

Aus dem Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung  
an der Universität Hamburg (IHF)

Direktoren: Prof. Dr rer. nat. R. Ivell  
Dr. A. K. Mukhopadhyay

**NACHWEIS DER ENDOTHELIN-REZPTOREN A UND B  
IM CORPUS PINEALE DER RATTE  
MIT HILFE DIREKTER UND INDIREKTER NACHWEISMETHODEN**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von  
Ulrike Fittschen  
aus Hamburg

Hamburg, 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher:

Referent:

Koreferent:

Meinem Sohn Daniel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Corpus pineale</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Endothelin</b> .....	<b>4</b>
1.2.1	Historischer Überblick.....	4
1.2.2	Endothelin-Synthese.....	5
1.2.3	Sekretorische Aktivitäten .....	8
1.2.4	Endothelin-Rezeptoren .....	10
1.2.5	Verfahren zum Nachweis von Endothelin-Rezeptoren .....	12
1.2.5.1	Rezeptoranalysen .....	12
1.2.5.2	Sättigungsexperimente .....	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Membranpräparation</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Proteinbestimmung</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Endothelin-Bindungsassay (LYSKO und NAMBI 1993)</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Berechnungen aus den Ergebnissen der Bindungsassays</b> .....	<b>19</b>
2.4.1	Sättigungsversuche .....	19
2.4.2	Verdrängungsversuche.....	20
<b>2.5</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion</b> .....	<b>20</b>
2.5.1	RNA-Herstellung.....	23
2.5.1.1	Vorbereitung .....	23
2.5.1.2	Separation .....	23
2.5.1.3	Präzipitation .....	24
2.5.1.4	Waschen.....	24
2.5.1.5	Resuspendieren.....	25
2.5.1.6	Qualitätskontrolle der RNA .....	25
2.5.1.6.1	Herstellen des Agarose-Gels.....	25
2.5.1.6.2	Kontrolle mit Elektrophorese .....	26
2.5.2	cDNA-Herstellung .....	26
2.5.3	Herstellung der PCR.....	28

2.5.3.1	cDNA-Überprüfung mit GAPDH.....	28
2.5.3.2	Überprüfung der cDNA auf dem Gel.....	29
2.5.4	Endothelin-Rezeptor-PCR.....	30
2.5.4.1	Primer.....	31
2.5.4.2	PCR zur Vorbereitung der Sequenzierung des Endothelin-A-Rezeptors.....	31
2.5.4.3	PCR zur Vorbereitung der Sequenzierung des Endothelin-B-Rezeptors.....	34
2.5.5	Sequenzierung.....	36
2.5.5.1	DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel.....	36
2.5.5.2	Sequenzierung.....	36
2.5.5.2.1	Endothelin-Rezeptor A.....	37
2.5.5.2.2	Endothelin-B-Rezeptor.....	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Sättigungsexperimente.....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Corpus pineale, Ratte.....	39
3.1.2	Corpus pineale, Ratte und Rind.....	41
3.1.3	Corpus pineale, Einzeldarstellungen.....	41
3.1.4	Corpus pineale, Berechnung der Dissoziationskonstante und der erwarteten Rezeptordichte.....	43
3.1.5	Cerebellum.....	45
<b>3.2</b>	<b>Verdrängungsversuche.....</b>	<b>47</b>
3.2.1	Cerebellum.....	47
3.2.2	Corpus pineale.....	48
3.2.2.1	Endothelin-1.....	48
3.2.2.2	Endothelin-3.....	53
<b>3.3</b>	<b>Sequenzierung der Rezeptoren und Vergleich mit einer Konsensussequenz.....</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>68</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
EDCF	endothelin-derived contracting factor
EDRF	endothelin-derived relaxing factor
ET-1, 2, 3	Endothelin 1, 2 und 3
ET-A, B	Endothelin-Rezeptor A und B
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
HVL	Hypophysenvorderlappen
$K_d$	Dissoziationskonstante
LH	Luteinisierungshormon
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
RT-PCR	Reverse Transkriptase/Polymerase-Kettenreaktion

## 1 Einleitung

Die Zirbeldrüse produziert sehr viele vasoaktive Substanzen, unter ihnen Melatonin, Serotonin, Vasopressin, Neuropeptid Y, Natriuretisches Peptid, Adenosin. Da sie sehr gefäßreich ist und neben der Niere das am stärksten durchblutete Organ des Körpers ist, spielt sie wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der Hirndurchblutung. Hieran könnten Endotheline – eine Familie stark vasoaktiver Peptide – teilhaben, von denen bisher zwei Rezeptortypen bekannt sind, Rezeptor A und B. Vermutlich ist der Rezeptor A an der Vasokonstriktion peripherer und zentraler Gefäße beteiligt, während der Rezeptor B, der überwiegend in Endothelzellen vorkommt, über die Erzeugung eines Relaxing-factors und Prostazyklin eine Vasodilatation vermittelt (GILLER et al. 1997; OKAZAKI et al. 1998).

Die mögliche Funktion der Zirbeldrüse bei der Hirndurchblutung könnte durch den Nachweis von Endothelinen und ihrer Rezeptoren erhellt werden. Daher ist es das Ziel der vorliegenden Studie eine potentielle Wirkung des Endothelins auf die Signalübertragungsmechanismen im Corpus pineale mittels Radioligandenassay zu untersuchen und die Existenz von Endothelin-Rezeptoren mit Hilfe des Radiorezeptorassay nachzuweisen. Durch die Polymerase-Kettenreaktion sollte anschließend eine Sequenzierung der gefundenen Rezeptoren und ein Vergleich mit den bisher bekannten Rezeptorsequenzen bei der Ratte erfolgen.

### 1.1 Das Corpus pineale

Die Epiphyse (Corpus pineale, Zirbeldrüse) wurde erstmals von dem alexandrinischen Anatom HEROPHILOS (325 – 280 v. Chr.) beschrieben. Er sah in ihr eine Art Schleuse für den Gedankenstrom aus den Seitenventrikeln des Gehirns. Der römische Arzt und Anatom GALENOS VON PERGAMON (129 –

199 n. Chr.) äußerte 450 Jahre später die Vermutung, daß die Funktion der Epiphyse der einer Lymphdrüse entspräche. ANDREAS VESALIUS (1514 – 1564) veröffentlichte 1543 erstmals Illustrationen der Epiphyse und verglich ihre Form mit einem Pinienzapfen (LeBARON 1972).

Im 17. Jahrhundert hielt der französische Philosoph und Mathematiker René DESCARTES (1596 – 1650) die Epiphyse – das „dritte Auge“ – für den Sitz der Seele. DESCARTES war der Meinung, daß eine Nervenverbindung zwischen den Augen und der Zirbeldrüse bestünde, die die optischen Sinneseindrücke weiterleitet und in Bewegungsreize umwandelt (EAKIN 1973).

Systematische Untersuchungen der Epiphyse begannen um etwa 1880, als sich AHLBORN als einer der ersten Wissenschaftler mit der Anatomie, Histologie und Embryologie der Epiphyse beschäftigte. DE GRAAF (1886) in England und HEUBNER (1899) in Deutschland stellten fest, daß die Epiphyse bei Amphibien und Reptilien als ein photosensorisches Organ angesehen werden kann (LeBARON 1972).

Die ersten Hypothesen über einen Zusammenhang zwischen der sexuellen Reifung und der Funktion des Corpus pineale wurden unabhängig voneinander von OGLE (1898) in England und HEUBNER (1899) in Deutschland aufgestellt. HEUBNER beschrieb den vorzeitigen Eintritt der Pubertät bei einem vierjährigen Jungen mit Pinealom (MESS 1985).

1943 postulierte BARGMANN, daß die endokrine Funktion der Epiphyse durch Lichteinfluß gesteuert würde und einen Einfluß auf die Hypothalamusfunktion habe. Diese Überlegung BARGMANNs basierte auf einer früheren Studie von ROUSSY und MOSINGER (1938), in der ausgeführt wurde, es existiere ein neuraler Weg zwischen Epiphyse und Hypothalamus. Der anatomische Nachweis, daß ein direkter Kontakt der Zirbeldrüse mit dem Gehirn über sympathische Nervenfasern besteht, wurde 1960 von KAPPERS erbracht. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde die Struktur der menschlichen Pinealozyten und deren Zellorganellen bekannt (WOLF 1965).

Heute ist bekannt, daß die Epiphyse als Ausstülpung des Zwischenhirns kaudal in der Mitte zwischen beiden Großhirnhemisphären entsteht. Zusammen



mit dem Plexus chorioideus ventriculi tertii, den Striae medullaris thalami, dem Trigonum und dem Nucleus habenuale bildet es den Epithalamus. Das Corpus pineale verdankt seinen Namen seiner Pinienzapfen-ähnlichen Form. Es ist am hinteren Rand des Zwischenhirndaches befestigt und liegt zwischen beiden Colliculi superiores dem Tectum auf (MESS 1985).

Bei der Epiphyse handelt es sich um ein sehr kleines Organ; es ist beim Menschen knapp einen Zentimeter lang und wiegt etwa 170 mg. Bei der Ratte schwankt das Gewicht zwischen 0,9 und 1,56 mg (MESS 1985).

Eingebettet in gefäßhaltiges Bindegewebe liegen die polygonalen, epitheloiden Pinealzellen in einem Maschenwerk von Gliazellen. Nach der Niere ist das Corpus pineale das am stärksten durchblutete Organ. Die Pinealozyten bilden sich mit zunehmenden Alter zurück, während die Gliafasern an Stärke und Zahl zunehmen (ALCOLADO 1986). Da in den Pinealozyten zahlreiche vasoaktive Substanzen produziert werden – unter anderem Serotonin, GABA, Adenosin, Taurin und Melatonin – wird angenommen, daß dem Corpus pineale eine wesentliche Bedeutung bei der Regulation der Hirndurchblutung zukommt (VAN COEVORDEN 1991). Durch seine Lage außerhalb der Blut-Hirn-Schranke unterliegt es der direkten Interaktion mit peripheren Stoffen (MESS 1985). Die bisher bekannte, vorrangige Aufgabe besteht in der Übersetzung des Tag-Nacht-Rhythmus in die Körperphysiologie (BOIVIN 1998).

## 1.2 Endothelin

### 1.2.1 Historischer Überblick

Vor mehr als zehn Jahren erkannte man, daß Endothelzellen sowohl vasorelaxierende (beispielsweise PGI<sub>2</sub> = Prostazyklin und EDRF = endothelin-derived relaxing factor (WARNER et al. 1988) als auch vasokonstriktive (EDCF = endothelin-derived contracting factor (GILLESPIE et al. 1986) Faktoren synthetisieren und freisetzen.

EDCF wurde 1982 zufällig entdeckt, als mittels Bioassay die biologische Aktivität des Kulturmediums aortaler Rinderendothelzellen an isolierten Schweinekoronarien gemessen werden sollte. Erwartet wurde die Freisetzung von EDRF durch die Endothelzellen und eine hieraus resultierende Relaxierung der glatten Muskulatur der Koronargefäße. Stattdessen wurde – wohl aufgrund der extremen Labilität des EDRF (Donor-Endothelzellen und Akzeptor-Koronarien kamen aus unterschiedlichen Laboratorien) – eine langsam zunehmende und langanhaltende Kontraktion der glatten Muskulatur beobachtet. Da diese Reaktion keiner bisher bekannten vasokonstriktischen Substanz zugeordnet werden konnte, wurde angenommen, es handele sich um einen peptischen Mediator (HICKEY et al. 1985). 1987 wurde der peptische endothelium-derived contracting factor EDCF isoliert, sequenziert, kloniert und 1988 in Endothelin umbenannt (YANAGISAWA et al. 1988), da er keine Ähnlichkeit mit den bisher bei Säugern bekannten Peptiden aufwies. Die Analyse des menschlichen Genoms zeigte sich Existenz dreier ähnlicher Gene für Endothelin auf, die drei verwandete Endotheline, ET-1, ET-2 und ET-3 kodieren (INOUE et al. 1989).

### 1.2.2 Endothelin-Synthese

Heute ist bekannt, daß es sich bei den Endothelinen um eine Familie stark vasoaktiver Substanzen handelt. Es bestehen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit der Sarafotoxinfamilie, die aus dem Genom der Schlange *Atractaspis engaddensis* isoliert wurde (BOUSSO-MITTLER et al. 1991; MORTON und DAVENPORT 1992; SHRAGA-LEVINE et al. 1994).

Die Endothelin-Peptide bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren und wurden zunächst aus Schweineendothelien isoliert (YANAGISAWA et al. 1988). Sie werden sowohl von den Zellen des Gefäßendothels als auch von den Zellen verschiedener Organe und Gewebe produziert. Die drei physiologisch aktiven Endotheline unterscheiden sich lediglich in wenigen Aminosäuren (Abbildung 1).

Alle Mitglieder der Endothelin-Familie bestehen aus 21 Aminosäuren und zeigen eine vollständige Übereinstimmung an 10 Positionen:

- Aminosäuren 1, 3, 11, 15	- Cystein
- 8, 18	- Aspartat
- 10	- Glutamat
- 16	- Histidin
- 20	- Isoleucin
- 21	- Tryptophan

Weitere Charakteristika sind zwei Disulfid-Brücken zwischen Cys 1-13 und Cys 3-11 und ein hydrophobes Endstück, das aus sechs Aminosäuren besteht und stets mit Tryptophan endet. Ohne das endständige Hexapeptid verliert das Molekül einen Großteil seiner biologischen Aktivität (DOHERTY et al. 1993B) und stellt daher das minimal benötigte Endothelin-Fragment dar (MACCHIA et al. 1998).

Die Aminosäuren 4 und 7 weisen die höchste Variabilität auf, die Aminosäuren 16 und 21 die geringste (NAYLER 1990).

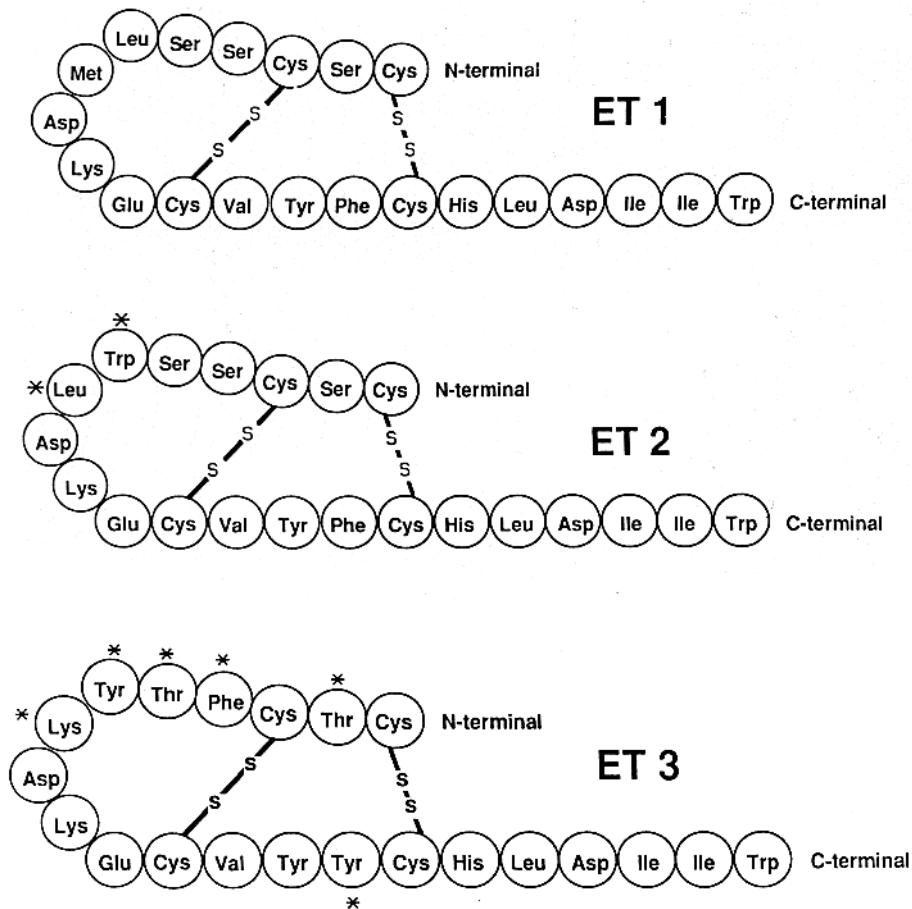


Abbildung 1: Vergleich der chemischen Struktur der Endotheline 1-3  
Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Aminosäuren weichen von  
ET-1-Sequenz ab (NAYLER 1990)

Endothelin wird aus größeren Vorformen synthetisiert, die zunächst durch eine dibasische Aminosäuren-Endopeptidase gespalten werden und dann durch die Carboxypeptidase in Big-Endothelin oder Prepro-Endothelin überführt werden. Big-Endothelin wird letztendlich durch das Endothelin-Converting-Enzyme in das Endprodukt aus 21 Aminosäuren gespalten. Dann verbinden sich die vier Cystein-Aminosäurereste 1, 3, 11 und 15 über Disulfidbrücken (YANAGI-SAWA et al. 1988).

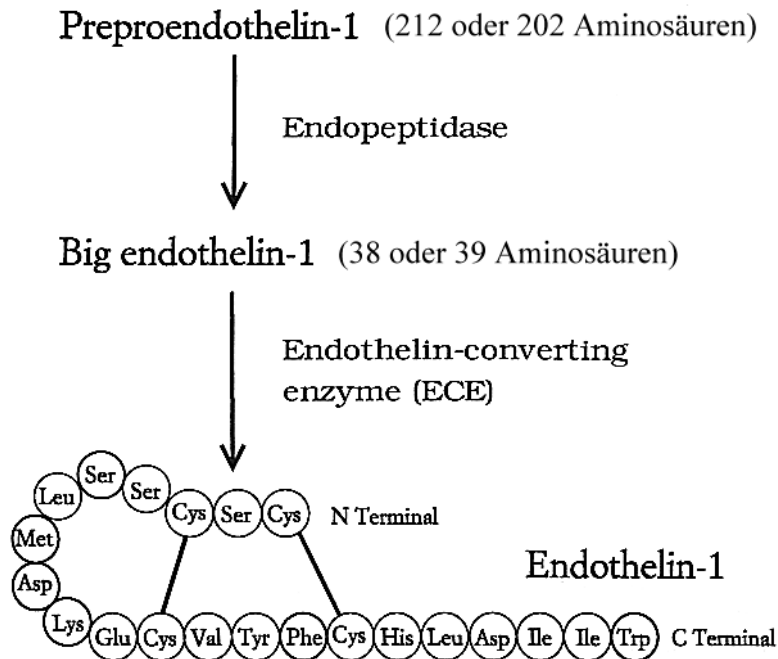


Abbildung 2: Bildung von Endothelin-1 aus Prepro- und Big-Endothelin (VANE et al. 1995)

Endotheline werden von vielen neuroendokrinen Zellen hergestellt. Nachgewiesen wurde dies durch Northern Analyse, Reverse Transkriptase/Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), RNAase protection techniques und verschiedene immunologische Assays. Auf diese Weise wurden Endotheline in den verschiedensten Zellen des menschlichen Gehirns gefunden. Die höchste Dichte an ET-mRNA tritt beim Menschen im Hypothalamus auf. Aber auch in Zellen des HVL, der Epithelkörperchen, der Leber, der Schilddrüse, der Nebenniere, der Gonaden, des Uterus und in anderen Geweben ist Endothelin nachweisbar (INOUE et al. 1989; BLOCH et al. 1989A; BLOCH et al. 1989B; DIAMANTIS et al. 1998).

Mit Hilfe eines hochspezifischen Antiserums gegen den bovinen Endothelin-Rezeptor B wurde eine unterschiedliche Gewebeverteilung nachgewiesen, d. h. die Menge des ET-B relativ zur Menge der ET-Rezeptoren variierte von Gewebe zu Gewebe: Lunge 70%, Cerebellum 55%, Hypophyse 50%, Niere 25%, Neben-

niere 10%, Hoden 2%. Das bedeutet, daß in der Lunge ET-B dominiert, während in den Hoden ET-A über 95% der Rezeptoren stellt (HAGIWATA et al. 1993).

