tag-Nacht-Rhythmus (Tag: 12h, Nacht: 12h) für die Dauer des Versuchs gehalten.

2.4 Verbrauchsmaterialien

Zentrifugenröhrchen	100/16; Rundboden, Polystyrol glasklar RE 04, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Pipettenspitzen	PSG 1000 Pipettenspitzen gelb, Typ Eppendorf 1-100µl, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland PSB 1000 Pipettenspitzen blau, Typ Eppendorf 100 - 1000 µl, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Petrischalen	PP90, 94x16mm, Böttger oHG, Bodenmais, Deutschland
Eppendorfcups	RSL1 Reaktionsgefäße Eppendorf 1,5ml, save lock, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Skalpellklingen	SJ21 100 Skalpellklingen steril, Megro GmbH Wesel, Deutschland
Spritzen	Omicam U-40 Insulin, 1ml, B Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland Omnifix-F Plus, 1ml, B Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland Injekt 2ml, luer, solo, B Braun AG, Melsungen, Melsungen, Deutschland
Tierfutter	1321 Haltungsfutter Mäuse, Altromin GmbH, Lage, Deutschland
aqua bidest	Ampuwa für Spülzwecke 10l, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H, Deutschland

3. Methoden

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Organkammeranordnung

Das Prinzip der Experimente *in vitro* ist die Messung der durch externe Stimuli induzierten, reaktiven isometrischen Spannungsänderung von muskelzellenhaltigen Geweben. Die Versuchsanordnung besteht aus einem Organbad, in dem sich das zu analysierende Gewebe befindet, einem Kraftumwandler, der die resultierenden isometrischen Gewebereaktionen in elektrische Signale umwandelt, und einem Computer an den die Daten weitergeleitet und graphisch aufgezeichnet werden.

Um den untersuchten Geweben ein möglichst physiologisches und konstantes Milieu zu gewährleisten, wurden sie in Krebs-Ringer-Henseleit-Lösung gegeben, mit einem Gasgemisch von 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast, und mittels des, die Organkammer umspülenden, Wärmebades auf einer Temperatur von 37° C gehalten. Die Versuche konnten so unter isoosmotischen, isohydrischen und isothermen Bedingungen durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die isometrischen Kontraktionen und Relaxationen von Segmenten der Aorta descendens von ET_B-ko-Mäusen und deren Wildtyp Geschwistertieren auf vasokonstriktorisch bzw. vasodilatatorisch wirkende Substanzen gemessen. Dazu wurden die vom Bindegewebe befreiten Blutgefäße in gleich breite Ringe (3mm) geschnitten und schonend zwischen zwei steigbügelartigen Haken in der Organkammer so auf- und vorgespannt, dass die Kraftentwicklung der Gefäßreaktionen mittels eines Kraftumwandlers gemessen und graphisch auf dem Computer aufgezeichnet werden konnte.

Es wurden sowohl vom Endothel-unabhängige, durch an den Muskelzellen direkt wirkende Substanzen wie auch Endothel-abhängige Reaktionen provoziert. Letztere durch Transmitter und Hormone, die vom Endothel in die eigentlichen Überträgerstoffe umgewandelt werden, wofür ein unversehrtes Endothel Voraussetzung ist.

3.1.2 Versuchsgruppen

Die 12 ET_B-ko- sowie die 12 Wt- Mäuse wurden dem Zufallsprinzip entsprechend in jeweils 2 Untergruppen à 6 Tiere aufgeteilt. Hierfür wurden die Tiere nummeriert, markiert und per Losverfahren verschiedenen Gruppen zugeordnet.

Dem gemahlten Futter einer ET_B-ko- und einer Wt- Gruppe wurden ab Tag 0 der Versuchsreihe 4% NaCl (NaCl-Gruppen) zugesetzt. Die restlichen zwei Gruppen erhielten gemahltes Standard-Futter (Kontroll-Gruppen, 0,2% NaCl). Die Mäuse wurden je nach Gruppenzugehörigkeit mit dem jeweiligen Futter ab Tag 0 bis Tag 15 gefüttert. Damit ergab sich folgende Gruppenverteilung:

Gruppe	Beschreibung	n
ET _B -ko-NaCl	Knock-out-Mäuse mit angereichertem Futter (4% NaCl)	6
ET _B -ko-Ktrl.	Knock-out-Mäuse mit Standard-Futter (0,2% NaCl)	6
Wt-NaCl	Wildtyp-Mäuse mit angereichertem Futter (4% NaCl)	6
Wt-Ktrl.	Wildtyp-Mäuse mit Standard-Futter (0,2% NaCl)	6

Tab. 3.1: Einteilung der Tiere in die verschiedenen Behandlungsgruppen; n: Anzahl der Tiere in einer Gruppe.

3.2 Versuchsablauf

3.2.1 Messung der Vitaldaten

Der arterielle systolische Blutdruck (RR) sowie die Herzfrequenz (HF) aller Mäuse wurde mit Hilfe der Tail-Cuff-Methode – einer unblutigen Blutdruckmessung am Mäuseschwanz – am Tag 0, 5, 10 sowie 15 gemessen [150;163;213]. Hierfür wurden die Mäuse durch 5maliges Training - im Abstand von jeweils einem Tag - an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Die Mäuse befanden sich während der gesamten Messphase in einem Käfig auf einer auf 37°C erwärmten Unterlage (Wärmeplatte). Die Manschette zur Messung des systolischen Blutdruckes und der Herzfrequenz wurde am

fixierten Mäuseschwanz angelegt. Sobald die Herzfrequenz der Mäuse einen konstanten Wert angenommen hatte, konnte über die Blutdruckmanschette 5malig der systolische Blutdruck (RR) und die Herzfrequenz erfasst werden. Der oberste und unterste Wert wurden verworfen und aus den restlichen drei der Mittelwert gebildet. Zusätzlich wurde das Körpergewicht (KG) der Mäuse an den einzelnen Messtagen ermittelt (Abb. 3.1).

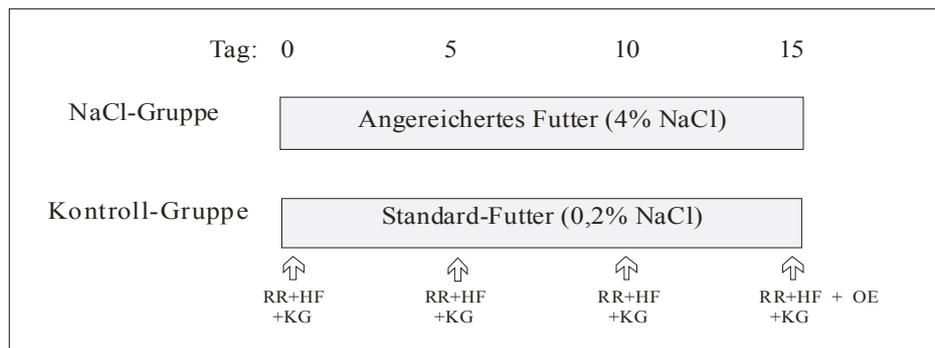


Abb. 3.1: Behandlungsschema der NaCl- und der Kontroll-Gruppen. An Tag 0,5,10 und 15 wurde sowohl der systolische Blutdruck (RR) mittels Tail-Cuff-Methode, die Herzfrequenz (HF) als auch das Körpergewicht (KG) ermittelt. An Tag 15 erfolgte dann die terminale Organentnahme (OE).

3.2.2 Anästhesie der Mäuse

Am Versuchstag 15 wurden die Mäuse mit Metofane (als Inhalationsnarkotikum; c: 0,2-0,3ml / kg KG) in einem Glasbehälter betäubt, anschließend durch intraperitoneale (i.p.) Injektion (0,5ml) eines Gemisches aus Rompun und Ketavet (Verhältnis 1:4) anästhesiert und schließlich mit 0,2 Milliliter Heparin (1ml = 5000 IE) - ebenfalls intraperitoneal appliziert - heparinisiert.

3.2.3 Präparation der Gefäße

Die anästhesierten Mäuse wurden auf einer Operationsunterlage fixiert und daraufhin mit Pinzette und Schere thorako-abdominal eröffnet. Nach Exsanguination durch Punktion des rechten Ventrikels wurde die Aorta descendens in No-Touch-Technik zur Schonung des Endothels entnommen und unverzüglich in 4°C gekühlten Krebs-

Henseleit-Puffer überführt. Die Aorta wurde mittels einer Kanüle sondiert, mit Heparin gespült, mit Pinzette und Operationsschere vom umgebenden Bindegewebe befreit und mit Hilfe eines Skalpells in 3mm breite Ringsegmente geschnitten.

3.2.4 Fixation der Gefäßsegmente im Organbad

Die Gefäßsegmente wurden auf zwei Triangelgestelle aus feinem Draht (Durchmesser 10 μm) montiert, welche wiederum auf zwei Drahhaken befestigt wurden, die mit einem Kraftumwandler zur Messung der isometrischen Spannung verbunden waren [163;213;214].

Anschließend wurden die Aortenringe in den mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllten Organbädern (10ml) aufgehängt, mit Carbogen begast und mittels eines Wärmebades konstant auf einer Temperatur von 37°C gehalten [215].

3.2.5 Versuchsdurchführung im Organbad

Nach Einspannen der präparierten Gefäß-Segmente wurden diese über 30 Minuten zur Anpassung an das Milieu im Organbad ruhen gelassen. Danach wurde die Spannung über einen Zeitraum von weiteren 30 Minuten in Schritten von 0,25g bis auf 2g erhöht. Diese optimale Vorspannung wurde im Vorfeld dieser Arbeit in mehreren Versuchen ermittelt, um – gemäß Frank-Starling-Mechanismus – ein für die maximale Muskelkontraktion optimales Längen-Spannungs-Verhältnis zu erhalten [216]. Erst nach Erreichen dieses individuell optimalen Spannungs-Längen-Verhältnisses besitzen die Gefäße ihr volles Kontraktions- und Relaxationsvermögen, so dass bei Zugabe von vasokonstriktischen und vasodilatatorischen Substanzen standardisierte Daten über den Spannungszustand des Gefäßabschnittes gewonnen werden können. Nach Erreichen einer stabilen Referenzspannungslinie wurde 10 Minuten abgewartet um dann die vasoaktiven Substanzen zu applizieren.

Um einen für den jeweiligen Gefäßring individuellen, standardisierten Referenzwert bezüglich maximaler Kontraktion zu erhalten, wurden die Blutgefäße je zweimal mit 100mM Kaliumchlorid-Lösung inkubiert [215]. Nach Erreichen eines Plateaus (d.h.

keine weitere Steigerung der isometrischen Kraftentwicklung) bei der ersten KCl-Inkubation wurde dreimal mit Krebs-Henseleit-Puffer gespült, um die Ausgangssituation wiederherzustellen. Eventuelle Abfälle der Ruhedehnungsspannung (2g) konnten durch Nachjustieren der Vorspannung ausgeglichen werden, bevor nach weiterer 10 minütiger Anpassungszeit eine zweite durch KCl induzierte Kontraktion ausgelöst wurde. Zur vollständigen Entfernung der KCl-Lösung aus dem Organbad wurde nach abgeschlossener Plateaubildung dreimal mit Krebs-Henseleit-Puffer gespült.

Die Gefäße wurden für die Versuche entweder nativ eingesetzt, oder mit Substanzen vorinkubiert. Bei den nativ belassenen Gefäßen wurde der Einfluss von SNP, NE, Ach und ET-1 untersucht. Als Vorinkubationssubstanz diente Indometacin (c: 10^{-8} mol/l) und L-NAME (c: 10^{-4} mol/l), deren Vorinkubationszeitraum jeweils 30min betrug. Untersucht wurden hierbei die Gefäßreaktionen auf Ach. Des Weiteren wurden die Aortasegmente mit BQ 788 (c: 10^{-5} mol/l) und BQ 123 (c: 10^{-5} mol/l) für jeweils 20min vorinkubiert und deren Kontraktionsantwort auf ET-1 untersucht. Die unterschiedlichen Testsubstanzen wurden nach genau definiertem Protokoll in die Organbäder appliziert. Zwischen den einzelnen Versuchsdurchgängen wurden die Gefäße jeweils dreimal mit Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen. Im Weiteren wurde den Gefäßen zwischen den verschiedenen Durchgängen Zeit gegeben, sich wieder in ihre ursprüngliche Ausgangslage mit entsprechender Vorspannung zu begeben.

Als kontrahierende Substanzen wurden NE und humanes ET-1 eingesetzt. Sie wurden in aufsteigender Konzentration (10^{-10} bis 10^{-4} mol/l für NE, 10^{-10} - 10^{-7} mol/l für ET-1), in jeweils logarithmischen Abständen einer halben Zehnerpotenz, appliziert. Dabei musste vor Zugabe der nächst höheren Konzentration die Ausbildung eines Plateaus als Gefäßreaktion abgewartet werden. Ausgangslage war immer die anfangs durch Vorspannung gewonnene Referenzlinie.

