

MYOKARDIALE REZEPTORSYSTEME UND IHRE VERÄNDERUNGEN
IM MONOCROTALIN-RATTEN-MODELL DER
RECHTSHERZHYPERTROPHIE UND -INSUFFIZIENZ

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(Mathematisch-Naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Torsten Seyfarth
geb. am: 14.07.1973 in Gera

Gutachterin bzw. Gutachter

1. Prof. Dr. H. Schröder
2. Prof. Dr. O.-E. Brodde
3. Prof. Dr. J. Holtz

Halle (Saale), 24.03.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006507

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006507>]

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

Seyfarth T., Gerbershagen HP., Giessler C., Leineweber K., Heinroth-Hoffmann I., Pönicke K. & Brodde O.-E. (2000). The cardiac β -adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in monocrotaline-treated rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 2315-2323.

Leineweber K., Seyfarth T. & Brodde O.-E. (2000). Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake 1) in right ventricles of monocrotaline-treated rats. *Br. J. Pharmacol.* **131**: 1438-1444.

Pönicke K., Schlüter KD., Hoffmann-Heinroth I., Seyfarth T., Goldberg M., Osten B., Piper HM. & Brodde O.-E. (2001). Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only α_{1A} -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **364**: 444-453.

Dhein S., Giessler C., Heinroth-Hoffmann I., Leineweber K., Seyfarth T. & Brodde O.-E. (2003). Changes in α_1 -adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-treated rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **365**: 87-95.

Leineweber K.*), Seyfarth T.*), Abraham G., Gerbershagen HP., Heinroth-Hoffmann I., Pönicke K. & Brodde O.-E. (2003). Cardiac β -adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: Differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **41**: 333-342.

*) Leineweber K. and Seyfarth T. contributed equally to the paper

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Monocrotalin-Modell	1
1.2. Myokardiale Rezeptorsysteme	3
1.3. Aufgabenstellung	7
2. Methoden	8
2.1. Monocrotalin-Modell	8
2.2. Quantifizierung der Katecholaminkonzentration	9
2.3. Zellaufschluß und Membranaufreinigung	10
2.3.1. Präparation homogener Membransuspensionen	10
2.3.2. Separation rechts- und linksventrikulärer Kardiomyozyten	11
2.4. Radioligandenbindungsstudien	12
2.4.1. Rezeptortheorie	12
2.4.2. Vakuumfiltration	14
2.4.3. β -Adrenerge Rezeptoren (β -AR)	15
2.4.4. Endothelin-(ET) Rezeptoren	16
2.4.5. Quantitative Bestimmung von [125 J]-markierten Rezeptoren	17
2.4.6. α_1 -Adrenerge Rezeptoren (α_1 -AR)	17
2.4.7. Muskarinerge Rezeptoren	18
2.4.8. Quantitative Bestimmung von [3 H]-markierten Rezeptoren	19
2.5. Auswertung der Radioligandenbindungsstudien	19
2.5.1. Sättigungsexperimente	19
2.5.2. Konkurrenzexperimente	21
2.5.3. Konkurrenzexperimente mit [125 J]-Endothelin	22
2.6. Untersuchungen zum kardialen Noradrenalin Uptake an ventrikulären Membranen	23
2.6.1. Bestimmung der NAT Dichte an ventrikulären Membranen	24
2.6.2. Messung der NAT Aktivität an ventrikulären Membranen	25
2.6.3. Auswertungen zum neuronalen Noradrenalin Uptake	26
2.7. Bestimmung der GRK Aktivität in ventrikulärem Gewebe	27
2.7.1. Aufarbeitung von Zytosol- und Membranfraktionen aus ventrikulärem	

Gewebe	27
2.7.2. Bestimmung der GRK Aktivität in ventrikulären Zytosol- und Membranfraktionen	27
2.8. Detektion der G_{α} -Proteine an ventrikulären Membranen	28
2.8.1. Präparation ventrikulärer Membransuspensionen	28
2.8.2. Western Blot Analyse an ventrikulären Membranen	29
2.8. Bestimmung der Adenylyl Zyklase Aktivität an ventrikulären Membranen	29
2.9.1. Präparation ventrikulärer Membransuspensionen	30
2.9.2. Messung der Adenylyl Zyklase Aktivität an ventrikulären Membranen	30
2.10. Bestimmung des cAMP Gehaltes in Kardiomyozyten	32
2.11. Kontraktionsmessungen an ventrikulären Muskelstreifen	32
2.11.1. Präparation der Ventrikelstreifen	32
2.11.2. Ermittlung kumulativer Konzentrations-Wirkungs-Kurven	33
2.12. Statistik	34
2.13. Verwendete Chemikalien	35
2.14. Verwendete Geräte	37
3. Ergebnisse	39
3.1. Charakterisierung des Monocrotalin-Modells	39
3.1.1. Futteraufnahme, Körpergewicht, Herzgewicht	39
3.1.2. Noradrenalingehalt	40
3.2. Untersuchungen zum Noradrenalin-Transporter (NAT, Uptake ₁)	41
3.2.1. Bestimmung der NAT Dichte in ventrikulären Membransuspensionen	41
3.2.2. Messung der NAT Aktivität	42
3.3. Charakterisierung der kardialen β -AR Signaltransduktion	44
3.3.1. Bindungseigenschaften von β -AR an ventrikulären Membranen	44
3.3.2. Charakterisierung der $G_{\alpha S}$ -Proteine an ventrikulären Membranen	49
3.3.3. Quantifizierung der Adenylyl Zyklase Aktivität an ventrikulären Membranen	50
3.3.4. Bestimmung der GRK Aktivität an ventrikulären Membranen	51
3.3.5. Kontraktile Wirkung von Isoprenalin	52
3.4. Charakterisierung der kardialen β -AR Signaltransduktion an isolierten Kardiomyozyten	56

3.4.1. Separation rechts- und linksventrikulärer Kardiomyozyten	56
3.4.2. Bindungseigenschaften von β -AR an Membranen isolierter Kardiomyozyten	56
3.4.3. Bestimmung des cAMP Gehaltes in Kardiomyozyten	58
3.5. Kardiale muskarinerge Rezeptoren an ventrikulären Membranen	58
3.5.1. Biochemische Charakterisierung M-cholinergere Rezeptoren	58
3.5.2. Quantitative Erfassung von $G_{\alpha i}$ -Proteinen an ventrikulären Membranen	59
3.6. Charakterisierung der kardialen $G_{q/11}$ -gekoppelten Signaltransduktion an ventrikulären Membranen	60
3.6.1. Biochemische Analysen zur α_1 -AR Dichte	60
3.6.2. Detektion der $G_{\alpha q/11}$ -Proteine an ventrikulären Membranen	61
3.6.3. Kontraktile Wirkung von Noradrenalin	61
3.6.4. Charakterisierung kardialer Endothelin-Rezeptoren an ventrikulären Membranen	63
3.6.5. Kontraktile Wirkung von Endothelin	64
4. Diskussion	66
4.1. Monocrotalin-Modell	66
4.2. Noradrenalin Uptake ₁	69
4.3. β - Adrenerge Rezeptoren	70
4.4. Muskarinerge Rezeptoren	81
4.5. α_1 -Adrenerge Rezeptoren	84
4.6. Endothelin-Rezeptoren	85
4.7. Weiterführende Gedanken	87
5. Zusammenfassung	89
Literaturverzeichnis	91
Anhang	

$\alpha_{(1A, B, D)}$ -AR	$\alpha_{(1A, B, D)}$ -Adrenozeptor(en)
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylyl Zyklase
$\beta_{(1, 2)}$ -AR	$\beta_{(1, 2)}$ -Adrenozeptor(en)
B_{\max}	Rezeptordichte
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cpm	Zählimpulse pro Minute
EC ₅₀	Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung erreicht wird
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET(-1, -2, -3)	Endothelin(-1, -2, -3)
ET _{A, B}	Endothelin _{A, B} -Rezeptor(en)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
[³ H]-NMS	[³ H]-N-Methylscopolamin
IE	Internationale Einheiten
[¹²⁵ J]-CYP	[¹²⁵ J]-Jodcyanopindolol
K _D	Dissoziationskonstante
K _H	Affinitätskonstante für den high-affinity state
K _I	Inhibitionskonstante
K _L	Affinitätskonstante für den low-affinity state
KG	Körpergewicht
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurven
LV	Linker Ventrikel
MCT	Monocrotalin
MW	Mittelwert
n _H	Hill-Koeffizient
NA	Noradrenalin
NAT	Noradrenalintransporter
PBS	Phosphat gepufferte, physiologische Kochsalzlösung
PLC	Phospholipase C
PPH	Primäre Pulmonale Hypertonie
R _H	high-affinity state
R _L	low-affinity state
rE	relative Einheiten
RV	Rechter Ventrikel
RVH	Rechtsherzhypertrophierte Tiere
RVF	Rechtsherzinsuffiziente Tiere
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. EINLEITUNG

1.1. MONOCROTALIN-MODELL

Eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren bedingt die Ausprägung von ventrikulären Druck- und Volumenüberlastungen, wie sie beispielsweise im Zusammenhang mit Klappenfehlern, Shunt-Vitien, Aortenisthmusstenosen oder auch bei arterieller Hypertonie auftreten. Ist die zugrunde liegende Erkrankung keiner erfolgreichen Therapie zugänglich, antwortet das Herz als „zellkonstantes Organ“ (Linzbach, 1947) mit einer Größenzunahme der Herzmuskelzellen. Begründet wird dies durch die Tatsache, dass Kardiomyozyten als terminal differenzierte Zellen keine Mitosen durchlaufen können (Schwarzfeld & Jakobson, 1981). Im Stadium der konzentrischen Hypertrophie kann aufgrund einer erhöhten Funktion (Kraft) des einzelnen Myozyten das Defizit des Gesamtorgans Herz ausgeglichen werden. Aus der Erschöpfung überlasteter Myozyten sowie dem Tod einzelner Zellen resultiert im weiteren Verlauf eine Dekompensationsphase (exzentrische Hypertrophie). Die Herzinsuffizienz kennzeichnet somit das Unvermögen des Herzens, eine ausreichende Menge Blut für metabolische und zirkulatorische Anforderungen der Gewebe zu fördern bzw. diese Leistung nur unter abnorm erhöhten Füllungsdrücken erbringen zu können. Die Mehrheit experimenteller Studien zum Thema Herzhypertrophy/-insuffizienz beschäftigte sich jedoch vorwiegend mit Untersuchungen am linken Ventrikel. Demgegenüber existieren deutlich weniger Erkenntnisse über die Kompensationsmechanismen der rechten Kammer. Unter diesem Gesichtspunkt sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit das Verständnis von kardiovaskulären Rezeptoren und deren Signaltransduktionen im rechten hypertrophierten bzw. insuffizienten Ventrikel erweitern.

Nicht nur die Schwierigkeit, auf geeignetes menschliches Untersuchungsmaterial zurückgreifen zu können, sondern auch aufgrund der Heterogenität der humanen Herzhypertrophie und -insuffizienz sind Tiermodelle unverzichtbar, um Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen zu verstehen. Zahlreiche experimentell induzierte Formen einer Herzhypertrophie mit terminaler Insuffizienz sind in der Literatur beschrieben (Smith & Nuttall, 1985; Gwathmey & Davidoff, 1993, 1994; Elsner & Riegger, 1995; Einstein & Abdul-Hussein, 1995; Hasenfuss, 1998a; Doggrell & Brown, 1998; Muders & Elsner, 2000). Die bisher untersuchten Tiermodelle sind allerdings experimentell aufwendig, kostenintensiv und zeigen darüber hinaus deutliche Unterschiede gegenüber humanen Befunden (Brodde et al., 1995). Schließlich erlauben es die meisten dieser Modelle im Allgemeinen nicht, den Übergang einer kompensierten Herzhypertrophie in eine Herzinsuffizienz zu verfolgen.

Gerade in diesem Zusammenhang wird in der Literatur über ein Modell zur tierexperimentellen Herzinsuffizienz berichtet, das einen Teil der dargestellten Nachteile aufheben könnte. Die Applikation von Monocrotalin (MCT), ein Pyrrolizidin-Alkaloid aus *Crotalaria spectabilis*, führt bei Ratten (Schoental & Head, 1955; Meyrick et al., 1980; Ghodsi & Will, 1981), Pferden (Gibbons et al., 1953; Rose et al., 1957), Kaninchen (Gardiner et al., 1965), Mäusen (Harris et al., 1942; Goldenthal et al., 1964) und Hunden (Miller et al., 1978; Okada et al., 1995) zu charakteristischen Intoxikationen in Abhängigkeit von der gewählten Dosierung. Die Verabreichung geringer Mengen an MCT resultiert in einer progressiven pulmonalen Hypertonie, woraus sich je nach Empfindlichkeit der Tiere eine ausgeprägte Rechtsherzhypertrophie mit und ohne Zeichen einer kongestiven Stauungsinsuffizienz entwickelt. Dagegen konnte nach Überdosierungen ein frühzeitiges Sterben der Tiere infolge von Leberfunktionsstörungen beobachtet werden (Wilson et al., 1992). Als mögliche Ursache dafür wird die Metabolisierung der Substanz diskutiert. Das Pyrrolizidin-Alkaloid wird hepatisch unter anderem zum Monocrotalinpyrrol (Dehydromonocrotalin) reduziert (Lame et al., 1991; Dueker et al., 1992; Kasahara et al., 1997). Diesem Reaktionsprodukt werden sämtliche beobachteten toxischen Wirkungen auf Leber sowie Endothelzellen zugesprochen (Lame et al., 1997; Wilson et al., 1992).

Der exakte Wirkmechanismus von MCT ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich ansatzweise untersucht und noch nicht vollständig aufgeklärt (Hincks et al., 1991; Wilson et al., 1992, 2000; Thomas et al., 1996; Pereira et al., 1998; Ito et al., 2000; Lame et al., 2000). Histologische Untersuchungen an Pulmonalarterien zeigen eine deutliche Zerstörung von Endothelzellen begleitet von einer Verdickung der medialen Gefäßschicht. Literaturangaben zufolge sind eine verstärkte Vasokonstriktion im pulmonalarteriellen Kapillarbett und die beobachteten alveolären Ödemen als Hauptursachen für die resultierende pulmonale Hypertonie sowie der nachfolgenden Hypertrophie des rechten Ventrikels anzusehen. Die mediale Verdickung der Pulmonalarterien und die Neomuskularisation kleinerer arterieller Gefäße werden für den progressiven Verlauf verantwortlich gemacht (Valdivia et al., 1967; Altieri et al., 1986; Rosenberg & Rabinovitch, 1988; Wilson et al., 1989; Reindel et al., 1990; Tyler et al., 1999; Ito et al., 2000). Je nach Empfindlichkeit der Tiere terminiert der Krankheitsverlauf in einer Dekompensation der kardialen Kontraktilität mit den erkennbaren Anzeichen einer Herzinsuffizienz (Kachexie, Dys- und Tachypnoe, periphere Zyanose, Piloerektion). Mit Blick auf diesen kardialen Umbau existiert die übereinstimmende Meinung, dass sämtliche kardiale Läsionen als eine Folge der anhaltenden Steigerung im pulmonalarteriellen Druck anzusehen sind (Schultze & Roth, 1998). Somit stehen die genannten Auswirkungen einer

Monocrotalininjektion in gutem Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen zur Primären Pulmonalen Hypertonie (PPH) am Menschen: abgeschwächte endotheliale Relaxation, Erhöhung des pulmonalarteriellen Widerstandes mit Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes sowie eine chronische Druckbelastung des rechten Herzens.

1.2. MYOKARDIALE REZEPTORSYSTEME

Die Fähigkeit insuffizienter Herzen, ein adäquates Herzminutenvolumen aufrechtzuerhalten, ist in erster Linie von deren Kompensationsmöglichkeiten abhängig. Dazu gehören unter anderem eine Aktivierung des Sympathikus (Packer, 1988; Cohn, 1990), des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Francis, 1989; Francis et al., 1993), des Endothelinsystems (Hiroe et al., 1991) sowie eine vermehrte Ausschüttung von antidiuretischem Hormon (Goldsmith et al., 1986; Broqvist et al., 1989). Im Allgemeinen kommt es zu einer konzentrierten Stimulation aller vier Systeme, was durch deren positive Rückkopplung gefördert wird. Nachfolgend sollen die im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchten Signaltransduktionen sowie deren Regulationen im Stadium der Herzinsuffizienz kurz angesprochen werden.

Die mit Abstand am besten untersuchte kardiale Signaltransduktion ist die β -Adrenozeptor (β -AR) vermittelte Steigerung der Herzarbeit. Konformationsänderung des Rezeptormoleküls infolge einer Ligandenbindung führt zur Aktivierung von G_S -Proteinen, die ihrerseits die Adenylyl Zyklase (AZ) stimulieren mit der Folge einer gesteigerten Akkumulation des second messengers cAMP (Brodde, 1991). Aufgrund der agonistischen Ligandenbesetzung wird der Rezeptor über Phosphorylierung durch die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) sowie der im Herzen nachgewiesenen G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen 2, 3 und 5 (GRK; Hausdorff et al., 1990; Lohse et al., 1995) funktionell entkoppelt.

An ventrikulären Gewebeproben explantierter insuffizienter Herzen zeigten Bristow et al. (1982) als erste, dass die Antwort auf eine β -adrenerge Stimulation an der isolierten Herzmuskulatur um etwa 50 % verringert ist und mit einer reduzierten β -AR Dichte einhergeht. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gilt eine selektive Abnahme kardialer β_1 -AR (Protein- und mRNA) sowie eine Entkopplung von β_2 -AR (oft ohne Veränderung auf Protein bzw. mRNA Ebene) als gesichert. Des Weiteren erwies sich sowohl der Gehalt als auch die Aktivität kardialer G_S -Proteine als unverändert (Brodde & Michel, 1999). Insuffiziente Herzen lassen darüber hinaus einen erhöhten GRK2 mRNA Gehalt erkennen bei gleichzeitigem Anstieg in der Phosphorylierungsaktivität (Ungerer et al., 1993). Mehrheitlich konzentrierten sich die vorlie-

genden Arbeiten jedoch auf die Darstellung adrenerger Rezeptoren an linksventrikulären Gewebepreparationen insuffizienter Herzen. Lediglich Bristow et al. (1992) untersuchten Patienten mit PPH sowie Anzeichen einer Rechtsherzinsuffizienz. Dabei erwies sich der rechtsventrikuläre Noradrenalinegehalt, die β_1 -AR Dichte sowie die AZ Aktivität nach Stimulation mit β -AR Agonisten als Kammer-spezifisch reduziert in rechten Ventrikeln. Ebenso zeigte sich an diesen Präparationen eine selektive rechtsventrikuläre Abnahme in der Aktivität der katalytischen AZ-Untereinheit.

Die beobachteten Regulationen auf Rezeptor-Ebene insuffizienter Herzen stehen vermutlich in engem Zusammenhang mit einer erhöhten Sympathikus Aktivität im Stadium der Herzinsuffizienz (Packer, 1988; Cohn, 1990). Durchgeführte Studien mit einer Infusion von Tritium-markiertem Noradrenalin (NA) beschreiben einen systemischen aber auch lokalen NA Spillover aus kardialem und renalem Gewebe (Swedberg et al., 1984; Hasking et al., 1986; Ferguson et al., 1990; Meredith et al., 1993; Kaye et al., 1994). Der nachgewiesene NA Spillover am Herzen insuffizienter Patienten geht dabei den renalen und systemischen Anstiegen von präsynaptisch freigesetztem NA voraus (Rundqvist et al., 1997a, b). Er resultiert sowohl aus einer gesteigerten neuronalen Freisetzung als auch aus einem abgeschwächten neuronalen NA Uptake (Rose et al., 1989; Meredith et al., 1993; Beau & Saffitz, 1994; Böhm et al., 1995b; Eisenhofer et al., 1996). Ungerer et al. (1998) berichteten im Blick auf die Charakterisierung des kardialen NA Spillover über eine signifikante Korrelation zwischen der neuronalen NA Uptake Dichte und dem NA Gewebegehalt an Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Neben dem Natrium- und Chlorid-abhängigen, Desipramin-sensitiven Uptake₁ (neuronaler Uptake) wurde an ventrikulärem Gewebe auch der Corticosteron-sensitive, extra-neuronale Uptake₂ nachgewiesen (Gräfe & Bönisch, 1988; Trendelenburg, 1991). Letzterer ist allerdings in Gegenwart physiologischer Noradrenalkonzentrationen an ventrikulären Gewebeproben von untergeordneter Bedeutung (Iversen, 1965).

Die physiologischen Effekte einer Stimulation von G_i-Proteinen und der damit verbundenen inhibitorischen Wirkung auf die AZ sind an kardialem Gewebe antagonistischer Natur gegenüber einer Aktivierung von G_s-Proteinen über zum Beispiel β -adrenerge Rezeptoren (Taussig et al., 1993; Eschenhagen, 1993). Mindestens drei Rezeptorsysteme existieren am menschlichen Herzen mit einer funktionellen Kopplung an inhibitorische G_i-Proteine: muskarinerge M₂-, Adenosin A₁- und Somatostatin-Rezeptoren (Delhaye et al., 1984; Hershberger et al., 1991), wobei der vagale Einfluss über M₂-Acetylcholin-Rezeptoren dominierend wirkt. Radioligandenbindungsstudien an humanen Ventrikelpreparationen kennzeichneten den muska-

rinergen M_2 -Rezeptor als alleinigen kardialen Acetylcholin-Rezeptor (Giraldo et al., 1988; Deighton et al., 1990). Die Mehrheit der durchgeführten Untersuchungen beschreibt keine Veränderungen in der M_2 -Rezeptor-Dichte und deren Funktion an Gewebeproben insuffizienter Patienten (Böhm et al., 1990a; Giessler et al., 1999). Jedoch zeigten sich die M_2 -Rezeptor-koppelnden G_i -Proteine in Aktivität und Betrag erhöht verglichen mit nicht-insuffizienten Herzen (Feldman et al., 1988; Neumann et al., 1988).

Eine weitere Signaltransduktionskaskade, welche ebenso wie der AZ-Signalweg ubiquitär vorkommt, ist das Phospholipase-C-System (Berridge, 1993). Eine Kopplung an $G_{q/11}$ -Proteine wurde hierbei für α_1 -Adrenozeptoren (α_1 -AR), Angiotensin-II- und Endothelin-Rezeptoren nachgewiesen (Brodde et al., 1995). Dies hat eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zur Folge mit sich anschließenden intrazellulären Anstiegen der second messenger Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol. Während IP_3 Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum mobilisiert, aktiviert Diacylglycerol die Proteinkinase C (PKC). Eine Stimulation der PLC führt am Myokard zu einer Steigerung der Kontraktionskraft, wobei das Ausmaß der Kraftzunahme deutlich geringer und der Zeitverlauf langsamer als nach β -AR Stimulation ist. Die hierbei involvierten Mechanismen sind im Detail noch unvollständig aufgeklärt (Sugden & Bogoyevitch, 1996; Hein & Kobilka, 1997; Kerrie et al., 2000).

Die Existenz kardialer α_1 -AR wurde für mehrere Spezies nachgewiesen (Wagner & Brodde, 1978; Böhm et al., 1988; Bristow et al., 1988; Steinfath et al., 1992a; Zhong et al., 1999). Differenziert wird zwischen drei Subtypen mit den Bezeichnungen α_{1A} -, α_{1B} - und α_{1D} -AR (Michel et al., 1995). Die Übertragung von α_1 -AR Resultaten aus tierexperimentellen Studien auf menschliche Untersuchungsergebnisse ist allerdings nicht ohne Einschränkungen möglich. So liegt die α_1 -AR Dichte in ventrikulärem Rattengewebe mindestens um das 5fache höher als an menschlichen Herzen (Steinfath et al., 1992a). Für letztere wurde darüber hinaus eine Dominanz von α_{1A} -AR mRNA festgestellt (Price et al., 1994a; Weinberg et al., 1994; Faure et al., 1995). Eine erfolgreiche Subtypisierung auf Protein Ebene ist jedoch bislang für menschliche Herzen nicht beschrieben. Radioligandenbindungsstudien an Rattenherzen als auch Untersuchungen zur mRNA von α_1 -AR ermittelten hingegen für α_{1B} -AR den prozentual größten Anteil (Knowlton et al., 1993; Michel et al., 1994; Price et al., 1994b; Noguchi et al., 1995; Wolff et al., 1998).

Für die PLC koppelnde α_1 -AR Kaskade wurde im Stadium der Herzinsuffizienz über eine erhöhte positive Inotropie spekuliert (Schmitz et al., 1987). Experimentelle Untersuchungen widerlegten diese Vermutungen jedoch aufgrund unveränderter (Böhm et al., 1988; Bristow et

al., 1988) bzw. verringerter funktioneller Ansprechbarkeit gegenüber α_1 -AR Agonisten (Landzberg et al., 1991; Steinfath et al., 1992b). Die Dichte α_1 -adrenerger Rezeptoren erwies sich dabei ebenso als unverändert (Böhm et al., 1988; Bristow et al., 1988). Andererseits zeigte sich aber auch ein signifikanter Anstieg in der α_1 -AR Dichte (Vago et al., 1989; Steinfath et al., 1992b; Yoshikawa et al., 1996).

Das Polypeptid Endothelin (Yanagisawa et al., 1988) vermittelt in vitro an ventrikulären Muskelstreifen einen positiv inotropen und chronotropen Effekt (Ishikawa et al., 1988a, b). Mittlerweile sind drei verschiedene Isoformen dieses Peptids identifiziert (ET-1, ET-2 und ET-3), deren Aminosäuresequenzen lediglich geringfügig voneinander abweichen (Inoue et al., 1989). Des Weiteren wurden bisher zwei pharmakologisch unterschiedliche ET-Rezeptoren kloniert. Für die ET-Isoformen sind folgende Affinitäten gegenüber Rezeptoren beschrieben: ET_A-Rezeptor ET-1 > ET-2 > ET-3 bzw. ET_B-Rezeptor ET-1 = ET-2 = ET-3 (Sakurai et al., 1990; Sakamoto et al., 1993; Lee et al., 1994).

Interessanterweise wird im Fall der ET_{A/B}-Rezeptoren verglichen mit α_1 -AR gleichermaßen über eine erhöhte kardiale Dichte für Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie diskutiert (Pieske et al., 1999; Zolk et al., 1999) bzw. die Tendenz dafür aufgezeigt (Pönicke et al., 1998). Serner et al. (2000) dokumentierten eine Zunahme in der ET_{A/B}-Dichte für ischämische, jedoch keine Veränderung im Fall dilatativer Kardiomyopathien. Asano et al. (2002) beobachteten eine selektive Zunahme von ET_A-Rezeptoren in linken Ventrikeln insuffizienter Herzen aufgrund ischämischer und dilatativer Kardiomyopathien.

Eine G_{q/11}-PLC getragene positive Inotropie im Herzen scheint allerdings von untergeordneter Bedeutung zu sein. Diacylglycerol stimuliert die PKC, die zu einer charakteristischen Aktivierung von Protoonkogenen im Herzen führt und damit die mittel- bis langfristigen Stimulierung von Wachstumssignalen beeinflusst (Sugden & Clerk, 1998; Ruwhof & van der Laarse, 2000; Bogoyevitch, 2000; Michel et al., 2001). Im Zusammenspiel mit einer chronisch erhöhten Druck-Volumen-Arbeit kardialer Myozyten bewirken demnach Noradrenalin (Starksen et al., 1986; Iwaki et al., 1990) und Endothelin (Shubeita et al., 1990; Pönicke et al., 1999) eine hypertrophe Antwort infolge einer verstärkten Rezeptorstimulation. Deren Einfluss gewinnt darüber hinaus zusätzlich an Bedeutung, da für beide Mediatoren erhöhte Plasmakonzentrationen im Stadium der Insuffizienz festgestellt wurden (Chidsey et al., 1962; Thomas & Marks, 1978; Stewart et al., 1992; Lerman et al., 1992). Ebenso zeigten Patienten mit pulmonaler Hypertonie einerseits (Stewart et al., 1991; Cody et al., 1992; Nootens et al., 1995; Bratel et al., 2000), aber auch tierexperimentelle Rechtsherzhypertrophie-Modelle auf

der anderen Seite signifikante Anstiege in den Plasmanoradrenalin- und Plasmaendothelin-konzentrationen (Morioka et al., 1992; Elton et al., 1992; Miyauchi et al., 1993; Li et al., 1994; Frasch et al., 1999).

1.3. AUFGABENSTELLUNG

Mit Hilfe des Monocrotalin-Modells sollten Erkenntnisse über kardiale Rezeptorsysteme an rechtsherzhypertrophierten Ratten mit bzw. ohne Anzeichen einer Stauungsinsuffizienz gewonnen sowie die erzielten Ergebnisse mit den bislang beschriebenen Veränderungen am Menschen verglichen werden. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich dabei auf folgende Schwerpunkte:

1. Zeigen Monocrotalin-behandelte Ratten Veränderungen innerhalb der β -AR Signaltransduktion? Manifestiert sich diesbezüglich ein Unterschied zwischen insuffizienten und Rechtsherzhypertrophie-kompensierenden Ratten?
2. Existieren Unterschiede zwischen Kardiomyozyten und ventrikulärem Gewebe in Bezug auf die Regulation der β -AR Kaskade? Die Isolation kontraktile kardialer Myozyten aus rechten und linken Ventrikeln gestattete die Gegenüberstellung dieser kontraktile Zellpopulation mit homogenen Membransuspensionen.
3. Inwiefern unterscheiden sich der kardiale Noradrenalin Uptake in hypertrophierten rechten bzw. nicht-hypertrophierten linken Ventrikeln MCT-behandelter Ratten?
4. Wie verhalten sich muskarinerge Rezeptoren im Monocrotalin-Modell? Erfahren M-cholinerge Rezeptoren und G_i -Proteine eine mögliche Gegenregulation zur β -AR Kaskade als Ausdruck ihrer antagonistischen Funktion gegenüber der sympathischen Signaltransduktion?
5. Unterliegen $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren einer spezifischen Veränderung infolge einer Rechtsherzhypertrophie bzw. -insuffizienz im MCT-Modell? Zeigen sich Abweichungen in der kontraktile Funktion nach Stimulation dieser Rezeptoren?
6. Beschränken sich eventuelle Änderungen in den aufgeführten Signaltransduktionen auf den hypertrophierten rechten Ventrikel oder können diese ebenfalls an linken Ventrikel festgestellt werden?
7. Lassen sich mögliche Veränderungen an MCT-behandelten Ratten mit weiteren Modellen der Rechtsherzhypertrophie vergleichen? Können die Resultate dieser Arbeit auf den Menschen extrapoliert werden? Verkörpert das Monocrotalin-Modell demnach eine adäquate Möglichkeit zur Untersuchung neuer Therapiestrategien für den Fall einer Rechtsherzhypertrophieund-insuffizienz?

2. METHODEN

2.1. MONOCROTALIN-MODELL

Die verwendeten Wistar-Ratten wurden ursprünglich aus Schönewalde bezogen und im Zentralinstitut für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg weitergezüchtet. Sämtliche durchgeführte Untersuchungen an diesen Wistar-Ratten entsprachen den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes zur Tierhaltung und wurden vom Regierungspräsidium Halle/Veterinäramt (Antragsnummer: 43.2-42502/2-290 Ä3) genehmigt.

Männliche Wistar-Ratten wurden in Käfigen zu drei Tieren in klimatisierten Räumen bei 22 °C und unter einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Im Alter von sechs Wochen (140-160g) erhielten die Tiere randomisiert eine intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg KG Monocrotalin (MCT) bzw. die Kontrollgruppe ein äquivalentes Volumen 0,9%iger Kochsalzlösung. Monocrotalin, in aufgereinigter Form ein weißes, kristallines Pulver mit einem Molekulargewicht von 325,3 g/mol, wurde in 1 N HCl gelöst, der Ansatz mit 0,5 M NaOH neutralisiert und die Lösung mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf eine Endkonzentration MCT von 24 mg/ml eingestellt.

Grundlage für die Vergleichbarkeit der Resultate ist ein annähernd identisches Körpergewicht beider Versuchsgruppen. MCT-Ratten reduzierten infolge des Krankheitsverlaufes ihren Futterkonsum vier bis sechs Wochen nach Applikation des Pyrrolizidinalkaloids. Basierend auf der Rückwaage des verabreichten Standarddiätfutters an MCT-Ratten wurde demnach für Kontrolltiere die Futtergabe des kommenden Tages festgelegt. Literaturangaben zufolge soll eine Futtermenge von 10 g pro Tag nicht unterschritten werden (Hildermann et al., 1996). Alle Kontrollratten erhielten eine Mindestmenge von 12,5 g pro Tag. Für MCT-Ratten bestand keine Futterrestriktion; alle Tiere erhielten Wasser ad libitum.

Die Fütterung der Tiere erfolgte mit kommerziell bezogenem Altromin[®] Haltungsfutter-Ratten/Mäuse (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) mit folgender Zusammensetzung: 19,0 % Rohprotein, 4,0 % Rohfett, 6,0 % Rohfaser, 7,0 % Rohasche, 0,2 % Natrium, 1,0 % Kalium, 0,7 % Phosphor, 0,9 % Calcium sowie Vitaminen (15000 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D₃ und 75 mg Vitamin E/kg Futter).

Vier Wochen nach MCT-Injektion zeigten einige Ratten Symptome eines schwerwiegenden Krankheitsverlaufes, wie Dys- und Tachypnoe, Piloerektion, Kachexie und Zyanose. Diese

Tiere wurden umgehend getötet und das Vorliegen einer kongestiven Herzinsuffizienz (RVF) aufgrund von Ascites, Perikardial- oder Pleuraergüssen diagnostiziert. Eine äquivalente Anzahl von Kontrolltieren wurde zum selben Zeitpunkt getötet. Die Tötung der verbliebenen MCT-behandelten Ratten mit Rechtsherzhypertrophie (RVH) ohne Anzeichen einer Stauungsinsuffizienz erfolgte spätestens sechs Wochen nach Injektion zusammen mit den restlichen Kontroll-Ratten.

Für die Durchführung von Radioligandenbindungsstudien an homogenen Rohmembransuspensionen wurden die Tiere mit Ether narkotisiert und unmittelbar folgend durch zervikale Dislokation getötet. Nach Laparo- und Thorakotomie erfolgte die Klassifikation der untersuchten Tiere in kompensierte (RVH) bzw. dekomensierte Rechtsherzhypertrophien (RVF) entsprechend der oben genannten Befunde. Das Herz wurde umgehend entnommen, in die entsprechenden Pufferlösungen überführt und mit den jeweiligen Untersuchungen fortgeführt.

2.2. QUANTIFIZIERUNG DER KATECHOLAMINKONZENTRATION

Der Katecholamingehalt wurde sowohl in Plasmaproben als auch in ventrikulärem Gewebe von MCT- sowie Kontrollratten mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) nach Schäfers et al. (1997) ermittelt.

Narkotisierten Ratten (Pentobarbital 50 mg/kg KG; Heparin 2000 IE) wurde aus dem retroorbitalen Augenplexus mit Hilfe einer Steigkapillare ca. 2-3 ml Blut entnommen und in eine EDTA-haltige, eisgekühlte Monovette überführt. Als Antioxidans wurde den Proben pro ml Blut 10 µl einer 10 mM Glutathion-Lösung zugesetzt. Die Abtrennung des Plasmas von korpuskulären Bestandteilen erfolgte durch Zentrifugation (1700 g, 10 min, 4 °C). Sämtliche Plasmaproben wurden bei -80 °C bis zur HPLC-Analyse gelagert.

Für die Erfassung der Gewebekatecholaminkonzentration wurde den narkotisierten Tieren (siehe oben) das Herz entnommen und die Ventrikel bei -80 °C verwahrt. Am Tag der Präparation wurden die Herzen in 5 ml Lyse-Puffer (10%ige Perchlorsäure, 5 mM Glutathion) aufgetaut, rechts- bzw. linksventrikuläres Gewebe (jeweils 100 mg) mit einer Schere zerkleinert und unmittelbar folgend über einen Ultra-Turrax für 20 Sekunden bei maximaler Leistung (25000 U/min) homogenisiert. Die Überstände der nachfolgenden Zentrifugation (12000 g, 20 min, 4 °C) bildeten die Grundlage für die HPLC-Analyse und wurden bis zu deren Durchführung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Katecholamine (sowie weitere aromatische 1,2-Diol-Verbindungen) wurden auf einer Vorsäule (Vinyl-Copolymer mit Phenylboronsäure) in Gegenwart von Phosphatpuffer [mM: 200 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 10 EDTA, 1,71 NaN_3 , mit NH_4OH auf pH 8,7 eingestellt] unter Esterbildung retiniert. Über ein elektronisches Säulenschaltventil wurde das Elutionsmittel [89 Teile Phosphatpuffer (mM: 1000 NaH_2PO_4 , 5 Oktansulfonsäure, 1,71 NaN_3 , pH 3,0) und 11 Teile Methanol] nach 12 min gewechselt. Auf diesem Weg wurden die Phenylboronsäureester der Katecholamine hydrolysiert und die Katecholamine von der Vorsäule eluiert. Im nächsten Arbeitsschritt folgte über den Transfer des Eluats auf eine weitere analytische Säule (12,5 cm LiChrospher 100, RP 18ec) die Auftrennung der Katecholamine. Deren Detektion erforderte eine dreistufige Nachsäulenderivatisierung zu den entsprechenden fluoreszierenden Trihydroxyindolderivaten über folgende Reaktionsstufen:

1. Oxidation mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zu Adrenochinon bzw. Noradrenochinon,
2. oxidative Zyklisierung zu Adrenochrom bzw. Noradrenochrom und
3. intramolekulare Umlagerung zu 3, 5, 6-Trihydroxy-1-methylindol bzw. 3, 5, 6-Trihydroxyindol.

Die Bestimmung der Trihydroxyindol-Derivate erfolgte mittels Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Die Quantifizierung ermöglichte eine externe Standardisierung unter Verwendung von ClinRep-Standardlösung für Katecholamine in Plasma (Recipe, München).

2.3. ZELLAUFSCHLUSS UND MEMBRANAUFREINIGUNG

2.3.1. PRÄPARATION HOMOGENER MEMBRANSUSPENSIONEN

Ausgehend von frisch ektomierten Herzen gestattete diese Methode die Präparation kardialer Rohmembranen aus verschiedenen Zelltypen in einer homogenen Suspension. Die nachfolgend aufgelisteten Präparationsschritte wurden entsprechend der Methode nach Brodde et al. (1998a) durchgeführt.

Unmittelbar zuvor entnommene Rattenherzen wurden von Bindegewebsresten befreit, die Ventrikel getrennt in jeweils 10 ml des entsprechenden Präparationspuffers (siehe 2.4.) aufgenommen und mit Hilfe einer Schere zerkleinert. Über einen Ultra-Turrax erfolgte die Homogenisierung einmalig bei maximaler Leistung (25000 U/min) für 10 Sekunden sowie nachfolgend zweimal mit submaximaler Kapazität (18000 U/min) für 20 Sekunden (einminütige Intervalle). Die erhaltenen Suspensionen wurden zentrifugiert (1000 g, 15 min, 4 °C) sowie die

resultierenden Überstände von den Pellets durch Filtration über vierlagigen Mull abgetrennt. Die Pellets wurden in 5 ml 1 mM KHCO_3 resuspendiert, umgehend in flüssigen Stickstoff überführt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ für maximal 8 Wochen zur Analyse der AZ Aktivität gelagert.

Der filtrierte Überstand wurde einer zweifachen Zentrifugation (50000 g, 20 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$) unterzogen. Die Homogenisierung des endgültigen Pellets erfolgte in dem jeweiligen Inkubationspuffer. Abschließend wurden die resultierenden Suspensionen auf eine Proteinkonzentration von 0,1 bis 0,2 mg/ml eingestellt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach Bradford (1976) mit bovinem Immunglobulin G als Standard. Gemessen wurde mit einem UV/VIS Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.3.2. SEPARATION RECHTS- UND LINKSVENTRIKULÄRER KARDIOMYOZYTEN

Kollagenase perfundiertes Ventrikelgewebe erlaubte unter Anwendung mehrerer Sedimentationsschritte die Isolierung kontraktiler Zellen aus intakten Herzen. Die Isolierung und Aufreinigung adulter Kardiomyozyten aus ventrikulärem Gewebe von MCT-behandelten und Kontrollratten erfolgte nach der Methode von Viko et al. (1995).

Narkotisierte Ratten (siehe 2.2.) wurden künstlich über die freigelegte Trachea beatmet und das Herz nach Abtrennung von Gefäßen und Perikard umgehend in physiologische Kochsalzlösung (auf Eis) überführt. Unter Verwendung einer Langendorff-Apparatur erfolgte die retrograde Spülung der unmittelbar zuvor entnommenen Herzen über die Aorta zunächst für ca. 3 bis 4 Minuten bis zur Einstellung eines normalen Herzrhythmus mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) begaster Lösung B (siehe Material) sowie anschließend zur weiteren Perfusion mit Lösung C (siehe Material). Nach 5 und 10 Minuten wurden je 25 μl bzw. nach 15 Minuten 50 μl CaCl_2 (100 mM) der Perfusionslösung zugesetzt, um die Ca^{2+} Toleranz der Zellen anzuheben. Das erhaltene Lysat wurde mikroskopisch auf Kardiomyozyten kontrolliert. Mit dem Auftreten erster Myozyten in der Perfusionslösung erfolgte die Abtrennung der Herzen von der Langendorff-Apparatur und die fortführende Präparation auf einem Uhrglas. Dabei wurde atriales Gewebe entfernt und die verbliebenen Ventrikel mit Hilfe eines Skalpell in Fragmente zerkleinert. Die aufgeweichten rechten bzw. linken Ventrikel wurden getrennt in zwei Teflongefäße mit je 20 ml Perfusionslösung überführt, welche im Wasserbad bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ unter vorsichtiger Begasung mit Carbogen standen. Resuspension der erhaltenen Zellsedimente erfolgte in 2-minütigen Abständen sowie nach 10 Minuten Zentrifugation (15 g, 3 min, $25\text{ }^\circ\text{C}$). Die resultierenden Überstände wurden rezentrifugiert (15 g, 3 min, $25\text{ }^\circ\text{C}$). Isolierte Zellpellets aus beiden Zentrifugationsschritten wurden zusammen (rechter und linker Ventrikel

getrennt) in Lösung D (siehe Material) resuspendiert, dabei mit Carbogen begast und wenige Tropfen 5 N HCl zugesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte wiederum Zentrifugation (21 g, 3 min, 25 °C) der erzielten Zellsuspensionen sowie anschließende Filtration über angefeuchtetes Nylon. Nach Sedimentation der kardialen Zellen in einem Reagenzröhrchen bei 37 °C wurden die entstandenen Pellets wiederholt in Lösung D aufgenommen, resuspendiert und nach erneutem Absetzen in wenigen ml Lösung E (siehe Material) aufgenommen. Abschließend wurden die Kardiomyozyten mikroskopisch kontrolliert und gezählt.

