

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Seipel

Sektion für Nieren- und Hochdruckkrankheiten

Leiter: Professor Dr. T. Rislér

**Charakterisierung der stimulatorischen und inhibitorischen
G-Proteine in der urämischen Kardiomyopathie vor und
nach Behandlung mit Endothelin-Rezeptorantagonisten**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Benjamin Wiesinger
aus Ravensburg**

2003

Dekan:	Prof. Dr. C.D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. T. Risler
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Oßwald

Inhaltsverzeichnis , Seiten 3-5

Kapitel 1

Einleitung, Seiten 6-18

1.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit	-----	S. 6
1.2 Bisheriger Kenntnisstand	-----	S.7
1.2.1 Organveränderungen in der Urämie	-----	S.7
1.2.2 Strukturelle Veränderungen in der urämischen Kardiomyopathie	-----	S.7
1.2.3 Endothelinwirkungen auf zellulärer Ebene	-----	S.8
1.2.4 Genexpression und G-Proteine	-----	S.9
1.2.5 Endothelin	-----	S.9
1.2.6 Endothelin-Rezeptoren	-----	S.10
1.2.7 Synthese des Endothelins und Vorkommen	-----	S.12
1.2.8 Rolle der Endotheline in verschiedenen Krankheitsbildern	-----	S.14
1.2.9 G-Proteine	-----	S.16
1.2.10 Endothelinrezeptorantagonisten	-----	S.17
1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	-----	S.17

Kapitel 2

Material und Methoden, Seiten 19-41

2.1 Versuchstiere	-----	S.19
2.2 Materialien	-----	S.20
a.1) Plasmamembran-Präparation aus Organen	-----	S.20
a.2) Bradford Protein	-----	S.20
a.3) SDS Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS PAGE)	-----	S.20
a.4) Western Blot	-----	S.21
a.5) RNA Extraktion	-----	S.22
a.6) PCR, Synthetische Oligonukleotide	-----	S.22
a.7) Reverse Transkription	-----	S.22
a.8) Polymerase Kettenreaktion, PCR	-----	S.22
a.9) DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese	-----	S.23
a.10) Klonierung	-----	S.23
a.11) Bakterientransformation	-----	S.24
a.12) Bakterienkulturen	-----	S.24

a.13) Plasmid-DNA-Transformation	-----S.24
a.14) Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	-----S.25
2.a) Chemikalienbezug	-----S.25
2.b) Software	-----S.26
2.c) Geräte	-----S.26
2.d) Verbrauchsmaterial	-----S.27
2.3 Analytische Methoden	-----S.27
A1) Plasmamembranpräparation aus Geweben	-----S.27
A2) Bradford Microassay zur Proteinbestimmung	-----S.27
B1) SDS Polyacrylamidgelelektrophorese SDS PAGE	-----S.28
B2) Western Blot	-----S.30
B3) Stripping und Reprobing	-----S.31
C1) Klonierung	-----S.31
C2) Ligation	-----S.32
C3) Transformation	-----S.32
C4) Glycerinkulturen	-----S.33
C5) Plasmid DNA Präparation	-----S.34
C6) Zur Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	-----S.34
C7) Zur DNA Reinigung durch Phenol/Chloroform Extraktion	-----S.35
D1) RNA Extraktion aus Geweben	-----S.35
D2) Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese	-----S.36
D3) PCR-Reverse Transkription	-----S.36
D4) PCR-Polymerase Kettenreaktion	-----S.37
D5) PCR-Kompetitive PCR	-----S.38
D6) Synthese des Standards und der Ribosonden	-----S.39
D7) PCR-DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese	-----S.40
2.4 Statistik	-----S.41

Kapitel 3

Ergebnisse, Seiten 42-65

3.1 Western Blot	-----S.42
1. G α	-----S.42
2. Gi $_{1/2}$ α	-----S.43
3. Gi $_{3}$ α	-----S.43

3.2 Plasmamembranpräparation	-----S.43
3.2.1 Die Durchführung des Western Blots-Ergebnisse	-----S.45
3.3.1 Die G α Ergebnisse im Western Blot	-----S.45
3.3.2 Die Gi $_{1/2}$ α Ergebnisse im Western Blot	-----S.49
3.3.3 Die Gi $_3$ α Ergebnisse im Western Blot	-----S.53
3.4.1 Die G α Ergebnisse in der quantitativen RT-PCR	-----S.57
3.4.2 Die Gi (unspezifisch) Ergebnisse in der quantitativen RT-PC	-----S.60
3.4.3 Die Gi $_3$ α Ergebnisse in der quantitativen RT-PCR	-----S.62

Kapitel 4

Diskussion, Seiten 66-79

4.1 Ergebniszusammenfassung	-----S.66
4.2 Verdeutlichung der pathogenetischen Grundlagen der untersuchten Kollektive	-----S.67
4.3 G-Proteine in der Herzinsuffizienz und in der Kardiomyopathie	-----S.69
4.4 G-Proteine in der Hypertonie	-----S.71
4.5 Endothelin	-----S.72
4.6 G-Proteine und Endothelin	-----S.74
4.7 G-Proteine in der myokardialen Zellapoptose	-----S.75
4.7.1 Gs Proteine und Zellapoptose	-----S.75
4.7.2 Gi Proteine in der myokardialen Zellapoptose	-----S.77
4.8 Zusammenfassung	-----S.78

Literaturverzeichnis

Seiten 80-88

Danksagung

Seiten 89-90

Lebenslauf, Curriculum vitae

Seite 91

Charakterisierung der stimulatorischen und inhibitorischen G-Proteine in der urämischen Kardiomyopathie vor und nach Behandlung mit Endothelin-Rezeptorantagonisten

1. Einleitung

1.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

Die Urämie, das heißt die Retention harnpflichtiger Substanzen, ist eine weitverbreitete Krankheit. Im Rahmen der Urämie, bedingt durch eine Niereninsuffizienz gleich welcher Genese (idiopathisch, postinfektiös, autoimmun, nach akutem Nierenversagen oder etwa nach Medikamentenabusus wie bei NSAR Abusus), sind insbesondere kardiovaskuläre Komplikationen Grund für die hohe Morbidität und Mortalität der Erkrankung. Sie stellen mit etwa 50% die häufigste Todesursache dar (Bethesda et al 1995, Amann et al 1996, Jones et al 1992, Parfrey et al 1990). Zu nennen sind insbesondere die koronare Herzerkrankung, die zunehmende linksventrikuläre Hypertrophie und die myokardiale Insuffizienz (Silverberg et al 1989, Parfrey et al 1990, Lüscher 2000). Die kardiovaskuläre Mortalität ist im Vergleich zu alters- und geschlechtsreifen Gruppen in der Normalbevölkerung um den Faktor 5 bis 20 erhöht, gegenüber der Hochrisikogruppe Diabetes mellitus sogar noch um den Faktor 3.

Endotheline (wie etwa das ET1) konnten in neueren Arbeiten in der Urämie beispielsweise im Urin von Patienten in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden, aber auch im Plasma herzinsuffizienter Patienten (Ruiz Ortega et al 1997, Nambi et al 2001). Da im Verlauf der Urämie oftmals eine urämische, hypertrophe Kardiomyopathie entsteht, die sowohl in ihrer Entstehung als auch bezüglich ihrer molekularen Grundlagen noch weitgehend unbekannt ist, aber einen wesentlichen Grund für die kardiale Mortalität und Morbidität darstellt, sollte dieses Kollektiv in dieser Arbeit bezüglich ihrer nachweisbaren Mengen an G-Proteinen (wichtige Signaltransduktionsproteine) untersucht werden. Zusätzlich hierzu wurde auch der Einfluß von Endothelin A- und AB-Rezeptorantagonisten auf die G-Proteine in weiteren urämischen Kollektiven betrachtet. Hierzu wurden Herzmuskelzellen (Kardiomyocyten) aus einem Tiermodell (Ratten) aufgearbeitet und auf Protein- und

RNA Ebene bezüglich Ihres G Proteingehaltes untersucht, um Unterschiede im G Proteingehalt als Hinweis für veränderte molekulare Grundlagen in der Urämie nachzuweisen. Dies auch deswegen, um in einem weiteren urämischen Kollektiv, das mit Endothelin A-Rezeptorantagonisten behandelt wurde, und in einem, das mit Endothelin AB-Rezeptorantagonisten behandelt wurde, den Einfluß von Endothelinrezeptorantagonisten in der Urämie zu untersuchen.

1.2 Bisheriger Kenntnisstand

1.2.1 Organveränderungen in der Urämie

Die Urämie ist eine Akkumulation von Stoffwechselabbauprodukten, die durch eine renale Insuffizienz (Reduktion der Nierenclearance) oder einen Nierenkomplettausfall bedingt ist (mögliche Gründe siehe oben). Hierdurch kumulieren beispielsweise: Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Homocystein, Parathormon, Cyanat, Beta-2-Mikroglobulin, Stickstoffmonooxid, Hippursäure, Indoxylsulfat, Paracresol, Methylguanidin und viele andere Stoffe.

Die klinischen Manifestationen sind mannigfaltig. Durch die akkumulierten Toxine/Stoffe kann auf organischer Ebene eine Enzephalopathie, eine Neuropathie und sogar eine Dialyseudemenz entstehen, aber auch Knochenerkrankungen, Gastritiden, Enteritiden, Weichteilverkalkungen und Nekrosen und Juckreiz. Außerdem Hyperlipidämien, Kohlenhydratintoleranzen, Insulinsekretionsstörungen, Anämien, Blutungsneigungen, immunologische- und Sexualfunktionsstörungen und letztlich Kardiomyopathien.

In dieser Arbeit soll von den vielen urämisch bedingten Veränderungen im Organismus auf die Veränderungen im Herzen, bekannt als urämische hypertrophe Kardiomyopathie, fokussiert werden.

1.2.2 Strukturelle Veränderungen in der urämischen Kardiomyopathie

Eine zentrale morphologische Veränderung hinsichtlich der Prognose ist die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH), (Silverberg et al 1989, Parfrey et al 1990). Sie hat eine hohe Prävalenz in urämischen Patienten mit 50-70% (Jones et al 1992, Huting et al 1992, Foley et al 1993) und ist somit höher als bei der essentiellen Hypertonie (etwa 40%). Diese und die gleichzeitig bestehende generalisierte

Myokardhypertrophie führt zur Erhöhung des vasomotorischen Perfusionswiderstandes und steigert das Infarktrisiko. Histologisch entsteht im Verlauf eine diffuse, interstitielle Fibrosierung (Myocytenersatz durch Bindegewebe) und Dilatation des Myokards und eine reduzierte intramyokardiale Kapillarisation mit Gefäßwandhypertrophie der Gefäßmuskelzellen (Amann et al 1992 und 1995, Mall et al 1990). Dadurch sinkt letztlich auch die linksventrikuläre Compliance (Rambausek et al 1985).

Folgende Faktoren tragen nach dem heutigen Kenntnisstand zur Entwicklung der urämischen Kardiomyopathie bei:

- die arterielle Hypertonie
- das adrenerge System
- das NO (Stickstoffmonoxid)-System
- das lokale Renin-Angiotensin System
- das Parathormon
- das Erythropoietin
- das Endothelin

In dieser Arbeit soll die Wirkung des Endothelins/seiner Rezeptorantagonisten in urämisch veränderten Herzmuskelzellen beleuchtet werden.

1.2.3 Endothelinwirkungen auf zellulärer Ebene

Über die Rolle des Endothelins in der Kardiomyopathie ist noch wenig bekannt. Ergebnisse in Endothelin-1-transgenen k.o. Mäusen sprechen für eine Rolle des Endothelins in der Entwicklung der renalen Sklerose und der Myokardhypertrophie (Hochoer et al 1996). Auch Wu et al konnte 1996 aufzeigen, dass Endothelin-1 in vitro in Kardiomyocyten der Ratte eine Myokardzellhypertrophie bewirkte. Ein Hinweis für die Rolle des Endothelins bei der Entstehung der Myokardfibrose ist, dass ET-1 auch als potentieller Stimulator der interstitiellen Kollagensynthese nachgewiesen wurde (Weber et al 1994). Die Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie (stimuliert durch Aortenbanding in Ratten) konnte 1993 von Ito durch den Einsatz von Endothelin-1-Antagonisten aufgezeigt werden. In Zellkulturen konnte die Endothelinexpression in Kardiomyocyten durch Angiotensin II erhöht und durch die Gabe von ACE Hemmern reduziert werden (Clavell et al 1996, Arai et al 1995). Die Endothelin-1 Gabe am aortalen Rattengefäßmuskel steigerte ihrerseits wiederum die Freisetzung von Angiotensin II (Sventek et al 1996). Benigni et al zeigte 1991, dass

in urämischen Ratten die renale Endothelinproduktion gesteigert war, Ohta et al konnte im gleichen Jahr eine vermehrte renale ET-1 Exkretion nachweisen. Endothelin-Antagonisten konnten die Entwicklung der renalen Glomerulosklerose bei subtotal nephrektomierten Ratten verhindern (Nabokov et al 1996). Dies deutet zum einen auf eine erhöhte ET-Konzentration bei urämischen Patienten hin, zum anderen erhofft man sich durch den Einsatz spezifischer Antagonisten auch eine Verringerung der Progredienz der urämischen Kardiomyopathie als entscheidendem Mortalitäts- und Morbiditätsfaktor.

1.2.4 Genexpression und G-Proteine

Auf genetischer Ebene vollzog sich die Myokardhypertrophie der Ratten bei Hoher et al 1996 über eine Induktion der Genexpression von Erg-1, c-myc, c-jun und c-fos. Die PreproET-mRNA-Level konnten in der ischämischen Kardiomyopathie (ICM) im Herzen erhöht gemessen werden, in der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) jedoch nicht (gleiches galt für die Plasma ET-Spiegel und die ET A- und die ET AB-Rezeptoren), (Tonnessen et al 2000, Seneri et al 2000).

Bezüglich der G-Proteine liegen Daten zur ischämischen und idiopathischen Kardiomyopathie vor, nämlich verringerte Gs alpha Proteinspiegel bei konstanten oder erhöhten Gi Proteinspiegeln (Singh et al 2000, Brodde et al 1998). Keine Daten jedoch existieren derzeit zu den Veränderungen der G-Proteine in der urämischen, hypertrophen Kardiomyopathie.

1.2.5 Endothelin

Endothelin ist ein Peptid aus 21 Aminosäuren, das 1988 von Kähler et al als potenter Vasokonstriktor identifiziert wurde (Kähler et al 1997, Miyauchi et al 1999). Seither wurden drei Endotheline beschrieben, wobei die Erstbeschreibung auf Hickey et al 1985 zurückgeht. Sein Molekulargewicht beträgt 2492 Dalton.

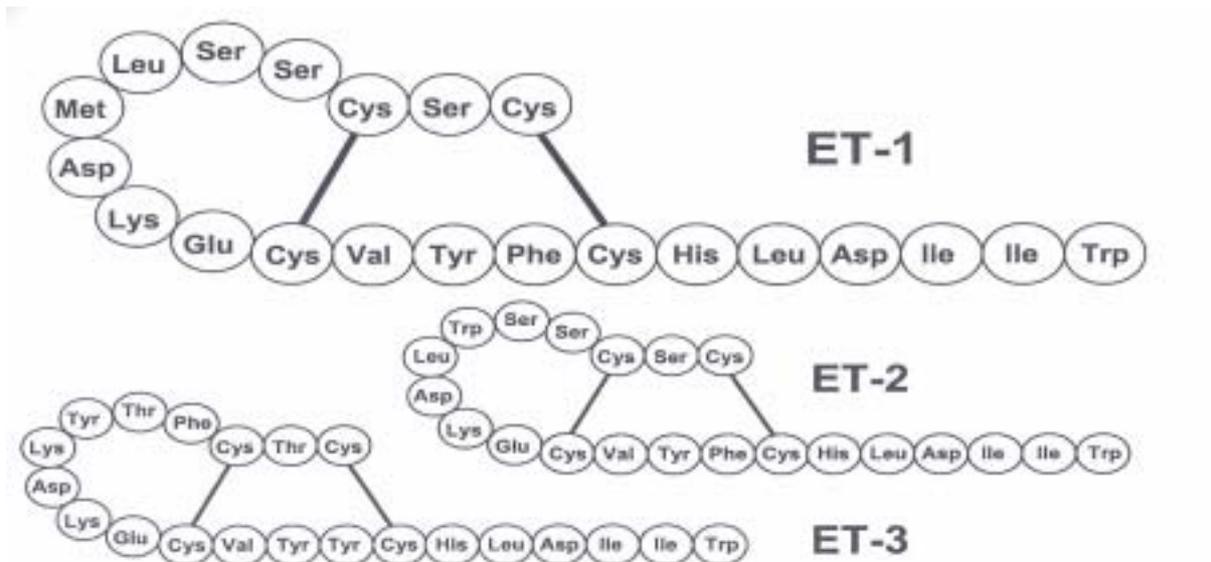


Abbildung 1:

Legende: Die Aminosäure-Struktur der Endotheline nach Kähler et al 1997.

Die drei Polypeptide Endothelin-1, -2 und -3 (ET) bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren mit zwei Disulfidbrücken. ET-2 und ET-3 unterscheiden sich durch den Austausch von zwei, bzw. sechs Aminosäuren von ET-1.

1.2.6 Endothelin-Rezeptoren

Die molekulare Signaltransduktion soll nun beispielhaft am Endothelin A (ET A)-Rezeptor und Endothelin B (ET B)-Rezeptor beschrieben werden.

Aktivierte ET A-Rezeptoren, die vornehmlich über ET-1 und in geringerem Maße auch über ET-3 aktiviert werden, stimulieren über G-Proteine die Phospholipase C (Badr et al 1989, Takuwa et al 1990). Dies erhöht das 1,4,5-Inositol-Triphosphat (IP 3) und 1,2-Diacylglycerol. Inositol-Triphosphat setzt Calcium aus intrazellulären Speichern und dem endoplasmatischen Retikulum frei (Simonson et al 1990). Dies geschieht über die Öffnung dihydropyridinsensitiver, spannungsabhängiger L-Type Calciumkanäle (Miyachi et al 1999, Silberberg et al 1989, Goto et al 1989).

Die Proteinkinase C, aktiviert von Diacylglycerol und Calcium, sensitiviert den kontraktile Apparat, und das freigesetzte Calcium führt zur Kontraktion der Muskelzellen.

ET-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt und zu 50% strukturhomolog (ET A- zu ET B-Rezeptor). Der ET A-Rezeptor hat eine etwa 10fach höhere Affinität für ET-1 als für

ET-3 und findet sich vornehmlich auf Myocyten des Herzens und der Gefäße (Arai et al 1990, Kähler et al 1997). ET B-Rezeptoren hingegen sind vornehmlich auf Endothelzellen anzutreffen und haben gleiche Affinität zu ET-1 und ET-3. Effekt der ET B-Rezeptorkopplung ist eine Vasodilatation über NO (Stickstoffmonoxid) und Prostacyclin (Dohi et al 1991, Kähler et al 1997). Laut Batra et al 1993 wirken ET B-Rezeptoren auf Gefäßwandmyocyten auch vasokonstriktorisch.

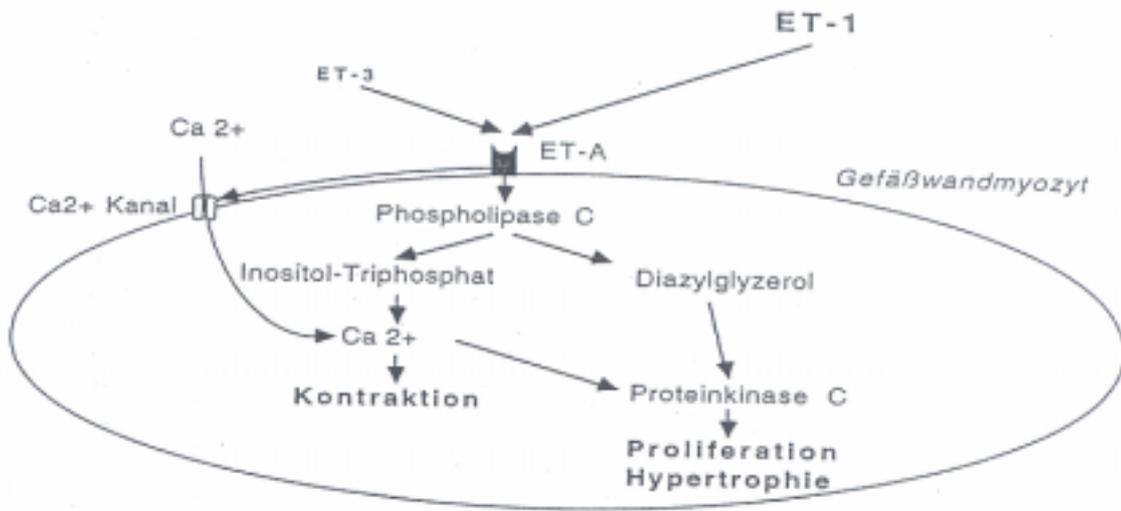


Abbildung 2: Legende: Kurzschema über die molekulare Wirkungsweise des ET A-Rezeptors und seine effektiven Wirkungen (Ca²⁺ = Calcium).

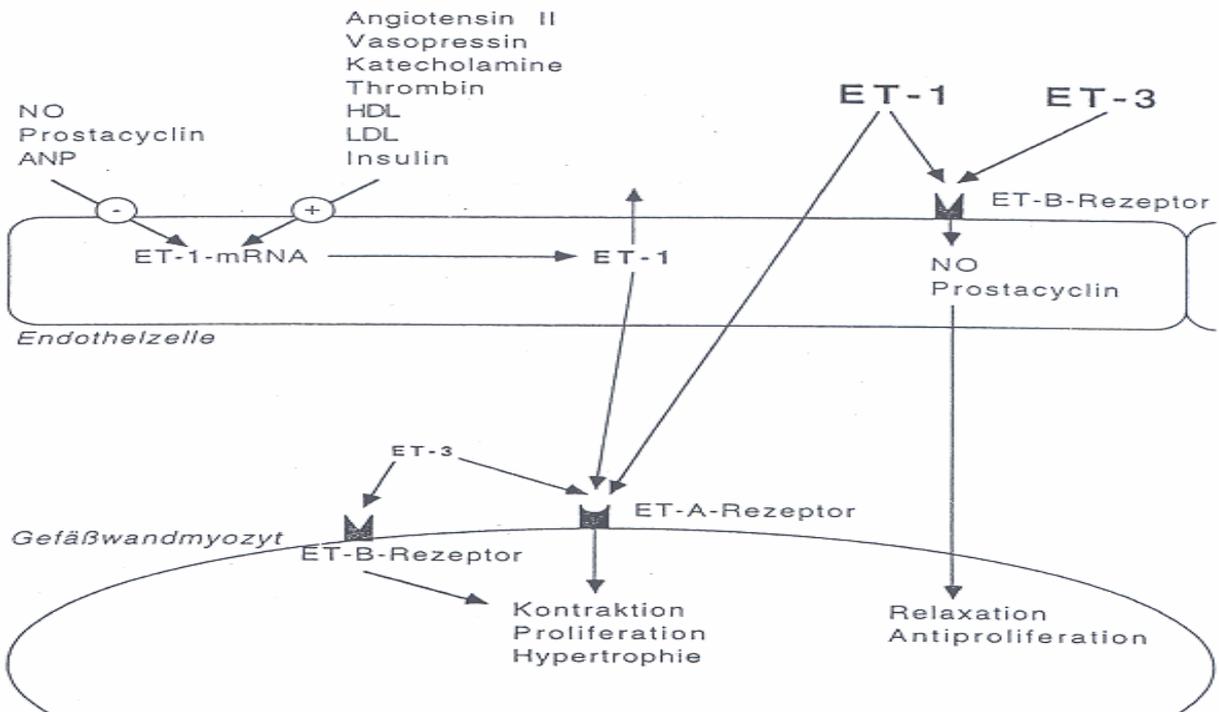


Abbildung 3:

Legende: Kurzschema über die Wirkungsweisen der ET A- und der ET B-Rezeptoren und deren Effekte (HDL=high density lipoprotein; LDL=low density lipoprotein; NO=Stickstoffmonoxid; ANP=atrial natriuretisches Peptid; ET-1-mRNA=Endothelin-1-Boten Ribonukleinsäure).

1.2.7 Synthese des Endothelins und Vorkommen

ET-1 wird aus einer 212 Aminosäuren langen Vorstufe, dem Prä-Pro-Endothelin über ein Furin-like-enzyme durch proteolytische Spaltung synthetisiert. ET-2 und ET-3 werden von verschiedenen Genen codiert, wobei alle drei Endotheline strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit den Serafotoxinen, Isopeptide der Schlange *Atractaspis engaddensis* aufweisen, was auf gleiche entwicklungsgeschichtliche Ursprünge hinweist.

Das ET-1 Gen enthält 5 Exons die für Präproendothelin kodieren. Regulatorische Elemente können in der 5' Region des ET-1-Gens gefunden werden: die consensus binding Sequenz für den Transkriptionsfaktor nuclear factor-1 (Miyachi et al 1999), vier Kopien des Hexanucleotids CTGGGA, das Akut-Phasen-regulierende Element und hoch-homologe Sequenzen zum Octanucleotid consensus AP-1/Jun-binding site am 5'Ende.

ET-1 wird hierbei zunächst über das 38 Aminosäuren enthaltende Big ET-1, welches jedoch nur geringste biologische Aktivität besitzt, gebildet. Big ET-1 (Miyachi et al 1999, Kido et al 1997) wird über das Endothelin-converting-enzyme (ECE) zum aus 21 Aminosäuren bestehenden ET-1.

Hemmbar ist ECE, eine membranständige Metalloprotease, durch Proteaseinhibitoren wie Phosphoramidon und Pepstatin (Matsumara et al 1990, Gardiner et al 1991, Miyachi et al 1999). Nicht geklärt jedoch ist, ob die ECE Beeinflussung ein relevanter Mechanismus zur Regulation des ET-1-Spiegels ist (Lüscher et al 1993).

ET-1 hat eine Halbwertszeit von 4-8 min., wird jedoch zu circa 75% in die Gefäßwand abgegeben, weswegen es auch als parakrines Hormon gewertet wird. Bildungsort von Endothelin-1 ist vorwiegend das Endothel, in geringerem Maße jedoch auch Gefäßwandmyocyten, Neurone; Hepatocyten, Mesangiumzellen der Niere und Makrophagen (Rolle bei entzündlichen Prozessen).

ET-2 wird vorwiegend im Gastrointestinaltrakt synthetisiert, zu sehr geringen Anteilen auch im Gehirn und im Myokard.

ET-3 findet sich in hohen Konzentrationen im Gehirn (Rolle bei Entwicklung, Wachstumsregulation und ZNS-Differenzierung), weniger in Niere und Lunge. Wie auch das ET-2 hat ET-3 keine spezifischen Wirkungen im kardiovaskulären System (Levin et al 1995, Kähler et al 1997).