Auch innerhalb einzelner Organe wurden unterschiedliche Endothelin-Verteilungen beobachtet. So sind in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde von Ratten ET-A und ET-B vorhanden, in der Zona fascicularis nur ET-B-Rezeptoren (BELLONI et al. 1996). In Blutgefäßen ist der ET-A-Rezeptor in der glatten Muskelschicht der Muskularis vorhanden, während der ET-B-Rezeptor im Endothel und in der Adventitia exprimiert (McEWAN et al. 1998).

Bei der Ratte interagieren ET-B-Rezeptoren in Lunge und Cerebellum unterschiedlich mit dem Antagonisten IRL 1620 und Endothelin 1 (CHIN et al. 1996).

### 1.2.3 Sekretorische Aktivitäten

ET-1 wird als einzige der drei Isoformen vom Gefäßendothel hergestellt (SHIGEMATSU et al. 1998), dem eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus zukommt. Es bewirkt eine prolongierte Vasokonstriktion sowohl an peripheren als auch an zentralen Gefäßen (YANAGISAWA et al. 1988). Man vermutet, daß ET-1 in die Regulation des zerebralen Blutflusses, speziell bei der Entstehung zerebraler Gefäßspasmen, involviert ist (ITOH et al. 1993).

Nach intravenöser Gabe von Endothelin kommt es zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von Vasopressin (EMORI et al. 1989). Es stimuliert die GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus ebenso wie die Gonadotropinsekretion, und die Aktivierung von ET-Rezeptoren ist mit einem Anstieg der LH- und FSH-Konzentration verbunden. Während GnRH einen plötzlichen Peak der letztgenannten Hormone induziert, ist der von ET hervorgerufene Anstieg flüchtig, mit einer geringen Amplitude. Endothelin-1 stimuliert die ACTH-Freisetzung aus der Hypophyse (STOJILKOVIC und CATT 1995).

Auch die Aldosteronkonzentration im Blut ist nach intravenöser Gabe von ET erhöht (MAZZOCCHI et al. 1990). Ob es sich hierbei um eine direkte Stimulation der Nebenniere handelt oder eine indirekte Reaktion auf eine ACTH-Freisetzung ist noch nicht geklärt.

Endotheline scheinen auch eine Rolle bei der Heilung von Gefäßwandverletzungen zu spielen. Drei Tage nach der Gefäßwandplastik der Karotis bei Ratten stieg die Konzentration der ET-A-Rezeptor-mRNA um nahezu das Dreißigfache, bzw. diejenige der ET-B-Rezeptor-mRNA bereits am ersten Tag um das Fünfzehnfache (WANG et al. 1996). Parallel hierzu stiegen auch die Konzentration an Endothelin-1 drastisch an (PICARD et al. 1998A).

In jüngerer Zeit wurden auch negative Endothelin-Auswirkungen beobachtet: beim Herzversagen herzinsuffizienter Ratten war die Produktion von Endothelin-1 signifikant erhöht. Eine dreimonatige Behandlung mit dem ET-A-Rezeptor-Antagonisten BQ-123 konnte das Langzeitüberleben und hämodynamische Parameter herzinsuffizienter Ratten deutlich verbessern (SAKAI et al. 1998). Ursache hierfür ist vermutlich eine veränderte basale kardiale Kontraktilität und ein Myokard-Umbau, die durch eine verstärkte ET-1-Expression ausgelöst wurden (PICARD et al. 1998B). Kürzlich wurden mit den Phenoxyphenylacetonsäure-Derivaten 13a, 27a und 27b neue potente, selektive Endothelin-A-Rezeptorantagonisten vorgestellt, die zur Therapie ET-1-mediierter Erkrankungen weiter geprüft werden (ASTLES et al. 2000).

Endothelin-1 soll auch an der Pathogenese Glycerol-induzierten Nierenversagens der Ratte beteiligt sein (ROUBERT et al. 1994; SHIMUZU et al. 1998). Radioligandenassays zeigten, daß ein Glycerol-induziertes Nierenversagen mit einer Aufregulierung der ET-A- und ET-B-Rezeptoren sowohl in der Nierenrinde als auch im -mark verbunden war (ROUBERT et al. 1994). Daher kann eine Therapie mit ET-Antagonisten möglicherweise beim menschlichen Nierenversagen von Nutzen sein (SHIMUZU et al. 1998).

#### 1.2.4 Endothelin-Rezeptoren

Die strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Endothelinpeptiden, die individuellen Bindungscharakteristika und die physiologischen Aktivitäten weisen auf die Existenz von Endothelin-Rezeptor-Subtypen hin (SCHVARTZ et al. 1991; TAKEDA et al. 1994). Bisher wurden zwei Subtypen mit über 50% Homologie in der Aminosäuresequenz durch molekulares Klonen charakterisiert, ET-A und ET-B (ARAI et al. 1990; SAKURAI et al. 1990). Der Rezeptor ET-A zeigt eine hohe Spezifität für Endothelin-1. Seine mRNA ist in glatter Muskulatur, dem Herzen, dem Gehirn und der Lunge weit verbreitet, während ET-B alle drei Endotheline gleichmäßig akzeptiert (VANE et al. 1995). Das Endothelin-1 kontrolliert den Gefäßtonus vermutlich über die zwei Rezeptortypen: durch ET-A-Bindung wirkt es vasokonstriktorisch, durch ET-B-Bindung vasodilatatorisch (OKAZAKI et al. 1998). Im Gegensatz hierzu wurde nachgewiesen, daß der ET-B-Rezeptor auch gegensätzliche Effekte mediiert und sowohl an der Entstehung einer Vasodilatation als auch einer Vasokonstriktion beteiligt sein kann (GILLER et al. 1997)

Kürzlich wurde eine Spaltungs-Variante des porcinen ET-B entdeckt, die sich in der Länge und in der Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende von dem originären ET-B unterscheidet, aber keine abweichenden Bindungsaktivitäten aufweist (NAMBI et al. 2000).

Beide Endothelinrezeptoren gehören zur Familie der  $Ca^{++}$ -mobilisierenden Rezeptoren, die über das regulatorische G-Protein (guanin-nucleotide-bindung protein) mit der Phospholipase C verbunden sind. Sie wurden bisher im Hypothalamus (Nucleus supraopticus, paraventricularis, ventromedialis) der Ratte nachgewiesen (ASSAL et al. 1997). Beim menschlichen Hypothalamus lassen gleiche Affinitäten für ET-1, ET-2, ET-3 im Radioligandenassay den Rezeptor B vermuten. ET-A-Rezeptoren sind in der Adenohypophyse, nicht aber in der Neurohypophyse stark ausgeprägt (VANE et al. 1995).

Endothelin-Rezeptoren verschiedener Spezies weisen teilweise eine große Übereinstimmung mit den menschlichen Endothelin-Rezeptoren auf. Beispiels-



weise zeigt der menschliche Endothelin-Rezeptor-A eine 91%ige Übereinstimmung mit demjenigen der Ratte und eine 94%ige Übereinstimmung mit demjenigen des Rindes, während der menschliche Endothelin-Rezeptor-B nur zu 59% dem von Ratte und Rind entspricht (HAYZER et al. 1992). Jedoch wurden speziesabhängig unterschiedliche reversible Bindungscharakteristika nachgewiesen (NAMBI et al. 1994).

Man vermutet, daß Endothelin-Rezeptoren zwei unterschiedliche Affinitätszustände aufweisen, die entweder im nanomolaren („high affinity sites“) oder im picomolaren Bereich („super-high affinity sites“) liegen. Sowohl in Membranen aus dem Cerebellum als auch aus dem Atrium der Ratte, trugen im nanomolaren Bereich Kohlenhydrat-Seitenketten zur Ligandenbindung bei, nicht aber im picomolaren Bereich (SHRAGA-LEVINE und SOKOLOVSKY 1998). Es besteht die Möglichkeit, daß die „super-high affinity sites“ an der vasodilatatorischen Fähigkeit der Endotheline beteiligt sind, während die „high affinity sites“ bei einer Vasokonstriktion partizipieren (SOKOLOVSKY et al. 1992).

Endothelin-Rezeptoren sind von der Aktivierung der Phospholipase C, der Proteinkinase C und der Öffnung von Kalziumkanälen abhängig (RUBANYI und POLOKOFF 1994). In Zellkulturen aus Ratten- und Rinder-Pinealozyten induzieren sowohl Noradrenalin als auch einige Peptide wie beispielsweise PACAP (Pituitary Adenyl Cyclase Activating Peptide) eine biphasische Kalziumantwort, die aus einer anfänglichen transienten Spike-Phase und einer folgenden anhaltenden Plateauphase besteht (OLCESE et al. 1996). Endothelin-1 beeinflusst den intrazellulären Kalziumgehalt in den Pinealozyten: Nach einem rapiden Anstieg blieb der Kalziumgehalt über die gesamte Versuchsdauer auf einem hohen Niveau. Annähernd 25% der Zellen reagierten auf Endothelin-1, während fast alle Zellen auf Noradrenalin reagierten. Die Hydrolyse von Phosphatidyl-Inositol wurde durch ET-1 sowohl in Ratten- als auch in Rinder-Pinealozyten gesteigert, wobei die Reaktion der Rinderzellen signifikant stärker ausfiel. Dennoch konnte bisher keine kalziumabhängige Signalübertragung bei der Endothelin-1-Antwort boviner Pinealozyten nachgewiesen werden. Vermutlich existiert ein neues peptiderges System im Corpus pineale, dessen Beteiligung in der kalziumabhängigen Signalübertragung eventuell auf andere regulatorische Funktionen hinweist (OLCESE und MARONDE 1999).

Bei der Ratte wird ein Fehlen oder eine Funktionsstörung des Endothelin-B-Rezeptors mit dem Auftreten der kongenitalen Aganglionose in Verbindung gebracht (KARAKI et al. 1996; KUNIEDA et al. 1996).

Der Gebrauch selektiver und nicht-selektiver Rezeptorantagonisten hilft, die Rolle der Endotheline bei physiologischen und pathologischen Vorgängen aufzuklären (DOHERTY et al. 1993B). Beispielsweise sind die Antagonisten BQ-123, BQ-485 und FR-139317 selektiv für ET-A und BQ-788 ist selektiv gegenüber ET-B-Rezeptoren (IHARA et al. 1992; ARAMORI et al. 1993; ITOH et al. 1993; ISHIKAWA et al. 1994). PD-142893 und PD-145065 wurden als potente Antagonisten entwickelt, die ET-A und ET-B blockieren (DOHERTY et al. 1993A). Die Entwicklung nicht-selektiver, oral wirksamer, Nicht-Peptid-Antagonisten erlaubte die weitere Erforschung endogener Endotheline am nicht bewußtlosen Versuchstier. Beispielsweise verringerte Ro 46-2005 die gegensätzlichen Effekte einer ernsthaft gestörten Nierendurchblutung und zerebrovaskulärer Spasmen (BREU et al. 1993; CLOZEL et al. 1994), und SB 298670 reduzierte sowohl den Blutdruck bei spontan hypertonen Ratten als auch die Neointima-Bildung nach Gefäßwandnaht der Ratten-Karotis (OHLSTEIN et al. 1994; WANG et al. 1996).

Solche und ähnliche Versuche können dazu beitragen, die Rolle der Endotheline bei Bluthochdruck, Schlaganfall und Atherosklerose endgültig aufzudecken (MASAKI et al. 1994; WARNER et al. 1994).

### 1.2.5 Verfahren zum Nachweis von Endothelin-Rezeptoren

#### 1.2.5.1 Rezeptoranalysen

Es existieren mehrere Wege der Analyse, um die Interaktion von Neurotransmittern, Hormonen und anderen Stoffen mit Zellen zu untersuchen. Die erste Möglichkeit ist es, die biologische Antwort von Zellen an einem intakten isolierten Organ mittels Agonisten und Antagonisten zu messen. Die Schwierigkeit dieser Methode besteht in den unbekanntenen Schritten bezüglich Transport,

Verteilung und Metabolismus, die eine Substanz erfährt, bevor die endgültige biologische Antwort gemessen werden kann (McGONIGLE und MOLINOFF 1989).

Die zweite Methode zur Untersuchung eines Rezeptors besteht in der Messung einer Ligandenbindung am Homogenat oder Teilstück. Diese Technik wurde nach der Entdeckung von Liganden mit hoher spezifischer Aktivität und hoher Affinität für einen Rezeptor möglich. Man unterscheidet eine direkte von einer indirekten Methode. Bei der indirekten Methode wird die direkte Interaktion des Radioliganden mit dem Rezeptor gemessen. Sie besteht in der Inkubation eines markierten Agonisten oder Antagonisten mit dem präparierten Rezeptor, in der Trennung des Rezeptor-Liganden-Komplexes von den freien Liganden über Zentrifugation, Filtration oder Präzipitation. Bei der indirekten Methode wird die Hemmung der Bindung eines Radioliganden gemessen. Dadurch wird die Affinität des Rezeptors für den nicht markierten Liganden indirekt bestimmt. Es handelt sich um eine Gleichgewichts-Analyse, die spezifisch für den Rezeptor-Liganden-Komplex ist. Die Ligandenkonzentration im Bad wird von der im „Dialysis Sack“ subtrahiert (BYLUND und YAMAMURA 1990).

Eine dritte Methode stellt die elektrische Ableitung dar. Es handelt sich um eine intrazelluläre Stimulation und Beobachtung über Mikroelektroden, die sich in einem Hirnteil oder Neuron in Kultur befinden, kombiniert mit der Applikation von Agonisten und Antagonisten (McGONIGLE und MOLINOFF 1989).

#### 1.2.5.2 Sättigungsexperimente

Sättigungsexperimente messen spezifische Bindungen, wenn bei verschiedenen Konzentrationen ein Gleichgewicht an Radioliganden hergestellt ist, um die Anzahl an Rezeptoren und ihre Affinität festzustellen.

Man unterscheidet direkte und indirekte Bindungsassays. Beim direkten Bindungsassay wird die direkte Interaktion zwischen Radioligand und Rezeptor gemessen. Indirekte Bindungsassays messen die Hemmung der Bindung eines

Radioliganden durch einen unmarkierten Liganden, um indirekt die Affinität des Rezeptors zu dem unmarkierten Liganden ableiten zu können.

Der Radioligand sollte eine hohe Affinität zum Rezeptor besitzen, d. h. die Dissoziationskonstante  $K_d$  kleiner als 100nM sein. Bei niedrigerer Affinität des Radioliganden ist die Dissoziationsrate vom Rezeptor zu hoch, um ein Gleichgewicht entstehen zu lassen.

In einem typischen Sättigungsexperiment wird eine steigende Zahl von Radioliganden einer konstanten Zahl an Rezeptoren zugefügt. Die Zahl der gebundenen Radioliganden wird als Funktion der Radioligandenkonzentration gemessen. Die Anzahl der Radioliganden wird solange gesteigert, bis scheinbar alle Rezeptoren besetzt sind. Die Ergebnisse können grafisch in Form eines Scatchard Plots – besser bezeichnet als Rosenthal-Analyse – dargestellt werden. Die Gültigkeit der Analyse hängt davon ab, ob während der Inkubation ein Gleichgewicht erreicht wurde. Dies kann wenige Minuten, aber auch mehrere Stunden dauern, wobei die Zeitdauer vom Liganden, Rezeptor, Temperatur und anderen experimentellen Bedingungen beeinflusst wird.

Bei der Scatchard-Analyse ergibt sich ein lineares Verhältnis. Die Steigung ist gleich dem negativen Kehrwert der Dissoziationskonstanten. Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse entspricht der totalen Rezeptorkonzentration. Damit ist es möglich, die Rezeptorkonzentration abzuschätzen. Es kann allerdings auch zu völligen Fehlkalkulationen kommen, wenn die Radioligandenkonzentration nicht den  $K_d$ -Wert erreicht hat.

Außer an den Rezeptor binden Radioliganden auch an viele andere Substanzen. Zur Durchführung eines Radioliganden-Experimentes ist es daher immer erforderlich, die gesamten und die nichtspezifischen Bindungen zu messen, um die spezifische Bindung aus der Differenz zu errechnen. Nichtspezifische Bindungen sind generell nicht zu sättigen und entstehen sofort. Sie steigen proportional zur Radioligandenkonzentration und können durch Hinzufügen eines nichtmarkierten Liganden, der spezifisch für den Rezeptor ist, quantifiziert werden. Sind unmarkierte und markierte Liganden vorhanden, so werden alle Rezeptoren von unmarkierten Liganden besetzt, und der Radioligand bindet nur noch unspezifisch. Der unmarkierte Stoff sollte die gleiche Verbindung sein

wie der Radioligand, nur unmarkiert. Die Konzentration der unmarkierten Substanz sollte etwa hundertfach über der Dissoziationskonstante des Rezeptors liegen. Dann werden praktisch alle Rezeptorstellen blockiert und generelle Veränderungen an der Membran durch nichtspezifische Bindungen entstehen nicht. Höhere Konzentrationen können sowohl die spezifischen als auch die nichtspezifischen Bindungen hemmen (BYLUND und YAMAMURA 1990).

## **2 Material und Methodik**

### **2.1 Membranpräparation**

Zwölf Tage alte Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts wurden vormittags durch Dekapitation getötet und das Corpus pineale unmittelbar nach dem Tod des Tieres entnommen. Für die Sättigungsexperimente wurden die Zirbeldrüsen in 3 ml eiskalter 20 mM NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, pH 7,4, in einem Glashomogenisator homogenisiert.

Das Homogenat wurde anschließend 15 min bei 4°C in einer vorgekühlten Zentrifuge (Eppendorf speed 3.800 rpm) bei 1.000 g zentrifugiert.

Der Überstand, der die Membranen enthält, wurde vorsichtig in spezielle auf Eis stehende Ultrazentrifugenröhrchen abpipettiert und bei 40.000 U/min (100.000 g) für 30 min in der bei 4°C vorgekühlten Ultrazentrifuge (Cryofuge 8.000) zentrifugiert (Rotor 3). Der Überstand enthielt nun die Zellbestandteile, während die Membranteile sich am Boden absetzten. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pellet in 300 µl 50 mM Tris und 20 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,5) resuspendiert. Davon wurden 10 µl zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

### **2.2 Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt wurde nach der BRADFORD-Methode bestimmt (BRADFORD 1976). Es handelt sich um einen indirekten quantitativen Nachweis. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Änderung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm durch Bindung des Farbstoffes Dye an Protein.

Bestimmung:

Als erstes wurden Standards aus Ovalbumin ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{l H}_2\text{O}$ ) in steigender Konzentration hergestellt: 0  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , 12  $\mu\text{g}$ , 16  $\mu\text{g}$  (pro Standard 250  $\mu\text{l}$ ). Dann wurden 10  $\mu\text{l}$  des Pellet (s. 2.1) in 300  $\mu\text{l}$  50 mM Tris und 20 mM MgCl gelöst und 10  $\mu\text{l}$  dieser Suspension in 240  $\mu\text{l}$  50 mM Tris und 20 mM MgCl aufgeschwemmt. 100  $\mu\text{l}$  des Standards und 100  $\mu\text{l}$  der Suspension wurden miteinander vermischt. Zum Zersetzen des Proteins wurde 100  $\mu\text{l}$  NaOH hinzugegeben, dann 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Mit 200  $\mu\text{l}$  Dye (Bio-Rad Proteinassay) wurde die Mischung angefärbt. Da Dye mit Aminosäuren eine schnell zerfallende Bindung eingeht, mußte sofort photometrisch gemessen werden.