Zur Durchführung von Radioligandenbindungsstudien wurde Lösung E (siehe Material) abzentrifugiert (80 g, 10 min, 25 °C), die Sedimente in 1 mM KHCO₃ resuspendiert, wiederholt zentrifugiert (80 g, 10 min, 25 °C) und erneut in 1 mM KHCO₃ resuspendiert. Dreimaliges Homogenisieren (Potter S) für je 15 Sekunden (einminütige Intervalle) bei 1500 U/min resultierte im mechanischen Aufschluss der Kardiomyozyten. Die fortführende Aufarbeitung der Kardiomyozyten entsprach den Präparationen der homogenen Membransuspensionen aus ventrikulärem Gewebe und begann mit einer zweimaligen Zentrifugation bei 50000 g (2.3.1.). Die Umsetzung der Bindungsstudien erfolgte gemäß 2.4.3.

2.4. RADIOLIGANDENBINDUNGSSTUDIEN

2.4.1. REZEPTORTHEORIE

Die Charakterisierung membranständiger Rezeptoren mit Hilfe von Radioliganden basiert auf dem Massenwirkungsgesetz. Es geht davon aus, dass sich zwischen einem geeigneten, hochaffinen, radioaktiv markierten Liganden und einem Rezeptor spezifische und reversible Ligand-Rezeptor-Interaktionen aufbauen. Dieser Ligand-Rezeptor-Komplex existiert nach einer definierten Inkubationszeit in einer Gleichgewichtslage mit den freien Liganden bzw. Rezeptoren. Das Ausmaß dieser Ligand-Rezeptor-Interaktion ist bei gleichbleibender Rezeptormenge von der Konzentration des freien Radioliganden abhängig.

Für eine spezifische Bindung zwischen den genannten Komponenten müssen die eingesetzten Radioliganden folgende Kriterien für eine Interaktion mit Rezeptoren erfüllen:

1. Sättigungsverhalten bei ansteigender Ligandenkonzentration als Folge der begrenzten Anzahl von Membranrezeptoren,
2. Spezifität und Reversibilität der Rezeptor-Ligand-Interaktion, sowie
3. Übereinstimmung von Bindungskinetik und dem zeitlichen Ablauf einer biologischen Antwort des unmarkierten Liganden.

Für die Durchführung eines Radioassays ist es erforderlich, das Gleichgewicht des entstandenen Komplexes zu unterbrechen. Die Inkubationsreaktion wird daher nach einer definierten Reaktionszeit durch Abtrennung des freien ungebundenen Radioliganden unter Anwendung von Filtrations- oder Zentrifugationsverfahren terminiert. Abschließend kann die Bindung des verwendeten Liganden an die Membranpräparationen durch Detektion der Radioaktivität quantifiziert werden.

Das Ausmaß gebundener Radioliganden umfasst neben der spezifischen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung auch ein unspezifisches Bindungsverhalten. Ursachen dieser unspezifischen Bindung sind unter anderem Interaktionen von Liganden mit weiteren Membranproteinen, Membranlipiden (lipophile Liganden) sowie Interaktionen mit verwendeten Materialien (z.B. Glasfilter). Demzufolge korreliert die unspezifische Bindung in der Regel mit der Ligandenkonzentration. Die Gesamtbindung umfasst somit, methodisch bedingt, grundsätzlich immer beide Bindungskomponenten. Um den Anteil der spezifischen Bindung zu quantifizieren, detektiert man in Parallelansätzen die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung getrennt voneinander. Als unspezifischer Parameter wird der Betrag der Radioligandenbindung erfasst, der bei Absättigung der spezifischen Bindungsstellen durch einen zweiten nicht radioaktiv markierten Liganden (ca. $100 \times K_D$) noch detektierbar ist. Somit errechnet sich der Anteil der spezifischen Rezeptorbindung aus der Differenz von Gesamtbindung und unspezifischer Bindung.

Zur quantitativen und qualitativen Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen unter Verwendung von Bindungsstudien kommen hauptsächlich zwei experimentelle Verfahren zum Einsatz:

1. In Sättigungsanalysen erfolgt die Inkubation bei konstanter Rezeptormenge mit steigenden Radioligandenkonzentrationen. Aus dem Sättigungsverlauf der spezifischen Bindung lassen sich die Rezeptordichte B_{\max} und die Dissoziationskonstante K_D (bzw. die Assoziationskonstante K_A) der Ligand-Rezeptor-Bindung bestimmen. Alternativ zu diesem Verfahren unter Äquilibriumbedingungen kann K_D (bzw. K_A) direkt aus kinetischen Untersuchungen über die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten von Hin- und Rückreaktion ermittelt werden.
2. Kompetitions- oder Verdrängungsverfahren gestatten die Bestimmung der Affinität eines weiteren nicht radioaktiv markierten Liganden zum Rezeptor in Abhängigkeit vom verwendeten Radioliganden. Bei bekanntem K_D -Wert des Radioliganden ist aus den erhaltenen Kompetitionsdaten die Affinität des nicht markierten Liganden zum

Rezeptor quantitativ über die Berechnung der K_D -Werte (Cheng & Prusoff, 1973) zugänglich.

Des Weiteren lassen sich über Verdrängungsverfahren in Abhängigkeit vom verwendeten Kompetitor (Agonist respektive Antagonist) Rezeptorsubtypen exakt differenzieren bzw. Aussagen über eventuelle Unterschiede in der Kopplung von Rezeptoren an intrazelluläre G-Proteine („high and low affinity states“) gewinnen. Kompetitionsexperimente wurden unter diesem Anspruch in Gegenwart konstanter Radioliganden- und Rezeptorkonzentration durchgeführt. Der Radioligand wurde hierbei durch steigende Konzentrationen des nicht radioaktiv markierten Liganden aus seiner Bindung zum Rezeptor verdrängt. Für eine gleichförmige Verdrängung von möglichen Rezeptorsubtypen sollte der Radioligand annähernd identische Affinitäten gegenüber diesen Bindungsstellen aufweisen.

Die Durchführung von Radioligandenbindungsstudien, als Modelle einfacher und komplexer Bindungsphänomene, erfordert das Einhalten bestimmter Versuchsbedingungen. Als wesentliche Gesichtspunkte seien genannt:

1. Die Gesamtbindung sollte klein gegenüber der verwendeten Ligandenkonzentration (<5 %) sein.
2. Keine endogenen Liganden in den zu untersuchenden Rezeptorpräparationen.
3. Äquilibriumseinstellung zwischen Ligand bzw. Rezeptor und keine Kooperation zwischen den Rezeptoren.
4. Minimale Verluste infolge des Zerfalls von Ligand-Rezeptor-Komplexen bei der Separation gebundener von nicht gebundenen Liganden (<10 %).

2.4.2. VAKUUMFILTRATION

Die Einstellung des Ligand-Rezeptor-Gleichgewichts wurde durch Verdünnen der Proben mit 10 ml Inkubationspuffer gestoppt. Unmittelbar anschließend erfolgte die Abtrennung freier, nicht an Membranen gebundener Radioliganden mit Hilfe der Vakuumfiltration über Whatman GF/C Filter. Probengefäße und Filter wurden mit 10 ml Inkubationspuffer nachgespült. Die Detektion der zurückgehaltenen Radioaktivität auf den Filtern erfolgte wie unter 2.4.5. bzw. 2.4.8. beschrieben.

2.4.3. β -ADRENERGE REZEPTOREN (β -AR)

SÄTTIGUNGSANALYSEN

Die Bestimmung der β -AR erfolgte entsprechend der Methode nach Brodde et al. (1995). Als radioaktiv markierter Rezeptor Antagonist kam (-)-[¹²⁵J]-Jodcyanopindolol (JCYP, spezifische Aktivität: 2200 Ci/mmol; Brodde et al., 1981; Engel et al., 1981; Hoyer et al., 1982) zum Einsatz. Aufgrund der geringen Halbwertszeit des Isotops ¹²⁵J wurden die Radioassays mit JCYP bis maximal 1 Monat nach Syntheseabschluss (Angabe des Herstellers) durchgeführt. Die Inkubationsansätze umfassten ein Gesamtvolumen von 250 μ l mit nachfolgender Zusammensetzung:

- 50 μ l Inkubationspuffer (mM: 10 TRIS-HCl, 154 NaCl, 0,55 Ascorbinsäure, pH 7,4 bei 25 °C) \pm Agonist oder Antagonist
- 50 μ l Inkubationspuffer mit JCYP (5 bis 200 pM)
- 150 μ l Membranpräparation (eingestellt auf 20 μ g Membranprotein)

Die Präparation ventrikulären Gewebes erfolgte in eiskalter KHCO₃-Lösung (1 mM). Für die Durchführung von Sättigungsassays zur Quantifizierung der β -AR Dichte wurden die Membranpräparationen mit sechs verschiedenen JCYP Konzentrationen zwischen 5 pM und 200 pM im Schüttelwasserbad für 90 min bei 37 °C inkubiert, anschließend filtriert (2.4.2.) und membrangebundenes JCYP detektiert (2.4.5.). Die Definition der tatsächlichen JCYP Konzentration in den jeweiligen Verdünnungsstufen erfolgte über die Detektion der entsprechend eingesetzten Radioaktivitätsmengen parallel zu den Inkubationsansätzen. Das Ausmaß unspezifischer (-)-[¹²⁵J]-CYP Bindung wurde in Gegenwart des nicht-selektiven β -AR Antagonisten CGP 12177 (1 μ M) quantifiziert. Mittelwerte aus Doppelbestimmungen wurden der Auswertung zugrunde gelegt.

Die Herstellung der Verdünnungsreihen bzw. die Durchführung der Radioassays zur Quantifizierung sämtlicher Rezeptortypen erfolgte in Polypropylen-Reaktionsgefäßen. Die Präparationen zur Vorbereitung der Assays wurden permanent auf Eis durchgeführt.

VERDRÄNGUNGSEXPERIMENTE

Kompetitionsanalysen zur Subtypisierung von β -AR wurden in Gegenwart von CGP 20712A durchgeführt. Die Affinität dieses β -AR Antagonisten ist gegenüber β_1 -AR ca. 1000fach größer verglichen mit β_2 -AR (Dooley et al., 1986). In einem Konzentrationsbereich zwischen 1

nM und 100 μ M verdrängte der nicht markierte Antagonist den Radioliganden JCYP (100 pM, entsprechend $10 \times K_D$) quantitativ aus seiner spezifischen Rezeptorbindung. Die Detektion des Anteils der unspezifischen Bindung erfolgte, wie für Sättigungsanalysen, in Gegenwart von CGP 12177 (100 μ M). Sämtliche Proben wurden doppelt bestimmt und deren Mittelwerte bildeten die Grundlage für die Auswertung der Radioligandenassays.

Rezeptoragonisten gestatten die Bestimmung unterschiedlicher Affinitätszustände von adrenergen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Auf dieser Basis wurde mit Hilfe des nicht-selektiven β -AR Agonisten Isoprenalin (1 nM bis 10 μ M) die prozentuale Verteilung sogenannter „high and low affinity states“ erfasst. Guanosintriphosphat konvertiert GPCR in den „low affinity state“ und wurde aus diesem Grund in parallelen Konkurrenzexperimenten als Kontrolle (100 μ M Guanosin-5'-Triphosphat) zugesetzt. Die Konzentration des Radioliganden JCYP betrug 100 pM. Sämtliche Inkubationsansätze der durchgeführten Verdrängungsexperimente zur Bestimmung von β -AR ergaben ein Gesamtvolumen von 250 μ l mit nachfolgender Zusammensetzung:

- 50 μ l Inkubationspuffer (mM: 10 TRIS-HCl, 154 NaCl, 0,55 Ascorbinsäure, pH 7,4 bei 25 °C) \pm CGP 12177 oder CGP 20712A
- 50 μ l Inkubationspuffer \pm 50 μ l Guanosin-5'-Triphosphat (100 μ M)
- 50 μ l Inkubationspuffer mit JCYP (\sim 100 pM)
- 100 μ l Membranpräparation (eingestellt auf 20 μ g Membranprotein).

Die Gewebepräparation sowie die Inkubationsparameter entsprachen in ihrer Ausführung den dargestellten Sättigungsexperimenten. Kalkulierte Mittelwerte aus Doppelbestimmungen wurden der Auswertung zugrunde gelegt.

2.4.4. ENDOTHELIN-(ET) REZEPTOREN

Die Ermittlung der kardialen ET-Rezeptordichte wurde ausschließlich mit Hilfe von Konkurrenzbindungsstudien (2.4.3.) in Anlehnung an Pönicke et al. (1998) durchgeführt. Als Radioligand wurde [125 J]-Endothelin-1 ([125 J]-ET-1, spezifische Aktivität: 2000 Ci/mmol) in einer Konzentration von ca. 3 pM eingesetzt. Für die Detektion der ET-Rezeptordichte erfolgte die Verdrängung des Radioliganden in Membranpräparationen in Gegenwart von 15 verschiedenen Konzentrationen (0,1 pM bis 1 μ M) des nicht radioaktiv markierten Endothe-

lin-1. Der prozentuale Anteil der ET_A-/ET_B-Rezeptorsubtypen wurde mit Hilfe des ET_A-selektiven Antagonisten BQ-123 (1 µM; Ihara et al., 1992; Ishikawa et al., 1992) ermittelt. Die Detektion der unspezifischen Bindung des Radioliganden [¹²⁵J]-ET-1 erfolgte mit Hilfe des nicht-selektiven ET-Rezeptor Antagonisten Bosentan (1 µM; Clozel et al., 1994). Das Gesamtvolumen von 1 ml setzte sich wie folgt zusammen:

- 500 µl Inkubationspuffer (mM: 135 NaCl, 5,4 KCl, 0,3 Na₂HPO₄, 0,4 MgSO₄, 0,5 MgCl₂, 1,2 CaCl₂, 4 NaHCO₃, 39,8 HEPES; Sojabohnen-Trypsininhibitor 1 mg/ml, 0,2 % BSA, pH 7,4 bei 25 °C) ± Endothelin-1, BQ-123 oder Bosentan
- Inkubationspuffer mit 100 µl [¹²⁵J]-ET-1 (~3 pM)
- 400 µl Membranpräparation (eingestellt auf 20 µg Membranprotein).

Rechts- und linksventrikuläres Gewebe wurde in eiskaltem Präparationspuffer (mM: 50 TRIS-HCl, 1 EDTA; 10 µg/ml Aprotinin, 2% BSA, pH 7,4) für den Assay aufgearbeitet. Die Inkubationsreaktion (Schüttelwasserbad bei 37 °C) wurde nach 60 Minuten durch Vakuumfiltration (2.4.2.) gestoppt. Das Ausmaß unspezifischer [¹²⁵J]-ET-1 Bindung an Whatman GF/C Filter konnte durch mindestens 20 minütige Sättigung der Filter mit 4%igem BSA-Inkubationspuffer reduziert werden. Die zurückgehaltene Radioaktivität wurde, wie unter 2.4.5. aufgeführt, detektiert. Die Durchführung der Inkubationsreaktion erfolgte in Doppelbestimmungen. Deren Mittelwerte bildeten die Grundlage der Auswertung.

2.4.5. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON [¹²⁵J]-MARKIERTEN REZEPTOREN

Unmittelbar nach Abschluss der Vakuumfiltration wurden die [¹²⁵J]-markierten Rezeptoren über einen Gamma-Counter detektiert. Die Ausbeute des verwendeten Counters betrug 80 %.

2.4.6. α₁- ADRENERGE REZEPTOREN (α₁-AR)

Die Charakterisierung der kardialen α₁-AR Dichte erfolgte mit Hilfe von Bindungsassays in methodischer Anlehnung an Bindungsstudien nach Michel et al. (1992, 1993a). Für die Untersuchungen wurde Tritium-markiertes Prazosin (Guicheney & Meyer, 1981; spezifische Aktivität: 74,4 Ci/mmol) in sechs verschiedenen Konzentrationen (0,03 nM bis 1,5 nM) eingesetzt. Unspezifische Bindung des Radioliganden [³H]-Prazosin wurde definiert als der Anteil von gebundener Radioaktivität an Membranpräparationen, welche nicht durch den unselekti-

ven α_1 -AR Antagonisten Phentolamin (100 μM) verdrängt werden konnte. Die Inkubationsansätze mit [^3H]-Prazosin umfassten ein Gesamtvolumen von 1 ml mit nachfolgend aufgeführter Zusammensetzung:

- 500 μl Inkubationspuffer (mM: 50 TRIS-HCl, 0,5 EDTA, pH 7,5 bei 25 °C)
- 200 μl Inkubationspuffer \pm Phentolamin (100 μM)
- 200 μl Inkubationspuffer mit [^3H]-Prazosin (0,03 nM bis 1,5 nM)
- 100 μl Membranpräparation (eingestellt auf 100 μg Membranprotein)

Die Aufarbeitung des Gewebes für den Radioassay erfolgte in eiskaltem Präparationspuffer (mM: 10 TRIS-HCl, 5 EDTA, pH 7,5 bei 25 °C). Sämtliche Ansätze zur Ermittlung der [^3H]-Prazosin Bindungsstellen an kardialen Membranpräparationen wurden für 60 min bei 25 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und nachfolgend aufgearbeitet (2.4.2. und 2.4.8.). Sättigungsbindungsstudien an Membransuspensionen wurden mit Hilfe von Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Mittelwerte jeder Konzentrationsstufe bildeten die Grundlage für die Auswertung.

2.4.7. MUSKARINERGE REZEPTOREN

Die muskarinerge Rezeptordichte wurde über Sättigungsbindungsassays mit [^3H]-N-Methylscopolaminchlorid ([^3H]-NMS, spezifische Radioaktivität: 70 Ci/mmol) in sechs verschiedenen Konzentrationsstufen (0,5 nM bis 10 nM) nach Brodde et al. (1998a) quantifiziert. Das unspezifische Bindungsverhalten ergab sich aus den jeweiligen Ansätzen in Gegenwart von Atropin (1 μM). Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 25 °C in einem Schüttelwasserbad. Das Inkubationsvolumen betrug 250 μl mit folgender Zusammenstellung:

- 50 μl Inkubationspuffer (mM: 10 Na_2HPO_4 , 10 NaH_2PO_4 , pH 7,4 bei 25 °C) \pm Atropin (1 μM)
- 50 μl Inkubationspuffer mit [^3H]-NMS (0,5 nM bis 10 nM)
- 150 μl Membranpräparation (eingestellt auf 100 μg Membranprotein)

Rechts- bzw. linksventrikuläres Gewebe wurde in eiskaltem Präparationspuffer (1 mM KHCO_3) aufgearbeitet, die Inkubationsreaktion durch Vakuumfiltration (2.4.2.) terminiert und die Radioaktivität detektiert (2.4.8.). Der Anteil der unspezifischen Bindung (Filter) konnte

durch Sättigung der verwendeten Filter für 20 Minuten vor Filtrationsbeginn mit Inkubationspuffer (inklusive 0,5 M NMS, nicht radioaktiv) reduziert werden.

2.4.8. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON [³H]-MARKIERTEN REZEPTOREN

Whatman-GF/C Filter wurden mit der zurückgehaltenen Radioaktivität in Scintillationsgefäße überführt und trockneten für 12 h bei Raumtemperatur. Die getrockneten Filter wurden mit 4 ml Scintillator LumasafeTM Plus versetzt und nachfolgend für 10 min kräftig geschüttelt. Die abschließende Detektion der Radioaktivität erfolgte in einem Beta-Scintillationscounter. Die ermittelte Zählausbeute betrug 60 %.

2.5. AUSWERTUNG DER RADIOLIGANDENBINDUNGSSTUDIEN

2.5.1. SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE

Für die Bestimmung der adrenergen und muskarinergen Rezeptordichte kamen ausschließlich Sättigungsexperimente zur Anwendung. Grundlage dieses Verfahrens ist, wie bereits unter 2.4.1. angesprochen, die einfache bimolekulare Reaktion zwischen einem Liganden und seinem Rezeptor:



Die quantitative Kopplung der Liganden an Rezeptoren steht nach (1) somit in Korrelation zu der freien Liganden- bzw. Rezeptorkonzentration, und ist des Weiteren abhängig von den Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung und den Zerfall des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Befindet sich eine Reaktion im Gleichgewicht (Hin- = Rückreaktion) kann wie folgt umgeformt werden:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[\text{Ligand}] [\text{Rezeptor}]}{[\text{Ligand} \times \text{Rezeptor}]} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} k_{+1} &= \text{Assoziationsgeschwindigkeitskonstante} \\ k_{-1} &= \text{Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante} \\ K_D &= \text{Dissoziationskonstante} \end{aligned}$$

Im Fall einer 50%igen Besetzung der Rezeptoren durch den Liganden ($[Rezeptor] = [Ligand \times Rezeptor]$) folgt aus (2) $K_D = [Ligand]$. Unter der Dissoziationskonstanten K_D versteht man demnach einen versuchsspezifischen Kinetikparameter, der die freie Ligandenkonzentration im Fall einer 50%igen Rezeptorbesetzung durch diesen Liganden widerspiegelt. Sie verhält sich umgekehrt proportional zur Affinität des Liganden gegenüber einem bestimmten Rezeptor.

Die Gesamtzahl aller Rezeptoren ($B_{max} = [Rezeptor]_{TOT}$) errechnet sich aus der Summe von freien und besetzten Rezeptoren. Unter Berücksichtigung von Gleichung (2) erhält man K_D aus (3):

$$K_D = \frac{([Rezeptor]_{TOT} - [Ligand \times Rezeptor]) \times [Ligand]}{[Ligand \times Rezeptor]} \quad (3)$$

Nachfolgend aufgezeigte Umstellung resultiert in der Kalkulation der spezifischen Bindung ($[Ligand \times Rezeptor]$) für die durchgeführten Sättigungsexperimente:

$$[Ligand \times Rezeptor] = \frac{[Rezeptor]_{TOT} \times [Ligand]}{K_D + [Ligand]} \quad (4)$$

Die graphische Darstellung des Anteils rezeptorgebundener Liganden $[Ligand \times Rezeptor]$ gegen die steigende, freie Ligandenkonzentration $[Ligand]$ definiert eine Hyperbel entsprechend der mathematischen Formel $y = (a \times x) / (b + x)$. Verläuft demnach $[Ligand] \rightarrow \infty$, so nähert sich die spezifische Bindung $[Ligand \times Rezeptor] \rightarrow [Rezeptor]_{TOT}$ asymptotisch, d.h. die maximale Rezeptorbesetzung ist experimentell nicht zugänglich. Computer gestützte nicht-lineare Regressionsmethoden ermöglichen die Berechnung der Dissoziationskonstanten K_D sowie der Lage dieser horizontalen Asymptote als Index für $[Rezeptor]_{TOT}$ bzw. B_{max} .

Angaben der Hersteller zur Charakterisierung der Radioliganden wurden der Auswertung ohne weitere Korrektur zugrunde gelegt und bildeten ihrerseits die Grundlage für die Umrechnung der detektierten Radioaktivität (counts per minute, cpm) in Konzentrationsangaben von Liganden, Rezeptorproteindichten bzw. Reaktionskonstanten. Die Angabe der ermittelten Rezeptordichte B_{max} und Dissoziationskonstante K_D erfolgte in fmol/mg Protein bzw. pM unter Berücksichtigung der spezifischen Radioaktivität des verwendeten Radioliganden, der Zählrohrbeute des jeweiligen Counters für das entsprechende Isotop und des Inkubationsvolu-

mens. Die Interpretation der ausgewiesenen Messwerte wurde mit Hilfe des PC-Programms GraphPad™Prism® 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien; USA) durchgeführt.

2.5.2. KOMPETITIONSEXPERIMENTE

Die spezifische Bindung reduziert sich infolge einer steigenden Konzentration des Kompetitors, wobei letzterer den Radioliganden aus seiner Rezeptorkopplung verdrängt (siehe 2.4.1.). Die EC_{50} verdeutlicht demnach jene Konzentration der nicht-markierten kompetitiven Substanz, welche einer 50%igen Abnahme der spezifischen Ligandenbindung entspricht.

Das Ausmaß der Reduktion dieser Radioligandenbindung ergibt sich bei definierter EC_{50} aus dem molaren Verhältnis mit welchem der Austausch von Ligand und Kompetitor an der(n) Bindungsstelle(n) erfolgt. Dieses molare Verhältnis, verantwortlich für die Steigung der Kurve, wird auch Hill-Koeffizient (n_H) genannt. Ein Kompetitor mit gleicher Affinität für eine oder mehrere voneinander unabhängige Bindungsstellen bewirkt eine monophasische und steile Verlaufskurve. Voraussetzung hierfür ist eine gleichförmige, in einem molaren Verhältnis von eins zu eins erfolgende Verdrängung des Radioliganden aus seiner Rezeptorbindung. Für diesen Fall beträgt der Hill-Koeffizient in der Regel eins. Substanzen mit unterschiedlichen Affinitäten gegenüber Bindungsstellen werden hingegen nicht gleichförmig aus ihrer Rezeptorkopplung verdrängt. Die mit Hilfe der Kurvenanpassung ermittelten Hill-Koeffizienten sind demzufolge von eins abweichend. Auf dieser Grundlage gestatten Verdrängungsexperimente die Charakterisierung unterschiedlicher Ligand-Rezeptorbindungsstellen sowie deren funktionelle Differenzierung (2.4.1.).

Die ermittelten EC_{50} -Werte entsprechen jedoch nicht direkt den Dissoziationskonstanten von Kompetitoren und Rezeptoren. Eine Möglichkeit zur Elimination versuchsspezifischer Einflüsse auf die kalkulierten EC_{50} -Werte besteht in der Berechnung der K_I -Werte nach der Methode von Cheng & Prusoff (1973):

$$K_I = \frac{EC_{50}}{\frac{[Ligand]}{K_D} + 1} \quad (5)$$

K_I	=	Dissoziationskonstante von Kompetitor und Rezeptor
EC_{50}	=	Konzentration des Kompetitors mit 50 %iger Reduktion der spezifischen Bindung des Radioliganden
$[Ligand]$	=	Konzentration an freien Radioliganden im Inkubationsansatz
K_D	=	Dissoziationskonstante von Radioligand und Rezeptor

Als Kriterien für die Anwendung der Kalkulation von K_I -Werten nach Cheng und Prusoff (1973) mussten folgende Versuchsparameter eingehalten werden:

1. Die freie Ligandenkonzentration ist konstant. Der Anteil des Rezeptor-gekoppelten Radioliganden sollte dazu 5 % nicht übersteigen.
2. Die B_{max} ist wesentlich kleiner als die K_D des markierten oder unmarkierten Liganden ($B_{max} \ll K_D$).

Verdrängungsanalysen zur Detektion variabler Rezeptoraffinitätszustände (R_H und R_L) wurden entsprechend den Konkurrenzexperimenten zur Rezeptor-Subtyp Charakterisierung ausgewertet. Die ermittelten K_I -Werte (siehe oben) kennzeichneten dabei eine 50%ige Absättigung der jeweiligen Affinitätszustände R_H bzw. R_L mit dem eingesetzten Kompetitor Isoprenalin.

Die Auswertung der durchgeführten Verdrängungsexperimente erfolgte mit Hilfe iterativer, nicht-linearer Kurvenanpassung. Entscheidungen zwischen mono- und biphasischem Verlauf zur bestmöglichen Kurveninterpretation wurden unter Anwendung des F-Tests (2.12.) getroffen. Sämtliche Wettbewerbs-Bindungsdaten wurden mit Hilfe des PC-Programms GraphPadTMPrism[®] 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien; USA) ausgewertet.

2.5.3. KOMPETITIONSEXPERIMENTE MIT [¹²⁵J]-ENDOTHELIN

Entgegen der Rezeptordichtebestimmung von adrenergen und muskarinergen Rezeptoren über Sättigungsexperimente erfolgte die Quantifizierung der Endothelin-Rezeptoren unter Anwendung von Wettbewerbsassays sowie anschließend deren Interpretation nach der Methode von DeBlasi et al. (1989). Grundlage der genannten Methode ist der Einsatz einer Substanz sowohl als Radioligand bzw. als nicht-markierter Kompetitor. Nach Cheng & Prusoff (1973, siehe 2.5.2.) gilt:

$$EC_{50} = K_I (1 + [Ligand] / K_D) \quad (6)$$

Im Fall einer Verdrängung von ET-1 gegen [¹²⁵J]-ET-1 sind diese Affinitäten identisch ($K_D = K_I$). Somit ergibt sich:

$$K_D = EC_{50} - [Ligand] \quad (7)$$

die Dissoziationskonstante des Radioliganden aus der Differenz zwischen der ermittelten EC_{50} und der Radioligandenkonzentration.

Über die Berechnung der spezifischen Ligand-Rezeptor-Kopplung (Gleichung 4 aus 2.5.1.) ist die Rezeptordichte mit Hilfe der Gleichung 8 zugänglich:

$$[Rezeptor]_{TOT} = [Ligand \times Rezeptor] \times (K_D + [Ligand]) / [Ligand] \quad (8)$$

Unter Berücksichtigung von 6 erhält man die Rezeptordichte demnach aus folgender Gleichung (9):

$$[Rezeptor]_{TOT} = [Ligand \times Rezeptor] \times (EC_{50}) / [Ligand] \quad (9)$$

Das Ausmaß der spezifischen Bindung $[Ligand \times Rezeptor]$ ergibt sich aus der Differenz von Gesamtbindung minus unspezifischer Bindung.

In Erweiterung zu den unter 2.4.1. genannten Gesichtspunkten zur Durchführung von Radioligandenbindungsstudien mussten für die Anwendung von Gleichung 9 folgende Voraussetzungen gewährleistet werden:

1. Identische Affinität von markiertem und nicht markiertem Ligand gegenüber
2. Einer Rezeptorpopulation (z.B. ET_A/ET_B) im zu untersuchenden Inkubationsansatz

Die Kompetitions-Bindungsdaten wurden mit Hilfe nicht-linearer Regression des PC-Programms GraphPadTMPrism[®] 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien; USA) ausgewertet.

2.6. UNTERSUCHUNGEN ZUM KARDIALEN NORADRENALIN UPTAKE AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Extrazelluläres Noradrenalin (NA) wird physiologisch auf zwei verschiedenen Wegen inaktiviert. Dominierend wirkt die synaptische Rückaufnahme mit Hilfe des NA Transporters (NAT) in der Axoplasmamembran ($Uptake_1$). Dementgegen spielt die extraneuronale Inaktivierung ($Uptake_2$) von NA durch Abbau des Transmitters mit Hilfe der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) in physiologischen Konzentrationen eine untergeordnete Rolle (Iversen, 1965). Gegenstand der durchgeführten Untersuchungen war einerseits die Erfassung

der NAT Dichte, aber auch der NAT Aktivität (Uptake_1). In der Auswertung wurde nicht zwischen RVH und RVF unterschieden.

2.6.1. BESTIMMUNG DER NAT DICHTEN AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Die Präparation der Membranaufschlüsse aus rechten und linken Ventrikeln für die Bindungsassays erfolgte nach der Methode von Shearman & Meyer (1998). Tiefgefrorenes Gewebe (100 mg) beider Ventrikel wurde in 5 ml Inkubationspuffer (mM: 10 Na_2HPO_4 , 120 NaCl, 5 KCl, pH 7,4) inklusive 250 mM Saccharose auf Eis stehend aufgetaut. Anschließende Homogenisierung der rechten und linken Ventrikel erfolgte wie unter 2.3.1. beschrieben in Inkubationspuffer (+ 250 mM Saccharose). Nach Zentrifugation der Suspensionen (1200 g, 10 min, 0 °C) wurden die Überstände über vierlagigen Mull filtriert und zweifach zentrifugiert (20000 g, 20 min, 4 °C). Die aufgereinigten Membranpellets wurden in eiskaltem Inkubationspuffer (ohne Saccharose) resuspendiert und die Suspension auf eine Proteinkonzentration von 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ eingestellt.

SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE

Sättigungsbindungsstudien erfolgten in sechs verschiedenen Konzentrationen (0,3 bis 10 nM) des spezifischen Uptake_1 Inhibitors [^3H]-Nisoxetin (spezifische Aktivität: 80 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 500 μl mit nachfolgender Zusammensetzung:

- 50 μl Inkubationspuffer \pm Desipramin (1 μM , spezifischer Uptake_1 Inhibitor)
- 50 μl Inkubationspuffer mit [^3H]-Nisoxetin (0,3 bis 10 nM)
- 400 μl Membranpräparation (eingestellt auf 100 μg Membranprotein)

Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 1 μM Desipramin quantifiziert. Die Reaktionsansätze inkubierten drei Stunden bei 4 °C, wurden durch Vakuumfiltration über Whatman GF/C Filter (2.4.1.) gestoppt und fortführend aufgearbeitet (2.4.7.). Die Durchführung der Sättigungsbindungsstudien erfolgte in Doppelbestimmungen und deren Mittelwerte wurden der Auswertung zugrunde gelegt.

VERDRÄNGUNGSEXPERIMENTE

Die Subtypisierung von NAT Bindungsstellen erfolgte mit Hilfe der selektiven Uptake_1 Inhibitoren Desipramin und Nisoxetin, dem Uptake Inhibitor Kokain und des Dopamin Uptake

Inhibitors GBR 12909 (acht verschiedene Konzentrationen: 0,1 pM bis 400 μ M). Die Durchführung der Assays entsprach den Sättigungsbindungsstudien.

2.6.2. MESSUNG DER NAT AKTIVITÄT AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Die ventrikuläre NAT Aktivität wurde über die Aufnahme von Tritium-markiertem D,L-Noradrenalinhydrochlorid (spezifische Aktivität: 13,5 Ci/mmol) in präparierte Gewebeslices ermittelt. Die Untersuchungen zur Uptake₁ Aktivität standen dabei in methodischer Anlehnung an Liang et al. (1989). Rechts- und linksventrikuläres Gewebe wurde in modifizierter und begaster (95 % O₂, 5 % CO₂) Krebs-Henseleit-(KH) Lösung (mM: 118 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂, 0,54 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 11 Glucose, 0,094 EDTA, 1,14 Ascorbinsäure, 0,067 Nialamid) mit einem McIlwain Tissue-Chopper in Gewebestücke der Größe 250 × 250 μ m geschnitten.

SÄTTIGUNGSEXPERIMENTE

Für die Quantifizierung der NAT Aktivität wurden je 10 mg rechts- bzw. linksventrikuläre Gewebestücke in Gegenwart von 1 μ M Nisoxetin (Uptake₁ Inhibitor) bzw. 40 μ M Corticosteron (Uptake₂ Inhibitor) für 15 Minuten bei 37 °C in KH-Puffer äquilibriert und die NAT Aktivität durch Zugabe von [³H]-NA (25 nM) nach einer zusätzlichen Inkubationszeit für 15 Minuten in einem Gesamtvolumen von 500 μ l mit folgenden Komponenten bestimmt:

- 50 μ l KH-Puffer \pm Nisoxetin (1 μ M) bzw. Corticosteron (40 μ M)
- 50 μ l KH-Puffer mit [³H]-NA (25 nM)
- 400 ml KH-Puffer mit 10 mg ventrikulärem Gewebe

Die Erfassung der unspezifischen [³H]-NA Akkumulation in ventrikulären Gewebeslices erfolgte in parallelen Reaktionsansätzen bei 4 °C. Die Inkubationen wurden durch Vakuumfiltration über einen mit 0,05 % Polyethylenimin gesättigten Whatman GF/C Filter (2.4.1.) terminiert. Die Filter inklusive der zurückgehaltenen Radioaktivität wurden in Scintillationsgefäße überführt, mit 3 % Trichloressigsäure versetzt und bei 4 °C über Nacht stehen gelassen. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte wie unter 2.4.7. beschrieben. Spezifische Aktivität wurde definiert als totale NAT Aktivität (37 °C) minus unspezifischen Uptake (4 °C).

VERDRÄNGUNGSEXPERIMENTE

Zur qualitativen Charakterisierung des Uptake₁ wurden linksventrikuläre Gewebeslices von Kontroll-Ratten in Gegenwart acht verschiedener Konzentrationen (100 nM bis 100 mM) der selektiven Uptake₁ Inhibitoren Desipramin und Nisoxetin, dem Uptake Inhibitor Kokain und des Dopamin Uptake Inhibitors GBR 12909 inkubiert. Die Versuchsdurchführung sowie die Inkubationsbedingungen entsprachen denen der Sättigungsexperimente. Sämtliche Ansätze zur Detektion der [³H]-NA Uptake₁ Aktivität erfolgten in Doppelbestimmungen. Die jeweiligen Mittelwerte wurden der Auswertung zugrunde gelegt.

2.6.3. AUSWERTUNGEN ZUM NEURONALEN NORADRENALIN UPTAKE

Bindungsdaten aus den Untersuchungen mit Tritium-markiertem Nisoxetin wurden in Anlehnung an die Methoden zur Rezeptorcharakterisierung ausgewertet. Dabei erfolgte die Anpassung der ermittelten Bindungsdaten aus Sättigungsexperimenten an Hyperbelfunktionen (2.5.1.). Als Grundlage der gewählten Auswertung diente wiederum die Einstellung eines Gleichgewichtes nach dem Massenwirkungsgesetz zwischen [³H]-Nisoxetin und dessen Kopplung an den NAT (2.4.1.). Das Ausmaß der spezifischen Bindung von Transportergebundenem [³H]-Nisoxetin entsprach in diesem Fall der Ligand-Rezeptor-Interaktion (Gleichung 4 aus 2.5.1.). Die maximale Bindung von [³H]-Nisoxetin bzw. dessen Dissoziationskonstante K_D wurden mit Hilfe nicht-linearer Kurvenanpassung ermittelt.

Für die Bestimmung der NAT Aktivität wurde dessen Transportrate in Gegenwart von 25 nM [³H]-NA ermittelt. Liang et al. (1989) berichteten über eine direkte Proportionalität zwischen dem verwendeten Substrat und der Uptakegeschwindigkeit in einem Bereich von 0 bis 50 nM NA. Aus diesem Grund gewährleistete die angegebene Konzentration eine objektive Charakterisierung der Uptake₁ Aktivität und sicherte eine entsprechende Vergleichbarkeit der erzielten Resultate.

Sämtliche Untersuchungen zum NA Uptake wurden mit Hilfe des PC-Programms GraphPadTM Prism[®] 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien; USA) ausgewertet.

2.7. BESTIMMUNG DER GRK AKTIVITÄT IN VENTRIKULÄREM GEWEBE

Die Messung der Enzymaktivität der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) in zytosolischen und Membranfraktionen aus sowohl rechts- und linksventrikulärem Gewebe orientierte sich an der Methode von Benovic et al. (1987). Das Prinzip des Assays begründet sich darauf, dass lichtabhängig Rhodopsin spezifisch via der zu erfassenden Rezeptorkinase phosphoryliert wird. Die Inkorporation von radioaktiv markiertem Phosphor repräsentiert dabei ein Maß für die im Ansatz vorhandene GRK Aktivität. Rhodopsin, freundlicherweise von Prof. Dr. M. J. Lohse (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg) für die Durchführung der Versuche zur Verfügung gestellt, wurde den Assayproben als Substrat zugesetzt. In der Auswertung der erzielten Daten wurde nicht zwischen RVH und RVF unterschieden.

2.7.1. AUFARBEITUNG VON ZYTOSOL- UND MEMBRANFRAKTIONEN AUS VENTRIKULÄREM GEWEBE

Rechts- bzw. linksventrikuläres Gewebe (100 mg) wurde in 1 ml eiskaltem Lyse-Puffer (mM: 10 TRIS-HCl, 5 NaCl, 5 EDTA; 40 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid, 40 µg/ml Leupeptin, 40 µg/ml Benzamidin, pH 7,4) einmalig mit maximaler Leistung (25000 U/min) 10 Sekunden sowie nachfolgend zweimal mit submaximaler Kapazität (18000 U/min) 20 Sekunden (einminütige Intervalle) über einen Turrax homogenisiert und anschließend zentrifugiert (50000 g, 30 min, 4 °C). Die Überstände beinhalten die zytosolische Fraktion des aufgearbeiteten Ventrikelgewebes. Die erhaltenen Pellets (Membranfraktion) wurden erneut in frischem Lyse-Puffer (inklusive 250 mM NaCl) aufgenommen, mit einem Sonifier für 5 Sekunden auf Eis homogenisiert, gefolgt von einer Inkubation für 15 Minuten bei 4 °C und wiederholt zentrifugiert (50000 g, 30 min, 4 °C). Die Überstände dieser zweiten Zentrifugation enthielten die membranassoziierten Proteine. Die Erfassung des Proteingehalts erfolgte nach Bradford (1976) mit bovinem Immunglobulin G als Standard (2.3.1.).

2.7.2. BESTIMMUNG DER GRK AKTIVITÄT IN VENTRIKULÄREN ZYTOSOL- UND MEMBRANFRAKTIONEN

Zytosolische (100 µg) und Membranfraktionen (50 µg) beider Ventrikel wurden für 30 min bei 30 °C in Gegenwart von Licht und 400 pmol Rhodopsin in 60 µl Assaypuffer (mM: 10 TRIS-HCl, 5 EDTA, 10 MgCl₂, 0,1 ATP mit γ -[³²P]-ATP (~20 µCi); 260 pM $\beta\gamma$ -

Untereinheit) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eiskalter Pufferlösung (mM: 10 TRIS-HCl, 5 EDTA, pH 7,4) gestoppt und es erfolgte die Zentrifugation (14000 g, 10 min, 25 °C) der rhodopsinhaltigen Vesikel. Die erzielten Pellets wurden in 30 µl zweifach konzentriertem Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) unter kräftigem Schütteln für 30 min resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Auftragung der Proteine auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel zur gelelektrophoretischen Separation (25 mA/Gel für 90 min). Die resultierenden Gele wurden mit Coomassie-Farblösung für 30 min gefärbt und mit 30 % Methanol und 10 % Essigsäure für etwa 2-3 Stunden entfärbt. Die Rhodopsinbanden (~35 kDa) wurden aus dem Gel geschnitten und via Cerenkov Counting erfasst. Die Ermittlung der GRK Aktivität erfolgte parallel in Zytosol- und Membranfraktionen aus beiden Ventrikeln.

2.8. DETEKTION DER G_α-PROTEINE AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Als Konsequenz agonistischer Ligandenbesetzung koppeln adrenerge, muskarinerge und Endothelin-Rezeptoren zwecks Signaltransduktion intrazellulär mit membrangebundenen G-Proteinen. GTP-bindende Heterotrimere (G-Proteine, bestehend aus α-, β- und γ-Untereinheiten) werden aufgrund ihrer unterschiedlichen α-Subeinheiten klassifiziert (Morris et al., 1999). Selektive Antikörper gegen diese α-Untereinheiten ermöglichen deren Detektion. Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Ermittlung der G_α-Proteine wurden modifiziert (Michel et al., 1993b) nach der Methode von Burnette (1981) unter Verwendung der Antikörper RM/1 (G_{αs}), AS/7 (G_{αi}) und QL-Antiserum (G_{αq/11}) durchgeführt.