Vor Applikation der dilatierenden Substanz wurden die Gefäße durch Zugabe von NE (c: 10^{-7} mol/l) auf 70-80% der Referenzkontraktion durch die 100mM Kaliumchlorid-Lösung vorkontrahiert, um dann in aufsteigender Konzentration den jeweiligen Vasodilatator (10^{-10} bis 10^{-4} mol/l für ACH und SNP), in logarithmischen Abständen einer halben Zehnerpotenz, zuzugeben. Wiederum wurde das jeweilige

Relaxationsplateau vor Zugabe der nächst höheren Konzentration abgewartet [214;217]. In der Tabelle 3.2 sind die bei den Gefäßen durchgeführten Untersuchungen aufgelistet.

Vorinkubations- substanzen Substanz- verdünnungs- -reihe (mol/l)	Ohne Vorinkubat.	Mit Vorinkubat. L-NAME c: 10^{-4} mol/l 30 min	Mit Vorinkubat. Indo c: 10^{-8} mol/l 30 min	Mit Vorinkubat. BQ 123 c: 10^{-5} mol/l 20 min	Mit Vorinkubat. BQ 788 c: 10^{-5} mol/l 20 min
ACH , $10^{-10} - 10^{-4}$	X	X	X		
SNP , $10^{-10} - 10^{-4}$	X				
NE , $10^{-10} - 10^{-4}$	X				
ET-1 , $10^{-10} - 10^{-7}$	X	X		X	X

Tab. 3.2: Übersicht über die verwendeten Vorinkubationssubstanzen und ihrem jeweiligen Einsatz.

3.3 Statistik

Die Auswertung der Versuche erfolgte durch eine computergestützte Ermittlung der erzielten Gefäßantworten bei den entsprechenden Substratkonzentrationen. Gefäßreaktionen auf Vasokonstriktoren wurden in Prozent der jeweiligen individuellen Referenzkonzentration auf KCl (100mmol/l) angegeben, die zu Beginn eines jeden Versuchstages für jede Organkammer ermittelt wurde. Gefäßreaktionen auf Vasodilatoren wurden in Prozent der Vorkontraktion auf NE (c: 10^{-7} mol/l) angegeben. Es wurden nur Gefäßsegmente in die Auswertung einbezogen, deren Endothel-abhängige Relaxation auf Ach mehr als 50% der Vorkontraktion auf NE betrug.

Die Datenerfassung erfolgte mittels VitroDatWin (FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland). Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) angegeben. Zur statistischen Analyse wurde die Sensitivität (pD₂) der Gefäße auf die vasoaktiven Substanzen als negativer Logarithmus der

Konzentration, die eine halbmaximale Kontraktion bzw. Relaxation ausgelöst hat, ausgedrückt. Die maximale Relaxation (ausgedrückt in Prozent der NE-Kontraktion) bzw. die maximale Kontraktion wurden unter Zuhilfenahme von MatLab Software (MatWorks, Natick, MA, USA) für jede Dosis-Wirkungskurve durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelt. Für den Vergleich zwischen zwei Werten kam der ungepaarte Student's t-Test zur Anwendung.

Die graphische Darstellung der Gefäßreaktion und der Vitaldaten der Mäuse erfolgte in Form von Linien-Diagrammen mit zusätzlich dargestellter Standardabweichung unter Verwendung von SigmaPlot (Jandel Scientific Software 2001, San Rafael, CA, USA). Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet [218;219].

4. Ergebnisse

4.1 Vitaldaten

Gewicht

Bei der Gewichtsentwicklung war während der gesamten Versuchsdauer kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstierpopulationen feststellbar (Abb. 4.1).

Herzfrequenz

Unabhängig von der Fütterung traten bei der Herzfrequenz der Mäuse ebenfalls keine signifikanten Unterschiede während der Versuchsreihe auf. Sowohl die Herzfrequenz der ET_B-ko-Mäuse, als auch der Wildtyp Mäuse, bewegte sich während des Versuchs im Bereich von 600 +/-23 Schlägen / min (Abb. 4.2).

Systolischer Blutdruck

Ein Anstieg des systolischen Blutdrucks konnte nur bei den ET_B-ko-Mäusen (166 +/-12 mmHg), die Salz-angereichertes Futter erhielten, beobachtet werden.

Weder die Wildtyp Geschwistertiere unter Salzfütterung (128 +/-11 mmHg; p<0,05) noch die ET_B-ko-Mäuse bei Standard-Futter (129 +/-12 mmHg) wiesen eine signifikante Erhöhung des systolischen Blutdrucks auf (Abb. 4.3).

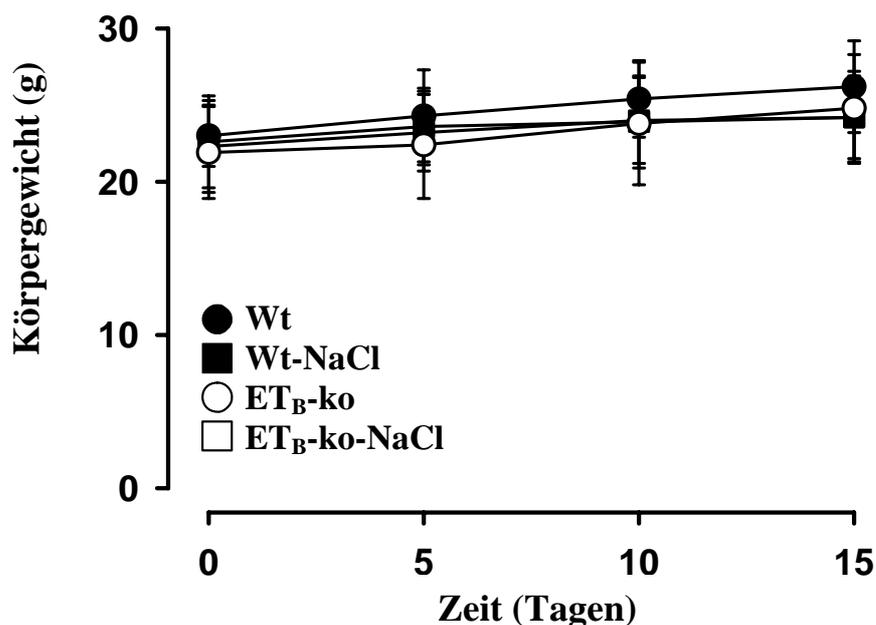


Abb. 4.1: Körpergewicht der ET_B-Rezeptor-knockout Mäuse (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

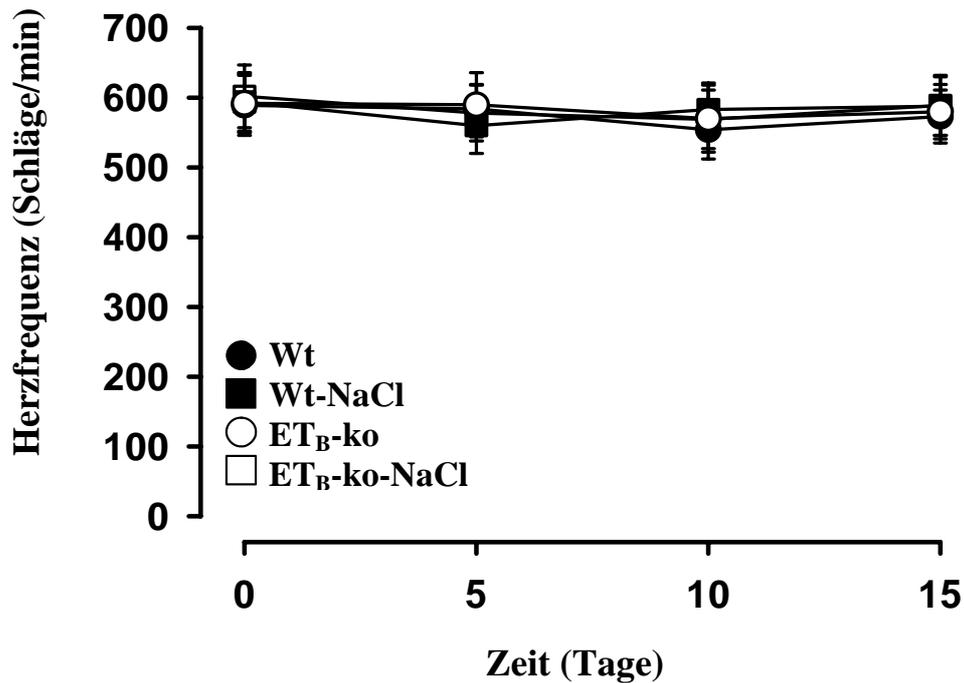


Abb. 4.2: Herzfrequenz der ET_B-Rezeptor-knockout Mäuse (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

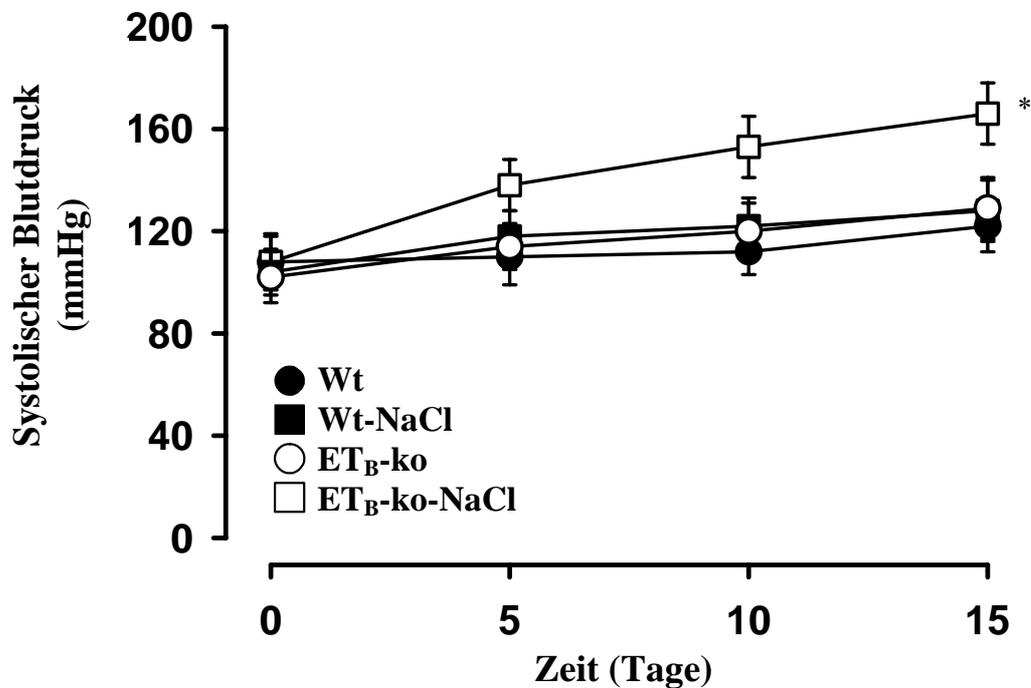


Abb. 4.3: Systolischer Blutdruck der ET_B-Rezeptor-knockout Mäuse (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe), * p < 0,05 vs. Wt.

4.2 Relaxationen

4.2.1 Endothel-abhängige Relaxationen auf Acetylcholin

Die Endothel-abhängigen Relaxationen auf Ach stellten sich bei den ET_B-ko-Mäusen gegenüber ihren Wildtyp Geschwistertieren vermindert dar (74±/3 % gegenüber 96±/5 % der Vorkontraktion; p<0,05).

Die Fütterung von Salz-angereichertem Futter (4%) hatte hierbei keinen signifikanten Einfluss auf die Endothel-abhängige Relaxation (Abb. 4.4-A).

Bei der Vorinkubation mit Indometacin (10⁻⁵mol/l) zeigte sich bei der Endothel-abhängigen Relaxation auf Ach bei den ET_B-ko-Mäusen ebenfalls eine Verminderung gegenüber ihren Wildtyp Geschwistertieren. Auch hierbei konnten keine fütterungsabhängigen Unterschiede bei den zu untersuchenden Versuchsgruppen detektiert werden (Abb. 4.4-B).

Nach Vorinkubation mit dem NO-Synthase Hemmer L-NAME (10⁻⁵mol/l) zeigte sich bei allen Versuchstieren eine nahezu vollständig unterdrückte Relaxation auf Ach (Abb. 4.4-C).