Es wird in seiner Synthese gesteigert durch Vasopressin, Katecholamine, Thrombin, Lipoproteine HDL und LDL, Insulin, $TNF\alpha$, Immunglobulin 1, transforming growth factor β , basic fibroblast growth factor und endothelial cell growth factor (Myiauchi et al 1999, Emori et al 1992, Maemura et al 1992, Marsden et al 1992, Imai et al 1992). ET-1 fördert weiterhin die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II und somit die Aldosteronsekretion (Cozza et al 1992, Kähler et al 1997). Andersherum stimuliert AT II die ET-1-Synthese. Offenbar vermittelt die AT II bedingte transkriptionelle Steigerung der ET-1-Synthese die von AT II induzierte zelluläre Hypertrophie der Kardiomyocyten (Ito et al 1993, Paul et al 1995), womit möglicherweise ein Teil der Effekte der ACE Hemmer auf Blutdruck und linksventrikuläre Hypertrophie indirekt über eine Reduktion der ET-1-Synthese zu erklären ist (Kähler et al 1996).

Niedriger shear-stress (5 dynes/cm²) erhöht die mRNA-Produktion, hoher shear-stress (25 dynes/cm²) erniedrigt sie (Miyuchi et al 1999). Reduziert wird die ET-1 Synthese durch NO, Prostacyclin, zyklisches GMP und Atriales Natriuretisches Peptid ANP (Boulanger et al 1990, Prins et al 1994) über eine über cGMP vermittelte Inhibition des Phosphatidylinositolstoffwechsels (Emori et al 1993). Heparin verringert die ET-1-mRNA-Expression über eine Inhibition der Proteinkinase C (Imai et al 1993). Bei ET A-Rezeptoren steigern Hypoxie, cyclisches Adenosinmonophosphat und Wachstumsfaktoren die Synthese, AT II und Platelet derived growth factor vermindern sie.

Die ET B-Rezeptorsynthese wird durch ANP und Angiotensin II (AT II) gesteigert und durch cAMP und Katecholamine gehemmt.

1.2.8 Rolle der Endotheline in verschiedenen Krankheitsbildern

A) Herzinsuffizienz und Herzinfarkt: Big ET-1-Spiegel sowie ET-1-Serumspiegel sind in der Herzinsuffizienz (HI) erhöht. ET-1-Spiegel korrelieren positiv mit dem enddiastolischen, linksventrikulären Druck und dem klinischen HI Grad und invers mit der Auswurfraction und der maximalen Belastbarkeit (Krum et al 1996, Pacher et al 1993). Ursächlich für die ET-1- Erhöhung könnte eine periphere Hypoxie, eine erhöhte myokardiale Synthese, eine erhöhte Synthese im ZNS oder ein verlangsamter Abbau sein. ET-1-Spiegel korrelieren besser mit dem HI Grad als ANP Spiegel (Pacher R et al 1996).

Bei transmuralen Infarkten sind ET-1-Spiegel erhöht, ET-2- und ET-3-Spiegel nicht (Boulanger et al 1990, Miyauchi et al 1999): durch Hypoxie erhöht sich der ET-1-Spiegel im Infarktareal, weiterhin erhöht sich die ET-1-Synthese, die gut mit der linksventrikulären Funktionseinschränkung korreliert (Yasuda et al 1990), nicht jedoch mit der Kreatinkinase CK (Stewart et al 1991). Während der Reperfusion von irreversibel geschädigtem Myokard kommt es zur ET-1-induzierten Vasokonstriktion (Neubauer et al 1991), wobei die Endothelinerhöhung den Infarkt ausdehnen kann (Yanagisawa et al 1988): die externe ET-Zufuhr vergrößert den Infarkt, vermutlich durch Vasokonstriktion und Nachlasterhöhung im Areal (Kojima et al 1995), die Gabe eines ET-Antikörpers verkleinert den Infarkt um etwa 33% (Watanabe et al 1991). In Übereinstimmung dazu war die Überlebensrate bei Ratten nach Infarkt mit Behandlung mit BQ 123, einem ET A-Rezeptorantagonisten, deutlich verbessert (Sakai et al 1996).

B) Pulmonale Hypertonie: Bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PH) gleich welcher Äthiologie werden erhöhte ET-1-Spiegel gemessen, während bei Gesunden ET-1 bei der pulmonalen Passage weitestgehend eliminiert wird (Stewart et al 1991).

ET-1-Werte liegen bei Patienten mit PH relativ niedrig, können aber eventuell am geschädigten Endothel stärker wirken oder sogar in diesem verstärkt gebildet werden, was zu lokal sehr hohen Werten führen kann (Stewart et al 1991). Ebenso kann das Atemwegsepithel ET-1 synthetisieren (Black et al 1989). Im Tierversuch ging der Mediahypertrophie der Lungengefäße eine Prä-Pro-Endothelin-1-mRNA-Zunahme voraus (Miyauchi et al 1993) , die mit BQ 123, einem ET-1-Rezeptorantagonisten, inhibiert werden konnte, wobei in diesem Modell die ET-1-Synthese in der Niere stattfand (Sawamura et al 1990, Kähler et al 1997).

C) Arterielle Hypertonie: Insgesamt wird dem ET-1 eine ausgeprägte Vasokonstriktion zugeschrieben. Erhöhte ET-1-Spiegel konnten bei Phäochromocytompatienten (Amico Ja et al 1993), bei der cyclosporininduzierten Hypertonie (Nambi et al 1990) und in der Eklampsie (Florijn et al 1991) nachgewiesen werden.

Endothelinspiegel sind dabei bei mäßiger Hypertonie nicht bis höchstens geringgradig erhöht (Kohno et al 1990, Shichiri et al 1990), bei schwerer Hypertonie mit Organschäden sind Endothelinspiegel jedoch deutlich erhöht (Widemski et al 1991).

Die ET-1-Ausschüttung wird durch Angiotensin II und Noradrenalin erhöht (Dohi et al 1992) und ET-1 potenziert seinerseits die Aldosteronsynthese mit folgender Natriumchloridretention (Cozza et al 1992). ACE Inhibitoren sind daher in der Lage die ET-1-Reaktivität zu normalisieren (Deng et al 1993).

ET reduziert auch den renalen Plasmafluss und die GFR und führt daher nochmals zu erhöhter NaCl und Wasserretention mit Blutdruckerhöhung (Miller et al 1993). ET-2 und ET-3 wirken weniger konstriktorisch (Deng et al 1994). Bosentan (ein ET AB-Antagonist) führt im Tiermodell kurzfristig zur Blutdruckreduktion, langfristig zur Remodeling-Reduktion der Blutgefäße, aber nicht des Herzens (Nakamichi et al 1992). Außerdem soll die selektive ET A-Rezeptorblockade die Progression des Bluthochdrucks in urämischen Ratten verhindern (Brochu et al 1999).

D) Arteriosklerose: Bei ausgeprägter Arteriosklerose korreliert der erhöhte ET-1-Spiegel mit der Ausdehnung arteriosklerotischer Läsionen, weiterhin besteht auch eine reduzierte Bioverfügbarkeit des ET-Antagonisten Stickstoffmonoxid (NO) (Lerman et al 1991).

Bei instabiler Angina pectoris ist der ET-Spiegel erhöht, nicht aber bei stabiler (Zeiber et al 1994), wahrscheinlich als Folge intrakoronarer Thrombocytenaggregation und Thrombinfreisetzung. Mit Atherektomiepräparaten konnte gezeigt werden, dass im Bereich der Plaquerupturen die Gewebs-ET-1-Konzentrationen deutlich erhöht waren, was besonders in Wechselwirkung mit anderen Vasokonstriktoren zu einem lokalen Spasmus führen kann (Zeiber et al 1994).

Weiterhin wird beim Morbus Raynaud, bei vasospastischer Angina und bei der Restenoseentwicklung nach Angioplastie ein ET-Einfluss diskutiert.

1.2.9 G-Proteine

G-Proteine gehören zu einer heterogenen Gruppe von second messenger Proteinen, die an einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen wie Hormonwirkungen und in zahlreichen Zellkommunikationsprozessen beteiligt sind.

G-Proteine werden von vielen verschiedenen Typ-III-Signalrezeptoren aktiviert. Diese sind durch sieben Membranhelices gekennzeichnet und übertragen ihre vom jeweiligen Liganden ausgelöste Konformationsänderung auf G-Proteine (Guanin-Nucleotid-Bindende-Proteine), mit denen sie in der Membran vergesellschaftet sind. Der Kontakt mit einem ligandentragenden Rezeptor aktiviert die unterschiedlichen G-Proteine über eine Öffnung oder Schließung von Ionenkanälen oder über eine Proteinphosphorylierung (Interkonversion), was zu einer Stimulation oder Inhibierung von Membranenzymen und zu einer Änderung des Ionenmilieus der Zelle/Veränderung der Aktivität intrazellulärer Proteine führt. Die Beendigung des G-Protein-Signaltransduktionprozesses vollzieht sich durch Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP, wodurch das G-Protein in den inaktiven Zustand zurückfällt oder durch eine Rückkehr zum ursprünglichen Ionenmilieu der Zelle über die beschriebenen Ionenkanäle.

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei nicht-identischen Polypeptiduntereinheiten (Kepler/Gilman 1992): α -Untereinheiten mit 39-46 kDa, die β -Untereinheiten mit 35-37 kDa und die γ -Untereinheiten mit 8-10 kDa. β - und γ -Untereinheiten haben funktionell gemeinsame Aufgaben wie Inhibition der Adenylatcyclase und Phospholipase C/ β -Aktivierung, die Effektivität ändert sich mit der Art der β - und γ -Untereinheit (Gilman et al 1995, Müller et al 1995).

α -Untereinheit: Es existieren mindestens 17 verschiedene Gene von ihr mit 21 Splicingprodukten. Sie interagiert mit Guaninnucleotiden β/γ -Komplexen und mit Rezeptor und Plasmamembranfaktoren. Bei der Aktivierung tauscht sie das gebundene GDP gegen GTP aus und dissoziiert dadurch in eine α GTP und in eine $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die α -Untereinheit bindet an Effektorsysteme, wie die Adenylatcyclase AC oder Calciumkanäle, und steuert deren Aktivität.

G α : Hier existieren vier Splicingvarianten der stimulatorischen α -Untereinheit mit Molekulargewichten zwischen 44 und 46 kDa. Sie ist ubiquitär und vermittelt am Herzen positiv inotrope und chronotrope Katecholaminwirkungen über die Kopplung

an ET A-, β 1- und β 2-adrenergen-Rezeptoren und die Stimulation von Calciumkanälen und der Adenylatcyclase.

$G_{i\alpha}$: Die ubiquitären, inhibitorischen G-Proteine $G_{i1\alpha}$ (40,3 kDa), $G_{i2\alpha}$ (40,5 kDa) und $G_{i3\alpha}$ (40,5 kDa) werden durch muskarinische, β ₃-adrenerge, α ₂-adrenerge und ET A- und ET B-Rezeptoren aktiviert und inhibieren die Adenylatcyclase, Calciumkanäle und die Phospholipase C. Sie hemmen die Insulinfreisetzung, die Lipolyse, stimulieren die Thrombocytenaggregation und sind in Anzahl und Aktivität im Myokard bei der Herzinsuffizienz erhöht und vermindern die $G_{s\alpha}$ vermittelte cAMP Bildung und die positive Inotropie (Brodde et al 1996).

1.2.10 Endothelinrezeptorantagonisten

Es gibt drei in Potenz und Selektivität hinsichtlich der Rezeptorsubtypen unterschiedliche ET-Rezeptorantagonisten: ET A-selektive, ET B-selektive und ET AB-selektive. In unserem Versuchsaufbau wurden verwendet:

LU 302872 als kompetitiver ET AB-Antagonist, mit relativ ausgeglichen starker Antagonisierung beider Rezeptoren im Gegensatz zu etwa Bosentan mit eindeutig besserer ET A-Affinität ($K_i=4.7\text{nM}$ für SMCs, ET A; $K_i=95\text{nM}$ für SMCs, ET B; Clozel et al 1994). Die zweite benutzte Substanz, LU 302146, ist ein spezifischer ET A-Antagonist. Da es sich bei beiden Substanzen um relativ neue Substanzen handelt, ist die Datenlage für speziell diese Rezeptorantagonisten noch spärlich.

1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich qualitativ und quantitativ drei ausgewählte G-Proteine ($G_{s\alpha}$, $G_{i1/2\alpha}$ und $G_{i3\alpha}$), die an der molekularen Signaltransduktion der Endotheline beteiligt sind, in den Herzmuskelzellen unterschiedlicher Tierkollektive (Ratten) verändern.

Im Fokus des Interesses stand die Frage, wie sich 1. die oben aufgeführten G-Proteine im Gewebe des Herzmuskels der Ratten unterscheiden zwischen einem Kontrollkollektiv (K Kollektiv) und einem urämischen Kollektiv (SNX Kollektiv), und 2. wie sich diese Kontrolltier-G Proteinmengen relativ zu den G Proteinmengen von urämischen, ET A-antagonistisch behandeltem Herzgewebe (ET A Kollektiv) und

relativ zu ET AB antagonistisch behandelten Tieren (ET AB Kollektiv) verhalten. Außerdem sollten 3. eventuelle G Proteinunterschiede zwischen dem urämischen und den beiden urämischen, endothelin-antagonistisch behandelten Kollektiven aufgezeigt werden. Die vorliegenden Untersuchungen stellen keine Endstreckenanalyse dar, da die untersuchten Tiere drei Monate lang behandelt worden waren. Diese G Proteinquantifizierungen wurden im Western Blot auf Proteinebene vorgenommen und in einem zweiten Schritt auf genetischer Ebene (quantifizierte RNA Mengen) in der reversen Transkriptase PCR.

Wichtig war dies, weil Endotheline ihre Effekte über G-proteinabhängige Signalkaskaden bewirken. Zu diesen Effekten zählt die Myokardhypertrophie in der urämischen Kardiomyopathie. Durch die Versuchsanordnung der vier Tierkollektive sollten zum einen mögliche Veränderungen der G-Proteine in der urämischen Kardiomyopathie aufgezeigt werden, zum anderen die Wirkung des spezifischen ET A-Rezeptorantagonisten und des unspezifischen ET AB-Rezeptorantagonisten auf die G-Proteine in der urämischen Kardiomyopathie. Eine Reversibilität der Veränderungen der G-Proteine im Herzen in der Urämie durch den Einsatz von ET Rezeptorantagonisten könnte einen eventuellen therapeutischen Nutzen des ET Rezeptorantagonisteneinsatzes in der urämischen Kardiomyopathie (z.B. bei der Verringerung des Herzmuskelumbaus) auf molekularer Ebene illustrieren und die Wertigkeit der ET-Rezeptorantagonistentherapie besser einschätzen helfen.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Versuchstiere

Zur molekularen Charakterisierung der G-Proteine in der Signaltransduktion bei urämischen und urämischen, endothelin-antagonistisch behandelten Tieren, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt.

Untersucht und quantifiziert wurde die Menge dreier G-Proteine, nämlich $G_s\alpha$, $G_i\alpha_{1/2}$ und $G_i\alpha_3$.

Die untersuchten Tiere waren männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzberg, Germany) mit einem Initialgewicht von 200-230 Gramm. Es wurden vier Kollektive gebildet:

-ein Kontrollkollektiv **K**: Normale Ratten nach operativer Nierenkapselentfernung ohne medikamentöse Behandlung.

-ein urämisches Kollektiv **SNX**: Ratten, bei denen durch eine 5/6 Nephrektomie eine Urämie erzeugt wurde. Dies erfolgte in einer zweizeitigen Operation. Erst wurde die rechte Niere entfernt, eine Woche später der Unter- und Oberpol der linken Niere zusätzlich.

-ein urämisches, endothelin-antagonistisch behandeltes Kollektiv **ET A**: Ratten, die nach der (oben beschriebenen) 5/6 Nephrektomie mit dem selektiven Endothelin A-Rezeptor-Antagonisten LU 302146 (Knoll, Ludwigshafen) behandelt wurden.

-ein urämisches, ebenso endothelin-antagonistisch behandeltes Kollektiv **ET AB**: Ratten, die nach der 5/6 Nephrektomie mit dem unselektiven Endothelin AB-Rezeptor-Antagonisten LU 302872 (Knoll, Ludwigshafen) behandelt wurden.

Die Medikamente wurden oral verabreicht in einer Dosierung von 30mg/kg Körpergewicht und Tag für die Dauer von 3 Monaten.

Um möglichst repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden jeweils vier verschiedene Kontroll-, vier verschiedene SNX-, ET A- und ET AB-Tiere analysiert. Für jede einzelne dieser vier Gruppen wurden die Versuchsansätze getrennt gefahren (getrennte Plasmamembran-Präparation für den Western Blot und später getrennte RNA Extraktion für die PCR). Jeder dieser Versuchsansätze wurde jeweils fünffach bestimmt.

2.2 Materialien

a.1) PLASMAMEMBRAN-PRÄPARATION AUS ORGANEN:

- 50 mM Tris Lösung;
- flüssiger Stickstoff;
- PBS (phosphatgepufferte Salzlösung).

a.2) BRADFORD PROTEIN ASSAY:

- 0,1 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin);
- Acqua bidest;
- 0,1N NaOH (Natronlauge) ;
- Dye Reagenz.

a.3) SDS POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE (SDS PAGE):

- 12%iges Trenngel: 12% N,N' –bis-methylenacrylamidlösung;
- 0,371M Tris (tris Hydroxymethyl-Aminomethan) HCL (Salzsäure), pH 8,8;
- 0,1% SDS (Sodiumdodecylsulfat) Lösung (Serva);
- APS (Ammoniumpersulfat);
- TEMED (N,N,N,N Tetraethylendiamin);
- SDS-Sample-Buffer: - 130 mM Tris-HCL, pH 6,8;
- 4% SDS;
- 20% Glycerin;
- 10% β -Mercaptoethanol;
- 0,01% Bromphenolblau;
- Elektrophoresepuffer: - 25 mM Tris-HCL;
- 192 mM Glycin;
- 0,1% 10% SDS Lösung;
- Verwendeter Standard: Prestained Protein Molecular Weight Standards (14.300-200.000 weight range) von GiBcO BRL.

a.4) WESTERN BLOT:

- Blotpuffer: - 25 mM Tris-HCL;
- 192 mM Glycin

- Blockpuffer: 5% Magermilchpulver in PBS / 0,1% Tween 20;
- Waschpuffer: -PBS (pH 7,5) / Tween 20;
 - 140 mM Natriumchlorid;
 - 2,7 mM Kaliumchlorid;
 - 6,5 mM Di-Natrium-Hydrogenphosphat;
 - 1,5 mM Kalium-di-Hydrogenphosphat;
 - 0,1% Tween 20;
- Antikörper:
 1. Anti Gs α Submit, NEN;
 2. Anti Gi_{1/2} α Submit, NEN;
 3. Anti Gi₃ α Submit, NEN;

Second Antibodies:

4. Anti-mouse IG, peroxidase-linked species-specific whole antibody, Amersham life science;
5. Anti-rabbit IG, peroxidase-linked species-specific whole antibody, Amersham life science;

Detection system:

ECL Plus Western blotting detection system, Amersham Life Science;

Detection films:

Hyper-films ECL aufgelegt auf Nylonmembranen, Hybond C von Amersham Life Science;

Stripping and Reprobing:

- Stripping buffer: - 62,5 mM Tris, pH 6,7;
- 2% SDS;
 - 100 mM β Mercaptoethanol.

PCR UND VORBEREITUNG

a.5) RNA EXTRAKTION AUS GEWEBEN mit RNAzol B von WAK Chemie.

a.6) PCR, Synthetische Oligonukleotide. Primer von Firma Replicon, Berlin

a.7) REVERSE TRANSKRIPTION:

- 5x First Strand Buffer, Gibco BRL;
- 250 mM Tris HCL, pH 8,3;
- 375 mM KCL (Kaliumchlorid);
- 15 mM Magnesiumchlorid;
- dNTP (Didesoxynucleosidtriphosphat) Mix, 10 mM each dNTP, Promega;
- 10 mM DTT (Dithiothreitol), Gibco BRL;
- 15 U/μl RNA guard, Rnase Inhibitor, Pharmacia Biotech;
- Superscript TMII, Rnase Reverse Transkriptase (200 U/μl)
Gibco BRL.

a.8) POLYMERASE KETTENREAKTION, PCR:

- Gene Amp 10x PCR Buffer II;
- 100 mM Tris-HCL, pH8,3;
- 500 mM Kaliumchlorid ;
- 25 mM Magnesiumchlorid;
- dNTP-Mix, 10 mM each dNTP, Promega;
- 5 U/μl Ampli Taq Gold, Perkin Elmer.

a.9) DNA-AGAROSE-GEL-ELEKTROPHORESE:

- Small DNA-Agarose, Biozym;
- Nu Sieve GTG-Agarose, FMC;
- 10 x TBE (Tris Borat EDTA Puffer):
 - 900 mM Tris HCL, pH 8,3;
 - 900 mM Borsäure;
 - 20 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), pH 8,0;
- Probenpuffer:
 - 40% Saccharose;
 - 0,05% Bromphenolblau;
 - 0,1% SDS;
 - 1mM EDTA, pH 8,0;
- Ethidiumbromid, stöcklösung 10 mg/ml, Sigma;

- DNA-Längenstandard XIII 50 bp-Ladder, Roche;
- DNA-Längenstandard VII (0,37-8,0 Kbp), Roche.

a.10) KLONIERUNG

Kloniert wurde mit Hilfe des pGEM-T Easy Vector Systems von Promega.

Für die Propagation von Plasmiden wurde der Escherichia Coli Stamm IM109 eingesetzt.

Ligation:

- 10 x Rapid Ligation Buffer;
- 300 mM Tris HCL, pH 7,8;
- 100 mM Magnesiumdichlorid;
- 100 mM DTT;
- 10 mM ATP (Adenosintriphosphat);
- 10% Polyäthylen-Glycerol;
- T4 DNA Ligase (3 Weiss U/µl).

a.11) BAKTERIENTRANSFORMATION:

SOC Medium (100ml) :

- 20 g/l Bacto Pepton;
- 5 g/l Hefeextrakt;
- 20 mM Glucose;
- 10 mM Natriumchlorid;
- 10 mM Magnesiumdichlorid;
- 10 mM
- 2,5 mM KCL.

a.12) BAKTERIENKULTUREN:

- LB Medium:
 - 10 g/l Bacto Pepton;
 - 5 g/l Hefeextrakt;
 - 5 g/l NaCL;

Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin wegen der plasmidvermittelten Resistenzeigenschaft der Bakterien:

- Antibiotikastammlösung: 10mg/ml Ampicillin;
- LB Agar: LB Medium/1,5% Agar;
- Iptg (Isopropyl-B-D-Thiogalaktopyranosid), Gibco BRL;
- X Gal (5 Brom- 4 chlor- 3 indoyl- B-D-galaktosid), Roche.

a.13) PLASMID-DNA-TRANSFORMATION:

Mit Hilfe der QIA prep-spin Plasmid Kits.

- P1-Puffer:
 - 50 mm Tris HCL, pH 8,
 - 10 mM EDTA ;
- 100 µg/ml Rnase A ;
- P2-Puffer :
 - 0,2 M NaOH;
 - 1% SDS
- N3 Puffer: Guanidium-Hydrochlorid-haltig, Quiagen;
- PE Puffer: 80%ige Ethanol-Salz-Lösung;
- Emulsionspuffer.

a.14) SPALTUNG MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN:

- 10x Puffer;
- 10 mM Tris HCL, pH 7,9;
- 100 mM NaCL;
- 5 mM Magnesiumdichlorid;
- 1 mM 2 Mercaptoethanol;
- Enzyme:
 - Clai (10 U/µl), Promega;
 - Ecor I (10 U/µl), Roche;
 - Hind III (10 U/µl), Roche;
 - MluNi (10 U/µl), Roche;
 - Ncoi (10 U/µl), Promega;
 - Sali (10 U/µl), Roche;

2.a) CHEMIKALIENBEZUG

2 Mercaptoethanol	Sigma
Agar	Difco
Antibiotika	Roche
Ammoniumpersulfat APS	Merck
Bacto Pepton	Gibco BRL
Bovines Serumalbumin BSA	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Dithiothreitol DTT	Roche
EDTA	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Gibco BRL
Magermilchpulver	Glücksklee
N1n1-bis-methylenacrylamidlösung	Serva
Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma
Saccharose	Serva
SDS Lösung 10%	Bio Whiltaker
TEMED (N1N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin)	Serva
Tris Base	Sigma
Tris HCL	Sigma
Tween 20	Merck
X-Gal	Roche

Alle weiteren Chemikalien stammen von Merk, Darmstadt, Rheinheitsgrad p.A.

2.b) SOFTWARE

Die verwendete PC Software bestand in Image Master 1D, Pharmacia Biotech Agfa Foto Shop.

2.c) GERÄTE

Blotkammer SE 22	Hofer
Cycler PTC 200	MJ Research
Feinwaage KB BA 100	Sartorius
Gelkammer Blue Marin	Serva
(Gelkammer Aul B2	AGS)
Gelkammer SE 260	Hofer
Hybridisierungshofen	Amersham Life Science
Kühlaggregat F 25	Julabo
Magmetrührer	Heidolf
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Megafuge 1,0 R	Heraeus
Photometer	Beckmann
Pipetten	Eppendorf
Polytron PT3000	Kinematica
Schüttler	Heidolph
Spannungsgerät Blue Power	Serva
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vortexer	Heidolf
Zentrifuge 5417	Eppendorf

2.d) VERBRAUCHSMATERIAL

Blotpaper Whatman	Amersham Pharmacia Biotech
Hyperfilm ECL	Amersham Life Science
Küvetten	Sarstedt
Nylonmembran, Hybond C	Amersham Life Science
Polaroid Filme 667	Polaroid
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Sterilfilter	Millipore
Blue caps	Greiner

2.3 Analytische Methoden

A1) Plasmamembranpräparation aus Geweben

Die verwendeten Organe zur Plasmamembran-Extraktion (Rattenherzen) wurden nach Explantation sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, so zu 20ml 50mM Tris Lösung in Reagenzgläser zugegeben und mittels des Polytron bei maximaler Geschwindigkeit für etwa 30-45 Sekunden unter ständiger Kühlung (auf Eis) mit kurzen Pausen gewebeschonend fein zerkleinert.

Das Homogenisat wird nun auf 50ml Tris (4°C) aufgefüllt und bei 1500 U/min 5 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand (Plasmamembranen) wird nun abdekantiert, in spezielle Homogenisationsröhrchen überführt und bei 20000 U/min 15 Minuten mit einer vorgekühlten Hochgeschwindigkeitszentrifuge bei konstant 4°C zentrifugiert.

Das entstehende Pellet (Plasmamembranen) wird mit 20ml kaltem 50mM Tris Puffer resuspendiert und anschließend im Homogenisator zerkleinert (homogenisiert). Jetzt wird erneut wie oben beschrieben zentrifugiert (20000 U/min, 15 Minuten bei 4°C).

Die nun folgenden Waschgänge (Pellet homogenisieren, jetzt mit 3ml Tris Zugabe, Tris Resuspension mit zusätzlichen 47ml Tris, Zentrifugation mit 20000 U/min, 15 Minuten lang, bei 4°C) werden nun noch drei Mal wiederholt, nach dem dritten Mal wird das Pellet mit 2ml Tris Lösung versetzt, homogenisiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren.

