

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. J. Schrader

**Inotrope Wirkungen bei β -adrenerger Stimulation
und antiadrenerger Effekt von ACh in
endothelial NO-Synthase defizienten Mäuseherzen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Heinicke

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Schrader

Korreferent: PD Dr. rer. nat. L. Klotz

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Schrader für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit.
Seine Unterstützung und Geduld sowie das gute Arbeitsklima im Labor haben diese Arbeit ermöglicht.

Herrn PD Dr. L. Klotz danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke. Nur durch seine freundschaftliche Unterstützung entstand diese Arbeit.

Auch allen anderen Kollegen des Instituts möchte ich nochmals für die stetige Hilfsbereitschaft danken

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Einführung	3
1.2	NO und Herzfunktion	4
1.3	NO und kontraktile Funktion	5
1.4	Basale Herzfunktion	5
1.5	β -adrenerge Stimulation	6
1.6	NO als Mediator der parasympathischen Hemmung der sympathischen Inotropie-Steigerung	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Mäuse	10
2.2	Expressionsanalyse	10
2.3	Das nach Langendorff isoliert perfundierte Mäuseherz	11
2.4	Organentnahme und Präparation von Mäuseherzen für funktionelle Untersuchungen	13
2.5	Messtechnik und Instrumentierung des Mäuseherzen	13
2.6	Druckkonstante Perfusionsanordnung	14
2.7	Volumenkonstante Perfusionsanordnung	15
2.8	Messung der antiadrenergen Wirkungen von ACh und Adenosin	15
2.9	Messung der cAMP- und cGMP-Spiegel	15
2.10	Verwendete Chemikalien	16
3	Ergebnisse	17
3.1	Expressionsanalyse der eNOS in Mäusekardiomyozyten	17
3.2	Auslegung der Versuchsanordnung für Mäuseherzen	18
3.3	Stabilität isolierter Mäuseherzen	20

3.4	Dosis-Wirkungskurven für Katecholamine	22
3.5	Frequenz- und Inotropieverhalten unter Dobutamin bei druckkonstanter Perfusion	22
3.6	Kontraktilitätsverhalten unter Dobutamin an elektrisch stimulierten Herzen bei druckkonstanter Perfusion	25
3.7	Kontraktilitätsverhalten bei akuter Hemmung der eNOS mit L-NMMA	27
3.8	Inotrope Stimulierbarkeit durch Ca^{2+}	29
3.9	cAMP/cGMP-Verhältnis unter β -adrenerger Stimulation	31
3.10	Kontraktilitätsverhalten unter β -adrenerger Stimulation nach Inhibition der cGMP-induzierten PDE II	31
3.11	Antiadrenerge Wirkungen von ACh und Adenosin bei β -adrenerger Stimulation	32
4	Diskussion	36
5	Literaturnachweis	43
6	Zusammenfassung	48
7	Lebenslauf	49
8	Veröffentlichungen	50

1 Einleitung

1.1 Einführung

Stickstoffmonoxid (NO), dessen Wirkung in Blutgefäßen bereits 1980 entdeckt wurde (Furchgott et al., 1980), ist ein gasförmiger Transmitter welcher von drei NO-Synthase- Isoenzymen in einer Vielzahl von Zelltypen synthetisiert wird. Eine Beteiligung von NO an unterschiedlichen Prozessen wie Kreislaufregulation, Herzfunktion, Immunabwehr, Knochenmetabolismus, Stoffwechselfunktionen, Blutgerinnung, Angiogenese und Signalübertragung im zentralen und peripheren Nervensystem gilt inzwischen als gesichert (Tab.1). Aufgrund dieser Vielschichtigkeit stellt die Erforschung der NO-Wirkungen und insbesondere die Untersuchung der Funktion einzelner NO-Synthase-Isoformen eine wesentliche Herausforderung dar.

Tab.1: Expressionsmuster der NO-Synthase-Isoformen

nNOS (TypI)	„konstitutiv“	bi- und multipolare Interneurone im ZNS, NANC-Nerven, TypII Skelettmuskelfasern, Macula densa, u.a.
iNOS (TypII)	induzierbar (Cytokine, LPS, cAMP)	Makrophagen, glatte Muskelzellen, Kardiomyozyten, Endothelzellen, Hepatozyten, Gliazellen, Chondrozyten u.a.
eNOS (TypIII)	„konstitutiv“	Endothelzellen, Kardiomyozyten, Pyramidenzellen (Hippocampus, Cortex), Bronchialepithel, u.a.