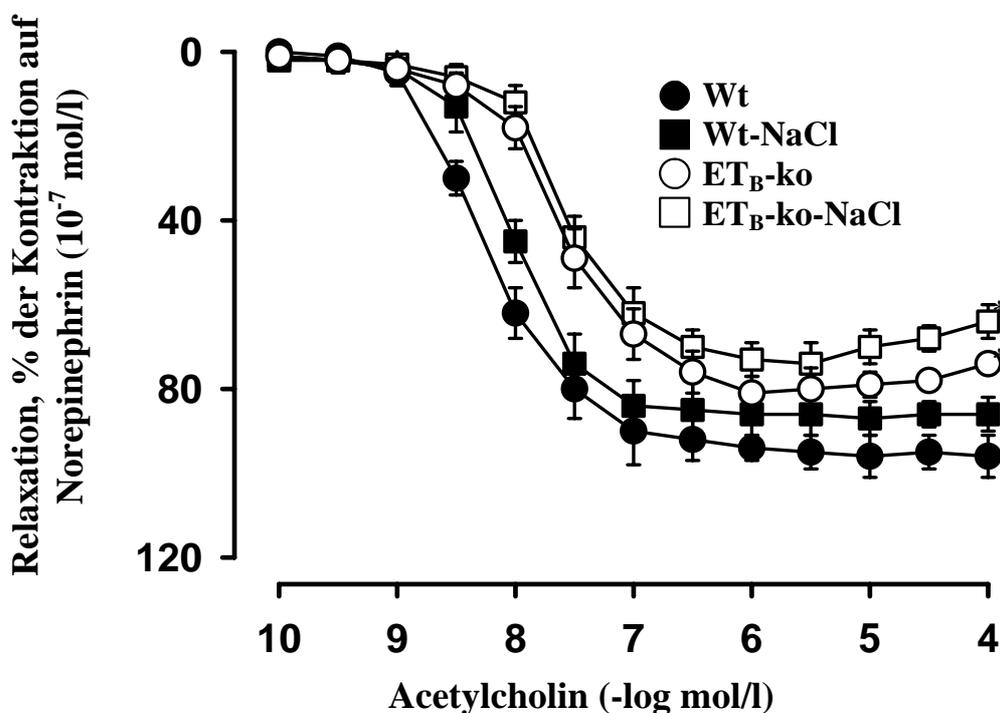


Abb. 4.4-A Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM angegeben (n = 6 / Gruppe), * p < 0,05 vs. Wt.

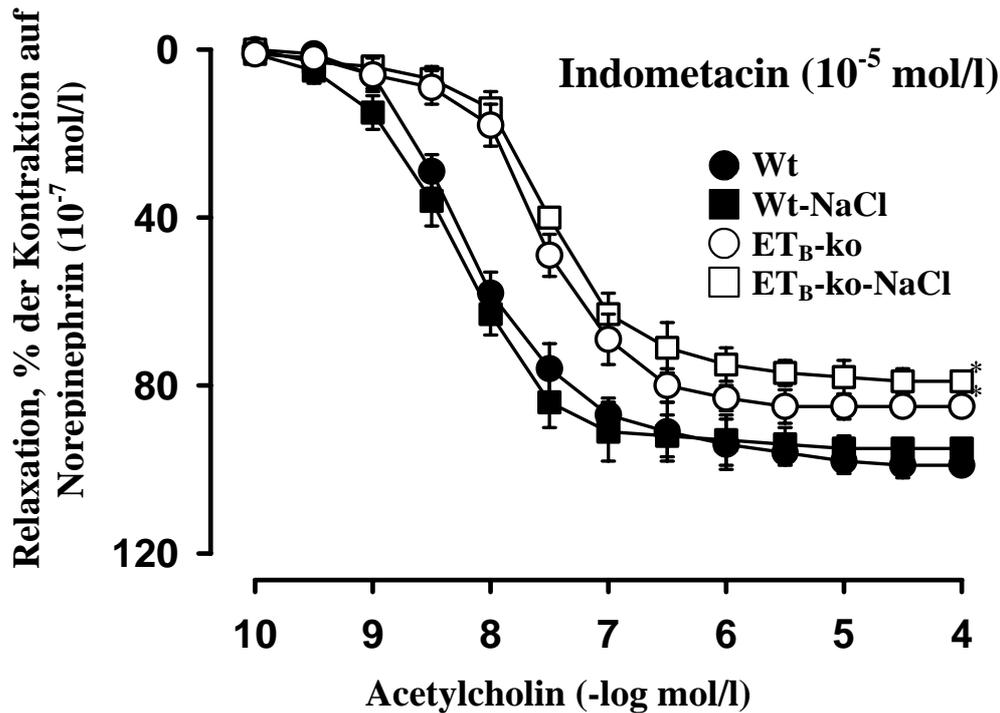


Abb. 4.4-B: Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) nach Vorinkubation mit Indometacin (10^{-5} mol/l) bei ET_B -Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B -ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6 / Gruppe)
* p < 0,05 vs. Wt.

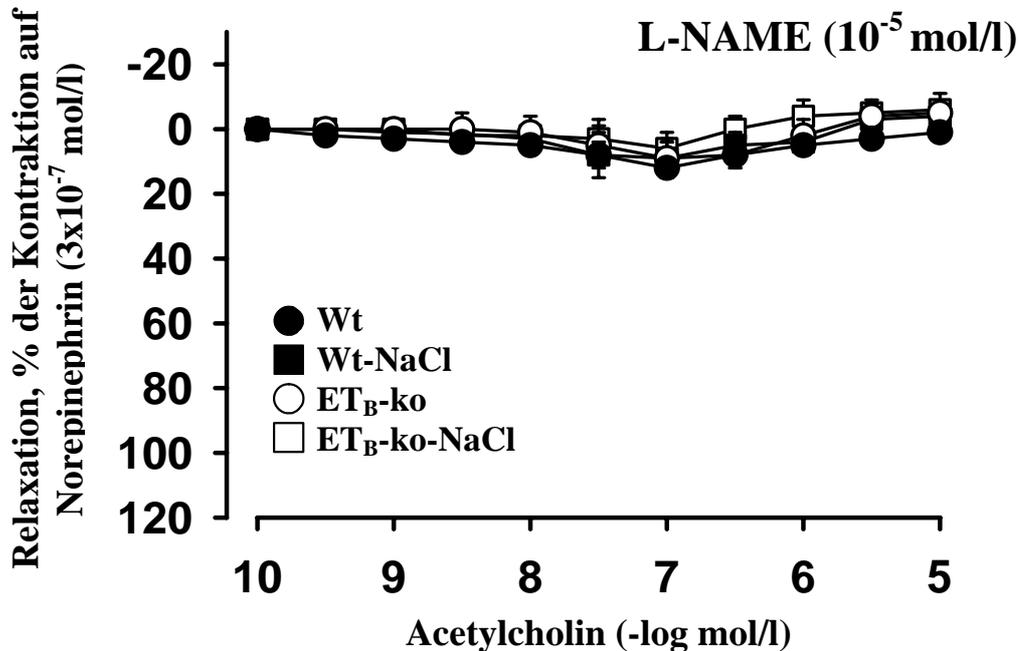


Abb. 4.4-C: Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) nach Vorinkubation mit L-NAME (10^{-5} mol/l) bei ET_B -Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B -ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

4.2.2 Endothel-unabhängige Relaxationen auf Natrium-Nitroprussid

Bei den Endothel-unabhängigen Relaxation auf Natrium-Nitroprussid ergab sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Tiergruppen (Abb. 4.5).

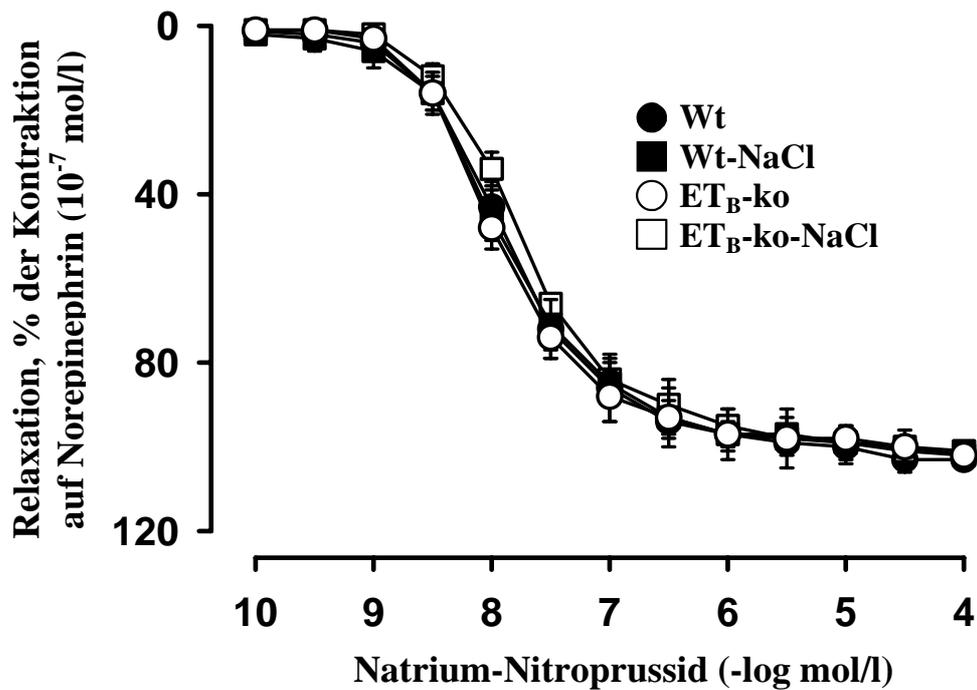


Abb. 4.5: Endothel-unabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Natrium-Nitroprussid (SNP) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

4.3 Kontraktionen

4.3.1 Kontraktionen auf Norepinephrin

Bei der Kontraktion auf Norepinephrin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den ET_B -ko-Mäusen und deren Wildtyp Geschwistertieren, unabhängig vom Salzgehalt des Futters, festgestellt werden (Abb. 4.6).

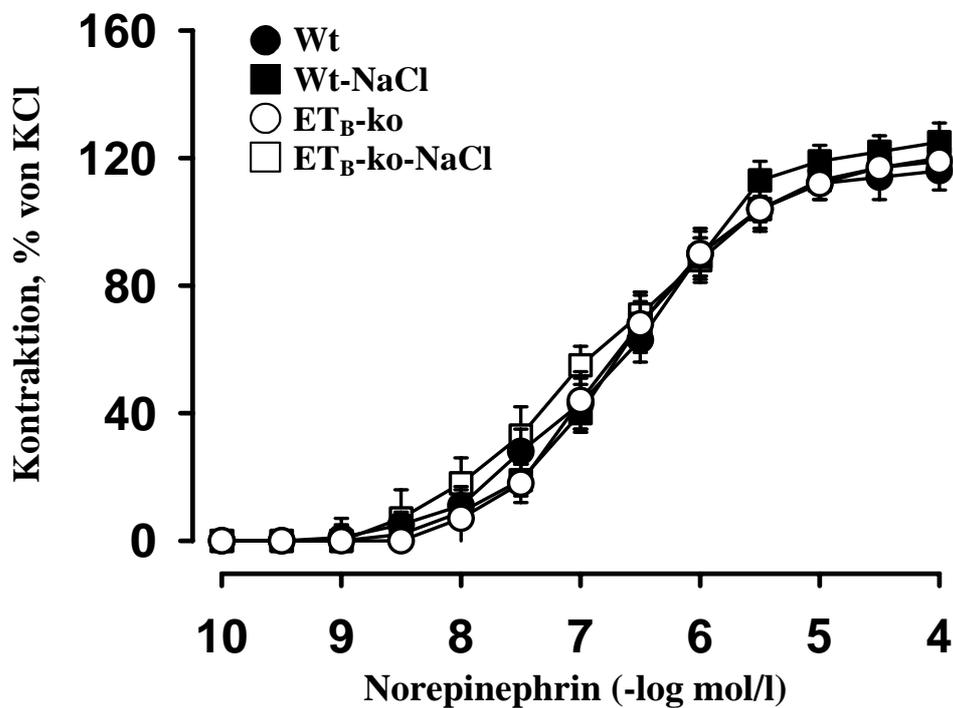


Abb. 4.6: Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin (NE) bei ET_B -Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B -ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

4.3.2 Kontraktionen auf Endothelin-1

Die Kontraktion auf Endothelin-1 war bei den ET_B -ko-Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp Geschwistertieren reduziert (Maximale Kontraktion der ET_B -ko-Mäuse von $28 \pm 4\%$ der Kontraktion auf 100mMol KCl gegenüber $64 \pm 6\%$ bei den Wildtyp-Mäusen). Die Fütterung mit Salz-angereichertem Futter hatte keine signifikante Auswirkung auf die Kontraktion (Abb. 4.7-A).

Die Vorinkubation mit dem ET_B -Rezeptor-Antagonisten BQ 788 (10^{-5} mol/l) hatte keinen spezifischen Einfluss auf die ET-1-Kontraktion (Abb. 4.7-B).

Die ET-1-Kontraktion bei Vorinkubation mit dem ET_A -Rezeptor-Antagonisten BQ 123 (10^{-5} mol/l) war jedoch bei allen Tieren vollständig aufgehoben (Abb. 4.7-C).