2.8.1. PRÄPARATION VENTRIKULÄRER MEMBRANSUSPENSIONEN

Tiefgefrorenes rechts- und linksventrikuläres Gewebe wurde in eiskalter 1 mM KHCO₃ Lösung aufgetaut, kleingeschnitten und mit einem Ultra-Turrax 10 Sekunden bei maximaler (25000 U/min) sowie zweimal 20 Sekunden (einminütige Intervalle) mit submaximaler Leistung (18000 U/min) homogenisiert. Die erhaltenen Membranen wurden nachfolgend durch Zentrifugation (50000 g, 20 min, 4 °C) gewaschen und das erzielte Pellet in 1 ml TED-Puffer (mM: 20 TRIS-HCl, 1 EDTA, 1 Dithiothreitol, pH 7,7 bei 4 °C) mit Hilfe des Turrax (10 Sekunden, 25000 U/min) resuspendiert.

2.8.2. WESTERN BLOT ANALYSE AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Kardiale Membranen (ca. 100 µg Protein/Slot) wurden mit Puffer (5 % SDS, 50 % Glycerol, 5 % 2-Mercaptoethanol, 300 mM TRIS-HCl, 0,04 % Bromphenolblau, pH 6,8 bei 25 °C) in einem Verhältnis von 4 : 1 verdünnt und für 5 Minuten erhitzt. Nach deren Auftrennung in SDS-Polyacrylamid-Gelen entsprechend der Methode nach Laemmli (1970) mit 4 % Acrylamid im Sammelgel und 10 % Acrylamid im Trenngel wurden die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen über Nacht mit einem 60 V Spannungsfeld transferiert. Im Anschluss daran wurden die Blots für 90 Minuten in TBS-Puffer (mM: 20 TRIS-HCl, 100 NaCl, pH 7,5, 25 °C) bei Raumtemperatur in Gegenwart von 2 % Fettsäure-freiem Milchpulver geblockt. Dieser Arbeitsschritt wurde zweimal für 10 Minuten in TTBS-Puffer (TBS mit 500 µl/l Tween-20) wiederholt. Die Inkubation der Blots mit dem entsprechenden Antiserum erfolgte über Nacht bei 4 °C in TTBS-Puffer mit 1 % Fettsäure-freiem Milchpulver.

Nach Abtrennung der Antiseren bzw. zweimaligem Waschen der Blots für 10 Minuten mit TTBS-Puffer erfolgte anschließend die Inkubation mit 80 µl [¹²⁵J]-markierter Protein A Lösung (130 µCi/ml) in einem Gesamtvolumen von 100 ml TTBS-Puffer mit 1 % Fettsäure-freiem Milchpulver für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Inkubationsreaktion wurde durch Auswaschen mit TTBS-Puffer gestoppt. Zur Entfernung [¹²⁵J]-markierter Protein A Lösung wurde dieser Schritt nachfolgend dreifach jeweils für 10 Minuten wiederholt. Für die Bestimmung der gebundenen Radioaktivität ([¹²⁵J]-Protein A) an die verwendeten Antiseren wurden die Blots auf Fotofilme aufgelegt.

Die relative Quantifizierung der G-Protein Untereinheiten erfolgte mit Hilfe eines Bio-Imaging Analyzer sowie des dazugehörigen Programmes Tina 2.10. Die Schwärzung der Fotofilme wurde in relativen Einheiten (rE) angegeben und der Auswertung zugrunde gelegt.

2.9. BESTIMMUNG DER ADENYLYL ZYKLASE AKTIVITÄT AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Die Adenylyl Zyklase (AZ), ein Membran-assoziiertes Protein, vermittelt die Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP); letzteres wurde als α-[³²P]-radioaktiv markierte Substanz dem Assay zugesetzt. Die katalytische Aktivität der AZ kann durch Zusatz verschiedener Substanzen sowohl gesteigert als auch inhibiert werden. Das Ausmaß dieser Beeinflussung ist dabei über die Detektion des Reaktionsproduktes [³²P]-

cAMP zugänglich. Die Untersuchungen zur AZ Aktivität standen in Anlehnung an die Methode nach Salomon et al. (1974) und wurden modifiziert nach Brodde et al. (1998b) durchgeführt.

2.9.1. PRÄPARATION VENTRIKULÄRER MEMBRANSUSPENSIONEN

Die Rattenherzen wurden entnommen und aufgearbeitet wie unter 2.3.1. beschrieben. Das tiefgefrorene Zentrifugationspellet (1000 g) wurde in eisgekühlter 1 mM KHCO₃ Lösung aufgetaut, resuspendiert und wiederholt bei 1000 g zentrifugiert. Die Pellets wurden nachfolgend in TEN-Puffer (mM: 20 TRIS-HCl, 1 EDTA, 25 NaCl, pH 7,4) resuspendiert und deren Proteingehalt nach der Methode von Bradford (1976, 2.3.1.) ermittelt.

2.9.2. MESSUNG DER ADENYLYL ZYKLASE AKTIVITÄT AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Die Reaktionsansätze zur Bestimmung der AZ Aktivität wurden in Gegenwart der folgenden Substanzen inkubiert: Guanosintriphosphat (GTP, Konzentration im Assay 10 µM), Isoprenalin (ISO, 100 µM), Natriumfluorid (NaF, 10 mM), Forskolin (100 µM) und Mangan (Mn²⁺, 10 mM). Die jeweiligen Ansätze wurden mit Proben für Leerwerte (ohne Membranen und Stimulanzen) und Basalwerte (mit Membranen, ohne Stimulanzen) komplettiert. Die Inkubationsansätze umfassten ein Gesamtvolumen von 100 µl mit folgender Zusammensetzung:

- Aqua dest. (µl: Leerwert 50; Basalwert, NaF und Forskolin 30 ; GTP 20 ; ISO 10),
- 10 µl Adenosindeaminase (ADA, 1786 units/ml),
- 10 µl GTP (1 mM, nur GTP und ISO),
- 10 µl ISO (1 mM, nur ISO),
- 16,5 µl Inkubationspuffer A (mM: 40 HEPES, 5 MgCl₂, 1 EDTA, 5 Kreatinphosphat, 0,5 ATP, 0,1 cAMP, 50 U/ml Kreatin-Kinase),
- 20 µl Membranpräparation (außer Leerwert, eingestellt auf 30 - 40 µg/ml Protein),
- 23,5 µl Aqua dest. mit ~10⁶ cpm α-[³²P]-ATP (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol).

Die jeweiligen Bestimmungen zur AZ Aktivität in Gegenwart von Mangan (Basalwert und 10 mM Mn^{2+}) erfolgten in Inkubationspuffer B (Inkubationspuffer A ohne $MgCl_2$). Sämtliche Ansätze wurden für 10 Minuten bei 30 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung (mM: 50 TRIS-HCl, 40 ATP, 1,4 cAMP; 2 % SDS, ~8000 cpm [3H]-cAMP, spezifische Radioaktivität: 31,7 Ci/mmol; pH 7,5) terminiert. Mit Hilfe des radioaktiv markierten cAMPs (120 bis 150 pM) erfolgte die Bestimmung der Effizienz der verwendeten Säulen (siehe unten).

Zur Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde das Probenvolumen mit destilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt, übertragen auf mit Dowex[®] Anionen-Austauschern (Porengröße 200 – 400) bestückte Säulen und α -[^{32}P]-ATP nach Zugabe von 2×1 ml destilliertem Wasser eluiert. Die Säulen wurden im nächsten Schritt über Alumina-Säulen positioniert, um [^{32}P]-cAMP und [3H]-cAMP mit 4 ml Wasser zu binden und von nicht umgesetztem α -[^{32}P]-ATP abzutrennen. Abschließend wurden die Alumina-Säulen des Ansatzes auf Scintillationsvials übertragen und [^{32}P]-cAMP bzw. [3H]-cAMP mit Hilfe von 5 ml 0,1 M Imidazol (pH 7,3) in die Countergefäße eluiert. Dem Eluat wurden 15 ml Scintillator hinzugefügt und die Radioaktivität in einem Beta-Counter mit 42 % Zählrohr gemessen. Errechnete Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen wurden der Auswertung zugrunde gelegt.

Die Erfassung der tatsächlichen [3H]-cAMP Konzentration und die Menge des eingesetzten α -[^{32}P]-ATP für den jeweiligen Inkubationsassay erfolgte über die Detektion der entsprechenden Radioaktivität, die den Inkubationsansätzen hinzugefügt wurde. Auf diesem Weg konnte der cAMP Verlust jeder verwendeten Säule anhand der gemessenen Probenradioaktivität ermittelt werden.

Die verwendeten Säulenfüllungen mussten grundsätzlich vor jedem neuen Inkubationsansatz bzw. nach der Reaktion regeneriert werden. Dowex[®] 50W- \times 4 Säulen wurden zunächst durch Zugabe von 5 ml einer Suspension bestehend aus 75 g Dowex[®] 50W- \times 4 in 375 ml Aqua dest. vorbereitet. Unmittelbar vor jedem Assay wurde zweimal mit je 5 ml 1 N HCl gefolgt von zweimal 5 ml Aqua dest. äquilibriert. Nach Abschluss der Untersuchungen wurde den Säulen 5 ml Aqua dest. sowie 5 ml 1 N HCl zugesetzt. Die Aufbewahrung dieser Säulen erfolgte in 1 N HCl bei Raumtemperatur. Alumina-Anionenaustauscher-Säulen wurden mit je 5 ml einer Suspension von 55 g Alumina auf 472 ml Aqua dest. präpariert und dreimal mit 5 ml 1 M Imidazol (pH 7,3) vor Beginn und nach Abschluss einer Bestimmung gewaschen. Die Aufbewahrung dieser Säulen erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur.

2.10. BESTIMMUNG DES cAMP GEHALTES IN KARDIOMYOZYTEN

Die Ermittlung der AZ Aktivität in Kardiomyozyten erfolgte über die direkte Konzentrationsbestimmung des cAMPs. Die isolierten Kardiomyozyten (2.3.2.) wurden zweifach zentrifugiert (80 g, 10 min, 25 °C) und jeweils in PBS-Puffer resuspendiert. Für die weiteren Präparationsschritte wurde dem Puffer der Phosphodiesteraseinhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 100 µM) zugesetzt. Die nachfolgende Inkubation einer definierten Anzahl von Kardiomyozyten ($2,5 \times 10^5$ Zellen) erfolgte für 15 min bei 37 °C in einem Reaktionsansatz von 330 µl mit folgender Zusammensetzung:

- 300 µl Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen)
- 30 µl (Basal) bzw. 20 µl (ISO) PBS + IBMX (100 µM)
- 10 µl (–)-Isoprenalin (Konzentration im Assay 100 µM)

Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen bei 95 °C (Zellyse) gestoppt. Nach Abkühlung der Proben auf Eis wurde das Zellplasma von den korpuskulären Bestandteilen abzentrifugiert (12000 g, 10 min, 25 °C), dem erzielten Überstand 2×100 µl entnommen und diese Proben bei –80 °C gelagert. Die abschließende Bestimmung des cAMP Gehalts erfolgte unter Anwendung eines [³H]-cAMP Radio-Assay-Kits nach der Proteinbindungsmethode (Gilman, 1970; Schwabe et al., 1972). Dieser Assay basiert auf der kompetitiven Bindung von unmarkiertem cAMP und einem definierten Betrag an tritiiertem cAMP an ein spezifisches Bindungsprotein mit hoher Affinität für cAMP. Der Anteil des proteinadsorbierten radioaktiven cAMPs ist dem nichtmarkierten cAMP Gehalt umgekehrt proportional.

2.11. KONTRAKTIONSMESSUNGEN AN VENTRIKULÄREN MUSKELSTREIFEN

2.11.1. PRÄPARATION DER VENTRIKELSTREIFEN

Die narkotisierten Ratten (2.2.) wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nach bilateraler Thorakotomie wurde das noch schlagende Herz entnommen und in begaste (95 % O₂, 5 % CO₂) Tyrode-Lösung (mM: 136,9 NaCl, 5,4 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,05 MgSO₄, 0,42 NaH₂PO₄, 25,0 NaHCO₃, 9,7 D-Glucose bei 37 °C) überführt. Das Herz wurde mit Hilfe von Nadeln auf Wachs in einer, mit begaster Tyrode-Lösung gefüllten Glasschale fixiert und beide Vorhöfe abgetrennt. Der rechte Ventrikel wurde isoliert und der linke Ventrikel durch Schneiden von

der Aorta zur Herzspitze entlang der Herzvorderwand geöffnet. Die Papillarmuskeln wurden entfernt und aus beiden offen liegenden Ventrikeln entlang der Gewebetextur je zwei Ventrikelstreifen geschnitten (Länge 6 bis 8 mm, Breite 1 bis 2 mm). Für ein Herz ($n=1$) konnten somit vier Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK, zwei pro Ventrikel) aufgenommen werden.

Die frisch präparierten Ventrikelstreifen wurden zwischen den Platin-Elektroden des Organbades (Eigenbau des Hauses) fixiert. Zur Ermittlung der Reizspannung (Rechteckreiz: Breite 5 ms, Frequenz 1 Hz) erfolgte die Stimulation der Gewebestreifen mit steigender Spannung. Die Spannung mit einem ersten sichtbaren Ausschlag wurde als Schwellenwert festgehalten. In den sich anschließenden Versuchen erfolgte die Reizung der Muskelstreifen mit dem 1,5fachen des entsprechenden Schwellenwertes (2,4 V). Die entwickelte Kontraktion der Präparate (unter einer Vorlast von 9,81 mN) wurde über einen Kraftaufnehmer auf einem Hellige-Rekorder registriert, als Ausschlag quantifiziert und ausgewertet.

2.11.2. ERMITTLUNG KUMULATIVER KONZENTRATIONS-WIRKUNGS-KURVEN

Das Organbad beinhaltete 10 ml Tyrode-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4. Es erfolgte permanente Begasung der Lösung mit Carbogen. Mittels einer Umwälzpumpe wurde das Organbad auf 37 °C beheizt. Die Registriereinheit wurde mit einer Vorlast von 9,81 mN auf einen Zeigerausschlag von 60 mm bei einer Verstärkung von 2 mV geeicht. Nach Vorspannung der Muskelstreifen auf 2 mN erfolgte die Reizung der präparierten Ventrikelstreifen über die Platin-Elektroden. Der verwendete Stimulator lieferte Rechteckimpulse von 5 ms Dauer bei einer Frequenz von 1 Hz. Die Aufzeichnung der Kontraktionen erfolgte als Amplitudenausschlag (in mm) mit Hilfe der Registriereinheit und wurde anschließend entsprechend der Eichkurve für die Auswertung in mN umgerechnet.

Die fixierten Ventrikelstreifen äquilibrierten vor Beginn der Kontraktionsuntersuchungen für mindestens 60 Minuten in Tyrode-Lösung. Die Stimulation der Muskelstreifen erfolgte durch Isoprenalin (0,1 nM bis 1 μ M), Noradrenalin (1 nM bis 1 mM) und Endothelin (1 nM bis 300 nM). Kontraktile Experimente mit Noradrenalin (NA) wurden in Gegenwart des unspezifischen β -AR Blockers Propranolol (100 nM) sowie des NA Uptake Inhibitors Kokain (10 μ M) durchgeführt. Kumulative KWK wurden in halblogarithmischen Schritten aufgenommen (van Rossum, 1963) und die Kontraktionszunahme innerhalb weniger Sekunden in einem beobachteten Maximum festgehalten. Nach Erreichen eines Kontraktionsplateaus für die jeweilige Konzentration wurde erneut der entsprechende Agonist zugesetzt. Die Interpretation der

Kontraktionskraftänderungen erfolgte nach Abzug der Basalwerte von den einzelnen Ergebniswerten anhand folgender Gleichung für KWK (aus Motulsky, 1996):

$$Y = [Basal] + \frac{[Maximum] - [Basal]}{1 + 10^{[\log(EC50) - X] \cdot Hillslope}} \quad (10)$$

Y	=	abhängige Größe (Kontraktion in mN)
X	=	dekadischer Logarithmus der Konzentration
$[Maximum]$	=	maximal erreichbare Wirkung (oberes Plateau)
$[Basal]$	=	Wirkung unter basalen Bedingungen (unteres Plateau)
EC_{50}	=	Konzentration bei der 50 % der maximalen Wirkung ($[Maximum] - [Basal]$) erzielt wird

Wie aus Gleichung (10) ersichtlich, entfällt der *Hillslope* im Fall eines konstanten Kurvenanstiegs ($n=1$) bei gleicher Affinität des Agonisten gegenüber Rezeptorsubtypen. Für die Auswertung sämtlicher KWK inotroper Untersuchungen mit Isoprenalin, Noradrenalin bzw. Endothelin wurden die Messwerte über nichtlineare Kurvenregression an sigmoidale Graphen mit einem fixen Hill-Koeffizienten von $n=1$ angepasst.

Im Anschluss an die Messungen wurden die Ventrikelstreifen dreimal mit Tyrode-Lösung gespült und wiederholt für mindestens 30 Minuten äquilibriert. Für sämtliche Muskelstreifen wurden abschließend kumulative Calcium KWK (4,3 mM bis 13,3 mM) gemessen, um die funktionelle Intaktheit der Muskelpräparationen verifizieren zu können.

2.12. STATISTIK

In Text und Abbildungen aufgeführte, experimentell ermittelte Daten sämtlicher Untersuchungen entsprechen dem arithmetischen Mittel aller durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichung des Mittelwertes (SEM). Sofern nicht explizit hervorgehoben, setzen sich diese Mittelwerte aus mindestens 5 unabhängigen Experimenten zusammen.

Die Genauigkeit der Verdrängungskurven für eine oder zwei Bindungsstellen wurde statistisch mit Hilfe des F-Tests ermittelt. Unter Anwendung des Student's t-Tests für ungepaarte Proben wurde die Signifikanz von Unterschieden zwischen Mittelwerten ermittelt. Ein ausgewiesener P-Wert kleiner 0,05 wurde für beide Tests als signifikant betrachtet. Sämtliche statistische Kalkulationen wurden mit Hilfe des PC-Programms GraphPadTMPrism[®] 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien; USA) durchgeführt.

2.13. VERWENDETE CHEMIKALIEN

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim; Deutschland
Adenosin-3:5-monophosphat, zyklisch (cAMP)	Boehringer Mannheim; Deutschland
Alumina	Alumina für Säulenchromatographie, Sigma, Deisenhofen; Deutschland
AS/7	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
α -, γ -[³² P]-ATP	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
BQ-123	Saxon Biochemicals GmbH, Hannover; Deutschland
[³ H]-cAMP	Amersham-Buchler, Braunschweig; Deutschland
[³ H]-cAMP RIA-Kit	Amersham-Buchler, Braunschweig; Deutschland
Desipramin	Research Biochemicals International, Natick; USA
Dowex [®] 50W- \times 4	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien; USA
[¹²⁵ J]-Endothelin 1	Amersham-Buchler, Braunschweig; Deutschland
Forskolin	Calbiochem-Novabiochem Corporation La Jolla; USA
Guanosin-Triphosphat (GTP)	Boehringer Mannheim; Deutschland
Heparin	Biochrom KG, Berlin; Deutschland
(-)-[¹²⁵ J]-Jodcyanopindolol	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
Lumasafe [™] Plus	LUMA*LSC B.V., Groningen; Niederlande
2-Mercaptoethanol	Ferak, Berlin; Deutschland
[³ H]-Myoinositol	Amersham-Buchler, Braunschweig; Deutschland
[³ H]-Nisoxetin	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
Nonfat Dry Milk	Topco [®] Assoc., Inc. Illinois; USA
DL-[7- ³ H(N)]-Noradrenalinhydrochlorid	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
Pentobarbital	United Pharmaceutical Works, Praha; Tschechien
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom KG, Berlin; Deutschland
[³ H]-Prazosin	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
[¹²⁵ J]-Protein A	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
QL-Antiserum	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe; Deutschland

RM/1	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien
[N-Methyl- ³ H]-Scopolaminmethylchlorid	New England Nuclear/DuPont, Brüssel; Belgien

Sigma (Deisenhofen; Deutschland):

- Adenosindesaminase
- Alumina für Säulenchromatographie
- Atropinsulfat
- Bovine Serum Albumine
- Cocain
- Corticosteron
- Crotaline
- Imidazol
- (-)-Isoprenalinbitartrat
- Kaliumchlorid
- Kreatinkinase
- Kreatinphosphat
- Medium M199
- Nialamid
- (-)-Noradrenalinhydrochlorid
- Phentolamin
- Polyethylenimin
- Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)
- (±)-Propranololhydrochlorid

Merck (Darmstadt; Deutschland):

- Natriumfluorid
- (-)-N-Methylscopolaminnitrat
- Vinyl-Copolymer mit Phenylboronsäure
- LiChrosphor 100, RP 18ec

Folgende Chemikalien wurden freundlicherweise von Firmen zur Verfügung gestellt:

- (±)-CGP 12177 (±)-4-(3-Tertiärbutylamino-2-hydroxypropoxy)-benzimidazole-2-on und CGP 20712A (1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethylimidazolyl)-phenoxy]-2-propanol von Ciba-Geigy (Basel; Schweiz)
- ICI 118,551 (Erythro-(±)-1-(7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol) von ICI Pharma (Plankstadt; Deutschland)
- IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) von Sigma, Deisenhofen; Deutschland
- Ro 47-0203 (Bosentan) von Hoffmann-La Roche, Basel; Schweiz

LÖSUNGEN ZUR KARDIOMYOZYTEN ISOLIERUNG

JOKLIK-MEM (Sigma, Deisenhofen; Deutschland):

- Auflösen der Festsubstanz unter leichtem Rühren
- Zugabe von 2g / 1000ml wasserfreiem NaCO₃
- Einstellung des pH Wertes auf 7,0
- sterile Filtration über Filter (Falcon 7111)

Lösung A (mM):

- 440 ml	JOKLIK-MEM (Gibco-BRL)
- 24,0	NACO ₃
- 0,6	MgSO ₄
- 1,0	DL-Carnitin

- 10,0 Creatine
 - 20,0 Taurin
 - 5-8 Tropfen 5 N HCl
- Lösung B:
- 300 ml Lösung A
 - 60-180 U/ml Trypsin
 - 1,5 ml CaCl₂ (100 mM)
- Lösung C:
- 150 ml Lösung A
 - 60-180 U/ml Trypsin
 - 150 mg BSA
- Lösung D:
- 130 ml Lösung A
 - 130 µl CaCl₂ (100 mM)
 - 150 mg BSA
- Lösung E:
- Medium M 199
 - 10% Newborn calf serum
 - 1% Penicillin/Streptomycin

Alle Lösungen wurden mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast.

2.14. VERWENDETE GERÄTE

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Auto-Gamma Cobra TM II Bio-Imaging Analyzer BAS 2000	Canberra-Packard, Meriden; USA Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt; Deutschland
Filtrationstopf Gewebezerhacker	Millipore GmbH, Eschborn; Deutschland Bachhofer GmbH, Reutlingen; Deutschland
Harvester	Brandel Biomedical Research and Development Lab. Inc., Gaithersburg; USA
Hellige Rekorder Liquid Szintillation Analyzer Nr.2250CA	Hellige GmbH, Freiburg; Deutschland Packard Instrument Company, Meriden; USA
McIlwain Tissue-Chopper Millipore-Vakuumfiltrationstopf Sedgewick-Rafter Cell S50	Bachhofer, Reutlingen; Deutschland Millipore GmbH, Eschborn; Deutschland Pyser, Edenbridge; Großbritannien
Photofilme Potter S Registriereinheit	Fuji Photo Film Co. LTD, Japan B.Braun Melsungen AG Servomed, Fa Hellige, Freiburg im Breisgau; Deutschland
Respirator Sonifier	TSE GmbH, Kronberg; Deutschland Branson Instruments, Danbury, Connecticut; USA
Spektrophotometer DU [®] 520	Beckman Instruments, Inc., Fullerton; USA

Stimulator II	Hugo Sachs, March-Hugstetten; Deutschland
Tri-Carb [®] Liquid Szintillation Analyzer Nr.2250CA	Packard Instrument Company, Meriden; USA
Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik GmbH & Co-KG, Staufen; Deutschland
Umwälzpumpe	Colora Messtechnik GmbH, Lorch; Deutschland
Vakuumfiltrationsanlage	Brandel Biomedical Research and Development Lab. Inc., Gaithersburg; USA
Zentrifugen:	
Sorvall [®] RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	DuPont Company, Newtown; USA
Sorvall [®] RT 6000D	DuPont Company, Newtown; USA
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf GmbH, Hamburg; Deutschland
Biofuge fresco	Kendro, Osterode; Deutschland

EINMALARTIKEL

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Counterröhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen; Deutschland
Glasfilter Whatman GF/C	Whatman, Inc., Clifton, NJ; USA
Nitrocellulose-Membranen	Hybond ECL, Amersham, Braunschweig; Deutschland
Nylonmesh (250 × 250 µm)	NeoLab [®] , Heidelberg; Deutschland
Fimlplatten	Kodak, Biomax MS-1, Sigma, Deisenhofen; Deutschland
Scintillatorgefäße	Greiner Labortechnik, Frickenhausen; Deutschland

3. ERGEBNISSE

3.1. CHARAKTERISIERUNG DES MONOCROTALIN-MODELLS

3.1.1. FUTTERAUFNAHME, KÖRPERGEWICHT, HERZGEWICHT

Zwei bis drei Tage nach Injektion des Pyrrolizidinalkaloids Monocrotalin war die Futteraufnahme der MCT-behandelten Tiere gegenüber den Kontrollen reduziert. Im weiteren Versuchsverlauf entsprachen jedoch sowohl deren Futteraufnahme als auch die Gewichtszunahme den Werten der Kontrolltiere. Ab etwa vier Wochen nach MCT-Injektion entwickelten ca. 50 % der Tiere Symptome eines schwerwiegenden Krankheitsverlaufes (Kachexie, Dys- bzw. Tachypnoe, periphere Zyanose). Kennzeichnend für diese Tiere war neben einer ausgeprägten rechtsventrikulären Hypertrophie das Vorhandensein von Pleura-, Pericardial- und/oder Peritonealergüssen. Aufgrund dieser Ödeme wurden die Tiere als insuffizient (RVF) klassifiziert. Die verbliebenen MCT-injizierten Ratten mit einer offensichtlich milderen Symptomatik gaben hingegen keine Anzeichen einer Stauungsinsuffizienz (RVH) zu erkennen.

Sämtliche MCT-behandelten Tiere zeigten eine signifikante Hypertrophie des rechten Ventrikels (Tab. 1). Für RVH-Tiere wurde hierbei eine rechtsventrikuläre Gewichtszunahme um 120 % bzw. für RVF-Ratten ein Anstieg um 138 % ermittelt. Die Hypertrophie des rechten Ventrikels war damit für RVF-Ratten stärker ausgeprägt (Tab. 1). Linke Ventrikel zeigten ebenso eine signifikante Erhöhung in deren Nassgewichten von RVH- und RVF-Ratten gegenüber Kontrollen. Das Verhältnis des linken zum rechten Ventrikel, als Körpergewichts-unabhängiger Index einer kardialen Hypertrophie, war infolge der ausgeprägteren Rechtsherzhypertrophie nach MCT-Applikation deutlich erniedrigt.

	KONTROLLE (n=100)	RVH (n=50)	RVF (n=50)
Körpergewicht	264,1 ± 2,9	248,1 ± 8,2 [*]	246,8 ± 7,5 [*]
Herz	725,8 ± 8,1	1081,2 ± 32,6 ^{**}	1068,2 ± 26,4 ^{**}
RV	148,4 ± 3,0	326,9 ± 12,7 ^{**}	353,8 ± 10,6 ^{**}
LV	492,7 ± 5,8	565,9 ± 18,8 ^{**}	531,6 ± 12,3 [*]
LV/RV	3,4 ± 0,06	1,8 ± 0,07 ^{**}	1,6 ± 0,05 ^{**a}
Lunge	1,3 ± 0,02	2,4 ± 0,12 ^{**}	2,1 ± 0,10 ^{**}

Tab. 1: Körper- (g), Herz- (mg), RV- (mg), LV- (mg) und Lungengewichte (g) von Monocrotalin-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. MW ± SEM aus jeweils n Experimenten, RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel. ^{*}) P<0,05 vs. Kontrolle, ^{**}) P<0,0001 vs. Kontrolle, ^a) P<0,05 vs. RVH.

Die Gegenüberstellung der Körpergewichte ergab ferner eine signifikante Reduktion für MCT-Ratten (Tab. 1). Das Ausmaß dieser Körpergewichtsabnahme war dabei für RVH- und RVF-Ratten identisch. Die ermittelten Lungen-Nassgewichte zeigten sich für alle MCT-Tiere

durchweg erhöht. Es wurde kein Unterschied zwischen RVH- und RVF-Tieren festgestellt (Tab. 1).

3.1.2. NORADRENALINGEHALT

Im totalen Noradrenalingehalt bestand ein signifikanter Unterschied ($P < 0,01$) zwischen rechten und linken Ventrikeln Saline-behandelter Kontrollratten. Die Umrechnung des Noradrenalingehalts auf die jeweiligen Ventrikelgewichte ergab demgegenüber keine Signifikanz ($P = 0,054$, Tab. 2).

Vier bis sechs Wochen nach MCT-Injektion wurde eine signifikante Reduktion im totalen Noradrenalingehalt ausschließlich in rechts- und linksventrikulärem Gewebe von RVF-Tieren gemessen (Tab. 2). Linksventrikuläre Abnahme war darüber hinaus signifikant verschieden von RVH-Ratten. Letztere zeigten keine Veränderungen im totalen Noradrenalingehalt gegenüber Kontrolltieren (Tab. 2).

Im Noradrenalingehalt pro mg rechtsventrikuläres Gewebe wurde auf der anderen Seite für RVH- und RVF-Tiere eine signifikante Verringerung beobachtet. Diese Reduktion erwies sich für RVF-Tiere stärker ausgeprägt als für RVH-Ratten (Tab. 2).

	KONTROLLE (n=6)	RVH (n=5)	RVF (n=5)
RV			
NA pro Ventrikel	41,3 ± 5,4	31,0 ± 10,3	13,6 ± 3,7*
NA pro mg Ventrikel	369,5 ± 44,1	162,8 ± 55,0*	58,4 ± 15,5**
LV			
NA pro Ventrikel	105,5 ± 10,9	113,4 ± 23,1	50,2 ± 9,3 ^a
NA pro mg Ventrikel	258,9 ± 24,9	264,9 ± 28,9	104,4 ± 20,4 ^a

Tab. 2: Totaler Noradrenalin-(NA)-gehalt pro Ventrikel (ng) bzw. pro mg Ventrikel (pg) in rechts- (RV) und linksventrikulärem (LV) Gewebe von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. MW ± SEM aus jeweils n Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle, **) $P = 0,0002$ vs. Kontrolle, ^a) $P < 0,05$ vs. RVH.

Entsprechende Untersuchungen am linken Ventrikel zeigten eine Abnahme im Noradrenalingehalt je mg Gewebe ausschließlich für RVF-Ratten jedoch nicht für RVH-Tiere (Tab. 2).

Die Messungen zur PlasmanoradrenalinKonzentration ergaben für MCT-behandelte Ratten mit 322 ± 120 pg/ml Plasma (n=4) höhere Werte als die Plasmaproben der jeweiligen Kontrollen (165 ± 13 pg/ml Plasma, n=4). Der Anstieg war jedoch nicht signifikant ($P = 0,24$).

3.2. UNTERSUCHUNGEN ZUM NORADRENALINTRANSPORTER (NAT, UPTAKE₁)

3.2.1. BESTIMMUNG DER NAT DICHTEN IN VENTRIKULÄREN MEMBRANSUSPENSIONEN

Die Anzahl der Nisoxetin-Bindungsstellen war in den Membransuspensionen des hypertrophierten rechten Ventrikels signifikant gegenüber Kontrollen erniedrigt ($P < 0,05$; Tab. 3).

	KONTROLLE (n=5)	MCT (n=10)
RV		
B_{\max}	$125,9 \pm 9,1$	$73,7 \pm 14,4^*$
K_D	$1,1 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,2$
LV		
B_{\max}	$123,0 \pm 7,7$	$108,0 \pm 9,7$
K_D	$1,2 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,2$

Tab. 3: Maximale Bindung B_{\max} (fmol/mg Protein) und Dissoziationskonstanten K_D (pM) des Radioliganden [³H]-Nisoxetin an kardialen Membranpräparationen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten und Kontrollratten. MW \pm SEM aus jeweils n Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

Linksventrikuläre Präparationen zeigten eine reduzierte NAT Dichte, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erzielen. Für den Radioliganden [³H]-Nisoxetin wurden keine Unterschiede in dessen Affinität zwischen Kontroll- und MCT-Ratten beobachtet (Tab. 3).

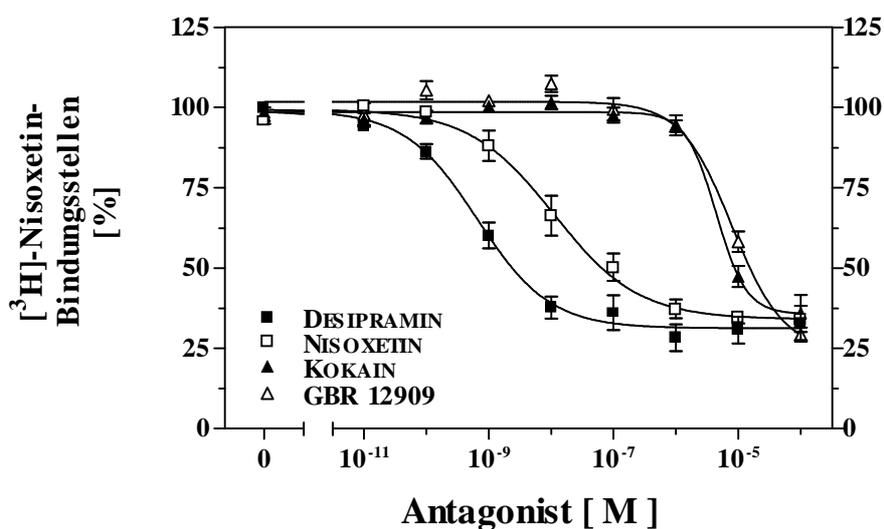


Abb. 1: Konkurrenzexperimente zur Charakterisierung der NAT Bindungsstellen in Gegenwart steigender Konzentrationen der Uptake₁-Inhibitoren Desipramin (■) und Nisoxetin (□), des Uptake-Inhibitors Kokain (▲) sowie des Dopamin Uptake-Inhibitors GBR 12909 (Δ) in linksventrikulären Gewebeslices von Kontrollratten. Ordinate: Spezifische [³H]-Nisoxetin Bindung in % der totalen Bindungsstellen (=100 %). Abszisse: Molare Konzentrationen der jeweiligen Antagonisten. MW \pm SEM aus jeweils 5 Experimenten.

In Konkurrenzexperimenten zur Charakterisierung der [^3H]-Nisoxetin Bindungsstellen an Gewebeslices linker Ventrikel von Kontroll-Ratten verdrängten die selektiven Uptake₁-Inhibitoren Desipramin (IC_{50} : $0,7 \pm 0,09$ nM) und Nisoxetin (IC_{50} : $10,7 \pm 1,1$ nM) Tritium-markiertes Nisoxetin mit höherer Potenz aus dessen Kopplungsstellen als der Uptake-Inhibitor Kokain (IC_{50} : $3,2 \pm 0,13$ μM) und der Dopamin Uptake-Inhibitor GBR 12909 (IC_{50} : $4,7 \pm 0,14$ μM ; Abb. 1). Die Hill-Koeffizienten der entsprechenden Kurven lagen zwischen 0,63 und 1,72.

3.2.2. MESSUNG DER NAT AKTIVITÄT

Die NAT Aktivität war mit $154,4 \pm 16,5$ pmol NA/mg RV 15 min ($n=3$) tendenziell höher in rechten Ventrikeln von Kontrollen verglichen mit linksventrikulären Kontrolllices ($115,2 \pm 15,8$ pmol NA/mg LV 15 min, $n=3$; Abb. 2a/b).

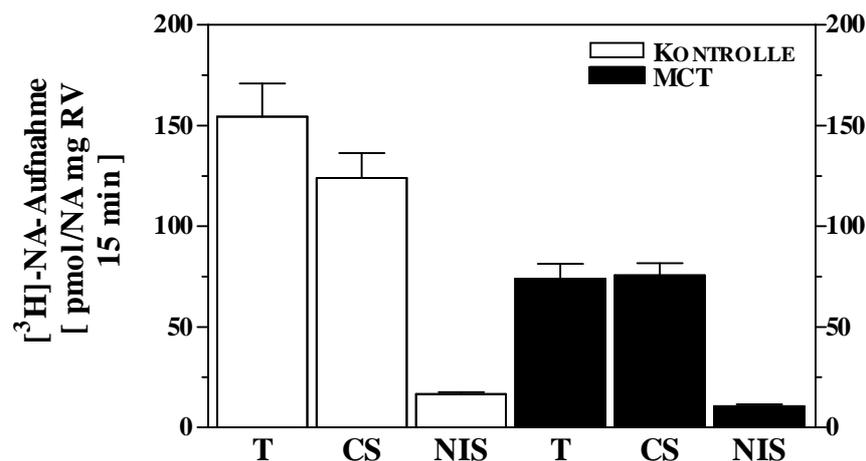


Abb. 2a: Akkumulation von exogenem [^3H]-NA (25 nM) in rechtsventrikulären Gewebepartien von MCT-behandelten und Kontrollratten: Totale (T) [^3H]-NA Aufnahme bzw. in Gegenwart von 40 μM des Uptake₂-Inhibitors Corticosteron (CS) und 1 μM des Uptake₁-Inhibitors Nisoxetin (NIS). Ordinate: Spezifische [^3H]-NA Aufnahme in pmol NA pro mg RV pro 15 min. MW \pm SEM aus 3 (Kontrolle, MCT) Experimenten.

Mit dem Ziel einer qualitativen Charakterisierung der NAT Aktivität wurde den Assayproben der spezifische Uptake₂-Inhibitor Corticosteron (40 μM) bzw. der Uptake₁-Inhibitor Nisoxetin (1 μM) zugesetzt (Abb. 2a/b). Unter diesen Bedingungen vermochte Nisoxetin die untersuchte [^3H]-NA Aufnahme nahezu vollständig in Gewebepreparationen des rechten Ventrikels von Kontrollratten zu unterbinden ($16,7 \pm 0,9$ pmol NA/mg RV 15 min, $n=3$; Abb. 2a). Der Uptake₂-Inhibitor Corticosteron ($124,0 \pm 12,0$ pmol NA/mg RV 15 min, $n=3$) hatte hingegen keinen Einfluss auf die totale [^3H]-NA Transportrate (Abb. 2a).

Nach MCT-Injektion zeigte sich eine signifikante Reduktion in der NA Transportrate rechtsventrikulärer Gewebeslices ($73,7 \pm 7,5$ pmol NA/mg RV 15 min, $n=3$). In Gegenwart von Corticosteron ($75,5 \pm 6,1$ pmol NA/mg RV 15 min, $n=3$) wurde wiederum kein Unterschied gegenüber der maximalen [^3H]-NA Aufnahme ohne Inhibitoren beobachtet. Jedoch war die NA Transportrate durch Nisoxetin nahezu vollständig reduziert ($10,5 \pm 0,9$ pmol NA/mg RV 15 min, $n=3$; Abb. 2a).

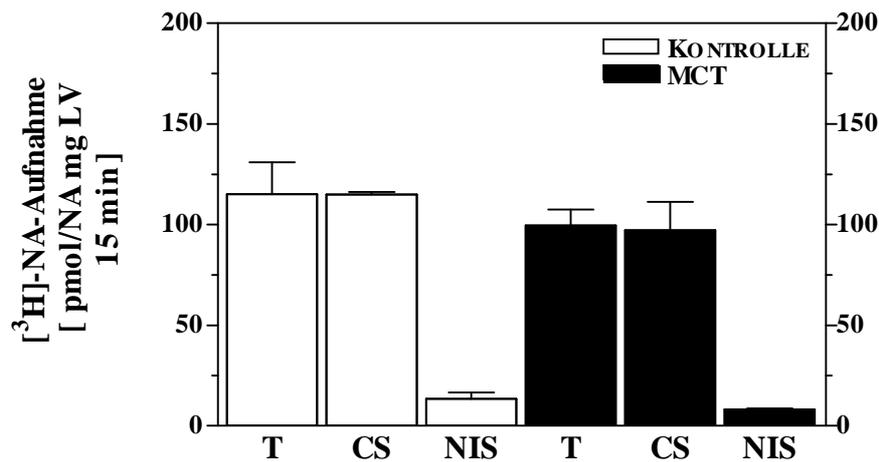


Abb. 2b: Akkumulation von exogenem [^3H]-NA (25 nM) in linksventrikulären Gewebepartien von MCT-behandelten und Kontrollratten: Totale (T) [^3H]-NA Aufnahme bzw. in Gegenwart von 40 μM des Uptake₂-Inhibitors Corticosteron (CS) und 1 μM des Uptake₁-Inhibitors Nisoxetin (NIS). Ordinate: Spezifische [^3H]-NA Aufnahme in pmol NA pro mg LV pro 15 min. MW \pm SEM aus jeweils 3 (Kontrolle, MCT) Experimenten.

Entgegen den rechtsventrikulären Befunden ergaben die Aufarbeitungen linker Ventrikel von MCT-behandelten Ratten mit $99,5 \pm 8,0$ pmol NA/mg LV 15 min ($n=3$) keine Veränderung in der spezifischen NAT Aktivität (Abb. 2b). Auf der anderen Seite bot sich mit der Aufnahme von 25 nM [^3H]-NA eine qualitativ gleichwertige Darstellung verglichen mit rechten Ventrikeln: Corticosteron (Uptake₂-Inhibitor) konnte den NA Uptake nicht unterbinden (Kontrolle: $115,0 \pm 1,2$ pmol NA/mg LV 15 min, $n=3$; MCT: $97,2 \pm 14,0$ pmol NA/mg LV 15 min, $n=3$), wohl aber der Uptake₁-Inhibitor Nisoxetin (Kontrolle: $13,4 \pm 3,2$ pmol NA/mg LV 15 min, $n=3$; MCT: $8,2 \pm 0,5$ pmol NA/mg LV 15 min, $n=3$; Abb. 2b).

In Konkurrenzexperimenten zur Charakterisierung des Uptake₁ hemmten Desipramin (IC_{50} : $6,9 \pm 0,03$ nM) bzw. Nisoxetin (IC_{50} : $11,8 \pm 0,11$ nM) die NAT Aktivität mit hoher Potenz. Dementgegen zeigten Kokain (IC_{50} : $3,8 \pm 0,17$ μM) und GBR 12909 (IC_{50} : $6,8 \pm 0,11$ μM) eine deutlich geringere Hemmpotenz gegenüber dem Uptake₁ (Abb. 3). Die Hill-Koeffizienten der entsprechenden Kurven lagen zwischen 0,72 und 1,17.