Übersicht über die Expression einzelner NO-Synthase-Isoformen. Entgegen der ursprünglichen Nomenklatur ist die Expression der beiden konstitutiven NOS-Isoformen nicht auf neuronale oder endotheliale Zellen beschränkt.

1.2 NO und Herzfunktion

Im Herzen werden alle NOS-Isoformen exprimiert. Dabei geht die Mehrzahl der Arbeiten davon aus, dass die eNOS von überwiegender Bedeutung am Herzen ist. Immunhistochemisch konnte der Nachweis einer Expression dieser Isoform im endokardialen Endothel sowie im Endothel der epikardialen Koronararterien bis hin zu den Kapillaren nachgewiesen werden (Belhassen et al., 1996, Balligand et al., 1996). Allerdings variiert das Ausmaß der Expression stark innerhalb des Herzens mit dem höchsten Expressionsniveau in den Koronararterien und dem endokardialen Endothel. Darüber hinaus zeigen einige neuere Arbeiten, dass die endotheliale NO-Synthase auch in Kardiomyozyten der Ratte und des Menschen exprimiert werden kann (Seki et al., 1996; Wie et al., 1996). Weiterhin gelang der Nachweis der eNOS in den spezialisierten Kardiomyozyten des Sinus- und AV- Knotens (Han et al., 1996). Gut charakterisiert ist die Bedeutung der eNOS für die Regulation der Koronardurchblutung. NO ist an der Einstellung des basalen Koronarflusses beteiligt (Kelm et al., 1990) und wird darüber hinaus in Antwort auf Agonisten wie Acetylcholin (ACh), Bradykinin, Thrombin, ATP u.a. vermehrt vom Endothel freigesetzt. Entsprechend der Expression in Kardiomyozyten wird aber auch vermehrt die Rolle der eNOS bei der Modulation der Kontraktionskraft diskutiert.

Die nNOS wird in kardialen Nerven sowie in den spezialisierten Zellen des Erregungsfortleitungssystems exprimiert (Hassall et al., 1992). Quantitativ ist diese Isoform jedoch deutlich geringer exprimiert als die eNOS. Untersuchungen an isolierten Herzen und in Kokultorexperimenten von Kardiomyozyten und peripheren kardialen Neuronen ergaben, dass NO, das im Bereich der Nervenendigungen freigesetzt wird, die Freisetzung von Katecholaminen bei elektrischer Sympathikusstimulation steigert bzw. deren Rückbindung hemmt (Horackova et al., 1995). Die nNOS scheint daher bei der sympathischen Erregung von Kardiomyozyten eine modulatorische Rolle zu spielen.

Die iNOS wird unter normalen Bedingungen nicht oder nur in sehr geringem Umfang im Myokard exprimiert. Eine Vielzahl experimenteller Studien ergab aber, dass Cytokine wie IL-1 β und TNF- α die iNOS-Expression in Kardiomyozyten induzieren können (Finkel et al., 1992; Brady et al., 1992). Unter Bedingungen erhöhter lokaler oder zirkulierender Cytokin-Spiegel kann demnach eine gesteigerte NO-Synthese durch Induktion der iNOS erfolgen. Bei der Transplantatabstoßung gilt

eine Heraufregulation der kardialen iNOS-Expression als gesichert und Untersuchungen an iNOS-defizienten Mäusen belegen eine kausale Rolle der iNOS-Induktion bei der Abstoßung transplanteder Herzen (Kibbe et al., 1999).

1.3 NO und kontraktile Funktion

Eine Vielzahl von Untersuchungen der letzten Jahre weist darauf hin, dass NO die kontraktile Funktion des Herzens moduliert. Das Interesse für die kardialen NO-Wirkungen wird vor allem durch die häufige Beobachtung stimuliert, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz verschiedener Genese eine Stimulation der iNOS- oder eNOS-Expression im Myokard nachgewiesen wurde. Dies wirft die interessante Frage auf, ob eine gesteigerte myokardiale NO-Freisetzung die Entwicklung einer Herzinsuffizienz auslösen kann.