A2) Bradford Microassay zur Proteinbestimmung

Verwendet wird das Bio-Rad-Protein-Assay: durch die Proteinbindung an die säurehaltige Lösung von Coomassie-Brilliant-Blue-G-250 verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm. Die Proteinquantifizierung ist möglich, da der Extinktionskoeffizient eines Farbstoff-Albumin-Komplexes über einen weiten Konzentrationsbereich konstant bleibt (Beersches Gesetz).

In einem Reaktionsvolumen von einem Milliliter (bestehend aus 200µl NaOH 0,1N und 200 µl Dye-Reagenz und 600µl Proteinlösung, bestehend aus 10 µl des wie oben beschrieben hergestelltem Proteins (PM) und 590 µl Acqua bidest), alles gevortext und nach 5 Minuten am Photometer Extinktionsgemessen, wurden die gemessenen Werte auf eine Eichkurve mit bekannter BSA-Protein-Konzentration bezogen.

Durch die Linearität (Extinktionskoeffizient/Proteinmenge) kann die effektive Proteinmenge der Lösung quantifiziert werden.

Standardherstellung:

BSA-EINWAAGE	0,1 mg/ml BSA	ACQUA BIDEEST	0,1N NaOH	DYE REAGENZ
0 µg	0	600 µl	200 µl	200 µl
1 µg	10 µl	590 µl	200 µl	200 µl
5 µg	50 µl	550 µl	200 µl	200 µl
10 µg	100 µl	500 µl	200 µl	200 µl
15 µg	150 µl	450 µl	200 µl	200 µl
20 µg	200 µl	400 µl	200 µl	200 µl

B1) SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS Page)

Diese Methode erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Im Prinzip wird durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS), einem Detergens, das die nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört, das Proteingemisch gelöst.

Durch die weitere Zugabe von Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken reduziert. Nun binden die SDS-Anionen an die Hauptkette der Proteine, wobei ein Komplex aus SDS und denaturierten Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist.

Durch die negative Ladung des gebundenen SDS kann die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigt werden.

Die Auftrennung der Proteine in elektrischem Feld erfolgt nach ihrem Molekulargewicht.

Die verwendete Proteinauftrennung orientiert sich an der Methode nach Lämmli.

Die Elektrophorese wird in einem vertikalen Mini-Gel-Apparat mit Geldicken zwischen 0,75-1,0 mm durchgeführt, in den das Gel zwischen einer Aluminiumplatte (Rückseite) und einer Glasplatte (Vorderseite), getrennt durch zwei laterale Spacer aus Kunststoffbeschichtetem Aluminium, eingefüllt wird.

Als Trenngel wird ein 12%iges Polyacrylamid-Gel mit dem pH von 8,8 in der unteren Phase, als Sammel-Gel ein 5%iges Polyacrylamid-Gel in der oberen Phase verwendet.

Im Sammel-Gel wird ein Kamm eingesteckt, der hier 10 Laufspuren bildet. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und Temed zu den verschiedenen Gellösungen gestartet.

Jetzt wird es nach dem Eingießen zwischen die beiden Glas und Aluminiumplatten mit Butanol überschichtet, und zwar zuerst die Trennmatrix.

Bis zur Auspolymerisation wird das Sammel-Gel gegossen, danach das Butanol vollständig abgegossen, jetzt das Sammel-Gel eingegossen und der Kamm eingesetzt.

Die Proteinproben können so nach ungefähr einer Stunde Polymerationsdauer aufgetragen werden.

Hierzu wurden die, wie an anderer Stelle beschrieben, hergestellten Plasmamembranen der Rattenherzen im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert. Die effektive Proteinauftrennung im Trenngel erfolgt bei 35 mA in 0,1%iger SDS-Laemmli Puffer bis das Bromphenolblau das Probenpuffers die komplette Trennstrecke durchlaufen hat.

Nach erfolgter Elektrophorese wird das Sammel-Gel mittels eines Skalpell von Trenngel abgetrennt und verworfen, das Trenngel wird vorsichtigst von der Platten abgelöst und bis zum anschließenden Western Blot, wie auch die Nitrocellulose

Membranen und das Blotpapier (beide in entsprechende Größen zurechtgeschnitten), in jeweils getrennten Schalen in Blotpuffer äquilibriert.

B2) Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, durch die bestimmte Proteine mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert werden können. Hierzu werden die durch SDS Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran überführt, auf der Membran fixiert und mit bestimmten Antikörpern (in diesem Falle Anti G α , Anti Gi $_{1/2}$ α , Anti Gi $_3$ α) detektiert.

Nach Äquilibration des Gels, der Nitrocellulose und des Blotpapiers wird ein „Sandwich“ hergestellt: zwei Blotpapiere, eine Nitrocellulose-Membran, das Gel und zwei weitere Blotpapiere werden zwischen zwei dünne Schwämme in einer speziellen gitterförmigen Kunststoffvorrichtung eingeklemmt und mit der Membranseite zur Anode in den Blotter eingehängt.

Der Proteintransfer findet in vorgekühltem Lämlie Puffer (bei 15°C) statt, der bis über die eingehängten Kunststoffvorrichtungen zugegeben wird, und zwar bei 500 mA über eine Zeitspanne von 30 Minuten.

In der Vorrichtung konnten so maximal zwei Gele auf einmal geblottet werden. Hiernach wird das Gel nun vor der Membran gelöst, und die Membran mit dem transferierten Protein zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde in Blockpuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS 0,1% Tween 20 wird die Membran jetzt entweder für eine Stunde (im Falle des G α Antikörpers), oder über Nacht (im Falle des Gi $_{1/2}$ α und des Gi $_3$ α Antikörpers) in 3%ige Albumin und 5%iger Magermilchpulverlösung in PBS inkubiert.

Im Anschluß wird die Membran 4x10 Minuten mit PBS 0,1% Tween 20 gewaschen. Jetzt wird der horseradish-peroxidase-labeled Zweitantikörper 1:500 verdünnt in 10%iger Magermilchpulverlösung in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wird die Membran nochmals 4x10 Minuten mit PBS 0,1%iger Tween 20 gewaschen.

Unter Rotlichtbedingungen wird die Membran zwischen zwei durchsichtigen Kunststoffolien im ECL Western-Blotting-Detektionssystem von Amersham (einer flüssigen Entwicklungslösung) positioniert.

Alles das wird in eine Filmentwicklungskassette eingelegt, hier jetzt Hyper ECL Filme aufgelegt und diesen in verschiedenen Zeiten, je nach Signalintensität, belichtet und daraufhin entnommen und entwickelt.

Die Entwicklung geschieht im Röntgenfilmprinter der radiologischen Abteilung der CRONA-Kliniken in Tübingen.

B3) Stripping and Reprobing

Durch diese Methode können einfach geblottete Membranen mehrfach mit dem Erst- und Zweitantikörper-Komplex inkubiert werden.

Dies kann notwendig werden um beispielweise übermäßigen Background, der etwa bei zu hoch dosiertem Erstantikörpergebrauch entstehen kann, zu entfernen und die Membran neu zu inkubieren.

Um den Antikörperkomplex zu entfernen, wird die Membran für 40 Minuten in Stripping-Puffer bei 50°C inkubiert. Hiernach wird dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS 0,1% Tween gewaschen und die Membran für eine Stunde in Blockpuffer versetzt.

Anschließend kann die Nitrocellulose erneut mit Erstantikörper inkubiert werden. Das weitere Procedere entspricht der entsprechenden Stelle des Western Blot Protokolls.

C1) Klonierung

(Als vorbereitender Schritt zur Polymerasekettenreaktion).

Zur Klonierung der PCR Produkte wurde das pGEM-T-Easy-Vector-System von Promega verwendet.

Mit Hilfe des Enzyms Eco-R-V wird ein Vektor geschnitten, der am 3'-terminal Ende Thymidin angefügt wird, was die Rezirkulation des Vektors verhindert.

Ebenso wird die Ligation des PCR Produktes, das am 3'-Ende ein durch die Polymerase angefügtes, einzelnes Deoxyladenosin enthält, durch den 3'-T-Überhang erleichtert.

C2) Ligation

Unter ATP-Verbrauch katalysiert die T4 DNA Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3' OH und 5' Phosphorresten benachbarter DNA-Enden. Das molare Verhältnis bei der Ligation eines Vektors mit einer Insert DNA sollte 1:3 betragen.

Zur Arbeitsschritt der Ligation wurden folgende Produkte über Nacht bei 4°C inkubiert:

- 50 ng pGEM T Easy;
- 1µl ATP haltiger 10xLigationspuffer;
- 3 U T4 DNA Ligase;
- 5-25 ng PCR Produkt.

C3) Transformation

Dieser Begriff bezeichnet die Aufnahme freier, löslicher DNA in eine Zelle.

Bestimmte Bakterienzellen, die ein Plasmid aufnehmen, das ein definiertes Antibiotika Resistenz Gen enthält, sind nun in der Lage, auf Selektionsagarpaletten Kolonien zu bilden.

Zu dieser Transformation werden kompetente E-coli JM 109 von Promega verwendet. Um die Effizienz der Fremd-DANN-Aufnahme der Bakterien zu erhöhen, wird die Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellhülle durch Vorbehandlung der Zellen mit Calciumchlorid erreicht.

Methodisch wird dies wie folgt erreicht:

50µl der kompetenten Zellen werden mit 2µl Ligationsansatz versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert, worauf anschließend für 45 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C erfolgt. Jetzt werden die Bakterien 2 Minuten auf Eis abgekühlt und für 1,5 Sekunden bei 37°C unter Schütteln mit 950µl SOC Medium vermehrt.

Nun wird die hiermit transformierte Bakterienkultur auf LB Agarplatten, die 100µg/ml Ampicillin zur Selektion enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Wichtig ist, dass hierbei ein Vektor verwendet wurde, der es ermöglicht, DNA Insertionen durch eine Blau- oder Weißfärbung der Kolonien zu erkennen.

Um dies zu ermöglichen, wurden die Agarplatten noch vor dem Ausplattieren der transformierten Bakterien mit LB Medium behandelt, das 15µl IPTG und 15µl 100mg x-Gel pro ml N,N'-Dimethylformamid enthält.

Das Selektionsprinzip beruht darauf, dass der Polylinker des Plasmids in einem bestimmten Gen, dem Lac Z Gen, sitzt. Das Bakterium selbst produziert keine Beta-Galaktosidase.

Durch IPTG wird nun der Lactose Promoter induziert, was zur Produktion von Beta-Galaktosidase führt, die wiederum X Gel zu einem blauen Farbstoff spaltet.

Wenn nun der Vektor ein Insert enthält, kann Lac Z nicht mehr transkribiert werden.

Ohne Bildung von β-Galaktosidase kann also folglich X Gel nicht gespalten werden. Somit wird klar, dass ungefärbte Kolonien ein Plasmid mit einer Insertion in Polylinker enthalten, und so können diese also schon vorselektioniert werden.

Diese weißen, „ungefärbten“ Bakterien-Kolonien werden gepickt und auf eine Agarplatten überführt, die Ampicillin, IPTG und X Gel enthalten.

Diese Einzelkolonien können für maximal 4 Monate bei 4°C gelagert werden.

Verwendet werden sie zur Anzucht der Rekombinanten und zu deren Überprüfung.

C4) Glycerinkulturen

Jetzt wird 1ml ampicillinhaltiges LB-Medium in Blue caps von Greiner zugegeben.

Eine Einzelkolonie der transformierten Bakterienkulturen wird von der Agarplatte gepickt und bei 37°C über Nacht im LB Medium unter Schütteln inkubiert.

Diese über Nacht inkubierte Kultur wird danach mit 50% Glycerin versetzt und bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

Bei Neubedarf können diese Klone wieder in LB Medium angezüchtet werden.

C5) Plasmid DNA Präparation

Mit Hilfe des Qiaprep-Spin Plasmid Kits von Qiagen wird die rekombinante DNA aus den transformierten Bakterien isoliert. Hierzu wird eine Einzel-Kolonie über Nacht in 2ml LB Medium mit Ampicillin bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Nach einer Nacht wird die Kultur nun bei Raumtemperatur 10 Minuten lang bei 12000g zentrifugiert und das entstehende Pellet in 250µl P1-Puffer resuspendiert. Zum Zwecke der Lyse der Bakterienzellen wird 250µl P2-Puffer zugesetzt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 350µl N3-Puffer wird 5 Minuten lang auf Eis inkubiert und danach 10 Minuten bei 13000g zentrifugiert. Jetzt wird der Überstand auf eine „Qiaprep-spin“-Säule gegeben und durch eineminütige Zentrifugation bei 13000g die DNA an das Säulenmaterial gebunden. Nachdem die Säule mit 750µl PE-Puffer gewaschen wird, wird die Säule erneut bei 13000g zentrifugiert, ohne Puffer, um die Restflüssigkeit vollständig von der Säule zu entfernen.

Die Elution der DNA erfolgt mit 100µl Elutionspuffer. Zur Erfolgskontrolle wird ein Aliquot (Probe) der eluierten DNA mit den geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten und anschließend in der Elektrophorese aufgetrennt. Mit Hilfe eines Markers kann hier die Größe der Elutions-DNA bestimmt werden.

C6) Zur Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Das Prinzip der Restriktionsendonukleasen ist die Spaltung doppelsträngiger DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Die Spaltung der DNA durch Restriktionsenzyme erfolgt meistens spezifisch innerhalb ihrer Erkennungssequenz. Die verwendeten Restriktionsenzyme werden nach den Angaben des entsprechenden Herstellers eingesetzt. Hierbei ist eine Unit des Enzyms definiert als die Menge Restriktionsenzym, die 1µg-DNA in einer Stunde bei den entsprechenden Salz und Temperaturbedingungen spaltet. Zur Hilfe der Gewährleistung optimaler Salzkonzentrationen, werden den Ansätzen 10 Vol% des 10x Puffers zugesetzt, der vom Hersteller mitgeliefert wurde. Die so hergestellten Restriktionsansätze werden nun für mindestens 1 Stunde inkubiert und deren Spaltung wird anschließend wiederum auf einem Agarose Gel überprüft.

C7) Zur DNA Reinigung durch Phenol/Chloroform Extraktion

Es wird nötig die Restriktionsenzyme danach zu entfernen, ebenso andere Proteine, wozu die DNA haltige Lösung mit einer Volumeneinheit Phenol/Chloroform versetzt wird.

Durch die Versetzung mit anschließendem vortexen werden die enthaltenen Proteine ausgefällt und liegen jetzt in der phenolischen Phase vor. Durch 10 minütige Zentrifugation bei 14000g bei 4°C werden jetzt die Phasen getrennt, wobei sich die DNA dann in der wässrigen Phase befindet. Die DNA wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und diese Extraktion so oft wiederholt, bis keine sogenannte „Interphase“ (Verunreinigung) mehr nachweisbar sind.

Die Interphase ist in Form weißlicher Schlieren erkennbar. Zur Konzentrierung der DNA in einer wässrigen Lösung, wird diese mit Isopropanol versetzt, wobei der DNA die Hydrathülle entzogen wird, wodurch die DNA ausfällt. Durch Zugabe von Natriumacetat verstärkt sich dieser Effekt noch zusätzlich. Also wird die DNA-haltige Lösung über Nacht mit 1/10 Volumen 3M Na-Acetat (pH 5,2) und 3 Volumeneinheiten Isopropanol versetzt und bei einer Temperatur von -20°C ausgefällt. Nach diesem Schritt wird 30 Minuten lang bei 14000g und 4°C erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet letztlich mit 70%igem Ethanol gewaschen, bevor dieses abschließend luftgetrocknet und in entsprechender Menge Wasser resuspendiert wird.

D1) RNA Extraktion aus Geweben

Verwendet zur RNA Extraktion aus Geweben wird Rnazol B von WAK Chemie.

Die entsprechenden Organe (Rattenherzen) waren sofort nach Explantation in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt worden. Etwa 100 mg dieser Gewebe werden unter Zusatz von 1 ml Rnazol B mit dem Homogenisator fein zerkleinert und anschließend unter Zugabe 1/10 Volumeneinheit Chloroforms 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 14000g bei 4°C wird eine Phasentrennung erreicht und die wässrige Phase in ein neues Eppendorf Cup überführt.

Die Fällung der RNA erfolgt, indem 1 ml Isopropanol hinzugegeben und bei minus 20°C 15 Minuten lang inkubiert wird. Hiernach ist eine neuerliche Zentrifugation bei

14000g und 4°C nötig, wonach das Pellet zweimal mit 70%igen Ethanol gewaschen und daraufhin luftgetrocknet wird. Jetzt wird letztlich das luftgetrocknete Pellet in 50 µl Rnasefreiem Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

D2) Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese

Diese Methode ermöglicht es, die Qualität der extrahierten DNA zu überprüfen. Zur Herstellung des 1,2%igen Formaldehyd-Agarose-Gels wird Agarose von GTG Nusieve in TBE aufgenommen und stark erhitzt, so dass sich eine homogene Lösung bildet.

Die flüssige Agarose wird auf ca. 65°C abgekühlt und wird jetzt mit 10 mg/ml Ethidiumbromid und 12,3M Formaldehyd versetzt und zu einem Gel in die entsprechenden Kammern eingegossen. In einem zeitlichen Abstand von 30 Minuten vor dem Start des Gels wird dasselbe in 1x FA-Laufpuffer äquilibriert, die Proben mit 1/5 Volumen 5x RNA-Loading Puffer versetzt und 5 Minuten bei einer Temperatur von 65°C inkubiert. Zum Gel-Lauf in 1x FA Laufpuffer wird eine Spannung von 5-7 V/cm angelegt, womit eine schonende Trennung möglich wird. Die Auswertung dieser Agarose Gele erfolgt optisch mit einem speziellem UV Transilluminator bei 254 nm.

D3) PCR-Reverse Transkription

Ziel ist RNA mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen. Hierzu wird ein Primer an die RNA Matrize hybridisiert. Danach wird mittels der Reversen Transkriptase Reaktion und einer folgenden PCR eine copy DNA (c-DNA Kopie) erstellt.

Verwendet wird die aus Moloney Maus-Läukämie-Virus isolierte MMLV Transkriptase. Sie ist imstande aus einer einzelsträngigen RNA Matrize in Gegenwart eines Primers in 5`-3` Richtung, eine komplementäre DNA zu synthetisieren.

Diese Umschreibung der RNA in DNA erfolgt in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Im Ansatz sind enthalten: 1x RT Puffer, 1mM DTT, 1 mM DNTP, 1µM anti-Sense Primer, 15 u Rnase Inhibitor, 200 U Superscript TM II und letztlich 250-700ng RNA.

Dieser Ansatz ist für 40 min. bei 42°C inkubiert und im Anschluss dann in der PCR eingesetzt worden.

D4) PCR-Polymerase Kettenreaktion

Ziel der Polymerase Kettenreaktion ist die Amplifikation (Vermehrung) definierter DNA-Bereiche. Diese Amplifikation geschieht spezifisch mit exakt definierten Primern und ist somit eine hochverlässliche Methode zum effektiven Nachweis bestimmter DNA Sequenzen, die beispielsweise für bestimmte Proteine oder Antikörper spezifisch sind. Im Prinzip wird ein DNA-Abschnitt zwischen zwei Primern, die gegenläufig an komplementäre Stränge der DNA gebunden sind, enzymatisch vermehrt. Eine thermostabile Taq-Polymerase erstellt, ausgehend vom 3`OH-Ende des Primers, eine Kopie der DNA Matrize. Ist die Synthese vollendet, wird der Doppelstrang durch Hitze getrennt, wodurch durch eine schnelle, folgende Temperaturabsenkung die erneute Bindung des Primers ermöglicht wird. Durch Primer-Extension kann somit eine neue Kopie dieser sogenannten Template-DNA erstellt werden. Hierzu wird die copy-DNA aus der Reversen Transkription in einem Reaktionsvolumen von 50 µl amplifiziert: 2µl Template werden mit 1x PCR Puffer II, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, je 0,5 µM sense und antisense Primer und 2,5 U Ampli Taq Gold TM versetzt. Die Amplifikationsreaktion erfolgt im Mastercycler Gradient von Eppendorf oder reproduzierbar im PTC 200 Cyler von MJ Research. Eine 10-minütige Ansatzheizung auf 95°C wird den 30 bis 35 PCR Zyklen antizipiert.

Dies ist nötig, da die Ampli Taq Gold TM erst durch Hitze aktiviert werden muss.

Der Amplifikationszyklus ist wie folgt aufgebaut: 30 Sekunden DNA Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Primer Annealing bei 46°C oder 58°C (je nach Antikörper) und letztlich noch 30 Sekunden für die DNA Extension bei 72°C. Am Schluss der PCR ist nun nochmals bei 72°C inkubiert worden, um überstehende Enden, die bei der PCR entstehen, aufzufüllen.

D5) PCR-Kompetitive PCR

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß eine absolute Quantifikation des spezifischen Ausgangsmaterials möglich ist. Dies wird erreicht, indem ein interner Standard und die zu messende Probe mit den gleichen Primern in den gleichen Reaktionsgefäßen amplifiziert werden. Dies bedeutet gleiche Reaktionsbedingungen für Standard und Probe und auch, dass Variationen, die zwischen einzelnen Reaktionsansätzen eventuell auftreten können, vernachlässigbar werden.

Im Prinzip werden unterschiedliche Mengen des Standards mit einer konstanten Menge der Probe in verschiedenen Reaktionsgefäßen ko-amplifiziert. Im entwickelten Gel ist hiernach nach der dichtebezogenen Auswertung der Banden am PC die Erstellung zweier Kurven möglich: eine Kurve des Standardverlaufs und eine des Probenverlaufs. Diese beiden Kurven schneiden sich an einer definierten Stelle, an der eine bestimmte Konzentration abgeglichen werden kann (bei bekannten Standardkonzentrationen). Hierdurch ist die Probenquantifizierung möglich.

Eine wichtige Voraussetzung für die Genauigkeit der Quantifizierung der Expressionsrate mittels der kompetitiven PCR ist die ähnliche Ausgangskonzentration von Probe und Standard und die quantitative Messung in der exponentiellen Reaktionsphase. Da die Plateauphase durch eine Abnahme der Reaktionseffizienz gekennzeichnet ist, musste in Vorversuchen die optimale Zyklenzahl und die optimale cDNA Konzentration ermittelt werden.

Die zur Reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) extrahierte RNA wurde in ihrer Reinheit und Konzentration spektrophotometrisch ausgemessen bei 260 und bei 280 nm, wobei die Nukleinsäurekonzentration aus der optischen Dichte bestimmt wurde, die Probenreinheit hingegen aus dem Extinktionsverhältnis zwischen dem 260nm und dem 280nm Wert. Der Quotient sollte hierbei zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Nukleinsäurekonzentrationen konnten wie folgt bestimmt werden: lag die Extinktion bei 260nm bei 1,0, so konnte von einer Konzentration von 50µg pro ml für doppelsträngige DNA ausgegangen werden, beziehungsweise 33µg/ml für einzelsträngige Oligonukleotid DNA und 40µg/ml für Ribonukleinsäure (RNA).

Zur Festlegung der cRNA-Ausgangskonzentration wurden nun mehrere qualitative RT PCRs gefahren, anhand der ermittelten Signalstärke der Probenamplifikate konnte der Konzentrationsbereich der Standardverdünnungsreihe festgelegt werden.

Für die Amplifikation wurde eine bestimmte Menge Gesamt-RNA in der RT eingesetzt, der interne Standard wurde in den Verdünnungen 10^{-1} , 5×10^{-2} , 10^{-2} , 5×10^{-3} , 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} , 5×10^{-6} , 10^{-6} verwendet.

Die hiermit erhaltenen Agarosegele wurden nun fotografiert und eingescannt. Die Evaluation erfolgte dann mittels des eigens hierfür entwickelten Computerprogrammes IMAGE MASTER 1D von Pharmacia Biotech. Analysiert wurde die relative Intensität der Banden und die TraceOD/mm.

Da bei Ethidiumbromidfärbungen die unterschiedlichen Sequenzlängen von Probe und Standard berücksichtigt werden müssen, wurde die Trace des Standards jeweils mit dem Faktor X (=basepairs Standard/Basepairs Probe) multipliziert. Das Verhältnis von der Probe zum internen Standard konnte nun auf die eingesetzte Menge Standard bezogen und graphisch dargestellt werden. Mit Hilfe einer Regressionsgeraden konnte jetzt der Äquivalenzpunkt (der Punkt, an dem das Verhältnis der Trace des Standards zur Trace der Probe=1,0 ist) bestimmt werden, und somit der mRNA Gehalt:

$$\text{Probe mRNA (amol/}\mu\text{g Gesamt RNA)} = \frac{\text{Menge Standard} \cdot \text{Äquivalenzpunkt} (\text{pg} \times 10^6)}{\text{Molekulargewicht Standard}}$$

Die Doppelbestimmungen des Standards erfolgten in unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen. Die statistische Evaluation erfolgte mittels des Student T-Tests.

D6) Synthese des Standards und der Ribosonden

Zur Quantifizierung der DNA wurde ein Standard verwendet, der kompetitiv zur Probe im gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert wurde. Die Voraussetzung hierfür ist, dass der Standard und die Probe die gleichen Primerbindungsstellen, ähnliche Längen und einen ähnlichen GC-Gehalt haben.

Zur Synthese des internen Standards wurde eine RNA Isolierung vorgenommen und, mittels spezifischer Primerpaare, die Genomfragmente amplifiziert. Die Annealing-Temperaturen lagen hierbei zwischen 47°C und 58°C . Die Größen der PCR-Amplifikate wurden dann mit 2%igen Agarosegelen mittels eines 50bp (basepair) Markers ermittelt.

Die durch die RT PCR entstandenen DNA-Fragmente wurden mit dem pGem-T-Easy-Vector System kloniert, nach der Transformation kompetenter Zellen wurde mit Bakterienklonen aus der `weißen` Kolonie eine Plasmidpräparation durchgeführt, um die gewünschten Klone mit dem jeweiligen Plasmid zu isolieren. Die Überprüfung der richtigen Insertion der Amplifikationsprodukte in den Polylinker des Vektors pGem-T-Easy erfolgte durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym-Eco-RI und anschließender Gel-Elektrophorese. Zur weiteren Analyse der pGem-Subklone wurde eine Sequenzanalyse (Replicon, Berlin) durchgeführt. Da die Nukleotidsequenzen der pGem-Klone den jeweiligen Genomfragmenten entsprachen, konnten sie zur Herstellung des internen Standards verwendet werden. Die Deletionsvarianten (Standard) sind um jeweils 40 Basenpaare kürzer als ihre Ausgangsklone.

Zur Synthese des internen Standards wurden in der Mitte der klonierten PCR Amplifikate 40 Basenpaare deletiert, wobei die Primerbindungsstellen erhalten blieben, ebenso veränderte sich der GC-Gehalt nicht wesentlich laut Angaben von Replicon um lediglich einstellige Prozentpunkte (Firma Replicon Berlin).