Extinktion 595 nm

Photometer:

14.08.1996	10 $\mu\text{l}$	3,41 $\mu\text{g}$
16.08.1996	10 $\mu\text{l}$	3,98 $\mu\text{g}$
09.07.1996	10 $\mu\text{l}$	2,43 $\mu\text{g}$
10.07.1996	10 $\mu\text{l}$	0,86 $\mu\text{g}$
Mittelwert:	10 $\mu\text{l}$	2,67 $\mu\text{g}$

Der Überstand wurde in 250  $\mu\text{l}$  bovinem Gammaglobulin (= 0,4g/100ml) und 1,5 ml 16% Polyethylenglykol gelöst und 30 min bei 3.600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.3 Endothelin-Bindungsassay (LYSKO und NAMBI 1993)**

Der Bindungsassay wurde mit  $^{125}\text{J-ET-1}$  (2.200 Ci/mmol) in Glasröhrchen im doppelten Versuchsansatz mit einer mittleren Proteinkonzentration von 2 – 3  $\mu\text{g}$  durchgeführt. Das Reaktionsgemisch bestand aus  $^{125}\text{J-ET-1}$  in einem Konzentrationsbereich von 20 – 480 pM, durchschnittlich 2 – 3  $\mu\text{g}$  Protein, aufgefüllt mit Tris/ $\text{MgCl}_2$ -Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$ . Es wurde bei Raumtemperatur gehalten. Nichtspezifische Bindungen wurden durch Hinzufügen von 100 nM kaltem, unmarkierten ET-1 definiert. Darauf folgte die Inkubation im Wasserbad bei 30°C. Nach der Inkubation wurden 250  $\mu\text{l}$  bovine Gammaglobulin-Lösung (0,4 g/100 ml) und 16%ige PEG hinzugefügt. Das Gemisch wurde 30 min bei 3.600 rpm zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Radioaktivität des Niederschlags wurde in einem Multi Gamma Counter (1260 gamma counter) bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde durch Verwendung von Brilliant blue (Biorad) bestimmt (BRADFORD 1976). Die spezifische Bindung betrug 60 – 90% der Gesamtbindungen.

#### **Material:**

- $^{125}\text{J-ET-1}$ , spezifische Aktivität 2.200Ci/mmol (Fa. New England Nuclear Research Products)
- unmarkiertes ET-1, CONC = 1  $\mu\text{M}$  (Fa. Bissendorf)
- Puffer für den Tracer: PMSF 0,1 mM, Bacitracin 40  $\mu\text{g/ml}$ , Tris/ $\text{MgCl}_2$  (50 mM Tris + 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,5)
- Proteinstandards zur Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 2.2)
- 2 – 3  $\mu\text{g}$  Protein/10  $\mu\text{l}$ /Reagenzglas

Der Bindungsassay wurde nach dem Prinzip der Präzipitation mit Salzen oder anderen Lösungsmitteln durchgeführt. Hierbei wird das Material in einer Konzentration hinzugefügt, daß die bindende und die gebundene Substanz einen unlöslichen Komplex bilden und dadurch präzipitieren, während die freie Fraktion in Lösung bleibt. Als Präzipitationsagens diente Polyethylenglykol.



## 2.4 Berechnungen aus den Ergebnissen der Bindungsassays

### 2.4.1 Sättigungsversuche

Das Specific binding wurde nach der Formel errechnet:

$$\text{Specific binding (cpm)} = \text{Total binding (cpm)} - \text{Nonspecific binding (cpm)}$$

Die Menge der Radioliganden-Rezeptor-Komplexe wird als Funktion der freien Liganden-Konzentration bestimmt. Nach folgender Gleichung kann die Zahl der Radioliganden-Rezeptor-Komplex bestimmt werden:

$$B = B_{\max} * F / (K_D + F)$$

B = Radioligand-Rezeptor-Komplexe,  $B_{\max}$  = Anzahl der Bindungen,

F = freie Liganden,  $K_D$  = Dissoziationskonstante

Durch Auftragen der Werte für die gebundenen Liganden auf der X-Achse gegen den Quotienten aus „Bound/free“ erhält man die lineare graphische Darstellung in Form des Rosenthal-Plots. Hierbei kennzeichnet der Schnittpunkt der Gerade mit der X-Achse die Anzahl der maximalen Bindung und die Steigung der Geraden kennzeichnet die Dissoziationskonstante gemäß der Formel:

$$K_D = -1/\text{Steigung der Geraden}$$

#### 2.4.2 Verdrängungsversuche

Der Hill Koeffizient  $\eta_H$  (Steigung der Ausgleichsgeraden) und  $IC_{50}$  (Menge des zugesetzten Endothelin-1 bei Logit 0) wurden aus der Korrelationsmatrix „Logit über zugesetzte Menge unmarkiertes Endothelin-1 (logarithmisch)“ errechnet.

Der „estimated free radioligand“ wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$\text{Free (pmol)} = (\text{Total added (cpm)} - \text{Specific binding Leerwert (cpm)}) * 0,00156061 \text{ (Umrechnungsfaktor cpm in pmol).}$$

Die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) wurde folgendermaßen errechnet:

$$K_i = IC_{50} / (1 (= \eta_H) + (\text{Free} / K_d)).$$

$K_d$  entspricht der in den Sättigungsexperimenten bestimmten Dissoziationskonstante (5,725 pmol).

### 2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine schnelle enzymatische Amplifikation eines spezifischen DNA-Segmentes. Die Polymerase-Kettenreaktion wird für verschiedene Zwecke eingesetzt, u. a. das direkte Klonieren der DNA oder cDNA (bereits klonierte DNA), die In-vitro-Mutagenese und Manipulation der DNA, der genetische Fingerabdruck für forensische Zwecke, die pränatale Diagnostik genetischer Erkrankungen, die Analyse von

allelen Sequenzvariationen, die Analyse der t-RNA, die direkte Nukleotidsequenz der DNA und cDNA.

Der theoretische Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion: Die beteiligten Reaktionspartner sind die Ziel-DNA (Template) als Matrize für die Vervielfältigung, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's), Starteroligonucleotide (Primer) und DNA-Polymerasen, die die Neuverknüpfung der dNTP's zum komplementären Strang der Ziel-DNA vornehmen.

Das Reaktionsprinzip der PCR besteht aus sich wiederholenden Temperaturzyklen mit folgenden Reaktionsschritten:

- Durch Erhitzung auf 95°C (Denaturierung) wird zunächst eine einzelsträngige Ziel-DNA erzeugt. Eine Reassoziaton der einzelsträngigen DNA wird durch schnelles Abkühlen verhindert.
- Bei einer niedrigeren Temperatur, die von der Schmelztemperatur der Primer abhängig ist, erfolgt dann die Anlagerung der Primer an die Ziel-DNA (Annealing). Die Polymerase benötigt die Primer als Startermoleküle. Die Primer müssen immer als gegensinnig ausgerichtetes Paar vorliegen, die im Idealfall weder Primerdimere noch Sekundärstrukturen bilden sollten.
- Bei 72°C verlängert schließlich die Taq-Polymerase durch Neuverknüpfung der dNTP's komplementär zum Template die Primer immer in Richtung 3'-Ende (Extension). Es entsteht ein Doppelstrang, der in einem neuen Zyklus wieder als Template dienen kann (Abbildung 3).

Theoretisch wächst die Zahl der Moleküle um  $2^n$ . Die Reaktion erreicht durch Limitierung der Substrate, abhängig von der Menge der Template, nach etwa 25 bis 30 Zyklen ein Plateau. Mittels PCR können Genomfragmente von 430 bis 5.000 bp amplifiziert und durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden (NEWTON und GRAHAM 1994).

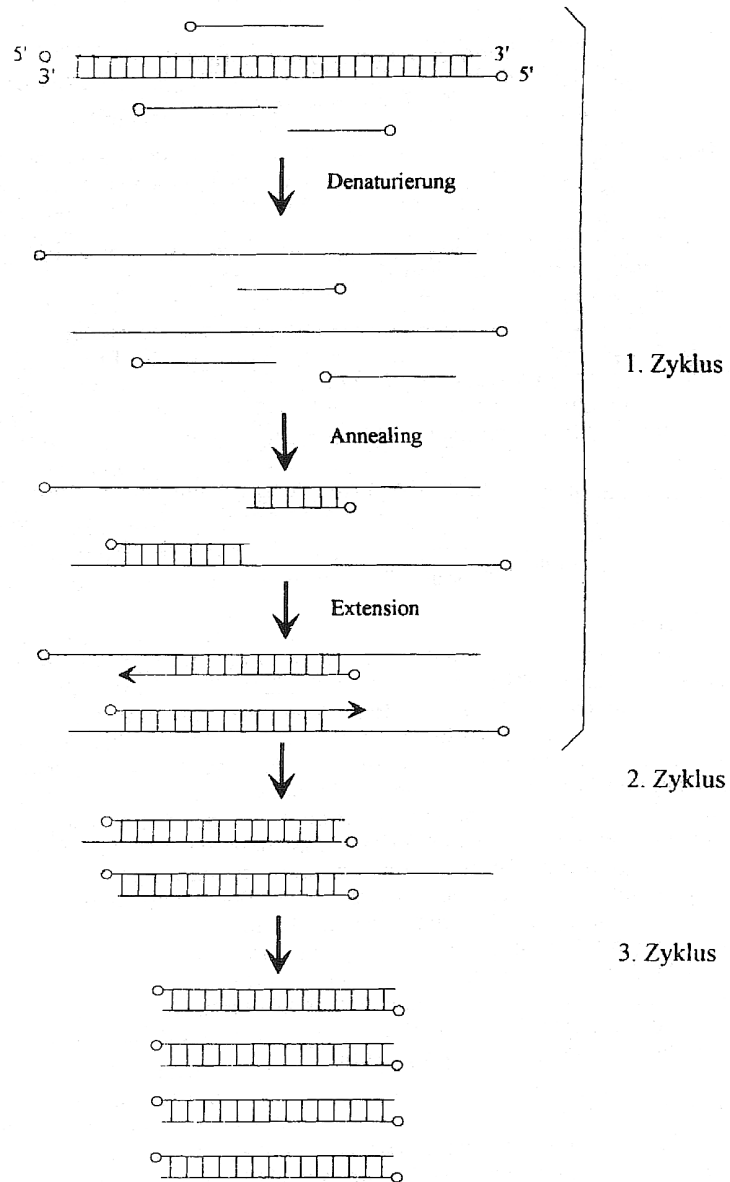


Abbildung 3: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

## 2.5.1 RNA-Herstellung

### 2.5.1.1 Vorbereitung

Es wurden 25 Corpora pineale der Ratte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  homogenisiert; 2 ml Tri-Reagent und 25 Corpora pineale ergaben etwa 25 mg Homogenat.

Jeweils 1 ml des Homogenats wurde in Eppendorf-Röhrchen gefüllt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14.000 rpm erfolgte die Separation.

### 2.5.1.2 Separation

In die Eppendorf-Röhrchen wurden jeweils 0,2 ml Chloroform pro ml Tri-Reagent zugeführt und die Proben 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  in Wassereis stengelassen. Es bildeten sich drei Phasen: in der unteren, tiefroten Phenol-Chloroform-Phase und der Interphase waren DNA und Protein enthalten, die obere, farblose Wasser-Phase enthielt RNS.

Die Wasserphase wurde vorsichtig abpipettiert und in Eppendorf-Röhrchen gegeben. (Die beiden anderen Phasen wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und zur DNA- bzw. Proteingewinnung benutzt.)

### 2.5.1.3 Präzipitation

Pro 1 ml Tri-Reagent wurden 0,5 ml Isopropanol zugegeben und die Probe geschüttelt („vortexing“), um eine gute Durchmischung zu erreichen. Nach 10minütigem Stehenlassen in Wassereis bei 4°C wurden die Proben bei 14.000 rpm 10 min zentrifugiert.

### 2.5.1.4 Waschen

Das Waschen der Proben erfolgte nach folgendem Schema:

- Überstand abpipettieren und verwerfen
- 1 ml Ethanol 75% pro Röhrchen hinzufügen
- Vortexing
- 5 min bei Raumtemperatur in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren (12.000 rpm)
- Überstand vorsichtig abpipettieren
- zum Verdampfen das Röhrchen offen auf Wassereis bei 4°C etwa 5 min stehenlassen

#### 2.5.1.5 Resuspendieren

Der Probe wurden 25  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  oder 25  $\mu\text{l}$ -Tris-EDTA-Puffer, pH 8,0 zugefügt und zehnmal mit der Pipette resuspendiert. Nach Vortexing und Zentrifugieren wurden die Proben bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### 2.5.1.6 Qualitätskontrolle der RNA

##### 2.5.1.6.1 Herstellen des Agarose-Gels

In der Mikrowelle wurden 100 ml TBE-Puffer und 1 g Agarose zum Kochen gebracht. Die Lösung wurde immer wieder geschüttelt und sollte klar aussehen. Anschließend wurde die Lösung mit 3  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid versetzt und für 5 min auf den Rüttler gestellt. Das flüssige Gel wurde unter der Abzugshaube in vorbereitete Schalen gefüllt und wurde dort nach etwa 15 min fest.

Anschließend wurde 1  $\mu\text{l}$  der Resuspension (d. h. 1  $\mu\text{l}$  pro Röhrchen abnehmen, insgesamt 2 Röhrchen) mit 59  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt und hiervon 1  $\mu\text{l}$  in die Tasche des 1%igen Agarose-Gels gegeben.

#### 2.5.1.6.2 Kontrolle mit Elektrophorese

Als Loading-buffer diente Brom-Phenolblau und Glycerol.

Die Agarose-Gelkammer wurde mit TBE-Puffer gefüllt, das Gel in die Kammer gesetzt, der Kamm entfernt, wobei die Löcher des Kamms zur Anode zeigten.

Es wurde 1 µl der Probe noch einmal zentrifugiert, 2 µl Loading-buffer hinzugefügt und nach erneutem Zentrifugieren die Proben in die Löcher des Gels gefüllt.

Die Elektrophorese wurde bei 100V, 44 mA über 2 Stunden durchgeführt..

#### 2.5.2 cDNA-Herstellung

Zunächst wurden 5 µg RNA mit 1 µl Oligo (dt)<sup>1</sup> und 5,5 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O versetzt, nach Vortexing und Zentrifugieren bei 70° für 10 min in den Eppendorf-Thermomixer und nach erneutem Zentrifugieren auf Wassereis gegeben.

Nach dem Zufügen von 4 µl 5x Superscript-Puffer (Fa. Gibco), 2 µl 0,1M DTT und 1 µl dNTP und nach Zentrifugieren für 2 min wurde die Probe in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Es folgte erneutes Zentrifugieren, Zugabe von 1 µl Superscript (Fa. Gibco), Zentrifugieren und 1 h Inkubation im Wasserbad bei 37°C.

Anschließend wurden 30 µl TE (Tris/EDTA, 50 Ml 0,3 N NaOH/30 mM EDTA) zugegeben und die Probe nach Vortexing und Zentrifugieren für 5 min in den

---

<sup>1</sup> Oligo (dt) = künstliche Polymere, um den Poly-A-Schwanz der zu untersuchenden RNA zu binden und die cDNA-Synthese zu ermöglichen



Thermomixer bei 100°C gegeben. 10 µl TRIS 1M, pH 7,5 wurden zugefügt und eine Phasentrennung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol eingeleitet.

Aus der unteren Phase wurden nun 110 µl abgenommen und nach Vortexing in der Eppendorf-Zentrifuge 2 min bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert.

Die abgesetzte obere Phase (DNA) wurde vorsichtig abpipettiert und unter dem Abzug in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben.

Nach erneuter Phasentrennung mit Chloroform/Isoamylalkohol und Vortexing wurde für 2 min in der Eppendorf-Zentrifuge bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert, in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und ihr Volumen bestimmt.

Zum besseren Ausfällen der DNA wurde 1 µl Glykogen zugefügt und die Probe mit 1/10 des Probenvolumens Natriumacetat 3M, pH 5,1 und der dreifachen Menge des Volumens 96% Ethanol versetzt. Nach Vortexing wurde die Probe bei -20°C tiefgekühlt gelagert.

Vor der Durchführung der PCR wurde die Probe 20 min bei 4°C in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und danach in Wassereis gegeben. Der Überstand wurde verworfen und erneut mit etwa 300 µl 96%igem Ethanol die Salze herausgewaschen. Nach Vortexing, 2minütigem Zentrifugieren bei 14.000 rpm bei 4°C wurde der Überstand abgegossen und das Pellet etwa eine halbe Stunde zum Lufttrocknen stehengelassen.

Das Pellet wurde in 50 µl autoklaviertes H<sub>2</sub>O gegeben und nach Vortexing und Zentrifugieren 2 µl der Lösung für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.

### 2.5.3 Herstellung der PCR

#### 2.5.3.1 cDNA-Überprüfung mit GAPDH

Folgende GAPDH-Primer wurden zur Überprüfung der cDNA eingesetzt:

- a. 5´-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG-3´
- b. 5´-GGC CTC CAA GGA GTA AGA AA-3´  
5´-TTC CTT ACT CCT TGG AGG CC-3´ (reverse)

Der Mastermix für den PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

dNTP 2 mM	5 µl
(0,5 mM dATP	
0,5 mM dCTP	
0,5 mM dGTP	
0,5 mM dTTP	
neutralisiert bei pH 8,0)	
10x PCR-Buffer	5 µl
(100 mM Tris-HCl pH 8,3	
500 mM KCl	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	
0,01% Gelatine)	
Tetra LB	5 µl
Taq Polymerase (Biotherm) 5 unit/µl	0,3 µl
3´-Primer (GADPH) 100 µg/µl	1 µl
5´-Primer (GADPH) 100 µg/µl	1 µl
H <sub>2</sub> O	30,7 µl
<hr/> Gesamtvolumen	<hr/> 48,0 µl

Der Mastermix wurde in dreifacher Menge hergestellt (= 144 µl) und nach Vortexing und Zentrifugieren auf Wassereis gegeben. Jeweils 48 µl wurde in ein PCR-Röhrchen gegeben und 2 µl cDNA zugefügt.

50 µl des benötigten PCR-Ansatzes wurden in das PCR-System (Fa. Perkin Elmer) eingesetzt. Das Programm wurde im Optimum wie folgt eingestellt:

Programmschritt	Temperatur	Zeit	
1	95°C	1 min	Einleitung der Denaturierung
2	95°C	1 min	Denaturierung
3	50°C	1 min	Annealing
(30x)	72°C	1 min	Kettenverlängerung
	95°C	1 min	
4	72°C	10 min	abschließende Kettenverlängerung

#### 2.5.3.2 Überprüfung der cDNA durch Elektrophorese

Die Elektrophorese durch horizontale Agarosegels ist die Standardmethode, um Nucleinsäuren und Fragmente zu separieren, zu identifizieren und zu reinigen. Zur Überprüfung der cDNA wurde Agarose-Gel in 1,5%iger Konzentration (0,75 µg Agarose + 50 ml TBE 0,5x-Puffer) wie unter 2.5.1.6.1 beschrieben hergestellt und mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt und in die vorbereitete Gelkammer gefüllt. 15 µl des PCR-Produktes mit GAPDH wurden in eine Geltasche gegeben. Parallel hierzu wurde eine Geltasche mit 10 µl PCR-Marker gefüllt.

PCR-Marker:

1 µl 100bp DNA-Ladder (Gibco BRL)

1 µl Loading-Buffer LB

1 µl PCR-Puffer (10x)

7 µl DEPC H<sub>2</sub>O

---

10 µl

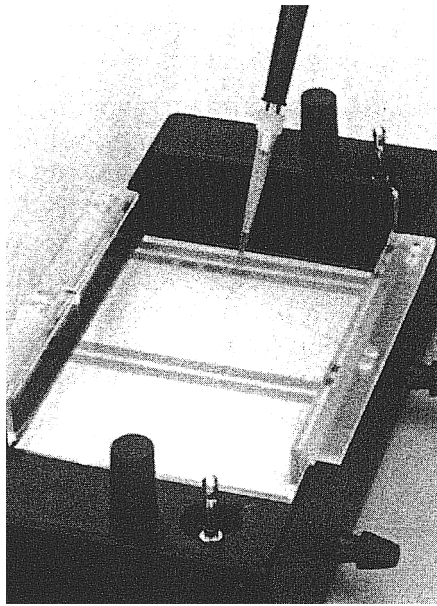


Abbildung 4: Füllung der Geltasche

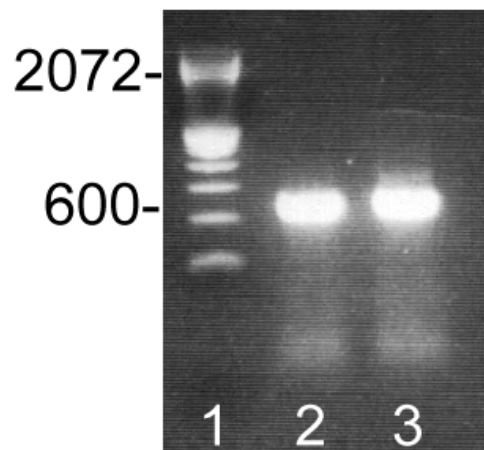


Abbildung 5: cDNA-Überprüfung, Gel 2%ig  
1: 100bp Marker  
2: cDNA + GAPDH Corpus pineale  
3: cDNA + GAPDH Cerebellum

#### 2.5.4 Endothelin-Rezeptor-PCR

#### 2.5.4.1 Primer

Nach der cDNA-Herstellung wurden vier Primer eingesetzt, d. h. jeweils ein Primer für die PCR eines cDNA-Stranges des Endothelin-Rezeptors A und B (ET-A und ET-B SENSE, Acc. Nr. M 60786) sowie des Komplementärstranges (ET-A und ET-B ANTISENSE, Acc. Nr. X 57764) (TERADA et al. 1992). Die Primer wurden von der Fa. Gibco BRL bezogen.