1.4 Basale Herzfunktion

Erste Hinweise auf die Modulation der kontraktilen Funktion des Herzens durch NO kamen von Smith et al. (1991). Am Papillarmuskel des Frettchens zeigten diese Autoren, dass eine Stimulation der NO-Freisetzung mit Substanz P zu einer beschleunigten Relaxation des Myokards führte. Als Folge der gesteigerten Relaxation kam es in isolierten Herzen zu einer geringgradigen Einschränkung des entwickelten linksventrikulären Druckes (-10 mmHg). Ähnliche Befunde wurden später am Meerschweinchenherzen bestätigt (Grocott-Mason et al., 1994). In Kokultorexperimenten von Kardiomyozyten mit Endothelzellen führte die Stimulation der endothelialen NO-Freisetzung mit Bradykinin zu einer Abnahme der Verkürzungsamplitude der Kardiomyozyten, ein Effekt, der einer negativ inotropen Wirkung entspricht (Brady et al., 1992).

Im Gegensatz zu Befunden einer negativ inotropen Wirkung führte eine Hemmung von endogener NO-Freisetzung an isolierten Kardiomyozyten der Ratte zu keiner Veränderung der Verkürzungsamplitude. Ebenso konnte gezeigt werden, dass physiologische NO-Konzentrationen keinen negativ inotropen Effekt auf die basale Druckentwicklung bewirkten (Weyrich et al., 1994). Untersuchungen am isolierten Meerschweinchenherzen mit authentischem NO führten erst bei Gabe hoher Dosen von NO zu einer Einschränkung der Druckentwicklung, die mit einer Reduktion des kardialen Energiestatus einher ging (Wyeth et al., 1996). Weiter wurde eine negativ inotrope

Wirkung hoher NO-Konzentrationen von mehreren Gruppen nachgewiesen. (Mohan et al., 1995; Kojda et al., 1996; Kelm et al., 1997).

Im Gegensatz zu den Befunden, dass die endogene NO-Freisetzung die basale Kontraktionskraft des Herzens nicht oder eher negativ beeinflusst, gibt es auch Hinweise auf eine positiv inotrope Wirkung von NO am Myokard. So führten niedrige Konzentrationen des NO-Donators SIN-1 zu einer Steigerung des Ca^{2+} -Einstroms über die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle ($I_{\text{Ca-L}}$) in Kardiomyozyten des humanen Atriums und Ventrikelmyokardzellen des Froschs (Kirstein et al., 1995), (Mery et al., 1993). Höhere NO Konzentrationen reduzierten konsistent den $I_{\text{Ca-L}}$. Eine Steigerung des $I_{\text{Ca-L}}$ könnte sich am intakten Herzen in einer positiv inotropen Wirkung niederschlagen. Tatsächlich zeigen einige Arbeiten einen positiv inotropen Effekt endogenen NO's bzw. geringer Konzentrationen exogener NO-Donatoren (Mohan et al., 1995), (Kojda et al., 1996). Interessanterweise weist eine neue klinische Studie eine positiv inotrope Wirkung endogenen NO's nur bei gesunden Probanden nach. Bei Patienten mit Kardiomyopathie war kein Effekt einer NOS-Hemmung auf kontraktile Parameter nachweisbar (Cotton et al., 2001).

Diese Übersicht zeigt, dass hinsichtlich der Wirkung von NO auf die kontraktile Funktion z.T. widersprüchliche Ergebnisse publiziert wurden. Erschwert wird die Interpretation der Daten dadurch, dass teilweise die endogene NO-Freisetzung, teilweise der Effekt von NO-Donatoren auf die Kontraktionskraft des Herzens studiert wurde. Dabei fand eine Vielzahl von Modellsystemen Anwendung, die vom isolierten Kardiomyozyten bis zum gesunden und insuffizienten humanen Herzen in situ reichten.