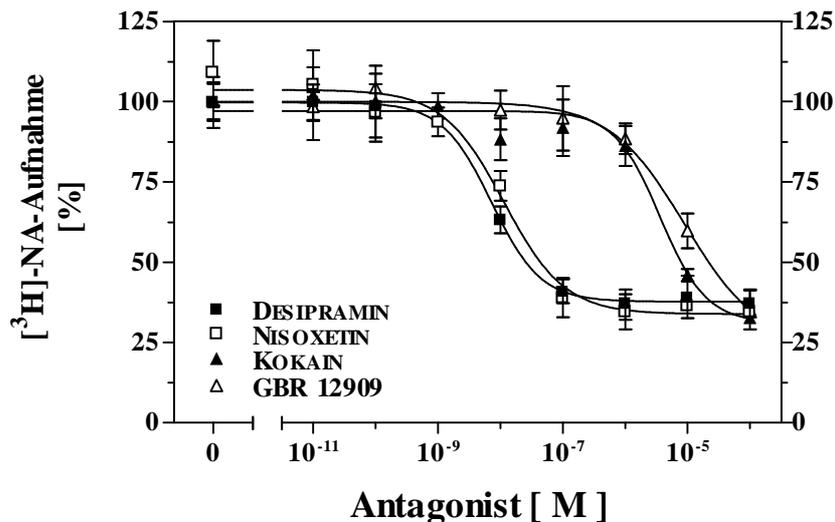


Abb. 3: Konkurrenzexperimente zur Charakterisierung des Uptake₁. Akkumulation von exogenem [³H]-NA (25 nM) in Gegenwart steigender Konzentrationen der Uptake₁-Inhibitoren Desipramin (■) und Nisoxetine (□), des Uptake-Inhibitors Kokain (▲) sowie des Dopamin Uptake-Inhibitors GBR 12909 (△) in linksventrikulären Gewebeslices von Kontrollratten. Ordinate: Spezifische [³H]-NA-Aufnahme in % der totalen [³H]-NA-Aufnahme (=100 %). Abszisse: Molare Konzentrationen der jeweiligen Antagonisten. MW ± SEM aus jeweils 5 Experimenten.

3.3. CHARAKTERISIERUNG DER KARDIALEN β-AR SIGNALTRANSDUKTION

Untersuchungen zur β-AR Signaltransduktion wurden einerseits an Membransuspensionen des rechten und linken Ventrikels durchgeführt. Auf der anderen Seite ermöglichte die Isolierung von Kardiomyozyten aus beiden Ventrikeln die Charakterisierung von β-AR an diesen kontraktiven Herzzellen. Zunächst sollen sämtliche Resultate für die ventrikulären Membransuspensionen dargestellt werden. Die Ergebnisse der Kardiomyozyten sind im Anschluss an die Ventrikelpräparationen getrennt aufgeführt.

3.3.1 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON β-AR AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

In rechtsventrikulären Membranpräparationen von Kontrolltieren lag die β-AR Dichte signifikant niedriger verglichen mit den entsprechenden linksventrikulären Aufarbeitungen ($P < 0,01$, Tab. 4).

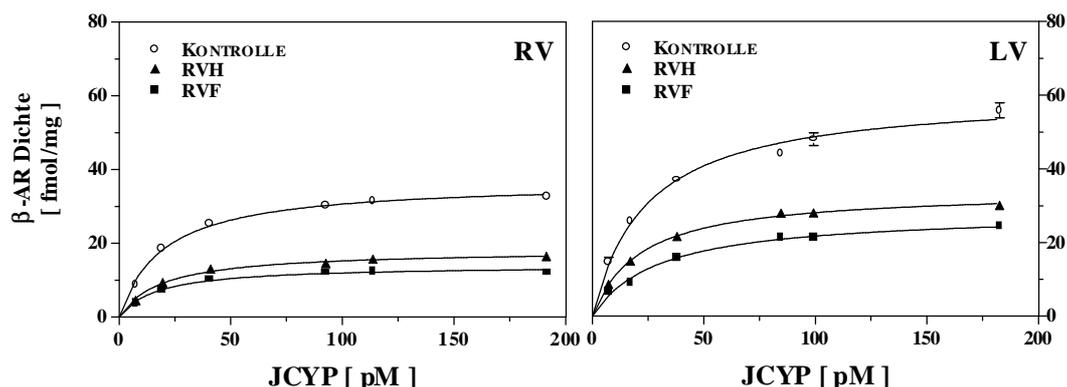


Abb. 4: Bestimmung der β -Adrenozeptor-(β -AR)-dichte in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten am Beispiel eines Radioassays. Ordinate: Spezifische JCYP Bindung (fmol/mg Protein). Abszisse: Konzentrationen von Jodycyanopindolol (JCYP, pM). MW \pm SEM aus Doppelbestimmungen eines Experiments.

	KONTROLLE (n=12)	RVH (n=11)	RVF (n=12)
RV			
B_{max}	35,7 \pm 2,5	17,3 \pm 2,5**	13,6 \pm 2,9**
K_D	26,7 \pm 1,8	25,1 \pm 1,1	25,7 \pm 1,3
β_1 -: β_2 -AR	59,4 \pm 1,6 : 40,6 \pm 1,6	55,6 \pm 2,7 : 44,4 \pm 2,7	54,0 \pm 3,2 : 46,0 \pm 3,2
pK _I β_1 -AR	8,66 \pm 0,04	8,61 \pm 0,14	8,51 \pm 0,10
pK _I β_2 -AR	5,55 \pm 0,05	6,02 \pm 0,11	5,92 \pm 0,09
LV			
B_{max}	58,0 \pm 5,5	34,0 \pm 4,2*	25,6 \pm 2,5**a
K_D	28,0 \pm 1,9	26,5 \pm 1,4	24,7 \pm 1,3
β_1 -: β_2 -AR	58,6 \pm 1,0 : 41,4 \pm 1,0	57,5 \pm 1,3 : 42,5 \pm 1,3	56,9 \pm 2,0 : 43,1 \pm 2,0
pK _I β_1 -AR	8,52 \pm 0,04	8,57 \pm 0,07	8,57 \pm 0,11
pK _I β_2 -AR	5,47 \pm 0,05	5,68 \pm 0,16	5,78 \pm 0,11

Tab. 4: β -Adrenozeptor (β -AR) Dichte B_{max} (fmol/mg Protein), K_D -Werte des Radioliganden JCYP (pM), β_1 -: β_2 -AR Verhältnis (%) und pK_I-Werte des selektiven β_1 -AR Antagonisten CGP 20712A in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. MW \pm SEM aus jeweils n Experimenten. *) P<0,05 vs. Kontrolle, **) P<0,01 vs. Kontrolle, a) P<0,05 vs. RVH.

Vier bis sechs Wochen nach MCT-Applikation war die β -AR Dichte signifikant reduziert in Rohmembransuspensionen aus rechten aber auch aus linken Ventrikeln. Für insuffiziente Ratten (RVF) erwies sich die Abnahme stärker ausgeprägt als für RVH-Tiere (Abb. 4, Tab. 4). Die Dissoziationskonstanten des Radioliganden JCYP waren unverändert (Tab. 4).

Zur Bestimmung der prozentualen Verteilung von β_1 - bzw. β_2 -AR Subtypen in Rohmembransuspensionen wurden Kompetitionsassays mit Hilfe des selektiven β_1 -AR Antagonisten CGP 20712A durchgeführt. Biphasische Verdrängungskurven kennzeichneten dabei ein β_1 -/ β_2 -AR Verhältnis von ca. 60/40 für beide Ventrikel von Kontrollen (Abb. 5, Tab. 4). Fortführende

Untersuchungen bestätigten dieses β_1 -/ β_2 -AR Verhältnis für wiederum beide Ventrikel von RVH- und RVF-Ratten (Abb. 5, Tab. 4). Die Affinität des Kompetitors CGP 20712A gegenüber β_1 -/ β_2 -AR blieb unverändert (Tab. 4).

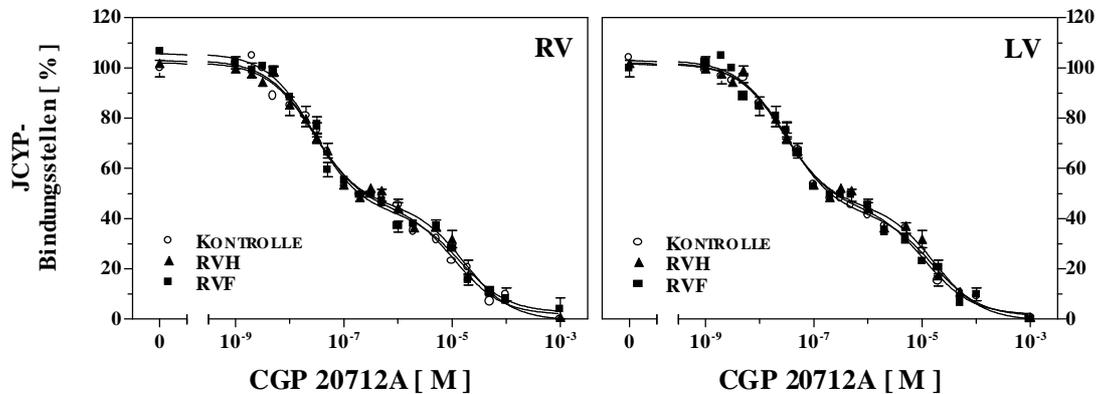


Abb. 5: Bestimmung der prozentualen β -Adrenozeptor (β -AR) Subtypverteilung mit Hilfe des selektiven β_1 -AR Antagonisten CGP 20712A in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten am Beispiel eines Radioassays. Ordinate: Spezifische JCYP Bindung in % der totalen Bindungsstellen (=100 %). Abszisse: Molare Konzentrationen von CGP 20712A. MW \pm SEM aus Doppelbestimmungen eines Experiments.

Zur Charakterisierung der funktionellen Ansprechbarkeit von β -AR gegenüber Rezeptoragonisten wurden Kompetitionsassays zur Detektion sogenannter „high (R_H) and low (R_L) affinity states“ durchgeführt. Biphasische Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) des nicht-selektiven β -AR Agonisten Isoprenalin beschrieben für ca. 45 % der β -AR eine hochaffine Kopplung an G_S -Proteine (Status R_H). Die verbliebenen 55 % entsprachen demnach β -AR im komplementären „low affinity state“. Ein R_H -/ R_L Verhältnis von 45/55 wurde sowohl an homogenen Membransuspensionen des rechten als auch des linken Ventrikels von Kontrolltieren beobachtet (Tab. 5, Abb. 6).

	KONTROLLE (n=5)	RVH (n=5)	RVF (n=5)
RV			
R _H	45,7 ± 3,7	36,0 ± 1,9 [*]	27,0 ± 2,8 ^{*a}
R _L	54,3 ± 3,7	64,0 ± 1,9 [*]	73,0 ± 2,8 ^{*a}
K _H	2,29 ± 0,77	2,66 ± 0,71	3,97 ± 0,71
K _L	371 ± 76	184 ± 44	344 ± 54
K _D	240 ± 45	188 ± 23	260 ± 31
n _H	0,78 ± 0,07	0,74 ± 0,05	0,83 ± 0,05
LV			
R _H	46,3 ± 3,4	43,5 ± 1,8	26,4 ± 2,8 ^{*a}
R _L	53,7 ± 3,4	56,5 ± 1,8	73,6 ± 2,8 ^{*a}
K _H	6,26 ± 2,41	4,91 ± 3,45	3,65 ± 1,24
K _L	1020 ± 593	277 ± 85	220 ± 12
K _D	249 ± 52	159 ± 22	267 ± 36
n _H	0,68 ± 0,05	0,73 ± 0,06	0,87 ± 0,05 [*]

Tab. 5: β -Adrenozeptoren im „high (R_H) und low (R_L) affinity state“ (%); Affinitätskonstanten (nM) für Isoprenalin in Gegenwart (K_D) und Abwesenheit (K_H bzw. K_L) von 100 μ M GTP sowie Hill-Koeffizienten (n_H) sigmoidaler GTP-Graphen für Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. MW \pm SEM aus jeweils n Experimenten. ^{*}) P<0,05 vs. Kontrolle, ^a) P<0,05 vs. RVH.

In rechtsventrikulären Membranen von RVH-Ratten hingegen war die Anzahl der R_H- β -AR mit nur 36 % signifikant verringert. Eine darüber hinausgehende Reduktion ergaben die Verdrängungsexperimente an rechten Ventrikeln insuffizienter Ratten (RVF). Lediglich 27 % der erfassten β -AR koppelten an G-Proteine im Status R_H (Tab. 5, Abb. 6). An den jeweiligen linksventrikulären Membranen wurde eine Abnahme von R_H- β -AR ausschließlich für RVF-Ratten festgestellt (Tab. 5).

Die Zugabe von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) konvertierte die biphasischen Isoprenalin-Graphen in monophasische KWK und kennzeichnete somit das Vorliegen der β -AR im niederaffinen R_L-Status (Tab. 5, Abb. 6). Für alle GTP-Graphen wurde des Weiteren eine Rechtsverschiebung festgestellt. Die jeweiligen Hill-Koeffizienten rechter Präparationen lagen zwischen 0,74 und 0,83. Für linksventrikuläre Membranen waren die Hill-Koeffizienten der RVF-Tiere signifikant verschieden von den Kontrollen (Tab. 5).

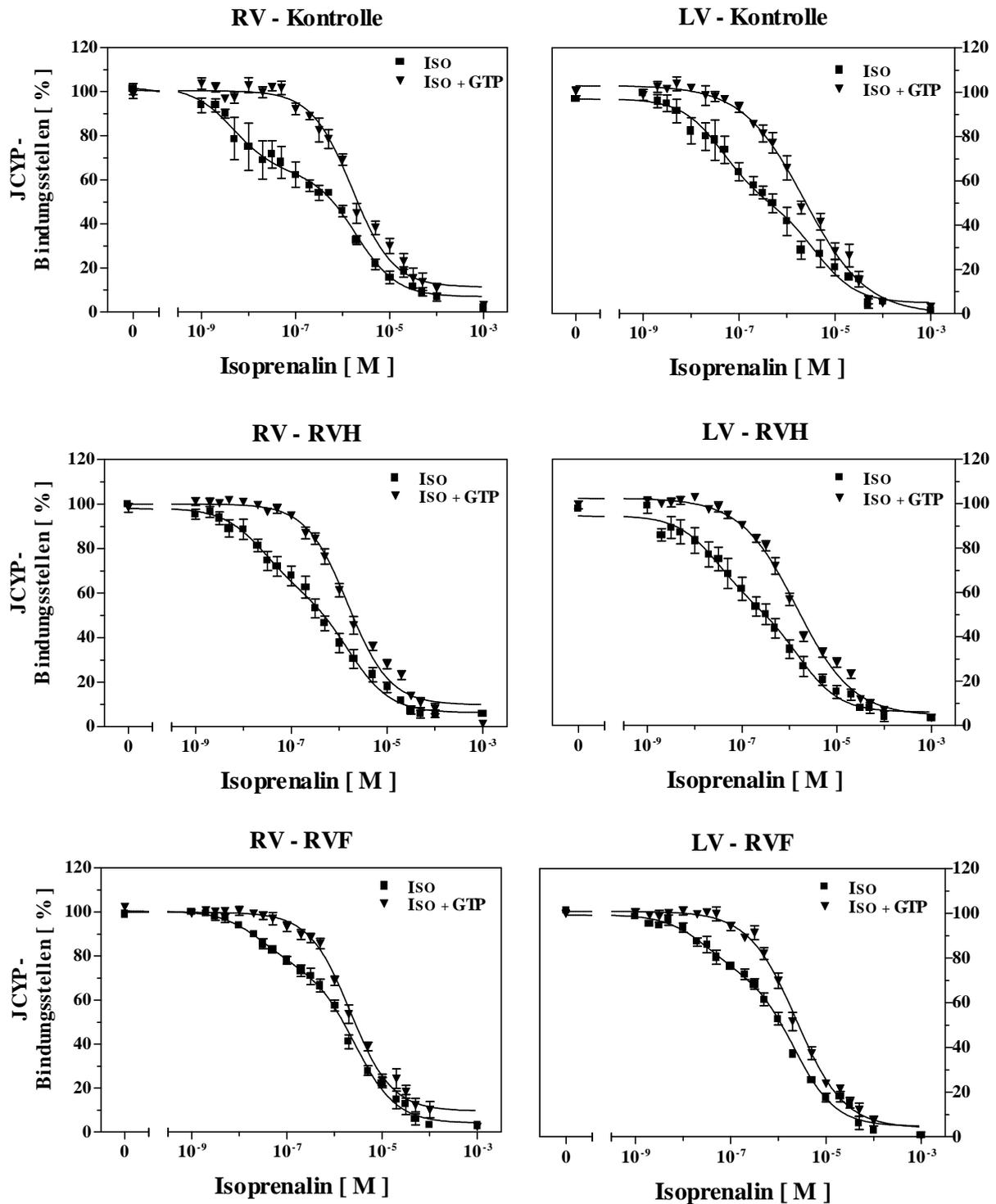


Abb. 6: Einfluss von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) auf die Verdrängung der JCYP Bindungen durch Isoprenalin (Iso) in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Spezifische JCYP Bindung in % der totalen Bindungsstellen (=100 %). Abszisse: Molare Konzentrationen von Isoprenalin. MW \pm SEM aus jeweils 5 Experimenten.

3.3.2. CHARAKTERISIERUNG DER G_{αS}-PROTEINE AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Das G_{αS}-selektive Antiserum RM/1 detektierte zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 47,1 kDa bzw. 49,7 kDa in homogenen Rohmembransuspensionen aus rechten und linken Ventrikeln von Kontrolltieren (47,1 kDa: RV: 2,85 ± 0,18 rE, n=10; LV: 2,76 ± 0,21 rE, n=10; 49,7 kDa: RV: 2,40 ± 0,22 rE, n=10; LV: 2,24 ± 0,14 rE, n=10; Abb. 7/8).

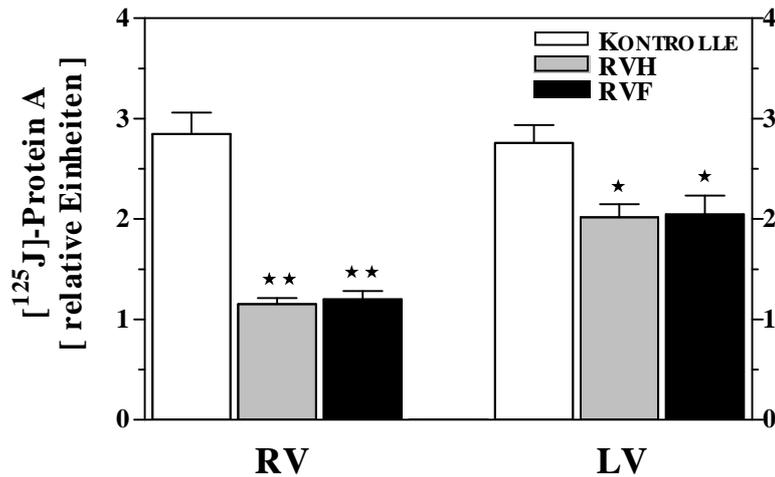


Abb. 7: Immunreaktive G_{αS}-Proteine (47,1 kDa Bande) in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Spezifisch gebundener primärer Antikörper in Kopplung an [¹²⁵J]-Protein A (relative Einheiten). MW ± SEM aus jeweils 10 Experimenten. *) P<0,05 vs. Kontrolle, **) P<0,0001 vs. Kontrolle.

RVH- und RVF-Ratten zeigten eine signifikante biventrikuläre Verringerung im relativen Gehalt der 47,1 kDa Bande (Abb. 7). Allerdings war die Abnahme an rechtsventrikulären Membranpräparationen (RVH: 1,15 ± 0,06 rE, n=10, P<0,0001 vs. Kontrolle; RVF: 1,20 ±

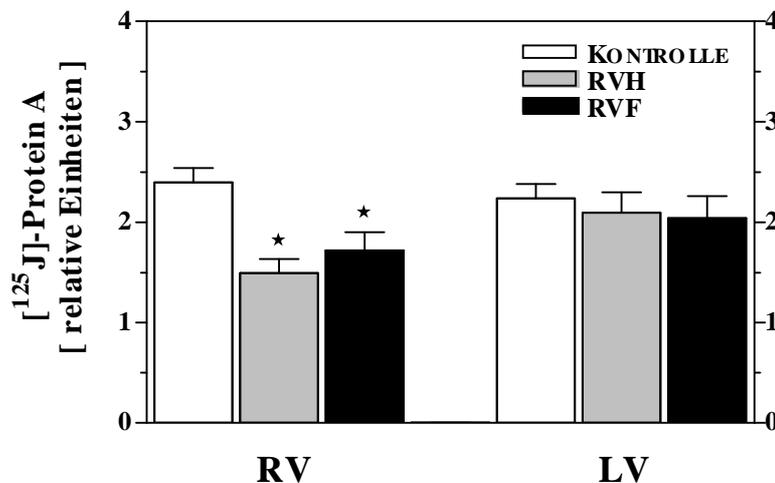


Abb. 8: Immunreaktive G_{αS}-Proteine (49,7 kDa Bande) in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Spezifisch gebundener primärer Antikörper in Kopplung an [¹²⁵J]-Protein A (relative Einheiten). MW ± SEM aus jeweils 10 Experimenten. *) P<0,05 vs. Kontrolle.

0,08 rE, n=10, $P < 0,0001$ vs. Kontrolle) generell stärker ausgebildet als in den jeweiligen Aufarbeitungen des linken Ventrikels (RVH: $2,02 \pm 0,13$ rE, n=10, $P < 0,05$ vs. Kontrolle; RVF: $2,04 \pm 0,19$ rE, n=10, $P < 0,05$ vs. Kontrolle; Abb. 7).

Im Fall der 49,7 kDa Bande wurde ausschließlich für rechte Ventrikel MCT-behandelter Ratten (RVH und RVF) eine Verminderung in der Intensität dieser Bande (RVH: $1,49 \pm 0,14$ rE, n=10, $P < 0,05$; RVF: $1,72 \pm 0,18$ rE, n=10, $P < 0,05$; Abb. 8) nachgewiesen. Linksventrikuläre Präparationen waren dementsgegen unverändert gegenüber Kontrollen (RVH: $2,10 \pm 0,20$ rE, n=10; RVF: $2,04 \pm 0,22$ rE, n=10; Abb. 8).

3.3.3. QUANTIFIZIERUNG DER ADENYLYL ZYKLASE AKTIVITÄT AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Rechte Ventrikel MCT-behandelter Ratten (RVH und RVF) ließen eine signifikante Reduktion in der AZ Basalaktivität erkennen (Abb. 9a), wohingegen eine linksventrikuläre Erniedrigung nur für insuffiziente Ratten (RVF) festgestellt wurde (Abb. 9b). Darüber hinaus war die Stimulation der AZ in Gegenwart von GTP ($10 \mu\text{M}$) signifikant abgeschwächt für beide Ventrikel. In diesem Zusammenhang zeigte sich kein Unterschied zwischen RVH- und RVF-Tieren (Abb. 9a/b).

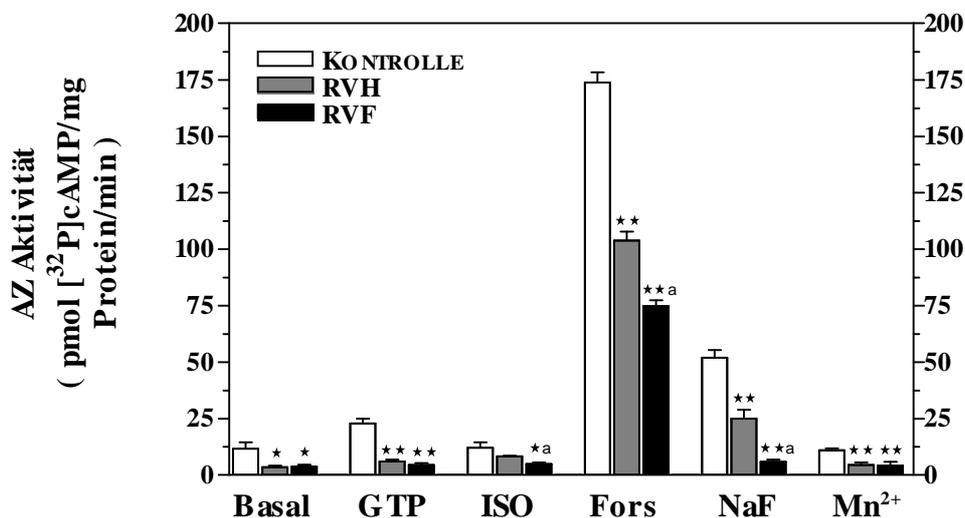


Abb. 9a: Adenylyl Zyklase (AZ) Aktivität nach Stimulation mit Guanosin-5'-triphosphat (GTP), Isoprenalin (ISO), Forskolin (Fors), Natriumfluorid (NaF) und Mangan-Ionen (Mn^{2+}) in Membransuspensionen des rechten Ventrikels von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Umsatzrate der AZ ($\text{pmol } [^{32}\text{P}]\text{-cAMP/mg Protein/min}$). MW \pm SEM aus jeweils 10 (Kontrolle/RVH) und 9 (RVF) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle, **) $P < 0,01$ vs. Kontrolle, ^a) $P < 0,05$ vs. RVH.

Nach einer β -AR-vermittelten Stimulation der AZ mit Hilfe des nicht-selektiven β -AR Agonisten Isoprenalin ($100 \mu\text{M}$) an rechtsventrikulären Membranen war der Substratumsatz aus-

schließlich für RVF-Tieren reduziert (Abb. 9a). An Membranen des linken Ventrikels wurde eine Abnahme der AZ Aktivität für RVH- und RVF-Ratten beobachtet (Abb. 9b).

Das Diterpenalkaloid Forskolin (100 μM) sowie Fluorid-Ionen (zugesetzt als NaF: 10 mM) steigerten die AZ Aktivität rezeptorunabhängig in Kontrollpräparationen beider Ventrikel (Abb. 9a/b). Entsprechende Untersuchungen an Membransuspensionen des rechten und linken Ventrikels von RVH-Ratten zeigten eine signifikante Erniedrigung in der Forskolin- bzw.

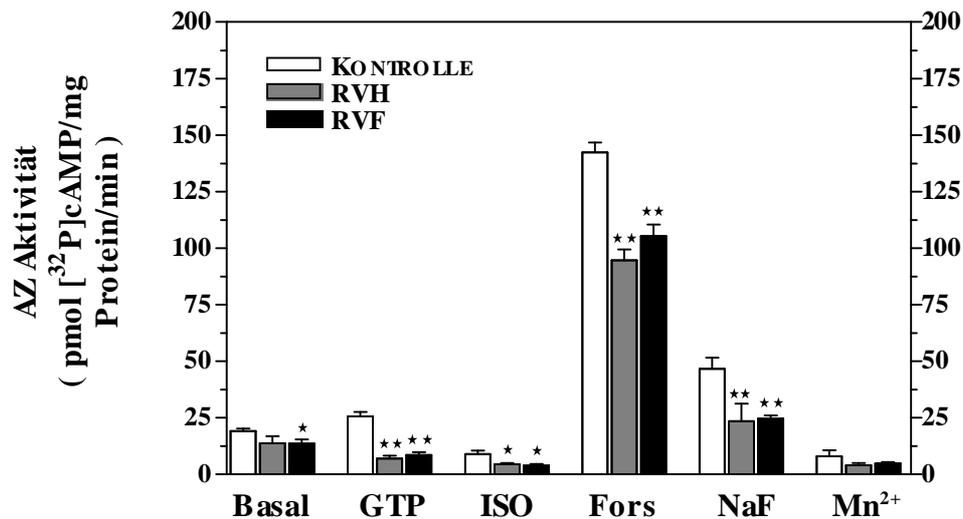


Abb. 9b: Adenylyl Zyklaste (AZ) Aktivität nach Stimulation mit Guanosinriphosphat (GTP), Isoprenalin (ISO), Forskolin (Fors), Natriumfluorid (NaF) und Mangan-Ionen (Mn^{2+}) in Membransuspensionen des linken Ventrikels von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Umsatzrate der AZ (pmol [³²P]-cAMP/mg Protein/ min). MW \pm SEM aus jeweils 10 (Kontrolle/RVH) und 9 (RVF) Experimenten. *) P < 0,05 vs. Kontrolle, **) P < 0,01 vs. Kontrolle.

NaF-vermittelten Aktivität. An rechtsventrikulären Gewebeaufarbeitungen insuffizienter RVF-Ratten wurde unter diesen Bedingungen eine zusätzliche Abschwächung der AZ Aktivität gegenüber RVH-Tieren festgestellt (Abb. 9a).

Nach unmittelbarer Stimulation der katalytischen Untereinheit der AZ in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen war die AZ-Aktivität signifikant reduziert in Membranen rechter Ventrikel von RVH- und RVF-Ratten (Abb. 9a). Für linksventrikuläre Membranen (RVH und RVF) wurde ebenso eine Abschwächung in der [³²P]-cAMP Akkumulation ermittelt. Allerdings blieb diese Reduktion ohne statistische Signifikanz (Abb. 9b).

3.3.4. BESTIMMUNG DER GRK AKTIVITÄT AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Die Membranen rechter Ventrikel von Kontrolltieren zeigten eine signifikant stärkere GRK-vermittelte Rhodopsinphosphorylierung von 481 ± 29 cpm/Bande (n=5) gegenüber den jeweiligen linksventrikulären Membranen (262 ± 44 cpm/Bande, n=5, P < 0,01). Im Gegensatz dazu

bestand für zytosolische Präparationen hinsichtlich der Kinaseaktivität kein Unterschied zwischen beiden Ventrikel (RV: 274 ± 30 cpm/Bande vs. LV: 220 ± 13 cpm/Bande, $n=5$, n.s.; Abb. 10).

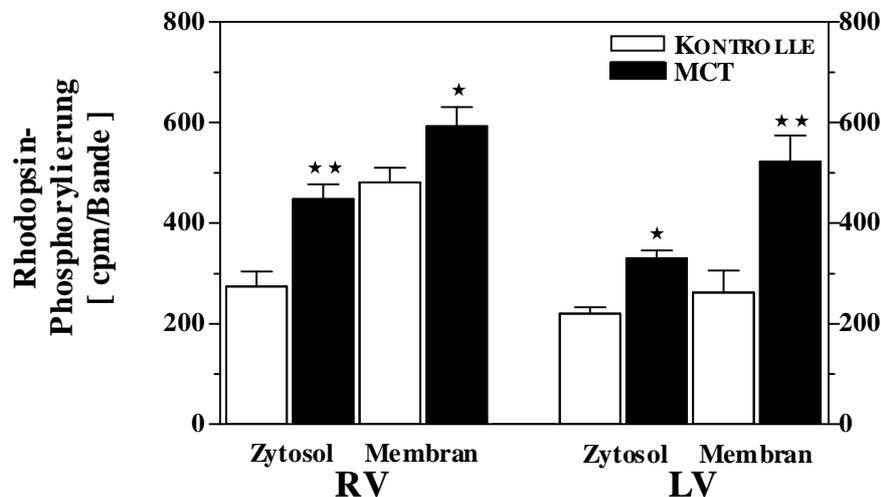


Abb. 10: G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase (GRK) Aktivität in Zytosol- (Zyto.) und Membran- (Memb.) Fraktionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten und Kontrollratten. Ordinate: GRK-vermittelte Phosphorylierung von Rhodopsin in cpm pro Bande. MW \pm SEM aus jeweils 5 Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle, **) $P < 0,01$ vs. Kontrolle.

Die Untersuchungen an MCT-behandelten Ratten ($n=5$) ergaben einen signifikanten GRK Aktivitätsanstieg in den zytosolischen (RV: 448 ± 29 cpm/Bande, $P < 0,01$; LV: 330 ± 16 cpm/Bande, $P < 0,01$), aber auch in den Membranfraktionen (RV: 593 ± 38 cpm/Bande, $P < 0,05$; LV: 522 ± 52 cpm/Bande, $P < 0,05$; Abb. 10).

3.3.5. KONTRAKTILE WIRKUNG VON ISOPRENALIN

Der nicht-selektive β -AR Agonist Isoprenalin bewirkte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Kontraktionskraft elektrisch gereizter kardialer Muskelstreifen aus rechten und linken Ventrikeln (Abb. 11a/b). An ventrikulärem Gewebe MCT-behandelter Ratten konnten die KWK lediglich bis zu einer Isoprenalinkonzentration von 300 nM (RV) bzw. 100 nM (LV) erfasst werden. Konzentrationssteigerungen darüber hinaus resultierten in arrhythmischen Kontraktionen der präparierten kardialen Muskelstreifen.

Rechte und linke Ventrikel von Kontrollratten zeigten äquivalente Steigerungen in der maximalen Kontraktionskraftzunahme (300 nM Isoprenalin) nach Rezeptorstimulation (RV: $\Delta 2,1 \pm 0,3$ mN; LV: $\Delta 2,5 \pm 0,3$ mN; $n=11$; Abb. 11a/b).

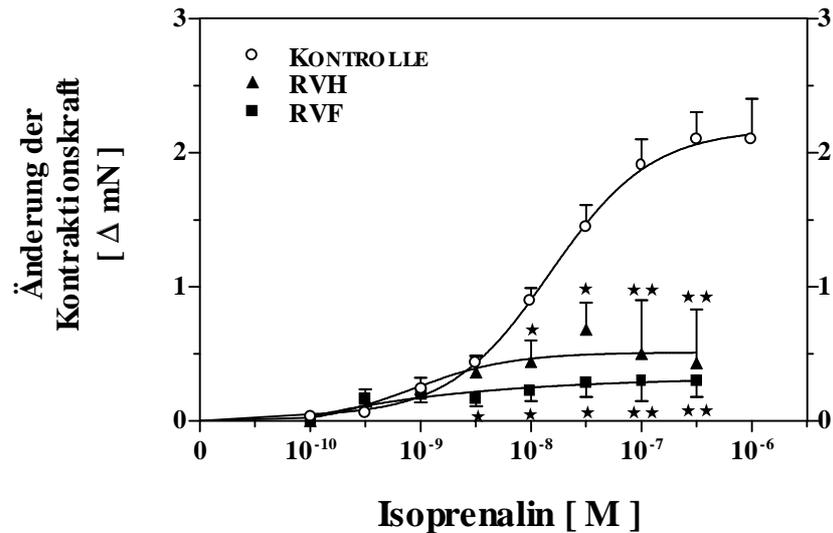


Abb. 11a: Steigerung der Kontraktionskraft nach Stimulation von β -Adrenozeptoren mit Isoprenalin an kardialen Muskelstreifen des rechten Ventrikels von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Δ mN. Abszisse: Molare Konzentrationen von Isoprenalin. MW \pm SEM aus jeweils 11 (Kontrolle), 5 (RVH) bzw. 6 (RVF) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle, **) $P < 0,01$ vs. Kontrolle.

Für Herzmuskelstreifen aus beiden Ventrikeln MCT-behandelter Ratten war die β -AR-vermittelte Inotropiezunahme signifikant abgeschwächt. Jedoch wurden für rechtsventrikuläre Gewebestreifen deutlich stärkere Reduktionen nachgewiesen (Abb. 11a/b). Deren maximale Inotropiesteigerung betrug nach Zugabe von Isoprenalin (300 nM) mit $\Delta 0,5 \pm 0,4$ mN (RVH, $n=5$, $P < 0,01$ vs. Kontrolle) nur 20,5 % bzw. lediglich 14,3 % (RVF: $\Delta 0,3 \pm 0,1$ mN, $n=6$,

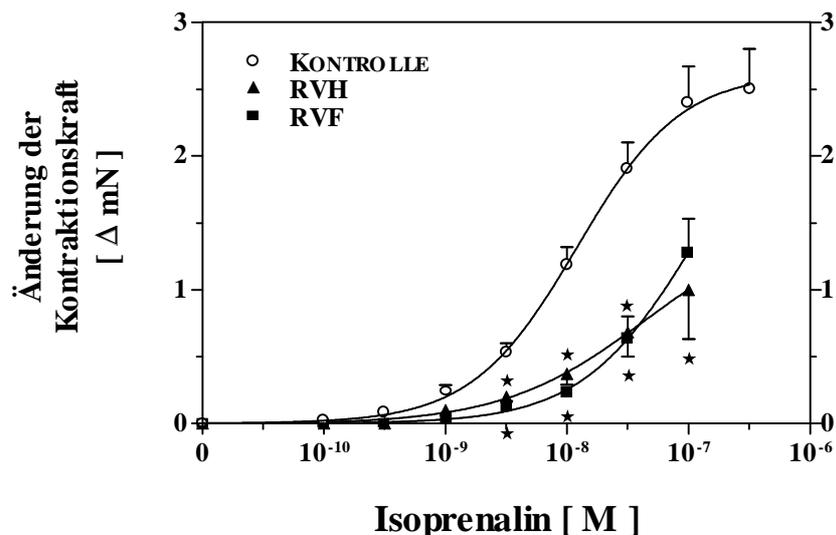


Abb. 11b: Steigerung der Kontraktionskraft (mN) nach Stimulation von β -Adrenozeptoren mit Isoprenalin an kardialen Muskelstreifen des linken Ventrikels von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Änderung in der Kontraktionskraft in Δ mN. Abszisse: Molare Konzentrationen von Isoprenalin. MW \pm SEM aus jeweils 11 (Kontrolle), 5 (RVH) bzw. 6 (RVF) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

$P < 0,01$ vs. Kontrolle) verglichen mit den Muskelstreifen von Kontrolltieren (Abb. 11a). Aus diesem Grund konnten die erhaltenen Daten nicht an sigmoidale KWK angepasst werden. Die KWK für Isoprenalin an linken Ventrikeln MCT-behandelter Ratten zeigten eine Rechtsverschiebung (Abb. 11b). Aufgrund arrhythmischer Kontraktionen mussten diese Versuche ebenfalls vorzeitig abgebrochen werden.

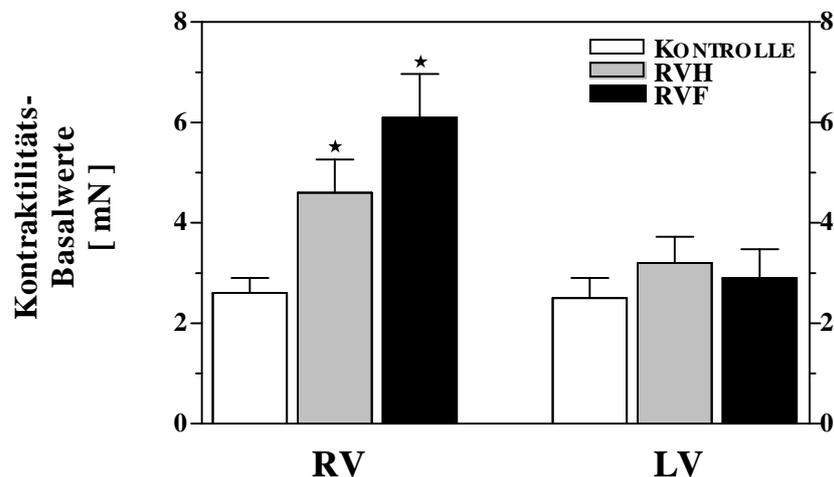


Abb. 12: Basalkontraktionskraft kardialer Muskelstreifen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten vor externer Zugabe von Isoprenalin. Ordinate: Basalwerte der Kontraktionskraft in mN. MW \pm SEM aus jeweils 11 (Kontrolle), 5 (RVH) bzw. 6 (RVF) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

Abbildung 12 umfasst die Bestimmung der Basalkontraktionen kardialer Muskelstreifen vor Beginn der Aufzeichnungen für die Isoprenalin-induzierte Steigerung der Kontraktilität. Im Fall der rechtsventrikulären Muskelstreifen MCT-behandelter Ratten (RVH: $4,6 \pm 0,7$ mN, $n=5$, $P < 0,01$; RVF: $6,1 \pm 0,9$ mN, $n=6$, $P < 0,01$; Kon: $2,6 \pm 0,3$ mN, $n=11$) wurden signifikante Anstiege in den Ausgangswerten der Kontraktionskraft ermittelt. Die Gewebestreifen des linken Ventrikels, präpariert aus RVH- ($3,2 \pm 0,5$ mN, $n=5$) und RVF-Ratten ($2,9 \pm 0,6$ mN, $n=6$), hingegen entsprachen den Kontrollwerten ($2,5 \pm 0,4$ mN, $n=11$; Abb. 12).

Unmittelbar im Anschluss an die KWK für Isoprenalin wurde den Organbädern kumulativ Calcium ($4,3$ bis $13,3$ mM) zugesetzt. Rechtsventrikuläre RVH-Herzmuskelstreifen ($n=5$) zeigten ausschließlich in maximaler Ca^{2+} -Konzentration ($13,3$ mM) eine signifikante Reduktion in der Kontraktilitätszunahme gegenüber Kontrollen ($\Delta 0,6 \pm 0,2$ mN vs. $\Delta 1,8 \pm 0,3$ mN; $P < 0,05$; Abb. 13a). Dementgegen wurde für RVF-Ratten eine signifikante Verringerung sämtlicher Ca^{2+} -Konzentrationen festgestellt. Submaximale Ca^{2+} -Konzentrationen ($4,3$ bis $9,7$ mM) steigerten die Kontraktilität zunächst noch geringfügig ($4,3$ mM: $\Delta 0,7 \pm 0,1$ mN, $P < 0,05$ vs. Kontrolle; Abb. 13a), wohingegen bei $11,3$ mM und $13,3$ mM kein inotroper Zuwachs mehr beobachtet wurde.

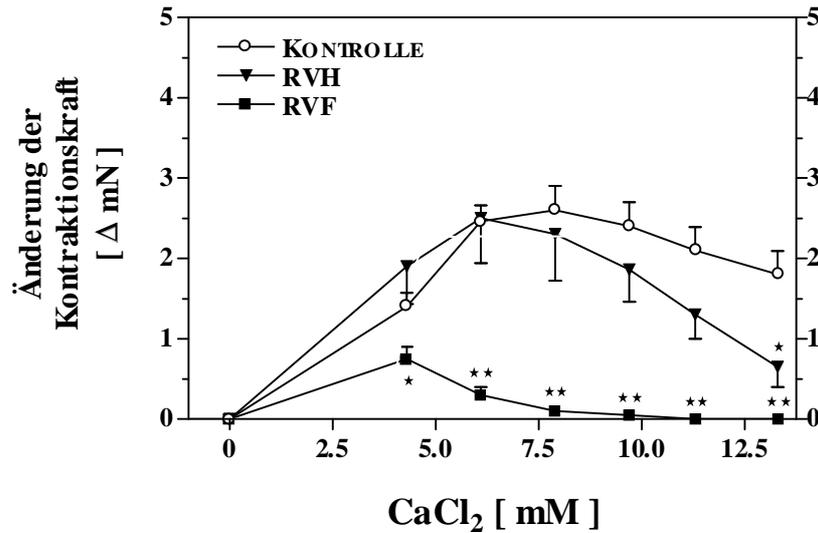


Abb. 13a: Steigerung der Kontraktionskraft (mN) durch exogenes Calciumchlorid an kardialen Muskelstreifen des rechten Ventrikels von MCT-behandelten und Kontrollratten. Ordinate: Änderung in der Kontraktionskraft in Δ mN. Abszisse: Kumulative Konzentrationsstufen von Calciumchlorid [mM]. MW \pm SEM aus jeweils 11 (Kontrolle), 5 (RVH) bzw. 6 (RVF) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle, **) $P < 0,01$ vs. Kontrolle.