ET-A SENSE            5'-GAG ATC CAC ATT AAG ATG GG-3'

ET-A ANTISENSE    5'-GGA GAT CAA TGA CCA CGT AG-3'

ET-B SENSE            5'-AGC TGG TGC CCT TCA TAC AGA AGG C-3'

ET-B ANTISENSE    5'-TGC ACA CCT TTC CGC AAG CAC G-3'

#### 2.5.4.2 PCR zur Vorbereitung der Sequenzierung des Endothelin-A-Rezeptors

Zur Sequenzierung sollte mindestens 150 µl PCR-Produkt hergestellt werden. Bei Herstellung der Mastermixansätze mußte beachtet werden, dass einer der Ansätze statt cDNA H<sub>2</sub>O enthalten sollte. Der zweite Ansatz sollte als Probe-  
lauf, der dritte als Überschuß dienen.

Mastermix:	
dNTP 2 mM neutralisiert bei pH 8,0 (0,5 mM dATP 0,5 mM dCTP 0,5 mM dGTP 0,5 mM dTTP)	5,0 µl
PCR-Buffer 10 x (100 mM Tris-HCl pH 8,3 500 mM KCl 25 mM MgCl <sub>2</sub> 0,01% Gelatine)	5,0µl
Tetra LB	5,0 µl
Taq Polymerase (Biotherm) 5 unit/µl	0,3 µl
3' Primer (ET-1A) 100 pmol/µl	1,0 µl
5' Primer (ET-1A) 100 pmol/µl	1,0 µl
cDNA	2,0 µl
H <sub>2</sub> O	30,7 µl
<hr/> gesamt	<hr/> 48,0 µl

In jeden der 7 Ansätze – mit Ausnahme des H<sub>2</sub>O-Ansatzes wurde 2 µl cDNA gegeben und der Thermocycler für ET-1A nach folgendem Schema eingestellt.

Programm- schritt	Tempe- ratur	Zeit	
1	95°C	1 min	Einleitung der Denaturierung
2	95°C	1 min	Denaturierung
3	94°C	1 min	Annealing
(35x)	55°C	1,5 min	Kettenverlängerung
	72°C	10 min	
	72°C	10 min	abschließende Kettenverlängerung
6	4°C	unendlich	

#### 2.5.4.3 PCR-Produktanalyse Endothelin-A-Rezeptor

Ethanol-Präzipitation in 1,5 µl Eppendorftuben:

Na-Acetat 3M, pH 5,0	2 µl
Ethanol 95%	50 µl
PCR-Produkt	20 µl

Zentrifugieren, 10 min auf Eis stehen lassen, wiederum 15-30 min zentrifugieren, die Ethanollösung vorsichtig abpipettieren, darauf hin das Pellet wiederum mit 70% Ethanol waschen. Die Ethanollösung – vorheriges Zentrifugieren – vorsichtig abpipettieren und das Pellet trocken lassen.

Das PCR-Produkt wird durch Elektrophorese nach Größe fraktioniert.

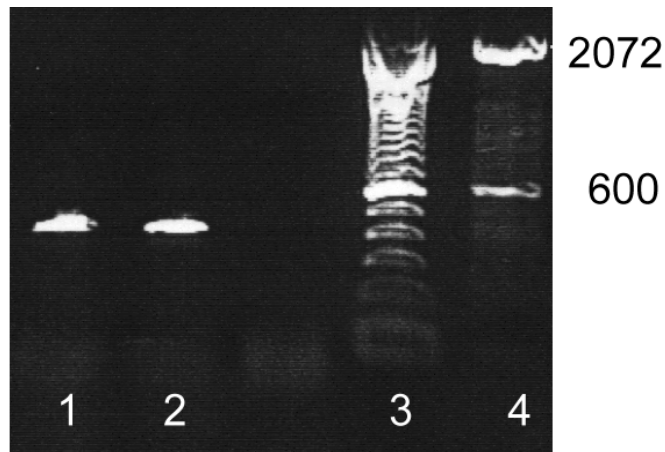


Abbildung 6: PCR Endothelin-Rezeptor A

- 1: ET-A Cerebellum
- 2: ET-A Corpus pineale
- 3: 100 bp Marker mit PCR-Puffer
- 4: 100 bp Marker ohne PCR-Puffer

#### 2.5.4.4 PCR zur Vorbereitung der Sequenzierung des Endothelin-B-Rezeptors

Die PCR zur Sequenzierung des Endothelin-B-Rezeptors erfolgte analog der Vorgehensweise mit dem Endothelin-A-Rezeptor (s. 2.5.4.2) mit dem Unterschied, daß nur 3'- bzw. 5'-Endothelin-B-Primer (Fa. Gibco BRL) eingesetzt wurden und die Zeiten bzw. Temperaturen im Thermocycler geändert wurden:

Programmschritt	Temperatur	Zeit	
1	95°C	1 min	Einleitung der Denaturierung
2	95°C	1 min	Denaturierung
3	60°C	1,5 min	Annealing
(35x)	72°C	1,5 min	Kettenverlängerung
	94°C	1 min	
5	72°C	10 min	abschließende Kettenverlängerung
6	4°C	unendlich	



#### 2.5.4.5 PCR-Produktanalyse Endothelin-B-Rezeptor

Ethanol-Präzipitation in 1,5 µl Eppendorftuben:

Na-Acetat 3M, pH 5,0	2 µl
Ethanol 95%	50 µl
PCR-Produkt	20 µl

Zentrifugieren, 10 min auf Eis stehen lassen, wiederum 15-30 min zentrifugieren, die Ethanollösung vorsichtig abpipettieren, darauf hin das Pellet wiederum mit 70% Ethanol waschen. Die Ethanollösung – vorheriges Zentrifugieren – vorsichtig abpipettieren und das Pellet trocken lassen.

Das PCR-Produkt wird durch Elektrophorese nach Größe fraktioniert.

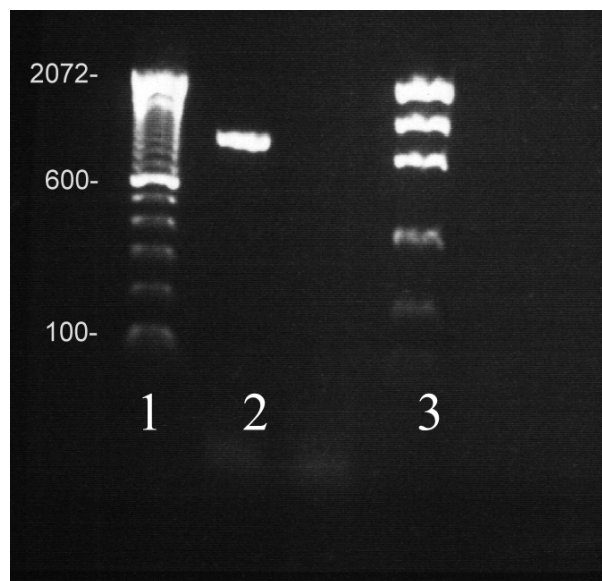


Abbildung 7: PCR Endothelin-Rezeptor B, Corpus pineale

1: 100 bp Marker

2: ET-B, Corpus pineale

3: PCR-Quantitätsmarker („low mass DNA ladder“)

## 2.5.5 Sequenzierung

### 2.5.5.1 DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel

Zur Sequenzierung muss das cDNA-Fragment aus dem Agarose-Gel extrahiert und gesäubert werden. Dazu wurde das Agarose-Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und das entsprechende Stück mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die cDNA-Extraktion erfolgte nach dem Quiaex II Prinzip (Fa. Quiagen).

Das Gelstück wurde gewogen und ein Volumenteil Gel mit drei Volumenteilen des Puffers QX1 (Fa. Qiagen) versetzt. Nach Inkubation der Probe für 10 min bei 50°C wurde einmal mit dem Puffer QX1 und zweimal mit Ethanol gewaschen, dabei jedesmal der Überstand vorsichtig abgegossen. Nach dem Waschen wurde das verbleibende Pellet 10-15 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zur Extraktion der cDNA wurden 20 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) oder Aqua bidest. zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zentrifugation für 30 sec ist die DNA im Überstand enthalten.

### 2.5.5.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem „ABI PRISM Sequencer“ (Fa. Perkin Elmer) mit freundlicher Unterstützung vom Labor Prof. Höppner, Hamburg.

### 2.5.5.2.1 Endothelin-Rezeptor A

#### Vorbereitung zur Sequenzierung:

Terminator Ready Reaction Mix	8,0 µl
(Fa. Perkin Elmer, mit Ampli Taq FS 361405009)	
PCR-Produkt	4,0 µl
Primer: ET-A Sense <u>oder</u> Antisense	3,2 µl
H <sub>2</sub> O	<u>4,8 µl</u>
	20,0 µl

#### Thermocycler-Programmierung:

Programm- schritt	Temperatur	Zeit	
1	96°C	10 sec	Denaturierung
(25x)	50°C	5 sec	Annealing
	60°C	4 min	Kettenverlängerung
2	4°C	unendlich	

### 2.5.5.2.2 Endothelin-B-Rezeptor

#### Vorbereitung zur Sequenzierung:

Terminator Ready Reaction Mix	8,0 µl
PCR-Produkt	5,0 µl
Primer: ET-B Sense <u>oder</u> Antisense	3,2 µl
H <sub>2</sub> O	<u>3,8 µl</u>
	20,0 µl

Thermocycler-Programmierung:

Programm- schritt	Temperatur	Zeit	
1	95°C	2 min	Vorbereitung der Kettenverlängerung
2	94°C	1 min	„
3	58°C	1,5 min	Annealing
(35x)	72°C	1,5 min	Kettenverlängerung
	72°C	10 min	
2	4°C	unendlich	

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Sättigungsexperimente**

##### **3.1.1 Corpus pineale, Ratte**

Als Vorversuche dienten 5 Versuchsansätze aus dem Corpus pineale der Ratte ohne Proteinbestimmung. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Im ersten Vorversuch wurde die Radioligandenkonzentration ausgehend von 2 pmol jeweils bis auf 64 pmol verdoppelt. Der höchste Prozentsatz des Specific binding (93,9%) zeigte sich im Vorversuch 1 bei einer Konzentration von 16 pmol. Daher wurde in den Sättigungsversuchen 7 - 10 mit dieser Konzentration begonnen.

Tabelle 1: Ergebnisse des Bindungsassays  
Corpus pineale der Ratte, 60 Minuten Inkubationszeit, ohne Proteinbestimmung

Versuch Nr.	Experimentelle Messwerte				Errechnete Parameter				
	Radio-ligand (pmol)	Total added (cpm)	Total binding (cpm)	Non-specific binding (cpm)	Specific binding (cpm)	Free (cpm)	Specific binding (pmol)	Bound/free	Specific binding (% von Total binding)
1	2	336,7	36,9	8,4	28,5	308,2	0,044	0,092	77,2
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	1317,0	37,9	6,4	31,6	1285,4	0,049	0,025	83,4
	16	4326,2	577,7	35,1	542,6	3783,6	0,847	0,143	93,9
	32	14348,9	-	89,9	-	-	-	-	-
	64	20580,3	918,1	337,3	580,8	19999,5	0,906	0,029	63,3
2	16	4832,8	-	40,2	-	-	-	-	-
	24	12888,7	383,6	48,0	335,7	12553,0	0,524	0,027	87,5
	32	20809,2	35,4	-	-	-	-	-	-
	48	29426,6	616,4	183,4	433,1	28993,6	0,676	0,015	70,3
	64	41090,2	727,8	343,7	384,1	40706,1	0,599	0,009	52,8
	72	44298,6	453,4	146,9	306,5	43992,1	0,478	0,007	67,6
3	16	15579,0	1260,5	150,9	1109,7	14469,3	1,732	0,077	88,0
	24	25662,6	630,9	572,1	58,8	25603,8	0,092	0,002	9,3
	32	37143,2	2563,8	-	-	-	-	-	-
	48	57781,3	440,3	117,6	322,7	57458,7	0,504	0,006	73,3
	64	-	-	-	-	-	-	-	-
	72	73105,5	642,1	257,2	384,9	72720,6	0,601	0,005	59,9
4	16	14103,7	2144,3	1239,2	905,1	13198,6	1,413	0,069	42,2
	24	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	27692,9	6640,5	3445,6	3194,9	24498,0	4,986	0,130	48,1
	48	42347,5	8233,9	4690,0	3543,9	38803,6	5,531	0,091	43,0
	64	58325,6	8212,3	8019,0	193,3	58132,3	0,302	0,003	2,4
	72	56233,0	11097,1	8198,7	2898,4	53334,6	4,523	0,054	26,1
5	16	13596,3	6359,7	5057,2	1302,5	12293,8	2,033	0,106	20,5
	24	16927,3	12412,0	3321,0	9091,0	7836,3	14,188	1,160	73,2
	32	23882,1	6070,7	4072,7	1998,0	21884,1	3,118	0,091	32,9
	48	40531,6	12101,4	9889,6	2211,9	38319,8	3,452	0,058	18,3
	64	52942,7	15943,8	10919,6	5024,2	47918,6	7,841	0,105	31,5
	72	69392,9	-	7079,2	-	-	-	-	-

### 3.1.2 Corpus pineale, Ratte und Rind

Auch bei der Verwendung von Corpus pineale-Gewebe von Ratte und Rind wurde das höchste Specific binding (95,5%) bei einer Radioligandenkonzentration von 16 pmol erzielt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnisse des Bindungsassays  
Corpus pineale von Ratte und Rind, 60 Minuten Inkubationszeit, ohne Proteinbestimmung

Ver- such Nr.	Experimentelle Messwerte				Errechnete Parameter				
	Radio- ligand (pmol)	Total added (cpm)	Total binding (cpm)	Non- specific binding (cpm)	Specific binding (cpm)	Free (cpm)	Specific binding (pmol)	Bound / free	Specific binding (% von Total binding)
6	16	13990,5	2444,0	110,7	2333,3	11657,2	3,64	0,200	95,5
	24	23202,3	1988,2	453,8	1534,4	21667,9	2,39	0,071	77,2
	32	28369,0	4189,1	549,6	3639,5	24729,6	5,68	0,147	86,9
	48	44258,3	7330,1	858,5	6471,6	37786,7	10,10	0,171	88,3
	64	63589,1	1307,9	576,7	731,2	62857,9	1,14	0,012	55,9
	72	72675,9	1800,6	382,4	1418,2	71257,7	2,21	0,020	78,8

### 3.1.3 Corpus pineale (Ratte), Einzeldarstellungen

Die folgenden Tabellen zeigen die Einzelergebnisse der Sättigungsversuche.

Tabelle 3: Versuch 7, Protein 2,425 µg/10 µl, Inkubation 60 Minuten

Experimentelle Messwerte				Errechnete Parameter					
Radio-ligand (pmol)	Total added (cpm)	Total binding (cpm)	Non-specific binding (cpm)	Specific binding (cpm)	Free (cpm)	Specific binding (pmol)	Spec. (pmol/µg Protein)	Bound / free	Spec. (% Total)
20	5114,9	2798,4	358,7	2439,7	2675,2	3,81	1,57	0,911	87,2
40	11577,3	4404,7	713,0	3691,7	7885,6	5,76	2,38	0,468	83,8
60	15409,9	4948,0	782,9	4165,2	11244,8	6,50	2,68	0,370	84,2
120	30887,2	5616,6	1575,1	4041,6	26845,7	6,31	2,60	0,151	72,0
240	63800,8	8084,6	3049,6	5035,1	58765,7	7,86	3,24	0,086	62,3
360	94706,0	9825,8	6186,8	3639,0	91067,0	5,68	2,34	0,040	37,0

Tabelle 4: Versuch 8, Protein 6,135 µg/ 10µl, Inkubation 60 Minuten

Experimentelle Messwerte				Errechnete Parameter					
Radio-ligand (pmol)	Total added (cpm)	Total binding (cpm)	Non-specific binding (cpm)	Specific binding (cpm)	Free (cpm)	Specific binding (pmol)	Spec. (pmol/µg Protein)	Bound / free	Spec. (% Total)
2	719,6	444,5	128,2	316,4	403,3	0,49	0,08	0,785	71,2
5	17230	1162,6	136,2	1026,4	696,6	1,60	0,26	1,473	88,3
10	3456,5	2172,1	230,4	1941,7	1514,8	3,03	0,49	1,282	89,4
20	7050,3	3978,2	582,7	3395,6	3654,8	5,30	0,86	0,929	85,4
30	10084,7	3902,7	723,9	3178,8	6905,9	4,96	0,81	0,460	81,5
40	13452,4	5505,2	1063,9	4441,3	9011,2	6,93	1,13	0,493	80,7
80	27287,2	3607,5	1721,5	1886,1	25401,2	2,94	0,48	0,074	52,3

Tabelle 5: Versuch 9, Protein 3,4075 µg/ 10 µl, Inkubation 60 Minuten

Experimentelle Messwerte				Errechnete Parameter					
Radio-ligand (pmol)	Total added (cpm)	Total binding (cpm)	Non-specific binding (cpm)	Specific binding (cpm)	Free (cpm)	Specific binding (pmol)	Spec. (pmol/µg Protein)	Bound / free	Spec. (% Total)
2	2130,0	641,5	99,1	542,4	1587,7	0,85	0,25	0,342	84,6
4	3852,4	962,7	114,0	848,7	3003,7	1,32	0,39	0,283	88,2
8	8446,8	2381,5	307,2	2074,3	6372,5	3,24	0,95	0,326	87,1
64	17767,5	-	898,0	-	-	-	-	-	-
128	20734,8	2249,8	651,1	1598,8	19136,0	2,50	0,73	0,084	71,1
256	41080,1	3467,8	1407,0	2060,9	39019,2	3,22	0,94	0,053	59,4



Tabelle 6: Versuch 10, Protein 3,98 µg|10 µl, Inkubation 60 Minuten

Experimentelle Messwerte				Errechnete Parameter					
Radio- ligand (pmol)	Total added (cpm)	Total binding (cpm)	Non- specific binding (cpm)	Specific binding (cpm)	Free (cpm)	Specific binding (pmol)	Spec. (pmol/µg Protein)	Bound / free	Spec. (% Total)
2	1879,4	1130,5	73,8	1056,7	822,7	1,65	0,41	1,284	93,5
4	3729,1	1809,0	169,7	1639,3	2089,8	2,56	0,64	0,784	90,6
8	7664,4	2809,4	268,3	2541,1	5123,3	3,97	1,00	0,496	90,4
16	15811,9	5414,4	703,0	4711,4	11100,5	7,35	1,85	0,424	87,0
32	20457,4	8583,0	848,8	7734,3	12723,1	12,07	3,03	0,608	90,1
64	40512,8	9266,4	1764,8	7501,6	33011,2	11,71	2,94	0,227	81,0
128	82115,8	13433,8	3468,2	9965,7	72150,2	15,55	3,91	0,138	74,2

### 3.1.4 Corpus pineale (Ratte), Berechnung der Dissoziationskonstante und der erwarteten Rezeptordichte

Nach dem Rosenthal-Plot errechnet sich die Dissoziationskonstante  $K_d$  aus dem Verhältnis der Menge gebundener zu freier Rezeptors und dem Specific binding. Wie die folgende Tabelle 7 zeigt, ergibt sich in den vier Versuchen eine große Variationsbreite der ermittelten Dissoziationskonstanten, die zwischen 2,0888 und 14,159 pmol liegen. Gemittelt für alle vier Versuche beträgt die Dissoziationskonstante 6,098 pmol.