1.5 b-adrenerge Stimulation

Während die Datenlage für die basale Herzfunktion heterogen ist, weist die Mehrzahl der Arbeiten auf einen negativ-inotropen Effekt der endogenen NO-Freisetzung bei β -adrenerger Stimulation hin. Erste Hinweise auf einen negativen Feedback-Mechanismus durch eine autokrine NO-Freisetzung wurden an Kardiomyozyten der Ratte erhoben. Balligand et al. (1993) zeigten, dass NOS-Hemmung die inotrope und chronotrope Antwort von Kardiomyozyten der Ratte auf Gabe von Isoproterenol potenzierte. Diese Befunde wurden darauf an isolierten Vorhöfen der Ratte und des menschlichen Herzens bestätigt (Sterin-Borda et al., 1995). NOS-Hemmung steigerte nicht nur die

Antwort auf exogen applizierte Katecholamine (Keaney et al., 1996), sondern steigerte auch die Kontraktilität bei elektrischer Reizung des linken Ganglion stellatum des Hundes (Takita et al., 1998), so dass auch die endogene Katecholamin-Stimulation des Herzens einer negativen Kontrolle durch NO unterworfen ist.

Über welche Mechanismen wird eine NO-Ausschüttung bei β -adrenerger Stimulation gesteigert und welche nachgeschalteten Wege hemmen die Kraftentwicklung im Kardiomyozyten? Die Aktivierung der eNOS in Kardiomyozyten könnte durch eine gesteigerte mittlere Ca^{2+} -Konzentration erfolgen, die sich infolge der β -adrenergen Stimulation in den Kardiomyozyten einstellt. So wurde auch die negative Kraft-Frequenz-Beziehung elektrisch stimulierter Papillarmuskel auf eine Aktivierung der eNOS in Kardiomyozyten auf eine Steigerung der mittleren Ca^{2+} -Konzentration zurückgeführt (Finkel et al., 1995). Ein weiterer Mechanismus könnte aber auch in einer direkten Kopplung β -adrenerger Stimulation an den NO/cGMP-Signaltransduktionsweg liegen. So wurde an Muskelpräparaten aus humanem Myokard gezeigt, dass Stimulation myokardialer β_3 -Rezeptoren im Gegensatz zu β_1 - und β_2 - Rezeptoren einen negativ inotropen Effekt ausübte (Kohout et al., 2001). Dieser Effekt war auf Aktivierung der eNOS in Kardiomyozyten zurückzuführen. Neuere Befunde bestätigen, dass diesem Mechanismus eine wesentliche Rolle bei der Induktion des negativen Feedback-Mechanismus bei β -Rezeptor-Stimulation zukommt, denn β_3 -Rezeptor-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte NOS-Aktivierung und eine gesteigerte inotrope Antwort auf Isoproterenol (Vargese et al., 2000).

Generell kennt man im Herzen verschiedene Ansatzpunkte, an denen NO seine antiadrenerge Wirkung entfalten könnte. Stimulation der β_1 -Rezeptoren führt in einem G_s -Protein-gesteuerten Prozess zur Steigerung der Aktivität der Adenylatzyklase. cAMP wiederum aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase, die u.a. die spannungsabhängigen L-type Ca^{2+} -Kanäle phosphoryliert und damit zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom führt. NO, das in die Zelle gelangt oder intrazellulär gebildet wird, aktiviert die lösliche Guanylat-Zyklase, wodurch es zu einem Anstieg von cGMP im Kardiomyozyten kommt. Im Herzen wirkt cGMP im Wesentlichen auf zwei Effektoren: es aktiviert die cGMP-abhängigen Proteinkinasen und moduliert andererseits die Aktivität von Phosphodiesterasen. Im Herzen werden vor allem die cGMP-stimulierbare PDE2 und die cGMP-hemmbar PDE3A exprimiert. Beide besitzen eine spezifische Aktivität für cAMP, so dass bei einer Hemmung der PDE3A durch cGMP ein cAMP-Anstieg erfolgt, bei Aktivierung der PDE2 (bei

hohen NO- bzw. cGMP-Konzentrationen) aber ein cAMP-Abfall erfolgt. Offensichtlich ist es durch Regulation der PDE-Aktivität möglich, das Ausmaß der inotropen Antwort auf Noradrenalin zu modulieren. (Mery et al., 1993, Kojda et al., 1996, Paulus et al., 2001, Mohan et al., 1995).