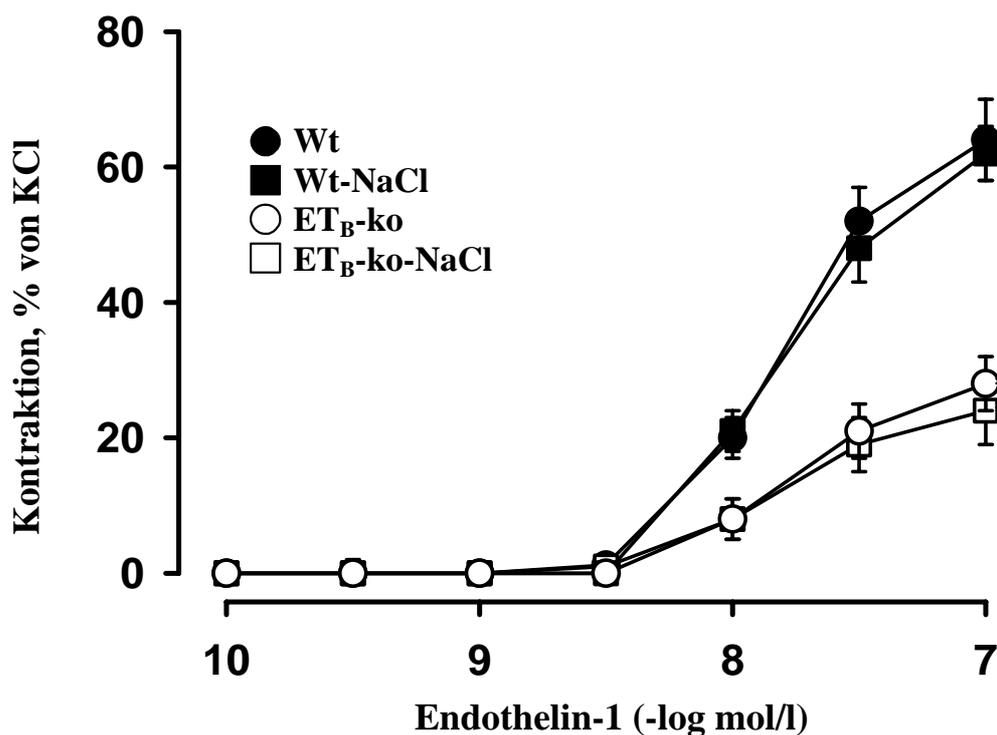


Abb. 4.7-A: Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Endothelin-1 (ET-1) bei ET_B -Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B -ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben (n = 6 / Gruppe), * $p < 0,05$ vs. Wt.

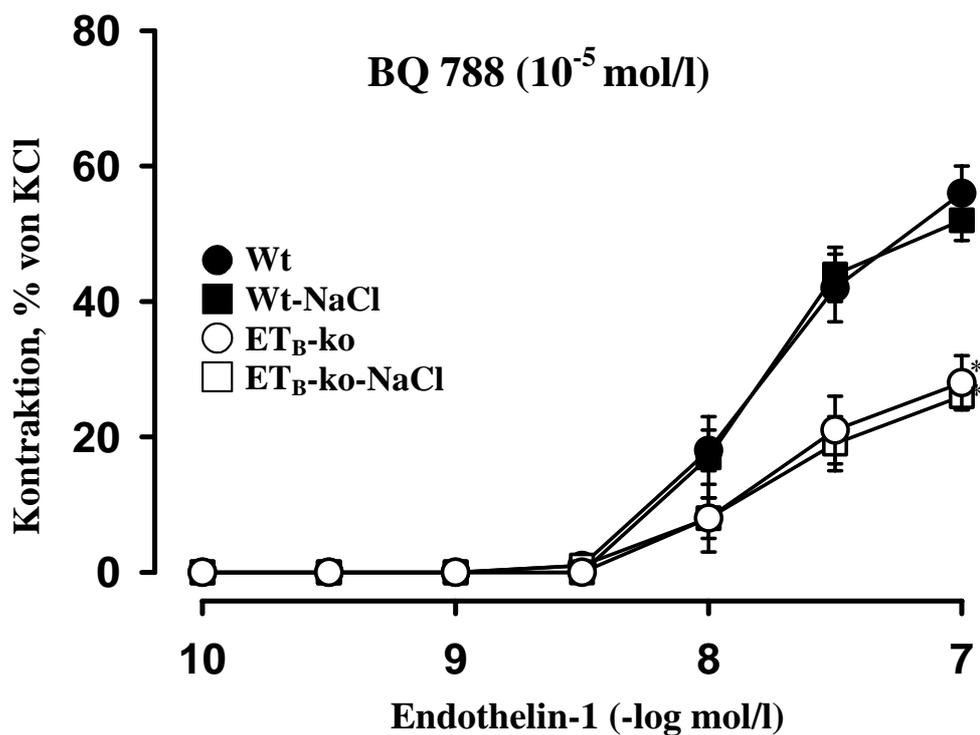


Abb. 4.7-B: Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Endothelin-1 (ET-1) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Vorinkubation mit dem selektiven ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ 788 (10^{-5} mol/l) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe), * p < 0,05 vs. Wt.

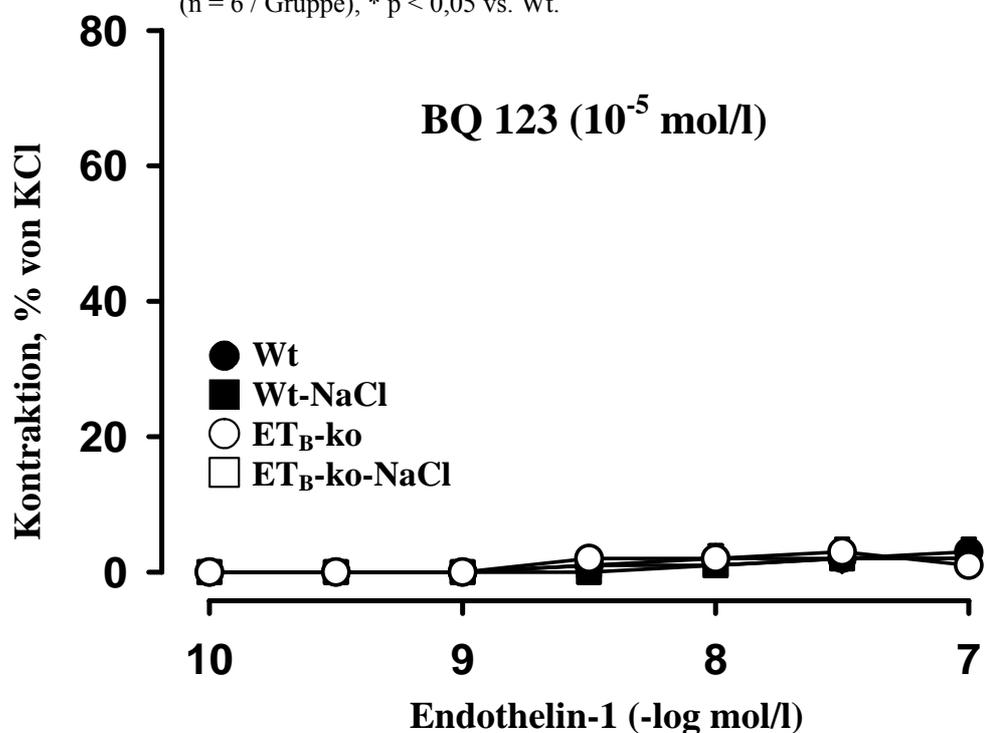


Abb. 4.7-C: Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Endothelin-1 (ET-1) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Vorinkubation mit dem selektiven ET_A-Rezeptor-Antagonisten BQ 123 (10^{-5} mol/l) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

5. Diskussion

Zu Beginn der Versuchsreihe stellte sich der systolische Blutdruck zwischen den Versuchsgruppen homogen dar. Signifikante Unterschiede bestanden keine. Im Verlauf der 15 Tage umfassenden Studie konnte ein Anstieg des systolischen Blutdrucks lediglich bei den ET_B -ko-Mäusen, die mit Salz-angereichertes Futter erhielten, beobachtet werden. Diese Erhöhung war signifikant gegenüber den Vergleichsgruppen. Weder die ebenfalls mit Salz-angereichertem Futter gefütterten Wildtyp Geschwistertiere noch die ET_B -ko-Mäuse, die Standard-Futter erhielten, wiesen eine signifikante Erhöhung des systolischen Blutdrucks auf.

Bezogen auf den Blutdruck wirkt sich demnach das alleinige Fehlen des ET_B -Rezeptors nicht primär negativ aus. Hätte sich eine Hypertonie rein auf der Basis des ET_B -Rezeptor-Defekts gezeigt, wäre ein signifikanter Unterschied zwischen den ET_B -ko-Mäusen und deren Wildtyp Geschwistertieren von vornherein zu verzeichnen gewesen. Die ET_B -ko-Mäuse hätten dann bereits zu Beginn der Studie einen signifikant erhöhten Blutdruck gegenüber ihren Wildtyp Geschwistertieren aufweisen müssen.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den von Gariépy et al. erhobenen Daten [159]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei ET_B -Rezeptor-defizienten Ratten nur unter Salz-reichem Futter (8% NaCl) ein Anstieg des Blutdrucks zu verzeichnen war. Sowohl bei den Wildtyp Geschwistertieren unter Fütterung mit Salz-armem (0,008% NaCl), Standard- (0,8% NaCl) und Salz-reichem Futter als auch bei den ET_B -ko-Ratten unter Fütterung mit Salz-armem oder Standard-Futter war der Blutdruck hingegen im Normbereich. Zu Beginn unterschieden sich die ET_B -ko-Tiere und deren Vergleichstiere nicht signifikant in der Höhe des systolischen Blutdruckes.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass ein generalisierter Defekt des ET_B -Rezeptors nicht zwangsläufig zur Entwicklung einer Hypertonie führen muss. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach bedarf es einer zusätzlichen Salz-reichen Kost um einen Hypertonus zu entwickeln. Ob auch andere Faktoren in Kombination mit einem ET_B -Rezeptor-Defekt einen Anstieg des systolischen Blutdrucks bewirken können ist bisher nicht geklärt.

Im Hinblick auf die Endothel-abhängige Relaxation auf Acetylcholin konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant ausgeprägte Verminderung bei den ET_B -ko-Mäusen gegenüber ihren Wildtyp Geschwistertieren festgestellt werden. Die Fütterung

von Salz-angereichertem Futter (4% NaCl) hatte hierbei keinen Einfluss auf die Endothelfunktion der Versuchstiere.

Nach heutiger Erkenntnis ist eine der ET_B -Rezeptor-vermittelten Funktionen die Induktion der Sezernierung von vasodilatatorischem NO [98;99]. NO wirkt als physiologischer Antagonist zur ET_A -Rezeptor-vermittelten Vasokonstriktion durch $ET-1$ und führt cGMP vermittelt zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur [101;107]. Auf Grund des Fehlens der endothelialen ET_B -Rezeptoren bei ET_B -ko-Mäusen entfällt diese Wirkungskaskade und führt zu einer verminderten Endothel-abhängigen Relaxationsfähigkeit.

Auch bei der Vorinkubation mit Indometacin zeigte sich eine signifikante Verminderung der Endothel-abhängigen Relaxation bei den ET_B -ko-Mäusen gegenüber ihren Wildtyp Geschwistertieren. Es konnten ebenfalls keine, auf Grund verschiedener Salzzufuhr hervorgerufene Unterschiede zwischen den untersuchten Versuchsgruppen detektiert werden. Indometacin unterbindet als pharmakologischer Hemmstoff der Cyclooxygenase die Bildung des Prostacyclins. Auf Grund dieser Hemmung und dem daraus folgenden Fehlen des Prostacyclins entfällt dessen cAMP-vermittelte vasodilatatorische Wirkung. Insofern müsste, wenn Prostacyclin in dieser Versuchsreihe eine entscheidende Rolle bei der Endothel-abhängigen Relaxation spielen würde, das Ergebnis eine bedeutend stärkere Verminderung der Endothel-abhängigen Relaxation aufweisen und graphisch eine deutliche Abweichung zu den nicht vorinkubierten Ach-Relaxationskurven zeigen. Da ein solch signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Endothel-abhängigen Relaxation auf Ach mit und ohne Vorinkubation durch Indometacin nicht zu ermitteln ist, kann daraus geschlossen werden, dass in dem vorliegenden Versuchsmodell die Endothel-abhängige Relaxation nicht durch Prostacyclin vermittelt wird.

Diese Ergebnisse lassen sich mit jenen der Endothel-abhängigen Relaxation auf Ach nach Vorinkubation mit dem NO-Synthase-Hemmer L-NAME in Einklang bringen. L-NAME verhindert durch NOS-Inhibition die Bildung von NO, wodurch dessen relaxierende Wirkung nicht zum Tragen kommen kann. Die Ergebnisse zeigen bei allen Versuchstieren eine nahezu vollständig unterdrückte Endothel-abhängige Relaxation auf Ach, unabhängig von deren Versuchsgruppenzugehörigkeit und Salzaufnahme. Insofern

erfolgt die Endothel-abhängige Relaxation auf Ach bei allen Versuchstieren in erster Linie durch die NOS-induzierte Bildung und Sekretion von NO.