D7) PCR-DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Analyse der amplifizierten DNA Fragmente beziehungsweise der Restriktionsfragmente klonierter DNA wird nun die Agarose-Gel-Elektrophorese eingesetzt. Das Prinzip ist, dass DNA Moleküle aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen im elektrischen Feld zur Anode wandern. Dabei wird die Wanderungsgeschwindigkeit durch verschiedene Größen wie zum Beispiel durch die Molekülgröße, die DNA-Konformation, die Agarosekonzentration und natürlich auch durch die angelegte Gleichspannung beeinflusst.

Somit wird nachvollziehbar, dass die bei der Gel-Elektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration direkt von dem DNA-Molekulargewichtsbereich abhängig ist, in dem eine effektive Auftrennung erfolgen soll.

So werden für Fragmentgrößen, die kleiner als 500 bps (base pairs) sind, 2%ige, und für Fragmentgrößen, die größer als 500 bps sind, 1%ige Agarose Gele verwendet. Wichtig ist, die Agarose-Gele mit Ethidiumbromid (1,5 µg/ml) zu versetzen, um die

DNA bei UV Licht sichtbar zu machen. Die endgültige Auftrennung der mit Probenpuffer versetzten DNA erfolgt in 1x TBE Laufpuffer bei 5-8V/cm.

Um die DNA Fragmente in ihrer Grösse exakt zu bestimmen, wird als Längenstandard je nach erwarteter Proteingrösse der 50 bp Standard oder der 1 kilobp Standard Marker in die erste Probenlaufbahn aufgetragen und mitgeführt. Optisch werden die Gele mit dem vormals beschriebenen UV-Transilluminator bei 254 nm Wellenlänge angeschaut und mit einer Polaroidkamera fotografiert. Diese Polaroidbilder können nun im PC eingescannt und mittels eines speziellen Programmes ausgewertet werden.

2.4 Statistik

Die erhobenen Rohzahlen bei der Messung der optischen Dichte der Western-Blot Banden und der RT-PCR Bandenauswertung wurden ermittelt mit Hilfe des eigens vertriebenen Software Programmes ImageMaster 1D von Pharmacia Biotech. Beim Western Blot wurden jeweils die optischen Dichten der Kontrolltiere gleich 1,0 gesetzt und die optischen Dichten der anderen Gruppen anteilig computergesteuert ermittelt. Bei der RT-PCR wurden die optischen Dichten der verschiedenen Punkte der Standardgeraden (Standardkonzentrationen) ermittelt, genauso wie die optische Dichten der Proben. Wie bereits im Methodenteil ausgeführt, konnte so am Schnittpunkt der beiden erhaltenen Geraden (Standardgerade mit jeweils bekannten RNA-Mengen und Probengerade) die RNA Konzentration der Probe genau bestimmt werden.

Innerhalb eines jeden Kollektives wurden bei fünffacher Messung jeweils die Mittelwerte (Median), Standardabweichungen und die Standardfehler gebildet (SEM). Bei dem Vergleich nur eines Kollektivs mit dem zugehörigen Kontrollkollektiv wurde der T-Test für unverbundene Stichproben angewandt. Bei der Signifikanzbestimmung der Unterschiede der Kollektive zum Kontrollkollektiv wurde eine Varianzanalyse nach dem Dunett-Test (Dunett 1955 und 1964) durchgeführt. Als Grenze für die statistische Signifikanz wurden p Werte < 0,05 festgesetzt.

Ausgewertet wurden die Daten mit Hilfe der Computerprogramme Image Master 1D (Pharmacia, Biotech) und der Statistikprogramme JMP, Version 3.1.2, SAS Institute Inc., USA., MS EXCEL 2000 und Graph Pad InStat 3.01 (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Western Blot

Zur Durchführung des Western Blots mit Plasmamembranen aus Organen (Myokard) mussten einige Vorversuche zur Etablierung durchgeführt werden. Zunächst wurden zur Spezifitätstestung der Antikörper von NEN Vorversuche an Plasmamembranen von A10 Zellen (thorakale aortale Zellen der Ratte) aus Zellkulturen durchgeführt und optimiert. Danach wurde bei guter Reproduktivität der Ergebnisse die Methode auf die Organplasmamembranen übertragen, was leichte Umstellungen der verwendeten Chemikalien im Blot vonnöten machte. Da im Western Blot die Proteinmengen der urämischen und behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe analysiert wurden, wurde besonderer Wert auf die Reproduktivität ansteigender Konzentrationsreihen gelegt.

Weiterhin wurden die Molekulargewichte der unterschiedlichen Proteinbanden mit Hilfe eines mitaufgetragenen Markers ausgewertet.

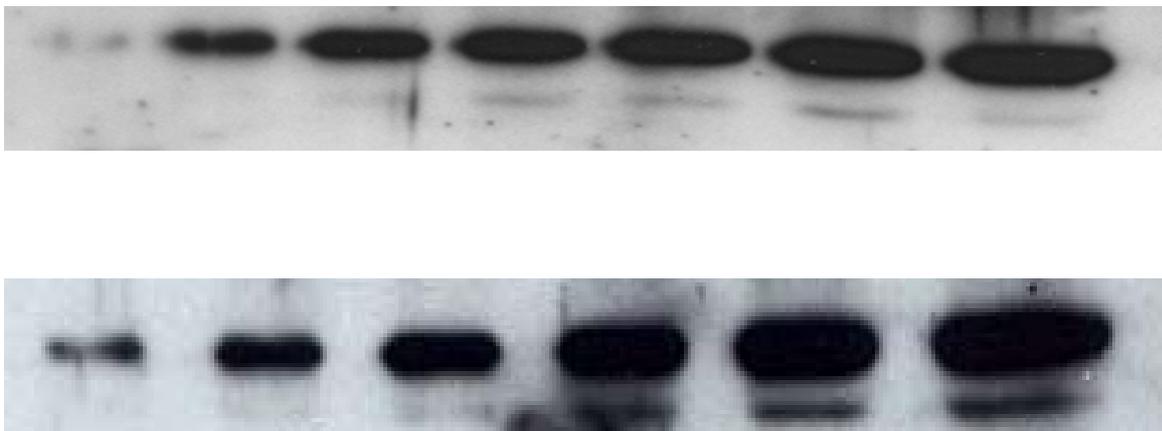


Abbildung 5:

Legende: Ansteigende Konzentrationsreihe hier am Beispiel des $Gs\alpha$ Antikörpers an Plasmamembranen (oben) und an A10 Zellen (unten) in steigender Proteinmenge.

Verwendete Antikörper:

1. $Gs\alpha$:

Es bestehen durch unterschiedliches Splicing der $Gs\alpha$ -mRNA vier verschiedene Proteine mit Molekulargewichten zwischen 44,2 und 45,7 KDA (Hepler und Gilman

1992), die auf den verwendeten SDS PAGE Elektrophoresen in zwei verschiedene Banden von 46 KDA ($G_{s\alpha s}$) und 52 KDA ($G_{s\alpha i}$) wandern (Hepler/Gilman 1992). Den so erkennbaren zwei Banden im Western Blot konnten Mit Hilfe Des Markers die Molekulargewichte 46 und 52 KDA zugeordnet werden.

2. $G_{i_{1/2}\alpha}$:

Das Gleiche wurde mit dem $G_{i_{1/2}\alpha}$ Antikörper durchgeführt, hier konnte mittels der SDS PAGE sowohl das $G_{i_1\alpha}$ -Protein (41 KDA), als auch das $G_{i_2\alpha}$ -Protein mit 40 KDA (Ammer und Schulz 1993) mit dem Antikörper von NEN detektiert werden. Auch hier mittels des mitaufgetragenen Markers. Dieser Antikörper machte bei der Etablierung, vor allem beim Übertragen der Ergebnisse von den A10 Zellen aus der Zellkultur auf die Plasmamembranen der Kardiomyocyten, einige Mühe.

3. $G_{i_3\alpha}$

Letztlich wurde der $G_{i_3\alpha}$ Antikörper von NEN etabliert. Auch hier zunächst an Zellkulturzellen A10 und später an den kardiomyocytären Plasmamembranen.

3.2 Plasmamembranpräparation

Wie schon im Material und Methodenteil ausführlich beschrieben, nimmt dieser Arbeitsschritt einen entscheidenden Platz ein.

Hierfür wurden Herzen der entsprechenden Ratten homogenisiert und deren Proteingehalt photometrisch vermessen, als Referenz galt eine Proteineichgerade, die mit Hilfe von bekannten BSA-Mengen erstellt wurde.

Tabelle 1:

Legende: Es wurden jeweils zwei verschiedene Messansätze photometrisch bestimmt, diese wurden jeweils dreifach vermessen und gemittelt. Die Werte der Tabelle entsprechen den *Extinktionskoeffizienten bei 595 nm*, der photometrisch bei der jeweils bekannten BSA Proteineinwaage (linke Spalte) bestimmt werden konnte.

BSA/ μ g	1.Best.	2.B.	3.B.	Durchschnitt	1.B.	2.B.	3.B.	Durchschnitt	Schnitt Total
10 μ g	0,0934	0,0935	0,0933	0,0934	0,0934	0,0935	0,0933	0,0934	0,0934
50 μ g	0,3353	0,3350	0,3353	0,3352	0,3351	0,3350	0,3354	0,3352	0,3352

100µg	0,5609	0,5611	0,5617	0,561233	0,5611	0,5607	0,5619	0,56123	0,5612
150µg	0,8167	0,8169	0,8171	0,8169	0,8166	0,8168	0,8173	0,8169	0,8169
200µg	0,948	0,9478	0,9476	0,9478	0,9478	0,9475	0,9481	0,9478	0,9478
250µg	1,4131	1,4168	1,4172	1,4157	1,4133	1,4165	1,4171	1,4157	1,4157

Im nächsten Schritt wurde mittels der so erhaltenen Werte eine Eichgerade erstellt. Die homogenisierten Plasmamembranproben der Kardiomyocyten wurden dann ebenfalls photometrisch vermessen.

Tabelle 2: Beispiel an vier vermessenen Proben (1. Spalte=Probennummer, 2. Spalte= Tiernummer, 3.=Extinktionskoeffizient, 4.=mittels Eichgerade errechneter Proteinnanogrammwert/50µl, 4.=Proteinmenge der Probe/µl).

Probe 1	Tier 340	0,8976	176,5 µg/50µl	3,53 µg/µl
Probe 2	Tier 333	1,0335	202,6 µg/50µl	4,052 µg/µl
Probe 3	Tier 37	0,5006	100,3 µg/µl	2,006 µg/µl
Probe 4	Tier 319	1,2119	236,83 µg/µl	4,74 µg/µl

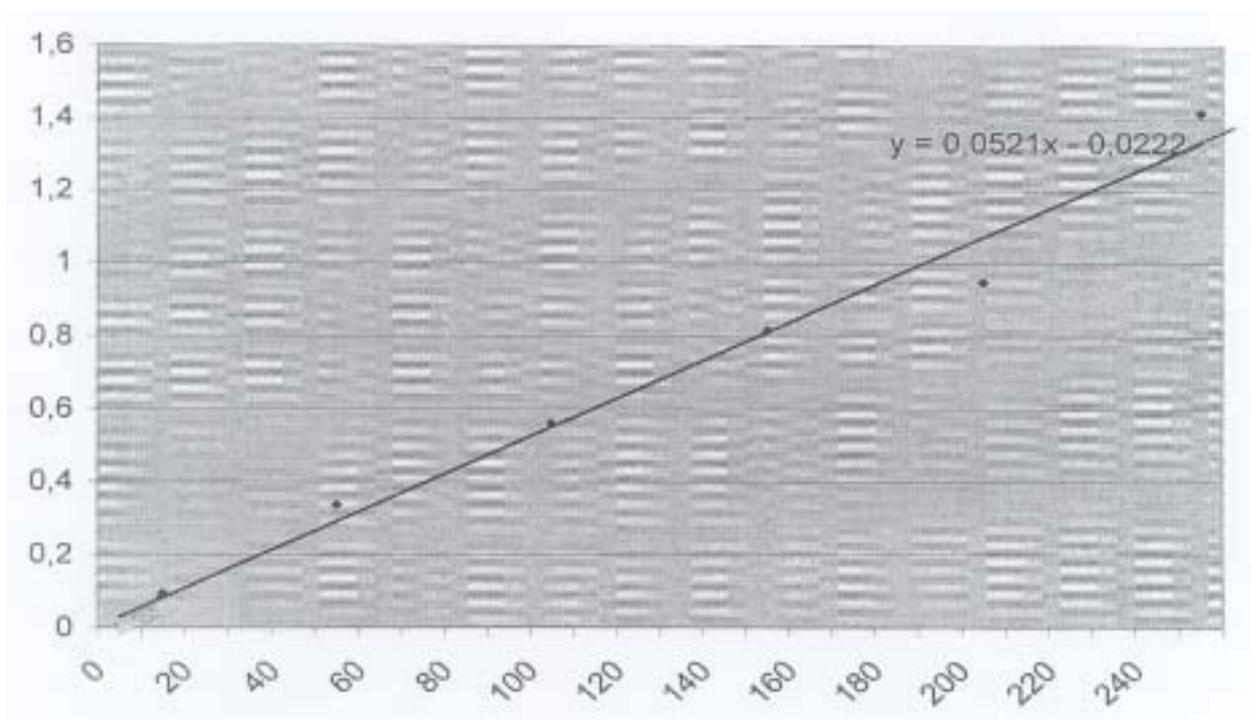


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Eichgeraden.

3.2.1 Die Durchführung des Western Blots-Ergebnisse

Nachdem nun mittels des Bradford Protein-Assays die Proteinmengen in den einzelnen Plasmamembranpräparationen angegeben werden konnten, konnte nun eine determinierte Menge Protein der Kardiomyocyten für den jeweiligen Versuchsansatz aufgewendet werden.

3.3.1 Die Gs α Ergebnisse im Western Blot

Es wurden vier verschiedene Tierserien (jeweils vier Kontrolltiere, vier SNX=urämische Tiere, Vier ET A-antagonistisch behandelte, urämische Tiere und letztlich vier ET AB-antagonistisch behandelte, ebenfalls urämische Tiere) jeweils fünffach bestimmt. Für jede der fünf Bestimmungen wurden die hierfür nötigen Plasmamembranen aus den Tierherzen neu hergestellt und vermessen.

Die mit dem Western Blot erhaltenen Proteinbanden wurden anschliessend mittels eines eigens erhältlichen PC Programmes ausgemessen als ODxmm² gemittelt und zueinander in Relation gesetzt.

Tabelle 2:

Legende: Hier die Messergebnisse der ausgewerteten 52 KDA Bande, links die Tiernummer mit Kollektivbezeichnung, 1-5= Messung 1-5, Schnitt= Durchschnitt).

Messungnr.	1	2	3	4	5	Schnitt
K 340	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 341	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 342	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 348	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
					Total K	1,0000
SNX 333	1,9355	2,0135	1,8934	1,9462	2,036	1,96516
SNX 334	1,9935	2,1621	1,8436	2,0732	1,9356	2,0016
SNX 338	2,1623	1,7947	1,9472	1,8942	1,9002	1,93972
SNX 330	2,0243	2,1432	1,9935	2,0105	1,9210	2,0185
					Total SNX	1,981245
Messungnr.	1	2	3	4	5	Schnitt
A 35	2,5281	2,7001	2,3291	2,4401	2,4601	2,4915
A 37	2,6106	2,4012	2,1967	2,6822	2,4413	2,4664

A 38	2,7201	2,2017	2,2000	2,3013	2,1967	2,32396
A 39	2,5462	2,3291	2,1733	2,2815	2,3975	2,34552
					Total A	2,406845
AB 316	1,9924	2,2184	2,1947	2,3185	2,2791	2,20062
AB 319	2,4001	2,1003	1,9628	2,3014	2,2811	2,20914
AB 324	2,2104	2,0713	2,1792	2,1106	1,9926	2,11282
AB 325	2,1945	2,2016	1,9274	2,3015	2,2810	2,1812
					Total AB	2,175945

Die Werte der optischen Dichten der Kontrolltiere wurden alle gleich eins gesetzt, so konnte die Gs α -Proteinmenge der Kardiomyocyten der SNX Tiere mit 1,98, p<0,05 ermittelt werden. Die urämischen, ET A-antagonistisch behandelten Tiere wiesen die 2,41fache Gs α Menge auf, p<0,05, relativ zum Kontrollkollektiv. Letztlich konnte bei den urämischen, ET AB-antagonistisch behandelten Tieren eine 2,18fache Gs α -Proteinmenge relativ zum K-Kollektiv festgestellt werden, p<0,05 zur Kontrolle. Die Unterschiede zwischen den SNX, ET A und den ET AB Tieren untereinander ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede, p>0,05.

Tabelle 3: Statistische Analyse der 52 kDa Bande, SEM= standard error of the mean, T-Test Wert in der letzten Spalte.

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
Mittelwert	1	1,981245	2,40685	2,175945
Standabw.	0	0,035523331	0,084353084	0,044802789
SEM	0	0,017761665	0,042176542	0,022401394
T-TEST		1,18104E-09	2,41591E-08	1,59235E-09

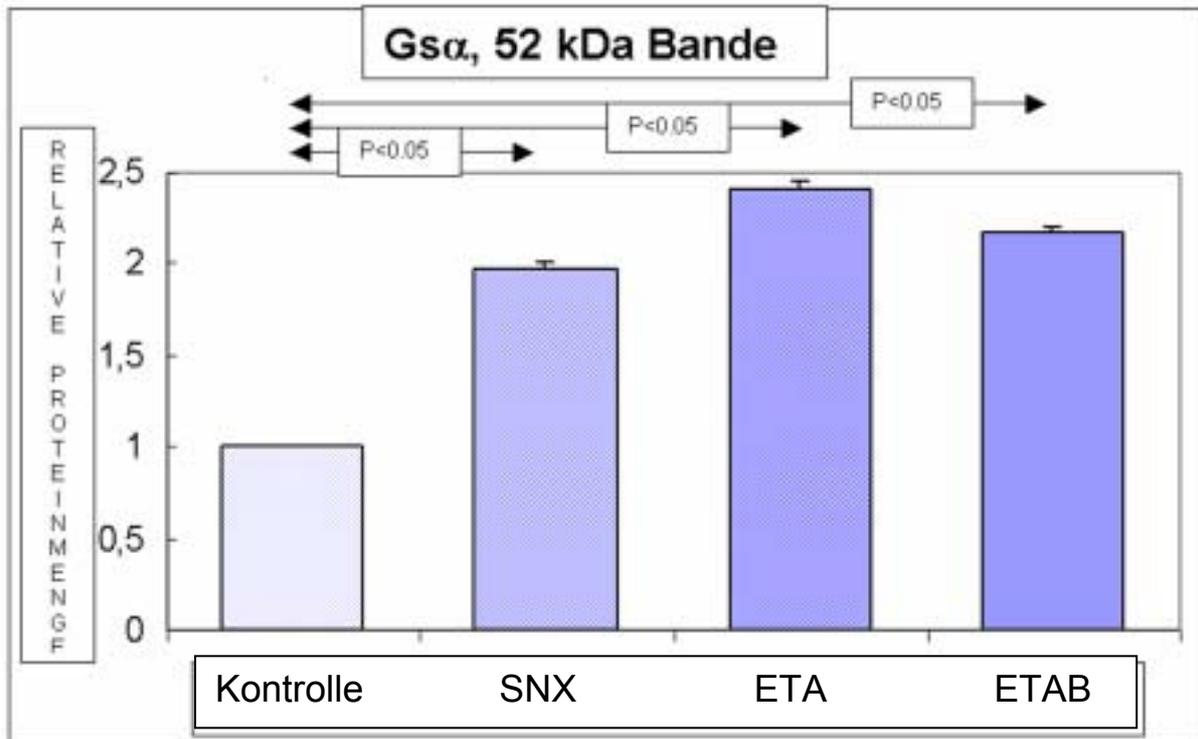


Abbildung 7:

Legende: Balkendiagramm der im Western Blot detektierten $Gs\alpha$ -Proteinmengen relativ zum Kontrollkollektiv, **52 kDa** Bande.

Die Striche mit Querstrichen über den Balkendarstellungen stellen graphisch die Standardabweichung dar.

Unten ist das Balkendiagramm der **46 kDa** Bandenauswertung des $Gs\alpha$ -Proteins. Hier ergaben sich folgende Werte: das Kontrollkollektiv wurde wieder gleich eins gesetzt, das SNX Kollektiv hatte hierbei die 1,91fache Proteinkonzentration des Kontrollkollektivs, $p < 0,05$, das ET A-antagonistisch behandelte die 2,25fache Proteinmenge, $p < 0,05$ relativ zu K, und das ET AB-antagonistische Kollektiv die 2,18fache Menge an $Gs\alpha$ relativ zu K, $p < 0,05$ /zu K. Wiederum wiesen die Unterschiede zwischen den SNX, den ET A und den ET AB Tieren in der untersuchten Fallzahl keine statistische Signifikanz auf, $p > 0,05$, signifikant waren die ermittelten Proteinmengen der SNX, ET A und ET AB Mengen relativ zum Kontrollkollektiv. Ebenfalls nicht statistisch signifikant die Unterschiede zwischen den korrespondierenden 52 und 46 kDa Ergebnissen, $p < 0,05$.

Tabelle 4: Legende: Statistische Analyse der Gs α 46 kDa Bande, SEM= standard error of the mean, Standabw.= Standardabweichung, letzte Zeile: T-Test Wert.

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
Mittelwert	1	1,90968	2,25053	2,1773525
Standabw.	0	0,037376894	0,091262339	0,044814624
SEM	0	0,018688447	0,045631169	0,022407312
T-TEST		2,52056E-09	7,80201E-08	1,59477E-09

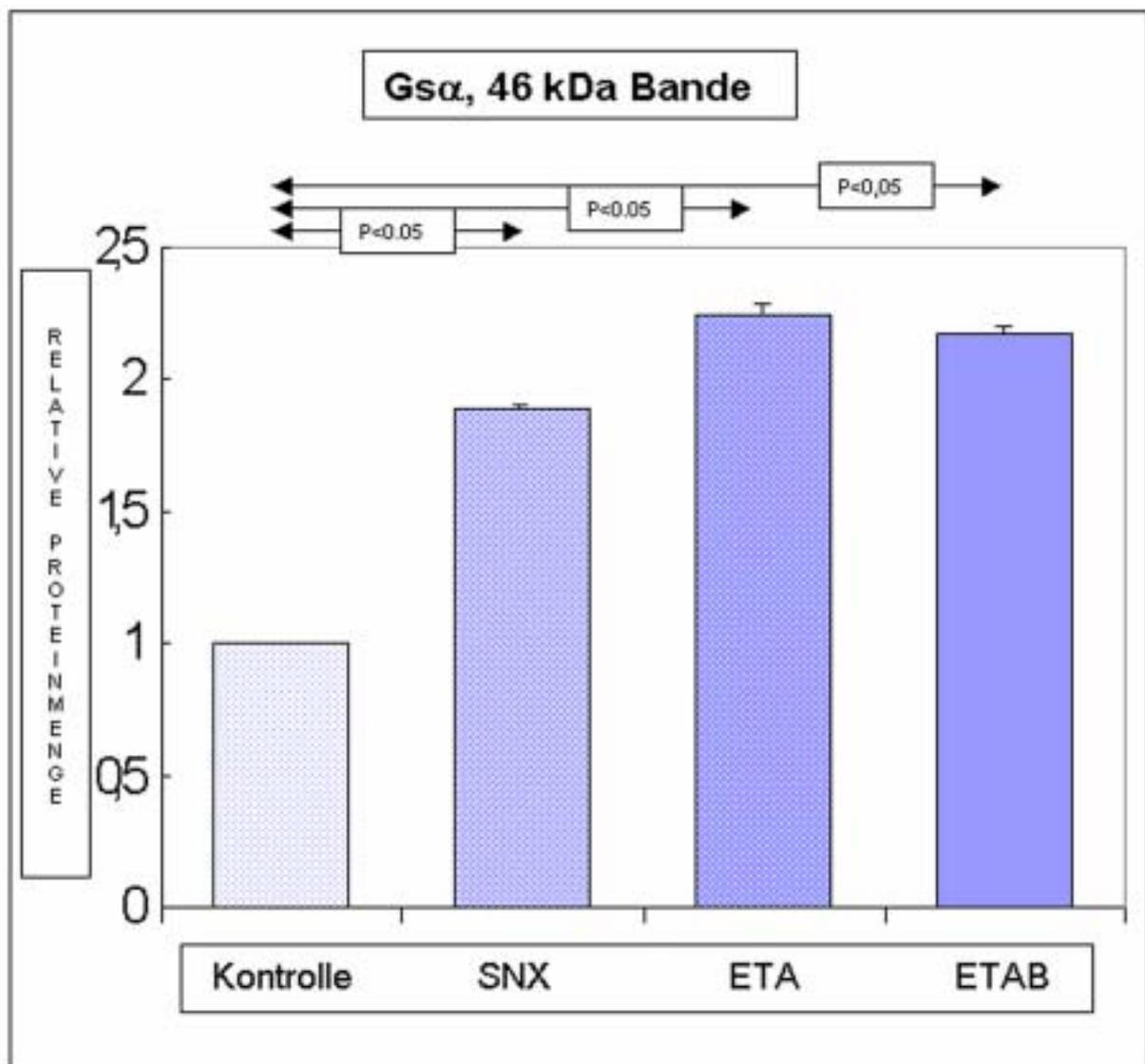


Abbildung 8: Legende: Graphische Darstellung der Proteinmengenverhältnisse.

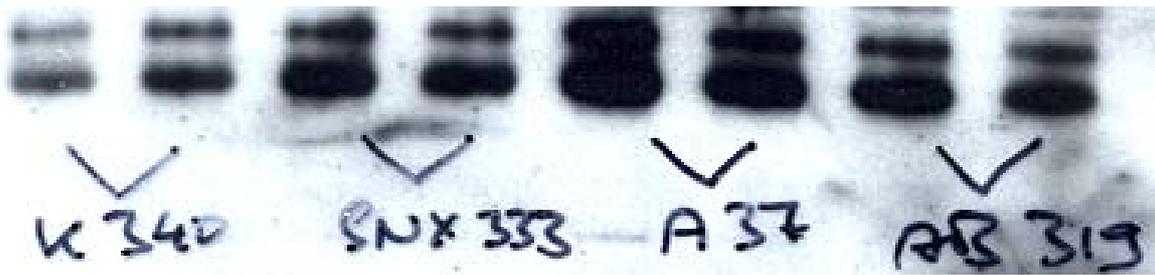


Abbildung 9: Legende: Hier noch ein repräsentatives Beispiel eines Western Blots mit dem $G_{s\alpha}$ Antikörper. Aufgetragen wurden pro Bandline 7,5 μ g Protein der Herzmuskelzellen, der Erstantikörper von NEN wurde in einer Verdünnung von 1:1500 verwendet und der Rabbit-Zweitantikörper wurde in PBS Tween 20 0,1% plus 5% BSA in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

3.3.2 Die $G_{i/2\alpha}$ Ergebnisse im Western Blot

Der Versuchsaufbau orientiert sich am oben Beschriebenen: auch hier wurden vier verschiedene Tierserien jeweils fünffach bestimmt. Für jede dieser fünf Bestimmungen wurde eine separate Plasmamembranpräparation durchgeführt und die letztlich erhaltenen Gele wurden wiederum mit dem eigens hierfür entwickelten Pharmacia Biotech PC Programm ausgewertet, als genaueste Größe wurde hierbei wiederum die optische Dichte pro Quadratmillimeter analysiert.