In Abhängigkeit von der Menge des zugefügten radioaktiv markierten Endothelin steigt die gemessene Radioaktivität zunächst steil an, bei höheren Konzentrationen ist ein zunehmend flacher Kurvenverlauf zu verzeichnen (Abbildung 8).

Gemäß Rosenthal-Plot ergibt sich bei der graphischen Darstellung der Werte für den Quotienten Specific/Free Binding und dem Specific Binding eine Gerade. Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse die maximalen Bindungen, die der Rezeptordichte entspricht. Es ergeben sich für alle vier Versuche Rezeptordichten zwischen 1,612 und 7,445 pmol/µg Protein. Der Mittelwert aller Versuche beträgt 4,506 pmol/µg Protein (Abbildung 9).

Bei der statistischen Prüfung zeigt der Versuch 10 als einziger einen statistisch signifikanten Zusammenhang des Quotienten aus gebundenem/freien Liganden und dem Specific binding (Tabelle 7) und scheint damit besonders verlässlich. Die Dissoziationskonstante und die errechnete Rezeptormenge stimmen sehr gut mit den Ergebnissen dieses Versuches 10 überein.

Tabelle 7: Berechnung der Dissoziationskonstante  $K_d$  und der Rezeptordichte (= „Schnittpunkt mit der X-Achse“)

Versuch Nr.	Anzahl der Messwerte	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p	Steigung der Geraden	Schnittpunkt mit der Y-Achse	Dissoziationskonstante $K_d$ (pmol)	Schnittpunkt mit der X-Achse (pmol/ $\mu$ g)
7	6	-0,867	0,025*	-0,269	0,940	3,717	3,494
8	7	-0,36	0,430	-0,479	1,067	2,088	2,228
9	5	-0,53	0,360	-0,227	0,366	4,405	1,612
10	7	-0,78	0,039*	-0,222	1,003	4,505	4,518
7-10	25	-0,45	0,025*	-0,164	0,739	6,098	4,506

\* = statistisch signifikant

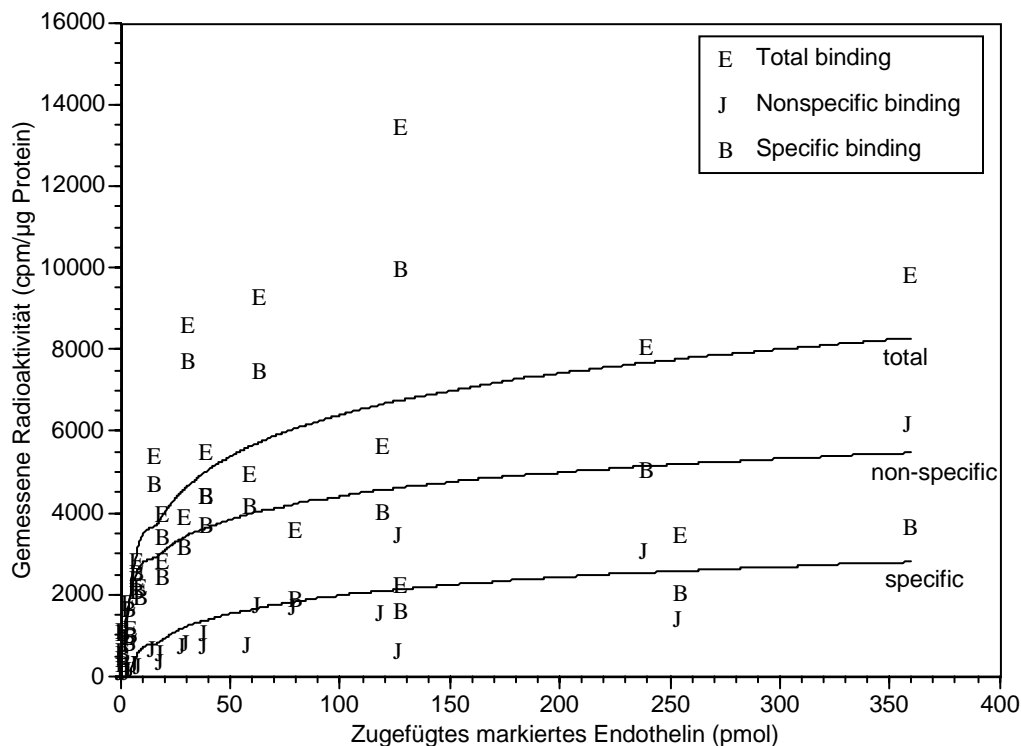


Abbildung 8: Scatchard-Plot der Sättigungsversuche Nr. 7-10

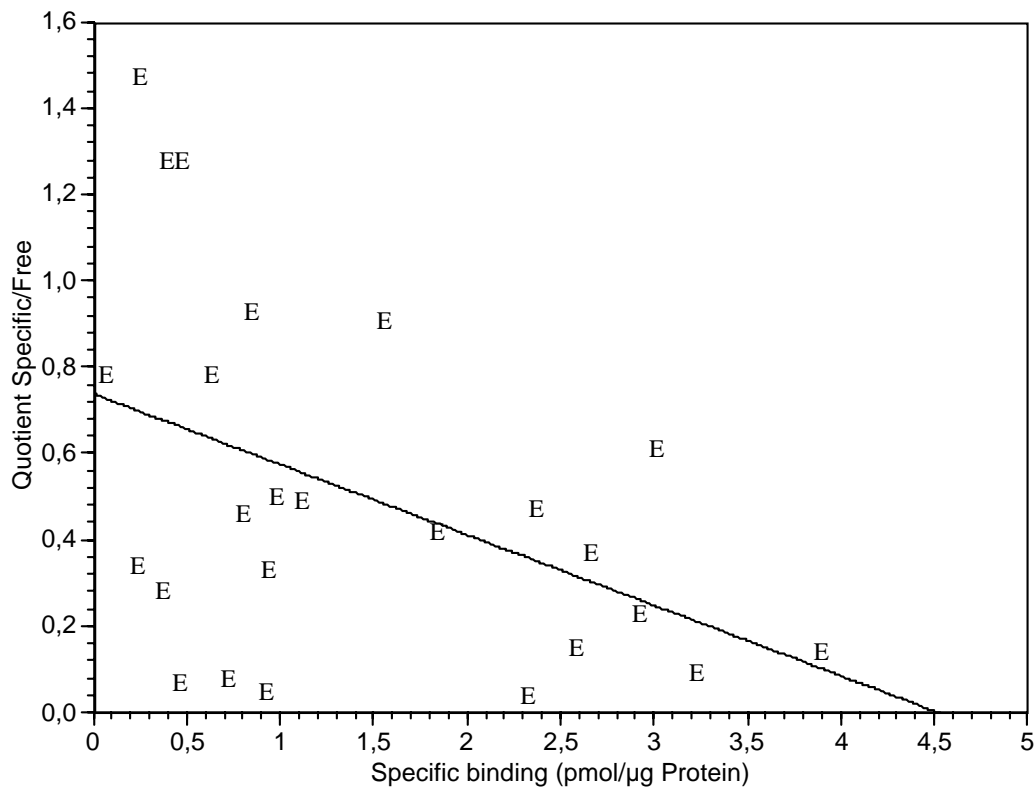


Abbildung 9: Scatchard-Plot der vier Versuche 7 bis 10

### 3.1.5 Cerebellum

Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, erreichte das Specific binding bei den Sättigungsversuchen mit Cerebellumgewebe nur maximal 53,1% bei einer Radioligandenkonzentration von 1680 pmol. Die Dissoziationskonstante  $K_d$  betrug 0,048 pmol und lag folglich deutlich unter derjenigen, die im Corpus pineale ermittelt wurde (6,098pmol). Aus dem Rosenthal-Plot ergab sich mit einer Rezeptordichte von 0,007 pmol/µg ein Wert, der um den Faktor 1.000 niedriger als im Corpus pineale war.

Tabelle 8: Sättigungsversuch Cerebellum, Protein 20 µg/10 µl, Inkubation 60 Minuten

Experimentelle Messwerte				Errechnete Parameter					
Radio-ligand (pmol)	Total added (cpm)	Total binding (cpm)	Non-specific binding (cpm)	Specific binding (cpm)	Free (cpm)	Specific binding (pmol)	Spec. (pmol/µg Protein)	Bound / free	Spec. (% Total)
320	2024,5	2705,2	1395,6	1309,6	714,9	2,04	0,102	1,832	48,4
180	1823,8	1700,8	976,5	724,3	1099,5	1,13	0,057	0,659	42,6
680	1877,6	1823,5	-	-	-	-	-	-	-
1680	1502,6	1839,2	862,4	976,8	525,8	1,52	0,076	1,858	53,1
4680	1230,0	1346,9	1001,0	345,9	884,1	0,54	0,027	0,391	25,7
9680	1128,0	1300,0	809,2	490,8	637,2	0,77	0,038	0,770	37,8

Tabelle 9: Berechnung der Dissoziationskonstante  $K_d$  und der Rezeptordichte im Corpus pineale

Anzahl der Messwerte	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p	Steigung der Geraden	Schnittpunkt mit der Y-Achse	Dissoziationskonstante $K_d$ (pmol)	Schnittpunkt mit der X-Achse (pmol/µg)
5	0,90	0,035	-0,148	20,813	0,048	0,007

### 3.2 Verdrängungsversuche

#### 3.2.1 Cerebellum

Für Cerebellumrezeptoren wurden die in Tabelle 10 dargestellten Ergebnisse dokumentiert.

Tabelle 10: Inhibitionsversuch Cerebellum, Inkubationszeiten 0, 30, 60 Minuten

Zugegebene Menge unmarkiertes Endothelin-1 (Mol)	Total binding (cpm)			Binding in Prozent (100% = Leerwert – Überschußwert)		
	0 Minuten	30 Minuten	60 Minuten	0 Minuten	30 Minuten	60 Minuten
$10^{-10}$	1073,2	21500,2	-	-6,2	106,6	-
$10^{-11}$	1546	2544,8	2732,4	-3,5	7,1	-2,5
$10^{-12}$	3441,6	3973,6	5847,4	7,5	14,6	13,8
$10^{-13}$	14578	11514,8	18343,8	71,6	54,2	78,8
$10^{-14}$	19418,4	22716,2	23497,4	99,5	113,0	105,6
$10^{-15}$	19194,2	21817,6	21442,0	98,2	108,3	94,9
$10^{-16}$	19509,2	22889,6	22454,0	100,0	113,9	100,2
$10^{-17}$	20491,6	21964,6	21928,8	105,7	109,1	97,4
$10^{-18}$	19982,4	22845,0	22453,2	102,7	113,7	100,2
0	19508,4	20235,0	22420,2	100,0	100,0	100,0
Überschuß	2147,8	1192,6	3203,6	0,0	0,0	0

Der Wert für  $10^{-10}$  Mol zugefügtes unmarkiertes Endothelin-1 bei 30 Minuten Inkubation ist vermutlich aufgrund eines Pipettierfehlers ein Ausreißer. Trotz der starken Abweichungen bei 60 Minuten Inkubation ist erkennbar, daß besonders bei geringen Mengen zugesetzten unmarkierten Endothelins erst nach längerer Zeit ein Gleichgewicht erreicht wird. Für die folgenden Verdrängungsversuche wurde daher eine Inkubationszeit von 60 Minuten gewählt.

Der lineare Teil der Inhibitionskurve für Endothelin-1 liegt für die Rezeptoren des Cerebellums zwischen  $10^{-12}$  und  $10^{-14}$  Mol unmarkiertem Endothelin-1. Die Inhibitionskurve ist damit gegenüber den Rezeptoren des Corpus pineale in höhere Bereiche verschoben. Der lineare Anstieg der Inhibitionskurve für En-

dothelin-1 beginnt für die Rezeptoren des Corpus pineale frühestens bei  $10^{-14}$  Mol unmarkiertem Endothelin-1. Im Cerebellum werden etwas höhere Mengen Endothelin-1 benötigt, um das markierte Endothelin-1 aus den Rezeptoren zu verdrängen.

Der Hill Koeffizient nahm zwischen 0 und 30 Minuten Inkubationszeit zu, ebenso der  $IC_{50}$ . Zwischen 30 und 60 Minuten Inkubation waren die Werte dagegen unverändert.

Der Hill Koeffizient war größer als bei Corpus pineale, der  $IC_{50}$  dagegen in der gleichen Größenordnung (s. Tabelle 14).

Tabelle 11: Bestimmung des Hill Koeffizienten ( $\eta_H$ ) und der  $IC_{50}$

Inkubationszeit (Minuten)	Anzahl Meßwerte	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p	Schnittpunkt mit der Y-Achse (%Leerwert/ (100-%vom Leerwert)	Steigung der Geraden (entspricht $\eta_H$ )	$IC_{50}$ (Wert x für Y=0) (Mol)
0	4	-0,89	0,11	-30,31	-2,39	-12,7
30	3	-0,97	0,15	-17,83	-1,37	-13,0
60	3	-0,97	0,15	-17,83	-1,37	-13,0

### 3.2.2 Corpus pineale

#### 3.2.2.1 Endothelin-1

Im Versuch 11 waren die Werte für 0 und  $10^{-11}$  zugesetztes Endothelin-1 kleiner als die Werte für das Nonspecific binding und die Versuchsergebnisse wurden daher nicht weiter ausgewertet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Verdrängungsversuch, Protein 2,356µg /10 µl, 16,7 pmol Tracer, Inkubation 60 Minuten

Exponent der zugesetzten Menge Endothelin-1 (Mol)	Total binding (cpm/µg Protein)	Nonspecific binding (cpm/µg Protein)	Specific binding (cpm/µg Protein)	Specific binding (pmol/µg Protein)	Specific binding (% Total)
10 <sup>-6</sup>	7574,4	2681,2	4893,3	7,636	64,6
10 <sup>-7</sup>	6761,5	2397,7	4363,8	6,810	64,5
10 <sup>-8</sup>	6176,9	2031,5	4145,4	6,469	67,1
10 <sup>-9</sup>	5688,5	2263,8	3424,6	5,344	60,2
10 <sup>-10</sup>	7275,2	2441,9	4833,3	7,543	66,4
10 <sup>-11</sup>	1952,9	2239,1	-	-	-
0	1527,0	1685,9	-	-	-

Die Ergebnisse des Versuches 12 sind in der folgenden Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Verdrängungsversuch 1,915µg Protein/10µl, 16,7 pmol Tracer (16774,7 cpm), Inkubationszeit 60 Minuten,

Exponent der zugesetzten Menge Endothelin-1 (10x Mol)	Total binding (cpm/µg Protein)	Nonspecific binding (cpm/µg Protein)	Specific binding (cpm/µg Protein)	Specific binding (pmol/µg Protein)	Specific binding in % des Wertes ohne unmarkiertes Endothelin	Specific binding (% von Total binding)
10 <sup>-8</sup>	487,2	431,8	55,4	0,086	2,2	11,4
10 <sup>-9</sup>	517,8	450,4	67,4	0,105	2,7	13,0
10 <sup>-10</sup>	868,0	492,2	375,8	0,586	14,9	43,3
10 <sup>-11</sup>	810,3	470,3	340,1	0,531	13,5	42,0
10 <sup>-12</sup>	810,1	402,8	407,2	0,635	16,1	50,3
0	3045,8	440,5	2605,3	4,066	103,1	85,5
0	2973,1	524,8	2448,3	3,821	96,9	82,3

Der Hill Koeffizient liegt bei 1,002 und entspricht damit einer einfachen Bindung (Hill Koeffizient = 1). Die IC<sub>50</sub> liegt bei 10<sup>-12,4</sup> Mol Endothelin-1 (Tabelle 14).

Die errechnete Menge freier Radioliganden beträgt 18,86 pmol (Free = (16774,7 cpm - 4688,5 cpm) \* 0,00156061 = 18,86 pmol).

Die Inhibitionskonstante einer einfache Bindung  $\eta_H = 1$  beträgt 0,0927 pmol ( $K_i = 10^{-12,4} \text{ Mol} / (1 + (18,86 \cdot 10^{-12} \text{ Mol} / 5,725)) = 0,398 \text{ pmol} / (1 + (18,86 \text{ pmol} / 5,725)) = 0,0927 \text{ pmol}$  oder 92,7 fMol).

Für den gemessenen Hill Koeffizienten ist die Inhibitionskonstante mit 0,0926 pmol nahezu identisch ( $K_i = 10^{-12,4} \text{ Mol} / (1,002 + (18,86 \cdot 10^{-12} \text{ Mol} / 5,725)) = 0,398 \text{ pmol} / (1,002 + (18,86 \text{ pmol} / 5,725)) = 0,0926 \text{ pmol}$  oder 92,6 fMol).

Tabelle 14: Bestimmung des Hill Koeffizienten ( $\eta_H$ ) und der  $IC_{50}$

Anzahl Meßwerte	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p	Schnittpunkt mit der Y-Achse (%Leerwert/ (100-%vom Leerwert))	Steigung der Geraden (entspricht $\eta_H$ )	$IC_{50}$ (Wert x für Y=0) (Mol)
6	-0,95	0,0036*	-12,39	-1,002	-12,4

\* = statistisch signifikant

Die Ergebnisse des Versuches 13 sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Verdängungsversuch, Protein ca. 2µg/10µl, 16,7 pmol Tracer, Inkubation 60 Minuten

Exponent der zugeetzten Menge Endothelin-1 (10x Mol)	Total binding (cpm/µg Protein)	Nonspecific binding (cpm/µg Protein)	Specific binding (cpm/µg Protein)	Specific binding (pmol/µg Protein)	Specific binding in % des Wertes ohne unmarkiertes Endothelin	Specific binding (% Total)
$10^{-9}$	488,4	385,3	103,2	0,161	5,2	21,1
$10^{-10}$	697,3	370,8	326,6	0,510	16,3	46,8
$10^{-11}$	191,7	415,5	376,2	0,587	18,8	196,2
$10^{-12}$	842,6	354,2	488,5	0,762	24,4	58,0
$10^{-13}$	747,5	332,4	415,0	0,648	20,7	55,5
$10^{-14}$	1116,4	354,1	762,4	1,190	38,1	68,3
0	2312,8	310,1	2002,7	3,125	100,0	86,6



Aus den ermittelten Werten errechnet sich ein Hill Koeffizient von 0,381 (Tabelle 16); dieser entspricht damit nicht einer einfachen Bindung (Hill Koeffizient = 1). Die  $IC_{50}$  liegt bei  $10^{-15,4}$  Mol Endothelin-1.

Als Menge freier Radioligand wurde 11,00 pmol errechnet (Free = (11051 cpm - 4005,45 cpm) \* 0,00156061 = 11,00 pmol).

Es ergibt sich für eine einfache Bindung eine Inhibitionskonstante von 0,000398 pmol ( $K_i = 10^{-15,4}$  Mol / (1 + (11,00\*  $10^{-12}$  Mol / 5,725)) = 0,000398 pmol / (1 + (11,0 pmol/5,725)) = 0,000136 pmol oder 0,136 fMol, die nicht mit der gemessenen Inhibitionskonstante übereinstimmt ( $K_i = 10^{-15,4}$  Mol / (0,381 + (18,86\*  $10^{-12}$  Mol / 5,725)) = 0,000398 pmol / (0,381 + (11,0 pmol/5,725)) = 0,000172 pmol oder 0,172 fMol).

Tabelle 16: Bestimmung des Hill Koeffizienten ( $\eta_H$ ) und der  $IC_{50}$

Anzahl Meßwerte	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p	Schnittpunkt mit der Y-Achse (%Leerwert/ (100-%vom Leerwert))	Steigung der Geraden (entspricht $\eta_H$ )	$IC_{50}$ (Wert x für Y=0) (Mol)
6	-0,89	0,0171*	-5,88	-0,381	-15,4

\* = statistisch signifikant

Aus den Ergebnisse der Verdrängungsversuche 12 und 13 ergibt sich ein Hill-Koeffizient von 0,758 (Tabelle 17), der damit annähernd im Bereich einer einfachen Bindung (Hill Koeffizient = 1) liegt. Die  $IC_{50}$  liegt bei  $10^{-13,2}$  Mol Endothelin-1.