Nicht nur der Mechanismus der Endothel-abhängigen Relaxation wurde in dieser Arbeit untersucht, sondern es wurde auch durch Zugabe von Natrium-Nitroprussid der Endothel-unabhängige Gefäßrelaxationsmechanismus genauer betrachtet. Bei der Endothel-unabhängigen Relaxation im Rahmen des Natrium-Nitroprussids ergab sich zwischen den einzelnen Tiergruppen kein Unterschied. Natrium-Nitroprussid wirkt ohne Verzögerung im menschlichen Körper als direkt eingebrachtes NO. Es bedarf keiner Umwandlung und kann somit augenblicklich durch Erhöhung des cGMP-Spiegels in der glatten Gefäßmuskulatur seine vasodilatatorische Wirkung entfalten. In den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit konnte weder in Abhängigkeit der Versuchstiere (ET_B-ko, Wildtyp) noch des Fütterungsmodus` (Salz-angereichertes Futter, Standard-Futter) ein Unterschied in der quantitativen Ausprägung der Gefäßrelaxation nachgewiesen werden. Endotheliale ET_B-Rezeptoren scheinen somit keine signifikante Rolle bei der Endothel-unabhängigen Vasodilatation zu spielen, was sich in der Homogenität der Versuchsgruppenkurven widerspiegelt.

Zur Untersuchung der Vasokontraktionsfähigkeit wurden die Gefäßsegmente der Aorta descendens, wie im Methodikteil dargestellt, mit ET-1 in der Organkammer inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass die Kontraktion auf Endothelin-1 bei den ET_B-ko-Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp Geschwistertieren reduziert war. Die Fütterung mit Salz-angereichertem Futter hatte keine signifikante Auswirkung auf die Kontraktion.

Das Fehlen des vaskulären ET_B-Rezeptors und die damit einhergehende erniedrigte lokale Abgabe von NO, welche die ET-1 Freisetzung *in vitro* antagonisiert [71] und die vaskuläre ET-1 Expression *in vivo* reguliert [220;221], könnte für eine Erhöhung der lokalen ET-1 Freisetzung verantwortlich sein. Auch die auf Grund des Fehlens des ET_B-Rezeptors entstandene verminderte Clearance von ET-1 führt zu einer Erhöhung von zirkulierendem ET-1 [103;104]. Ein solcher Konzentrationsanstieg von zirkulierendem ET-1 hat eine verminderte Expression der ET_A-Rezeptoren an der glatten Muskulatur der Gefäßwand zur Folge [222]. Dies würde die verschlechterte Kontraktionsfähigkeit der Aortasegmente der ET_B-ko-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp Geschwistertieren erklären.

Die Vorinkubation mit dem ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ 788 (10⁻⁵ mol/l) hatte keinen spezifischen Einfluss auf die ET-1-Kontraktion. Auch hier ist die Kontraktion auf Endothelin-1 bei den ET_B-ko-Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp Geschwistertieren signifikant vermindert (Maximale Kontraktion der ET_B-ko-Mäuse von 27±6% der Kontraktion auf 100mMol KCl gegenüber 63±8% bei den Wildtyp-Mäusen). Die Fütterung mit Salz-angereichertem Futter hatte keine signifikante Auswirkung auf die Kontraktion. Dies lässt sich in Einklang bringen mit dem Ergebnis der ET-1 Kontraktion bei der Gruppe ohne Vorinkubation. Auch hier war die Kontraktion auf ET-1 bei den ET_B-ko-Mäusen gegenüber ihren Wildtyp Geschwistertieren in gleichem Umfang vermindert. Würde der ET_B-Rezeptor eine Rolle bei der Gefäßkontraktion spielen, müsste nach Applikation des ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ 788, da hier der ET_B-Rezeptor vermittelte Effekt durch Blockade entfällt, eine deutlich stärkere Verminderung der Kontraktion von ET-1 bei den Wildtyp Mäusen dieser Gruppe gegenüber den Wildtyp Mäusen der Gruppe ohne Vorinkubation auftreten. Die lediglich geringfügige Kontraktionsverminderung zwischen der mit BQ 788 vorinkubierten Versuchsgruppe und der Versuchsgruppe ohne Vorinkubation lässt sich durch die nicht vollständige ET_B-Rezeptor-Selektivität des ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ 788 erklären. Insofern kann eine bedeutende Beteiligung des ET_B-Rezeptors bei der Vasokonstriktion im vorliegenden Versuchsmodell ausgeschlossen werden.

Eine ET-1 induzierte Kontraktion nach Vorinkubation mit dem ET_A-Rezeptor-Antagonisten BQ 123 konnte in keiner der Versuchsreihen nachgewiesen werden.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Kontraktionen auf ET-1 im vorliegenden Versuchsmodell sowohl bei den ET_B-ko-Mäusen als auch bei ihren Wildtyp Geschwistertieren primär durch den ET_A-Rezeptor vermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich sowohl die ET_B-Rezeptor defizienten Mäuse als auch deren Wildtyp Geschwistertiere primär als normotensiv. Ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die systolischen Blutdruckwerte zwischen den Gruppen wird erst bei Fütterung von Salz-angereichertem Futter messbar. Hierbei zeigten ausschließlich die ET_B-ko-Mäuse einen signifikanten Anstieg. Somit kann gesagt werden, dass ein vaskulärer ET_B-Rezeptor-Defekt nicht automatisch einen Hypertonus bedingt, sondern sich erst in Kombination mit einer erhöhten Salzaufnahme entwickelt.

Im Gegensatz dazu ist die Endothel-abhängige Relaxation bei den ET_B-ko-Mäusen gegenüber ihren Wildtyp Geschwistertieren unabhängig der Fütterung signifikant vermindert. Insofern zeigt sich die Verschlechterung der endothelialen Funktion bei den ET_B-ko-Mäusen unabhängig von der salzreichen Ernährung aber auch unabhängig von der Salz-induzierten Hypertonie. Somit kann gesagt werden, dass die Salz-induzierte Hypertonie im vorliegenden Versuchsmodell nicht in ursächlichem Zusammenhang mit der endothelialen Dysfunktion steht.

Als mögliche Ursache für die Entwicklung einer Hypertonie unabhängig von endothelialen Regulationsmechanismen der Gefäße könnte es sich allerdings auch um einen ET_B-Rezeptor-Defekt in der Niere handeln. Zum einen verhindert ET-1 ET_B-Rezeptor vermittelt [128;129] durch direkte Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität im proximalen Tubulus und Sammelrohr [125] die Natriumreabsorption, zum anderen unterbricht ET-1 die Vasopressin-induzierte cAMP Akkumulation und Wasserreabsorption im innermedulären Sammelrohr [126;127]. Bei Fehlen des ET_B-Rezeptors könnte es zu einer vermehrten Natriumreabsorption und Wasserabsorption kommen, die mit darauf folgender Zunahme des Extrazellulärvolumens zur Entstehung einer Hypertonie beitragen kann. Diese Vermutung wird gestützt durch die Ergebnisse der Forschergruppe um M. Yanagisawa [159]. Diese führten Untersuchungen an transgenetisch veränderten ET_B-ko-Ratten durch. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Ratten auf Grund eines Defekts bei der ET_B-Rezeptor-vermittelten Inhibition des renalen epithelialen Natriumkanals eine Hypertonie aufwiesen. Der potentielle molekulare Mechanismus dieser renal bedingten Salz-sensitiven Hypertonieform wurde erstmals von Gallego und Ling [223] beschrieben. Diese konnten in vitro zeigen, dass geringe Konzentrationen von ET-1 via ET_B-Rezeptor die Aktivität des apikalen Natriumkanals (eNAC) hemmen. Analog dazu sind die Ergebnisse von Ohuchi et al. [224]: Mäuse mit defizientem ET_B-Rezeptor wiesen eine Salz-abhängige Hypertonie auf, verursacht durch einen verschlechterten ET-1 Effekt auf die Natriumausscheidung. In der Folge entwickelte sich eine Expansion des Extrazellulärvolumens. Des Weiteren kam es bei der chronischen Blockade des ET_B-Rezeptors bei gesunden Versuchstieren ebenfalls zu einer Erhöhung des Blutdrucks im Rahmen einer salzreichen Diät [225]. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit zum einen den bereits mehrmals nachgewiesenen Zusammenhang zwischen einer salzreichen Diät und der

Entwicklung einer Hypertonie bei Vorliegen eines ET_B-Rezeptor-Mangels – hier erstmals an Mäusen gezeigt – und zum anderen wird zum ersten mal gezeigt, dass die Salz-induzierte Hypertonie nicht in ursächlichem Zusammenhang mit einer endothelialen Dysfunktion in Form eines ET_B-Rezeptor-Defekts steht, d. h. nicht in Verbindung mit einer fehlenden ET_B-Rezeptor vermittelten Wirkung direkt am Gefäßendothel.

Ausblickend betrachtet bedarf es somit weiterer Versuchsreihen speziell in Bezug auf die ET_B-Rezeptor-Funktion in der Niere bei Salz-induzierten hypertensiven ET_B-ko-Mäusen, um die oben beschriebenen Ergebnisse und Vermutungen für dieses Tiermodell zu verifizieren.

6. Zusammenfassung

Bei den Endothelinen, einer Familie bestehend aus 21-Aminosäure-Peptiden, handelt es sich um potente Vasokonstriktoren, die mit der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Krankheiten (z.B. Hypertonie) in Verbindung gebracht werden. Die Wirkung der Endotheline wird durch zwei G-Protein-gekoppelte, transmembran lokalisierte Rezeptoren (ET_A- und ET_B-Rezeptor) vermittelt [26;27]. Die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur exprimieren hauptsächlich ET_A-Rezeptoren, die den direkten vasokonstriktorischen Effekt der Endotheline übertragen [87], wohingegen Endothelzellen überwiegend ET_B-Rezeptoren exprimieren, die eine Endothel-abhängige Vasodilatation mittels NO und Prostacyclin vermitteln.

Die Tatsache, dass Mäuse, denen der Endothelin_B-Rezeptor fehlt kurz nach Geburt an den Folgen einer kongenitalen intestinalen Aganglionose versterben [204-206], erschwerte bisher die Untersuchung des ET_B-Rezeptors durch dieses Versuchsmodell. Überlebensfähige, ET_B-Rezeptor defiziente Mäuse konnten jedoch durch den Einsatz eines Dopamin-Hydroxylase-ET_B-Transgens gezüchtet werden [159].

Ziel dieser Arbeit war es, am ET_B-Rezeptor defizienten Maus-Modell die Bedeutung des ET_B-Rezeptors für die Endothelfunktion und für die Pathogenese einer Salz-induzierten Hypertonie zu untersuchen. Dazu wurden ET_B-ko-Mäuse mit einem absoluten Mangel an vaskulären ET_B-Rezeptoren parallel zu ihren Wildtyp Geschwistertieren für 15 Tage bei jeweiliger Fütterung eines Salz-angereicherten (4% NaCl) bzw. eines Standard-Futters (0,2% NaCl) gehalten. Der systolische Blutdruck wurde alle 5 Tage unblutig mittels Tail-Cuff-Methode gemessen. Am Tag 15 erfolgte nach thorako-abdominaler Eröffnung und Entnahme der Aorta die Untersuchung der Endothel-abhängigen und -unabhängigen Gefäßreaktion als Dosis-abhängige Relaxation an isolierten vorgespannten Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin bzw. Natrium-Nitroprussid in der Organkammer. Es folgte die Analyse der Dosis-abhängigen Kontraktion der isolierten Gefäßringe auf Endothelin-1 mit und ohne Vorinkubation mit spezifischen ET_A- und ET_B-Rezeptor-Antagonisten. Des Weiteren wurde die Dosis-abhängige Kontraktion auf Norepinephrin ermittelt.

Zu Beginn der Studie konnte in Bezug auf die Blutdruckmessung kein Unterschied der systolischen Blutdruckwerte zwischen den ET_B-ko-Mäusen und deren Wildtyp Geschwistertieren detektiert werden. Ein signifikanter Unterschied konnte im Verlauf

der Studie nur innerhalb der Gruppe der ET_B-ko-Mäuse belegt werden. Hierbei war der systolische Blutdruck der ET_B-ko-Mäuse unter erhöhter Salzzufuhr (4% NaCl) signifikant erhöht, sowohl gegenüber den Wildtyp Geschwistertieren unter Fütterung mit Salz-angereichertem Futter (4% NaCl) als auch gegenüber den ET_B-ko-Mäusen und deren Wildtyp Geschwistertieren unter Fütterung mit Standard-Futter (0,2% NaCl). Insofern bedingt der Defekt des ET_B-Rezeptors nicht automatisch die Entwicklung einer Hypertonie. In der vorliegenden Versuchsreihe bedarf es für eine Ausbildung einer Hypertonie zusätzlich zur ET_B-Rezeptor-Defizienz noch eines weiteren Faktor in Form einer erhöhten Salzaufnahme.