Tabelle 5: Legende: In der folgenden **Tabelle** werden die 5fach-Messergebnisse der 41 kDa Bande dargestellt, links: Tierkollektiv und Tiernummer, rechts: Durchschnitt.

Messungnr.	1	2	3	4	5	Schnitt
K 340	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 341	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 342	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 348	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
					Total K	1,0000
SNX 333	1,1132	1,0639	0,9620	1,2006	1,0835	1,08464
SNX 334	1,0920	0,9459	1,1296	0,8054	1,0620	1,00698
SNX 338	0,9462	1,1986	0,8430	1,2310	1,0061	1,04498
SNX 330	1,1856	1,0428	0,9219	0,9402	1,0723	1,03256

					Total SNX	1,04229
Messungnr.	1	2	3	4	5	Schnitt
A 35	1,2742	1,1820	0,8931	0,9277	1,1004	1,07548
A 37	1,0028	1,2084	0,8925	0,9855	1,0276	1,00646
A 38	1,1722	0,9336	1,0020	1,1824	0,9115	1,04034
A 39	0,9132	0,8773	1,1283	1,0023	1,0709	1,02934
					Total A	1,037905
AB 316	0,8862	0,9620	0,8118	1,1956	1,0054	0,97220
AB 319	1,0674	1,1207	0,9472	1,1844	0,8952	1,04298
AB 324	1,1206	1,0002	0,9451	0,8945	1,0783	1,00774
AB 325	1,0673	0,9221	0,8659	1,2006	0,9143	0,99404
					Total AB	1,00424

Hier ebenso wurden die OD-Werte der Kontrolltiere gleich 1,0 gesetzt, die gemittelten Werte der SNX Tiere ergaben eine 1,04fache $Gi_{1/2}\alpha$ -Menge, $p>0,05$, ebenso nicht signifikant unterschiedlich war die 1,038fache $Gi_{1/2}\alpha$ -Menge der Kardiomyocyten der ET A Tiere relativ zum Kontrollkollektiv genauso wie die 1,004fache $Gi_{1/2}\alpha$ -Menge der ET AB-antagonistisch behandelten Tiere relativ zur Kontrolle nicht signifikant verschieden war, $p>0,05$.

Tabelle 6: Statistische Analyse der $Gi_{1/2}\alpha$ 41 kDa Bande, SEM= standard error of the mean, Standabw= Standardabweichung, letzte Spalte T-Testergebnis.

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
Mittelwert	1	1,04229	1,037905	1,00424
Standabw.	0	0,032363702	0,03660243	0,029685233
SEM	0	0,016181851	0,018301215	0,014842617
T-TEST		0,01996839	0,081584468	0,392370593

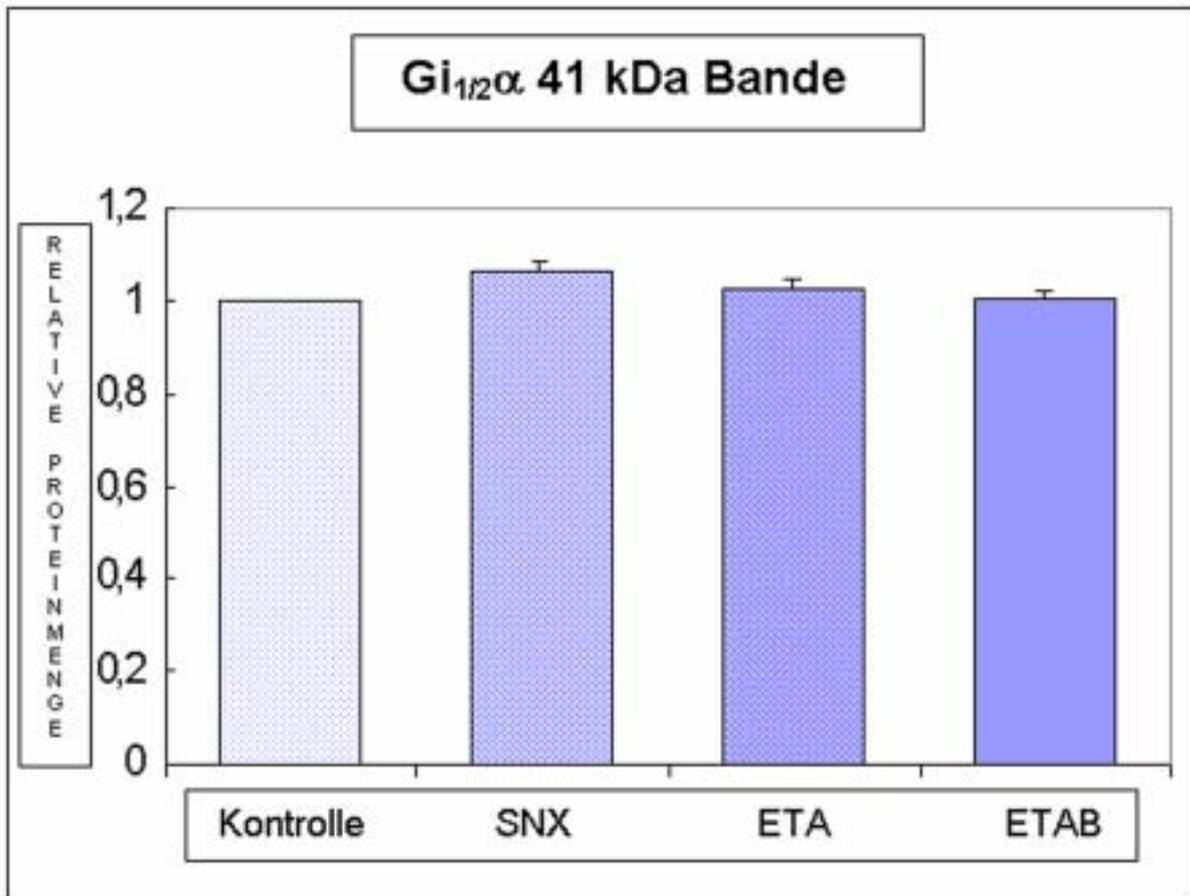


Abbildung 10:

Legende: Balkendiagramm der im Western Blot detektierten $Gi_{1/2}\alpha$ -Proteinmengen relativ zum Kontrollkollektiv, 41 kDa Bande.

Die optische Dichte pro Quadratmillimeter wurde ebenso, wie bereits oben und im Methodenteil beschrieben, für die 40 kDa Bande des $Gi_{1/2}\alpha$ Antikörpers von NEN durchgeführt. Hier bestanden, wie nicht anders erwartet, gleichsinnige Veränderungen wie für die 41 kDa Bande. Ähnlich war es zuvor bei den 52 und 46 kDa Banden des $Gs\alpha$ Proteins.

Bei der 40 kDa Bande war also die detektierte Proteinmenge an $Gi_{1/2}\alpha$ bei den SNX Tieren relativ zum Kontrollkollektiv mit der 1,0937fachen Menge nicht signifikant unterschiedlich, $p > 0,05$. Gleichfalls nicht signifikant unterschiedlich die ET A-antagonistisch behandelten SNX Tiere mit der 0,9826fachen und die ET AB-antagonistisch behandelten SNX Tiere mit dem 1,1414fachen Ergebnis, in beiden Fällen $p > 0,05$.

Tabelle 7: Legende: Statistische Analyse der $Gi_{1/2\alpha}$ 40 kDa Bande, Standabw= Standardabweichung, SEM= standard error of the mean, letzte Zeile: T-Testwert.

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
Mittelwert	1	1,00438	0,9973725	1,0390825
Standabw.	0	0,105320273	0,143260278	0,098485112
SEM	0	0,052660136	0,071630139	0,049242556
TTEST		0,468209007	0,485964465	0,228808021

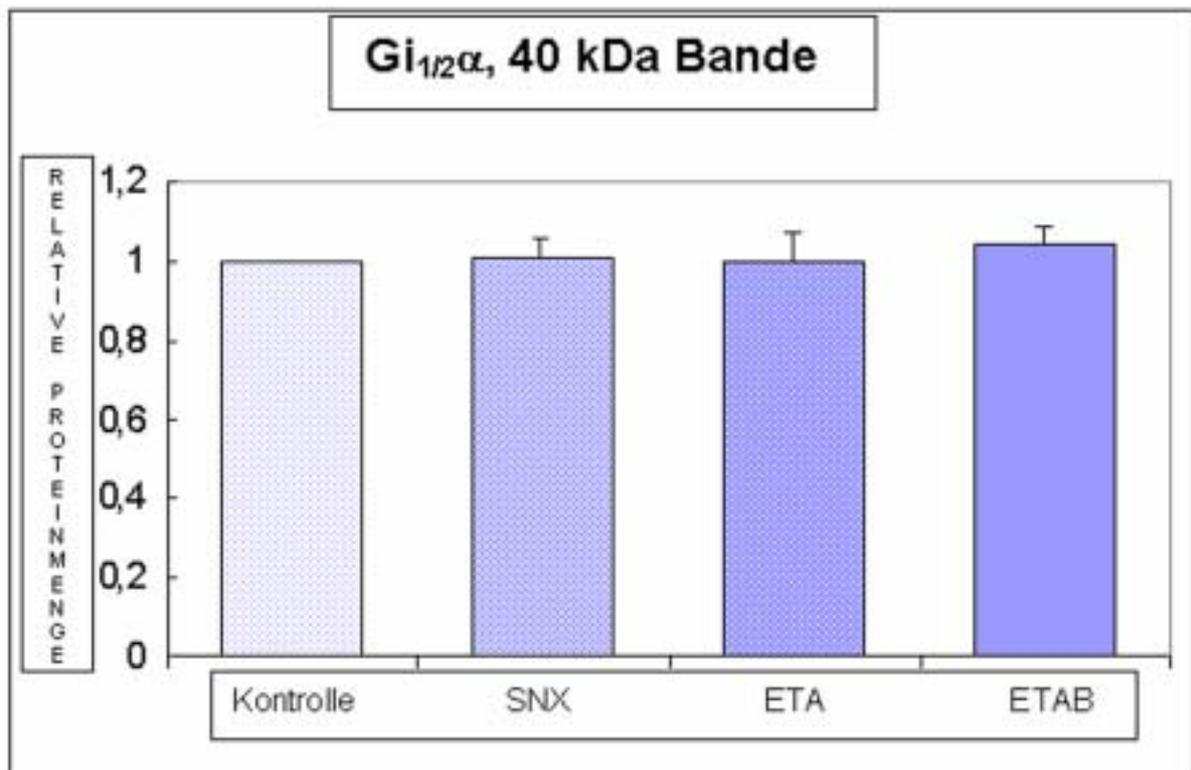


Abbildung 11: Legende: Balkendiagramm der 40 kDa Bande der $Gi_{1/2\alpha}$ -Proteinmenge.

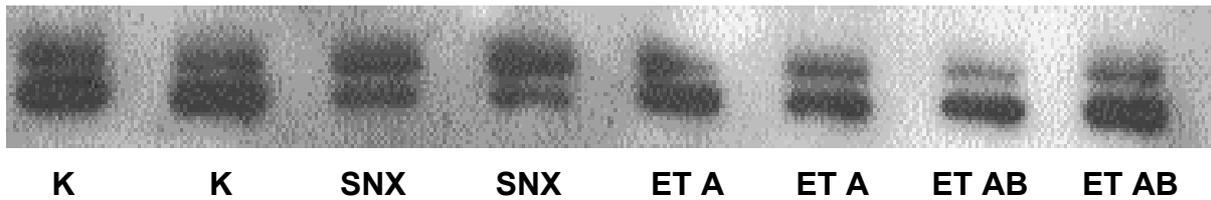


Abbildung 12: Legende: Unten dargestellt ein repräsentativer Western Blot des $Gi_{1/2\alpha}$ Antikörpers von NEN an den Plasmamembranen der Kardiomyocyten der untersuchten Tiere. Verwendet wurden pro Bandline $11,5\mu\text{g}$ Protein, der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:1000 angewendet, der Rabbit-Zweitantikörper 1:500 in 5%iger PBS Tween 20 Lösung, 0,1%.

3.3.3 Die $Gi_3\alpha$ Ergebnisse im Western Blot

Auch zur Auswertung des $Gi_3\alpha$ Antikörpers wurden die vier Tierserien, K, SNX, ET A und ET AB, jeweils fünffach bestimmt. Für jede dieser Bestimmungen wurde eine separate Plasmamembranpräparation durchgeführt, die Auswertung erfolgte wiederum durch die computergestützte Analyse der erhaltenen optischen Dichten der Proteinbanden, bezogen auf die Fläche im Quadrat, mit einer speziellen Software.

Tabelle 8: Legende: In der folgenden Tabelle werden die Messergebnisse der **41 kDa** Bande aufgezeigt, die Zahlenwerte sind in x-facher Menge bezogen zur Kontrolle zu verstehen.

Messungnr.	1	2	3	4	5	Schnitt
K 340	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 341	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 342	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K 348	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
					Total K	1,0000
SNX 333	0,4297	0,5673	0,6637	0,3977	0,5002	0,51172
SNX 334	0,3856	0,6692	0,5510	0,4672	0,4658	0,50776
SNX 338	0,6110	0,4391	0,4982	0,5538	0,6011	0,54064
SNX 330	0,3682	0,4956	0,5291	0,4442	0,5821	0,48384
					Total SNX	0,51099

Messungnr.	1	2	3	4	5	Schnitt
A 35	0,2994	0,4882	0,5120	0,4329	0,4492	0,4376
A 37	0,4883	0,3419	0,4558	0,5193	0,4385	0,44876
A 38	0,5129	0,3845	0,5722	0,4294	0,4601	0,47182
A 39	0,5936	0,3845	0,4050	0,4803	0,4227	0,45722
					Total A	0,45385
AB 316	0,6104	0,5113	0,4507	0,5006	0,4920	0,5130
AB 319	0,5092	0,4015	0,6204	0,5622	0,4792	0,5145
AB 324	0,6332	0,5782	0,5204	0,4612	0,5012	0,53884
AB 325	0,4923	0,4193	0,5520	0,6003	0,4166	0,4961
					Total AB	0,51561

Tabelle 9: Legende: Statistische Analyse der 40 kDa Gi₃α Bande, Standabw= Standardabweichung, SEM= standard error of the mean, letzte Zeile: T-Testwert.

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
Mittelwert	1	0,51099	0,45385	0,51561
Standabw.	0	0,02328956	0,014425075	0,01759088
SEM	0	0,01164478	0,007212538	0,00879544
TTEST		6,09934E-09	1,78541E-10	1,20336E-09

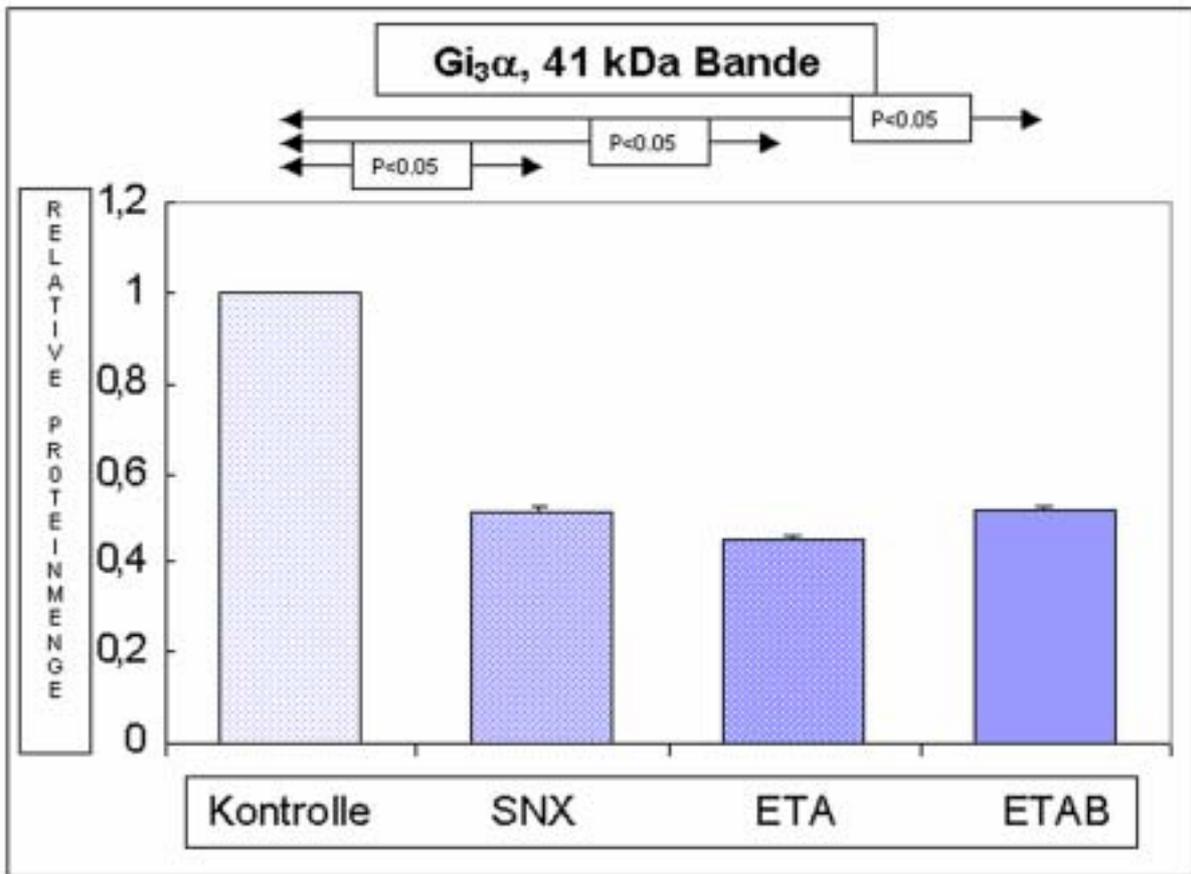


Abbildung 13: Legende: Dargestellt ist das **Balkendiagramm** der Auswertung der optischen Dichte der 41 kDa Proteinbande des $Gi_3\alpha$ -Proteins im Western Blot:

Während wieder die optische Dichte der Kontrollkollektivtiere gleich 1 gesetzt wurde, ergab sich beim $Gi_3\alpha$ Antikörper das folgende Ergebnis: das urämische SNX Kollektiv ergab im Mittel einen OD_{xmm^2} -Wert von 0,51099 entsprechend ca 51,1% der Kontrollkollektiv $Gi_3\alpha$ -Proteinmenge, $p < 0,05$. Das urämische ET A-antagonistische Kollektiv hatte mit 45,4% des Kontrollkollektivniveaus ein ähnliches $Gi_3\alpha$ -Niveau wie die SNX-Gruppe, entsprechend ergab die Signifikanztestung ein $p > 0,05$ zum SNX, aber ein $p < 0,05$ bei der Testung relativ zur Kontrolle. Wiederum ähnlich das ET AB-antagonistisch behandelte urämische Kollektiv mit etwa 51,6% der $Gi_3\alpha$ -Menge relativ zur K-Gruppe, $p < 0,05$, jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur ET A und zum SNX Kollektiv, p jeweils größer 0,05.



Abbildung 14: Legende: Oben dargestellt noch ein Beispiel eines $Gi_3\alpha$ Western Blots mit dem Antikörper von NEN. Die Plasmamembranen der Kardiomyocyten der Tiere wurden mit einer korrespondierenden Proteinmenge von 11,25 μ g aufgetragen. Der Erstantikörper wurde 1:1000 eingesetzt, der Anti-Rabbit Zweitantikörper in PBS Tween 20 0,1% in einer Verdünnung von 1:500. Das erhaltene Signal konnte mittels Marker der 41 kDa Bande zugeordnet werden.

$Gi_3\alpha$ Western Blot

Zusammenfassend ist festzustellen, dass auf Proteinebene Veränderungen des $Gs\alpha$ - und des $Gi_3\alpha$ -Proteins bei den SNX, ET A und ET AB Tieren relativ zu den gesunden Kontrolltieren nachzuweisen sind. Beim $Gi_{1/2}\alpha$ -Protein konnte hierbei kein Unterschied zwischen allen vier Kollektiven nachgewiesen werden, wobei die Veränderungen des Gs -Proteins annähernd spiegelbildlich zum $Gi_3\alpha$ -Protein waren (die SNX, ET A und ET AB Tiere hatten etwa-jeweils statistisch signifikant-doppelt soviel Gs - und etwa halb soviel Gi_3 -Protein relativ zu den Kontrolltieren). Aufgrund dieses -wie im Diskussionsteil genauer dargestellten- doch etwas überraschenden Ergebnisses wurde eine eingehendere Analyse mit der Polymerasekettenreaktion durchgeführt, um nachzuvollziehen, ob auch auf genetischer Ebene ähnliche Veränderungen nachweisbar waren.

3.4.1 Die Gs α Ergebnisse in der quantitativen RT-PCR

Es wurde die Serie K46, SNX 424, ET A 410 und ET AB 416 jeweils fünffach ausgewertet. Das Amplifikat hatte eine Grösse von 449 Basenpaaren, der sense-Primer eine von 629 und der antisense-Primer für die Reverse Transkriptase PCR eine von 1077 Basenpaaren. Die Annealing Temperatur lag bei 58°C.

Tabelle 12: Übersicht über die in der RT-PCR verwendeten Amplifikate, Größe in basepairs, Annealing T.= Annealing Temperatur.

Amplifikat	Bezeichnung	Oligonukleotid	Größe	Annealing-T.
<u>Gsα</u>	pGEM449 Gs1	sGsarat/asGsarat	449	58°C
<u>Gi₃α</u>	pGEM411 Gi6	sGi3rat/asGi3rat	411	54°C
<u>Gi unspezifisch</u>	pGEM455 Gi5	sGiurat/asGiurat	455	47°C

Tabelle 13: Ergebnistabelle der RNA-Mengen, Gs α :

Legende: Werte sind angegeben als amol/ μ g total RNA.

PCR-Gs α

Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
4,3226	36,3401	42,663	39,4631
5,7894	47,0022	49,0374	41,4927
3,0343	29,9409	37,0762	51,1726
5,2104	38,4436	44,0224	43,29
4,0624	36,5295	48,0326	54,4832

Tabelle 14: Statistische Analyse. Legende: Mittelwertangabe in amol/ μ g total RNA, Standardabweichung und SEM (standard error of the mean) bezogen auf die Werte der obigen Tabelle.

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
Mittelwert	4,48382	37,65126	44,16632	45,98032
Standabw.	1,065029644	6,133820566	4,775615851	6,502104494
SEM	0,402543368	2,318366258	1,688435176	2,29884109
TTEST		1,13313E-06	4,39022E-08	3,13902E-07

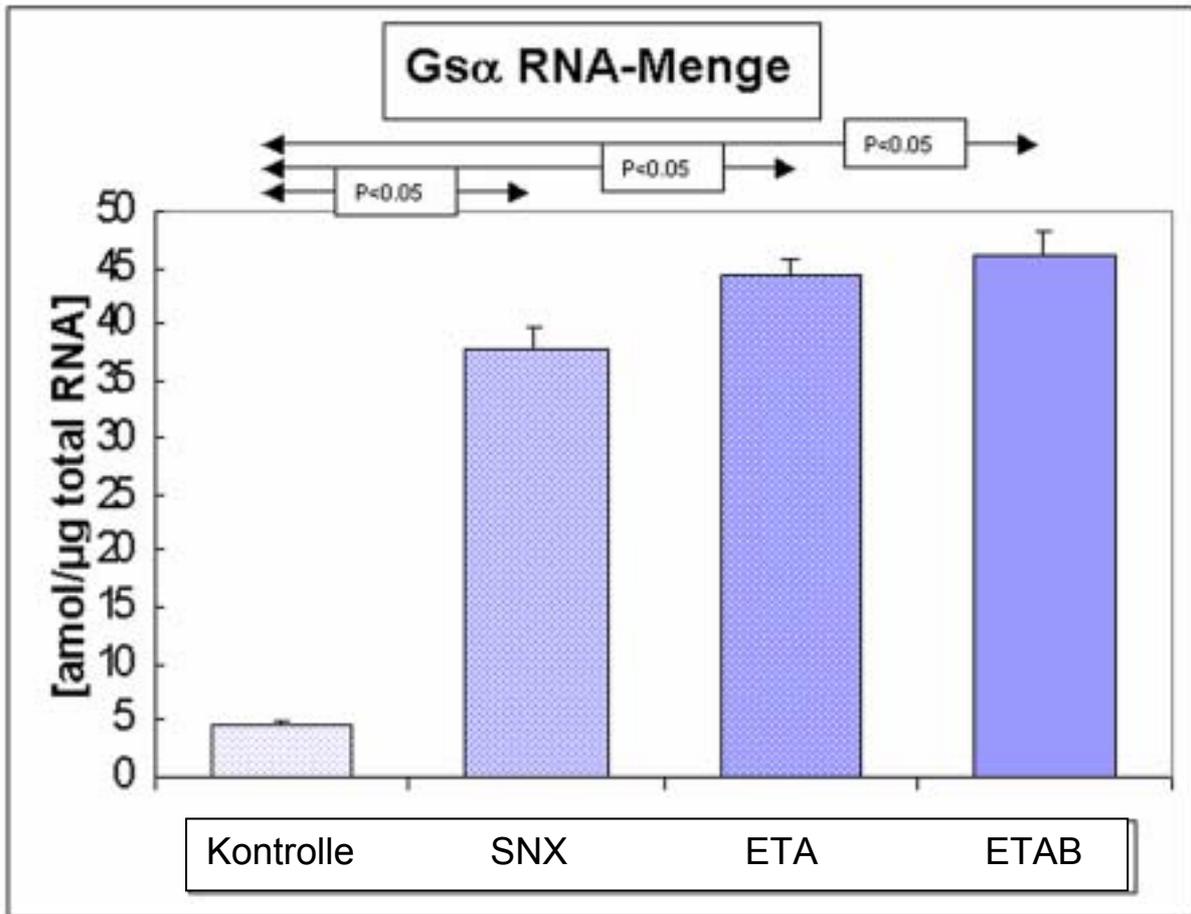


Abbildung 17: Legende: Graphische Darstellung der Gs α -mRNA-Menge, x-Achse= Tierkollektive, y-Achse= mRNA in amol/ μ g total RNA.

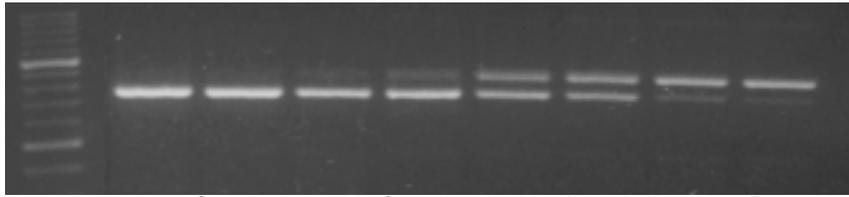
Anmerkung: der Strich mit Querbalken über den Balken (graphische Darstellung der gemittelten RNA-Mengenangaben) zeigt graphisch die Standardabweichung an.