Der Mittelwert der errechneten Menge freier Radioliganden beträgt 18,86 pmol + 11,00 pmol / 2 = 14,93 pmol.

Die Inhibitionskonstante für eine einfache Bindung wurde mit 0,0175 pmol errechnet ( $K_i = 10^{-13,2}$  Mol / (1 + (14,93\*  $10^{-12}$  Mol / 5,725)) = 0,0631 pmol / (1 + (14,93 pmol / 5,725)) = 0,0175 pmol oder 17,5 fMol) und lag damit nahezu gleich mit der Inhibitionskonstante für gemessene  $\eta_H$  ( $K_i = 10^{-13,2}$  Mol / (0,758 +

$(14,93 \cdot 10^{-12} \text{ Mol} / 5,725) = 0,0631 \text{ pmol} / (0,758 + (14,93 \text{ pmol} / 5,725)) = 0,0187 \text{ pmol}$  oder  $18,7 \text{ fMol}$ .

Tabelle 17: Bestimmung des Hill Koeffizienten ( $\eta_H$ ) und der  $IC_{50}$

Anzahl Meßwerte	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p	Schnittpunkt mit der Y-Achse (%Leerwert/ (100-%vom Leerwert))	Steigung der Geraden (entspricht $\eta_H$ )	$IC_{50}$ (Wert x für Y=0) (Mol)
12	-0,87	0,0002*	-9,98	-0,758	-13,2

\* = statistisch signifikant

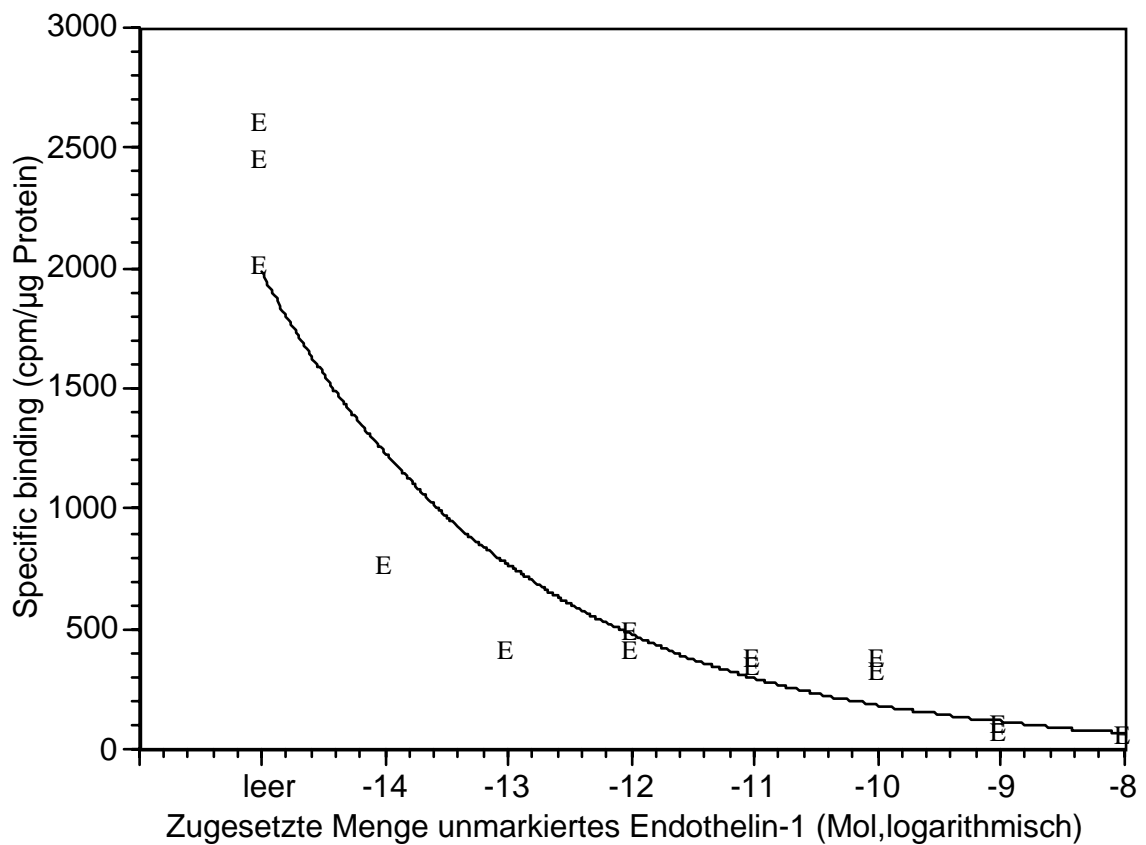


Abbildung 10: Inhibitionskurve für Endothelin-1 (Versuche 12 und 13). Die zugesetzten Mengen Endothelin-1 waren nicht gering genug, um ein Plateau mit dem „Leerwert“ zu erreichen.

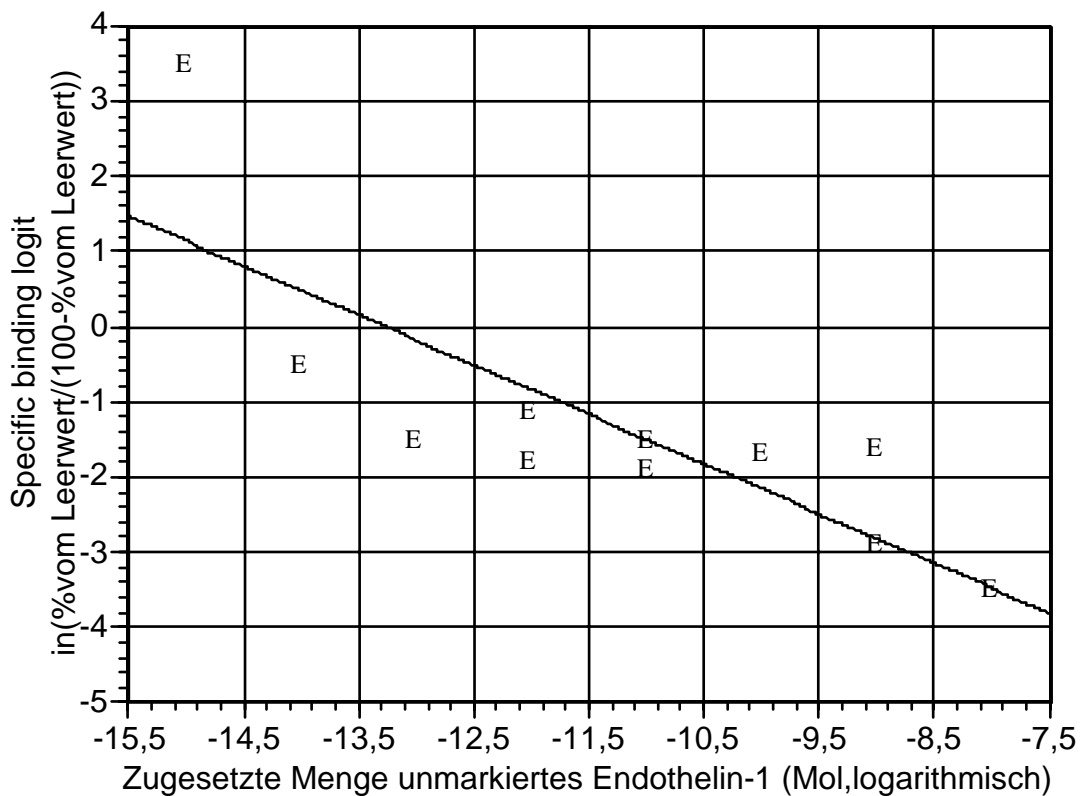


Abbildung 11: Logit-Plot der Versuche 12 und 13. Die  $IC_{50}$  liegt am Schnittpunkt der Linie mit Logit 0.

### 3.2.2.2 Endothelin-3

Bei den Ansätzen mit  $10^5$  und  $10^6$  Mol Endothelin-3 war das Total binding geringer als das Nonspecific binding, diese Werte wurden nicht weiter ausgewertet. Der Wert für Specific binding bei  $10^8$  Mol zugesetztem unmarkiertem Endothelin-3 ist nicht plausibel und wurde in die weitere Auswertung nicht einbezogen (Tabelle 18).

Die Affinität von Endothelin-3 zu den Rezeptoren des Corpus pineale war geringer als die Affinität von Endothelin-1. Bei den Verdrängungsversuchen mit Endothelin-1 wurden bei Zugabe von  $10^9$  Mol unmarkiertem Liganden nur ca.

5% des bei Leerwert erreichten Specific binding gemessen (Versuch 12: 5,2%, Versuch 13: 2,7%). Bei dem Verdrängungsversuch mit Endothelin-3 wurde bei Zugabe von  $10^{-9}$  Mol unmarkiertem Liganden 73,2% des bei Leerwert erreichten Specific binding gemessen. Es kann also eine etwa 15fach geringere Affinität des Endothelin-3 angenommen werden.

Tabelle 18: Verdrängungsversuch, Inkubationszeit 60 Minuten

Exponent der zuge-setzten Menge Endothelin-1 (10x Mol)	Total bin-ding (cpm/ $\mu$ g Protein)	Nonspecific binding (cpm/ $\mu$ g Protein)	Specific binding (cpm/ $\mu$ g Protein)	Specific binding (pmol/ $\mu$ g Protein)	Specific binding in % des Wertes ohne un-markiertes Endothelin	Specific binding (% von Total bin-ding)
$10^{-7}$	314,0	244,5	69,5	0,108	19,3	22,1
$10^{-8}$	312,0	296,0	16,0	0,025	4,4	5,1
$10^{-9}$	523,0	259,5	263,5	0,411	73,2	50,4
0	724,0	364,3	359,8	0,561	100,0	49,7

Der Hill Koeffizient lag bei 1,218 (Tabelle 19) und entsprach damit annähernd einer einfachen Bindung (Hill Koeffizient = 1). Die  $IC_{50}$  lag bei  $10^{-8,2}$  Mol Endothelin-1 und war damit geringer als bei Endothelin-1.

Die errechnete Menge freier Radioliganden beträgt 5,68 pmol (Free = (4358 cpm - 719,5 cpm) \* 0,00156061 = 5,68 pmol). Die Inhibitionskonstante konnte nicht berechnet werden, da die Dissoziationskonstante für Endothelin-3 nicht bekannt ist.

Tabelle 19: Bestimmung des Hill Koeffizienten ( $\eta_H$ ) und der  $IC_{50}$

Anzahl Meß-werte	Korrelations-koeffizient r	Signifikanz-niveau p	Schnittpunkt mit der Y-Achse (%Leerwert/ (100-%vom Leerwert)	Steigung der Geraden (ent-spricht $\eta_H$ )	$IC_{50}$ (Wert x für Y=0) (Mol)
2	-	-	-9,957	-1,218	-8,2

### **3.3 Sequenzierung der Rezeptoren und Vergleich mit einer Konsensussequenz**

Für den Endothelin-Rezeptor A ergab sich für einen 392 Basen langen DNA-Strang eine 100%ige Übereinstimmung mit der aus glatter Gefäßmuskulatur der Ratte isolierter Rezeptorsequenz (LIN et al. 1991A). Innerhalb des Stranges stimmten alle lesbaren Basen mit der Vergleichssequenz überein (Abbildung 12). Abweichungen ergaben sich lediglich bei zwei Basen durch redundante Artefakte, sowie bei 6 Basen durch nicht lesbare Artefakte (Abbildung 12).

Der Komplementärstrang von 366 Basen stimmte mit der Vergleichssequenz (LIN et al. 1991A) ebenfalls zu 100% überein. Es traten auch hier Lesefehler durch Artefakte auf (Abbildung 13).

Der isolierte doppeläufige DNA-Strang von 366 Basen des Endothelin A-Rezeptors im Corpus pineale stimmte mit der Vergleichssequenz von LIN et al. (1991A) bis auf wenige Artefakte überein (Abbildung 14).

Beim Endothelin-Rezeptor B ergab der Vergleich der isolierten Teilsequenz von 324 Basen mit der Sequenz aus der Rattenlunge von SAKURAI et al. (1990) ebenfalls eine 100%ige Übereinstimmung (Abbildung 15). Dies galt auch für den Komplementärstrang der isolierten cDNA des Endothelin B-Rezeptors (Abbildung 16) mit Ausnahme weniger redundanter bzw. sonstiger Artefakte.

Aus der 100%igen Übereinstimmung der vier sequenzierten Teilstücke mit der jeweiligen Vergleichssequenz kann mit Sicherheit auf die Existenz der Endothelin-Rezeptoren A und B im Corpus pineale der Ratte rückgeschlossen werden.

10v	20v	30v	40v	50v
CPR: TATGCTTTCTGGCGTC <u>N</u> TTTTGGCTGGCCCTGGTGGGAGGCGCAATCGCT				
<b>ASE: TTTGCTTTCTGGCGTC<u>C</u>TTTTGGCTGGCCCTGGTGGGAGGCGCAATCGCT</b>				
60v	70v	80v	90v	100v
CPR: GACAATGCTGAGAGATACAGTGCTAATCTAAGCAGCCACGTGGGAGGACTT				
<b>ASE: GACAATGCTGAGAGATACAGTGCTAATCTAAGCAGCCACGTGG<u>-AGGACTT</u></b>				
110v	120v	130v	140v	150v
CPR: CACCCCTTTTCCAGGGACAGAN <u>TTC</u> NACTTTCTGGGCACCACCCTTCNA				
<b>ASE: CACCC<u>-</u>TTTTCCAGGGACAGAG<u>TTC</u>GACTTTCTGGGCACCACCCTTC<u>G</u>A</b>				
160v	170v	180v	190v	200v
CPR: CCCCTAATTTGGCCCTGCCTAGCAATGGCTCAATGCATGGCTATTGTCC				
<b>ASE: CCCCTAATTTGGCCCTGCCTAGCAATGGCTCAATGCATGGCTATTGTCC</b>				
210v	220v	230v	240v	250v
CPR: ACAGCAGACAAAATCACGACGGCTTTCAAATATATCAACACTGTGATAT				
<b>ASE: ACAGCAGACAAAATCACGACGGCTTTCAAATATATCAACACTGTGATAT</b>				
260v	270v	280v	290v	300v
CPR: CCTGTACCATTTTCATCGTGGGAATGGTGGGGAACGCCACTCTCCTAANA				
<b>ASE: CCTGTACCATTTTCATCGTGGGAATGGTGGGGAACGCCACTCTCCTA<u>A</u>GA</b>				
310v	320v	330v	340v	350v
CPR: ATCATTTACCAAACAAGTGTNTGAGGAACGGCCCCAATGCGCTCATAGC				
<b>ASE: ATCATTTACCAAACAAGTGT<u>A</u>TGAGGAACGGCCCCAATGCGCTCATAGC</b>				
360v	370v	380v	390v	
CPR: AGCCTGGCCCTTGAGACCTTATCTACGTGGTCATTGATCTC				
<b>ASE: AGCCTGGCCCTTGAGACCTTATCTACGTGGTCATTGATCTC</b>				

Abbildung 12: Endothelin Receptor A sense

CPR: Corpus pineale Ratte

ASE: Receptor A sense (Basen entsprechen Nr. 1 bis 402 aus LIN et al. (1991A))

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanotin, T = Thymin, N = nicht identifiziert

10v	20v	30v	40v	50v
CPR: CTCNAAGGGCCAGGCTGGCNATGAAGCGCATTGGGGCCGTTCCCTCATACAC				
<b>AAS: CT<u>C</u>CAAGGGCCAGGCTGGCTATGA-GCGCATTGGGGCGCTTCCCTCATACAC</b>				
60v	70v	80v	90v	100v
CPR: TTGTTTTGGTAAATGATTCTTAGGANAGTGGCGTTCCACCATTCCCAC				
<b>AAS: TTGTTTTGGTAAATGATTCTTAGGAGAGTGGCGTTA<u>CC</u>ACCATTCCCAC</b>				
110v	120v	130v	140v	150v
CPR: GATGAAAATGGTACAGGATATCGNNGTGTGGATATATTTGAAAGCCGTCG				
<b>AAS: GATGAAAATGGTACAGGATAT<u>CAC</u>AGTGTGGATATATTTGAAAGCCGTCG</b>				
160v	170v	180v	190v	200v
CPR: TGATTTTTGTCTGCTGTGGCAATAGCCATGCATTGAGCCATTGCTAGGC				
<b>AAS: TGATTTTTGTCTGCTGTGG<u>ACA</u>ATAGCCATGCATTGAGCCATTGCTAGGC</b>				
210v	220v	230v	240v	250v
CPR: <u>NG</u> GGCCAAATTAGGGGGTGAAGGGTGGTGCCANAAAGTCGAACTCTGT				
<b>AAS: <u>AG</u>GGCCAAATTAGGGGGTGAAGGGTGGTGCC<u>AG</u>AAAGTCGAACTCTGT</b>				
260v	270v	280v	290v	300v
CPR: CCCTGGAAAAGGGGTGAAGTCCTCCACGTGGCTGCTTANATTA <u>CA</u> CTGT				
<b>AAS: CCCTGGAAAAGGGGTGAAT<u>GC</u>CTCCACGTGGCTGCTTAG<u>AT</u>TA<u>GC</u>ACTGT</b>				
310v	320v	330v	340v	350v
CPR: <u>NT</u> CTCTCANCATTGTC <u>NG</u> CGATTGCGCCTCCACCAGGGCCAGCCAAAAG				
<b>AAS: <u>AT</u>CTCTCAGCATTGTC<u>AG</u>CGATTGCGCCTCCACCAGGGCCAGCCAAAAG</b>				
360v				
CPR: GACGCCNGAAAGCAAA				
<b>AAS: GACGCC<u>AG</u>AAAGCAAA</b>				

Abbildung 13: Endothelin Receptor A antisense

CPR: Corpus pineale Ratte

ASE: Receptor A antisense, Basen sind komplementär zu Nr. 376 bis 1  
Konsensussequenz aus LIN et al. (1991A)

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanotin, T = Thymin, N = nicht identifiziert

10v	20v	30v	40v	50v
CPR: TATGCTTTCTGGCGTCNTTTTGGCTGGCCCTGGTGGGAGGCGCAATCGCT				
<b>ASE: TTTGCTTTCTGGCGTCCTTTTGGCTGGCCCTGGTGGGAGGCGCAATCGCT</b>				
CPA: AAACGAAAGNCCGCAGGAAAACCGACCGGGACCACCCTCCGCGTTAGCGN				
60v	70v	80v	90v	100v
CPR: GACAATGCTGAGAGATAACAGTGCTAATCTAAGCAGCCACGTGGGAGGACTT				
<b>ASE: GACAATGCTGAGAGATAACAGTGCTAATCTAAGCAGCCACGTGG-AGGACTT</b>				
CPA: CTGTTACNACTCTCTNTGTCAACAATTANATTCTCGGTGCACC-TCCGTAA				
110v	120v	130v	140v	150v
CPR: CACCCCTTTTCCAGGGACAGANTTCTNACTTTCTGGGCACCACCCTTCNA				
<b>ASE: CACCCCTTTTCCAGGGACAGAGTTTCGACTTTCTGGGCACCACCCTTCGA</b>				
CPA: GTGGGG-AAAAGGTCCCTGTCTCAAGCTGAAANACCCGTGGTGGGAAGCT				
160v	170v	180v	190v	200v
CPR: CCCCCTAATTTGGCCCTGCCTAGCAATGGCTCAATGCATGGCTATTGTCC				
<b>ASE: CCCCCTAATTTGGCCCTGCCTAGCAATGGCTCAATGCATGGCTATTGTCC</b>				
CPA: GGGGATTAACCGGNCGGATCGTTACCGAGTTACGTACCGATAACGGG				
210v	220v	230v	240v	250v
CPR: ACAGCAGACAAAAATCACGACGGCTTTCAAATATATCAACACTGTGATAT				
<b>ASE: ACAGCAGACAAAAATCACGACGGCTTTCAAATATATCAACACTGTGATAT</b>				
CPA: TGTCGTCTGTTTTTAGTGCTGCCGAAAGTTTATATAGTTGTGNNCTATA				
260v	270v	280v	290v	300v
CPR: CCTGTACCATTTTCATCGTGGGAATGGTGGGGAACGCCACTCTCCTAANA				
<b>ASE: CCTGTACCATTTTCATCGTGGGAATGGTGGGGAACGCCACTCTCCTAAGA</b>				
CPA: GGACATGGTAAAGTAGCACCCCTTACCACCCATTGCGGTGANAGGATTCT				
310v	320v	330v	340v	350v
CPR: ATCATTTACCAAACAAGTGTNTGAGGAACGGCCCCAATGCGCT-CATAGC				
<b>ASE: ATCATTTACCAAACAAGTGTATGAGGAACGGCCCCAATGCGCT-CATAGC</b>				
CPA: TAGTAAATGGTTTTGTTACATACTCCTTCGGGGGGTTACGCGAAGTNCGG				
360v				
CPR: AGCCTGGCCCTTGGAG				
<b>ASE: AGCCTGGCCCTTGGAG</b>				
CPA: TCGGACCGGGAANTC				