Linksventrikuläre Muskelstreifen MCT-behandelter Ratten entsprachen im maximalen Kontraktionsanstieg nach Stimulation mittels exogener Ca^{2+} -Ionen den Kontrollen (13,3 mM: Kontrolle: $\Delta 2,4 \pm 0,6$ mN, $n=11$; RVH: $\Delta 2,3 \pm 0,6$ mN, $n=5$; RVF: $\Delta 2,8 \pm 0,6$ mN, $n=6$; Abb. 13b).

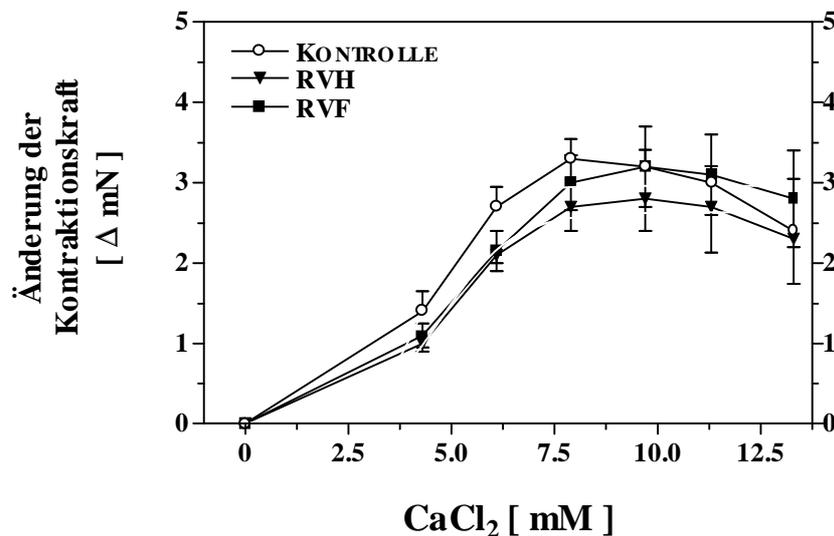


Abb. 13b: Steigerung der Kontraktionskraft (mN) durch exogenes Calciumchlorid an kardialen Muskelstreifen des linken Ventrikels von MCT-behandelten und Kontrollratten. Ordinate: Änderung in der Kontraktionskraft in Δ mN. Abszisse: Kumulative Konzentrationsstufen von Calciumchlorid [mM]. MW \pm SEM aus jeweils 11 (Kontrolle), 5 (RVH) bzw. 6 (RVF) Experimenten.

3.4. CHARAKTERISIERUNG DER KARDIALEN β -AR SIGNALTRANSDUKTION AN ISOLIERTEN KARDIOMYOZYTEN

3.4.1. SEPARATION RECHTS- UND LINKSVENTRIKULÄRER KARDIOMYOZYTEN

Kardiomyozyten wurden aus rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV) von Kontroll- und MCT-behandelten Tieren mit Hilfe einer Langendorff-Apparatur isoliert. Lichtmikroskopische Kontrollen verifizierten die Abtrennung der kontraktile kardialen Zellen von weiteren ventrikulären Gewebebestandteilen. Für sämtliche Untersuchungen an Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten wurde methodisch bedingt nicht zwischen RVH und RVF unterschieden. Die durchschnittliche Ausbeute kontraktile Myokardzellen, aufgearbeitet aus zwei frisch ektomierten Herzen ($n=1$), lag für Kontrollen bei $2,57 \pm 0,13 \times 10^6$ (RV) bzw. $5,69 \pm 0,18 \times 10^6$ (LV) Zellen. Davon waren 38,9 % (RV) und 40,1 % (LV) abgerundete, sog. „hyperkontraktile“ Zellen. Aus MCT-behandelten Ratten wurden lediglich $1,59 \pm 0,07 \times 10^6$ (RV) bzw. $3,55 \pm 0,29 \times 10^6$ (LV) Kardiomyozyten isoliert. Der Anteil nicht-stäbchenförmiger abgerundeter Zellen entsprach hierbei 80,7 % (RV) bzw. 64,3 % (LV). Für die sich unmittelbar anschließenden Versuche wurden sowohl stäbchenförmige als auch abgerundete kontraktile Myokardzellen verwendet.

3.4.2. BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON β -AR AN MEMBRANEN ISOLIERTER KARDIOMYOZYTEN

Kardiomyozytenmembranen des rechten Ventrikels MCT-behandelter Ratten zeigten eine signifikante Abnahme in der β -AR Dichte, wohingegen für Membranen linksventrikulärer

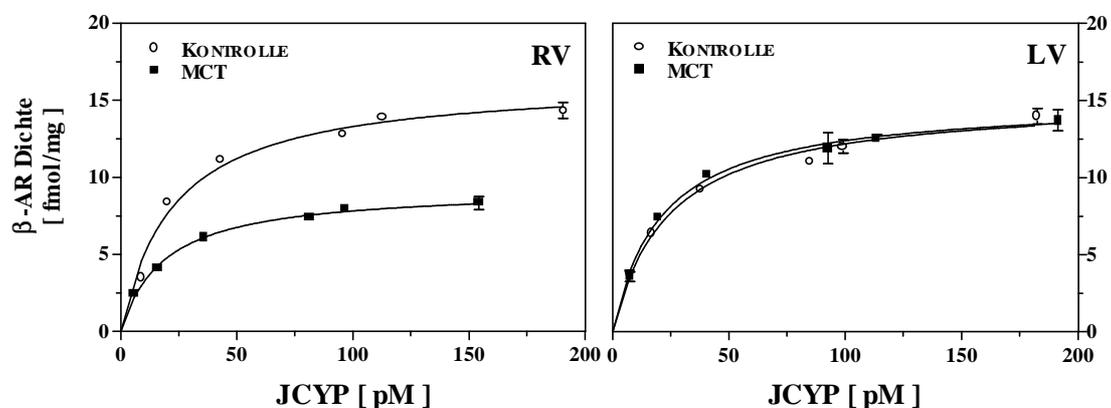


Abb. 14: Bestimmung der β -Adrenozeptor- (β -AR)-dichte in Membransuspensionen rechts- (RV) und linksventrikulärer (LV) Kardiomyozyten von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten am Beispiel eines Radioassays. Ordinate: Spezifische JCYP Bindung (fmol/mg Protein). Abszisse: Konzentrationen von Jodcyanopindolol (JCYP, pM). MW \pm SEM aus Doppelbestimmungen eines Experiments.

Kardiomyozyten keine Veränderungen ermittelt wurden. Die K_D -Werte aller Präparationen waren identisch (Abb. 14, Tab. 6).

	KONTROLLE (n=9)	MCT (n=8)
RV		
B_{max}	$14,0 \pm 1,1$	$9,5 \pm 1,3^*$
K_D	$24,2 \pm 2,2$	$25,8 \pm 1,0$
β_1 -: β_2 -AR	$74,3 \pm 4,2 : 25,7 \pm 4,2$	$56,1 \pm 6,1 : 43,9 \pm 6,1^*$
$pK_I \beta_1$ -AR	$8,68 \pm 0,12$	$8,72 \pm 0,18$
$pK_I \beta_2$ -AR	$5,98 \pm 0,29$	$6,24 \pm 0,19$
LV		
B_{max}	$15,7 \pm 1,1$	$15,2 \pm 1,5$
K_D	$23,9 \pm 2,3$	$25,9 \pm 1,0$
β_1 -: β_2 -AR	$78,3 \pm 2,6 : 21,7 \pm 2,6$	$78,4 \pm 2,7 : 21,6 \pm 2,7$
$pK_I \beta_1$ -AR	$8,53 \pm 0,13$	$8,48 \pm 0,06$
$pK_I \beta_2$ -AR	$5,70 \pm 0,23$	$5,70 \pm 0,11$

Tab. 6: β -Adrenozeptor (β -AR) Dichte B_{max} (fmol/mg Protein), K_D -Werte des Radioliganden JCYP (pM), β_1 -: β_2 -AR Verhältnis (%) und pK_I -Werte des β_1 -selektiven Antagonisten CGP 20712A an Kardiomyozytenmembranen aus rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV) von MCT-behandelten und Kontrollratten. MW \pm SEM aus jeweils 9 (Kontrolle) bzw. 8 (MCT) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

Kompetitionsexperimente in Gegenwart von CGP 20712A (1 nM bis 100 μ M) verdeutlichten die Existenz von β_1 - und β_2 -AR in Kardiomyozytenmembranen beider Ventrikel. Vier bis sechs Wochen nach Monocrotalin-Applikation war die β_1 -AR Dichte selektiv rechtsventrikulär reduziert. Verdrängungsexperimente an linksventrikulären Kardiomyozytenmembranen MCT-behandelter Ratten ergaben keine Verschiebung im β_1 -: β_2 -AR Verhältnis. Für CGP 20712A wurden durchweg vergleichbare Affinitäten festgestellt (Abb. 15, Tab. 6).

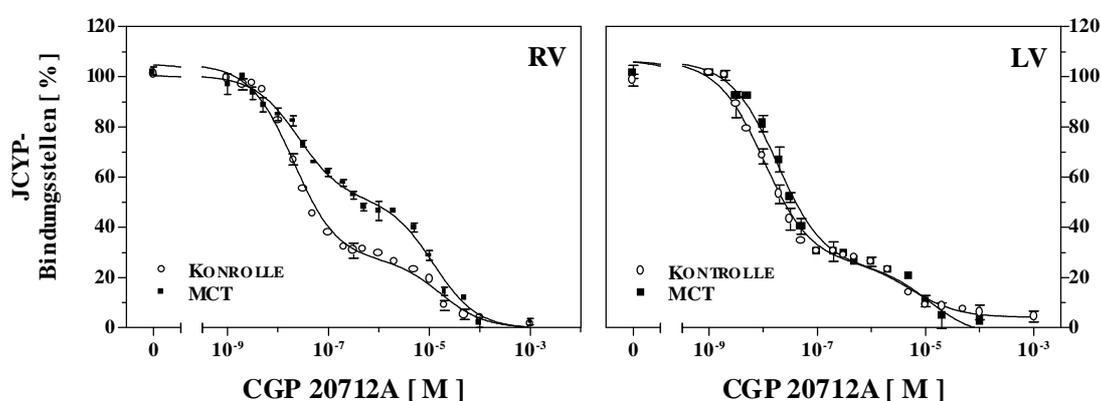


Abb. 15: Bestimmung der prozentualen β -Adrenozeptor (β -AR) Subtypverteilung mit Hilfe des selektiven β_1 -AR Antagonisten CGP 20712A in Membransuspensionen rechts- (RV) und linksventrikulärer (LV) Kardiomyozyten von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten am Beispiel eines Radioassays. Ordinate: Spezifische JCYP Bindung in % der totalen Bindungsstellen (=100 %). Abszisse: Molare Konzentrationen von CGP 20712A. MW \pm SEM aus Doppelbestimmungen eines Experiments.

3.4.3. BESTIMMUNG DES cAMP GEHALTES IN KARDIOMYOZYTEN

Stimulation der AZ mit Isoprenalin (100 μM) führte zu äquivalenten Anstiegen in der Konzentration des second messengers cAMP in Kardiomyozyten aus rechten und linken Ventrikeln von Kontrollratten (Δ cAMP: RV: $34,5 \pm 8,1$ pmol/ $2,5 \times 10^5$ Zellen; LV: $36,0 \pm 4,9$ pmol/ $2,5 \times 10^5$ Zellen, n=5; Abb. 16).

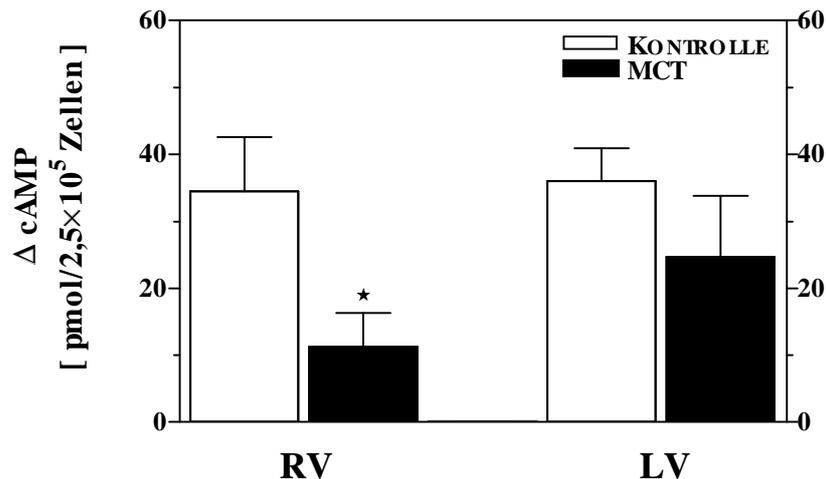


Abb. 16: Isoprenalin- (100 μM) induzierte Steigerung des cAMP Gehaltes in rechts- (RV) und linksventrikulären (LV) Kardiomyozyten von MCT-behandelten und Kontrollratten. Ordinate: Anstieg des cAMP Gehaltes in pmol/ $2,5 \times 10^5$ Zellen. MW \pm SEM aus jeweils 5 (Kontrolle) und 6 (MCT) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die Isoprenalin-vermittelte Steigerung des cAMP Gehaltes war selektiv reduziert in rechtsventrikulären Kardiomyozyten MCT-behandelter Ratten ($11,2 \pm 5,1$ pmol/ $2,5 \times 10^5$ Zellen, n=6, $P < 0,05$ vs. Kontrolle; Abb. 16), wohingegen in linksventrikulären Kardiomyozyten ($24,7 \pm 9,1$ pmol/ $2,5 \times 10^5$ Zellen, n=6; Abb. 16) keine Veränderungen beobachtet wurden.

3.5. KARDIALE MUSKARINERGE REZEPTOREN AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

3.5.1. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG M-CHOLINERGER REZEPTOREN

Sättigungsbindungsstudien zur muskarinergen Rezeptordichte ergaben einen signifikanten Unterschied im Vergleich des rechten ($110,6 \pm 10,2$ fmol/mg Protein) zum linken Ventrikel ($146,9 \pm 10,5$ fmol/mg Protein, $P < 0,05$; Abb. 17) von Kontrollen (n=7).

Für rechtsventrikuläre Membranen MCT-behandelter Ratten wurden keine Veränderungen in der Dichte M-cholinergere Rezeptoren für sowohl hypertrophiekompensierende Ratten (RVH,

107,7 ± 6,3 fmol/mg Protein, n=4) als auch für Tiere mit Stauungsinsuffizienz (RVF, 126,1 ± 7,3 fmol/mg Protein, n=7; Abb. 17) ermittelt.

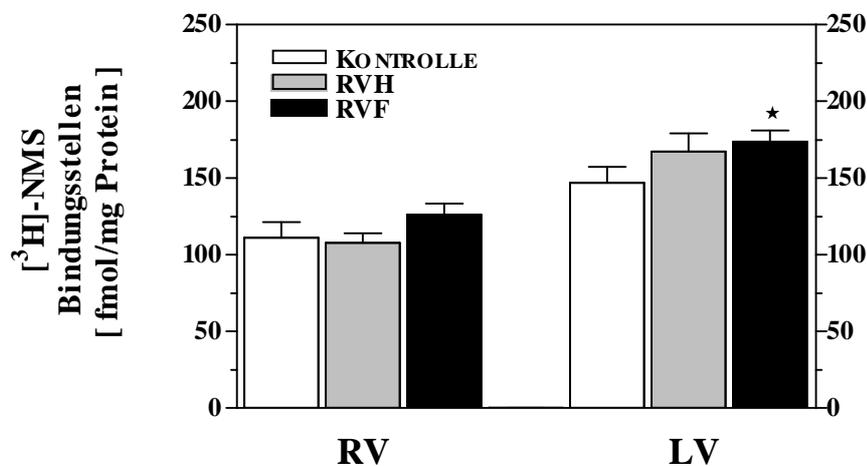


Abb. 17: Totale M-cholinerge Rezeptordichte in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Spezifisch gebundenes [³H]-NMS in fmol pro mg Protein. MW ± SEM aus jeweils 7 (Kontrolle), 4 (RVH) bzw. 9 (RVF) Experimenten. *) P<0,05 vs. Kontrolle.

Dementgegen zeigten linksventrikuläre Membranpräparationen mit 167,2 ± 11,9 fmol/mg Protein (n=4) für RVH-Ratten sowie 173,9 ± 7,2 fmol/mg Protein (n=9, P<0,05 vs. Kontrolle) für RVF-Ratten die Tendenz zur Erhöhung der M-cholinergen Rezeptordichte (Abb. 17). Im Fall der RVF-Tiere erreichte der aufgezeigte Wert statistische Signifikanz. In den kalkulierten K_D-Werten der durchgeführten [³H]-NMS Sättigungsexperimente wurden keine Unterschiede zwischen Kontrollen und MCT-behandelten Ratten beobachtet (RV: Kon: 0,9 ± 0,1 nM, RVH: 1,1 ± 0,5 nM, RVF: 1,2 ± 0,1 nM; LV: Kon: 1,4 ± 0,2 nM, RVH: 1,0 ± 0,4 nM, RVF: 1,3 ± 0,1 nM).

3.5.2. QUANTITATIVE ERFASSUNG VON G_{oi}-PROTEINEN AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

In rechts- bzw. linksventrikulären Membranaufschlüssen wurde generell eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von 43 kDa detektiert. Wie aus Abb. 18 zu entnehmen, ergaben die Untersuchungen vergleichbare Resultate im relativen Gehalt der 43 kDa Bande des eingesetzten Antikörpers AS/7 für rechte (RVH: 3,30 ± 0,29 rE, n=10; RVF: 3,37 ± 0,16 rE, n=10) und linke Ventrikel (RVH: 3,14 ± 0,27 rE, n=10; RVF: 2,97 ± 0,26 rE, n=10) MCT-behandelter Ratten im Vergleich mit Kontrolltieren (RV: 3,38 ± 0,27 rE, n=10; LV: 2,87 ± 0,22 rE, n=10).

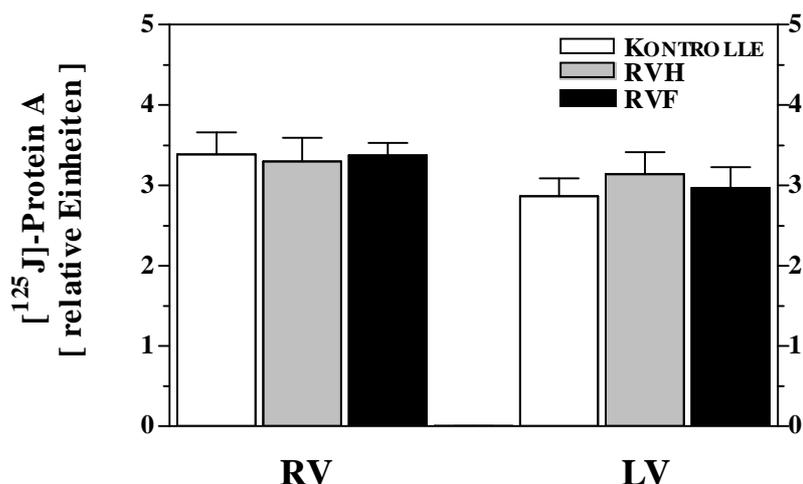


Abb. 18: Immunreaktive $G_{\alpha i}$ -Proteine in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Spezifisch gebundener primärer Antikörper in Kopplung an $[^{125}\text{J}]$ -Protein A in relativen Einheiten. MW \pm SEM aus jeweils 10 Experimenten.

3.6. CHARAKTERISIERUNG DER KARDIALEN $G_{q/11}$ -GEKOPPELTEN SIGNALTRANSDUKTION AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

3.6.1. BIOCHEMISCHE ANALYSEN ZUR α_1 -AR DICHTEN

Für rechtsherzhypertrophierte MCT-Ratten wurde eine signifikante Verringerung in der α_1 -AR Dichte an rechts-, aber auch an linksventrikulären Rohmembransuspensionen festgestellt. Das Ausmaß der Reduktion in den $[^3\text{H}]$ -Prazosin Bindungsstellen war dabei biventrikulär für RVF-Ratten stärker ausgeprägt als für RVH-Tiere. Die ermittelten Dissoziationskonstanten K_D ließen keine Affinitätsunterschiede erkennen (Tab. 7).

	KONTROLLE (n=9)	RVH (n=9)	RVF (n=9)
RV			
B_{\max}	63,7 \pm 4,6	47,1 \pm 3,9*	40,8 \pm 4,7*
K_D	53,9 \pm 3,1	59,7 \pm 3,1	59,8 \pm 4,2
LV			
B_{\max}	72,3 \pm 4,9	52,2 \pm 3,6*	46,1 \pm 3,1*
K_D	50,9 \pm 2,2	63,1 \pm 4,8	61,8 \pm 7,2

Tab. 7: α_1 -Adrenozeptor Dichte B_{\max} (fmol/mg Protein), K_D -Werte des Radioliganden $[^3\text{H}]$ -Prazosin (pM) in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. MW \pm SEM von jeweils n Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.6.2. DETEKTION DER $G_{\alpha q/11}$ -PROTEINE AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Das verwendete QL-Antiserum wurde mit einer spezifischen Bande (42 kDa) detektiert. Die Kopplung [125 J]-markierter Protein A Lösung an diese Bande war signifikant reduziert in ventrikulären Membransuspensionen rechter (RVH: $1,18 \pm 0,11$ rE, $n=10$, $P<0,01$ vs. Kontrolle; RVF: $1,41 \pm 0,08$ rE, $n=10$, $P<0,05$ vs. Kontrolle) und linker Ventrikel von MCT-behandelten Tieren (RVH: $1,46 \pm 0,09$ rE, $n=10$, $P<0,01$ vs. Kontrolle; RVF: $1,49 \pm 0,12$ rE, $n=10$, $P<0,01$ vs. Kontrolle) gegenüber den Ergebnissen der Kontrollratten (RV: $2,09 \pm 0,16$ rE, $n=10$; LV: $2,03 \pm 0,12$ rE, $n=10$; Abb. 19).

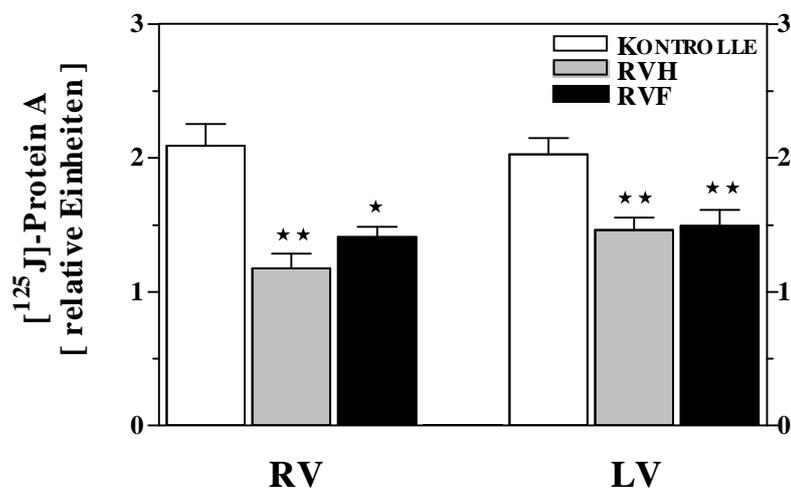


Abb. 19: Immunreaktive $G_{\alpha q/11}$ -Proteine in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Spezifisch gebundener primärer Antikörper in Kopplung an [125 J]-Protein A in relativen Einheiten. MW \pm SEM aus jeweils 10 Experimenten. *) $P<0,05$ vs. Kontrolle, **) $P<0,01$ vs. Kontrolle.

3.6.3. KONTRAKTILE WIRKUNG VON NORADRENALIN

Noradrenalin (NA, 1 nM bis 1 mM, in Gegenwart von 100 nM Propranolol) steigerte die Kontraktionskraft kardialer Muskelstreifen konzentrationsabhängig; die maximale Zunahme der Kontraktionskraft (1 mM) entsprach mit $\Delta 3,5 \pm 0,6$ mN (RV) und $\Delta 3,6 \pm 0,5$ mN (LV) für Kontrollratten ($n=8$) vergleichbaren Beträgen (Abb. 20a/b).

KWK rechter und linker Ventrikelstreifen MCT-behandelter Ratten zeigten eine signifikante Reduktion in der α_1 -AR-vermittelten Kontraktilitätszunahme (Abb. 20a/b). Rechtsventrikuläre Herzmuskelstreifen erzielten lediglich 43 % (RVH: $\Delta 1,5 \pm 0,4$ mN, $n=7$) bzw. 6 % (RVF: $\Delta 0,2 \pm 0,1$ mN, $n=9$) der maximal nachgewiesenen Inotropiesteigerung (1 mM NA) von Kontrolltieren (Abb. 20a).

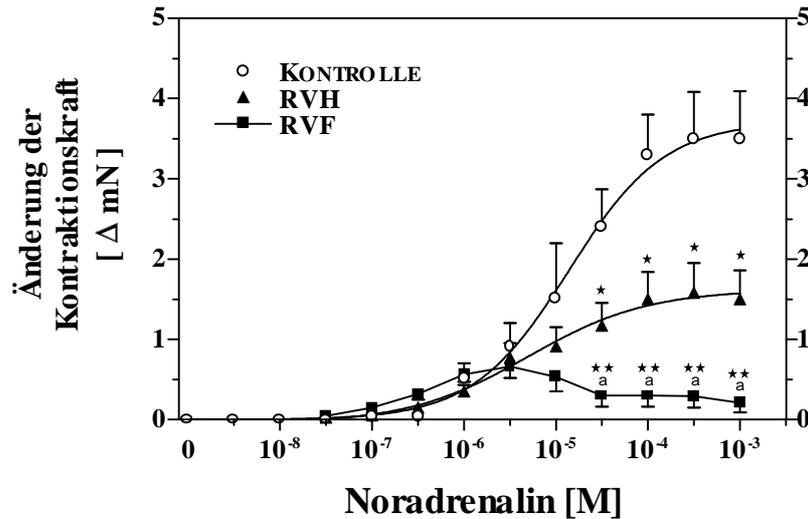


Abb. 20a: α_1 -AR-vermittelte und NA-induzierte Steigerung der Kontraktionskraft an kardialen Muskelstreifen des rechten Ventrikels von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Δ mN. Abszisse: Molare Konzentrationen von Noradrenalin. MW \pm SEM aus jeweils 8 (Kontrolle), 7 (RVH) bzw. 9 (RVF) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle, **) $P < 0,0001$ vs. Kontrolle, ^a) $P < 0,05$ vs. RVH.

Die linksventrikulären Kontraktilitätsänderungen waren demgegenüber schwächer ausgeprägt. Für maximale Konzentrationen an NA (50 μ M bis 1 mM) wurde eine signifikante Reduktion ausschließlich für RVH-Tiere mit einer Abnahme um 47 % festgestellt ($\Delta 1,9 \pm 0,4$ mN, $n=7$, $P < 0,05$). RVF-Ratten gaben lediglich in submaximalen Konzentrationen (100 μ M und 500 μ M) eine Erniedrigung zu erkennen ($\Delta 2,4 \pm 0,4$ mN \cong Abnahme um 33 %, $n=9$; Abb. 20b).

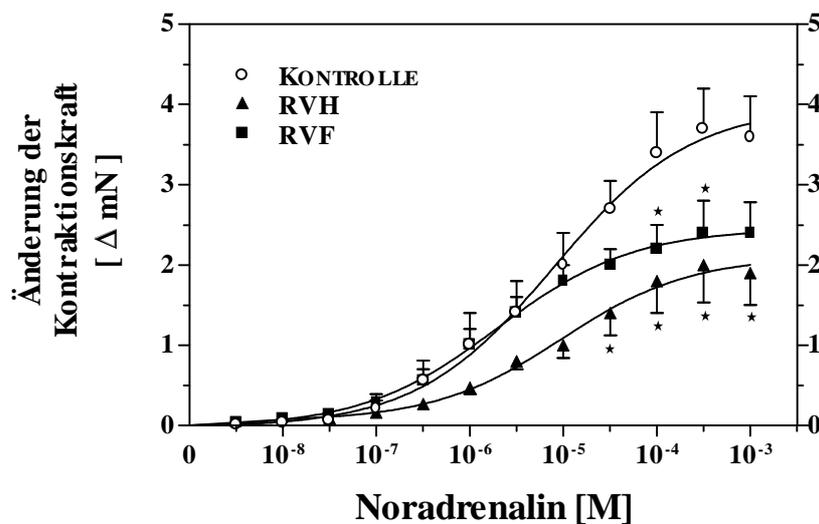


Abb. 20b: α_1 -AR-vermittelte und NA-induzierte Steigerung der Kontraktionskraft an kardialen Muskelstreifen des linken Ventrikels von MCT-behandelten (RVH/RVF) und Kontrollratten. Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Δ mN. Abszisse: Molare Konzentrationen von Noradrenalin. MW \pm SEM aus jeweils 8 (Kontrolle), 7 (RVH) bzw. 9 (RVF) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.6.4. CHARAKTERISIERUNG KARDIALER ENDOTHELIN-REZEPTOREN AN VENTRIKULÄREN MEMBRANEN

Entsprechend der angewandten Methode (siehe 2.4.4.) wurde für Kontrollratten ein signifikanter Unterschied in der $ET_{(A/B)}$ -Rezeptordichte zwischen rechten und linken Ventrikel ermittelt (Tab. 8).

Rechtsventrikuläre Membranen MCT-behandelter Ratten zeigten einen Anstieg in den [125 J]-ET-1-Bindungsstellen. Die beobachtete Zunahme war hierbei für RVF-Ratten signifikant (Tab. 8). An Membranen linker Ventrikel von RVH- und RVF-Tieren wurde hingegen in der $ET_{(A/B)}$ -Rezeptordichte kein Unterschied beobachtet (Tab. 8).

	KONTROLLE (n=10)	RVH (n=10)	RVF (n=13)
RV			
B_{max}	103,8 ± 5,6	128,6 ± 21,2	149,1 ± 19,5*
K_D	31,5 ± 3,8	38,3 ± 3,2	30,5 ± 3,7
n_H	1,01 ± 0,05	0,96 ± 0,05	0,95 ± 0,06
$ET_A : ET_B$	77,7 ± 1,9 : 22,3 ± 1,9	60,1 ± 3,1 : 39,9 ± 3,1**	50,9 ± 2,6 : 49,1 ± 2,6***a
LV			
B_{max}	149,9 ± 20,9	129,7 ± 13,6	138,4 ± 16,4
K_D	39,9 ± 6,5	34,8 ± 3,8	32,4 ± 2,9
n_H	1,06 ± 0,05	1,06 ± 0,07	0,96 ± 0,06
$ET_A : ET_B$	75,3 ± 3,3 : 24,7 ± 3,3	64,8 ± 2,7 : 35,2 ± 2,7*	54,9 ± 3,6 : 45,1 ± 3,6***a

Tab. 8: $ET_{(A/B)}$ -Rezeptordichte B_{max} in fmol/mg Protein, K_D -Werte des Radioliganden [125 J]-Endothelin-1 in pM, Hill-Koeffizienten (n_H) der Endothelin-1 Kompetitionskurven sowie das Verhältnis von ET_A : ET_B -Rezeptoren (%) in Membransuspensionen des rechten (RV) und linken Ventrikels (LV) von MCT-behandelten und Kontrollratten. MW ± SEM aus n Experimenten. *) P<0,05 vs. Kontrolle, **) P<0,01 vs. Kontrolle, ***) P<0,0001 vs. Kontrolle, a) P<0,05 vs. RVH.

Der Radioligand [125 J]-Endothelin-1 ließ für alle durchgeführten Verdrängungsexperimente eine vergleichbar hohe Affinität erkennen. Die Kompetitionskurven waren steil und monphasisch und die Hill-Koeffizienten lagen zwischen 0,95 und 1,06 (Tab. 8).

Für Membranen rechter und linker Ventrikel MCT-behandelter Ratten wurde des Weiteren eine prozentuale Zunahme von ET_B -Rezeptoren nachgewiesen, wobei diese Veränderungen bei Tieren mit Stauungsinsuffizienz (RVF) stärker ausgeprägt waren als in den Hypertrophie kompensierenden RVH-Ratten (Tab. 8).

3.6.5. KONTRAKTILE WIRKUNG VON ENDOTHELIN-1

Endothelin-1 steigerte die Kontraktilität konzentrationsabhängig an Muskelstreifen beider Ventrikel von Kontrolltieren. Jedoch gestaltete sich der Nachweis dieser positiv inotropen Wirkung (100 nM ET-1) mit $\Delta 0,3 \pm 0,1$ mN (RV, n=10) bzw. $\Delta 0,6 \pm 0,1$ mN (LV, n=10) gerade für rechtsventrikuläre Gewebestreifen außerordentlich schwierig (Abb. 21a/b).

Für Muskelstreifen rechter Ventrikel insuffizienter Tiere (RVF, n=5) wurde ein signifikanter Anstieg in der Inotropie mit $\Delta 1,4 \pm 0,2$ mN (100 nM ET-1) festgestellt (Abb. 21a). RVH-Ratten zeigten die Tendenz einer gesteigerten Inotropie (100 nM ET-1: $\Delta 0,6 \pm 0,2$ mN, n=6), welche ausschließlich in submaximalen ET-1 Konzentrationen (10 bzw. 50 nM) signifikant erhöht war. KWK rechter Ventrikelstreifen MCT-behandelter Tiere kennzeichneten darüber hinaus eine signifikant höhere Affinität von ET-1 (pD_2 : RVF: $8,0 \pm 0,06$, n=5, $P < 0,05$; RVH: $8,4 \pm 0,18$, n=6, $P < 0,01$) im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen ($7,3 \pm 0,16$, n=10, Abb. 21a).

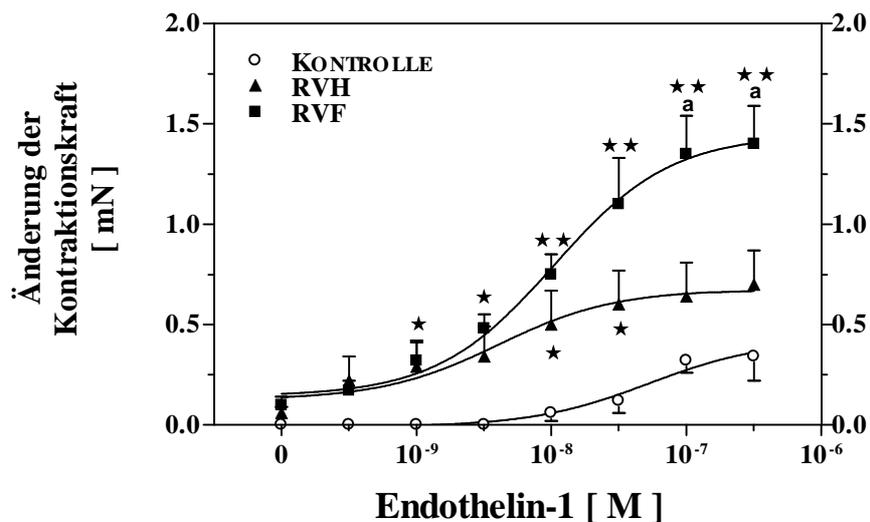


Abb. 21a: Steigerung der Kontraktionskraft nach Stimulation mit Endothelin-1 an kardialen Muskelstreifen des rechten Ventrikels von MCT-behandelten und Kontrollratten. Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Δ mN. Abszisse: Molare Konzentrationen von Endothelin-1. MW \pm SEM aus jeweils 10 (Kontrolle), 6 (RVH) bzw. 5 (RVF) Experimenten. *) $P < 0,05$ vs. Kontrolle, **) $P < 0,01$ vs. Kontrolle, ^a) $P < 0,05$ vs. RVH.

Die KWK linksventrikulärer Muskelstreifen insuffizienter RVF-Ratten waren ebenfalls linksverschoben (RVF: pD_2 : $8,54 \pm 0,07$, n=5; Kontrolle: $7,97 \pm 0,07$, n=10; $P < 0,01$), wohingegen für RVH-Ratten kein Unterschied beobachtet wurde ($7,97 \pm 0,08$, n=6; Abb. 21b). Andererseits zeigten linke Ventrikel keine Veränderungen in der maximalen Kontraktilitätssteigerung (100 nM ET-1) für sowohl RVF- ($\Delta 0,8 \pm 0,2$ mN, n=5) als auch RVH-Tiere ($\Delta 0,9 \pm 0,2$ mN,

n=6) bezogen auf entsprechende Resultate von Kontrollratten ($\Delta 0,6 \pm 0,1$ mN, n=10; Abb. 21b).

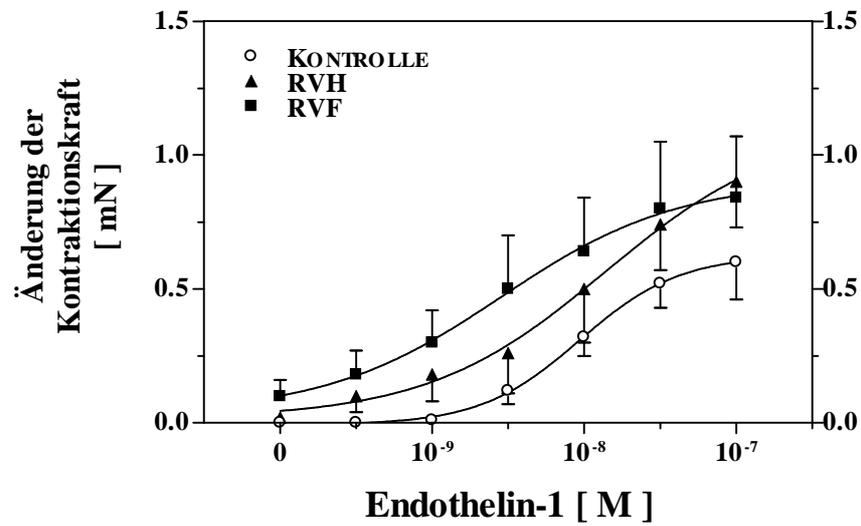


Abb. 21b: Steigerung der Kontraktionskraft nach Stimulation mit Endothelin-1 an kardialen Muskelstreifen des linken Ventrikels von MCT-behandelten und Kontrollratten. Ordinate: Änderung der Kontraktionskraft in Δ mN. Abszisse: Molare Konzentrationen von Endothelin-1. MW \pm SEM aus 10 (Kontrolle), 6 (RVH) bzw. 5 (RVF) Experimenten.

4. DISKUSSION

4.1. MONOCROTALIN-MODELL

Neben tierexperimentellen Studien zur Herzhypertrophie/-insuffizienz nach Koronarligation (Pfeffer et al., 1979; Zimmer et al., 1990; Lui et al., 1997), Aortenkonstriktion (Cutilletta et al., 1975; Chevalier et al., 1989; Feldman et al., 1993) oder im Fall von SH-Ratten (Okamoto & Aoki, 1963; Boluyt et al., 1994; Takata & Kato, 1996) gestattet die Applikation des Pflanzenalkaloids Monocrotalin (MCT) die Möglichkeit zur Ausbildung einer rechtsventrikulären Drucküberlastung (Meyrick et al., 1980; Ghodsi & Will, 1981; Bruner et al., 1983; Ceconi et al., 1989; Werchan et al., 1989; Comini et al., 1995; Chen et al., 1997). Aufgrund der progressiven pulmonalen Hypertonie entwickelten sämtliche MCT-behandelten Ratten eine signifikante rechtsventrikuläre Hypertrophie (3.1.1.). Diese kardiale Kompensationsreaktion war dabei für insuffiziente RVF-Tiere tendenziell stärker ausgeprägt und steht im Einklang mit den Resultaten weiterer Arbeitsgruppen (Pela et al., 1990; Comini et al., 1996a; Vescovo et al., 1998; Uzzaman et al., 2000). Für die linksventrikulären Gewichte wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg in den Nassgewichten ermittelt. Nahezu alle Studien zum MCT-Modell dokumentieren hingegen keine Veränderungen in den Massenangaben linker Ventrikel. Lediglich in den Arbeiten von Morioka et al. (1992), Kuramochi et al. (1994) und Brown et al. (1998) sind unverkennbare Steigerungen in den linksventrikulären Gewichten auszumachen. Die Zunahme war jedoch nicht signifikant. Eine Ursache für den aufgezeigten Unterschied findet sich mit großer Wahrscheinlichkeit im ausgewählten Probenumfang der untersuchten Tiere. Die vorliegende Arbeit spiegelt mit n=100 Kontrolltieren sowie jeweils 50 RVH- und insuffizienten RVF-Ratten eine objektivere Darstellung gegenüber Bestimmungen mit n=6 bis n=20 Wiederholungen wider. Der Körpergewichts-unabhängige Quotient des linken Ventrikels inklusive Septum gegen die rechtsventrikuläre Masse stand wiederum in Übereinstimmung mit den Ergebnissen sämtlicher Publikationen. Dieser Hypertrophie-Marker zeigte sich deutlich erniedrigt für MCT-behandelte RVH-Ratten mit einer darüber hinaus gehenden weiteren Absenkung für insuffiziente RVF-Tiere gemäß einer stärker ausgeprägten Rechtsherzhypertrophie (3.1.1.).

Etwa 50 % der Monocrotalin-injizierten Tiere gaben Anzeichen einer kongestiven Herzinsuffizienz (RVF) zu erkennen. Entsprechende Aussagen mit ca. 50 % RVH- bzw. RVF-Tieren finden sich in den Resultaten zahlreicher Studien wieder (Pela et al., 1990; Morioka et al., 1992; Comini et al., 1996a; Vescovo et al., 1998; Uzzaman et al., 2000). Ein gleichwertiges Bild liefert in diesem Zusammenhang die Gegenüberstellung jeweiliger MCT-Dosierungen.

Neben geringen Bolusinjektionen des Pflanzenalkaloids von 30 mg/kg KG i.p. (Vescovo et al., 1989a) bzw. Hochdosierungen von 105 mg/kg KG i.p. (Kreutz et al., 1996) erscheint die verabreichte Monocrotalin-Dosis von 60 mg/kg KG per intraperitonealer Applikation als Mittel der Wahl, um über zahlenmäßig vergleichbare Kontingente an RVH- und RVF-Tieren verfügen zu können.

Einige Autoren diskutieren im Rahmen ihrer Auswertungen zum MCT-Modell ebenso das Verhältnis des rechten Ventrikels zum Körpergewicht als Kammer-spezifischen Hypertrophie-Marker (Marthew et al., 1988; Hill et al., 1989; Ilkiw et al., 1989; Comini et al., 1996a). In der Ergebniszusammenstellung dieser Arbeit wurde dem angesprochenen Quotienten indes keine Berücksichtigung zuerkannt. Sämtliche zur Verfügung stehenden Publikationen sowie die eigens aufgestellten Resultate bestätigen eine signifikante Reduktion des Körpergewichts als Konsequenz aus einer Monocrotalin-Applikation. Unter Einbeziehung dieses Parameters in die Charakterisierung der Drucküberlastung würde dem Ausmaß der Hypertrophie aufgrund des resultierenden höheren Indexes daher eine unverhältnismäßig große Bedeutung zugemessen werden.