Die cGMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert verschiedene zelluläre Zielmoleküle, welche die Kontraktionskraft modulieren. Gut charakterisiert ist die Phosphorylierung des L-type- Ca^{2+} -Kanals, die zu einer Hemmung des $I_{\text{Ca-L}}$ führt. Dies steht im Gegensatz zu der stimulierenden Wirkung durch die cAMP-abhängige Phosphorylierung, so dass auf der Ebene der Kanalphosphorylierung eine antagonistische Wirkung des cGMP auf die cAMP-vermittelte Inotropiesteigerung induziert wird. Darüber hinaus reduziert eine cGK-abhängige Phosphorylierung des Troponin I die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente (Shah et al., 1994). Vor allem bei hohen NO Konzentrationen soll dieser Mechanismus wesentlich zur anti-adrenergen Wirkung von NO beitragen.

1.6 NO als Mediator der parasympathischen Hemmung der sympathischen Inotropie-Steigerung

In einer ersten Arbeit an isolierten Kardiomyozyten der Ratte zeigten Balligand et al., dass die antiadrenerge Wirkung des parasympathischen Transmittermimetikums Carbachol durch den NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA aufgehoben wurde, (Balligand et al., 1993). Dies betraf sowohl die inotrope als auch die chronotrope Wirkung des Carbachols. Diese Befunde legten eine Beteiligung einer endogenen, in Kardiomyozyten exprimierten NO-Synthase nahe. In weiterführenden Untersuchungen zeigte dieselbe Arbeitsgruppe, dass in Kardiomyozyten der Ratte die endotheliale NO-Synthase exprimiert wird und dass die Hemmung der NOS eine Steigerung des $I_{\text{Ca-L}}$ zur Folge hatte (Balligand et al., 1995). Ähnliche Befunde wurden auch für isolierte Myozyten aus Atrien, Sinus- und AV-Knoten sowie Ventrikelmyokard des Kaninchens berichtet (Han et al., 1996). Im Gegensatz zu diesen Befunden standen allerdings mehrere Untersuchungen, die keinen Effekt einer NOS-Hemmung auf den ACh vermittelten antiadrenergen Effekt nachweisen konnten. Die kontroverse Diskussion um die Beteiligung der eNOS an der parasympathischen Modulation der β -adrenergen inotropen Stimulierbarkeit konnte auch nicht durch die Verwendung eNOS-defizienter Mäuse aufgelöst werden, da auch hier Daten publiziert wurden, die eine wesentliche Rolle der eNOS belegten oder ihr widersprachen. Han et al. zeigten an isolierten Kardiomyozyten, dass eine parasympathisch ausgelöste Hemmung des $I_{\text{Ca-L}}$ -Anstiegs bei β -adrenerger Stimulation in

Kardiomyozyten aus eNOS-defizienten Mäusen ausblieb (Han et al., 1998). Demgegenüber berichten Vandecasteele et al. von einem unveränderten I_{Ca-L} in Kardiomyozyten aus demselben Stamm eNOS-defizienter Mäuse (Vandecasteele et al., 1999). Der Grund für diese Diskrepanz ist bisher nicht geklärt.

Die Übersicht über die Funktionen von NO bei der Modulation der Kontraktilität weist eine Vielzahl offener Fragen auf: Welche Rolle spielt die eNOS bei der Modulation der inotropen, β -adrenergen Stimulierbarkeit des Herzens? Ist NO und spezieller die eNOS an der anti-adrenergen Wirkung von Acetylcholin oder Adenosin beteiligt? Diese Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit an isoliert perfundierten Herzen von Wildtyp- und eNOS-defizienten Mäusen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wild-Typ C57BL/6 (WT)-Mäuse und eNOS-defiziente (eNOS^{-/-})-Mäuse verwendet, die für sieben Generationen in den C57BL/6-Hintergrund eingekreuzt wurden (Gödecke et al., 1998). Es wurden Tiere mit einem Mindestgewicht von 19 Gramm für die Versuche ausgewählt. Das durchschnittliche Gewicht betrug dabei für die WT-Mäuse $24,6 \pm 3,4$ g und für die eNOS^{-/-}-Mäuse $23,5 \pm 2,7$ g. Das durchschnittliche Verhältnis von Herzgewicht zu Mausgewicht betrug für die WT-Mäuse $6,21 \pm 0,68$ mg/g Mausgewicht und für die eNOS^{-/-}-Mäuse $6,49 \pm 0,93$ mg/g Mausgewicht.