Die Endothel-abhängige Relaxation der ET_B-ko-Mäusen war unabhängig vom Salzgehalt der Nahrung gegenüber ihren Wildtyp Geschwistertieren signifikant reduziert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Salz-induzierte Hypertonie in diesem Modell nicht in ursächlichem Zusammenhang mit der endothelialen Dysfunktion steht.

Die Evaluation des Einflusses weiterer Mechanismen auf die Pathogenese der Salz-induzierten Hypertonie, wie beispielsweise des Natriumstoffwechsels in der Niere, bedarf zusätzlicher Studien.

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.1:** Rezeptor-selektive und Rezeptor-unselektive Substanzen in Bezug auf den ET_A und ET_B-Rezeptor in der Übersicht.
- Tab. 1.2:** Formen der experimentellen Hypertonie mit und ohne Endothelin abhängiger Komponente.
- Tab. 1.3:** Effekte chronischer ET-Rezeptor Blockade in Bezug auf Gefäßantworten bei Tiermodellen mit experimentellen Hypertonus. Die Pfeile verdeutlichen die Veränderungen bei der Gefäßantwort. Verglichen werden zum einen unbehandelte hypertensive gegenüber unbehandelten normotensive Ratten, zum anderen hypertensive mit ET-Rezeptor-Antagonisten behandelte gegenüber hypertensive unbehandelte Ratten.
Ach: Acetylcholine, SNP: Natrium-Nitroprussid, ET-1: Endothelin-1, NE: Norepinephrin; ↑ Anstieg, ↓ Abfall, ↔ keine Änderung.
- Tab. 2.1:** Zusammensetzung der Stammlösungen mit den zugrunde liegenden Stoffmengen.
- Tab. 2.2:** Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers mit den jeweiligen Anteilen der einzelnen Stammlösungen und Zusatzsubstanzen, insgesamt mit aqua bidest aufgefüllt auf 20 l.
- Tab. 3.1:** Einteilung der Tiere in die verschiedenen Behandlungsgruppen; n: Anzahl der Tiere in einer Gruppe.
- Tab. 3.2:** Übersicht über die verwendeten Vorinkubationssubstanzen und ihrem jeweiligen Einsatz.

7.2 *Abbildungsverzeichnis*

- Abb. 1.1:** Biosynthese des Endothelin-1 über seine Vorstufen.
- Abb. 1.2:** Interaktion zwischen ET-1 auf Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen mittels der ET_A- und ET_B-Rezeptoren. Hierbei wird die potentielle Rolle von ET-1 bei der Regulation des Gefäßtonuses gezeigt. Physiologischer Weise reagieren die Endothelzellen nach Stimulation durch z.B. Zytokine, Hypoxie oder Wachstumsfaktoren mit einer erhöhten ET-1 Produktion. Der Nettoeffekt wird zum einen reflektiert durch die ET_A-Rezeptor Expression auf den glatten Gefäßmuskelzellen, die Konstriktion, Proliferation und Migration vermitteln, zum anderen durch die ET_B-Rezeptoren auf den Endothelzellen, die indirekt Wachstumshemmung und Vasodilatation durch NO- und Prostacyclin Produktion vermitteln.
ECE: ET-Converting Enzym, NOS: NO-Synthase, PGI₂: Prostacyclin, cAMP: zyklisches AMP, cGMP: zyklisches GMP.
- Abb. 1.3:** Einteilung der Hypertonieformen.
- Abb. 1.4:** Physiologische Faktoren, deren Dysregulation u. a. zur Entstehung einer hypertonen Kreislaufsituation führen können.
- Abb. 3.1:** Behandlungsschema der NaCl- und der Kontroll-Gruppen. An Tag 0,5,10 und 15 wurde sowohl der systolische Blutdruck (RR) mittels Tail-Cuff-Methode, die Herzfrequenz (HF) als auch das Körpergewicht (KG) ermittelt. An Tag 15 erfolgte dann die terminale Organentnahme (OE).
- Abb. 4.1:** Körpergewicht der ET_B-Rezeptor-knockout Mäuse (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

- Abb. 4.2:** Herzfrequenz der ET_B-Rezeptor-knockout Mäuse (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).
- Abb. 4.3:** Systolischer Blutdruck der ET_B-Rezeptor-knockout Mäuse (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe), * p < 0,05 vs. Wt.
- Abb. 4.4-A:** Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe), * p < 0,05 vs. Wt.
- Abb. 4.4-B:** Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) nach Vorinkubation mit Indometacin (10⁻⁵mol/l) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe), * p < 0,05 vs. Wt.
- Abb. 4.4-C:** Endothel-abhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Acetylcholin (Ach) nach Vorinkubation mit L-NAME (10⁻⁵mol/l) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).
- Abb. 4.5:** Endothel-unabhängige Relaxation von Segmenten der Aorta descendens auf Natrium-Nitroprussid (SNP) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

Abb. 4.6: Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Norepinephrin (NE) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

Abb. 4.7-A: Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Endothelin-1 (ET-1) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe),
* p < 0,05 vs. Wt.

Abb. 4.7-B: Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Endothelin-1 (ET-1) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Vorinkubation mit dem selektiven ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ 788 (10⁻⁵ mol/l) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe), * p < 0,05 vs. Wt.

Abb. 4.7-C: Kontraktion von Segmenten der Aorta descendens auf Endothelin-1 (ET-1) bei ET_B-Rezeptor-knockout Mäusen (ET_B-ko) und deren Wildtyp Geschwistertiere (Wt) nach Vorinkubation mit dem selektiven ET_A-Rezeptor-Antagonisten BQ 123 (10⁻⁵ mol/l) nach Fütterung mit Salz-angereichertem (4% NaCl) oder Standard (0,2% NaCl) Kleintier-Futter. Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben (n = 6 / Gruppe).

7.3 Literaturverzeichnis

1. Hazzard WR: Aging and atherosclerosis. Teasing out the contributions of time, secondary aging, and primary aging. *Clin.Geriatr.Med.* 1:251-284, 1985
2. Kung CF, Lüscher TF: Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension* 25:194-200, 1995
3. Raj L: Hypertension, endothelium, and cardiovascular risk factors. *Am.J.Med.* 90:13S-18S, 1991
4. Oliver JA: Cardiovascular disease and hypertension. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2:299-306, 1993
5. Cosentino F, Lüscher TF: Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 32 Suppl 3:S54-S61, 1998
6. Jeremy JY, Mikhailidis DP, Pittilo RM: Cigarette smoking and cardiovascular disease. *J.R.Soc.Health* 115:289-295, 1995
7. Jensen-Urstad K, Johansson J, Jensen-Urstad M: Vascular function correlates with risk factors for cardiovascular disease in a healthy population of 35-year-old subjects. *J.Intern.Med.* 241:507-513, 1997
8. Noll G, Lüscher TF: The endothelium in acute coronary syndromes. *Eur.Heart J.* 19 Suppl C:C30-C38, 1998
9. Zilla P, von Oppell U, Deutsch M: The endothelium: a key to the future. *J.Card Surg.* 8:32-60, 1993
10. Lüscher TF, Barton M: Biology of the endothelium. *Clin.Cardiol* 20:II-10, 1997
11. Rubanyi GM: The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 22 Suppl 4:S1-14, 1993
12. Busse R, Trogisch G, Bassenge E: The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res.Cardiol.* 80:475-490, 1985
13. Ruschitzka FT, Noll G, Lüscher TF: The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology* 88 Suppl 3:3-19, 1997
14. Lin PJ, Chang CH: Endothelium dysfunction in cardiovascular diseases. *Changeng.Yi.Xue.Za Zhi.* 17:198-210, 1994
15. Lüscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G: Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu.Rev.Med.* 44:395-418, 1993
16. Garcia-Palmieri MR: The endothelium in health and in cardiovascular disease. *P.R.Health Sci.J.* 16:136-141, 1997

17. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980
18. Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D: Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79:2106-2110, 1982
19. Lüscher TF, Tanner FC: Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am.J.Hypertens.* 6:283S-293S, 1993
20. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF: Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am.J.Physiol* 248:C550-C556, 1985
21. O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF: Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J.Cell Physiol* 132:263-270, 1987
22. Wennmalm A: Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J.Intern.Med.* 235:317-327, 1994
23. Haynes WG, Webb DJ: Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J.Hypertens.* 16:1081-1098, 1998
24. Noll G, Wenzel RR, Lüscher TF: Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. *Mol.Cell Biochem.* 157:259-267, 1996
25. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415, 1988
26. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348:730-732, 1990
27. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348:732-735, 1990
28. Lüscher TF: Do we need endothelin antagonists? *Cardiovasc.Res.* 27:2089-2093, 1993
29. Somlyo AP, Somlyo AV: Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372:231-236, 1994
30. Lüscher TF: Endothelium in the control of vascular tone and growth: role of local mediators and mechanical forces. *Blood Press Suppl* 1:18-22, 1994

31. Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T, Lüscher TF: Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest* 98:899-905, 1996
32. Linas SL, Repine JE: Endothelial cells protect vascular smooth muscle cells from H₂O₂ attack. *Am.J.Physiol* 272:F767-F773, 1997
33. Lüscher TF, Barton M: Biology of the endothelium. *Clin.Cardiol* 20:II-10, 1997
34. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665, 1976
35. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D: Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 6 Suppl 2:S336-S343, 1984
36. Noll G, Tschudi M, Nava E, Lüscher TF: Endothelium and high blood pressure. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 17:273-279, 1997
37. Mulvany MJ, Aalkjaer C: Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 70:921-961, 1990
38. Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR, Jr., Murphy WR, Hockel GM: Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ.Res.* 38:21-29, 1976
39. Lüscher TF: Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur.Heart J.* 12 Suppl E:2-11, 1991
40. Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 246:218-226, 1988
41. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666, 1988
42. Dusting GJ, Macdonald PS, Higgs EA, Moncada S: The endogenous nitrovasodilator produced by the vascular endothelium. *Aust.N.Z.J.Med.* 19:493-498, 1989
43. Tschudi MR, Lüscher TF: [Nitric oxide: the endogenous nitrate in the cardiovascular system]. [Review] [104 refs] [German]. *Herz* 21 Suppl 1:50-60, 1996
44. Lüscher TF, Bock HA: The endothelial L-arginine/nitric oxide pathway and the renal circulation. *Klin.Wochenschr.* 69:603-609, 1991

45. Forstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS: Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur.Heart J.* 14 Suppl I:10-15, 1993
46. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770, 1990
47. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem.Pharmacol.* 38:1709-1715, 1989
48. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem.* 267:15274-15276, 1992
49. Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM: Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am.J.Hypertens.* 3:55-58, 1990
50. Nadaud S, Philippe M, Arnal JF, Michel JB, Soubrier F: Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow. *Circ.Res.* 79:857-863, 1996
51. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F: Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306:174-176, 1983
52. Moreau P, Takase H, Kung CF, Lüscher TF: [Effect of chronic inhibition of nitric oxide synthesis on vascular structure: remodeling or growth?]. *Arch.Mal Coeur Vaiss.* 88:1141-1143, 1995
53. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43:109-142, 1991
54. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thone-Reineke C, El Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer HH, Rodman DM, Theuring F: Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23:19-26, 2000
55. Masaki T: The discovery of endothelins. *Cardiovasc.Res.* 39:530-533, 1998
56. Saida K, Mitsui Y, Ishida N: A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J.Biol.Chem.* 264:14613-14616, 1989
57. Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K, .: Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:6964-6967, 1988

58. Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T: cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 10:236-242, 1991
59. Miyauchi T, Masaki T: Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu.Rev.Physiol* 61:391-415, 1999
60. Masaki T: The endothelin family: an overview. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 35:S3-S5, 2000
61. Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Demura H, Uemura H: Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry* 94:475-477, 1990
62. Malek A, Izumo S: Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am.J.Physiol* 263:C389-C396, 1992
63. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Lüscher TF: Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ET_A receptors for endothelin regulation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 238:861-865, 1997
64. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M: Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J.Clin.Invest* 92:398-403, 1993
65. Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M: Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension* 32:89-95, 1998
66. Wesson DE, Simoni J, Green DF: Reduced extracellular pH increases endothelin-1 secretion by human renal microvascular endothelial cells. *J.Clin.Invest* 101:578-583, 1998
67. Corder R, Carrier M, Khan N, Klemm P, Vane JR: Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 26 Suppl 3:S56-S58, 1995
68. Schwarting A, Schlaak J, Lotz J, Pfers I, Meyer zum Buschenfelde KH, Mayet WJ: Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS). *Scand.J.Rheumatol.* 25:246-256, 1996
69. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T: The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J.Biol.Chem.* 264:14954-14959, 1989
70. Yanagisawa M, Masaki T: Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol.Sci.* 10:374-378, 1989