Mit Blick auf die Charakterisierung kardialer α_1 - und β -adrenerger Rezeptoren an MCT-behandelten Ratten wurde zunächst der Gehalt des physiologischen Transmitters Noradrenalin (NA) in ventrikulärem Gewebe, aber auch dessen Plasmakonzentration ermittelt. Der Gesamtnoradrenalinegehalt war lediglich für rechte und linke Ventrikel insuffizienter RVF-Tiere signifikant reduziert. Unter Berücksichtigung der ventrikulären Gewichte erwies sich der rechtsventrikuläre Noradrenalinegehalt pro mg Gewebe jedoch für sämtliche MCT-Tiere erniedrigt, wohingegen in linken Ventrikeln ausschließlich für insuffiziente RVF-Ratten eine Abnahme festgestellt wurde (3.1.1.). Entsprechend diesen vorliegenden Daten dokumentierten Ceconi et al. (1989) und Comini et al. (1996b) an MCT-behandelten Ratten eine bi-ventrikuläre Reduktion des Gesamtnoradrenalinegehalts ebenfalls nur für insuffiziente RVF-Tiere. Auf der anderen Seite beobachteten die genannten Autoren eine Abnahme im NA bezogen auf rechts- und linksventrikuläre Gewebemassen sowohl für RVH- als auch RVF-Ratten. Somit weisen bereits die Eingangsuntersuchungen darauf hin, dass es sich nicht um ein Ventrikel-spezifisches Tiermodell handelt. Eine deutlich stärkere Ausprägung von Veränderungen in rechten unter Beteiligung linker Ventrikel ist kennzeichnend für die vorliegende Arbeit. Aufgrund des progressiven Krankheitsverlaufs resultierte darüber hinaus oftmals ein signifikanter Unterschied zwischen RVH- und RVF-Tieren.

Für das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz ebenfalls charakteristisch ist ein Anstieg im NA-Plasmaspiegel linksherzinsuffizienter Patienten (Chidsey et al., 1962; Thomas & Marks, 1978). Diese Zunahme korreliert dabei streng mit der Prognose des Krankheitsbildes (Cohn et al., 1984; Rector et al., 1987). Aber auch nach Rechtsherzhypertrophie aufgrund einer primären pulmonalen Hypertonie (Nootens et al., 1995) bzw. einer alveolären Hypoventilation (Bratel et al., 2000) wurden erhöhte PlasmanoradrenalinKonzentrationen gemessen. Die vorliegenden Resultate verdeutlichen hingegen allein die Tendenz einer Steigerung im Plasma-NA MCT-behandelter Ratten (3.1.1.) und entsprechen dahingehend den Ergebnissen von Vescovo et al. (1989a). Morioka et al. (1992) stellten in ihren Untersuchungen eine signifikante Zunahme im Plasma-NA für ausschließlich insuffiziente Tiere fest. Ungeachtet der fehlenden Signifikanz geben die Resultate der vorliegenden Arbeit dennoch den Hinweis auf eine relevante Zunahme in der PlasmanoradrenalinKonzentration. Lediglich n=4 MCT-behandelte Tiere konnten in die angesprochene Auswertung einbezogen werden. Neben drei RVH-Ratten bzw. einem RVF-Tier wurden weitere 12 Ratten (RVF) mittels Pentobarbital zur Blutentnahme aus dem Augenskapillarbett vorbereitet, verstarben jedoch in der Narkose. Die ermittelten Werte (3.1.1.) spiegeln aus diesem Grund vielmehr den Plasmanoradrenalin Gehalt hypertrophiekompensierender RVH-Ratten wider.

Dieser Plasmanoradrenalin Spiegel ist das Ergebnis aus dem Zusammenspiel von NA Freisetzung und Wiederaufnahme/Metabolisierung verschiedener Organe (Esler et al., 1990). Die Kombination und Wechselwirkungen der den Plasmanoradrenalin Gehalt bestimmenden Faktoren limitieren auf der anderen Seite die Anwendung dieses Parameters als alleinigen und hochsignifikanten Indikator für eine gesteigerte sympathomimetische Aktivität. Demgegenüber ermöglichen die durchgeführten Untersuchungen zur Detektion des kardialen NA Spillover wesentlich aussagekräftigere Rückschlüsse für eine kardioselektive Erhöhung der sympathomimetischen Aktivität insuffizienter Herzen (Rundqvist et al., 1997a, b). Kaye et al. (1994) und Azevedo et al. (2000) zeigten darüber hinaus eine positive Korrelation zwischen dem pulmonalarteriellen bzw. dem rechtsventrikulären Druck und dem kardialen NA Spillover insuffizienter Patienten. In einer weiteren Studie bekräftigten Kaye et al. (1998) diesen Sachverhalt gerade für Patienten mit kardialer Stauungsinsuffizienz und pulmonaler Hypertonie. Erhöhte rechtsventrikuläre Drücke wurden ebenfalls von der eigenen Arbeitsgruppe im Rahmen der Untersuchungen zum MCT-Modell festgestellt. Unter diesem Gesichtspunkt steht die Entleerung kardialer NA Speicher in gutem Einklang mit der nachweislich verringerten NAT Dichte bzw. der verminderten Uptake₁ Aktivität (3.2.1. und 3.2.2.) im

Stadium der Insuffizienz und erscheint als eine unmittelbare Folge aus den erhöhten rechtsventrikulären Drücken vier bis sechs Wochen nach MCT-Applikation.

4.2. NORADRENALIN UPTAKE₁

Die mit Abstand größte Bedeutung bei der Entfernung des neuronal freigesetzten Noradrenalins kommt dem Noradrenalin Transporter (NAT) in der präsynaptischen Membran postganglionärer Neuronen zu (von Euler, 1972; Trendelenburg, 1991). Konkurrenzexperimente zur Charakterisierung von NAT Bindungsstellen und Aktivität in Gegenwart der selektiven Uptake₁ Inhibitoren Desipramin und Nisoxetin, des Uptake Inhibitors Cocain (Horn et al., 1971; Wong & Bymaster, 1976; Koe, 1976) oder des Dopamin Uptake Inhibitors GBR 12909 (Giros et al., 1992) ergaben eine Reihenfolge von: Desipramin \geq Nisoxetin \gg Cocain \geq GBR 12909. Diese Selektivität entspricht Literaturangaben zufolge dem Uptake₁ (Tejani-Butt, 1992; Jayanthi et al., 1993; Paczkowski et al., 1999). Der Uptake₂ Inhibitor Corticosteron (Grohmann & Trendelenburg, 1984) auf der anderen Seite hatte keinen Einfluss auf die totale NA Transportrate. Demzufolge verdeutlicht die vorliegende Arbeit eine signifikante Reduktion in der NAT Dichte (Uptake₁ Bindungsstellen) und in der NAT Aktivität in rechten, jedoch nicht in linken Ventrikeln MCT-behandelter Ratten (3.2.1. und 3.2.2.). Untersuchungen an linken Ventrikeln ergaben nur eine schwache Tendenz zur Absenkung der NAT Dichte und Aktivität. Diese minimale Verschiebung wird jedoch über die Tatsache verständlich, dass im Rahmen der Untersuchungen zum NAT nicht zwischen RVH und RVF unterschieden wurde. Die signifikant erniedrigten linksventrikulären NA Gewebekonzentrationen MCT-behandelter Ratten mit RVF lassen aber auf eine deutliche Absenkung der NAT Dichte und Aktivität schließen.

Experimentelle Untersuchungen weiterer Studien unterstreichen die nachgewiesene Abnahme im Uptake₁. Für rechtsherzhypertrophierte Hunde nach Pulmonalarterienstenose wird, verglichen mit den vorliegenden Ergebnissen, über eine qualitativ gleichwertige Reduktion der Uptake₁ Aktivität und Downregulation der NAT Dichte berichtet (Liang et al., 1989). Mit Hilfe dieses Hunde-Modells kennzeichneten Himura et al. (1993) ebenso eine Abnahme in der Uptake₁ Aktivität. Über Histofluoreszenzuntersuchungen beobachteten sie darüber hinaus einen Kammer-spezifischen Verlust noradrenerger Nervenendigungen in rechtsventrikulären Präparationen. Diese Befunde waren identisch mit den Resultaten nach chronischer NA Infusion an Hunden aus selbiger Studie. Einem erhöhten synaptischen NA Gehalt kommt dem-

nach eine Schlüsselfunktion in der Regulation von noradrenergen Rezeptoren zu. Die Resultate MCT-behandelter Ratten zur β - (3.3.1.) und α_1 -AR Dichte (3.6.1.) sowie von R_H - β -AR (3.3.1.) bekräftigen diese Aussage und verdeutlichen die unmittelbare Verknüpfung zum neuronalen Uptake bzw. dessen Regulation. Beau & Saffitz (1994) dokumentierten selbigen Zusammenhang für insuffiziente menschliche Herzen und zeigten darüber hinaus eine signifikante positive Korrelation zwischen der NAT Aktivität und der β_1 -AR Dichte. Infolge einer massiven Reduktion der synaptischen NA Wiederaufnahme resultiert ein verzögerter Abtransport des Neurotransmitters aus dem extrazellulärem Spalt und somit eine verlängerte Stimulation der genannten Rezeptoren. Eine solche exzessive Aktivierung führt über eine beschleunigte Desensibilisierung zur Downregulation und Internalisierung von β -AR (Büemann & Hosey, 1999; Ferguson, 2001) aber auch von α_1 -AR (Yang et al., 1999; Garcia-Sainz et al., 1999; Zhong et al., 1999). Als funktionelle Folge zeigte sich eine massiv abgeschwächte positive Inotropie nach Stimulation mit Isoprenalin (3.3.5.) und Noradrenalin (3.6.3.).

4.3. β - ADRENERGE REZEPTOREN

Der β -AR- G_s -AZ Signalweg stellt eine Verbindung des autonomen Nervensystems mit der Myokardfunktion her und vermittelt so die mit Abstand wichtigsten Einflüsse auf die Kraft, Frequenz und den Rhythmus des Herzens. Durchgeführte Untersuchungen identifizierten darüber hinaus die β -adrenerge Signaltransduktion als den ultimativen kardialen Kompensationsmechanismus in Anpassung an unterschiedlichste physiologische und psychische Einflüsse (Brodde et al., 1995). Unter diesem Blickwinkel lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Charakterisierung der β -AR Signaltransduktion.

Rohmembranfraktionen rechter, aber auch linker Ventrikel von MCT-behandelten Ratten ließen deutliche Reduktionen in der β -AR Dichte erkennen mit zweifellos stärkerer Absenkung im insuffizienten Stadium (RVF). Die aufgezeigte Verschiebung betraf dabei den β_1 -, jedoch auch den β_2 -AR-Subtyp (3.3.1.). Im Gegensatz dazu steht die Bestimmung von β -AR an präparierten Membranen isolierter Kardiomyozyten. Vier bis sechs Wochen nach MCT-Applikation wurde eine Kammer-spezifische Abnahme in der β_1 -AR Dichte für Kardiomyozytenmembranen aus rechten Ventrikeln festgestellt (3.4.2.).

Die fortgeschrittenere Downregulation β -adrenerger Rezeptoren an rechten Ventrikeln MCT-injizierter Ratten kennzeichnet die unmittelbare Verbindung zur verringerten Anzahl der NA Transporter Bindungsstellen bzw. der verminderten Uptake₁ Aktivität (3.2.1. und 3.2.2.) und der daraus folgenden Entleerung kardialer NA Speicher von MCT-behandelten Ratten (3.1.2.). Delehanty et al. (1994) und Dong et al. (1999) beschreiben in diesem Zusammenhang eine signifikante negative Korrelation zwischen der β -AR Dichte und dem interstitiellen NA Gehalt bzw. der Uptake Aktivität. Diese Arbeiten unterstreichen somit die eigens beobachteten Veränderungen kardialer β -AR bzw. des Uptake₁.

In der Literatur verfügbare Publikationen zum MCT-Modell berichten übereinstimmend, entsprechend den eigenen Ergebnissen, über eine Abnahme von β -AR in Rohmembranfraktionen rechter Ventrikel MCT-behandelter Ratten mit allerdings differenzierten Beobachtungen zu β -AR Veränderungen in linken Ventrikel sowie zur β -AR Subtyperegulation. Pela et al. (1990) und Brown et al. (1998) beobachteten selektive Abnahmen in der β_1 -AR Dichte rechter Ventrikel und zeigten derartige Reduktionen zusätzlich für linke Ventrikel. Ishikawa et al. (1991) demonstrierten eine stärker ausgeprägte Reduktion in der β -AR Dichte an rechten gegenüber linken Ventrikeln zwei Wochen sowie eine weiter fortgeschrittene Abnahme vier Wochen nach MCT-Injektion. Eine Ventrikel-spezifische Abnahme von β_1 -AR wird ebenso für rechts-herzinsuffiziente Hunde nach Pulmonalarterienstenose beschrieben (Fan et al., 1987). Die aufgezeigten Resultate der vorliegenden Arbeit stehen des Weiteren in guter Übereinstimmung mit entsprechenden Untersuchungen an humanen Ventrikelpräparationen. Diese liegen fast ausnahmslos für linksherzinsuffiziente Patienten vor und zeigen eine Reduktion β_1 -adrenerger Rezeptoren auf mRNA und Protein-Ebene sowie eine funktionelle Entkopplung von β_2 -AR (Brodde, 1991). Einzig Bristow et al. (1992) konnten gerade für Patienten mit PPH Kammer-spezifische Veränderungen von β -AR in rechten Ventrikeln feststellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch weder eine Kammer-spezifische noch eine selektive β_1 -AR Downregulation an ventrikulären Membranen nachgewiesen. Diese Befunde lassen auf die Annahme schließen, dass Veränderungen an Membranen beider Ventrikel nicht mit Verschiebungen an Kardiomyozytenmembranen einhergehen. Kontraktile Herzmuskelzellen umfassen lediglich 40 % einer heterogenen ventrikulären Population bestehend unter anderem aus Fibrozyten, Fibroblasten, Endothelzellen sowie glattmuskulären Zellen. Rohmembranfraktionen beinhalten darüber hinaus sämtliche kardiale Zelltypen aus ventrikulärem Gewebe. Aus diesem Grund resultieren zweifelsohne Unterschiede im β_1 -: β_2 -AR Verhältnis der aufgearbeiteten Membranpräparationen. Während ältere Arbeiten von Lau et al. (1980) und Freiss-

muth et al. (1986) eine Lokalisation von β_2 -AR an Kardiomyozyten ausschließen, widersprechen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in Übereinstimmung mit jüngeren Publikationen (Cerbai et al., 1995; Kuznetsov et al., 1995; Xiao et al., 1998) diesen Darlegungen. Der β_2 -AR Anteil beschränkte sich für letztgenannte Studien auf ungefähr 25 % entsprechend des Hauptanteils von β_1 -AR in Höhe von ca. 75 %. Rohmembransuspensionen beinhalten andererseits weitere kardiale Zelltypen mit einem unverkennbar größeren prozentualen β_2 -AR Anteil (Lau et al., 1980; Freissmuth et al., 1986). Entsprechend den vorliegenden Ergebnissen zum MCT-Modell unterliegt die β -AR Kaskade nicht-kontraktile Zellpopulationen ebenfalls charakteristischen Veränderungen. Diese Zellen dominieren aufgrund ihres prozentualen Anteils ventrikuläre Aufarbeitungen und maskieren folglich Veränderungen an Kardiomyozytenmembranen. Eine selektive β_1 -AR Downregulation kann demnach an Rohmembransuspensionen nicht so deutlich hervortreten, wie es für Kardiomyozyten beobachtet wurde. Untersuchungen an Membranen ventrikulären Gewebes gestatten aus diesem Grund deutlich sensiblere Aufzeichnungen für den β_2 -AR, obgleich der β_1 -AR spezifische Antagonist CGP 20712A (Dooley et al., 1986) mit seinem hohen Affinitätsunterschied gegenüber β_1 - und β_2 -AR (>1000) charakteristische Subtypverteilungen offen legen kann.

Diese Sachverhalte könnten jedoch lediglich die gemeinsame Downregulation von $\beta_{1/2}$ -AR an ventrikulären Membranen erklären. Mit Blick auf eventuelle Kammer-spezifische Verschiebungen wiesen Yoshie et al. (1994) in einer Studie zum MCT-Modell einerseits keine Veränderungen für linke Ventrikel, wohl aber eine Verminderung in der β -AR Dichte im interventrikulären Septum nach. In den eigens durchgeführten Untersuchungen wurde der linke Ventrikel zusammen mit dem Septum präpariert. Leineweber et al. (2002) diskutieren diesbezüglich Unterschiede in der β -AR Dichte linker Ventrikel mit und ohne Septum. Aus diesem Grund kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die dargestellten Resultate linksventrikuläre Veränderungen aufzeigen, deren Ursachen vielmehr in der Präparationsmethode als in der Rechtsherzhypertrophie nach MCT-Injektionen liegen. Aus den genannten Gründen wäre somit ebenfalls für ventrikuläre Membransuspensionen eine Ventrikel-spezifische und eine selektive β_1 -AR Downregulation vorstellbar.

Die eigens nachgewiesenen Unterschiede werden andererseits von weiteren Arbeitsgruppen gestützt. Abweichungen in den Ergebnissen zwischen Membranen aus ventrikulärem Gewebe bzw. Kardiomyozyten wurden von Laurent et al. (2001) und Yoshida et al. (2001) an Hunden mit Frequenz-induzierter Herzinsuffizienz bzw. an Ratten nach Koronarligation beschrieben. Vor diesem Hintergrund unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demnach um

so mehr die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung von spezifischen Zelltypen sowie deren Veränderungen im insuffizienten Herzen.

In Ergänzung zur Bestimmung der Dichte und Verteilung von β -AR wurde im weiteren Studienverlauf deren funktionelle Kopplung an G-Proteine untersucht. Maguire et al. (1976) und Lefkowitz et al. (1976) beschrieben erstmalig für Adrenozeptoren eine Guaninnukleotid-abhängige Agonistenbindung an β -AR als sogenannte „high and low affinity states“. Nachfolgend erweitert auf ein „three-state receptor model“ (Leff et al., 1997) wird zum heutigen Zeitpunkt davon ausgegangen, dass G-Protein koppelnde Rezeptoren mehrere unterschiedliche Konformationen eingehen können (Gether, 2000). Dennoch erfolgt die Charakterisierung einer Rezeptorkopplung an G-Proteine oftmals über Bindungsstudien in Gegenwart agonistischer Liganden. Die Anzahl der β -AR im „high affinity state“ war signifikant erniedrigt in Membranen des rechten Ventrikels MCT-behandelter Ratten mit erneut stärkerer Abschwächung für insuffiziente Tiere. Linksventrikuläre Verringerungen wurden hingegen ausschließlich für dekompensierte Ratten nachgewiesen (3.3.1.). Über eine gleichwertige Verminderung von kardialen β -AR in hochaffiner Kopplung wird von linken Ventrikeln im Hunde-Modell der Frequenz-induzierten Herzinsuffizienz (Kiuchi et al., 1993), von linken Ventrikel im Volumenüberlastungsmodell infolge aorto-cavaler Anastomose an Schweinen (Hammond et al., 1992) und ebenfalls von Membrangemischen aus rechten und linken Ventrikeln im Rechts-herzhypertrophiemodell nach Pulmonalarterienstenose an Hunden berichtet (Dong et al., 1999).

Unabhängig von der Ätiologie zeigen Tiermodelle zur Herzinsuffizienz demnach eine verringerte Anzahl von kardialen β -AR im „high affinity state“ für das Stadium der Dekompensation. Die aufgezeigte Reduktion infolge einer MCT-Injektion steht des Weiteren in gutem Einklang mit der nachgewiesenen Steigerung der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) Aktivität an diesen Ratten (3.3.4.). Jüngere Untersuchungen kennzeichnen eine zentrale Stellung der GRKs in der Rezeptor-Desensibilisierung bzw. in der Verknüpfung unterschiedlicher Signaltransduktionen (Bünemann & Hosey, 1999; Ferguson, 2001). Pei et al. (1994) belegten am Beispiel konstitutiv aktiver β_2 -AR in vitro eine GRK vermittelte Phosphorylierung in Abwesenheit agonistischer Liganden vergleichbar mit dem Wild-Typ β_2 -AR im „high-affinity-state“ nach agonistischer Besetzung. Sind Unterschiede in der Desensibilisierungskinetik von β_1 - und β_2 -AR auch umstritten (Freedman et al., 1995; Shiina et al., 2001), so scheint jedoch ein Zusammenhang zwischen der erhöhten GRK Aktivität sowie der Abnahme von β -AR mit hochaffiner Bindung an G_s -Proteine von MCT-behandelten Tieren sehr wahrscheinlich. Eine

weitere eindrucksvolle Bestätigung erfährt dieser Sachverhalt mit den Untersuchungen von Cho et al. (1999). Am Beispiel von Knock-out Mäusen für die Dopamin β -Hydroxylase demonstrierte die Arbeitsgruppe in vivo eine streng inverse Korrelation zwischen β -AR im „high-affinity-state“ und der GRK Aktivität als Konsequenz einer fehlenden Katecholaminsynthese. Die Reduktion hochaffin koppelnder β -AR wird auf Grundlage dieser Studien offenbar vor allem von einer Steigerung in der GRK Aktivität getragen.

Mit Blick auf die funktionelle Konsequenz entspricht eine Reduktion von kardialen β -AR im „high affinity state“ einer Abschwächung in der Rezeptor-vermittelten Stimulation der AZ sowie funktionell einer reduzierten inotropen und chronotropen Antwort. Diese erniedrigte Aktivierbarkeit wurde sowohl über Bestimmungen zur AZ (GTP- und Isoprenalin-vermittelt, 3.3.3.) als auch mittels kontraktile Experimente (3.3.5.) eindeutig festgestellt. Unter Berücksichtigung einer bereits reduzierten β -AR Dichte an Membranen MCT-behandelter Ratten gewinnt dieser Sachverhalt darüber hinaus an Bedeutung. Die Fähigkeit zur kardialen Kompensation mit Hilfe der β -AR Signaltransduktion vier bis sechs Wochen nach einer MCT-Applikation ist demnach allein aufgrund der verringerten Rezeptordichte bzw. -kopplung drastisch herabgesetzt.

Intrazellulär Rezeptor-koppelnde $G_{S\alpha}$ -Proteine zeigten eine signifikante Abnahme in den erfassten $G_{S\alpha}$ -Banden an rechtsventrikulären Membranen für einerseits hypertrophiekompensierende als auch für insuffiziente MCT-Ratten. Dagegen wurde an den jeweiligen Präparationen des linken Ventrikels ausschließlich für eine $G_{S\alpha}$ -Bande ein verringerter Betrag nachgewiesen (3.3.2.).

Eine Abnahme im $G_{S\alpha}$ -Proteingehalt ist für weitere Rechtsherzhypertrophie Modelle bereits dokumentiert. Lai et al. (1996) beschreiben ebenso die Reduktion von $G_{S\alpha}$ -Proteinen in beiden Ventrikeln nach Pulmonalarterienstenose an Hunden während Pei et al. (2000) und Leon-Velarde et al. (2001) im Hypoxie-Modell zur rechtsventrikulären Drucküberlastung für $G_{S\alpha}$ -Proteine eine Reduktion ausschließlich in rechten Ventrikeln aufzeigen. In diesem Sinne unterstreichen die eigens aufgestellten Ergebnisse die bisherige Tendenz sämtlicher Studien: Im Kontrast zu tierexperimentellen Befunden ergaben Untersuchungen an explantierten Herzen insuffizienter Patienten interessanterweise keine Verschiebung auf $G_{S\alpha}$ -Protein Ebene (Schnabel et al., 1990).

Inwiefern die β -adrenerge Signaltransduktion mit Blick auf die $G_{S\alpha}$ -Gehaltsabnahme eine Beeinträchtigung erfährt, lässt sich über die durchgeführten Untersuchungen nur unvollstän-

dig klären. Für G-Proteine ergibt sich ein drastischer Überschuss (β -AR: $G_{\alpha\beta\gamma}$:AZ = 1:100:3) in der Stöchiometrie der β -AR Signaltransduktion (Alousi et al., 1991; Post et al., 1995; Milligan, 1996). Ungeachtet dieses quantitativen Überhangs zeigten rechte Ventrikel MCT-behandelter Ratten immerhin eine ~60%ige (47,1 kDa) bzw. ~30%ige (49,7 kDa) Abnahme der $G_{S\alpha}$ -Untereinheiten. Diese unverkennbar drastische Reduktion verursacht zweifelsohne eine weitere Beeinträchtigung der β -AR Kaskade im MCT-Modell. Die Untersuchungen zu den $G_{S\alpha}$ -Untereinheiten ergaben darüber hinaus eine betragsmäßig vergleichbare Reduktion im Proteingehalt zwischen hypertrophiekompensierenden und insuffizienten Tieren. Während für die ventrikulären NA Gewebekonzentrationen, β -AR bzw. für deren Kopplung an G_S -Proteine Unterschiede zwischen RVH und RVF beobachtet wurden, kommt es im Fall der $G_{S\alpha}$ -Untereinheiten zu einer schnellen Hypertrophie-induzierten Gehaltsabnahme. Für insuffiziente Tiere wurde keine darüber hinausgehende Abnahme festgestellt. Demzufolge bewirkt die Reduktion der $G_{S\alpha}$ -Proteine eine verhältnismäßig frühzeitige und vor allem eine zusätzliche Schädigung der β -AR Signaltransduktion.

Ein besonderes Interesse mit Blick auf die Stöchiometrie der β -AR Signaltransduktion verdient in den Untersuchungen zur Herzinsuffizienz die Erfassung der AZ Aktivität. Dabei handelt es sich um den limitierenden Faktor innerhalb dieser Kaskade (siehe oben). Wie bereits an Herzen insuffizienter Patienten gezeigt wurde, resultiert im Fall einer β -AR Downregulation bzw. –Entkopplung eine stark verminderte Bildung des second messengers cAMP als Antwort auf eine Rezeptorstimulation (Bristow et al., 1989; Danielsen et al., 1989). Darüber hinaus findet sich im MCT-Modell mit einem reduzierten $G_{S\alpha}$ -Proteingehalt eine weitere Abschwächung innerhalb der β -AR Kaskade. Die Untersuchungen zur AZ Aktivität bestätigten diesen Sachverhalt. So erwies sich die Stimulation der AZ mittels Isoprenalin an MCT-behandelten Ratten als abgeschwächt für wiederum beide Ventrikel (3.3.3.), wohingegen über die Detektion der cAMP Bildung in frisch isolierten Kardiomyozyten eine Kammer-spezifische Verschiebung, entsprechend der β -adrenergen Rezeptorregulation, beobachtet werden konnte. Diesen erniedrigten Anstiegen in rechtsventrikulären Kardiomyozyten stand eine unveränderte cAMP Akkumulation infolge einer Isoprenalin-Stimulation in den jeweiligen Kardiomyozyten des linken Ventrikels gegenüber (3.4.3.).

Eine Ventrikel-spezifische Abschwächung in der cAMP Bildung nach β -adrenerger Aktivierung ergaben ebenso die Untersuchungen von Yoshie et al. (1994) an Membranen rechter Ventrikel bzw. von Vescovo et al. (1989a, b) in isolierten Kardiomyozyten des hypertro-

phierten Ventrikels MCT-behandelter Ratten. Pela et al. (1990) untersuchten ausschließlich Membranen des rechten Ventrikels und beobachteten dabei eine verminderte Antwort auf Isoprenalin. Eine selektive rechtsventrikuläre Erniedrigung des Basalumsatzes bzw. der Isoprenalin-vermittelten Aktivitätssteigerung, jedoch keine Änderung nach Zugabe von Forskolin bzw. NaF verdeutlichten Kacimi et al. (1992) an Hypoxie-exponierten Ratten mit hypertrophierten rechten Ventrikeln. In Kardiomyozyten des rechten und linken Ventrikels hypoxischer Ratten fanden Pei et al. (2000) signifikante Abnahmen in der cAMP Bildung nach Stimulation mit Isoprenalin, NaF und Forskolin, wohingegen die AZ Basalaktivität keinen Veränderungen unterlag. Ebenso keine Kammer-spezifische Abnahme in der Isoprenalin-, Gpp(NH)p- und Forskolin-vermittelten Steigerung in der AZ Aktivität wiesen Fan et al. (1987) an pulmonalarteriellstenosierten Hunden nach.

Unter diesen Gesichtspunkten geben die genannten Arbeiten kein einheitliches Bild bezüglich einer Kammer-selektiven Abschwächung der AZ Aktivität. In den eigenen Bestimmungen traten erneut die Unterschiede zwischen Ventrikel- und Kardiomyozytenbestimmungen hervor. In letzteren konnte nur für rechtsventrikuläre Präparationen eine signifikant abgeschwächte cAMP Akkumulation nach Stimulation mit Isoprenalin beobachtet werden. Allerdings ließen linksventrikuläre Kardiomyozyten die unverkennbare Tendenz zur Abschwächung der cAMP Bildung erkennen. Unter Berücksichtigung der unveränderten β -AR Dichte in linksventrikulären Herzmuskelzellen überraschten diese Resultate zunächst, deuten jedoch auf weitere Veränderungen innerhalb der β -AR Kaskade hin, wie z.B. die nachgewiesene Reduktion im $G_{S\alpha}$ -Proteingehalt in ventrikulären Membranen.

Dennoch bestätigen die vorliegenden Ergebnisse zur AZ die getroffenen Aussagen zur erniedrigten Aktivierbarkeit der β -AR Signaltransduktion im MCT-Modell und stehen in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Bristow et al. (1992). An Patienten mit PPH und Anzeichen einer Rechtsherzinsuffizienz beobachtete die genannte Arbeitsgruppe eine Abnahme im Noradrenalinegehalt, in der β_1 -AR Dichte sowie in der AZ Aktivität nach β -AR Stimulation in ausschließlich rechten Ventrikeln. Entsprechende Verschiebungen wurden im MCT-Modell ebenfalls nachgewiesen. Jedoch ergab sich eine ausgeprägte Selektivität für rechte Ventrikel nur in den Kardiomyozytenpräparationen. Einerseits existieren generelle Unterschiede zwischen tierexperimentellen Untersuchungsergebnissen und menschlichen Befunden (Brodde et al., 1995). Andererseits lässt die Symptomatik MCT-behandelter Ratten auf einen weitaus schwerwiegenderen Krankheitsverlauf im Vergleich mit den untersuchten PPH Patienten schließen. Während für letztere eine unveränderte linksventrikuläre Funktion festgestellt wurde, zeigten MCT-behandelte Ratten eine Zunahme in den linksventrikulären

Nassgewichten sowie insuffiziente Tiere Pleura-, Pericardial- und Peritonealergüsse. MCT-behandelte Ratten befanden sich demnach offensichtlich in einem wesentlich progressiveren Krankheitsverlauf und fortgeschrittenerem Stadium, was die Beeinträchtigung linker Ventrikel erklären könnte.

Für RVH- und RVF-Tiere wurde des Weiteren eine reduzierte AZ Aktivität als Folge einer β -AR unabhängigen Stimulation nachgewiesen. Neben einer abgeschwächten Basalfunktion für beide Ventrikel wurde eine Kammer-selektive rechtsventrikuläre Abnahme der AZ Aktivität nach Mn^{2+} -Stimulation gezeigt (3.3.3.). Der Einsatz des zweiwertigen Kations ergibt sich aus dessen selektiven Angriffspunkt an der katalytischen AZ Untereinheit ohne Beteiligung von G_S -Proteinen (Strittmatter & Neer, 1980; Drummond, 1981; de Vente & Zaagsma, 1981). Eine derartig selektive Regulation der katalytischen Untereinheit dokumentierten Bristow et al. (1992) gerade an Patienten mit Rechtsherzhypertrophie aufgrund PPH. In diesem Sinne zeigen die Versuche eine sehr gute Übereinstimmung in einer per se abgeschwächten Aktivität der katalytischen Untereinheit der AZ zwischen den Befunden von PPH Patienten und dem MCT-Modell. Demgegenüber stehen die Ergebnisse linksherzinsuffizienter Patienten mit nachweislich unveränderter Aktivität in der katalytischen AZ Untereinheit in beiden Ventrikeln (Böhm, 1995a; Brodde & Michel, 1999).

Die AZ steht unter dualer Kontrolle stimulatorischer und inhibitorischer Guaninnukleotidbindender Proteine (Sternweis et al., 1981; Gilman, 1987). In Gegenwart von GTP lassen sich sowohl G_S - als auch G_I - Proteine ansprechen (Simmond, 1999). Für rechte und linke Ventrikel MCT-behandelter Ratten ergab sich diesbezüglich eine deutliche Verringerung in dem ermittelten AZ Umsatz. Der Aktivitäts-steigernde Einfluss von G_S -Proteinen war darüber hinaus in Gegenwart von NaF separat zugänglich (Johnson & Sutherland, 1973; Manganiello & Vaughan, 1976). An Membranpräparationen beider Ventrikel konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der G_S -Proteine für MCT-behandelte Tiere eindrucksvoll reduziert war (3.3.3.). Diese Befunde stehen im Einklang mit der erfassten biventrikulären Abnahme im G_S -Proteingehalt (3.3.2.). Demnach wurde über die Untersuchungen zum „high affinity state“ hinaus eine Abschwächung in der Aktivität von G_S -Proteinen anhand von AZ Umsatzbestimmungen nachgewiesen. In Analogie dazu standen die Resultate der Forskolin getriggerten AZ Aktivitätssteigerung: Abnahme in beiden Ventrikeln mit jedoch deutlichem Unterschied zwischen RVH- und RVF-Ratten an rechtsventrikulären Präparationen. Das Diterpen-alkaloid Forskolin gestattete, im Gegensatz zu Mn^{2+} , die Bestimmung der AZ Aktivität nach hauptsächlichlicher Stimulation der katalytischen Untereinheit mit einer Beteiligung von G_S -Proteinen (Seamon et al., 1981; Darfler et al., 1985). Diese Ergebnisse bestätigten somit die funktionelle Abschwä-

chung der AZ Untereinheit, aber auch die nachgewiesene Verringerung der $G_{s\alpha}$ -Untereinheiten. Die AZ Untersuchungen komplettieren somit das Bild der β -AR Kaskade: Abschwächung ebenso auf AZ Ebene im MCT-Modell. Aufgrund der angesprochenen Stöchiometrie verursachen die nachgewiesenen AZ Veränderungen eine unverkennbar drastische Schädigung der β -AR Signaltransduktion, was die Ergebnisse zur β -AR vermittelten Kontraktilität eindrucksvoll bestätigen (siehe unten).

Die Resultate der GRKs unterstreichen die aufgezeigte Regulation von β -AR im Monocrotalin-Ratten-Modell. Hierbei trat eine signifikante Aktivitätssteigerung in Zytosol- und Membranfraktionen aus beiden Ventrikeln von MCT-behandelten Ratten hervor (3.3.4.). Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der Reduktion der $Uptake_1$ Aktivität sowie der verringerten ventrikulären NA Konzentration. Iaccarino et al. (1998) verdeutlichten diesbezüglich in vivo eine positive Korrelation zwischen der agonistischen Stimulation von β -AR und der GRK Aktivität sowie deren Expression (mRNA und Protein). Gleichwertige Ergebnisse erzielten ebenso Ishigai et al. (1999) an insuffizienten Ratten nach Koronarligation.

Infolge fehlender Antikörper gegen die GRK-Subtypen musste auf die Typisierung durch Immunoblots verzichtet werden. Es kann dennoch davon ausgegangen werden, dass mit Hilfe der angewandten Methode vornehmlich GRK2 (wahlweise auch β -adrenerge Rezeptorkinase1, β -ARK1, genannt) erfasst und charakterisiert wurde. Im Fall der bisher identifizierten 7 GRK-Subtypen wurden ausschließlich GRK2, 3 und 5 in kardialem Gewebe nachgewiesen, wobei GRK2 die betragsmäßig stärkste Expression zukommt (Iaccarino & Koch, 1999; Penn et al., 2000). Die genannten GRKs phosphorylieren das als Substratanalogon eingesetzte Rhodopsin mit folgender Spezifität: GRK2 » GRK3 = GRK5 (DeBlasi et al., 1995). Sowohl GRK2 als auch GRK3 liegen im inaktiven Zustand zytosolisch gelöst vor. Dementgegen ist die GRK5 mit Membranen assoziiert (Pitcher et al., 1998; Krupnick & Benovic, 1998). Die Aktivierung der GRK2, 3 erfolgt über eine Translokation aus dem Zytosol an die Membran, wobei diese Schlüsselfunktion von $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine getragen wird (Pitcher et al., 1992; Koch et al., 1993).

In der Literatur verfügbare Studien zur tierexperimentellen Herzhypertrophy/-insuffizienz mit einer Charakterisierung der GRK Aktivität existieren ausschließlich für linke Ventrikel (Urasawa et al., 1996; Akhter et al., 1997; Rockman et al., 1998; Maurice et al., 1999; Vinge et al., 2001). Die erkennbaren Steigerungen in der GRK2 Aktivität MCT-behandelter Ratten stehen dennoch in guter Relation zu den beschriebenen Ergebnissen genannter Arbeiten aber auch zu gleichwertigen Untersuchungen an linksherzinsuffizienten Patienten (Ungerer et al., 1993,

1994). Der parallele Anstieg der GRK2 Aktivität in zytosolischen Aufschlüssen und Membranfraktionen beider Ventrikel von MCT-behandelten Ratten konnte jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. Mit Blick auf die vornehmlich detektierte Aktivität der GRK2 wäre eine Abnahme in der zytosolischen Fraktion bzw. eine Steigerung in den Membranpräparationen zu erwarten gewesen. Ungerer et al. (1996) belegten eine derartige Aktivitätserhöhung an isolierten Membranfraktionen von Rattenherzen nach Myokard-Ischämie. Demgegenüber beschrieben jedoch Iaccarino et al. (1999) eine Zunahme der GRK2 Aktivität in zytosolischen Präparationen nach 45 minütiger Stimulation mit Isoprenalin. Möglicherweise spiegeln diese Resultate eine gesteigerte Translation eventuell aber auch eine erhöhte Transkriptionsrate wider. Insofern könnte die dargestellte Aktivitätssteigerung im Zytosol rechter und linker Ventrikel zumindest für eine gesteigerte Translation der GRK2 mRNA vier bis sechs Wochen nach Monocrotalin-Applikation sprechen. Choi et al. (1997) demonstrierten in diesem Sinne eine Zunahme der GRK2 Aktivität einerseits in Membranaufschlüssen, jedoch ebenfalls in zytosolischen Fraktionen hypertrophierter linker Ventrikel von Mäusen nach Aortenkonstriktion.

Wie bereits angesprochen, wird eine gesteigerte GRK Aktivität und Expression hauptsächlich für die Reduktion in der Anzahl von β -AR mit hochaffiner Kopplung an G-Proteine bzw. der Abnahme in der β -AR Dichte verantwortlich gemacht (Krupnick & Benovic JL, 1998; Iaccarino & Koch; 1999; Penn et al., 2000). Alle nachgewiesenen Veränderungen in der β -AR Signaltransduktion MCT-behandelter Tiere scheinen diese Aussage zu bekräftigen. Dennoch verdeutlichen weiterführende Untersuchungen, dass neben den GRKs noch weitere Kinasen in die Rezeptorphosphorylierung involviert sein müssen. Beispielsweise reduzierte eine dominant negative Mutation der GRK2 die Phosphorylierung des β_2 -AR lediglich um 60 % (Kong et al., 1994). Fan et al. (2001) berichten über die Notwendigkeit der β_2 -AR Phosphorylierung über die c-Src Tyrosin-Kinase, bevor eine GRK2 vermittelte Phosphorylierung eine funktionelle Entkopplung bewirkt. Diese Studien könnten in diesem Sinne die Tatsache mitbegründen, dass trotz biventrikulärer Steigerungen in der GRK2 Aktivität, mit einem hierbei prozentual stärkerem Anstieg in linken Ventrikeln (3.3.4.), die Veränderungen in der β -AR Signaltransduktion an diesen linken Ventrikeln schwächer ausgeprägt waren.

Die nachgewiesene Reduktion in der kontraktile Antwort nach β -adrenerger Stimulation (3.3.5.) bestätigt die Resultate etablierter Studien zur Herzinsuffizienz (Brodde, 1991). Das Ausmaß der drastischen rechtsventrikulären Abschwächung war andererseits unerwartet. So konnte gerade für insuffiziente Ratten ein lediglich minimaler inotroper Effekt in Gegenwart

von Isoprenalin festgestellt werden. Demgegenüber wurden für die jeweiligen linksventrikulären Muskelstreifen signifikante, im Vergleich zum rechten Ventrikel dennoch deutlich schwächere Verminderungen beobachtet (3.3.5.).

Die dargestellten Verschiebungen auf Rezeptor-, G_s -Protein-, AZ- und GRK2-Ebene infolge einer Monocrotalin-Applikation gestatten allerdings keine umfassende Charakterisierung der neurohumoral kontrollierten Kontraktilität des Herzens. Die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie wird darüber hinaus von einer Reihe markanter Veränderungen im kontraktilen Apparat selbst begleitet (Davies et al., 1996; Drexler et al., 1997). Im Mittelpunkt der myokardialen kontraktilen Dysfunktion steht hierbei auf zellulärer Ebene eine gestörte $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase als Endzustand der bereits angedeuteten pathophysiologischen Prozesse (Hasenfuss, 1998b; Balke & Shorofsky, 1998). Mit Hilfe von Kontraktilitätsaufzeichnungen nach Zugabe von Calcium-Ionen sollten diesbezüglich Rückschlüsse auf die Funktionalität des kontraktilen Apparates gezogen werden. Rechtsventrikuläre Muskelstreifen insuffizienter Ratten zeigten einerseits minimale Anstiege in der Kontraktilität für geringe Calcium-Konzentrationen, jedoch brach die kontraktile Antwort in Gegenwart maximaler Mengen an Calcium-Ionen zusammen (3.3.5.). Die untersuchten Herzmuskelstreifen waren nicht in der Lage, das exogen zugeführte Calcium in eine mit Kontrolltieren vergleichbare inotrope Antwort umzusetzen. Unabhängig von den bisher diskutierten Beeinträchtigungen der β -AR Kaskade ist der kardiale kontraktile Apparat MCT-behandelter Ratten demzufolge separat geschädigt. Aufgrund dieser Sachverhalte ist eine angemessene Kompensationsreaktion nach Stimulation von β -AR ausgeschlossen. Allerdings wurden für Muskelstreifen des rechten Ventrikels bereits relevante Steigerungen in den Basalkontraktionen ermittelt. Hypertrophierte Gewebestreifen arbeiteten demnach *in vitro* ohne exogene β -AR Stimulation bzw. durch Calcium-Ionen nahezu mit maximaler Leistung und kompensierten nur äußerst geringe Anstiege im intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ als Folge einer permanenten intrazellulären Calcium-Überladung. Derartige zytosolische Calcium-Überlastungen in Kardiomyozyten hypertrophierter bzw. terminal insuffizienter Herzen sind sowohl durch tierexperimentelle (Bing et al., 1991; Moore et al., 1991; Bentivegna et al., 1991; Perreault et al., 1992) als auch durch Untersuchungen am Menschen belegt (Beukelmann et al., 1992; Meuse et al., 1992; Pieske et al., 1995). Die physiologische Konsequenz dieser molekularbiologischen Untersuchungen veranschaulichten Ravens et al. (1996) und Brown et al. (1992) mit Hilfe von Organbad-Studien am Frequenz-induzierten Herzinsuffizienzmodell des Hundes bzw. nach Noradrenalin ausgelöster linksventrikulärer Hypertrophie in Ratten. Beide Studien dokumentieren in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit einen signifikant abgeschwächten inotropen Effekt nach externer

Calcium-Zufuhr. In diesen Tiermodellen zur Herzhypertrophie/-insuffizienz resultiert demnach unabhängig von den Signaltransduktionen eine signifikante Beeinträchtigung des kontraktilen Apparates. Für rechte Ventrikel von RVF-Tieren trat diese Schädigung unverkennbar deutlich hervor (3.3.5.).