Abbildung 14: Endothelin Receptor A sense und antisense

CPR: sense, CPA: antisense, ASE: Receptor A sense (Basen entsprechen Nr. 1-366 aus LIN et al. (1991A))

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanosin, T = Thymin, N = nicht identifiziert



10v	20v	30v	40v	50v
CPR: TTGANTCTATGTGCTCTAANTATTGACANATATCNAGCTGTTGCTTGGAN				
<b>BSE: TTGAGTCTATGTGCTCTAAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTGGAG</b>				
60v	70v	80v	90v	100v
CPR: TCNAATTAAAGGAATTGGGGTTCCAAAATGGACAGCAGTAGAGGGNNGT				
<b>BSE: TCGAATTAAAGGAATTGGGGTTCCAAAATGGACAGCAGTAGAAATTGTT</b>				
110v	120v	130v	140v	150v
CPR: NTTAATTTGGGTGGTCTCTGTGGTTCTGGNNNTCCCTGAACCCATAGGTTT				
<b>BSE: -TTAATTTGGGTGGTCTCTGTGGTTCTGGCTGTCCCTGAAGCCATAGGTTT</b>				
160v	170v	180v	190v	200v
CPR: TTGATGTGATTACNTCNGACTACAAAGGAAAGCCCCTAAGGGTCTGCATA				
<b>BSE: TTGATGTGATTACGTCGGACTACAAAGGAAAGCCCCTAAGGGTCTGCATA</b>				
210v	220v	230v	240v	250v
CPR: TGCTTAATCCCTTTCANAAAACAGCTTTCATGCANTTTTACAANACANCC				
<b>BSE: TGCTTAATCCCTTTCAGAAAACAGCCTTTCATGCAGTTTTTACAAGACAGCC</b>				
260v	270v	280v	290v	300v
CPR: AAAA <u>ACTGGTGGCTGTT</u> CANTTTCTACTTCTGCTTGCCGCTAGCCATCAC				
<b>BSE: AAAGACTGGTGGCTGTT</b> CAGTTTCTACTTCTGCTTGCCGCTAGCCATCAC				
310v	320v			
CPR: GCGATCTTTTACACCCTAATGACCT				
<b>BSE: GCGATCTTTTACACCCTAATGACCT</b>				

Abbildung 15: Endothelin Receptor B sense

CPR: Corpus pineale Ratte

ASE: Receptor B sense, Basen entsprechen Nr. 1-330 der Konsensussequenz aus SAKURAI et al. (1990)

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanosen, T = Thymin, N = nicht identifiziert

10v	20v	30v	40v	50v
CPR: TTTTCCGTTTGGGTTTTTGCAAAGGTTTCATTTTGTTTTAATGCTATCTGT				
BAS: TTTTCCGTTTGGGTTTG-GCAAAGGTTTCATTTTGTTTTAATGCTATCTGT				
60v	70v	80v	90v	100v
CPR: CCACGATGAGGACAATGAGATTCAGTGAGTGTTTCCTTCCTTCAAGATGAG				
BAS: CCACGATGAGGACAATGAGATTCAGTGAGTGTTTCCTTCCTTCAAGATGAG				
110v	120v	130v	140v	150v
CPR: CTGTATTTATTGCTGGAGCGGAAGTTGTCGTATCCGTGATCGTTAGCTTT				
BAS: CTGTATTTATTGCTGGAGCGGAAGTTGTCGTATCCGTGAGCGTTAGCTTT				
160v	170v	180v	190v	200v
CPR: GAACCTCAAGCAGGATTGCTTCTCCTCTAAGGACTGTTTTCTCAACG				
BAS: GAACCTCAAGCAGGATTGCTTCTCCTCTAAGGACTGTTTTCTCAACG				
210v	220v	230v	240v	250v
CPR: TTTGGCACCAGCAGCACAAACACG-ACTTAAAGCAGTTTTTGAATCTCTTG				
BAS: TTTGCCACCAGCA-CACAAACACGGACTTAAAGCAGTTTTTGAATCTCTTG				
260v	270v	280v	290v	300v
CPR: CTCACCAAATACAGAGCGATTGGATTAATGCAGGAATTCAAAGAAGCCAT				
BAS: CTCACCAAATACAGAGCGATTGGATTAATGCAGGAATTCAAAGAAGCCAT				
310v	320v	330v	340v	350v
CPR: GTTGATACCAATGTNGTCCAAAACCAGCAAAAACTCNGAANTTCACACC				
BAS: GTTGATACCAATGTAGTCCAAAACCAGCAAAAACTCAGAAGTTCACACC				
360v	370v	380v		
CPR: TCTGANGATTGCTCTGGTCATAAAGGGTGAG				
BAS: TCTGAGGATTGCTCTGGTCATAAAGGGTGAG				

Abbildung 16: Endothelin Receptor B antisense

CPR: Corpus pineale Ratte

ASE: Receptor B antisense, Basen sind komplementär zu den Basen Nr. 1 bis 383 aus SAKURAI et al. (1990)

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanotin, T = Thymin, N = nicht identifiziert

## 4 Diskussion

Da das Corpus pineale sehr stark durchblutet ist und viele vasoaktive Substanzen produziert, liegt die Vermutung nahe, daß es eine wesentliche Funktion bei der Regulierung der Hirndurchblutung ausübt. Hieran könnten Endotheline beteiligt sein, die bereits im Gehirn, den Epithelkörperchen, der Leber, der Schilddrüse, der Nebenniere, den Gonaden, dem Uterus und in anderen Geweben nachgewiesen wurden (INOUE et al. 1989; BLOCH et al. 1989A; BLOCH et al. 1989B; DIAMANTIS et al. 1998).

Indirekt wurde Endothelin-1 kürzlich auch im Corpus pineale der Ratte nachgewiesen (GARRIDO und ISRAEL 1999). Es wird vermutet, daß der Phosphoinositid-Turnover, der durch Endothelin-Rezeptoren aktiviert wird, in die biologische Aktivität Endothelin-verwandter Peptide involviert ist. Es wurde gezeigt, daß Endothelin den Phosphoinositid-Turnover in peripheren Geweben (ARAKI et al. 1989), in Neuronen (LIN et al. 1991B), in kultivierten Gliazellen, Kleinhirnzellen und Astrozyten (MARSAULT et al. 1990), in der Nebennierenrinde (WOODCOCK et al. 1990) und in Hirnstrukturen wie dem subfornicalen Organ und der Eminentia mediana (GARRIDO und ISRAEL 1994) stimuliert. GARRIDO und ISRAEL (1999) wiesen im Corpus pineale eine dosisabhängige Anregung des Phosphoinositid-Turnovers durch Endothelin-1 nach, die von der Anwesenheit extrazellulärer Kalzium-Ionen abhängig war. Sie zogen den Schluß, es müsse im Corpus pineale der Ratte funktionelle Endothelin-Rezeptoren geben.

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, solche Rezeptoren nachzuweisen. Hierzu wurden zunächst Sättigungsexperimente durchgeführt. Als Methode wählten wir einen direkten Radioliganden-Assay, da mit seiner Hilfe einerseits die Assoziation und Dissoziation von Rezeptor-Liganden-Komplexen an Gewebehomogenisaten festgestellt werden kann. Andererseits können Rezeptoren auf diese Weise auch ohne eine meßbare biologische Antwort bestimmt werden (McGONIGLE und MOLINOFF 1989). Als Radioligand wurde <sup>125</sup>J eingesetzt, da dieses Jodisotop eine hohe spezifische Aktivität und große

Affinität aufweist (BYLUND und YAMAMURA 1990). In Vorversuchen wurde zunächst eine geeignete Ausgangskonzentration für den Radioliganden bestimmt, in den Hauptversuchen dann eine steigende Zahl von Radioliganden zugefügt. Die Zahl der gebundenen Radioliganden wurde als Funktion der Radioligandenkonzentration grafisch in der Form von Rosenthal-Plots dargestellt.

Nach BYLUND und YAMAMURA (1990) ist eine spezifische Bindung von 50% gerade noch ausreichend, um einen Rezeptor nachzuweisen; ab 70% spricht man von einer guten, ab 90% von einer exzellenten Affinität. In jedem der hier durchgeführten Einzelversuche am Corpus pineale der Ratte wurde mindestens ein Specific Binding von 70% erzielt. In zwei von fünf Versuchen (Nr. 8 und 9) wurden knapp 90%, in Versuch 10 sogar bis zu 93,5% der eingesetzten Radioliganden gebunden. Die hier erhobenen Resultate belegen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei der bindenden Struktur um einen Endothelin-Rezeptor handeln muß.

Bei der graphischen Darstellung aller Ergebnisse in Form des Rosenthal-Plots zeigte sich eine typische Sättigungskinetik, bei der der Anteil spezifisch gebundener Rezeptoren mit zunehmender Radioligandenkonzentration zunächst steil ansteigt, um im weiteren Verlauf gegen einen Grenzwert abzuflachen, d. h. eine Sättigung zu erreichen (LYSKO und NAMBI 1993).

Aus den Ergebnissen der Bindungsassays wurden die Dissoziationskonstanten  $K_d$  errechnet. In der graphischen Darstellung entspricht  $K_d$  dem Punkt, an dem gerade die Hälfte aller möglichen Bindungsstellen ( $B_{max}$ ) von den zugegebenen Radioliganden besetzt ist. In den Einzelversuchen zeigte sich eine hohe Variationsbreite der Dissoziationskonstanten. Dies könnte methodisch bedingt sein. Erstens ist für die Ermittlung der  $K_d$  eine Trennung gebundener und freier Liganden unabdingbar. Da der Radioliganden-Rezeptor-Komplex aber rasch dissoziiert, kann die Anzahl freier und gebundener Liganden in Abhängigkeit von der Schnelligkeit des Auftrennens variieren. Dies ist im vorliegenden Versuch jedoch unwahrscheinlich, da die Auftrennung unverzüglich erfolgte. Zweitens hängt die Größe der  $K_d$  auch mit dem Anteil unspezifisch gebundener Liganden zusammen, der beispielsweise durch Anhaften am Filter oder durch das Auswaschen mit Pufferlösung schwanken kann (BYLUND und YAMAMURA 1990).

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte erwiesen sich die Ergebnisse des Versuches 10 als besonders verlässlich, da sie sehr gut mit dem Mittelwert aller Einzelversuche übereinstimmte. Mit einem Wert von 6,098 pmol fiel die  $K_d$  im Corpus pineale der Ratte sehr viel höher aus als im Cerebellum (0,048 pmol). Die anhand der Rosenthal-Plots errechnete maximale Bindungsfähigkeit, die der Rezeptordichte im untersuchten Gewebe entspricht, lag im Corpus pineale entsprechend etwa 1000 mal höher als im Cerebellum (Corpus pineale: 6,367 pmol/ $\mu$ g), Cerebellum: 0,0076,367 pmol/ $\mu$ g). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, daß im Corpus pineale eine sehr hohe Dichte an Endothelin-Rezeptoren vorhanden ist und folglich eine Beteiligung dieser stark vasoaktiven Peptide an der Durchblutung dieses Organs sehr wahrscheinlich ist. Da für die vorliegende Untersuchung das Corpus pineale in toto eingesetzt wurde, lassen die Ergebnisse keinen Rückschluß darauf zu, ob sich die Endothelin-Rezeptoren in vivo an den Pinealozyten oder an Gefäßzellen befinden. Es sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, aus welcher Quelle das Endothelin in vivo stammt. Zum einen könnte Endothelin von den Pinealozyten selbst gebildet werden. Zum anderen könnte es aber auch im Rahmen einer parakrinen Kommunikation von den Gefäßzellen an die Pinealozyten abgegeben werden und als Signalgeber das Corpus pineale zur Freisetzung vasoaktiver Substanzen stimulieren. In diesem Zusammenhang hat die Gruppe OLCESE nachgewiesen, daß Endothelin keinen Einfluß auf die Melatoninfreisetzung hat (OLCESE und MARONDE 1999).

Erste Schritte zur Aufklärung der oben genannten Fragen wurden kürzlich unternommen. Es wurde nachgewiesen, daß Endothelin im Corpus pineale die Phospholipase-Aktivität stimuliert (GARRIDO und ISRAEL 1999). Da dieser Vorgang kalziumabhängig ist, wurde die Hypothese aufgestellt, der Endothelin-Rezeptor sei direkt mit dem Plasmamembran-Kalziumkanal gekoppelt. Der Endothelin-Rezeptor stimuliert vermutlich die Aktivierung einer Phospholipase C sowohl direkt als auch indirekt über eine Öffnung der Kalziumkanäle (GARRIDO und ISRAEL 1999). Die Endothelin-1-Antwort konnte durch die Gegenwart des organischen Kalziumantagonisten Amlodipin im Corpus pineale der Ratte (GARRIDO und ISRAEL 1999), in der Aorta des Kaninchens (OHLSTEIN et al. 1989), im Mesenterium der Ratte (WALLHOFER et al. 1989), in granulierten Cerebellumzellen (LIN et al. 1991B) sowie in der Eminentia me-

diana und dem subfornicalen Organ (GARRIDO und ISRAEL 1994) nicht gehemmt werden, wohl aber durch Nicardipin in glatten Muskelzellen (XUAN et al. 1989). Daher ist es denkbar, daß in den einzelnen Organen und Zelltypen unterschiedliche Mechanismen existieren (GARRIDO und ISRAEL 1999).

Auskunft über die Affinität einer Substanz zu ihrem Rezeptor können Verdrängungsexperimente geben. Im Fall des Endothelins ist bekannt, daß Endothelin-1 und -2 sehr potent sind, <sup>125</sup>J-markiertes Endothelin-1 von seinen Rezeptoren zu verdrängen (GLEASON et al. 1991; YUE et al. 1991). In der vorliegenden Untersuchung konnte mittels markiertem Endothelin-1 eine entsprechende Inhibitionskinetik nachgewiesen werden, d. h. mit zunehmender Menge an unmarkiertem Endothelin-1 nahm die spezifische Bindung von markiertem Endothelin ab und strebte gegen einen Grenzwert. Der Hill Koeffizient aus zwei Verdrängungsversuchen (Nr. 12 und 13) lag mit 0,758 näherungsweise im Bereich einer einfachen Bindung.

Bei vergleichbaren Versuchen mit markiertem Endothelin-3 zeigte sich im Corpus pineale eine geringere Affinität zum Rezeptor in einem geringeren Specific binding gegenüber unmarkiertem Endothelin-1, das nur 73,2% des Leerwerts erreichte. Folglich verhielt sich Endothelin-3 ähnlich wie in Verdrängungsversuchen mit granulierten Cerebellum-Zellen; auch hier besaß Endothelin-3 eine geringere Fähigkeit, <sup>125</sup>J-markiertes Endothelin-1 zu verdrängen (WILLIAMS et al. 1991).

Eine Ursache für die abweichende Verdrängungskinetik der Endotheline kann die Existenz verschiedener Rezeptor-Subtypen im Corpus pineale sein. Bisher wurden die Endothelin-Rezeptoren A und B nachgewiesen. ET-A ist spezifisch für Endothelin-1, während ET-B alle drei Endotheline bindet. Beide Rezeptoren wurden bisher in glatter Muskulatur, dem Gehirn und der Lunge aufgefunden (ARAI et al. 1990; SAKURAI et al. 1990; VANE et al. 1995).

Neben dem Nachweis der Rezeptor-Subtypen über Sättigungs- und Verdrängungsexperimente mit Agonisten bzw. Antagonisten (s. S. 12ff) ist es möglich, mittels Polymerase-Kettenreaktion eine Sequenzierung der vermutlichen Rezeptoren durchzuführen und die gefundenen mit bereits bekannten Sequenzen zu vergleichen.

In der vorliegenden Untersuchung war es erstmals möglich, die im Corpus pineale der Ratte gefundenen Endothelin-Rezeptoren als ET-A und ET-B zu identifizieren. Der hier aus der Epiphyse isolierte ET-A stimmte in einem 392 Basen langen DNA-Teilstück mit einer Sequenz aus der glatten Gefäßmuskulatur der Ratte überein, die von LIN et al. (1991A) publiziert wurde. Auch der Komplementärstrang war zu 100% identisch, und alle drei Stränge (Vergleichssequenz, ET-A sense und antisense) zeigten in einem 366 Basen langen Abschnitt eine vollständige Übereinstimmung.

Der Endothelin-Rezeptor B deckte in einer Teilsequenz von 324 Basen die entsprechende Sequenz in der Rattenlunge (SAKURAI et al. 1990) und auch in Gegenrichtung betrug die Übereinstimmung bei einem 390 Basenpaar langen Segment 100%. Da keine Überlappung beider Teilstücke vorlag, konnte kein Vergleich aller drei Stränge erfolgen.

Im Corpus pineale der Ratte sind folglich beide Endothelin-Rezeptor-Subtypen A und B vorhanden. In Zusammenhang mit den bekannten biologischen Funktionen der Zirbeldrüse bei der Adaptation an den Tag-Nacht-Rhythmus sind weitere Versuche wünschenswert, um aufzuklären, welche Rolle die Endotheline innerhalb dieser Funktionskreise spielen, weiterhin nach welchem genauen Modus die Endotheline an der Blutdruckregulierung des Corpus pineale oder der übrigen Gehirns beteiligt sind.

## 5 Zusammenfassung

Endotheline sind als stark vasoaktive Peptide bekannt, die bei der Regulierung der Durchblutung eine wesentliche Rolle spielen. Ein möglicher Einfluß der Endotheline auf die Durchblutung des Corpus pineale, welches nach der Niere das am besten durchblutete Organ des Organismus darstellt und das maßgeblich an der Adaptation an den Tag-Nacht-Rhythmus beteiligt ist, wurde bislang nicht untersucht.

In der vorliegenden Untersuchung wurde durch Sättigungsexperimente mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem Endothelin-1 nachgewiesen, daß im Corpus pineale der Ratte Endothelin-Rezeptoren vorhanden sind, und diese teilweise eine spezifische Bindung von etwa 90% der Radioliganden besaßen. Im Corpus pineale fiel die Dissoziationskonstante  $K_d$  mit 6,098 pmol deutlich höher aus als im Cerebellum (0,048 pmol). Die errechnete Rezeptordichte war in der Epiphyse (6,3676,367 pmol/ $\mu\text{g}$ ) etwa 1000mal höher als im Cerebellum (0,0076,367 pmol/ $\mu\text{g}$ ).

In Verdrängungsversuchen nahm mit zunehmender Menge unmarkierten Endothelins die Menge an spezifisch gebundenem,  $^{125}\text{J}$ -markiertem Endothelin-1 gegen einen Grenzwert ab; der Hill Koeffizient lag mit 0,758 annähernd im Bereich einer einfachen Bindung. Dagegen zeigten die Versuche mit markiertem Endothelin-3 eine geringere Affinität zum Rezeptor.