71. Boulanger C, Lüscher TF: Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J.Clin.Invest* 85:587-590, 1990
72. Stewart DJ, Cernacek P, Mohamed F, Blais D, Cianflone K, Monge JC: Role of cyclic nucleotides in the regulation of endothelin-1 production by human endothelial cells. *Am.J.Physiol* 266:H944-H951, 1994
73. Wada A, Tsutamato T, Maeda Y, Kanamori T, Matsuda Y, Kinoshita M: Endogenous atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1 secretion in dogs with severe congestive heart failure. *Am.J.Physiol* 270:H1819-H1824, 1996
74. Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER: Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem.J.* 330 (Pt 3):1097-1105, 1998
75. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S: Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke* 22:378-383, 1991
76. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:9797-9800, 1988
77. Gasic S, Wagner OF, Vierhapper H, Nowotny P, Waldhausl W: Regional hemodynamic effects and clearance of endothelin-1 in humans: renal and peripheral tissues may contribute to the overall disposal of the peptide. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 19:176-180, 1992
78. Kaw S, Warner TD, Vane JR: The metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by the isolated perfused kidney of the rabbit. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 22 Suppl 8:S65-S68, 1993
79. Weitzberg E, Ahlborg G, Lundberg JM: Long-lasting vasoconstriction and efficient regional extraction of endothelin-1 in human splanchnic and renal tissues. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 180:1298-1303, 1991
80. Simonson MS: Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev.* 73:375-411, 1993
81. Rubanyi GM, Polokoff MA: Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol.Rev.* 46:325-415, 1994
82. Waeber C, Hoyer D, Palacios JM: Similar distribution of [125I]sarafotoxin-6b and [125I]endothelin-1, -2, -3 binding sites in the human kidney. *Eur.J.Pharmacol.* 176:233-236, 1990

83. Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, Sugita Y, Yoshizawa T, Uchiyama Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Kanazawa I: Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 164:587-593, 1989
84. Lin HY, Kaji EH, Winkel GK, Ives HE, Lodish HF: Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:3185-3189, 1991
85. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H, Masaki T: Cloning and functional expression of human cDNA for the ET_B endothelin receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 178:656-663, 1991
86. D'Orleans-Juste P, Honore JC, Carrier E, Labonte J: Cardiovascular diseases: new insights from knockout mice. *Curr.Opin.Pharmacol.* 3:181-185, 2003
87. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Lüscher TF: Both ET_A and ET_B receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 89:1203-1208, 1994
88. Masaki T: Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35:235-255, 1995
89. Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA: Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J.Biol.Chem.* 269:10112-10118, 1994
90. Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF: Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J.* 9:1196-1204, 1995
91. Filep JG, Herman F, Battistini B, Chabrier PE, Braquet P, Sirois P: Antiaggregatory and hypotensive effects of endothelin-1 in beagle dogs: role for prostacyclin. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 17 Suppl 7:S216-S218, 1991
92. Clarke JG, Benjamin N, Larkin SW, Webb DJ, Davies GJ, Maseri A: Endothelin is a potent long-lasting vasoconstrictor in men. *Am.J.Physiol* 257:H2033-H2035, 1989
93. Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF: Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J.Cell Physiol* 158:485-494, 1994
94. Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, Johnston NR, Gray GA, Webb DJ: Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. *Hypertension* 33:581-585, 1999
95. Rockey DC, Chung JJ: Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J.Clin.Invest* 98:1381-1388, 1996

96. Lysko PG, Elshourbagy NA, Pullen M, Nambi P: Developmental expression of endothelin receptors in cerebellar neurons differentiating in culture. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 88:96-101, 1995
97. Clavell AL, Stingo AJ, Margulies KB, Brandt RR, Burnett JC, Jr.: Role of endothelin receptor subtypes in the in vivo regulation of renal function. *Am.J.Physiol* 268:F455-F460, 1995
98. Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR: Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 13 Suppl 5:S85-S88, 1989
99. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F: Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J.Clin.Invest* 91:1367-1373, 1993
100. Jougasaki M, Schirger JA, Simari RD, Burnett JC, Jr.: Autocrine role for the endothelin-B receptor in the secretion of adrenomedullin. *Hypertension* 32:917-922, 1998
101. Boulanger CM, Lüscher TF: Differential effect of cyclic GMP on the release of endothelin-1 from cultured endothelial cells and intact porcine aorta. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 17 Suppl 7:S264-S266, 1991
102. Naomi S, Iwaoka T, Disashi T, Inoue J, Kanosaka Y, Tokunaga H, Tomita K: Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation* 97:234-236, 1998
103. Ozaki S, Ohwaki K, Ihara M, Fukuroda T, Ishikawa K, Yano M: ET_B-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 209:483-489, 1995
104. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M: Clearance of circulating endothelin-1 by ET_B receptors in rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 199:1461-1465, 1994
105. Dupuis J, Schwab AJ, Simard A, Cernacek P, Stewart DJ, Goresky CA: Kinetics of endothelin-1 binding in the dog liver microcirculation in vivo. *Am.J.Physiol* 277:G905-G914, 1999
106. Gratton JP, Cournoyer G, Loffler BM, Sirois P, D'Orleans-Juste P: ET_B receptor and nitric oxide synthase blockade induce BQ-123-sensitive pressor effects in the rabbit. *Hypertension* 30:1204-1209, 1997
107. Rich S, McLaughlin VV: Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation* 108:2184-2190, 2003

108. Berthiaume N, Yanagisawa M, D'Orleans-Juste P: Contribution of endogenous endothelin-1 and endothelin-A-receptors to the hypertensive state of endothelin-B heterozygous (+/-) knockout mice. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 36:S72-S74, 2000
109. Berthiaume N, Yanagisawa M, Labonte J, D'Orleans-Juste P: Heterozygous knock-Out of ET_B receptors induces BQ-123-sensitive hypertension in the mouse. *Hypertension* 36:1002-1007, 2000
110. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ, Webb DJ: Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 97:752-756, 1998
111. Benigni A: Endothelin antagonists in renal disease. *Kidney Int.* 57:1778-1794, 2000
112. Pollock DM: Renal endothelin in hypertension. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 9:157-164, 2000
113. Marsen TA, Schramek H, Dunn MJ: Renal actions of endothelin: linking cellular signaling pathways to kidney disease. *Kidney Int.* 45:336-344, 1994
114. Simonson MS, Dunn MJ: Endothelin peptides and the kidney. *Annu.Rev.Physiol* 55:249-265, 1993
115. Davenport AP, Kuc RE, Maguire JJ, Harland SP: ET_A receptors predominate in the human vasculature and mediate constriction. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 26 Suppl 3:S265-S267, 1995
116. Telemaque S, Gratton JP, Claing A, D'Orleans-Juste P: Endothelin-1 induces vasoconstriction and prostacyclin release via the activation of endothelin ET_A receptors in the perfused rabbit kidney. *Eur.J.Pharmacol.* 237:275-281, 1993
117. Katoh T, Chang H, Uchida S, Okuda T, Kurokawa K: Direct effects of endothelin in the rat kidney. *Am.J.Physiol* 258:F397-F402, 1990
118. Matsuura T, Miura K, Ebara T, Yukimura T, Yamanaka S, Kim S, Iwao H: Renal vascular effects of the selective endothelin receptor antagonists in anaesthetized rats. *Br.J.Pharmacol.* 122:81-86, 1997
119. Lerman A, Sandok EK, Hildebrand FL, Jr., Burnett JC, Jr.: Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation* 85:1894-1898, 1992
120. Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Yang T, Marumo F: Different localization and regulation of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. *J.Clin.Invest* 92:2339-2345, 1993

121. Lin H, Sangmal M, Smith MJ, Jr., Young DB: Effect of endothelin-1 on glomerular hydraulic pressure and renin release in dogs. *Hypertension* 21:845-851, 1993
122. Kohan DE, Padilla E: Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. *J.Clin.Invest* 91:1235-1240, 1993
123. Hoffman A, Abassi ZA, Brodsky S, Ramadan R, Winaver J: Mechanisms of big endothelin-1-induced diuresis and natriuresis : role of ET_B receptors. *Hypertension* 35:732-739, 2000
124. Harris PJ, Skinner SL, Zhuo J: Haemodynamic and renal tubular responses to low-dose infusion or bolus injection of the peptide ANF in anaesthetized rats. *J.Physiol* 412:309-320, 1989
125. Zeidel ML, Brady HR, Kone BC, Gullans SR, Brenner BM: Endothelin, a peptide inhibitor of Na(+)-K(+)-ATPase in intact renaltubular epithelial cells. *Am.J.Physiol* 257:C1101-C1107, 1989
126. Kohan DE, Padilla E, Hughes AK: Endothelin B receptor mediates ET-1 effects on cAMP and PGE2 accumulation in rat IMCD. *Am.J.Physiol* 265:F670-F676, 1993
127. Nadler SP, Zimpelmann JA, Hebert RL: Endothelin inhibits vasopressin-stimulated water permeability in rat terminal inner medullary collecting duct. *J.Clin.Invest* 90:1458-1466, 1992
128. Plato CF, Pollock DM, Garvin JL: Endothelin inhibits thick ascending limb chloride flux via ET_B receptor-mediated NO release. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 279:F326-F333, 2000
129. Edwards RM, Pullen M, Nambi P: Activation of endothelin ET_B receptors increases glomerular cGMP via an L-arginine-dependent pathway. *Am.J.Physiol* 263:F1020-F1025, 1992
130. Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH: Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19:117-130, 1992
131. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M: ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78:473-485, 1994
132. Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K: Endothelin-converting enzymes. *FASEB J.* 6:2653-2659, 1992
133. Takahashi M, Matsushita Y, Iijima Y, Tanzawa K: Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J.Biol.Chem.* 268:21394-21398, 1993

134. Takada J, Hata M, Okada K, Matsuyama K, Yano M: Biochemical properties of endothelin converting enzyme in renal epithelial cell lines. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 182:1383-1388, 1992
135. Dasgupta F, Mukherjee AK, Gangadhar N: Endothelin receptor antagonists--an overview. *Curr.Med.Chem.* 9:549-575, 2002
136. Benigni A, Remuzzi G: Endothelin antagonists. *Lancet* 353:133-138, 1999
137. Ihara M, Ishikawa K, Fukuroda T, Saeki T, Funabashi K, Fukami T, Suda H, Yano M: In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ET_A receptor. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 20 Suppl 12:S11-S14, 1992
138. Pollock DM, Opgenorth TJ: Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ET_A receptor activation. *Am.J.Physiol* 264:R222-R226, 1993
139. Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliott JD, Sung CP: The selective endothelin ET_A receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur.J.Pharmacol.* 225:347-350, 1992
140. Okada M, Nishikibe M: BQ-788, a selective endothelin ET_B receptor antagonist. *Cardiovasc.Drug Rev.* 20:53-66, 2002
141. Beevers G, Lip GY, O'Brien E: ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ* 322:912-916, 2001
142. Lariviere R, Thibault G, Schiffrin EL: Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 21:294-300, 1993
143. Lariviere R, Day R, Schiffrin EL: Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 21:916-920, 1993
144. Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL: Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 24:183-188, 1994
145. Schiffrin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P, Touyz RM: Deoxycorticosterone acetate plus salt induces overexpression of vascular endothelin-1 and severe vascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 25:769-773, 1995
146. Doucet J, Gonzalez W, Michel JB: Endothelin antagonists in salt-dependent hypertension associated with renal insufficiency. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 27:643-651, 1996

147. Sventek P, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL: Vascular and cardiac overexpression of endothelin-1 gene in one-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats but only in the late phase of two-kidney one clip Goldblatt hypertension. *J.Hypertens.* 14:57-64, 1996
148. Sharifi AM, He G, Touyz RM, Schiffrin EL: Vascular endothelin-1 expression and effect of an endothelin ET_A antagonist on structure and function of small arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 31 Suppl 1:S309-S312, 1998
149. Day R, Lariviere R, Schiffrin EL: In situ hybridization shows increased endothelin-1 mRNA levels in endothelial cells of blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am.J.Hypertens.* 8:294-300, 1995
150. d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Moreau P, Lüscher TF: Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. *Hypertension* 30:905-911, 1997
151. Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG: Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 30:29-34, 1997
152. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Lüscher TF: Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET_A-receptor antagonist. *Circulation* 96:1593-1597, 1997
153. Li JS, Knafo L, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL: Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats. *Am.J.Physiol* 271:H88-H93, 1996
154. Hocher B, George I, Rebstock J, Bauch A, Schwarz A, Neumayer HH, Bauer C: Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertension* 33:816-822, 1999
155. Rossi GP, Sacchetto A, Rizzoni D, Bova S, Porteri E, Mazzocchi G, Belloni AS, Bahcelioglu M, Nussdorfer GG, Pessina AC: Blockade of angiotensin II type 1 receptor and not of endothelin receptor prevents hypertension and cardiovascular disease in transgenic (mREN2)27 rats via adrenocortical steroid-independent mechanisms. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20:949-956, 2000
156. Sventek P, Turgeon A, Schiffrin EL: Vascular endothelin-1 gene expression and effect on blood pressure of chronic ET_A endothelin receptor antagonism after nitric oxide synthase inhibition with L-NAME in normal rats. *Circulation* 95:240-244, 1997
157. Lariviere R, Sventek P, Schiffrin EL: Expression of endothelin-1 gene in blood vessels of adult spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 56:1889-1896, 1995