Einen weiteren eindrucksvollen Beweis für diese separate Störung im kontraktilen Apparat bzw. der β -AR-vermittelten Kontraktilität ergaben die beobachteten Arrhythmien. Infolge dieser arrhythmischen Kontraktionen mussten die Aufzeichnungen der KWK für Isoprenalin an rechts- und linksventrikulären Muskelstreifen in dessen submaximaler Konzentration abgebrochen werden. Den offensichtlichen Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Sympathikusaktivität und kardialen Arrhythmien kennzeichnen eine Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen (Du et al., 1993, 1999; Dae et al., 1997) bzw. Studien am menschlichen Herzen (Meredith et al., 1991; Cao et al., 2000; Brunner-La Rocca et al., 2001). Eine Ursache für die beobachteten Arrhythmien liegt vermutlich in der Tatsache, dass Isoprenalin nicht über den neuronalen Uptake aus dem synaptischen Spalt entfernt wird (Bryan-Lluka & O'Donnell, 1992; Leuenberger et al., 1992), sondern einer Metabolisierung durch den Uptake₂ unterliegt (Friedgen et al., 1994). Die verzögerte Isoprenalin Clearance bewirkt demzufolge eine anhaltende β -AR Stimulation und beschleunigt das Auftreten arrhythmischer Kontraktionen. Für die entsprechenden Kontrollpräparationen wurden auf der anderen Seite keine Arrhythmien festgestellt. Somit bekräftigen diese Resultate eine unmittelbare Verbindung der aufgezeichneten Arrhythmien zum unverkennbar deutlich geschädigtem kontraktilen Apparat.

MCT-behandelten Ratten fehlt demzufolge mit der β -AR Signaltransduktion der wirkungsvollste Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der kardialen Leistung. Die dargestellten Veränderungen im MCT-Modell sind im Gegensatz zu Patienten mit PPH (Bristow et al., 1992) jedoch nicht auf den rechten Ventrikel beschränkt. Wie bereits aufgeführt ist dafür sehr wahrscheinlich das fortgeschrittenere Stadium im Krankheitsverlauf verantwortlich zu machen.

4.4. MUSKARINERGE REZEPTOREN

Ungeachtet der abgeschwächten vagalen Aktivität im terminal insuffizienten Stadium (Eckberg et al., 1971; Porter et al., 1990) ergab die überwiegende Mehrheit der Studien an insuffizienten menschlichen Herzen keinen Unterschied weder in der Anzahl noch in der Funktion muskarinerger Rezeptoren (Böhm et al., 1990a; Brodde et al., 1992b; Giessler et al., 1999).

Lediglich Le Guludec et al. (1997) berichteten in diesem Zusammenhang über einen signifikanten Anstieg M_2 -cholinergere Rezeptoren. Deren Dichte an MCT-behandelten Ratten erwies sich demgegenüber als unverändert für hypertrophierte rechte Ventrikel, während für die jeweiligen linken Ventrikel eine tendenzielle Erhöhung bzw. im Fall insuffizienter Tiere eine signifikante Steigerung verzeichnet wurde (3.5.1.).

Diese gegenläufigen Befunde scheinen einerseits auf grundsätzlichen Unterschieden zwischen Mensch und Tier zu beruhen. Im Rechtsherzhypertrophie-Modell nach hypoxischer Exposition konnten Kacimi et al. (1993) und Wolfe & Voelkel (1983) in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit einen Anstieg in der M_2 -Rezeptor Dichte ausnahmslos in linksventrikulären Membranfraktionen aufzeigen. Favret et al., 2001 dokumentierten einen biventrikulären Anstieg mit jedoch signifikant stärkerer Zunahme von M_2 -cholinergen Rezeptoren in linken Ventrikeln hypoxischer Ratten. Demzufolge unterstreichen die Resultate der vorliegenden Arbeit zum MCT-Modell die eingeschränkte Vergleichbarkeit beider Spezies bezüglich kardialer muskarinerger Rezeptoren.

Andererseits muss in diesem Zusammenhang erneut die Präparation der entnommenen Herzen Berücksichtigung finden. Rechte Ventrikel wurden von den Herzen abgetrennt und die interventrikulären Septen zusammen mit linksventrikulärem Gewebe aufgearbeitet. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ermittelten Veränderungen in linken Ventrikeln auf eine Erhöhung der M_2 -Rezeptor Dichte in den interventrikulären Septen zurückzuführen sind (siehe 4.3.).

Auf eine weitere Erklärung deutet der Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchungen hin. Vier bis sechs Wochen nach MCT-Injektion zeigte sich eine signifikante Hypertrophie des rechten Ventrikels für RVH- und RVF-Ratten, aber auch für linke Ventrikel insuffizienter RVF-Tiere (3.1.1.). Wie bereits mehrfach angesprochen, handelt es sich demnach im Fall einer MCT-Applikation an Ratten nicht um ein Ventrikel-spezifisches Tiermodell. Die Veränderungen linker Ventrikel waren jedoch generell schwächer ausgeprägt. Regulationsmechanismen im frühen Stadium einer Hypertrophie wären aus diesem Grund besser an linksventrikulären Präparationen nachweisbar. Der progressive Verlauf einer pulmonalen Hypertonie mit rechtsventrikulärer Hypertrophie an MCT-behandelten Tieren könnte deshalb mögliche Kompensationsmechanismen einer geringfügigen Hypertrophie überlagert haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht untersucht, ob sich eine derartige Regulation ausschließlich im frühen Stadium einer Hypertrophie etabliert bzw. aufgrund des progressiven Hypertrophieverlaufs im fortgeschrittenen Stadium zurückgesetzt wird. In diesem Fall wäre eine

Zunahme der M_2 -Rezeptor Dichte zum untersuchten Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar gewesen.

Im G_i -Protein Gehalt wurde kein Unterschied in beiden Ventrikeln MCT-behandelter Ratten festgestellt (3.5.2.). Gleiche Aussagen existieren wiederum sowohl für das Hypoxie-Modell rechtsherzhypertrophierter Ratten, aber auch für Hunde nach Pulmonalarterienstenose: keine Veränderungen in beiden Ventrikeln (Kacimi et al., 1995; Lai et al., 1996; Pei et al., 2000). Explantierte Herzen insuffizienter Patienten stehen mit einer mehrheitlichen Steigerung in der Aktivität von G_i -Untereinheiten erneut im Gegensatz zu tierexperimentellen Befunden (Feldman et al., 1988; Böhm et al., 1990b; Fu et al., 1992) und bekräftigen den aufgezeigten Kontrast zwischen Tier und Mensch. Stimulatorische und inhibitorische G-Proteine menschlicher Herzen zeigen somit ein gegensätzliches Bild im Vergleich mit tierexperimentellen Untersuchungen: reduzierter G_s - und unveränderter G_i -Protein Gehalt für Tiere gegenüber unverändertem G_s - aber erhöhtem G_i -Protein Gehalt für insuffiziente menschliche Herzen. Sowohl Untersuchungen zur AZ Aktivität als auch zur Kontraktilität nach muskarinenger Stimulation ließen allerdings keinen Unterschied zwischen Herzen insuffizienter Patienten und Kontrollen erkennen (Brodde et al., 1992b; Fu et al., 1992; Giessler et al., 1999). Diesen Verschiebungen auf G_i -Protein Ebene insuffizienter menschlicher Herzen konnte demnach bisher keine unmittelbare funktionelle Konsequenz zugeschrieben werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine Untersuchungen zur AZ Aktivität bzw. kontraktile Messungen nach M_2 -Rezeptor Stimulation durchgeführt. Eine gesteigerte parasymphatische Inhibition der Herzmuskelarbeit MCT-behandelter Ratten kann dementsprechend nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Muskarinerge Rezeptoren bzw. die koppelnden G_i -Proteine im MCT-Modell stehen somit lediglich in schwacher Übereinstimmung mit den nachgewiesenen Veränderungen menschlicher Herzen. Jedoch lassen sich auf der anderen Seite die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sehr wohl mit den Resultaten weiterer Rechtsherzhypertrophie Modelle vergleichen. Tiermodelle bieten unter diesem Blickwinkel offensichtlich nur begrenzte Möglichkeiten, Veränderungen in der muskarinergen Signaltransduktion von insuffizienten menschlichen Herzen experimentell nachvollziehen zu können.

4.5. α_1 -ADRENERGE REZEPTOREN

Entgegen den Befunden an insuffizienten menschlichen Herzen (siehe 1.) ließ die vorliegende Arbeit eine biventrikuläre Abnahme in der α_1 -AR Dichte für MCT-behandelte Ratten erkennen (3.6.1.). Besondere Vorsicht erfordert jedoch die bereits angesprochene Übertragung tierexperimenteller Resultate für α_1 -AR auf menschliche Untersuchungsergebnisse aufgrund der beträchtlichen Unterschiede in der Rezeptordichte und in der Subtypverteilung (siehe 1.). Vergleichsweise wenig Resultate existieren für α_1 -AR in Modellen zur Rechtsherzhypertrophie. Leon-Velarde et al. (2001) fanden bemerkenswerterweise infolge einer Hypoxie-induzierten Rechtsherzhypertrophie eine selektive Upregulation von α_1 -AR an nicht hypertrophierten linken Ventrikeln. Selbige Studie charakterisiert darüber hinaus ein weiteres Tiermodell. Entsprechend den Resultaten der vorliegenden Arbeit beschreiben die Autoren eine Reduktion in der α_1 -AR Dichte nach Noradrenalininfusion. Zhao et al. (1996) fanden ein identisches Ergebnis in diesem Modell und diskutieren einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Plasmanoradrenalin Spiegel und der Abnahme von α_1 -AR. Die Plasmanoradrenalin Spiegel MCT-behandelter Ratten der vorliegenden Arbeit waren ebenfalls erhöht, wenn auch ohne Signifikanz (3.1.2.). Eine Abnahme in der kardialen α_1 -AR Dichte scheint demzufolge eine mögliche Konsequenz erhöhter Plasmanoradrenalin Spiegel und/oder der lokal erniedrigten NA Gewebekonzentration zu sein. Allerdings lassen α_1 -adrenerge Subtypen ein unterschiedliches Bild in ihrem Desensibilisierungsverhalten nach einer agonistischen Stimulation erkennen. Yang et al. (1999) kennzeichneten für den α_{1B} -AR eine schnellere Desensibilisierung gegenüber α_{1A} - bzw. α_{1D} -AR. Diviani et al. (1996, 1997) detektierten in vitro eine verstärkte Phosphorylierung des α_{1B} -AR bzw. eine verminderte Inositolphosphat Akkumulation infolge anhaltender Adrenalin Stimulation. Dieser α_{1B} -AR wird an Rattenherzen prozentual am stärksten exprimiert (Michel et al., 1994; Pönicke et al., 2001). Eine Zunahme in der GRK2 Aktivität (3.2.4.) würde sich unter diesem Blickwinkel demnach mitverantwortlich für die nachgewiesene Reduktion in der α_1 -AR Dichte zeigen. Andererseits konnten Iaccarino et al. (1999) keine Steigerung weder im GRK2 Proteinbetrag noch in deren Aktivität an Mäusen nach in vivo Stimulation von α_1 -AR mit Phenylephrin feststellen. Jüngere Untersuchungen bekräftigen letztgenannte Beobachtung. Für die GRKs wurde mit Blick auf $G_{q/11}$ -Protein gekoppelte Rezeptoren über eine Phosphorylierungs-unabhängige Inhibition der Signaltransduktion berichtet (Dicker et al., 1999; Carman et al., 1999; Sallese et al., 2000; Willets et al., 2001). Entsprechend diesen Resultaten kann eine gesteigerte GRK2 Aktivität zum gegenwärtigen Zeitpunkt

tigen Zeitpunkt wohl nicht als alleinige Erklärung für die Abnahme von α_1 -AR angesehen werden.

In der abgeschwächten kontraktile Antwort nach Noradrenalin-Stimulation stehen die Ergebnisse dieser Arbeit andererseits in relativ gutem Einklang mit den Resultaten von Myokardpräparationen insuffizienter Patienten (Landzberg et al., 1991; Steinfath et al., 1992b). Infolge der Monocrotalin-Injektion manifestierte sich eine bedeutende Reduktion in der α_1 -AR vermittelten positiven Inotropie rechtsventrikulärer Muskelstreifen, wohingegen an linken Ventrikeln ausschließlich für Tiere mit Stauungsinsuffizienz eine verringerte Kontraktilitätssteigerung nach Noradrenalin ermittelt wurde (3.6.3.). Eine Erklärung hierfür findet sich zum einen in den beschriebenen Verringerungen auf Rezeptor (3.6.1.) bzw. $G_{q/11}$ -Protein Ebene (3.6.2.), aber auch in der diskutierten Schädigung des kontraktile Apparates (4.3.).

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse zur β -AR Kaskade fehlt MCT-behandelten Tieren somit ein weiterer Kompensationsmechanismus zur akuten Steigerung der Inotropie. Entgegen der β -AR Kaskade zeigen allerdings die Untersuchungen zur Kontraktilität nach α_1 -AR Stimulation eine stärkere Abschwächung für insuffiziente Ratten (RVF) verglichen mit RVH-Tieren. Die Inotropie rechtsventrikulärer Herzmuskelstreifen war sowohl für hypertrophiekompensierende als auch für insuffiziente Tiere nach β -AR Stimulation maximal erniedrigt. Die α_1 -AR-vermittelte Kontraktilität scheint demnach im MCT-Modell resistenter gegenüber neurohumoralen Veränderungen zu sein. Dennoch ist der beobachtete Kontraktilitätsgewinn im Stadium der Insuffizienz nahezu vollständig beeinträchtigt und gestattet keine weitere Steigerung der Herzmuskelarbeit.

4.6. ENDOTHELIN-REZEPTOREN

Für die Monocrotalin-induzierte Rechtsherzhypertrophie wurde eine selektive Zunahme in der ET_B -Rezeptor Dichte für rechte und linke Ventrikel nachgewiesen (3.6.4.). ET_A -Rezeptoren zeigten hingegen eine prozentuale Abnahme in linken bzw. keine Verschiebung in rechten Ventrikeln (3.6.4.).

Lediglich zwei verfügbare Publikationen dokumentieren Rezeptor-Subtyp Veränderungen am MCT-Modell. Ueno et al. (1999) zeigten eine selektive rechtsventrikuläre Steigerung von ET_A - und ET_B -Rezeptor mRNA über RT-PCR Untersuchungen. Yorikane et al. (1993) beobachteten einen Anstieg des ET_B -Rezeptor Subtyps in rechten, aber auch linken Ventrikeln MCT-behandelter Ratten. Im ischämischen Kardiomyopathie-Modell fanden Sakai et al.

(1996a, 1996b) nach Ligation der linken Koronararterie eine deutliche Zunahme von [125 J]-ET-1 Bindungsstellen in linken Ventrikeln insuffizienter Rattenherzen. Entsprechende Resultate konnten darüber hinaus Arai et al. (1995) an linksherzhypertrophierten Ratten nach operativer Aortenkonstriktion belegen. In diesem Sinne stehen die tierexperimentellen Untersuchungen, einschließlich der eigenen Resultate, in gutem Einklang mit Befunden insuffizienter menschlicher Herzen: ET-Rezeptor Upregulation in Gegenwart erhöhter Plasmakonzentrationen von ET-1.

Mit Blick auf eine Subtypisierung von $ET_{A/B}$ -Rezeptoren sollten jedoch ventrikuläre Membransuspensionen getrennt von Kardiomyozyten betrachtet werden. Während Literaturangaben zufolge ET_A -Rezeptoren ca. 85-90 % der ET-Rezeptoren in Kardiomyozyten umfassen (Modesti et al., 1999a, b), wurde für ventrikuläre Membranen ein $ET_{A/B}$ -Rezeptor Verhältnis von ca. 60:40 ermittelt (Molenaar et al., 1993). Diese prozentuale Verteilung bezieht sich hierbei auf Humangewebepräparationen und erklärt somit den möglichen Spezies-Unterschied gegenüber Ratten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben ein $ET_{A/B}$ -Rezeptor Verhältnis von ca. 80:20 für ventrikuläre Membranen. Für den ET_B -Rezeptor Subtyp wird eine mehrheitliche Lokalisation auf Membranen nicht-kontraktiler menschlicher Herzzellen beschrieben (Serneri et al., 2000). In der Annahme, diese Ergebnisse auf kardiales Rattengewebe übertragen zu können, würde die beobachtete Zunahme von ET_B -Rezeptoren im MCT-Modell demnach deren Funktion im kardialen „remodeling“ infolge einer Hypertrophie unterstreichen (Colucci, 1997; Molkentin & Dorn, 2001). Andererseits wird im Fall der ET_B -Rezeptoren über eine lokale Clearance Funktion spekuliert (Fukuroda et al., 1994; Brunner & Doherty, 1996), welche unter anderem mit der unterschiedlichen Dissoziationskinetik von ET-1 gegenüber ET_A - und ET_B -Rezeptoren begründet wird (Modesti et al., 1999a). Unter Berücksichtigung der erhöhten ET-1 Plasmaspiegel im MCT-Modell (Miyachi et al., 1993; Frasch et al., 1999) könnte der Anstieg von ET_B -Rezeptoren diesen Sachverhalt ebenso unterstreichen. Somit wäre die beobachtete Zunahme von ET_B -Rezeptoren vermutlich in erster Linie als ein längerfristiger Anpassungsmechanismus anzusehen.

Die Stimulation kardialer Muskelstreifen mit ET-1 führte zu einer signifikanten Kontraktilitätszunahme an rechtsventrikulären Präparationen hypertrophierter MCT-Ratten sowie zu einer weiteren Inotropiesteigerung für insuffiziente Ratten. Darüber hinaus wurde eine Affinitätssteigerung der, im Organbad äquilibrierten, Muskelstreifen gegenüber ET-1 festgestellt. Eine derartig erhöhte Sensibilität wurde ebenso für linksventrikuläre Gewebestreifen insuffizienter MCT-Ratten beobachtet. Jedoch erwies sich deren ET-1-induzierter Kontraktilitätszuwachs als unverändert im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollratten (3.6.5.). Studien zur in

in vitro Kontraktilität an rechten Vorhöfen insuffizienter Patienten ergaben einerseits keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich mit nicht-insuffizienten Gewebeproben (Burrell et al., 2000). Einen abgeschwächten Maximaleffekt von ET-1 zeigten jedoch Pieske et al. (1999) an linksventrikulären Muskelstreifen von Patienten mit idiopathischer DCM.

Weiterführende Untersuchungen zur in vitro Kontraktilität von ET-1 an menschlichen Herzmuskelstreifen beschrieben eine ET_A -vermittelte positive Inotropie (Pieske et al., 1999). In vivo Studien zeigten demgegenüber eine negative Inotropie (Beyer et al., 1994). Ein Kontraktilitätszuwachs wird vermutlich von einer Konstriktion der Koronargefäße bzw. der hierdurch bedingten Ischämie überlagert und ist nicht mehr nachweisbar. Entgegen den Resultaten von humanen Herzmuskelstreifen wurde im Tiermodell jedoch eine Beteiligung von ET_B -Rezeptoren an der positiven Inotropie festgestellt (Beyer et al., 1995). Selbige Arbeitsgruppe beobachtete diesen ET_B -Rezeptor-vermittelten positiv inotropen Effekt ebenso in vivo (Beyer et al., 1996, 1999). Nach alleiniger Stimulation von ET_B -Rezeptoren bzw. mit ET-1 unter Blockade von ET_A -Rezeptoren wurde am offenen Thorax von Ratten eine gesteigerte Kontraktilität nachgewiesen. Unter diesem Blickwinkel könnte die erhöhte ET-Rezeptor Dichte bzw. die prozentuale Zunahme von ET_B -Rezeptoren rechtsventrikulärer Membranen von MCT-behandelten Ratten die Zunahme in der ET-1 vermittelten Kontraktilität mitbegründen. Dies würde allerdings die Lokalisation von ET_B -Rezeptoren auf Kardiomyozyten von Ratten voraussetzen (siehe oben).

Die Endothelin-Kaskade stellt somit als einzige der untersuchten Rezeptorsignalwege einen kontraktilen Kompensationsmechanismus dar, welcher ebenfalls im terminal insuffizienten Stadium wirksam wird. Jedoch sind die maximal erzielten Anstiege im Inotropiezuwachs deutlich schwächer ausgeprägt im Vergleich zur α_1 - und β -AR-vermittelten Kontraktilitätssteigerung und verkörpern demzufolge vielmehr das Ergebnis eines kardialen „remodeling“ infolge der gesteigerten rechtsventrikulären Drücke.

4.7. WEITERFÜHRENDE GEDANKEN

Die vorliegende Arbeit beschreibt Veränderungen kardialer Rezeptoren nach Rechtsherzhypertrophie aufgrund einer MCT-Applikation. Dabei wurde gezeigt, dass die positive Inotropie nach einer β -AR- aber auch nach α_1 -AR Stimulation drastisch vermindert war. Die Ursachen dafür lagen einerseits innerhalb der entsprechenden Rezeptorsignaltransduktionen, jedoch auch in einer unverkennbaren Schädigung des kontraktilen Apparates. Den Herzen MCT-

behandelter Ratten fehlt somit die Möglichkeit einer akuten sympathischen Leistungssteigerung. Demgegenüber steht eine Zunahme in der Kontraktionsantwort nach ET-1 Stimulation, welche vermutlich von einer erhöhten ET_B-Rezeptor Dichte getragen wird. Nicht vollständig aufgezeigt werden konnte der Einfluss einer muskarinergen Rezeptorstimulation sowohl auf die Aktivität der AZ als auch deren Wirkung auf die Kontraktilität präparierter Herzmuskelstreifen. In diesem Zusammenhang konnten lediglich Ansatzpunkte für nachfolgende Untersuchungen gegeben werden.

Sämtliche nachgewiesenen Veränderungen dominierten den rechten Ventrikel. Allerdings wurde gerade im Stadium der rechtsventrikulären Insuffizienz eine Ventrikel-spezifische Regulation von signifikanten biventrikulären Beeinträchtigungen überlagert. Die festgestellten Schädigungen könnten auf der einen Seite sicherlich auch eine Konsequenz der terminalen Globalinsuffizienz sein. Es muss dennoch auch die Frage nach der Toxizität bzw. pulmonalen Selektivität gestellt werden. Der Wirkungsmechanismus der Substanz ist bislang noch nicht aufgeklärt. Demzufolge können systemische Effekte des Alkaloids nicht vollständig ausgeschlossen werden. In diesem Sinne zeigten sogar die Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe eine endotheliale Schädigung der *A. mesenterica* (Dhein et al., 2002) und widersprechen demnach einer Selektivität für das pulmonalarterielle Kapillarnetz.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit kennzeichnen dennoch eine gute Übereinstimmung des MCT-Modells mit den Befunden an insuffizienten menschlichen Herzen. Vor diesem Hintergrund bietet das MCT-Modell eine gute Grundlage für weitere detaillierte Untersuchungen zur menschlichen Herzinsuffizienz, deren Prävention bzw. zur Etablierung vielversprechender Therapiestrategien.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung myokardialer Rezeptoren und deren Veränderungen nach Ausprägung einer Rechtsherzhypertrophie bzw. einer Rechtsherzinsuffizienz im fortgeschrittenen Stadium.

Vier bis sechs Wochen nach Applikation von Monocrotalin zeigten Membranen des rechten Ventrikels eine signifikante Reduktion des β -AR-G-Protein-AZ Systems, wobei diese Veränderungen bei Tieren mit Stauungsinsuffizienz deutlicher hervortraten: die Dichte β -adrenerger Rezeptoren war vermindert, der Anteil der β -AR im "high affinity state" reduziert, die GRK Aktivität in zytosolischen und Membranaufschlüssen gesteigert, der Gehalt an G_s -Protein erniedrigt, während der an G_i -Protein keine Veränderungen erkennen ließ. Die Aktivität der katalytischen Untereinheit der AZ zeigte sich vermindert, dementsprechend war die Aktivierung der AZ durch Isoprenalin, GTP, NaF und Forskolin herabgesetzt. Am linken Ventrikel dieser Tiere kam es ebenfalls zu einer Desensibilisierung des β -AR-G-Protein-AZ Systems. Allerdings war das Ausmaß dieser Veränderungen deutlich geringer als am rechten Ventrikel. Die Untersuchungen zur β -AR Dichte und cAMP Bildung in Kardiomyozyten MCT-behandelter Tiere verdeutlichten sogar selektive Abschwächungen für ausschließlich rechte Ventrikel. Konsequenterweise ergaben die Organbadexperimente eine unverkennbare Reduktion in der positiv inotropen Wirkung von Isoprenalin an ventrikulären Gewebestreifen.

Rechte Ventrikel MCT-behandelter Ratten zeigten darüber hinaus eine verminderte Anzahl von [3 H]-Nisoxetin Bindungsstellen als auch eine reduzierte Aktivität des Uptake₁, wobei das Ausmaß dieser Abnahmen wiederum für insuffiziente Tiere größer war verglichen mit hypertrophierten Ratten. Am linken Ventrikel wurde ausschließlich für insuffiziente Ratten eine abgeschwächte Uptake₁ Transportrate beobachtet.

Die α_1 -AR Dichte sowie die $G_{q/11}$ -Proteine waren hingegen in beiden Ventrikeln MCT-behandelter Ratten vermindert mit erneut stärker Ausprägung für insuffiziente Tiere. Dementsprechend zeigte sich eine verringerte positive inotrope Wirkung von Noradrenalin (in Gegenwart von Propranolol). Im Gegensatz zu den α_1 -AR wurde für Endothelin-Rezeptoren im rechten Ventrikel MCT-behandelter Ratten eine tendenzielle Erhöhung in deren Dichte festgestellt sowie eine Zunahme der positiven Inotropie für Endothelin-1 beobachtet. Keine Veränderungen zeigten diesbezüglich linksventrikuläre Präparationen von MCT-behandelten Tieren.

Abschließende Untersuchungen zur Dichte kardialer Muskarin-Rezeptoren MCT-behandelter Ratten ergaben für linke Ventrikel eine signifikante Steigerung, wohingegen die Anzahl M-cholinerger Rezeptoren an rechten Ventrikeln unverändert blieb.

- Akhter SA, Skaer CA, Kypson AP, McDonald PH, Peppel KC, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1997). Restoration of β -adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12100-12105.
- Alousi AA, Jasper JR, Insel PA, Motulsky HJ (1991). Stoichiometry of receptor G_s -adenylate cyclase interactions. *FASEB J* **5**: 2300-2303.
- Altieri RJ, Olson JW, Gillespie MN (1986). Altered pulmonary vascular smooth muscle responsiveness in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* **236**: 390-395.
- Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T (1995). Endothelin and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **268**: H2084-H2091.
- Asano K, Bohlmeyer TJ, Westcott JY, Zisman L, Kinugawa K, Good M, Minobe WA, Roden R, Wolfel EE, Lindenfeld J, David Port J, Perryman MB, Clevel J, Lowes BD, Bristow MR (2002). Altered expression of endothelin receptors in failing human left ventricles. *J Mol Cell Cardiol* **34**: 833-846.
- Azevedo ER, Newton GE, Floras JS, Parker JD (2000). Reducing cardiac filling pressure lowers norepinephrine spillover in patients with chronic heart failure. *Circulation* **101**: 2053-2059.
- Balke CW, Shorofsky SR (1998). Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* **37**: 290-299.
- Beau SL, Saffitz JE (1994). Transmural heterogeneity of norepinephrine uptake in failing human hearts. *J Am Coll Cardiol* **23**: 579-585.
- Benovic JL, Mayor F, Staniszewski C, Lefkowitz R, Caron MG (1987). Purification and characterization of the β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **262**: 9026-9032.
- Bentivegna LA, Ablin LW, Kihara Y, Morgan JP (1991). Altered calcium handling in left ventricular pressure-overload hypertrophy as detected with aequorin in the isolated, perfused ferret heart. *Circ Res* **69**: 1538-1545.
- Berridge MJ (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Beukelmann DJ, Nábauer M, Erdmann E (1992). Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* **85**: 1046-1055.
- Beyer ME, Nerz S, Kramer BK, Hoffmeister HM (1994). Hemodynamic and inotropic effects of endothelin-1 in vivo. *Basic Res Cardiol* **89**: 39-49.
- Beyer ME, Nerz S, Kazmaier S, Hoffmeister HM (1995). Effect of endothelin-1 and its combination with adenosine on myocardial contractility and myocardial energy metabolism in vivo. *J Mol Cell Cardiol* **27**: 1989-1997.

- Beyer ME, Slesak G, Hoffmeister HM (1996). Significance of endothelinB receptors for myocardial contractility and myocardial energy metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **278**: 1228-1234.
- Beyer ME, Slesak G, Hovelborn T, Kazmaier S, Nerz S, Hoffmeister HM (1999). Inotropic effects of endothelin-1: interaction with molsidomine and with BQ 610. *Hypertension* **33**: 145-152.
- Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, Sen S, Perreault CL, Morgan JP (1991). Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure. *Circ Res* **68**: 1390-1400.
- Bogoyevitch MA (2000). Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* **45**: 826-842.
- Böhm M, Diet F, Feiler G, Kemkes B, Erdmann E (1988). α -adrenoceptors and α -adrenoceptor-mediated positive inotropic effects in failing human myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* **12**: 357-361.
- Böhm M, Ungerer M, Erdmann E (1990a). β -adrenoceptors and m-cholinoceptors in myocardium of hearts with coronary artery disease or idiopathic dilated cardiomyopathy removed at cardiac transplantation. *Am J Cardiol* **66**: 880-882.
- Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E (1990b). Increase in $G_{i\alpha}$ in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* **82**: 1249-1265.
- Böhm M (1995a). Alterations of β -adrenoceptor-G-protein-regulated adenylyl cyclase in heart failure. *Mol Cell Biochem* **147**: 147-160.
- Böhm M, La Rosee, Schwinger RHG, Erdmann E (1995b). Evidence for a reduction of norepinephrine uptake sites in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* **25**: 146-153.
- Böhm M, Castellano M, Flesch M, Maack C, Moll M, Paul M, Schiffer F, Zolk O (1998). Chamber-specific alterations of norepinephrine uptake sites in cardiac hypertrophy. *Hypertension* **32**: 831-837.
- Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG (1994). Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* **75**: 23-32.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bratel T, Wennlund A, Carlstrom K (2000). Impact of hypoxaemia on neuroendocrine function and catecholamine secretion in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Effect of long-term oxygen treatment. *Respir Med* **94**: 1221-1228.

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982). Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic receptor density in the failing human heart. *N Engl J Med* **307**: 205-211.

Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Hershberger RE, Hoffman BB (1988). Alpha-1 adrenergic receptors in the nonfailing and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther* **247**: 1039-1045.

Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R (1989). β_1 - and β_2 -adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* **35**: 295-303.

Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Larrabee P, Skerl L, Klein JW, Anderson FL, Murray J, Mestroni L, Karwande SV, Fowler M, Ginsburg R (1992). β -adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms. *J Clin Invest* **89**: 803-815.

Brodde O-E, Engel G, Hoyer D, Bock KD, Weber F (1981). The β -adrenergic receptor in human lymphocytes: subclassification by the use of a new radioligand, (\pm)-¹²⁵Iodocyanopindolol. *Life Sci* **29**: 2189-2198.

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

Brodde O-E, Hillman S, Kunde K, Vogelsang M, Zerkowski HR (1992b). Receptor systems affecting force of contraction in the human heart and their alterations in chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant* **11**: S164-S174.

Brodde O-E, Michel MC, Zerkowski HR (1995). Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* **30**: 570-584.

Brodde O-E, Korschak U, Becker K, Rüter F, Poller U, Radke J, Zerkowski HR (1998a). Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. *J Clin Invest* **101**: 471-478.

Brodde O-E, Vogelsang M, Broede A, Michel-Reher M, Beisenbusch-Schäfer E, Hakim K, Zerkowski HR (1998b). Diminished responsiveness of G_s-coupled receptors in severely failing human hearts: no difference in dilated versus ischemic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**: 585-591.

Brodde O-E, Michel MC (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* **51**: 651-689.

Broqvist M, Dahlström U, Karlberg BE, Marklund T (1989). Neuroendocrine response in acute heart failure and the influence of treatment. *Eur Heart J* **10**: 1075-1083.

Brown L, Sernia C, Newling R, Fletcher P (1992). Cardiac responses after norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **20**: 316-323.

Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C (1998). Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **31**: 108-115.

- Bruner LH, Hilliker KS, Roth RA (1983). Pulmonary hypertension and ECG changes from monocrotaline pyrrole in the rat. *Am J Physiol* **245**: H300-H306.
- Brunner F, Doherty AM (1996). Role of ET-B receptors in local clearance of endothelin-1 in rat heart: studies with the antagonists PD 155080 and BQ 788. *FEBS Lett* **396**: 238-242.
- Brunner-la Rocca HP, Esler MD, Jennings GL, Kaye DM (2001). Effect of cardiac sympathetic nervous activity on mode of death in congestive heart failure. *Eur Heart J* **22**: 1069-1071.
- Bryan-Lluka Lj, O'Donnell SR (1992). Dopamine and adrenaline, but not isoprenaline, are substrates for uptake and metabolism in isolated perfused lungs of rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **346**: 20-26.
- Bünemann M, Hosey MM (1999). G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* **517**: 5-23.
- Burnette WN (1981). „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**: 195-203.
- Burrell KM, Molenaar P, Dawson PJ, Kaumann AJ (2000). Contractile and arrhythmic effects of endothelin receptor agonists in the human heart in vitro: blockade with SB 209670. *J Pharmacol Exp Ther* **292**: 449-459.
- Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, Czer L, Wolf PL, Denton TA, Shintaku IP, Chen PS, Chen LS (2000). Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation* **101**: 1960-1969.
- Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T (1999). Selective regulation of G_{αq/11} by an RGS Domain in the G Protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* **274**: 34483-34492.
- Ceconi C, Condorelli E, Quinzanini M, Rodella A, Ferrari R, Harris P (1989). Noradrenaline, atrial natriuretic peptide, bombesin and neurotensin in myocardium and blood of rats in congestive cardiac failure. *Cardiovasc Res* **23**: 674-682.
- Cerbai E, Guerra L, Varani K, Barbieri M, Borea PA, Mugelli A (1995). β-Adrenoceptor subtypes in young and old rat ventricular myocytes: a combined patch-clamp and binding study. *Br J Pharmacol* **116**: 1835-1842.
- Chen EP, Bittner HB, Davis D, Van Tright P (1997). Right ventricular failure- insights provided by a new model of chronic pulmonary hypertension. *Transplantation* **63**: 209-216.
- Cheng YC, Prusoff WH (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of the inhibitor which causes 50% inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099-3108.
- Chevalier B, Mansier P, Callens-El Amranis F, Swynghedauw B (1989). Beta-adrenergic system is modified in compensatory pressure cardiac overload in rats: Physiological and biochemical evidence. *J Cardiovasc Pharmacol* **13**: 412-420.

- Chidsey CA, Harrison DC, Braunwald E (1962). Augmentation of the plasma norepinephrine response to exercise in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med* **267**: 650.
- Cho MC, Rao M, Koch WJ, Thomas SA, Palmiter RD, Rockman HA (1999). Enhanced contractility and decreased β -adrenergic receptor kinase-1 in mice lacking endogenous norepinephrine and epinephrine. *Circulation* **99**: 2702-2707.
- Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA (1997). Mechanism of β -adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **272**: 17223-17229.
- Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Loffler BM (1994). Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 228-235.
- Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R (1992). Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with congestive heart failure. *Circulation* **85**: 504-509.
- Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Tura D, Francis GS, Simon AB, Rector T (1984). Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *New Engl J Med* **311**: 819-823.
- Cohn JN (1990). Abnormalities of peripheral nervous system control in congestive heart failure. *Circulation* **82** (Suppl 1): 159-167.
- Colucci WS (1997). Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* **80**: 15L-25L.
- Comini L, Agnoletti G, Panzali A, Mantero G, Pasini E, Gaia G, Albertini A, Ferrari R (1995). Activation of ANP synthesis during congestive heart failure in rats treated with monocrotaline. *Am J Physiol* **268**: H391-H398.
- Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnoletti L, Pepi P, Ceconi C, Curello S, Ferrari R (1996a). Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **28**: 2241-2248.
- Comini L, Gaia G, Curello S, Ceconi C, Pasini E, Benigno M, Bachetti T, Ferrari R (1996b). Right heart failure chronically stimulates heat shock protein 72 in heart and liver but not in other tissues. *Cardiovasc Res* **31**: 882-890.
- Cutlip AF, Dowell RJ, Rudnik M, Arcella RA, Zak R (1975). Regression of myocardial hypertrophy. Experimental model, changes in heart weight, nucleic acids and collagen. *J Mol Cell Cardiol* **7**: 767-780.
- Dae MW, Lee RJ, Ursell PC, Chin MC, Stillson CA, Moise NS (1997). Heterogeneous sympathetic innervation in German Shepherd Dogs with inherited ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. *Circulation* **96**: 1337-1342.

- Danielsen W, Leyen H von der, Meyer W, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J, Stein B, Döring V, Kalmar P (1989). Basal and isoprenaline-stimulated cAMP content in failing versus nonfailing human cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol* **14**: 171-173.
- Darfler FJ, Mahan LC, Koachman A, Insel PA (1985). Stimulation by forskolin of intact S49 lymphoma cells involves the nucleotide regulatory protein of adenylate cyclase. *J Biol Chem* **257**: 11901-11907.
- Davies CH, Harding SE, Poole-Wilson PA (1996). Cellular mechanisms of contractile dysfunction in human heart failure. *Eur Heart J* **17**: 189-198.
- DeBlasi A, O'Reilly K, Motulsky HJ (1989). Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 227-230.
- De Blasi A, Parruti G, Sallese M (1995). Regulation of G-protein coupled receptor kinases subtypes in activated T lymphocytes. *J Clin Invest* **95**: 203-210.
- Deighton NM, Motomura S, Borquez D, Zerkowski HR, Doetsch N, Brodde O-E (1990). Muscarinic cholinergic receptors in the human heart: Demonstration, subclassification, and distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **341**: 14-21.
- Delehanty JM, Himura Y, Elam E, Hood WB Jr, Liang CS (1994). β -Adrenoceptor down-regulation in pacing-induced heart failure is associated with interstitial NE content. *Am J Physiol* **266**: H930-H935.
- Delhaye JP, De Smet JM, Taton G, De Neef P, Camus JC, Fontaine J, Waelbroeck M, Robbrecht P, Christophe J (1984). A comparison between muscarinic receptor occupancy, adenylate cyclase inhibition, and inotropic responses in human heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **325**: 170-175.
- de Vente J, Zaagsma J (1981). Effect of adenosine and adenosine-analogues on adenylate cyclase activity in the rat adipocyte plasma membrane: comparison of the properties of the enzyme with Mn^{2+} and Mg^{2+} as divalent cations. *Mol Cell Biochem* **40**: 65-73.
- Dhein S, Giessler C, Heinroth-Hoffmann I, Leineweber K, Seyfarth T, Brodde O-E (2002). Changes in α_1 -adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-treated rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **365**: 87-95.
- Dicker F, Quittner U, Winstel R, Honold K, Lohse MJ (1999). Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5476-5481.
- Diviani D, Lattion AL, Larbi N, Kunapuli P, Pronin A, Benovic JL, Cotecchia S (1996). Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **271**: 5049-5058.
- Diviani D, Lattion AL, Cotecchia S (1997). Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the α_{1B} -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **272**: 28712-28719.

- Doggrell SA, Brown L (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* **39**: 89-105.
- Dong E, Yatani A, Mohan A, Liang C-s (1999). Myocardial β -adrenoceptor down-regulation by norepinephrine is linked to reduced norepinephrine uptake activity. *Eur J Pharmacol* **384**: 17-24.
- Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC (1986). CGP 20712A: a useful tool for quantitating β_1 - and β_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **130**: 137-139.
- Drexler H, Hasenfuss G, Holubarsch C (1997). Signaling pathways in failing human heart muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* **7**: 151-160.
- Drummond GI (1981). Mg^{2+} and Mn^{2+} effects on membrane-bound and detergent-solubilized adenylate cyclase. *Can J Biochem* **59**: 748-756.
- Du XJ, Dart AM, Riemersma RA (1993). Sympathetic activation and increased extracellular potassium: synergistic effects on cardiac potassium uptake and arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol* **21**: 977-982.
- Du XJ, Cox HS, Dart AM, Esler MD (1999). Sympathetic activation triggers ventricular arrhythmias in rat heart with chronic infarction and failure. *Cardiovasc Res* **43**: 919-929.
- Dueker SR, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ (1992). Guinea pig and rat hepatic microsomal metabolism of monocrotaline. *Drug Metab Dispos* **20**: 275-280.
- Eckberg DL, Drabinsky M, Braunwald E (1971). Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. *N Engl J Med* **285**: 877-883.
- Einstein R, Abdul-Hussein N (1995). Animal models of heart failure for pharmacological studies. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **22**: 864-868.
- Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS, Esler MD (1996). Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation* **93**: 1667-1676.
- Elsner G, Riegger GAJ (1995). Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure. *Curr Opin Cardiol* **10**: 253-259.
- Elton TS, Oparil S, Taylor GR, Hicks PH, Yang R-H, Jin H, Chen YF (1992). Normobaric hypoxia stimulates endothelin-1 gene expression in the rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **263**: R1260-R1264.
- Engel G, Hoyer D, Berthold R, Wagner H (1981). (\pm)[125 Iodo]cyanopindolol, a new ligand for β -adrenoceptors: identification and quantitation of subclasses of β -adrenoceptors in Guinea pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **317**: 277-285.
- Eschenhagen T (1993). G Proteins and the heart. *Cell Biol Int* **17**: 723-749.