Die statistische Signifikanzüberprüfung ergab jeweils eine statistische Signifikanz zwischen dem Kontrollkollektiv und dem SNX wie auch zum ET A- und zum ET AB- antagonistisch behandeltem Kollektiv mit $p < 0,05$. Die drei anderen Kollektive untereinander (SNX, ET A und ET AB) hingegen zeigten statistisch keine signifikant unterschiedlichen Differenzen in ihrer RNA-Menge mit $p > 0,05$.

Abbildung 18: Legende:

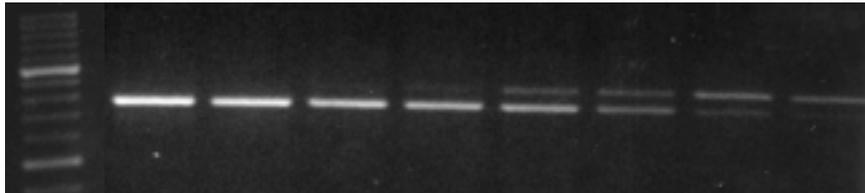
Letztlich soll noch umseitig ein Bildbeispiel der ausgewerteten RT-PCR Gele mit dem Gs α Primer abgebildet werden. Ersichtlich wird die etwa 10fach niedrigere Verdünnung des Standards am Äquivalenzpunkt im Kontrollgel relativ zu den SNX, ET A- und ET AB-Gelen.

Kontrolle

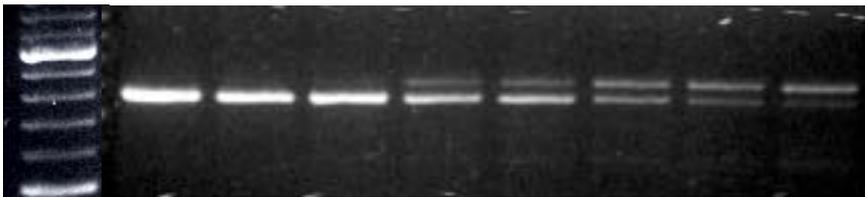


Verdünnung: 5×10^{-2} 5×10^{-3} 5×10^{-4} 5×10^{-5}
 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}

SNX

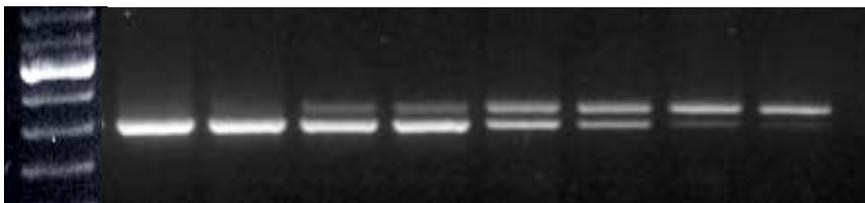


Verdünnung: 5×10^{-1} 5×10^{-2} 5×10^{-3} 5×10^{-4}
 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}



ET A

Verdünnung: 5×10^{-1} 5×10^{-2} 5×10^{-3} 5×10^{-4}
 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}



ET AB

Verdünnung: 5×10^{-1} 5×10^{-2} 5×10^{-3} 5×10^{-4}
 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}

Erklärung :

- Linke Lane=Marker
- Untere von links nach rechts absteigende Reihe=Standard, 409 bps
- Obere von links nach rechts aufsteigende Reihe=Probe, 449 bps

Abbildung 18: Legende:

Bildbeispiel der ausgewerteten RT-PCR Gele mit dem Gs α Primer. Ersichtlich wird die etwa 10fach niedrigere Verdünnung des Standards am Äquivalenzpunkt im Kontrollgel relativ zu den SNX, ET A- und ET AB-Gelen.

3.4.2 Die Gi (unspezifisch) Ergebnisse in der quantitativen RT-PCR

Analysiert wurden die Tiere K 219, SNX 421, ET 29 und ET AB 213; diese Tiere wurden, wie auch bei den anderen RT-PCR Versuchen, jeweils fünffach bestimmt. Hier hatte das Amplifikat 455 basepairs, der sense Primer 492 basepairs und der antisense Primer 947 basepairs. Die Annealing Temperatur betrug 47°C.

Tabelle 15: Legende: Ergebnistabelle der Gi (unspezifisch) RT-PCR Werte RNA-Menge, Werte sind angegeben als amol/ μ g total RNA.

PCR-Gi unspezifisch

Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
30,4622	25,4324	22,6704	31,4024
31,6824	23,2682	34,3262	33,4682
33,43	31,4374	30,7621	24,3284
29,1107	24,6843	26,3027	27,8326
30,7026	28,9983	32,4832	29,4362

Tabelle 16: Legende: Statistische Analyse, die Mittelwertangabe ist in amol/ μ g RNA angegeben, die Standardabweichung, die SEM (standard error of the mean) und der T-Test sind dimensionslose statistische Größen, alle Werte sind bezogen auf die Werte der obigen Tabelle.

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
Mittelwert	31,07758	26,76412	29,30892	29,29356
Standabw.	1,60371495	3,359750447	4,755738395	3,488638323
SEM	0,717203129	1,502526077	2,126830867	1,560166488
T-TEST		0,016036892	0,226706075	0,164601186

Abbildung 19/20: RNA-Menge Gi unspezifisch. Anmerkung: Der Strich mit dem Querstrich über der Balkendarstellung stellt die ermittelte Standardabweichung dar. Die statistische Analyse ergab keine statistisch signifikant unterschiedlichen Ergebnisse dieser Werte bei der untersuchten Anzahl mit $p > 0,05$. Hier soll nochmals ein RT PCR Beispiel mit dem Gi (unspezifischem) Primer dargestellt werden (Abb. 20).

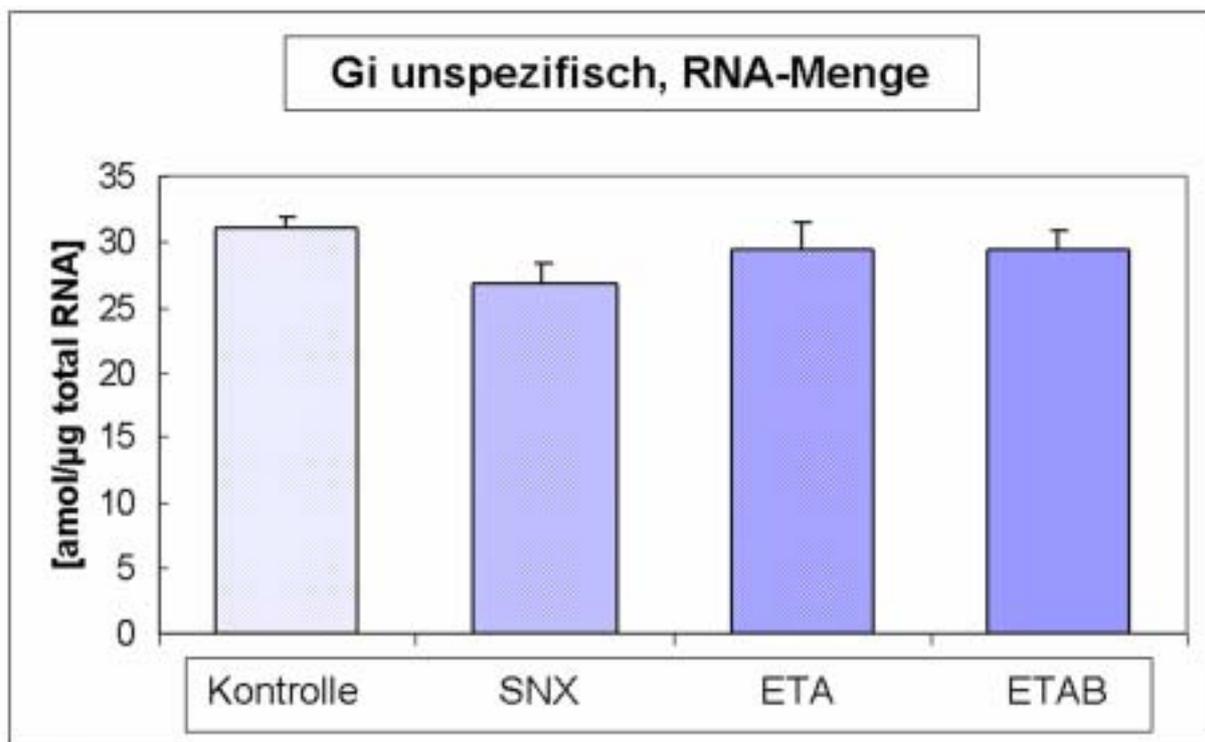
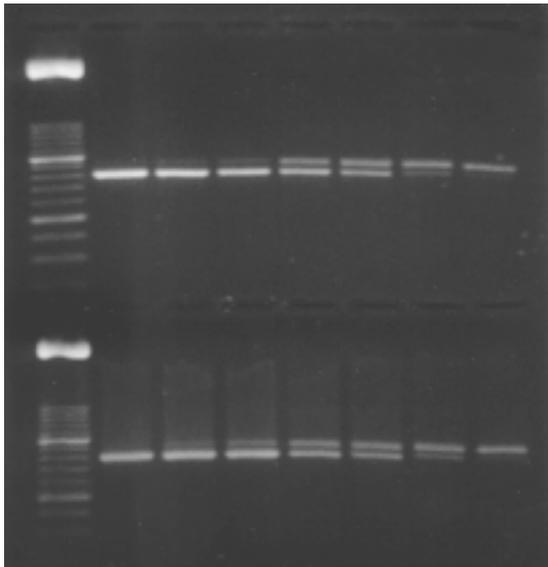


Abbildung 19/20: RNA-Menge Gi unspezifisch. Anmerkung: Der Strich mit dem Querstrich über der Balkendarstellung stellt die ermittelte Standardabweichung dar. Die statistische Analyse ergab keine statistisch signifikant unterschiedlichen Ergebnisse dieser Werte bei der untersuchten Anzahl mit $p > 0,05$. Hier soll nochmals ein RT PCR Beispiel mit dem Gi (unspezifischem) Primer dargestellt werden (Abb. 20).



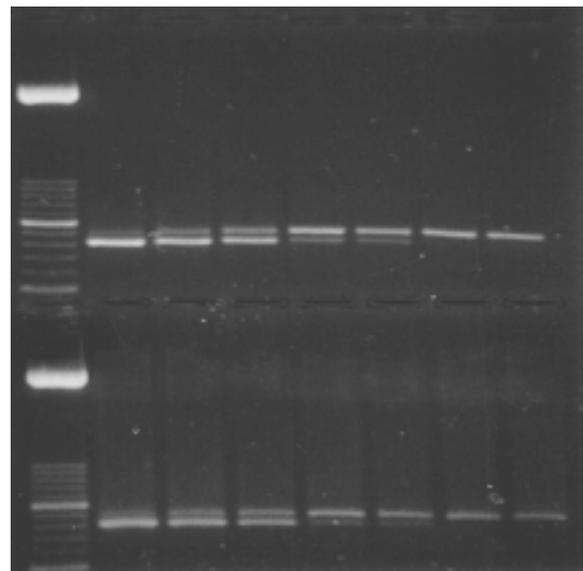
Kontrolle
 Linke Lane=Marker
 Obere Reihe=Probe, 455 bps
 Untere Reihe=Standard, 415 bps

SNX
 Linke Lane=Marker
 Obere Reihe=Probe, 455 bps
 Untere Reihe=Standard, 415 bps

Verdünnung: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}
 5×10^{-1} 5×10^{-2} 5×10^{-3} 5×10^{-4}

ET A
 Linke Lane=Marker
 Obere Reihe=Probe, 455 bps
 Untere Reihe=Standard, 415 bps

ET AB
 Linke Lane=Marker
 Obere Reihe=Probe, 455 bps
 Untere Reihe=Standard, 415 bps



Verdünnung: 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}
 5×10^{-2} 5×10^{-3} 5×10^{-4} 5×10^{-5}

Abbildung 20: Legende: PCR Gele, Gi unspezifisch.

3.4.3 Die $Gi_3\alpha$ Ergebnisse in der quantitativen RT-PCR

Es wurden die Tiere K 224, SNX 423, ET A 21 und ET AB 215 jeweils fünffach bestimmt. Das Gi_3 Amplifikat hatte eine Größe von 411 Basenpaaren. Der sense Primer war 929 Basenpaare groß, der antisense Primer 1339 Basenpaare groß. Die

Annealing Temperatur wurde ausgetestet und letztlich wurde bei 54°C das Optimum erreicht.

Tabelle 17: Legende: Ergebnistabelle der RNA-Mengen $Gi_3\alpha$, die Werte sind angegeben als amol/ μ g total RNA.

PCR- $Gi_3\alpha$

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
	34,6432	4,3266	5,4689	3,982
	26,3349	3,9829	4,8927	4,6343
	27,9468	3,4694	4,3326	5,1324
	35,7929	4,1171	3,9874	4,4114
	36,9223	3,9244	4,7985	4,8324

Tabelle 18: Legende: Statistische Analyse: Mittelwertangabe in amol/ μ g total RNA, Standardabweichung und SEM (standard error of the mean) bezogen auf die obige Tabelle.

	Kontrolle	SNX	ETA	ETAB
Mittelwert	32,32802	3,96408	4,69602	4,5985
Standabw.	4,836978307	0,316809433	0,565850039	0,434775436
SEM	2,16316246	0,141681486	0,253055831	0,194437486
T-TEST		5,53061E-07	7,00408E-07	6,67428E-07

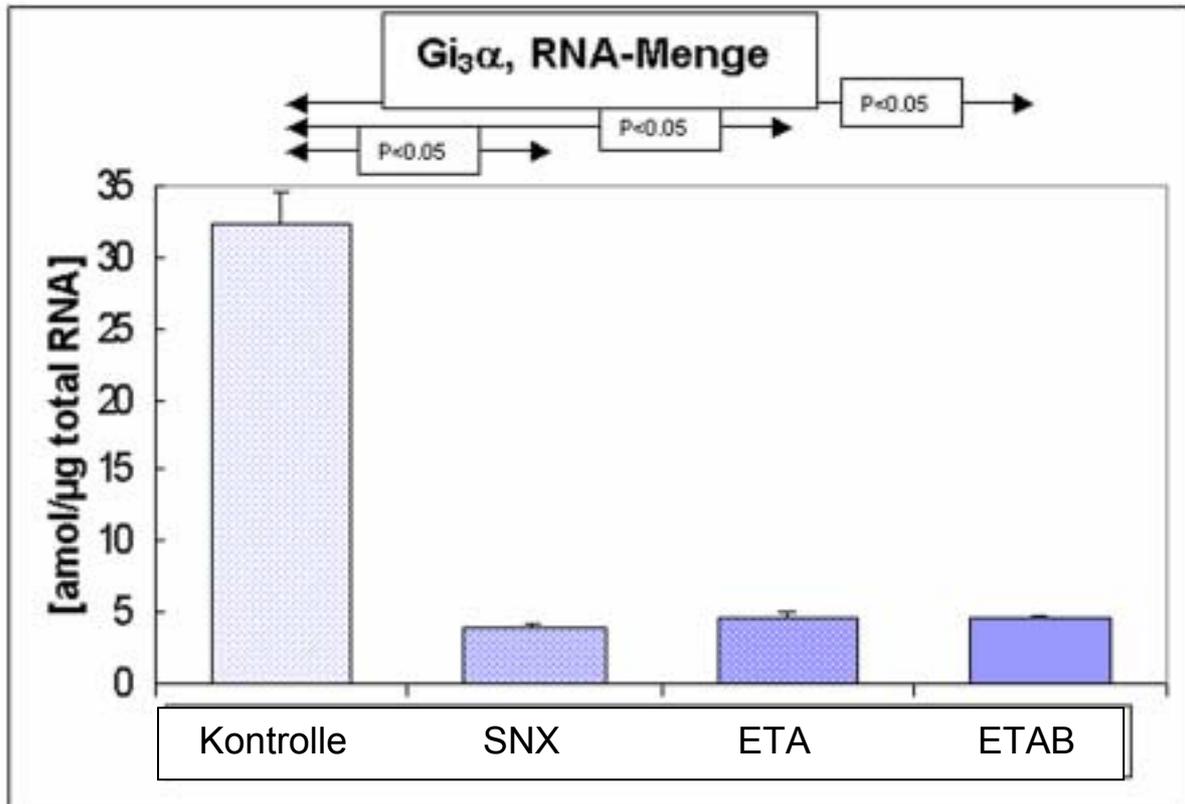
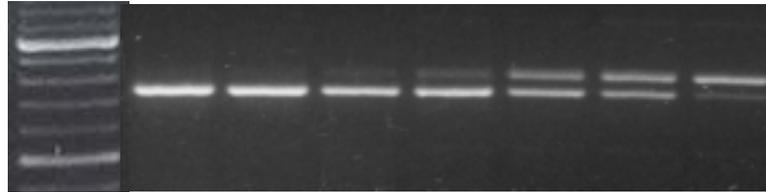


Abbildung 21: Legende: Der Strich mit Querstrich über dem Balken (graphische Darstellung der gemittelten RNA-Mengen) zeigt graphisch wiederum die Standardabweichung an. Die statistische Analyse ergab eine Signifikanz zwischen dem Kontrollkollektiv und dem nephrektomierten SNX Kollektiv wie auch zu den zusätzlich ET A- und ET AB-antagonistisch behandelten Kollektiven mit einem p von jeweils <0,05. Wiederum zeigten sich die SNX, ET A und ET AB Kollektive untereinander jedoch nicht signifikant different, $p > 0,05$.

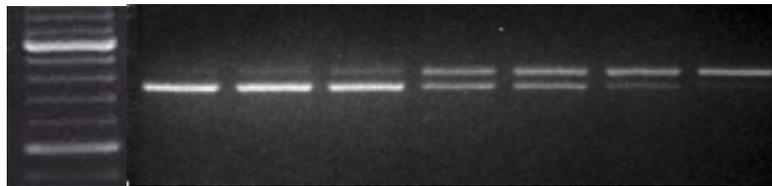
Kontrolle

Verdünnung: 5×10^{-2} 5×10^{-3} 5×10^{-4} 5×10^{-5}
 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}



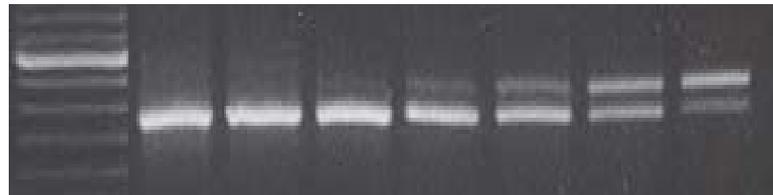
SNX

Verdünnung : 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}
 5×10^{-4} 5×10^{-5} 5×10^{-6}



ET A

Verdünnung : 5×10^{-3} 5×10^{-4} 5×10^{-5} 5×10^{-6}
 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}



ETAB

Verdünnung: 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}
 5×10^{-4} 5×10^{-5} 5×10^{-6}



Abbildung 22: Legende: Im Bildbeispiel hier noch repräsentative $Gi_3\alpha$ RT-PCR Gele.

-Lane 1=Marker

-Obere Reihe=Probe, 411 bps

-Untere Reihe=Standard, 371 bps

4. Diskussion

4.1 Ergebniszusammenfassung

Mit dem verwendeten Untersuchungsmodell konnten interessante Veränderungen aufgezeigt werden. Insgesamt liegen sowohl auf Proteinebene als auch auf genetischer Ebene der G-Proteine gleichsinnige Veränderungen vor; d.h. im SNX (urämischen) Kollektiv konnten, ähnlich wie auch im Endothelin A- und/oder AB-antagonistisch behandelten Kollektiv, eine Verdoppelung der $G_{s\alpha}$ -Proteinmenge mittels Western Blot detektiert werden (plus 98% beim SNX Kollektiv, plus 141% beim ET A und plus 118% im ET AB Kollektiv). Das inhibitorische $G_{i_{1/2}\alpha}$ -Protein bleibt unberührt, während das inhibitorische $G_{i_3\alpha}$ -Protein spiegelbildliche Veränderungen im Western Blot aufweist (hier konnte eine Reduktion der Proteinmenge um etwa 49% beim SNX, 54% beim ET A und um ca. 48% beim ET AB Kollektiv festgestellt werden).

Gleichsinnige Veränderungen konnten auch auf genetischer Ebene in der RT PCR eruiert werden. Auch hier ergaben sich deutlich erhöhte $G_{s\alpha}$ -RNA-Werte in der urämischen SNX Gruppe von 37,65 amol/ μ g RNA relativ zu 4,48 amol/ μ g RNA in der K Gruppe. Mit 44,17 amol/ μ g RNA waren auch die $G_{s\alpha}$ -Werte der ET A-antagonistisch behandelten Tiere deutlich erhöht, ebenso wie die RNA der ET AB-antagonistisch behandelten Tiere mit 45,98 amol/ μ g RNA auch deutlich erhöht nachzuweisen war.

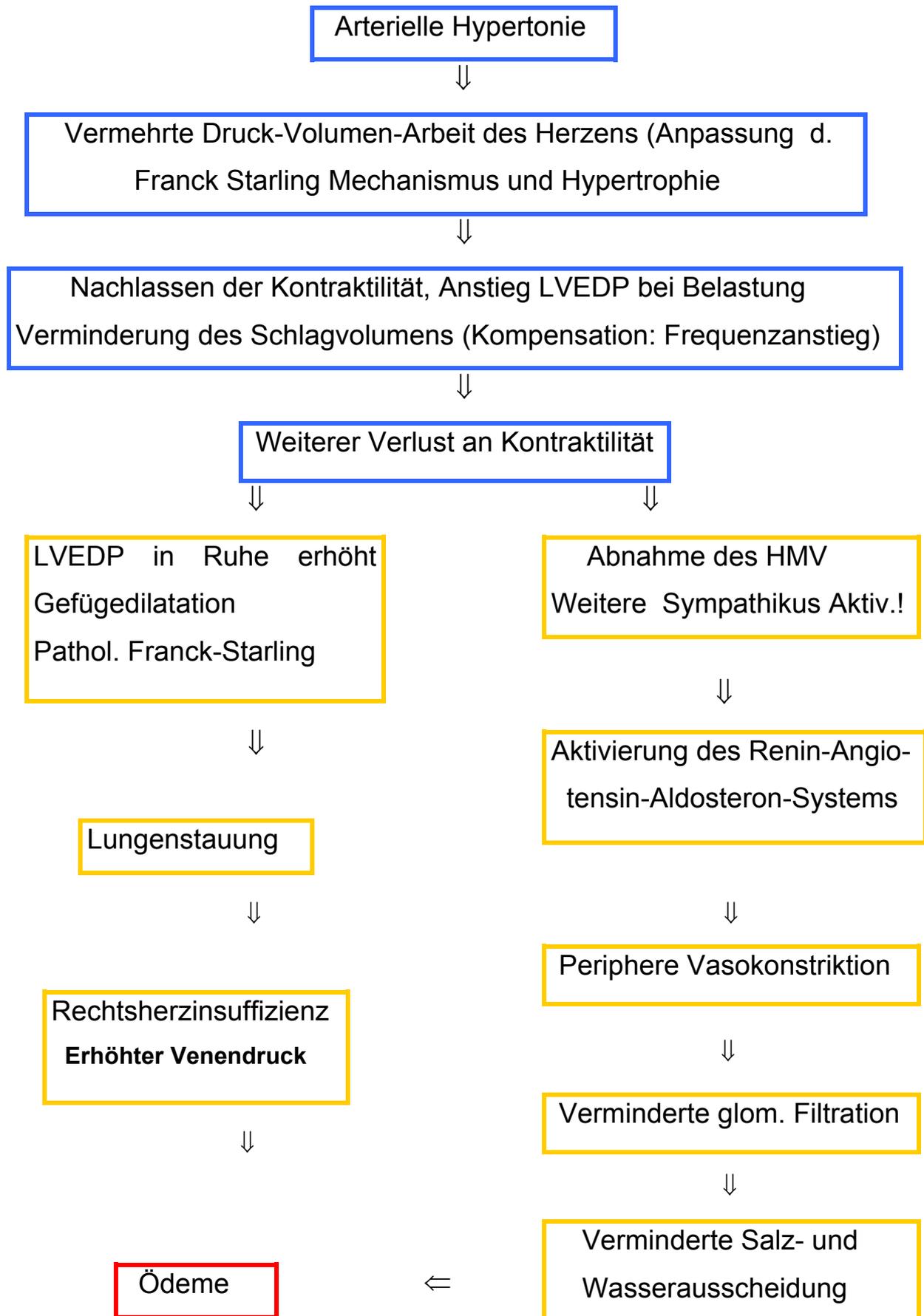
Bei den G_i -unspezifisch-RNA-Werten ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den vier Gruppen, wohingegen die RNA-Menge der $G_{i_3\alpha}$ -Werte bei der SNX Gruppe relativ zum Kontrollkollektiv signifikant erniedrigt war (3,96 amol/ μ g RNA zu 32,33 amol/ μ g RNA). Desgleichen waren die $G_{i_3\alpha}$ -RNA-Mengen der ET A- und ET AB-antagonistisch behandelten Tiere (4,70 amol/ μ g RNA und 4,60 amol/ μ g RNA) deutlich niedriger als die des K-Kollektivs. Diese Ergebnisse waren eine echte Herausforderung für die Interpretation, da anfänglich andere Erwartungen bestanden, was im Folgenden erläutert werden soll.

4.2 Verdeutlichung der pathogenetischen Grundlagen

Hierzu müssen die pathogenetischen Hintergründe der Kollektive zur näheren Interpretation nochmals verdeutlicht werden. Als Referenz galt immer das Kontrollkollektiv, d.h. unbehandelte, nicht-krankte Tiere. Die SNX Tiere waren allesamt 5/6 nephrektomiert, also primär niereninsuffizient. In der Folge der Urämie entwickelt sich klinisch letztlich eine Kardiomyopathie (siehe Einleitung), die durch verschiedene funktionelle und strukturelle Veränderungen gekennzeichnet ist. Unterschieden werden verschiedene Formen: die DCM (dilatare Kardiomyopathie, CM), die HCM (hypertrophe CM) und die restriktive CM. Bei der urämischen CM handelt es sich um eine metabolische, dilatative, hypertrophe CM Form (MLP, Innere Medizin, 1999).

Letztendlich tödliche Komplikationen können sein: die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit und eines Herzinfarktes (Bethesda et al 1995), die linksventrikuläre Hypertrophie (Lüscher et al 2000), die Entwicklung einer Atherosklerose (Rostand et al 1994), die Entwicklung kardialer Arrhythmien, Tachykardien, Herzklappeninsuffizienzen und Halsvenenstauungen, pulmonale Embolien, Lungenödeme und der plötzliche Herztod (MLP, Innere Medizin, 1999). Diese kardialen Komplikationen machen laut Foley 1993 bis zu 70% der Letalität urämischer Patienten aus. Weiterhin können Atemnot (Rückstau im Lungenkreislauf, vermehrte interstitielle Flüssigkeit durch erhöhten Venendruck, Belastungs- oder Ruhedyspnoe, vor allem im Liegen), Stauungshusten, Zyanose durch Abnahme des Herzminutenvolumens und Leistungsminderung (körperlich und cerebral) auftreten. Im weiteren Verlauf können auch eine Leberstauung, eine Stauungsgastritis, Nykturie und eine Hitzeunverträglichkeit (Springer, Pharmakologie und Toxikologie, 1997) beobachtet werden.