158. Li JS, Schiffrin EL: Chronic endothelin receptor antagonist treatment of young spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.* 13:647-652, 1995
159. Garipey CE, Ohuchi T, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M: Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J.Clin.Invest* 105:925-933, 2000
160. d'Uscio LV, Moreau P, Shaw S, Takase H, Barton M, Lüscher TF: Effects of chronic ET_A-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 29:435-441, 1997
161. Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Lüscher TF: ET_A receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 31:499-504, 1998
162. Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes DR, Jr., Lerman A: Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 99:1747-1752, 1999
163. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Lüscher TF: Endothelin ET_A receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:14367-14372, 1998
164. Prie S, Stewart DJ, Dupuis J: EndothelinA receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 97:2169-2174, 1998
165. Hirahashi J, Nakaki T, Hishikawa K, Marumo T, Hayashi M, Saruta T: Endothelin ET_A receptor antagonist reverses the inhibitory effect of platelet-derived growth factor on cytokine-induced nitric oxide production. *Eur.J.Pharmacol.* 365:119-123, 1999
166. Panza JA, Casino PR, Badar DM, Quyyumi AA: Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation* 87:1475-1481, 1993
167. Moreau P, Takase H, Kung CF, Shaw S, Lüscher TF: Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric oxide-deficient hypertension. *Hypertension* 29:763-769, 1997
168. Moreau P, Takase H, Kung CF, van Rooijen MM, Schaffner T, Lüscher TF: Structure and function of the rat basilar artery during chronic nitric oxide synthase inhibition. *Stroke* 26:1922-1928, 1995
169. Kung CF, Moreau P, Takase H, Lüscher TF: L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta. Prevention by trandolapril and verapamil. *Hypertension* 26:744-751, 1995

170. Nguyen PV, Parent A, Deng LY, Fluckiger JP, Thibault G, Schiffrin EL: Endothelin vascular receptors and responses in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 19:II98-104, 1992
171. Schiffrin EL, Deng LY, Laroche P: Blunted effects of endothelin upon small subcutaneous resistance arteries of mild essential hypertensive patients. *J.Hypertens.* 10:437-444, 1992
172. Muntzel M, Drueke T: A comprehensive review of the salt and blood pressure relationship. *Am.J.Hypertens.* 5:1S-42S, 1992
173. Campese VM: Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications. *Hypertension* 23:531-550, 1994
174. Weinberger MH: Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension* 27:481-490, 1996
175. Luft FC, Weinberger MH: Sodium sensitivity and resistance of blood pressure: the role of the kidney and the renin-aldosterone axis. *Kidney Int.Suppl* 22:S234-S241, 1987
176. Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, Gonzalez D, Coca A, de la SA: Renin-angiotensin system genetic polymorphisms and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 35:512-517, 2000
177. de la SA, Lluch MM, Coca A, Aguilera MT, Giner V, Bragulat E, Urbano-Marquez A: Fluid, ionic and hormonal changes induced by high salt intake in salt-sensitive and salt-resistant hypertensive patients. *Clin.Sci.(Lond)* 91:155-161, 1996
178. Lluch MM, de la SA, Poch E, Coca A, Aguilera MT, Compte M, Urbano-Marquez A: Erythrocyte sodium transport, intraplatelet pH, and calcium concentration in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 27:919-925, 1996
179. Kawasaki T, Delea CS, Bartter FC, Smith H: The effect of high-sodium and low-sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension. *Am.J.Med.* 64:193-198, 1978
180. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE: Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N.Engl.J.Med.* 323:22-27, 1990
181. Chen PY, Sanders PW: L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J.Clin.Invest* 88:1559-1567, 1991
182. Tolins JP, Shultz PJ: Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int.* 46:230-236, 1994

183. Lüscher TF, Vanhoutte PM, Raij L: Antihypertensive treatment normalizes decreased endothelium-dependent relaxations in rats with salt-induced hypertension. *Hypertension* 9:III193-III197, 1987
184. Ni Z, Oveisi F, Vaziri ND: Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. *Hypertension* 34:552-557, 1999
185. Lariviere R, Deng LY, Day R, Sventek P, Thibault G, Schiffrin EL: Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J.Mol.Cell Cardiol.* 27:2123-2131, 1995
186. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K: Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J.Mol.Med.* 80:105-116, 2002
187. Stein CM, Nelson R, Brown M, He H, Wood M, Wood AJ: Dietary sodium intake modulates systemic but not forearm norepinephrine release. *Clin.Pharmacol.Ther.* 58:425-433, 1995
188. Le Douarin NM, Teillet MA: The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 30:31-48, 1973
189. Mayer TC: The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev.Biol.* 34:39-46, 1973
190. Serbedzija GN, Fraser SE, Bronner-Fraser M: Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. *Development* 108:605-612, 1990
191. Webster W: Embryogenesis of the enteric ganglia in normal mice and in mice that develop congenital aganglionic megacolon. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 30:573-585, 1973
192. YNTEMA CL, HAMMOND WS: The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J.Comp Neurol.* 101:515-541, 1954
193. Kapur RP, Yost C, Palmiter RD: A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development* 116:167-175, 1992
194. Lane PW: Association of megacolon with two recessive spotting genes in the mouse. *J.Hered.* 57:29-31, 1966
195. McCabe L, Griffin LD, Kinzer A, Chandler M, Beckwith JB, McCabe ER: Overo lethal white foal syndrome: equine model of aganglionic megacolon (Hirschsprung disease). *Am.J.Med.Genet.* 36:336-340, 1990

196. Shah KN, Dalal SJ, Desai MP, Sheth PN, Joshi NC, Ambani LM: White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: possible variant of Waardenburg syndrome. *J.Pediatr.* 99:432-435, 1981
197. Edery P, Attie T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A, Lyonnet S: Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat.Genet.* 12:442-444, 1996
198. Attie T, Till M, Pelet A, Amiel J, Edery P, Boutrand L, Munnich A, Lyonnet S: Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Hum.Mol.Genet.* 4:2407-2409, 1995
199. Auricchio A, Casari G, Staiano A, Ballabio A: Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum.Mol.Genet.* 5:351-354, 1996
200. Amiel J, Attie T, Jan D, Pelet A, Edery P, Bidaud C, Lacombe D, Tam P, Simeoni J, Flori E, Nihoul-Fekete C, Munnich A, Lyonnet S: Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum.Mol.Genet.* 5:355-357, 1996
201. Hofstra RM, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, Ravenswaaij-Arts C, Majoor-Krakauer D, Angrist M, Chakravarti A, Meijers C, Buys CH: A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat.Genet.* 12:445-447, 1996
202. Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, Chakravarti A: A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79:1257-1266, 1994
203. Kusafuka T, Wang Y, Puri P: Novel mutations of the endothelin-B receptor gene in isolated patients with Hirschsprung's disease. *Hum.Mol.Genet.* 5:347-349, 1996
204. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M: Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79:1277-1285, 1994
205. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M: Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79:1267-1276, 1994
206. Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N, Hammer RE: Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 125:825-836, 1998

207. Garipey CE, Cass DT, Yanagisawa M: Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:867-872, 1996
208. Nagahama M, Ozaki T, Hama K: A study of the myenteric plexus of the congenital aganglionosis rat (spotting lethal). *Anat.Embryol.(Berl)* 171:285-296, 1985
209. Baetge G, Pintar JE, Gershon MD: Transiently catecholaminergic (TC) cells in the bowel of the fetal rat: precursors of noncatecholaminergic enteric neurons. *Dev.Biol.* 141:353-380, 1990
210. Baetge G, Schneider KA, Gershon MD: Development and persistence of catecholaminergic neurons in cultured explants of fetal murine vagus nerves and bowel. *Development* 110:689-701, 1990
211. Blaugrund E, Pham TD, Tennyson VM, Lo L, Sommer L, Anderson DJ, Gershon MD: Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development* 122:309-320, 1996
212. Kapur RP, Hoyle GW, Mercer EH, Brinster RL, Palmiter RD: Some neuronal cell populations express human dopamine beta-hydroxylase-lacZ transgenes transiently during embryonic development. *Neuron* 7:717-727, 1991
213. d'Uscio LV, Shaw S, Barton M, Lüscher TF: Losartan but not verapamil inhibits angiotensin II-induced tissue endothelin-1 increase: role of blood pressure and endothelial function. *Hypertension* 31:1305-1310, 1998
214. Ruschitzka F, Shaw S, Gygi D, Noll G, Barton M, Lüscher TF: Endothelial dysfunction in acute renal failure: role of circulating and tissue endothelin-1. *J Am Soc.Nephrol.* 10:953-962, 1999
215. Russell A, Watts S: Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse [In Process Citation]. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 294:598-604, 2000
216. Guney HZ, Gorgun CZ, Hodoglugil U, Zengil H: Effects of auro-detoxin treatment on vascular responses in mouse aorta. *Gen.Pharmacol.* 29:261-264, 1997
217. Barton M, Vos I, Shaw S, Boer P, d'Uscio LV, Grone HJ, Rabelink TJ, Lattmann T, Moreau P, Lüscher TF: Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt- sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophy and glomerulosclerosis. *J Am.Soc.Nephrol.* 11:835-845, 2000

-
218. Hafner D, Heinen E, Noack E: Mathematical analysis of concentration-response relationships. Method for the evaluation of the ED50 and the number of binding sites per receptor molecule using the logit transformation. *Arzneimittelforschung*. 27:1871-1873, 1977
 219. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ.Res.* 47:1-9, 1980
 220. Filep JG: Endogenous endothelin modulates blood pressure, plasma volume, and albumin escape after systemic nitric oxide blockade. *Hypertension* 30:22-28, 1997
 221. Sventek P, Li JS, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL: Vascular structure and expression of endothelin-1 gene in L-NAME-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 27:49-55, 1996
 222. Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH: Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19:117-130, 1992
 223. Gallego MS, Ling BN: Regulation of amiloride-sensitive Na⁺ channels by endothelin-1 in distal nephron cells. *Am.J.Physiol* 271:F451-F460, 1996
 224. Ohuchi T, Yanagisawa M, Garipey CE: Renal tubular effects of endothelin-B receptor signaling: its role in cardiovascular homeostasis and extracellular volume regulation. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 9:435-439, 2000
 225. Pollock DM, Pollock JS: Evidence for endothelin involvement in the response to high salt. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 281:F144-F150, 2001

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Jan Galle, Oberarzt am Institut für Nephrologie der Universität Würzburg, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herrn Dr. med. Thomas Quaschnig danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich Carmen Bauer und Dr. med. Julian Widder für konstruktive Anregungen sowie ständige Bereitschaft zu fachlicher und persönlicher Diskussion.

Herzlichen Dank an Dr. Katharina Jensen und Jürgen Moosecker für moralische Unterstützung, konstruktive Beiträge und grenzenlose Geduld.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

MEDIZINISCHE PRAKTIKA / FAMULATUREN

06 / 1997	HNO	Universitätsklinik Rechts der Isar, München
10 / 1997	Chirurgie	Sisters of Mercy Hospital, Cork, Irland
11 / 1997	Innere Medizin	St. Patricks Hospital, Cork, Irland
08 / 2000	Chirurgie	Klinik Dr. Rinecker, München
09 / 2001	Orthopädie	Klinik König-Ludwig-Haus, Würzburg
03 / 2002	Innere Medizin	Universitätsklinik, Würzburg
10 / 2002	Allgemeinmedizin	Frau Dr. Seissiger, Würzburg

SONSIGE PRAKTISCHE ERFAHRUNG

1998 – 2000	Nacht- und Pflegedienste in der Universitätsklinik Würzburg, Viszeralchirurgie Station CII/CIII
2000 – 2004	Nacht- und Pflegedienste in der Universitätsklinik Würzburg, Herz-Thorax-Chirurgie-Intensivstation

KENNTNISSE

Sprachen:	Englisch (9 Jahre) Französisch (5 Jahre)
EDV	Windows Office, Reference-Manager

EHRENAMTLICHE TÄTIGKEITEN

1998 – 1999	Mitglied der Fachschaft Medizin
-------------	---------------------------------

PERSÖNLICHE INTERESSEN und AKTIVITÄTEN

Sport- und Alpinklettern
Bergsteigen und Expeditionsmedizin
Skitouren, Segeln, Photographie

VERÖFFENTLICHUNGEN

Quaschnig T, Wunderlich C, Wanner C, Richter M, Neumayer HH, Galle J, Yanagisawa M, Hocher B:
Endothelial dysfunction does not account for salt-induced hypertension in endothelin-B receptor-deficient mice. NDT 2003;18 Suppl.4:604

Quaschnig T, Wunderlich C, Wanner C, Richter M, Neumayer HH, Galle J, Yanagisawa M, Hocher B:
Endothelin-B receptor-deficient mice develop salt-induced hypertension independent from endothelial dysfunction. J Am Soc Nephrol 2003, 14:616A