Die Sequenzierung der isolierten cDNA ergab folgende Übereinstimmungen mit Vergleichssequenzen bereits identifizierter Endothelin-Rezeptoren aus anderen Organen/Geweben der Ratte:



Rezeptor	DNA-Strang	Übereinstimmende Basenpaare	Vergleichssequenz	
			Organ/Gewebe	Autoren
ET-A	sense	392	glatte Muskulatur	LIN et al. (1991A)
	antisense	366		
	sense/ antisense	366		
ET-B	sense	324	Lunge	SAKURAI et al. (1990)
	antisense	370		

Folglich konnte die Existenz der Endothelin-Rezeptoren A und B im Corpus pineale der Ratte zweifelsfrei nachgewiesen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- ALCOLADO, J. C. (1986): Calcification in the human choroid plexus, meningiomas and pineal gland. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12: 235-250.
- ARAI, H., HORI, S., ARAMORI, I., OHKUBI, H., NAKANISHI, S. (1990): Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin endothelin receptor. *Nature* 348: 703-732.
- ARAKI, S. I., KAWAHARA, Y., KARIYA, K. I., SUNAKI, M., FUKUZAKI, H., TAKAI, Y. (1989): Stimulation of phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphoinositides by endothelin in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 1072-1079.
- ARAMORI, I., NIREI, H., SHOUBO, M., SOGABE, K., NAKAMURA, K., KOJO, H., NOTSU, Y., ONO, T., NAKANISHI, S. (1993): Subtype selectivity of a novel endothelin antagonist, FR 139317, for the two endothelin receptors in transfected Chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.* 43: 127-131.
- ASSAL, A. A., GESSNER, G., JARVIS, M. F. (1997): [125J]BQ3020, a novel endothelin agonist selective for the endothelin B receptor subtype. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 1: 23-26.
- ASTLES, P. C., BROWN, T. J., HALLEY, F., HANDSCOMBE, C. M., HARRIS, N. V., MAJID, T. N., MCCARTHY, C., McLAY, I. M., MORLEY, A., PORTER, B., ROACH, A. G., SARGENT, C., SMITH, C., WALSH, R. J. (2000): Selective ET(A) antagonists. 5. Discovery and structure-activity relationships of phenoxyphenylacetic acid derivatives. *J. Med. Chem.* 43: 900-910.
- BELLONI, A. S., ROSSI, G. P., ANDREIS, P. G., NERI, G., ALBERTIN, G., PESSINA, A. C., NUSSDORFER, G. G. (1996): Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. *Hypertension* 27: 1153-1159.

- BLOCH, K. D., EDDY, R. L., SHOWS, T. B., QUERTERMOUS, T. (1989A):  
cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J. Biol. Chem.* 264: 18156-18161.
- BLOCH, K. D., FRIEDRICH, S. P., LEE, M. E., EDDY, R. L., SHOWS, T. B.,  
QUERTERMOUS, T. (1989B): Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J. Biol. Chem.* 264: 10851-10857.
- BOIVIN, D. B. (1998): Resetting of circadian melatonin and cortisol rhythms in humans by ordinary room light. *Neuroreport* 9: 779-782.
- BOUSSO-MITTLER, D., GALRON, R., SOKOLOWSKY, M. (1991): Endothelin/sarafotoxin receptor heterogeneity: Evidence for different glycosylation in receptors from different tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 921-926.
- BRADFORD (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BREU, V., LÖFFLER, B. M., CLOZEL, M. (1993): In vitro characterization of RO 46-2005, a novel synthetic non-peptide endothelin antagonist of ETA and ETB receptors. *FEBS Lett.* 334: 210-214.
- BYLUND, D. B., YAMAMURA, H. I. (1990). Methods for receptor binding. In: H. O. YAMAMURA (Hrsg.): *Methods in neurotransmitter receptor analysis*. Raven Press, New York: 1-25
- CHIN, M. H., CIOFFI, C. L., GARAY, M., NNEALE, R. F., SHETTY, S. S., DELGRANDE, D., MUGRAGE, B., SILLS, M. A., LIPSON, K. E. (1996): The unusual binding properties of the endothelin receptor antagonist CGS 27830 distinguishes receptor/agonist interactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276: 74-83.

- CLOZEL, M., BREU, V., GRAY, G. A., KALINA, B., LÖFFLER, B.-M., BURRI, K., CASSAL, J.-M., HIRTH, G., MÜLLER, M., NEIDHART, W., RAMUZ, H. (1994): Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 270: 228-235.
- DIAMANTIS, I., VAN DE CASTELLE, M., HURNI, B., REICHEN, J. (1998): Detection of endothelin-1 and its receptors in rat liver endothelial cells by *in situ* reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Hepatol.* 28: 157-160.
- DOHERTY, A. M., CODY, W. L., DEPUE, P. L., HE, J. X., WAITE, L. A., LEONARD, D. M., LEITZ, N. L., DUDLEY, D. T., RAPUNDALO, S. T., HINGORANI, G. P. (1993B): Structure-activity relationships of C-terminal endothelin hexapeptide antagonists. *J. Med. Chem.* 36: 2585-2594.
- DOHERTY, A. M., CODY, W. L., HE, J. X., DEPUE, P. L., CHENG, X.-M., WELCH, K. M., FLYNN, M. A., REYNOLDS, E. E., LaDOUCEUR, D. M., DAVIS, L. S., KEISER, J. A., HALEEN, J. J. (1993A): *In vitro* and *in vivo* studies with a series of hexapeptide endothelin antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22: 98-102.
- EAKIN, R. E. (1973): *The third eye*. University of California Press, Berkeley.
- EMORI, T., HIRATA, Y., OHTA, K., SHICHIRI, M., MARUMO, F. (1989): Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 93-100.
- GARRIDO, M. D. R., ISRAEL, A. (1999): Endothelin-1 stimulates phosphoinositide hydrolysis in the rat pineal gland. *Arch. Physiol. Biochem.* 107: 138-143.
- GARRIDO, M. R., ISRAEL, A. (1994): Endothelin-3 stimulates phosphoinositide hydrolysis in the subfornical organ and median eminence of the rat brain. *Brain Res. Bull.* 33: 683-688.

- GILLER, T., BREU, V., VALDENNAIRE, O., CLOZEL, M. (1997): Absence of ET(B)-mediated contraction in Piebald-lethal mice. *Life Sci.* 61: 255-263.
- GILLESPIE, M. N., OWASOYO, J. O., McMURTRY, I. F., O'BRIEN, R. F. (1986): Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236: 339-343.
- GLEASON, H.-L., WU, T.-L., YUE, G., FEUERSTEIN, G., NAMBI, P. (1991): Comparison of endothelin binding and calcium mobilization in C6-BU-1 rat glioma and N18TG2 mouse neuroblastoma cells. *Neuropeptides* 19: 197-201.
- HAGIWATA, H., NAGASAWA, T., YAMAMOTO, T., LODHI, K. M., ITO, T., TAKEMURA, N., HIROSE, S. (1993): Immunochemical characterization and localization of endothelin ETB receptor. *Am. J. Physiol.* 264: 777-783.
- HAYZER, D. J., ROSE, P. M., LYNCH, J. S., WEBB, M. L., KIENZLE, B. K., LIU, E. C., BOGOSIAN, E. A., BRINSON, E., RUNGE, M. S. (1992): Cloning and expression of a human endothelin receptor: Subtype A. *Am. J. Med. Sci.* 304: 231-238.
- HICKEY, K. A., RUBANYI, G., PAUL, R. J., HIGHSMITH, R. F. (1985): Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 248: 550-556.
- IHARA, M., NOGUCHI, K., SAEKI, T., FUKURODA, T., TSUCHIDA, S., KIMURA, S., FUKAMI, T., ISHIKAWA, K., NISHIKIBE, M., YANO, M. (1992): Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET-A receptor. *Life Sci.* 50: 247-255.
- INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KAUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K., MASAKI, T. (1989): The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 2863-2867.

- ISHIKAWA, K., IHARA, M., NOGUCHI, K., MASE, T., MINO, N., SAEKI, T., FUKURODA, T., FUKAMI, T., OZAKI, S., NAGASE, T., NISHIKIBE, M., YANO, M. (1994): Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 4892-4896.
- ITOH, S., SASAKI, T., IDE, K., ISHIKAWA, K., NISHIKIBE, M., YANO, M. (1993): A novel endothelin ETA receptor antagonist, BQ-485, and its preventive effect on experimental cerebral vasospasm in dogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 969-975.
- KARAKI, H., MITSUI-SAITO, M., TAKIMOTO, M., ODA, K., OZAKI, T., KUNIEDA, T. (1996): Lack of endothelin ETB receptor binding and function in the rat with a mutant ETB receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 139-142.
- KUNIEDA, T., KUMAGAI, T., TSUJI, T., OZAKI, T., KARAKI, H., IKADAI, H. (1996): A mutation in endothelin-B receptor gene causes myenteric ganglionosis and coat color spotting in rats. *DNA Res.* 3: 101-105.
- LeBARON, R. (1972): *Hormones, a delicate balance*. Pegasus, New York.
- LIN, H. Y., KAJI, E. H., WINKEL, G. K., IVES, H. E., LODISH, H. F. (1991A): Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3185-3189.
- LIN, W. W., LEE, C. Y., CHUANG, D. M. (1991B): Endothelin and sarafotoxin-induced phosphoinositide hydrolysis in cultured cerebellar granule cells: Biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 1053-1061.
- LYSKO, P. G., NAMBI, P. (1993): Endothelin receptors in neural systems. *Meth. Neurosci.* 11: 186-198.

- MACCHIA, M., BARONTINI, S., CECCARELLI, F., GALOPPINI, C., GIUSTI, L., HAMDAN, M., LUCACCHINI, A., MARTINELLI, A., MANCHINI, E., MAZZONI, M. R., REVOLTELLA, R. P., ROMAGNOLI, F., ROVERO, P. (1998): Toward the rational development of peptidomimetic analogs of the C-terminal endothelin hexapeptide: Development of a theoretical model. *Farmacologia* 53: 545-556.
- MARSAULT, T., VIGNE, P., BREITTMAYER, J. P., FRELIN, C. (1990): Astrocytes are target cells for endothelins and sarafotoxins. *J. Neurochem.* 54: 2142-2144.
- MASAKI, T., VANE, J. R., VANHOUTTE, P. M. (1994): International union of pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol. Rev.* 4: 137-142.
- MAZZOCCHI, G., MALENDOWICZ, L. K., NUSSDORFER, G. G. (1990): Endothelin-1 acutely stimulates the secretory activity of rat zona glomerulosa cells. *Peptides* 11: 763-765.
- McEWAN, P. E., VALDENNAIRE, P., SUTHERLAND, L., WEBB, D. J., GRAY, G. A. (1998): A nonradioactive method for localization of endothelin receptor mRNA in situ. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31: 443-446.
- McGONIGLE, P., MOLINOFF, P. B. (1989). Quantitative aspects of drug-receptor interactions. In: G. J. SIEGEL (Hrsg.): *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects*. Raven Press, New York: 183-195
- MESS, B. (1985): *The pineal gland*. Pecs, Ungarn.
- MORTON, A. J., DAVENPORT, A. P. (1992): Cerebellar neurons and glia respond differentially to endothelins and sarafotoxin S6b. *Brain Res.* 581: 299-306.
- NAMBI, P., PULLEN, M., SPIELMAN, W. (1994): Species differences in the binding characteristics of [125I]IRL-1620, a potent agonist specific for endothelin-B-receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 202-207.

- NAMBI, P., WU, H., YE, D., GAGNON, A., ELSHOUBAGY, N. (2000): Characterization of a novel porcine endothelin (B) receptor splice variant. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 247-253.
- NAYLER, W. G. (1990): *The endothelins*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- NEWTON, C. R., GRAHAM, A. (1994): *PCR*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford.
- OHLSTEIN, E. H., HOROHONICH, S., HAY, D. W. P. (1989): Cellular mechanisms of endothelin in rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 548-555.
- OHLSTEIN, E. H., NAMBI, P., DOUGLAS, S. A., EDWARDS, R. M., GELLAI, M., LAGO, A., LEBER, J. D., COUSINS, R. D., GAO, A., FRAZEE, J. S., PEISHOFF, C. E., BEAN, J. W., EGGLESTON, D. S., ELSHOUBAGY, N. A., KUMAR, C., LEE, J. A., YUE, T.-L., LOUDEN, C., BROOKS, D. P., WEINSTOCK, F., FUERSTEIN, G., POSTE, G., RUFFOLO, R. R., GLEASON, J. G., ELLIOT, J. D. (1994): SB 209670, a rationally designed potent nonpeptide endothelin receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8052-8056.
- OKAZAKI, T., SHARMA, H. S., McCUNE, S. K., TIBBOEL, D. (1998): Pulmonary vascular balance in congenital diaphragmatic hernia: Enhanced endothelin-1 gene expression as a possible cause of pulmonary vasoconstriction. *J. Pediatr. Surg.* 33: 81-84.
- OLCESE, J., MARONDE, E. (1999). Species heterogeneity in pineal signal transduction mechanisms. In: (Hrsg.): *Pineal Update*. PJD Publications, Westbury/New York: 161-171
- OLCESE, J., McARDLE, C., MIKKELSEN, J., HANNIBAL, J. (1996): PACAP and type 1 PACAP receptors in the pineal gland. *Ann. New York Acad. Sci.* 805: 595-600.



- PICARD, P., SMITH, P. J., MONGE, J. C., ROULEAU, J. L., NGUYEN, Q. T., CALDERONE, A., STEWART, D. J. (1998B): Coordinated upregulation of the cardiac endothelin system in a rat model of heart failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31: 294-297.
- PICARD, P., SMITH, P. J., MONGE, J. C., STEWART, D. J. (1998A): Expression of endothelial factors after arterial injury in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31: 323-327.
- ROUBERT, P., GILLARD-ROUBERT, V., POUMARIN, L., CORNET, S., GUILMARD, C., PLAS, P., PIROTZKY, E., CHABRIER, P. E., BRAQUET, P. (1994): Endothelin receptor subtypes A und B are up-regulated in an experimental model of acute renal failure. *Mol. Pharmacol.* 45: 182-188.
- RUBANYI, G. M., POLOKOFF, M. A. (1994): Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 46: 325-415.
- SAKAI, S., MIYAUCHI, T., KOBAYASHI, T., YAMAGUCHI, I., GOTO, K., SUGISHITA, Y. (1998): Altered expression of isoforms of myosin heavy chain mRNA in the failing rat heart ist ameliorated by chronic treatment with an endothelin receptor antagonist. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31: 302-305.
- SAKURAI, T., YANAGISAWA, M., TAKUWA, 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.
- SCHVARTZ, I., ITTOOP, O., HAZUM, E. (1991): Direct evidence for multiple endothelin receptors. *Biochemistry* 30: 5325-5327.

- SHIGEMATSU, T., MIURA, S., HIROKAWA, M., HOKARI, R., HIGUCHI, H., WATANABE, N., TSUZUKI, Y., KIMURA, H., TADA, S., NAKATSUMI, R. C., SAITO, H., ISHII, H. (1998): Induction of endothelin-1 synthesis by IL-2 and its modulation of rat intestinal epithelial cell growth. *Am. J. Physiol.* 275: 556-563.
- SHIMUZU, T., KURODA, T., IKEDA, M., HATA, S., FUJIMOTO, M. (1998): Potential contribution of endothelin to renal abnormalities in glycerol-induced acute renal failure in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 977-983.
- SHRAGA-LEVINE, Z., GALRON, R., SOKOLOVSKY, M. (1994): Cyclic GMP formation in rat cerebellar slices is stimulated by endothelins via nitric oxide formation and by sarafotoxins via formation of carbon monoxide. *Biochemistry* 33: 14656-14659.
- SHRAGA-LEVINE, Z., SOKOLOVSKY, M. (1998): Functional role for glycosylated subtypes of rat endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 495-500.
- SOKOLOVSKY, M., AMBAR, I., GALRON, R. (1992): A novel subtype of endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* 267: 20551-20554.
- STOJILKOVIC, S., S.CATT, K. H. (1995): Novel aspects of GnRH-induced intracellular signalling and secretion in pituitary gonadotropins. *J. Neuroendocrinol.* 7: 739-757.
- TAKEDA, M., IWASAKI, S., HELLINGS, S. E., YOSHIDA, H., HOMMA, T., KON, V. (1994): Divergent expression of EtA and EtB receptors in response to cyclosporine in mesangial cells. *Am. J. Path.* 144: 473-479.
- TERADA, Y., TOMITA, K., NONOGUCHI, H., MARUMO, F. (1992): Different localization of two types of endothelin receptor mRNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Invest.* 90: 107-112.
- VAN COEVORDEN, A. (1991): Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men. *Am J. Physiol.* 280: 651-653.

- VANE, J. R., BORN, G. V. R., WELZEL, D. (1995): The endothelial cell in health and disease. Verlag Schattauer, Stuttgart-New York.
- WALLHOFER, A., WEIR, S., RUEGG, U., CAUVIN, C. (1989): The mechanism of action of endothelin-1 as compared with other agonists in vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13: 23-31.
- WANG, X., DOUGLAS, S. A., LOUDEN, C., VICKERY-CLARK, L. M., FEUERSTEIN, G. Z., OHLSTEIN, E. H. (1996): Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat. *Circ. Res.* 78: 322-328.
- WARNER, T., DE NUCCI, G., VANE, G. R. (1988): Release of EDRF by endothelin in the rat isolated perfused mesentery. *Brit. J. Pharmacol.* 95: 723-726.
- WARNER, T. D., BATTISTINI, B., DOHERTY, A. M., CORDER, R. (1994): Endothelin receptor antagonists: Actions and rationale for their development. *Biochem. Pharmacol.* 48: 625-635.
- WILLIAMS, D. L., JONES, K. L., PETTIBONE, D. J., LIS, E. V., CLINESCHMIDT, B. V. (1991): Sarafotoxin S6c: An agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 556-561.
- WOODCOCK, E. A., LITTLE, P. J., TANNER, J. K. (1990): Inositol phosphate release and steroidogenesis in rat adrenal glomerulosa cells. Comparison of the effects of endothelin, angiotensin II and vasopressin. *Biochem. J.* 241: 791-796.
- XUAN, Y. T., WHORTON, A. R., WATKINS, W. D. (1989): Inhibition by nicaldipine on endothelin-mediated inositol phosphate formation and Ca<sup>++</sup> mobilization in smooth muscle cell. *Biochem. Biophys. Commun.* 160: 758-764.

- YANAGISAWA, 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.
- YUE, T.-L., NAMBI, P., WU, H.-L., FEUERSTEIN, G. (1991): Endothelin receptor binding and cellular signal transduction in neurohybrid NG108-15 cells. *Neuroscience* 44: 215-219.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. F. A. Leidenderger danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die das Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung bietet.

Herrn PD Dr. J. Olcese danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die sehr gute Betreuung meiner Dissertation.

Im Laufe der Zeit habe ich zu vielen Mitarbeitern des IHF Kontakt gewonnen und bin von ihnen bei meiner Arbeit immer nach Kräften unterstützt worden. Besonders möchte ich mich für die Unterstützung bei Frau Annemarie Samalekos, Dr. rer. nat. G. Salinas, Dr. rer. nat. R. Telgmann und Dr. rer. nat. R. Bathgate bedanken.

## **Lebenslauf**

Name: Ulrike Fittschen  
Wohnort: Meyermannweg 11, 22529 Hamburg  
Geburtsdatum, -ort: 27. November 1960, Hamburg

### Schulbildung:

1967-1971 Grundschule Winsen  
1971-1980 Gymnasium Winsen

### Studium der Rechtswissenschaft:

1981-1983 Universität Hamburg

### Studium der Medizin:

1983-1990 Universität Lübeck/Universität Hamburg

### Ärztin im Praktikum:

1990-1991 Kreiskrankenhaus Buchholz, AK Barmbeck, Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin

### Assistenzärztin:

1991-1992 AK Bergedorf, Hamburg,  
Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin  
1992-2000 Heidekreisklinikum Soltau,  
Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin  
2000- Krankenhaus Elim,  
Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin

### Dissertation:

1996-2001 Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der  
Universität Hamburg