Im Herzen konnten interstitielle Myokardfibrosen, kardiale Gefäßwandhypertrophien und eine Verringerung intramyokardialer Kapillare (Amann et al 1995) nachgewiesen werden. Wu et al und Weber et al beschrieben 1996 und 1994 eine endothelinbedingte Vermehrung der Kardiomyocyten und der interstitiellen Kollagensynthese. Auf solchen Untersuchungen beruht die Hoffnung, mittels spezifischer Endothelinantagonisten diesen morphologischen Veränderungen entgegenzutreten zu können.



Oben: Schema zum Circulus Vitiosus der Herzinsuffizienz, hier dargestellt ausgehend von der arteriellen Hypertonie. Anm.: LVEDP= linksventrikulärer, enddiastolischer Druck.

Mit den Tierkollektiven, die hier verwendet worden sind, waren bereits zuvor interessante Untersuchungen bezüglich anderer Parameter durchgeführt worden. Im Journal of Cardiovascular Pharmacology wurden 12-Wochen Ergebnisse veröffentlicht mit den identischen K, SNX, ET A und ET AB Tieren (gleiche pharmakologische Behandlung mit LU 302872, ET A-Antagonist, und LU 302146, ET AB-Antagonist). Hierbei konnte eine erhebliche Verringerung der Proteinurie nach 12 wöchiger Behandlung dargelegt werden: 130+/-22,5 mg/24h beim nephrektomierten SNX Kollektiv zu 42,6+/-10 mg/24h und sogar nur 23,2+/-3,6mg/24h beim ET A- bzw ET AB-antagonistischen Kollektiv (n=17 jeweils). Das Herzgewicht hingegen lag im Mittel bei 1,14g beim K Kollektiv zu 1,4g beim SNX und 1,42g beim ET A und 1,24g beim ET AB Kollektiv. Somit liegt wohl in allen 3 urämischen Kollektiven eine Myokardhypertrophie vor, die durch den ET AB-Antagonisten teilweise verhindert werden konnte (Wolf et al 2000 und 1999). Möglicherweise sind jedoch die positiven Effekte bezüglich der Prävention der Hypertrophie weniger stark ausgeprägt, als erhofft. Diese Differenzen zwischen der erzielten Hypertrophieverringerng zwischen ET A und ET AB Kollektiv lassen sich jedoch nicht durch Differenzen der G-Proteine (G_{α} , $G_{i1/2\alpha}$ und $G_{i3\alpha}$) zwischen dem ET A und ET AB Kollektiv abbilden.

4.3 G-Proteine in der Herzinsuffizienz und in der Kardiomyopathie

Auf der Ebene der Signaltransduktion sind Veränderungen der G-Proteine in anderen pathologischen Kollektiven zuvor beschrieben worden. So beschreibt Brodde et al 1998 eine Zunahme an G_i -Proteinen im Endstadium der Herzinsuffizienz bei DCM und ICM Patienten mit einem Abfall kardialer β -Adrenorezeptoren (DCM= dilatative Cardiomyopathie; ICM= ischämische Cardiomyopathie), denen die Vermittlung der positiven Inotropie zugeschrieben wird (Brodde et al 1996). Außerdem war die Ansprechbarkeit der vermindert exprimierten, G_s -gekoppelten β -Rezeptoren gleichermassen verringert. Dies führte über die G-Proteinveränderungen zu einer auf molekularer Ebene reduzierten basalen und katecholamin-stimulierten Aktivität der

Adenylatcyclase und intrazellulären cAMP Konzentration. Hierdurch verringerte sich die Phosphorylierung intrazellulärer, funktioneller Proteine, was zu einem veränderten Ca^{2+} Influx in die Zelle und hiermit zu einer verminderten kontraktilen Funktion führte (Pieske et al 2000). Ein schwieriges Interpretationsproblem ergab sich hiermit, da im vorliegenden Modell die Gs-Protein- und RNA-Konzentrationen gerade gegenläufig verändert waren. Dies festigt die Vermutung, dass es sich bei der urämischen, hypertrophen DCM um eine auf molekularer Ebene andere Herzinsuffizienzart handelt.

Interessant war das Faktum, dass bei der ICM sowohl $\beta 1$ - und $\beta 2$ -ARs vermindert waren, bei der DCM, jedoch mehr die $\beta 1$ -ARs (Brodde et al, 1998). Auch dies legt nahe, dass es von großer Relevanz ist, welcher Art die Kardiomyopathie ist, die man versucht zu beschreiben. Die zugrundeliegende Biochemie kann offensichtlich wesentlich different sein. Hierzu kann man nicht genug darauf hinweisen, dass es sich bei der urämischen, hypertrophen Kardiomyopathie um eine eigenständige Form der Kardiomyopathie handelt, zu der noch keine Daten bezüglich der Veränderungen der G-Proteine vorliegen.

Darüberhinaus beobachtete 2001 Yoshida et al bei der chronischen Herzinsuffizienz eine Abnahme der $G_{s\alpha}$ - und $G_{q\alpha}$ -Spiegel und eine Zunahme an $G_{i\alpha}$ (speziell $G_{i2\alpha}$, Owen et al 2001, Yoshida et al, 2001). Interessant hierbei auch das Ergebnis, dass in seinem Herzinsuffizienzmodell (Ratten) zwar eine $G_{s\alpha}$ -Abnahme bestand, jedoch das Narbengebiet (die HI wurde durch einen Myokardinfarkt mit 40%igem Gewebeuntergang simuliert) eine stark erhöhte $G_{s\alpha}$ - und in viel geringerem Maße auch eine erhöhte $G_{i\alpha}$ -Konzentration aufwies.

Die genaue Rolle der G_i -Proteine ist momentan noch schwer zu greifen. Während man durch die mehrheitlich beobachtete erhöhte G_i -Konzentration in Herzinsuffizienzmodellen das G_i -Protein mit der Desensibilisierung der β -AR, der myokardialen Hypertrophie, der myokardialen Dysfunktion und somit mit dem Fortschreiten der Krankheit assoziierte, zeigen neueste Daten ein anderes Bild. Jain konnte aufzeigen, dass in $G_{i2\alpha}$ - und $G_{i3\alpha}$ -deletierten transgenen Mäusen die echokardiographisch untersucht wurden, die Ejektionsfraktionsvermindierungen vergleichbar mit der von nicht G_i -deletierten Mäusen war (und somit nicht nachweisbar war). Ebenso war die baseline diastolische Funktion und die kontraktile Leistungsfähigkeit nicht unterschiedlich (Jain et al 2001).

In einer weiteren Studie von 1996 in kardiomyopathischen Hamstern (220-275 Krankheitstag) beobachtete Kaura eine Abnahme an β 1-AR, weniger der β 2. Die $G_{s\alpha}$ - und $G_{i\alpha}$ -Menge war erhöht (Immunoblotting), im Northern Blot war die mRNA-Menge beider Proteine erhöht in diesem Stadium der Herzinsuffizienz. Der Autor schloss hieraus, dass hier durch eine β 1-AR-Reduktion (und einer geringeren adrenergen Erregbarkeit) das G_s -Protein vermutlich von der katalytischen Seite der Adenylatcyclase der kardiomyocytären Membran abgekoppelt war und dadurch auch in dessen Bioaktivität kompensatorisch erhöht war, genau wie das $G_{i\alpha}$ (durch eine geringere β 2 AR Reduktion) ebenso reaktiv erhöht war (Kaura et al, 1996).

Wichtig erscheint also nicht nur die Art der Kardiomyopathie, sondern auch das Stadium der vorliegenden Erkrankung.

4.4 G-Proteine in der Hypertonie

Die SNX, ET A und ET AB Kollektive hatten im Rahmen der Urämie auch eine arterielle Hypertonie. Diese ist in der Urämie ein häufiges Begleitproblem und ist wohl auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Eine wichtige Rolle spielt die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems, aber auch die adrenerge Gegenregulation bei der sich entwickelnden Herzinsuffizienz/Kardiomyopathie spielt wohl eine Rolle. Außerdem auch andere endokrine Faktoren wie beispielsweise die vermehrte Endothelinfreisetzung, die zumindest bei sehr hohem Blutdruck bereits nachgewiesen werden konnte. Daher ist bei der Ergebnisinterpretation auch von Wichtigkeit, inwiefern kardiale G-Proteinveränderungen in der Hypertonie allein bekannt sind.

Michel untersuchte 1993 im Western Blot Herzmembranen von Ratten auf ihren Gehalt an $G_{s\alpha}$, $G_{i\alpha}$ und $G_{q\alpha}$ und G_{β} . Dabei verglich er verschiedene Hypertoniemodelle: spontan hypertone Ratten, altershypertone Ratten, eine gematchte Gruppe zwischen diesen Kollektiven und letztlich Ratten mit einer Niere (urämische Ratten, Ratten, deren eine Niere geklippt worden war) mit einem normotensivem Kollektiv. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich keiner der untersuchten G-Proteine dargestellt werden (Michel et al 1993).

Später jedoch konnte Ge zeigen, dass in seinem hypertonen Rattenmodell (Tiere mit einer geklippten Niere) die kardialen $G_{i3\alpha}$ - und $G_{i2\alpha}$ -mRNA und Proteinmengen

(Northern und Immunoblotting) erhöht waren, $G_{s\alpha}$ hingegen zeigte keine Veränderungen (Ge et al 1999). Diese Veränderungen waren reversibel nach ACE Hemmergabe (Captopril), was für eine Angiotensin II Involvierung in der renalen Hypertonie sprach.

Bohm zeigte, dass in seinem Rattenmodell (high salt intake) der entstehende Bluthochdruck mit einer kardialen Hypertrophie und einer Desensibilisierung der kardialen Adenylatcyclase und mit einer Erhöhung des myokardialen $G_{i\alpha}$ -Proteins einherging (Bohm et al 1993).

Li zeigte 2002, dass sich durch intraperitoneale Injektion von Pertussistoxin in spontan hypertensive Ratten der Blutdruck der Tiere signifikant verringerte, was sich in kardial verringerten $G_{i2\alpha}$ - und $G_{i3\alpha}$ -Proteinspiegeln (Immunoblotting und ADP Ribosylation) widerspiegelte. Die Autoren schließen daraus, dass hohe Gi-Proteinspiegel und cAMP-Spiegel eine wichtige Rolle in der Pathogenese der spontanen Hypertonie haben könnten (Li et al 2002).

Was die $G_{s\alpha}$ -Proteine in der essentiellen Hypertonie angeht, gibt es Hinweise dafür, dass ein genetischer Polymorphismus auf Exon 5 des GNAS Locus einen prädiktiven Wert bezüglich des Ansprechens der β -Blocker Therapie definieren kann (FokI+ und FokI-, Anwesenheit oder Abwesenheit des Restriktions-sites FokI). Gute Responder der β -Blocker Therapie haben signifikant höhere FokI+ Mengen (Jia et al 1999).

Auch wenn also in einigen Studien erhöhte Gi-Proteine möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der essentiellen und urämischen Hypertonie zugeschrieben wird, sind die vorliegenden Ergebnisse nicht konkordant zu den zitierten, sodaß der Einfluß der Hypertonie unwesentlich für die hier vorliegenden G-Proteinveränderungen zu sein scheint.

4.5 Endothelin

ET A-Rezeptoren werden für Vasokonstriktion und Zellproliferation, ET B-Rezeptoren für die ET-1 (ET-1 ist Gi abhängig)-Clearance, die Inhibierung endothelialer Zellaoptose und der ECE-1-Expression und für die Freisetzung von NO und Prostacyclin verantwortlich gemacht.

Die Rolle der Endotheline in der Kardiomyopathie wurde auch untersucht: Tonnessen fand 2000 in Endstadium-Patienten (CM) linksventrikulär erhöhte ET-1-Werte, jedoch keine erhöhten preproET-1-Werte (Tonnessen et al 2000). Eine

weitere Publikation von Seneri beschreibt eine selektive Hochregulation des kardialen Endothelin Systems in der ICM (n=20) Patienten, jedoch keine in der DCM (n=22) Patienten.

In beiden Gruppen konnte eine ET-1-Plasmawerterhöhung festgestellt werden, jedoch war das kardiale ET-1, das mRNA Level für preproET-1 und die ET A- und ET B-Rezeptorenanzahl jeweils höher für die ICM Gruppe, jeweils signifikant mit $p < 0,001$. PreproET-1 und ECE-1-mRNA konnte in den Myocyten, Endothel und Interstitiellen Zellen der ICM nachgewiesen werden, wohingegen sie in der DCM und nicht insuffizienter Herzen hauptsächlich in nicht-myocytären Zellen nachgewiesen werden konnten. ET A- und ET B-spezifische Rezeptorbindungen auf Myocyten und auf kardialen Membranen, positiv korrelierend mit der links-ventrikulären Ejektionsfraktion konnten vermehrt in der ICM Gruppe, nicht aber in der DCM Gruppe beobachtet werden. Generell also, wurden die Komponenten des ET-1-Systems, die prinzipiell in allen humanen Kardiomyocyten vorgefunden werden, selektiv in ICM Patienten hochreguliert, nicht aber in der DCM (Seneri et al 2000). Den Daten von Wolf zufolge, spielt das ET-System in der urämischen, hypertrophen DCM jedoch durchaus eine Rolle (reduzierte LVH bei ET AB Antagonisteneinsatz).

Huntington fand 1998 erhöhte Endothelin-1-mRNA-Werte bei herzinsuffizienten Hunden im Herzgewebe, außerdem erhöhte PreproET-1-mRNA Werte in der Lunge und im linken Ventrikel (jeweils im Gewebe). Die Tiere entwickelten eine pulmonale Hypertonie (von 16 bis 40mm Hg im Mittel) und der LVEDP (linksventrikuläre enddiastolische Druck) erhöhte sich durchschnittlich von 8 auf 34mm Hg. Nach der Behandlung mit einem ET A-Antagonisten (LU135252) verringerte sich die Druckerhöhung in der Lunge um 30% und im Herzen um 19%, jedoch änderte sich der preproET-1-mRNA-Spiegel nicht durch diese Behandlung im Herzen, wohl aber deutlich in der Lunge. Dies könnte für ein reduzierteres Ansprechverhalten von ET-Rezeptorantagonisten im Herzen (Huntington et al 1998) sprechen, relativ zu anderen Organen wie in der Lunge.

Nambi et al untersuchte 2001 die Rolle von ET A- und AB-Antagonisten in der Herzinsuffizienz. Er beobachtete, dass ET A- und ET AB-Rezeptorantagonisten für die Hämodynamik zum jetzigen Zeitpunkt ähnliche Ergebnisse zeigten. Besonders aber, könnte eine ET B-Rezeptorblockade -etwa über die Kalium und Wasserexkretion der Nieren und die Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie NO

und Prostacyclin- und die Verminderung der pulmonalen Hypertension indirekt positive Effekte auf die Herzfunktion ausüben. Über die Rolle der über ET B-Rezeptorblockade möglichen direkt kardialen Effekte wie die Inhibierung der Proliferation der glatten Muskelzellen, der progredienten Fibrose und der Vasokonstriktion ließe sich zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulieren (Nambi et al 2001).

Es bestehen Hinweise auf eine eventuell kardial geringere ET-Rezeptor-antagonistenwirkung als in anderen Organsystemen (Niere, Lunge). Diese Ergebnisse liessen sich also mit denen von Wolf in Einklang bringen, die mit den identischen Kollektiven beobachtet wurden. Möglicherweise sind die positiven kardialen Effekte (Hypertrophieverringern) auch nicht allein über eine Remodeling-Inhibition erklärbar, sondern auch über sekundäre Effekte (s.o.).

4.6 G-Proteine und Endothelin

Shraga et al veröffentlichte 2000 eine Studie über die Koppelung zwischen G-Proteinen und Endothelin. Unstimulierte ET A- und ET B-Rezeptoren koppelten an G_{α} -Proteine, der unstimulierte ET A-Rezeptor war zusätzlich noch über $G_{i3\alpha}$ gekoppelt, der ET B-Rezeptor bedeutend weniger, wohingegen der ET B-Rezeptor stärker über die α subunits des $G_{i1/2\alpha}$ -Proteins gekoppelt war, als der ET A-Rezeptor. Stimulierte ET B-Rezeptoren koppelten verstärkt an $G_{i3\alpha}$, der ET A-Rezeptor band verstärkt an $G_{q\alpha}/G_{11\alpha}$. Die Koppelung an $G_{i1/2\alpha}$ hingegen war bei beiden Rezeptorsubtypen ähnlich im stimulierten Zustand. So ist die Bindung der Endothelin Rezeptoren wohl letztlich stark Liganden-, Aktivitäts- und Rezeptor-Subtypenspezifisch (Shraga et al 2000).

Ähnliche Tendenzen sind auch anderen Artikeln zu entnehmen, so etwa dem von Masaki aus Molecular Cell Biochemistry, 1999. Er entdeckte, dass potentiell viele verschiedene G_{α} -Proteine (G_i , G_q , G_s und $G_{12/13\alpha}$) an die verschiedenen Endothelin-Rezeptoren binden. Jede Bindung resultiert in unterschiedlichen Signalkaskaden und bedingt unterschiedliche Antworten. Wobei es klar ist, dass ein gewisser Aktivierungsgrad des jeweiligen Proteins und ein intrazelluläres Mindestmaß an Protein hierfür vorhanden sein muß. Nicht klar sind jedoch wegen dieser Vielfalt an Möglichkeiten die genaue Rezeptor-Klassifikation und die Funktion der verschiedenen Signaltransduktionswege der ET-Rezeptoren über die verschiedenen G-Proteine

(Masaki et al 1999). Insbesondere, da zum einen der Effektunterschied der Endotheline auf die unterschiedlichen ET-Rezeptoren zurückzuführen ist, zum anderen auf die Aktivierung unterschiedlichster G-Proteine und somit auf die unterschiedlichsten Signaltransduktionskaskaden.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist es noch nicht gelungen, eine umfassende Darstellung hierüber abzulegen.

Schwierig zu beurteilen sind und bleiben zum jetzigen Zeitpunkt die genauen Zusammenhänge zwischen den Endothelinen und den verschiedenen G- Proteinen, ET-1 scheint seine Effekte hauptsächlich über Gi-Proteine zu vermitteln, an der ET-1-Regulation sind aber wohl auch andere Proteine aus der Familie der G- Proteine beteiligt. Zu der Klärung dieser Zusammenhänge, konnte mit dieser Studie leider nicht beigetragen werden.

4.7 G-Proteine in der myokardialen Zellapoptose

4.7.1 Gs Proteine und Zellapoptose

Bei der Interpretation ist es wichtig, sich diese untersuchten Kollektive (SNX, ET A und ET AB) nochmals vor Augen zu führen. Es handelt sich hierbei jeweils um insuffiziente, urämische, hypertrophe, kardiomyopathische DCM Situationen. Wie oben im Schaubild zum Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz dargelegt, kommt es zur adrenergen Gegenregulation der Herzschwäche, also zu einer verstärkten Aktivierung von β -Adrenorezeptoren. Außerdem kommt es strukturell zu Veränderungen wie, am wichtigsten für das Herz, zu einer interstitiellen Fibrose und zu einem apoptotischen Untergang von Herzmuskelzellen (Mall et al 1988). Außerdem wird neueren Studien zufolge bei der Progredienz der Herzinsuffizienz (HI) der Apoptose, das heißt dem Herzmuskelgewebsuntergang, eine Schlüsselrolle zugesprochen. Norepinephrin (NE; auch über ET stimuliert), das bei der HI vermehrt im Rahmen der adrenergen Gegenregulation an die kardialen β 1-AR koppelt, besitzt über Verapamil-sensitive Ca^2 Kanäle und die Proteinkinase A (PKA) eine ausgeprägte Zytotoxizität (Mann et al 1992, Shizukuda et al 1998) und führt zum apoptotischen Verlust von kontraktilen Herzwesen.

Singh et al veröffentlichte 2000 einen interessanten Artikel über die adrenerge Regulation der myokardialen Apoptose. In der Herzinsuffizienz beobachtete er eine erhöhte Norepinephrin-Aktivität (Katecholaminaktivität) über α - und β -

Adrenorezeptoren (AR), die an G-Protein Rezeptoren koppeln. Er beschrieb einen Zusammenhang zwischen erhöhten Gs α - Konzentrationen und erhöhter Apoptoserate.

Er beschrieb β 1-AR überexprimierende Mäuse mit der Entwicklung der myokardialen Hypertrophie und verstärkter Kontraktilität nach 9 Monaten, β 2-überexprimierende Mäuse waren ähnlich, entwickelten aber nach 4 Monaten noch keine Hypertrophie. Gs α -überexprimierende Mäuse hingegen entwickelten nach 16 Monaten eine Myokarddegeneration und Atrophie. Zuvor entwickelten sie eine Hypertrophie und eine ausgeprägte Fibrose nach apoptotischem Herzmuskelverlust, Kammerdilatationen und reduzierte Ejektionsfraktionen, was mit einer erhöhten Mortalität einherging (Iwase et al 1996 und 1997). Ebenso bestanden elektronenmikroskopisch abnormale Myocytennuclei mit Chromatinkondensation, irreguläre Zellmembranen und die Formation von Vakuolen (Geng et al 1999). Also muß man rückschließen, dass eine exzessive Aktivierung von Gs α pathophysiologisch einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung der CM zugeschrieben werden könnte, und zwar über eine ausgeprägte Apoptose und die Entwicklung einer Myokardfibrose.

Adams et al 2001 konnte keinen direkten Zusammenhang zwischen G-Proteinen und der Myokardhypertrophie nachweisen: Hypertrophie-Effekte durch Norepinephrin wurden über Gq α -adrenerge-Rezeptoren (über die Phospholipase C und Calcineurin abhängige und unabhängige Wege) vermittelt. Ebenso aber auch über Endothelin, Prostaglandin F 2 α und Angiotensin II (Mende et al, 1998). Keine direkten Hypertrophie-Effekte wurden über Gs- oder Gi- Rezeptoren beobachtet. Jedoch bewirkte die Gs- und Gq-Aktivierung in vivo und in vitro einen apoptotischen Verlust an Kardiomyocyten.

In in vitro Studien an Kardiomyocyten stimulierten β -AR die Apoptoserate (Shizukuda et al 1998). Außerdem war in transgenen Mäusen mit einer Überexpression von β 1-AR oder Gs α eine eindeutige Assoziation mit der myocytären Apoptose und der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie nachweisbar (Milano et al 1994). Hingegen scheint der β 2-AR (über Gi α) sowohl die Stimulation als auch die Inhibierung der Apoptoserate beeinflussen zu können, abhängig vom Grad der Expression (Singh et al 2000).

Sethi untersuchte 1998 die Gs α - und Gi α -Proteine 4, 8 und 16 Wochen nach Myokardinfarkt (Muskelzelluntergang) bei Ratten: hier konnte eine signifikante Ver-

mehrung der G_{α} -mRNA in allen linken Ventrikeln nach 8 Wochen nach Koronararterienokklusion nachgewiesen werden, jedoch auch eine Vermehrung der $G_{i\alpha}$ -mRNA in allen Ventrikeln (Sethi et al 1998). Die höchsten G_{α} -Konzentrationen konnten in den intersarkolemmalen discs, außerdem im Sarkolemm, den T-Tubuli, im sarkoplasmalem Retikulum und im Myoplasma gefunden werden (Nash et al, 1996).

Diese Daten zeigen, dass vermutlich in dem vorliegenden Stadium der hypertrophen DCM der hier analysierten SNX, ET A und ET AB Tiere eine ausgeprägte adrenerge Stimulation über β -AR vorliegen könnte, mit einhergehendem Zelluntergang, was die stark erhöhten G_{α} -Werte erklären würde. Zusätzlich zeigen die vorherigen Untersuchungen an diesen Kollektiven strukturelle Veränderungen mit LV-Hypertrophie, die einen Umbau des Herzgewebes aufzeigen und eine adrenerge Gegenregulation zum Teilerhalt der Inotropie nahelegen. Hierbei könnte also ET über etwa $G_{q\alpha}$ und Norepinephrin (NE) zur indirekten Hypertrophie des Herzgewebes geführt haben, und letztlich zu einer NE-stimulierten Apoptose, in der bereits stark erhöhte G_{α} -Mengen nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise hätten diese Tiere medikamentös eher von einem β -AR Antagonisten wie Isoproterenol profitiert als von ET Antagonisten.

4.7.2 Gi Proteine in der myokardialen Zellapoptose

Die unveränderte Menge an $G_{i1/2\alpha}$ -Proteinen und dessen RNA verwundert weniger als die erniedrigt nachweisbare Menge an $G_{i3\alpha}$, da die Datenlage (wie etwa bei Brodde) mehrheitlich erhöhte Gi-Mengen in Herzinsuffizienzmodellen nachweist. Lange Zeit assoziierte man dann die erhöht nachweisbaren Gi-Werte mit der Progredienz der HI, da diese im Endstadium der CM stark erhöht nachweisbar waren. Nichtsdestotrotz zeigen neuere Daten wie etwa die von Jain 2001, dass erhöhte Gi-Werte nicht mit erniedrigten Ejektionsfraktionen oder einer verringerten kontraktilen oder diastolischen Leistungsfähigkeit einhergingen. Dies legt nahe, dass das Gi-Protein in der CM andere Funktionen haben könnte, die eher indirekt zur Progredienz der HI beitragen. Rezeptoren, die an Gi oder Gq koppeln, haben wohl einen Einfluss auf die Modulation der Apoptoserate und somit auch auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, was eine Interaktion zwischen dem β -AR System und vielfältigen Remodeling-Stimuli nahelegt, die über Gi und Gq Signalwege vonstatten gehen.

Interessant erscheinen in dieser Hinsicht zwei Arbeiten von Communal 1998 und 2000 über die Rolle von Gi in der über NE (Norepinephrin)- und Adrenorezeptoren-stimulierte Apoptose in der Herzinsuffizienz. Interessanterweise potenzierte der β 2-AR Antagonist die Norepinephrin-stimulierte Apoptose (über cAMP (cyclische Adenomyosinphosphatase) und die MAP Kinase p38, JNKs (c-jun N terminal kinases) und über ERK1 und 2) genauso wie die Vorbehandlung der Zellen mit PTX (Pertussistoxin), (Communal et al 1998). Ebenso verringerte sich die β -AR vermittelte Apoptose (auch über p38) mit der Vorbehandlung der Zellen mit Carbachol, einem Gi-Aktivator über M2 muscarinische Rezeptoren, was eine protektive Rolle von Gi nahelegt.

Die β 1-AR vermittelte NE Toxizität wiederum geht vonstatten über die Aktivierung von Gs-Proteinen, der Adenylatcyclase und cAMP, wohingegen die Erregung der β 2-AR, die β 1-Effekte antagonisierend, über Gi-Proteine und unabhängig von Gs und cAMP vonstatten geht (Xiao et al 1999).

Somit besteht über Gi-Proteine eine gewisse Apoptoseinhibition/Protektion (Communal et al 2000). Diese Studie bestätigt eine frühere von Communal 1998, in der bereits in vitro bei ventrikulären Rattenmyocyten die positiven Effekte von Gi auf die Progredienz der Zellapoptose beschrieben wurden (Communal et al 1998).