- Esler M, Jennings G, Lambert G, Meredith I, Horne M, Eisenhofer G (1990). Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiol Rev* **70**: 963-985.
- Fan GF, Shumay E, Malbon CC, Wang H (2001). C-Src tyrosine kinase binds the β_2 -adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *J Biol Chem* **276**: 13240-13247.
- Fan T-HM, Liang C-s, Kawashima S, Banerjee SP (1987). Alteration in cardiac β -adrenergic responsiveness and adenylate cyclase system by congestive heart failure in dogs. *Eur J Pharmacol* **140**: 123-132.
- Faure C, Gouhier C, Langer SZ, Graham D (1995). Quantification of α_1 -adrenoceptor subtypes in human tissues by competitive RT-PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 935-943.
- Favret F, Richalet JP, Henderson KK, Germack R, Gonzalez NC (2001). Myocardial adrenergic and cholinergic receptor function in hypoxia: correlation with O₂ transport in exercise. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **280**: R730-R738.
- Feldman AM, Cates AE, Veazey WB, Hershberger RE, Bristow MR, Baughman KL, Baumgartner WA, Dop C van (1988). Increase in the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G-protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* **82**: 189-197.
- Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, Lorell BH (1993). Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* **73**: 184-192.
- Ferguson DW, Berg WJ, Sandes JS (1990). Clinical and hemodynamic correlates of sympathetic nerve activity in normal humans and patients with heart failure: evidence from direct neurographic recordings. *J Am Coll Cardiol* **16**: 1125-1134.
- Ferguson SS (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**: 1-24.
- Francis GS (1989). The relationship of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in congestive heart failure. *Am Heart J* **118**: 642-648.
- Francis GS, Cohn JN, Johnson G, Rector TS, Goldman S, Simon A (1993). Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* **87** (Suppl 6): V140-V148.
- Frasch HF, Marshall C, Marshall BE (1999). Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **276**: L304-L310.
- Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, Lefkowitz RJ (1995). Phosphorylation and desensitization of the human β_1 -adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **270**: 17953-17961.

- Freissmuth M, Hausleithner V, Nees S, Böck M, Schütz W (1986). Cardiac ventricular β_2 -adrenoceptors in guinea-pigs and rats are located on the coronary endothelium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **334**: 56-62.
- Friedgen B, Halbrugge T, Graefe KH (1994). Roles of uptake₁ and catechol-O-methyltransferase in removal of circulating catecholamines in the rabbit. *Am J Physiol* **267**: E814-E821.
- Fu LX, Liang QM, Waagstein F, Hoebecke J, Sylven C, Jansson E, Sotonyi P, Hjalmarson A (1992). Increase in functional activity rather than in amount of $G_{i\alpha}$ in failing human heart with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **26**: 950-955.
- Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ET-B receptors in rat. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1461-1465.
- Gahli JK, Cooper R, Ford E (1990). Trends in hospitalization rates for heart failure in the United States 1973-1986. *Arch Inter Med* **150**: 769-773.
- Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J, Villalobos-Molina R (1999). α_1 -Adrenoceptor: Subtypes, Signaling, and Roles in Health and Disease. *Arch Med Res* **30**: 449-458.
- Gardiner MR, Royce R, Bokor A (1965). Studies on *Crotalaria crispata*, a newly recognized cause of Kimberly horse disease. *J Pathol Bacteriol* **89**: 43-55.
- Gether U (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine Rev* **21**: 90-113.
- Ghodsfi F, Will JA (1981). Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol* **240**: H149-H155.
- Gibbons WJ, Durr HE, Cox SA (1953). An outbreak of cirrhosis of the liver in horses. *North Am Vet* **34**: 556-558.
- Giessler C, Wangemann T, Zerkowski HR, Brodde O-E (1998). Age-dependent decrease in the negative inotropic effect of carbachol on isolated human right atrium. *Eur J Pharmacol* **357**: 199-202.
- Giessler C, Dhein S, Pönicke K, Brodde O-E (1999). Muscarinic receptors in the failing human heart. *Eur J Pharmacol* **375**: 197-202.
- Gilman AG (1970). A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **67**: 305-312.
- Gilman AG (1987). G proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**: 615-649.
- Giraldo E, Martos F, Gomez A, Garcia A, Vigano MA, Landinsky H, Sanchez de la Cuesta F (1988). Characterization of muscarinic receptor subtypes in human tissues. *Life Sci* **43**: 1507-1515.

- Giros B, El Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T, Caron MG (1992). Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol* **42**: 383-390.
- Goldenthal EI, Dáguanno W, Lynch JF (1964). Hormonal modification of the sex differences following monocrotaline administration. *Toxicol Appl Pharmacol* **6**: 434-441.
- Goldsmith SR, Francis GS, Cowley AW (1986). Arginine vasopressin and the renal response to water loading in congestive heart failure. *Am J Cardiol* **58**: 295-301.
- Graefe KH, Bönisch H (1988). The transport of amines across the axonal membranes of noradrenergic and dopaminergic neurons. In *Catecholamines I*. Hrsg. Trendelenburg U & Weiner N, Kapitel 4 S. 193-245. Berlin: Springer Verlag.
- Grohmann M, Trendelenburg U (1984). The substrate specificity of uptake₂ in the rat heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **328**: 164-73.
- Gross G, Hanft G, Rugevics C (1988). 5-Methyl-Urapidil discriminates between subtypes of the α_1 -adrenoceptor. *Eur J Pharmacol* **151**: 333-335.
- Guicheney P, Meyer P (1981). Binding of [³H]-Prazosin and [³H]-Dihydroergocryptine to rat cardiac α -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* **73**: 33-39.
- Gwathmey JK, Davidoff AJ (1993). Experimental aspects of cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* **8**: 480-495.
- Gwathmey JK, Davidoff AJ (1994). Pathophysiology of cardiomyopathies: part II. Drug-induced and other interventions. *Curr Opin Cardiol* **9**: 369-378.
- Hammond HK, Roth DA, Insel PA, Ford CE, White CS, Maisel AS, Ziegler MG, Bloor CM (1992). Myocardial β -adrenergic receptor expression and signal transduction after chronic volume-overload hypertrophy and circulatory congestion. *Circulation* **85**: 269-280.
- Hanft G, Gross G (1989). Subclassification of α_1 -adrenoceptor recognition sites by urapidil derivatives and other selective antagonists. *Br J Pharmacol* **97**: 691-700.
- Harris PN, Anderson RC, Chen KK (1942). The action of monocrotaline and retronecine. *J Pharmacol Exp Ther* **75**: 78-82.
- Hasenfuss G (1998a). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* **39**: 60-76.
- Hasenfuss G (1998b). Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* **37**: 279-289.
- Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI (1986). Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* **73**: 615-621.
- Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990). Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* **4**: 2881-2889.

- Hein L, Kobilka BK (1997). Adrenergic receptors: From molecular structure to in vivo function. *Trends Cardiovasc Med* **7**: 137-145.
- Hershberger RE, Feldman AM, Bristow MR (1991). A₁-Adenosine receptor inhibition of adenylylate cyclase in failing and nonfailing human ventricular myocardium. *Circulation* **83**: 1343-1351.
- Hildermann T, McKnight K, Dhalla KS, Rupp H, Dhalla NS (1996). Effects of long-term dietary restriction on cardiovascular function and plasma catecholamines in the rat. *Cardiovasc Drugs Ther* **10** (Suppl. 1): 247-250.
- Hill NS, Jederlinic P, Gagnon J (1989). Supplemental oxygen reduces right ventricular hypertrophy in monocrotaline-injected rats. *J Appl Physiol* **66**: 1642-1648.
- Hincks JR, Kim HY, Segall HJ, Molyneux RJ, Stermitz FR, Coulombe RA (1991). DNA cross linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* **111**: 90-98.
- Himura Y, Felten S, Kashiki M, Lewandowski TJ, Delehanty JM, Liang CS (1993). Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure. *Circulation* **88**: 1299-1309.
- Hiroe M, Hirata Y, Fujita N, Umezawa S, Ito H, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Takamoto T, Marumo F (1991). Plasma endothelin-1 levels in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* **68**: 1114-1115.
- Horn AS, Coyle JT, Snyder SH (1971). Catecholamine uptake by synaptosomes from rat brain: structure-activity relationships of drugs with differential effects on dopamine and norepinephrine neurones. *Mol Pharmacol* **7**: 66-80.
- Hoyer D, Engel G, Berthold R (1982). Binding characteristics of (+)-, (±)- and (-)-[¹²⁵Iodo] Cyanopindolol to Guinea-pig left ventricle membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **318**: 319-329.
- Huxtable R, Paplanus S, Laugharn J (1977). The prevention of monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *Chest* **71** (suppl 2): 308-310.
- Iaccarino G, Tomhave ED, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998). Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by β-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* **98**: 1783-1789.
- Iaccarino G, Koch WJ (1999). Therapeutic potential of G-Protein coupled receptor kinases in the heart. *Exp Opin Invest Drugs* **8**: 545-554.
- Iaccarino G, Dolber PC, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1999). β-Adrenergic receptor kinase-1 levels in catecholamine-induced myocardial hypertrophy. Regulation by β- but not α₁- adrenergic stimulation. *Hypertension* **33** (part II): 396-401.
- Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda M, Tsuchida S (1992). Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci* **50**: 247-255.

- Ilkiw R, Todorovich-Hunter L, Maruyama K, Shin J, Rabinovitch M (1989). SC-39026, a serin elastase inhibitor, prevents muscularization of peripheral arteries, suggesting a mechanism of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* **64**: 814-825.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989). The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2863-2867.
- Ishigai Y, Mori T, Moriyama S, Shibano T (1999). Induction of cardiac β -adrenergic receptor kinase 1 in rat heart failure caused by coronary ligation. *J Mol Cell Cardiol* **31**: 1261-1268.
- Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988a). Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **255**: H970-H973.
- Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988b). Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflügers Arch* **413**: 108-110.
- Ishikawa S, Honda M, Yamada S, Morioka S, Moriyama K (1991). Biventricular down-regulation of β -adrenergic receptors in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline. *Japan Circ J* **55**: 1077-1085.
- Ishikawa K, Fukami T, Nagase T, Fujita K, Hayama T (1992). Cyclic pentapeptide endothelin antagonists with high ET_A selectivity. *J Med Chem* **35**: 2139-2142.
- Ito KM, Sato M, Ushijima K, Nakai M, Ito K (2000). Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**: H1786-H1795.
- Iversen LL (1965). The uptake of catechol amines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: A novel catechol amine uptake process. *Br J Pharmacol* **25**: 18-33.
- Iwaki K, Sukhatme VP, Chien KR (1990). α - and β -adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. *J Biol Chem* **265**: 13809-13817.
- Jayanthi LD, Prasad PD, Ramamoorthy S, Mahesh VB, Leibach FH, Ganapathy V (1993). Sodium- and chloride-dependent, cocaine-sensitive, high-affinity binding of nisoxetine to the human placental norepinephrine transporter. *Biochemistry* **32**: 12178-12185.
- Johnson RA, Sutherland EW (1973). Detergent-dispersed adenylate cyclase from rat brain. Effects of fluoride, cations, and chelators. *J Biol Chem* **248**: 5114-5121.
- Kacimi R, Richalet JP, Crozatier B (1993). Hypoxia-induced differential modulation of adenosinergic and muscarinic receptors in rat heart. *J Appl Physiol* **75**: 1123-1128.
- Kacimi R, Moalic JM, Aldashev A, Vatner DE, Richalet JP, Crozatier B (1995). Differential regulation of G protein expression in rat hearts exposed to chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **269**: H1865-H1873.

- Kasahara Y, Kiyatake K, Tatsumi K, Sugito K, Kakusaka I, Yamagata S-I, Ohmori S, Kitada M, Kuriyama T (1997). Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. *J Cardiovasc Pharmacol* **30**: 124-129.
- Kaye DM, Lambert GW, Dewar EM, Jennings GL, Esler MD (1994). Neurochemical evidence of cardiac sympathetic activation and increased central nervous system norepinephrine turnover in severe congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* **23**: 570-578.
- Kaye DM, Jennings GL, Dart AM, Esler MD (1998). Differential effect of acute baroreceptor unloading on cardiac and systemic sympathetic tone in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* **31**: 583-587.
- Kerrie JW, Chou E, King GL (2000). Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* **21**: 181-187.
- Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, Cohen DJ, Bianchi C, Homcy CJ, Vatner SF, Vatner DE (1993). Myocardial β -adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure. *J Clin Invest* **91**: 907-914.
- Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, Chien KR (1993). The α_{1A} -adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* **268**: 15374-15380.
- Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ (1993). The binding site for the $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins on the β -adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**: 5256-5260.
- Koe BK (1976). Molecular geometry of inhibitors of the uptake of catecholamines and serotonin in synaptosomal preparations of rat brain. *J Pharmacol Exp Therap* **199**: 649-661.
- Kong G, Penn R, Benovic JL (1994). A β -adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* **269**: 13084-13087.
- Kreutz R, Fernandez-Alfonso, Ganten D, Paul M (1996). Effect of losartan on right ventricular hypertrophy and cardiac angiotensin I converting enzyme activity in pulmonary hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* **18**: 101-111.
- Krupnick JG, Benovic JL (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G-protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol* **38**: 289-319.
- Kuramochi T, Honda M, Tanaka K, Enomoto K, Hashimoto M, Morioka S (1994). Calcium transients in single myocytes and membranous ultrastructures during the development of cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **21**: 1009-1018.
- Kuznetsov V, Pak E, Robinson RB, Steinberg SF (1995). β_2 -Adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* **76**: 40-52.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lafranconi WM, Duhamel RC, Brendel K, Huxtable RJ (1984). Differentiation of the cardiac and pulmonary toxicity of monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid. *Biochem Pharmacol* **33**: 191-197.
- Lai LP, Suematsu M, Elam H, Liang CS (1996). Differential changes of myocardial β -adrenoceptor subtypes and G-proteins in dogs with right-sided congestive heart failure. *Eur J Pharmacol* **309**: 201-208.
- Lame MW, Jones AD, Morin D, Segall HJ (1991). Metabolism of [^{14}C]monocrotaline by isolated perfused rat liver. *Drug Metab Dispos* **19**: 516-524.
- Lame MW, Jones AD, Morin D, Wilson DW, Segall HJ (1997). Association of dehydromonocrotaline with red blood cells. *Chem Res Toxicol* **10**: 694-701.
- Lame MW, Jones AD, Wilson DW, Dunson SK, Segall HJ (2000). Protein targets of monocrotaline pyrrole in pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* **275**: 29091-29099.
- Landzberg JS, Parker JD, Gauthier DF, Colucci WS (1991). Effects of myocardial α_1 -adrenoceptor stimulation and blockade on contractility in humans. *Circulation* **84**: 1608-1614.
- Lau YH, Robinson RB, Rosen MR, Bilezikian JP (1980). Subclassification of β -adrenergic receptors in rat cardiac myoblasts and fibroblasts. *Circ Res* **47**: 41-48.
- Laurent CE, Cardinal R, Rousseau G, Vermeulen M, Bouchard C, Wilkinson M, Armour JA, Bouvier M (2001). Functional desensitization to isoproterenol without reducing cAMP production in canine failing cardiocytes. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **280**: R355-R364.
- Lee JA, Elliot JD, Sutiphong JA, Friesen WJ, Ohlstein EH, Stadel JM, Gleason JG, Peishoff CE (1994). Tyr-129 is important to the peptide ligand affinity and selectivity of human endothelin type A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7164-7168.
- Leff P, Scaramellini C, Law C, McKechnie K (1997). A three-state receptor model of agonist action. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 355-362.
- Lefkowitz RJ, Mullikin D, Caron MG (1976). Regulation of beta-adrenergic receptors by guanyl-5'-imidophosphate and other purine nucleotides. *J Biol Chem* **252**: 799-802.
- Le Guludec D, Cohen-Solal A, Delforge J, Delahaye N, Syrota A, Merlet P (1997). Increased myocardial muscarinic receptor density in idiopathic dilated cardiomyopathy: an in vivo PET study. *Circulation* **96**: 3416-22.
- Leineweber K, Brandt K, Wludyka B, Beilfuß A, Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Brodde O-E (2002). Ventricular hypertrophy plus neurohumoral activation is necessary to alter the cardiac β -adrenoceptor system in experimental heart failure. *Circ Res* **91**: 1056-1062.
- Leon-Velarde F, Bourin MC, Germack R, Mohammadi K, Crozatier B, Richalet JP (2001). Differential alterations in cardiac adrenergic signaling in chronic hypoxia or norepinephrine infusion. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **280**: R274-R281.

- Lerman A, Kubo SH, Tschumperlin LK, Burnett JC Jr (1992). Plasma endothelin concentrations in humans with end-stage heart failure and after heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* **20**: 849-853.
- Leuenberger U, Kenney G, Davis D, Clemson B, Zelis R (1992). Comparison of norepinephrine and isoproterenol clearance in congestive heart failure. *Am J Physiol* **263**: H56-H60.
- Li H, Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Oparil S, Elton TS (1994). Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* **77**: 1451-1459.
- Liang CS, Fan THM, Sullebarger T, Sakamoto S (1989). Decreased adrenergic neuronal uptake activity in experimental right heart failure: A chamber-specific contributor to β -adrenoceptor downregulation. *J Clin Invest* **84**: 1267-1275.
- Linzbach AJ (1947). Mikrometrische und histologische Analyse hypertropher menschlicher Herzen. *Virchows Arch* **314**: 534.
- Lohse MJ (1995). G-protein-coupled receptor kinases and the heart. *Trends Cardiovasc Med* **5**: 63-68.
- Lui YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA (1997). Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol* **272**: H722-H727.
- Maguire ME, Van-Arsdale PM, Gilman AG (1976). An agonist-specific effect of guanine nucleotides on binding to the beta-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* **12**: 335-339.
- Manganiello VC, Vaughan MJ (1976). Activation and inhibition of fat cell adenylate cyclase by fluoride. *J Biol Chem* **251**: 6205-6209.
- Marthew R, Gloster ES, Altura BT, Altura BM (1988). Magnesium aspartate hydrochloride attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats. *Clin Sci* **75**: 661-667.
- Maurice JP, Shah AS, Kypson AP, Hata JA, White DC, Glower DD, Koch WJ (1999). Molecular β -adrenergic signaling abnormalities in failing rabbit hearts after infarction. *Am J Physiol* **276**: H1853-H1860.
- Meredith IT, Broughton A, Jennings GL, Esler M (1991). Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias. *N Engl J Med* **325**: 618-624.
- Meredith IT, Eisenhofer G, Lambert GW, Dewar EM, Jennings GL, Esler M (1993). Cardiac sympathetic nervous activity in congestive heart failure: evidence for increased neuronal norepinephrine release and preserved neuronal uptake. *Circulation* **88**: 136-145.
- Meuse AJ, Perreault CL, Morgan JP (1992). Pathophysiology of cardiac hypertrophy and failure of human working myocardium: abnormalities in calcium handling. *Bas Res Cardiol* **87**: 223-233.

- Meyrick B, Gamble W, Reid L (1980). Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* **239**: H692-H702.
- Michel MC, Jäger S, Casto R, Rettig R, Graf C, Printz M, Insel PA, Philipp T, Brodde O-E (1992). On the role of renal α -adrenergic receptors in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension (Dallas)* **19**: 365-370.
- Michel MC, Büscher R, Kerker J, Kraneis H, Erdbrügger W, Brodde O-E (1993a). α_1 -Adrenoceptor subtype affinities of drugs for the treatment of prostatic hypertrophy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **348**: 385-395.
- Michel MC, Brodde O-E, Insel PA (1993b). Are cardiac G-proteins altered in rat models of hypertension? *J Hypertens* **11**: 353-363.
- Michel MC, Hanft G, Gross G (1994). Radioligand binding studies of α_1 -adrenoceptor subtypes in rat heart. *Br J Pharmacol* **111**: 539-546.
- Michel MC, Kenny BA, Schwinn DA (1995). Classification of α_1 -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **352**: 1-10.
- Michel MC, Li Y, Heusch G (2001). Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363**: 245-266.
- Milligan G (1996). The stoichiometry of expression of protein components of the stimulatory adenylyl cyclase cascade and the regulation of information transfer. *Cell Signal* **8**: 87-95.
- Miller WC, Rice DL, Kreusel RG, Bedrossian CWM (1978). Monocrotaline model of non-cardiogenic pulmonary edema in dogs. *J Appl Physiol Respir Environ Exercise Physiol* **45**: 962-965.
- Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K (1993). Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* **73**: 887-897.
- Modesti PA, Vanni S, Paniccchia R, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Sani G, Neri Serneri GG (1999a). Characterization of endothelin-1 receptor subtypes in isolated human cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**: 333-339.
- Modesti PA, Vanni S, Paniccchia R, Perna A, Maccherini M, Lisi G, Sani G, Neri Serneri GG (1999b). Endothelin receptors in adult human and swine isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol* **58**: 369-374.
- Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kue RE, Harding DP, Plumpton C, Gresham GA, Davenport AP (1993). Characterization and localization in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* **72**: 526-538.
- Molkentin JD, Dorn GW (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* **63**: 391-426.

- Moore RL, Yelamarty RV, Misawa H, Scaduto RC, Pawlusch DG, Elensky M, Cheung JY (1991). Altered Ca^{2+} dynamics in single cardiac myocytes from renovascular hypertensive rats. *Am J Physiol* **260**: C327-C337.
- Morioka S, Honda M, Ishikawa S, Ishinaga Y, Yano S, Tanaka K, Moriyama K (1992). Changes in contractile and non-contractile proteins, intracellular Ca^{2+} and ultrastructures during the development of right ventricular hypertrophy and failure in rats. *Jpn Circ J* **56**: 469-474.
- Morris AJ, Malbon CC (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* **79**: 1373-1430.
- Motulsky H. (1996). The GraphPad guide to: Analysing radioligand binding data (booklet). GraphPad Software Inc., San Diego, USA.
- Muders F, Elsner D (2000). Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res* **41**: 605-612.
- Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Döring V, Kalmar P (1988). Increase of myocardial G_i -proteins in human heart failure. *Lancet* *ii*: 936-937.
- Noguchi H, Muraoka R, Kigoshi S, Muramatsu I (1995). Pharmacological characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in rat heart: a binding study. *Br J Pharmacol* **114**: 1026-1030.
- Nootens M, Kaufmann E, Rector T, Toher C, Judd D, Francis GS, Rich S (1995). Neurohormonal activation in patients with right ventricular failure from pulmonary hypertension: Relation to hemodynamic variables and endothelin levels. *J Am Coll Cardiol* **26**: 1581-1585.
- Okada M, Yamashita C, Okada M, Okada K (1995). A dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension model in the beagle. *J Thorac Cardiovasc Surg* **110**: 546-547.
- Okamoto K, Aoki K (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* **27**: 282-293.
- Packer M (1988). Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation* **77**: 721-730.
- Paczkowski FA, Bryan-Lluka LJ, Pörzgen P, Brüß M, Bönisch H (1999). Comparison of the pharmacological properties of cloned rat, human, and bovine norepinephrine transporters. *J Pharmacol Exp Therap* **290**: 761-767.
- Pei G, Samama P, Lohse M, Wang M, Codina J, Lefkowitz RJ (1994). A constitutively active mutant β -adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2699-2702.
- Pei JM, Yu XC, Fung ML, ZhouJJ, Cheung CS, Wong NS, Leung MP, Wong TM (2000). Impaired $\text{G}_{s\alpha}$ and adenylyl cyclase cause β -adrenoceptor desensitization in chronically hypoxic rat hearts. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**: C1455-C1463.

- Perreault CL, Shannon RP, Komamura K, Vatner SF, Morgan JP (1992). Abnormalities in intracellular calcium regulation and contractile function in myocardium from dogs with pacing-induced heart failure. *J Clin Invest* **89**: 932-938.
- Pela G, Missale C, Raddino R, Condorelli E, Spano PF, Visioli O (1990). β_1 - and β_2 -receptors are differentially desensitized in an experimental model of heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* **16**: 839-846.
- Penn RB, Pronin AN, Benovic JL (2000). Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med* **10**: 81-89.
- Pereira TN, Webb RI, Reilly PEB, Seawright AA, Prakash AS (1998). Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks. *Nuc Acids Res* **26**: 5441-5447.
- Petch MC, Nayler WG (1979). Uptake of catecholamines by human cardiac muscle in vitro. *Br Heart J* **41**: 336-339.
- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* **44**: 503-512.
- Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G (1995). Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* **92**: 1169-1178.
- Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G (1999). Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* **99**: 1802-1809.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992). Role of $\beta\gamma$ subunits of G proteins in targeting the β -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* **257**: 1264-1267.
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998). G-protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 653-692.
- Pönicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Böhm M, Zerkowski HR, Brodde O-E (1998). Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation* **97**: 744-751.
- Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Becker K, Osten B, Brodde O-E (1999). $G_{q/11}$ -coupled receptors and protein synthesis in rat cardiomyocytes: role of G_i -proteins and protein kinase C-isozymes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **360**: 301-308.
- Pönicke K, Schlüter KD, Hoffmann-Heinroth I, Seyfarth T, Goldberg M, Osten B, Piper HM, Brodde O-E (2001). Noradrenaline-induced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only α_{1A} -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **364**: 444-453.

- Porter TR, Eckberg DL, Fritsch JM, Rea JF, Beightol LA, Schmedtje JF Jr, Mohanty PK (1990). Autonomic pathophysiology in heart failure patients: Sympathetic-cholinergic interrelations. *J Clin Invest* **85**: 1362-1371.
- Post SR, Hilal-Dandan R, Urasawa K, Brunton LL, Insel PA (1995). Quantification of signaling components and amplification in the beta-adrenergic-receptor-adenylate cyclase pathway in isolated adult rat ventricular myocytes. *Biochem J* **311**: 75-80.
- Price DT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Berkowitz D, Schwinn DA (1994a). Localization of mRNA for three distinct α_1 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: Implications for human α -adrenergic physiology. *Mol Pharmacol* **45**: 171-175.
- Price DT, Chari RS, Berkowitz DE, Meyers WC, Schwinn DA (1994b). Expression of α_1 -adrenergic receptor subtyp mRNA in rat tissues and human SK-N-MC neuronal cells: Implication for α_1 -adrenergic receptor subtype classification. *Mol Pharmacol* **46**: 221-226.
- Ravens U, Davia K, Davies CH, O'Gara P, Drake-Holland AJ, Hynd JW, Noble MI, Harding SE (1996). Tachycardia-induced failure alters contractile properties of canine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* **32**: 613-621.
- Rector TS, Olivari MT, Levine TB, Francis GS, Cohn JN (1987). Predicting survival for an individual with congestive heart failure using the plasma norepinephrine concentration. *Am Heart J* **114**: 148-152.
- Reindel JF, Ganey PE, Wagner JG, Slocombe RF, Roth RA (1990). Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicol Appl Pharmacol* **106**: 179-200.
- Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross J Jr, Lefkowitz RJ, Koch WJ (1998). Expression of a β -adrenergic receptor kinase1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7000-7005.
- Rose AL, Gardner CA, McDonnell D, Bull B (1957). Field and experimental investigation of „walk about“ disease of horses (Kimberley horse disease) in northern Australia: Crotalaria poisoning in horses. Part II. *Aust Vet J* **33**: 49-62.
- Rose CP, Burgess JH, Cousineau D (1989). Tracer norepinephrine kinetics in coronary circulation of patients with heart failure secondary to chronic pressure and volume overload. *J Clin Invest* **84** 1267-1275.
- Rosenberg HC; Rabinovitch M (1988). Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* **255**: H1484-H1491
- Rundqvist B, Elam M, Bergmann-Sverrisdottir Y, Eisenhofer G, Friberg P (1997a). Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. *Circulation* **95**: 169-175.
- Rundqvist B, Eisenhofer G; Elam M, Friberg P (1997b). Attenuated cardiac sympathetic responsiveness during dynamic exercise in patients with heart failure. *Circulation* **95**: 940-945.

Ruwhof C, van der Laarse A (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* **47**: 23-37.

Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y (1996a). Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation* **93**: 1214-1222.

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

Sakamoto A, Yanagisawa M, Sawamura T, Enoki T, Ohtani T, Sakurai T, Nakao K, Toyooka T, Masaki T (1993). Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin_A-selective antagonist and endothelin_B-selective agonists. *J Biol Chem* **268**: 8547-8553.

Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**: 732-735.

Sallese M, Mariggio S, D'Urbano, Iacovelli L, De Blasi A (2000). Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated G α_q . *Mol Pharmacol* **57**: 826-831.

Salomon, Y, Londos, C, Rodbell, M. (1974). A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem* **58**: 541-548.

Schäfers RF, Poller U, Pönicke K, Geissler M, Daul AE, Michel MC, Brodde O-E (1997). Influence of adrenoceptor and muscarinic receptor blockade on the cardiovascular effects of exogenous noradrenaline and of endogenous noradrenaline released by infused tyramine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355**: 239-249.

Schmitz W, Scholz H, Erdmann E (1987). Effects of alpha- and beta-adrenergic agonists, phosphodiesterase inhibitors and adenosine on isolated human heart muscle preparation. *Trends Pharmacol Sci* **8**: 447-450.

Schnabel P, Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Erdmann E (1990). Improvement of cholera-toxin-catalysed ADP-ribosylation by endogenous ADP-ribosylation factor from bovine brain provides evidence for an unchanged amount of G α_s in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **22**: 73-82.

Schoental R, Head MA (1955). Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. *Br Cancer* **9**: 229-237.

Schultze AE, Roth RA (1998). Chronic pulmonary hypertension-the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **1**: 271-346.

Schwabe U, Berndt S, Ebert R (1972). Activation and inhibition of lipolysis in isolated fat cells by various inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **273**: 62-74.

Schwarzfeld TA, Jacobson SL (1981). Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat. *J Mol Cell Cardiol* **13**: 563-575.

Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3363-3367.

Serneri GG, Cecioni I, Vanni S, Paniccchia R, Bandinelli B, Vetere A, Janming X, Bertolozzi I, Boddi M, Lisi GF, Sani G, Modesti PA (2000). Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* **86**: 377-385.

Shearmen LP, Meyer JS (1998). Norepinephrine transporters in rat placenta labeled with [³H]-nisoxetine. *J Pharmacol Exp Therap* **284**: 736-743.

Shiina T, Arai K, Tanabe S, Yoshida N, Haga T, Nagao T, Kurose H (2001). Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* **276**: 33019-33026.

Shubeita HE, McDonught PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* **265**: 20555-20562.

Simmond WF (1999). G-protein regulation of adenylate cyclase: *Trends Pharmacol Sci* **20**: 66-73.

Smith HJ, Nuttall A (1985). Experimental models of heart failure. *Cardiovasc Res* **19**: 181-186.

Starke K, Montel H, Gayk W, Merker R (1974). Comparison of the effects of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **285**: 133-150.

Starksen NF, Simpson PC, Bishopric N, Coughlin SR, Lee WMF, Escobedo JA, Williams LT (1986). Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc proto-oncogene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8348-8350.

Steinfath M, Chen Y-Y, Lavicky J, Magnussen O, Nose M, Rosswag S, Schmitz W, Scholz HZ (1992a). Cardiac α_1 -adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br J Pharmacol* **107**: 185-188.

Steinfath M, Danielsen W, Leyen H van der, Mende U, Meyer W, Neumann J, Nose M, Reich T, Schmitz W, Scholz HZ, Starbatty J, Stein B, Döring V, Kalmar P, Haverich A (1992b). Reduced α_1 - and β_2 -adrenoceptor-mediated positive inotropic effects in human end-stage heart failure. *Br J Pharmacol* **105**: 463-469.

Sternweis PC, Northup JK, Smigel MD, Gilman AG (1981). The regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem* **256**: 11517-11526.

Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D (1991). Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* **114**: 464-469.

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

Strittmatter S, Neer EJ (1980). Properties of the separated catalytic and regulatory units of brain adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 6344-6348.

Sugden PH, Bogoyevitch MA (1996). Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. *Trends Cardiovasc Med* **6**: 87-94.

Sugden PH, Clerk A (1998). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* **76**: 725-746.

Swedberg K, Viquerat C, Rouleau JL, Roizen M, Atherton B, Parmley WW, Chatterjee K (1984). Comparison of myocardial catecholamine balance in chronic congestive heart failure and in angina pectoris without heart failure. *Am J Cardiol* **54**: 783-786.

Takata Y, Kato H (1996). Adrenoceptors in SHR: alterations in binding characteristics and intracellular signal transduction pathways. *Life Sci* **58**: 91-106.

Taussig R, Iniguez-Lluhi JA, Gilman AG (1993). Inhibition of adenylyl cyclase by G_{iα}. *Science* **261**: 218-221.

Tejani-Butt SM (1992). [³H]Nisoxetine: A radioligand for quantification of norepinephrine uptake sites by autoradiography or by homogenate binding. *J Pharmacol Exp Therap* **260**: 427-436.

Thomas JA, Marks BH (1978). Plasma norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Cardiol* **41**: 233-243.

Thomas HC, Lame MW, Wilson DW, Segall HJ (1996). Cell cycle alterations associated with covalent binding of monocrotaline pyrrole to pulmonary artery endothelial cell DNA. *Toxicol Appl Pharmacol* **141**: 319-329.

Trendelenburg U (1991). Functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. *Trends Pharmacol Sci* **12**: 334-337.

Tyler RT, Muramatsu M, Abman SH, Stelzner TJ, Rodman DM, Bloch KD, McMurty IF (1999). Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension. *Am J Physiol* **276**: L297-L303.

Ueno M, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi T, Goto K, Yamaguchi I (1999). Effects of physiological or pathological pressure load in vivo on myocardial expression of ET-1 and receptors. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **277**: R1321-R1330.

Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993). Altered expression of β -adrenergic receptor kinase (β ARK) and β_1 -adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* **87**: 454-463

- Ungerer M, Parruti G, Böhm M, Puzicha M, DeBlasi A, Erdmann E, Lohse MJ (1994). Expression of β -arrestins and β -adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ Res* **74**: 206-213.
- Ungerer M, Kessebohm K, Kronsbein K, Lohse MJ, Richardt G (1996). Activation of β -adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ Res* **79**: 455-460.
- Ungerer M, Hartmann F, Karoglan M, Chlistalla A, Ziegler S, Richardt G, Overbeck M, Meisner H, Schömig A, Schwaiger M (1998). Regional in vivo and in vitro characterization of autonomic innervation in cardiomyopathic human heart. *Circulation* **97**: 174-180.
- Urasawa K, Yoshida I, Takagi C, Onozuka H, Mikami T, Kawaguchi H, Kitabatake A (1996). Enhanced expression of β -adrenergic receptor kinase 1 in the hearts of cardiomyopathic Syrian hamsters, BIO53.58. *Biochem Biophys Res Commun* **219**: 26-30.
- Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, Kodama I (2000). Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* **86**: 871-878.
- van Rossum JM (1963). Cumulative dose response curves II: Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **143**: 299-330.
- von Euler US (1972). Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves. In *Catecholamines*. Hrsg.: Blashko H & Musholl E, Handbuch der experimentellen Pharmakologie 33, S. 3-12, Berlin: Springer-Verlag.
- Vago T, Bevilacqua M, Norbiato G, Baldi G, Chebat E, Bertora P, Baroldi G, Accinni R (1989). Identification of α_1 -adrenergic receptors on sarcolemma from normal subjects and patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: Characteristics and linkage to GTP-binding protein. *Circ Res* **64**: 474-481.
- Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y, Sonnard J (1967). Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline. *Arch Pathol* **84**: 64-76.
- Vescovo G, Jones SM, Harding SE, Poole-Wilson PA (1989a). Isoproterenol sensitivity of isolated cardiac myocytes from rats with monocrotaline-induced right-sided hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **21**: 1047-1061.
- Vescovo G, Harding SE, Jones SM, Libera LD, Pessina AC, Poole-Wilson PA (1989b). Comparison between isomyosin pattern and contractility of right ventricular myocytes isolated from rats with cardiac hypertrophy. *Bas Res Cardiol* **84**: 536-543.
- Vescovo G, Zennaro R, Sandri M, Carraro U, Leprotti C, Ceconi C, Ambrosio GB, Libera LD (1998). Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 2449-2459.
- Viko H, Osnes J-B, Sjetnan AE, Skomedal T (1995). Improved isolation of cardiomyocytes by trypsination in addition to collagenase treatment. *Pharmacol Toxicol* **76**: 68-71.

- Vinge LE, Oie E, Andersson Y, Groggaard HK, Andersen GO, Attramadal H (2001). Myocardial distribution and regulation of GRK and β -arrestin isoforms in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H2490-H2499.
- Wagner J, Brodde O-E (1978). On the presence and distribution of α -adrenoceptors in the heart of various mammalian species. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **302**: 239-254.
- Weinberg DH, Trivedi P, Tan CP, Mitra S, Perkins-Parrow A, Borkowski D, Strader CD, Bayne M (1994). Cloning, expression and characterization of human α -adrenergic receptors α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} . *Biochem Biophys Res Commun* **201**: 1296-1304.
- Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH (1989). Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol* **256**: H1328-H1336.
- Willems JM, John Challiss RA, Kelly E, Nahorski SR (2001). G protein-coupled receptor kinases 3 and 6 use different pathways to desensitize the endogenous M_3 muscarinic acetylcholine receptor in human SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol* **60**: 321-330.
- Wilson DW, Segall HJ, Pan LCW, Dunston SK (1989). Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* **38**: 57-80.
- Wilson DW, Segall HJ, Pan LCW, Lame MW, Estep JE, Morin D (1992). Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol* **22**: 307-325.
- Wilson DW, Lame MW, Dunston SK, Segall HJ (2000). DNA damage cell checkpoint activities are altered in monocrotaline pyrrole-induced cell cycle arrest in human pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **166**: 69-80.
- Wolfe BB, Voelkel NF (1983). Effects of hypoxia on atrial muscarinic receptors and cardiac parasympathetic responsiveness. *Biochem Pharmacol* **32**: 1999-2002.
- Wolff DW, Dang HK, Liu MF, Jeffries WB, Scofield MA (1998). Distribution of α_1 -adrenergic receptor mRNA species in rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **32**: 117-122.
- Wong DT, Bymaster FP (1976). Effect of nisoxetine on uptake of catecholamines in synaptosomes isolated from discrete regions of rat brain. *Biochem Pharmacol* **25**: 1979-1983.
- Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Xiangwu J, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG, Koch WJ (1998). Age-associated reductions in cardiac β_1 - and β_2 -adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest* **101**: 1273-1282.
- Yanagishawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415.
- Yang M, Ruan J, Voller M, Schalken J, Michel MC (1999). Differential regulation of human α_1 -adrenoceptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **359**: 439-446.

Yorikane R, Miyauchi T, Sakai S, Sakurai T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K (1993). Altered expression of ET_B-receptor mRNA in the lung of rats with pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **22**: 336-338.

Yoshida H, Tanonaka K, Miyamoto Y, Abe T, Takahashi M, Anand-Srivastava, Takeo S (2001). Characterization of cardiac myocyte and tissue β -adrenergic signal transduction in rats with heart failure. *Cardiovasc Res* **50**: 34-45.

Yoshie H, Tobise K, Onodera S (1994). Intraventricular changes in the β -adrenoceptor-adenylate cyclase system of the rat heart with the progress of monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *Japan Circ J* **58**: 855-865.

Yoshikawa T, Port JD, Asano K, Chidiak P, Bouvier M, Dutcher, Roden RL, Minobe W, Tremmel KD, Bristow MR (1996). Cardiac adrenergic receptor effects of carvedilol. *Eur Heart J* **17** (Suppl B): 8-16.

Zimmer H-G, Gerdes AM, Lortet S, Mall G (1990). Changes in heart function and cardiac cell size in rats with chronic myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* **22**: 1231-1243.

Zhao M, Hagler HK, Muntz KH (1996). Regulation of α_1 -, β_1 -, and β_2 -adrenergic receptors in rat heart by norepinephrine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **271**: H1762-H1768.

Zhong H, Kenneth P, Minneman KP (1999). α_1 -Adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **375**: 261-276.

Zolk O, Quatteck J, Sitzler G, Schrader T, Nickenig G, Schnabel P, Shimada K, Takahashi M, Bohm M (1999). Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation* **99**: 2118-2123.

Für die Überlassung dieses herausfordernden Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Möglichkeit zu freien, ungehinderten, experimentellen Untersuchungen gebührt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. Otto-Erich Brodde. Im Verlauf der Arbeiten habe ich seine stete Bereitschaft zur Diskussion und Unterstützung sehr schätzen gelernt und mich in der vertrauensvollen und freundschaftlichen Atmosphäre sehr wohlgeföhlt.

Mein besonderer Dank gilt desweiteren Herrn Prof. Dr. Stefan Dhein. Seine ständige Diskussionsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen und seine grosszügige Unterstützung haben im besonderen Masse zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe danke ich für die kontinuierliche Gesprächsbereitschaft, die Anregungen und die Kollegialität. Ausdrücklich hervorheben möchte ich Frau Dr. Kirsten Leineweber, die mir durch ihre Hilfsbereitschaft, die weit über das normale Mass hinausgeht, ihre Anregungen und ihre aufmunternde Art bei auftretenden Schwierigkeiten geholfen hat. Frau Dr. Ingrid Hoffmann-Heinroth danke ich für die Unterstützung bei der Etablierung des Tiermodells an unserem Hause. Unsere Zusammenarbeit vermittelte mir grundlegende Fähigkeiten in der tierexperimentellen Methodik. Frau Dr. Karin Becker, Frau Christine Giessler sowie Herrn Dr. Klaus Poenicke danke ich für die zahlreichen Gespräche, denen ich wertvolle Hinweise für meine Untersuchungen entnehmen konnte.

Für die exzellente Zusammenarbeit bei der Durchführung sämtlicher experimenteller Versuche und der Erleichterung der Arbeit gilt mein Dank insbesondere Frau Pia Willmy-Matthess, Frau Anja Beilfuß, Frau Sonja Reber, Frau Anneliese Hauser, Frau Ingrid Adler sowie Frau Anne Dunemann.

Des Weiteren geböhrt mein Dank Herrn Prof. Dr. Henning Schröder für die Bemühungen, die er für die Betreuung der Arbeit aufgebracht hat.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Jana Rudolf, die mich mit ihrer aufmunternden Art und ihrer geduldigen Unterstützung stets nach vorn blicken ließ. Vielen Dank für das Korrekturlesen der Arbeit!

Mein herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern und meinem Bruder für die immer großzügig gewährte Unterstützung und Hilfe auf meinem bisherigen Lebensweg.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität vorgelegt und mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben habe.

Halle (Saale), den 31.08.2003

Torsten Seyfarth

LEBENS LAUF

Torsten Seyfarth

Geburtsdatum : 14.07.1973
Geburtsort : Gera
Nationalität : Deutsch

Schulische Ausbildung

1980 - 1990 2. Polytechnische Oberschule Gera
1990 - 1992 Zabelgymnasium Gera

Wissenschaftliche Ausbildung

1993 - 1997 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1997 2. Pharmazeutisches Staatsexamen

10.97 - 03.98 Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Thema: "Synthese und Eigenschaften von N1-Hetarylmethylen-substituierten Amidrazonen mit potentiell antimykobakterieller Aktivität"

04.98 - 09.98 Pharmaziepraktikum in der Salza-Apotheke, Salzmünde
10.1998 3. Pharmazeutisches Staatsexamen, Approbation als Apotheker

11.98 - 10.01 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Gegenwärtige Anstellung

Seit 05.02 Clinical Pharmacist, South Tyneside District Hospital, South Shields