4.8 Zusammenfassung

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: Legt man nun diese neueren Erkenntnisse zugrunde, könnten die vorliegenden Ergebnisse, d.h. verringerte Gi_3 -Werte, einen verringerten Apoptoseschutz reflektieren, wobei das $Gi_{1/2\alpha}$ hierbei nicht miteinbezogen wäre. Das erhöht nachweisbare $G_s\alpha$ könnte also für eine erhöhte adrenerge Stimulation (über ET, β 1 und NE) sprechen, mit konsekutiver Apoptose der Myocyten. Da die SNX, ET A und ET AB Tiere alle kardiomyopathisch waren, ist außerdem von einer adrenergen Stimulation auszugehen (siehe Circulus vitiosus Schema). Dies könnte für eine besonders ungünstige CM Situation in den hier untersuchten Kollektiven sprechen.

Außerdem bestehen Hinweise dafür, dass ET-Antagonisten am Herzen zum einen keine vollständige Reversibilität der Hypertrophie bewirken können, die beobachteten positiven antihypertrophen Effekte (des ET AB-Antagonisten), aber vermutlich auch über zusätzliche, sekundäre Mechanismen (NO etc) bedingt sind, und nicht allein

über eine Remodelinginhibition. Zusätzlich kann nach den bislang vorliegenden Daten kein Hinweis dafür gesehen werden, dass die Veränderungen im Rahmen der urämischen Hypertonie erklärbar sind. Ebenso wenig ist die Datenlage über die Endotheline in der Urämie, was die Veränderungen der G-Proteine angeht, erklärend für die vorliegenden Resultate. Dafür sind die verschiedenartigen Wirkungsweisen der Endotheline auf molekularer Ebene noch zu unbekannt.

Wichtig erscheint es aber zu betonen, dass es sich bei der urämischen, hypertrophen Kardiomyopathie um ein eigenständiges Krankheitsbild zu handeln scheint, welches von den bekannteren ICM und DCM Formen different bezüglich der molekularen Grundlagen ist. Dies bedeutet, dass die Ergebnisse auch als molekulare Basis der hier vorliegenden urämischen, hypertrophen DCM interpretierbar sein könnten bzw. stadiumsspezifisch für das vorliegende jeweilige urämische DCM-Stadium sein könnten. Weitere Untersuchungen wären hilfreich, um die Gründe dieser interessanten Veränderungen weiter zu illustrieren.

Literaturverzeichnis

Adams JW, Brown JH: G Proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart. *Oncogene* 2001 Mar 26, 20 (13): 1626-1634

Amann K, Wiest G, Zimmer G, Gretz N, Ritz E, Mall G: Reduced capillary density in the myocardium of uremic rats. A stereological study. *Kidney Int* 1992, 42: 1111-1117

Amann K, Wolf B, Törnig J, Nichols C, Mall G, Ritz E: Blood pressure independent increase of vessel volume in uremia – hyperplasia or hypertrophy? *J Am Soc Nephrol* 1995, 6: 1008-1020

Amann K, Ritz E: Cardiac structure and function in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 1996, 5: 102-106

Amico JA, Clarke MR, Watson CG, Kim NB, Bonomi PL, Crowley RS, Horowitz MJ: Endothelin 1 gene expression in human pheochromocytoma. *J Lab Clin Med* 1993, 122:667-672

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkub H, Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA Encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990, 348: 730-732

Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T: Endothelin 1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 1995, 268: H2084-H2091

Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC: Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* 1989, 83: 336-342

Batra KV, McNeill JR, Xu Y, Wilson TW, Gopalkrishnan V : ET B receptors on aortic smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1993, 264: C479-C484

Benigni A, Perico N, Gaspari F et al: Increased renal endothelin production in rats with reduced renal mass. *Am J Physiol* 1991, 260: F331-339

Bethesda: US Renal Data Registry: Causes of death. Annual Data Report. The National Institute of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 1995, 14: 79-90

Black PN, Gatei MA, Takahashi K, Bretherton-Watt D, Krausz T, Dollery CT, Bloom SR: Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. *FEBS Lett* 1989, 255: 129-132

Bohm M, Gierschik P, Knorr A, Schmidt U, Weismann K, Erdmann E: Cardiac adenylyl cyclase, beta-adrenergic receptors, and G proteins in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 1993, 22(5): 715-727

Boulanger C, Lüscher TF: Release of endotheline from the porcine aorta: inhibition by endothelium derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990, 85: 587-590

Brochu E, Lacasse-M S, Lariviere R, Kingma I, Grose JH, Lebel M: Differential effects of endothelin 1 antagonists on erythropoietin-induced hypertension in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10(7): 1440-1446

Brodde OE: Beta adrenergic receptors in failing human myocardium. *Basic Res Cardiol* 1996, 91 Suppl: 235-240

Brodde OE, Vogelsang M, Broede A, Michel-Reher M, Beisenbusch-Schafer E, Hakim K, Zerkowski HR: Diminished responsiveness of Gs coupled receptors in severely failing human hearts: no difference in dilated versus ischemic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998 Apr, 31(4): 585-594

Clavell AL, Mattingly MT, Stevens TL, Nir A, Wright S, Aarhus LL, Heublein DM, Burnett J: Angiotensin converting enzyme inhibition modulates endogenous endothelin in chronic canine thoracic inferior vena caval constriction. *J Clin Invest* 1996, 97: 1286-1292

Clozel M: Endothelin sensitivity and receptor binding in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1989, 17: 913-917

Communal C, Singh K, Colucci WS: Gi protein protects adult rat ventricular myocytes from beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in vitro. *Circulation* 1998, 98: 1742

Communal C, Colucci WS, Singh K: p38 mitogen activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi dependent activation. *J Biol Chem* 2000 Jan 23, 275(25): 19395-400

Cozza EN, Chiou S, Gomez Sanchez CE: Endothelin 1 potentiation of angiotensin II stimulation of aldosterone production. *Am J Physiol* 1992, 262: R85-R89

Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Löffler BM, Burri K, Cassal JM, Hirth G, Müller M, Neidhart W, Ramuz H: Pharmacological characterizations of Bosentan, a new potent orally active nonpeptide Endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, 270: 228-235

Deng LY, DeneH, Pravenec M, Rapp JP: Genetic mapping of two new blood pressure quantitative trait loci in the rat by genotyping endothelin system genes. *J Clin Invest* 1994, 93: 2701-2709

Dohi Y, Lüscher TF: Endothelin 1 in hypertensive resistance arteries. Intraluminal and extraluminal dysfunction. *Hypertension* 1991, 18: 543-549

Dohi Y, Hahn AWA, Boulanger CM, Bühler FR, Lüscher TF: Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 1992, 19: 131-137

Dunnett, CW: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Amer Stat Assoc* 50 1955, 50: 1096-1121

Dunnett, CW: New tables for a multiple comparison with a control. *Biometrics* 1964, 20: 482-491

Emori T, Hirata Y, Imai T, Ohta K, Kanno K: Cellular mechanisms of thrombin on endothelin 1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol* 1992, 264: 14954-14959

Emori T, Hirata Y, Imai T, Eguchi S, Kanno K, Marumo F: Cellular mechanism of natriuretic peptides-induced inhibition of endothelin 1 biosynthesis in rat endothelial cells. *Endocrinology* 1993, 133: 2474-2480

Florijn KW, Derkx FHM, Visser W, Hofman HJA, Rosmalen FMA, Wallenburg HCS, Schalekamp MADH: Elevated plasma levels of endothelin in pre eclampsia. *J Hypertens* 1991, 9: S166-S167

Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent K, Barre PE: Cardiac structure and function in patients starting end stage renal disease therapy: prevalence and prognosis. Abstract. *J AM Soc Nephrol* 1993, 4:345

Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennett T: The effects of phosphoramidon on the regional haemodynamic responses to human proendothelin (1-38) in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1991, 103: 2009-2015

Ge C, Garcia R, Anand-Srivastava MB: Altered expression of Gi protein and adenylyl cyclase activity in hearts from one kidney one clipped hypertensive rats: effect of captopril. *J Hypertens* 1999 Nov, 17(11): 1617-1626

Geng YJ, Ishikawa Y, Vatner DE et al : Apoptosis in cardiac myocytes in Gs alpha transgenic mice. *Circ Res* 1999, 84 : 34-42

Gilman AG: G Proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep* 1995, 15: 65-97

Goto K, Kasuya Y, Matsuki N, Takuwa Y, Kurihara H : Endotheline activates the dihydropyridine sensitive, voltage dependent Ca² channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86 : 3915-3918

Hepler JR, Gilman AG : G proteins. *TIBS* 1992, 17:383-387

Hickey KA, Rubanyi GM, Paul RJ, Highsmith RF : Characterization of a coronary vasoconstriction produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1985, 248: C550-C556

Hofer B, Thöne-Reinecke C, Schleuning WD, Bauer C, Distler A, Theuring F: Glomerulosclerosis and myocardial hypertrophy in endothelin 1 transgenic mice. *Kidney Blood Press Res* 1996, 19:60

Huntington K, Picard P, Moe G, Stewart DJ, Albernaz A, Monge JC: Increased cardiac and pulmonary endothelin 1 mRNA expression in canine pacing-induced heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998, 31 Suppl 1S424-426

Huting J, Alpert MA: Progression of left ventricular hypertrophy in end-stage renal disease treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis depends on hypertension and hypercirculation. *Clin Cardiol* 1992a, 15: 190-196

Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F: Induction of endothelin 1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992, 19:753-757

Imai T, Hirata Y, Emori T, Marumo F: Heparin has an inhibitory effect on endothelin 1 synthesis and release by endothelial cells. *Hypertension* 1993, 21: 353-358

Iwase M, Bishop SP, Uechi M et al: Adverse effects of chronic endogenous sympathetic drive induced by cardiac Gs alpha overexpression. *Circ Res* 1996, 78: 517-524

Iwase M, Uechi M, Vatner DE et al: Cardiomyopathy induced by cardiac Gs alpha overexpression. *Am J Physiol* 1997, 272: H585-H589

Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M: Endothelin 1 is an autocrine paracrine factor in the mechanism of angiotensin II induced hypertrophy in cultured rat myocytes. *J Clin Invest* 1993, 92: 398-403

Jain M, Lim CC, Nagata K, Davis VM, Milstone DS, Liao R, Mortensen RM: Targeted inactivation of Galphai does not alter cardiac function or beta adrenergic sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 Feb, 280(2): H569-575

Jia H, Hingorani AD, Sharma P, Hopper R, Dickerson C, Trutwein D, Lloyd DD, Brown MJ: Association of the G(s)alpha gene with essential hypertension and response to beta-blockade. *Hypertension* 1999, 34(1): 8-14

Jones LG, Rozich JD, Tsutsui H, Cooper G 4th: Endothelin stimulates multiple responses in isolated adult ventricular cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1992, 263 (5 Pt 2): H1447-1454

Kähler J, Baldus S, v. Varendorff T, Köster R, Terres W, Hamm CW, Meinertz T: Captopril reduces endothelin 1 release from human umbilical vein endothelial cells by reduction of endothelin II synthesis. *J Am Coll Cardiol* 1996, 27: 104A

Kähler J, Köster R, Paul M, Hamm CW, Meinertz T: Endotheline bei kardiovaskulären Erkrankungen. *Z Kardiol* 1997, 86:406-416

Kaufmann H, Oribe E, Oliver JA: Plasma endothelin during upright tilt: Relevance for orthostatic hypotension? *Lancet* 1991, 338: 1542-1545

Kaura D, Takeda N, Sethi R, Wang X, Nagano M, Dhalla NS: Beta adrenoreceptor mediated signal transduction in congestive heart failure in cardiomyopathic (UM-X7.1) hamsters. *Mol Cell Biochem* 1996 Apr 12-26, 157(1-2): 191-196

Kido T, Sawamura T, Hoshikawa H, D'Orleans Juste P, Denault JB et al: Processing of proendothelin 1 at the C-terminus of big endothelin 1 is essential for proteolysis by endothelin converting enzyme 1 in vivo. *Eur J Biochem* 1997, 244: 520-526

Kiowski W, Sütsch G, Hunzker P, Müller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O: Evidence for endothelin 1 mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995, 346: 732-736

Kohno M, Yasumari K, Murakawa KI, Yokokawa K, Horio T, Fukui T, Takeda T: Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J Med* 1990, 88: 614-618

Kojima M, Kusumoto K, Fujiwara S, Watanabe T, Fujino M: Role of endogenous endothelin in the extension of myocardial infarct size studied with the endothelin receptor antagonist, TAK-044. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, 26: S365-S368

Krum H, Gu A, Wilshire CM, Sackner BJ, Goldsmith R et al: Changes in plasma endothelin 1 levels reflect clinical response to beta blockade in chronic heart failure. *Am Heart J* 1996, 131:337-341

Levin ER: Endothelins. *N Engl J Med* 1995, 333:356-363

Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr: Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991, 325: 997-1001

Li Y, Anand-Srivastava MB: Inactivation of enhanced expression of G(i) proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 2002, 91(3): 247-254

Lüscher TF, Oemar BS, Boulanger CM, Hahn AWA: Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors. *J Hypertens* 1993, 11:7-11

Lüscher TF, Barton M: Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations of a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000, 102(19): 2434-2440

Maemura K, Kurihara H, Morita T, Hayashi Y, Yazaki Y: Production of endothelin 1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology* 1992, 38 (Suppl 1): 29-35

Mall G, Rambašek M, Neumeister A, Kollmar S, Vetterlein F, Ritz E: Myocardial interstitial fibrosis in experimental uremia. Implications for cardiac compliance. *Kidney Int* 1988, 33: 804-811

Mall G, Huther W, Schneider J, Lundin P, Ritz E: Diffuse intercardiomyocytic fibrosis in uremic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1990, 5: 39-44

Mann DL, Kent RL, Parson B, Cooper IV G: Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* 1992, 85: 790-804

Marsden PA, Brenner BM: Transcriptional regulation of the endothelin gene by TNF alpha. *Am J Physiol* 1992, 262: C854-C861

- Masaki T, Ninomiya H, Sakamoto A, Okamoto Y: Structural basis of the function of endothelin receptor. *Mol Cell Biochem* 1999 Jan, 190(1-2): 153-156
- Matsumara Y, Hisaki K, Takaoka M, Morimoto S: Phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big endothelin 1. *Eur J Pharmacol* 1990, 185: 103-106
- Mende U, Kagen A, Cohen A, Aramburu J, Schoen FJ, Neer EJ: Transient cardiac expression of constitutively active Galphaq leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin dependent and independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 13893-13898
- Michel MC, Brodde OE, Insel PA: Are cardiac G-proteins altered in rat models of hypertension? *Hypertens* 1993 Apr, 11(4): 355-363
- Milano CA, Dolber PC, Rockman HA et al: Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 10109-10113
- Miller RC, Pelton JT, Huggins JP: Endothelins – from receptors to medicine. *Trends Pharmacol Sci* 1993, 14: 54-60
- Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yana M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K : Contribution of endogenous endothelin 1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993, 73 : 887-897
- Miyauchi T, Masaki T: Pathophysiology of the Endothelin in the Cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999, 61: 391-415
- Müller S, Lohse MJ: The role of beta7gamma subunits in signal transduction. *Biochem Soc Trans* 1995, 23: 141-148
- Nabokov A, Amann K, Wagner J, Gehlen F, Muentner K, Ritz E: Influence of specific and non specific endothelin receptor antagonists on renal morphology in rats with surgical renal ablation. *Nephrol Dial Transplant* 1996, 11: 514-520
- Nakamichi K, Ihara M, Kobayashi M, Saeki T, Ishikawa K, Yano M: Different distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary tissues revealed by the novel selective ligands BQ-123 and (Ala^{1,3,11,15})ET-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Jan 15, 182(1): 144-150
- Nambi P, Pullen M, Contino LC, Brooks DP: Upregulation of renal endothelin receptors in rats with cyclosporine A induced nephrotoxicity. *Eur J Pharmacol* 1990, 187: 113-116
- Nambi P, Clozel M, Feuerstein G: Endothelin and heart failure. *Heart Fail Rev* 2001 Dec, 6(4): 335-340

Nash JA, Hammond HK, Saffitz JE: Subcellular compartmentalization of Gs alpha in cardiac myocytes and its redistribution in heart failure. *Am J Physiol* 1996 Dec, 271(6 Pt 2): H2209-2217

Neubauer S, Zimmermann S, Hirsch A, Pulzer F, Tian R, Bauer W, Bauer B, Ertl G: Effects of endothelin 1 in the isolated heart in ischemia/reperfusion and hypoxia/reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 1991, 223: 1397-1409

Ohta K, Hirata Y, Shichiri M: Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease. *Kidney Int* 1991, 39: 307-311

Owen VJ, Burton PB, Mullen AJ, Birks EJ, Barton P, Yacoub MH. Expression of RGS3, RGS4 and Gi alpha 2 in acutely failing donor hearts and end stage heart failure. *Eur Heart J* 2001 Jun, 22 (12): 1015-1020

Pacher R, Bergler-Klein J, Globits S, Teufelsbauer H, Schuller M, Krauter A, Ogris E, Rödler S, Wutte M, Hartter E: Plasma big endothelin 1 concentration in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension. *Hypertension* 1993, 71: 1293-1299

Pacher R, Stanek B, Hülsman M, Koller-Strametz J, Berger R, Schuller M, Hartter E, Ogris E, Frey B, Heinz G, Maurer G: Prognostic impact of big-endothelin 1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996, 27: 633-641

Parfrey PS, Harnett JD, Griffiths SM: The clinical course of left ventricular hypertrophy in dialysis patients. *Nephron* 55, 1990: 114-120

Paul M, Zintz M, Böcker W, Dyer M: Characterization and functional analysis of the rat endothelin 1 promoter. *Hypertension* 1995, 25: 683-687

Pieske B, Hasenfuss G: Pathophysiological basis of heart failure. *Ther Umsch* 2000 May, 57 (5): 284-292

Prins BA, Hu RM, Nazario B, Pedram A, Frank HJ, Weber MA, Levin ER: Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1994, 269: 11938-11944

Rambašek M, Ritz E, Mall G, Mehls O, Katus H: Myocardial hypertrophy in rats with renal insufficiency. *Kidney int.* 1985 Nov, 28(5): 775-782

Ruiz-Ortega M, Gomez-Garre D, Liu XH, Blanco J, Largo R, Egido J: Quinapril decreases renal endothelin 1 expression and synthesis in a normotensive model of immune-complex nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1997 May, 8(5): 756-768

Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y: Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996, 384: 353-355

Sawamura T, Kimura S, Shinmi O, Sugita Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T: Characterization of endothelin converting enzyme activities in

soluble fraction of bovine cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 169: 1138-1144

Sernerri GG, Cecioni I, Vanni S, Paniccia R, Bandinelli B, Vetere A, Janming X, Bertolozzi I, Boddi M, Lisi GF, Sani G, Modesti PA: Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy: endothelin 1 system in the human failing heart. *Circ Res* 2000 Mar 3, 84(4): 377-385

Sethi R, Elimban V, Chapman D, Dixon IM, Dhalla NS: Differential alterations in left and right ventricular G Proteins in congestive heart failure due to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1998 Nov, 30(11): 2153-2163

Shichiri M, Hirata Y, Ando K, Emori T, Ohta K, Kimoto S, Ogura M, Inoue A, Marumo F: Plasma levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension* 1990, 15: 493-496

Shizukuda Y, Buttrick PM, Geenen DL et al: Beta adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy. *Am J Physiol* 1998, 98: 1329-1334

Shraga-Levine Z, Sokolowsky M: Functional coupling of G proteins to endothelin receptors is ligand and receptor subtype specific. *Cell Mol Neurobiol* 2000 Jun, 20(3): 305-317

Silverberg JS, Barre PR, Prichard SS, Sniderman AD: Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end stage renal disease, *Kidney Int* 1989, 366: 286-290

Simonson MS, Dunn MJ : Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FEBS Lett* 1990, 247: 68-72

Singh K, Communal C, Sawyer DB, Colucci WS: Adrenergic regulation of myocardial apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000 Feb, 45(3): 713-719

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* 1996, 27: 49-55

Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D: Increased plasma endothelin 1 in pulmonary hypertension: Marker of mediator of disease? *Ann Int Med* 1991, 114: 464-469

Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P: Increased plasma endothelin 1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991, 18: 38-43

Stewart DJ, Cernacek P, Costello FB, Rouleau JL: Elevated endothelin 1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992, 85: 510-517

Takuwa Y, Kasuya Y, Takuwa N, Kudo M, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Yamashita K: Endothelin receptor is coupled to Phospholipase C via a pertussis toxin insensitive G protein in VSMC. *J Clin Invest* 1990, 85: 653-658

Tonnessen T, Lyberg T, Geiran O, Christensen G: Cardiac endothelin like immunoreactivity and preproendothelin 1 mRNA expression in human heart failure. *Scand Cardiovasc J* 2000, 34(1): 21-27

Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A: Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats. *Circ Res* 1991, 69: 370-377

Weber KT, Sun Y, Guarda E: Structural remodeling in hypertensive heart disease and the role of hormones. *Hypertension* 1994, 23: 869-877

Widemsky JJR, Horky K, Dvorakova J: Plasma endothelin 1, 2 levels in mild and severe hypertension. *J Hypertens* 1991, 9:S194-S195

Wolf SC, Brehm BR, Gaschler F, Brehm S, Klaussner M, Smykowski J, Amann K, Osswald H, Erley CM, Risler T: Protective effects of endothelin antagonists in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14Suppl 4: 29-30

Wolf SC, Gaschler F, Brehm S, Klaussner M, Amann K, Risler T, Brehm BR: Endothelin receptor antagonists in uremic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 Nov; 36 (5 Suppl1): 348-350

Wu J, Garami M, Cheng T, Gardner DG: 1,25 OH₂ Vitamin D₃ and retinoic acid antagonize endothelin stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1996, 97: 1577-1588

Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Lakatta EG: Coupling of beta 2 adrenoreceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* 1999 Jan 8-22, 84(1): 43-52

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988, 332: 411-415

Yasuda M, Kohne M, Tahara A, Itagane H, Toda I, Akioka K, Teragaki M, Oku H, Takeuchi K, Takeda T: Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1990, 119: 801-806

Yoshida H, Takahashi M, Tamonaka K, Maki T, Nasa Y, Takeo S: Effects of ACE Inhibition and angiotensin II type receptor blockade on cardiac function and G Proteins in rats with chronic heart failure. *Br J Pharmacol* 2001 Sep, 134(1): 150-160

Zeiber AM, Ihling C, Pistorius K, Schächinger V, Schaefer HE: Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes. *Lancet* 1994, 344: 1405-1406

Danksagung

Diese Dissertation wurde angefertigt in der Medizinischen Klinik, Abteilung III für Innere Medizin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. T. Risler in der Zeit vom Februar 1999 bis Februar 2001.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. T. Risler für die Bereitstellung des Themas und die jederzeit problemlose und freundliche Begleitung während meiner Tätigkeit.

Ebenso will ich besonders Frau Dr. S. Wolf und Herrn PD Dr. B. Brehm für die besonders engagierte und tatkräftige Unterstützung, fachkundige Beratung und die immerwährende Ansprechbarkeit und Problemlösung während dieses Projektes danken.

Weiterhin im speziellen Frau Dr. M. Klaußner für die äußerst profunde Einarbeitung bei den diversen Methoden/Etablierungen in die molekularbiologische Materie und ihre immerwährende und motivierende positive Art und ihren Humor.

Des Weiteren Herrn Vonthein aus dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung IMI für die freundliche Beratung zwecks der statistischen Auswertung der Daten.

Außerdem noch Frau A. Raiser und Frau J. Smykowski aus dem Nephrologischen Labor für die menschliche Begleitung.

Meinen Mitdoktoranden Herrn C. Brodbeck, Herrn T. Amann und Herrn J. Freudenberg.

Natürlich meinen unkomplizierten, stets motivierenden und liebevollen Eltern und Schwiegereltern und meiner Familie, ohne die dieses Studium gar nicht erst möglich gewesen wäre, und die mir stets ein angenehmes, konstruktives Umfeld für meine Arbeit gegeben haben.

Und ganz besonders meiner wunderbaren Frau Elena, die auch keine Möglichkeit auslässt, mein Leben und meine Arbeit in jeglicher Hinsicht mit Sinn und Schönheit und Freude zu füllen.

LEBENS LAUF

Benjamin Wiesinger

Geboren am 8.10.1974 in Ravensburg als Sohn von Dr. Christofer Wiesinger, Dipl. Psychologe und Raffaella Wiesinger-Pontevia, Dipl. Übersetzerin.

Verheiratet seit dem 20.7.2001 mit Elena Conti-Wiesinger, geboren am 18.03.1975 in Rom, tätig als Kinderbuchillustratorin.

SCHULE UND STUDIUM

- Grundschule von 1981 bis 1982 in der Neuwiesengrundschule Ravensburg, von 1982 bis 1985 nach Umzug bis zum Ende des 4. Schuljahres in Bad Säckingen.
- Gymnasium von 1985 bis zum Abitur 1994 am Naturwissenschaftlichen Scheffelgymnasium Bad Säckingen
- Nach dem Abitur von Oktober 1994 bis Februar 1995 Absolvierung des Krankenpflegepraktikums im Kreiskrankenhaus Bad Säckingen.
- Im April 1995 Aufnahme des Medizinstudiums in Tübingen, Physikum im Sommer 1997, 1. Staatsexamen im Sommer 1998, 2. Staatsexamen im Sommer 2000.
- Während des Studiums Absolvierung der Famulaturen, insgesamt 4 Monate, jeweils zu einem Monat in der Inneren Medizin (KKH Bad Säckingen), in der Pädiatrie (UKT Tübingen), in der Chirurgie (UKT Tübingen) und in der Hämatologisch-Nuklearmedizinischen Praxis Dr. med. Haen in Tübingen.
- Praktisches Jahr vom Oktober 2000 bis September 2001 am Universitätsklinikum Tübingen, chronologisch in der Inneren Medizin, dann in der Chirurgie und zuletzt in der Radiologischen Diagnostik.
- Doktorarbeit in der Inneren Medizin über die Molekulare Signaltransduktion bei urämischer Kardiomyopathie. Diese Doktorarbeit wurde vom IZKF (Interdisziplinäres Klinisches Forschungszentrum) gefördert durch ein erfolgreich beantragtes halbjähriges Stipendium für die projektbezogene Laborarbeit.
- Absolvierte Famulaturen in der Inneren Medizin, der Chirurgie, der Pädiatrie und in der Hämatologie und Nuklearmedizin.
- 3. Staatsexamen am 20. November 2001.
- Ab dem 1.1.2002 tätig als Arzt im Praktikum in der Radiologischen Abteilung der Universitätsklinik in Tübingen.

AUSSERSCHULISCHE/-UNIVERSITÄRE BESCHÄFTIGUNGEN

- Drei Jahre Judoport 1983-86.
- Von 1987 an Radrennsport.
- 1989-1993 aktiver Radrennsport in der Junioren- und Amateurklasse RSV Bad Säckingen, aktuell noch als Freizeitbeschäftigung.