2.2 Expressionsanalyse

Für die Western Blot- und RT-PCR-Untersuchungen zur Verteilung der eNOS-Expression im Herzen wurden Kardiomyozyten nach dem Protokoll von Piper et al. präpariert (Piper et al., 1990). Mäuse wurden mit Urethan (1,5 g/kg) anästhesiert, die Aorta in situ kanüliert und die Herzen retrograd mit einem modifizierten, kalziumfreien Krebs-Henseleit Puffer (NaCl 110, KCl 2.6, KH₂PO₄ 1.2, Mg₂SO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, Glukose 11 mMol/l) perfundiert. Die Herzen wurden entnommen und nach Zugabe von 0,1% Kollagenase, 0,5% Rinderserumalbumin sowie 16 µmol/l CaCl₂ rezirkulierend für 30 Minuten perfundiert. Das Perfusionsmedium wurde kontinuierlich mit 95% O₂ und 5% CO₂ bei 37°C begast. Anschließend wurde das Gewebe zerkleinert (tissue mincer, Bachofer, Deutschland) und mit dem Kollagenasepuffer für weitere 15 Minuten unter Schütteln inkubiert. Nach Filtration der isolierten Zellen wurde die Ca²⁺-Konzentration schrittweise bis zur Endkonzentration von 0.5 mmol/l erhöht. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf ein Kissen aus 4% Rinderalbuminserum (ICN Flow, Meckenheim, Deutschland) geschichtet und 2 Minuten bei 10 x G zentrifugiert. Die so erhaltenen Kardiomyozyten wurden dreimal in PBS gewaschen und in 1 ml eines SDS-PAGE-Puffer aufgekocht. Die Quantifizierung der eNOS-Banden wurde nach Westernanalyse wie beschrieben (Gödecke et al., 1998) durch Scannen mit Hilfe eines Densitometers (Molecular Dynamics) vorgenommen.

Gesamt-RNA aus Herzen bzw. Kardiomyocyten wurden mittels der LiCl-Harnstoff-Methode (Auffray et al., 1980) isoliert. Fünf µg der Gesamt-RNA wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl revers transkribiert (MMLV-Reverse Transkriptase, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland). Von den RT-Produkten wurde eine Verdünnungsreihe in Schritten von 1:3,1 hergestellt und je 5 µl zur Amplifikation der eNOS- bzw. ACE-spezifischen Transkripte mit folgenden Primern eingesetzt: eNOS: 5'-CTG GAC ATC ACT TCC CCG-3' und 5'-GAGCTGGCTCATCCACGT-3'; ACE: 5'-CAA TTA CCT GCT AAA GAT GGC C-3' und 5'-TAC TCC AGC AGT GCC TTG G-3'. Die Amplifikation erfolgte über 40 Zyklen: 1' 94°C, 2' 55°C, 2' 72°C. Die RT-PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 % Agarose-Gel aufgetrennt und bei UV-Licht fotografiert.

2.3 Das nach Langendorff isoliert perfundierte Mäuseherz

Funktionelle Untersuchungen wurden an retrograd, salin perfundierten Herzen durchgeführt (Langendorff, Abbildung 1). Zur Perfusion wurde ein modifizierter Krebs-Henseleit Puffer verwendet (Tabelle 2), der bei 37°C temperiert wurde. Die Begasung des Puffers erfolgte mit Carbogengas, (95% O₂, 5% CO₂) das den pH-Wert des Puffers auf 7,4 einstellte. Durch die Begasung im geschlossenen Pufferreservoir wurde der Puffer durch den steigenden Druck in die Perfusionssäule gedrückt. Die Füllungshöhe in der Perfusionssäule konnte über das kommunizierende Steigrohr eingestellt werden. Zwischen der Säule und dem Herzen war herznah eine Flusssonde zur Messung des Koronarflusses eingebracht. Die so aufgebaute druckkonstante Perfusionsanordnung konnte durch Zwischenschalten einer Rollerpumpe in eine volumenkonstante Perfusion überführt werden.

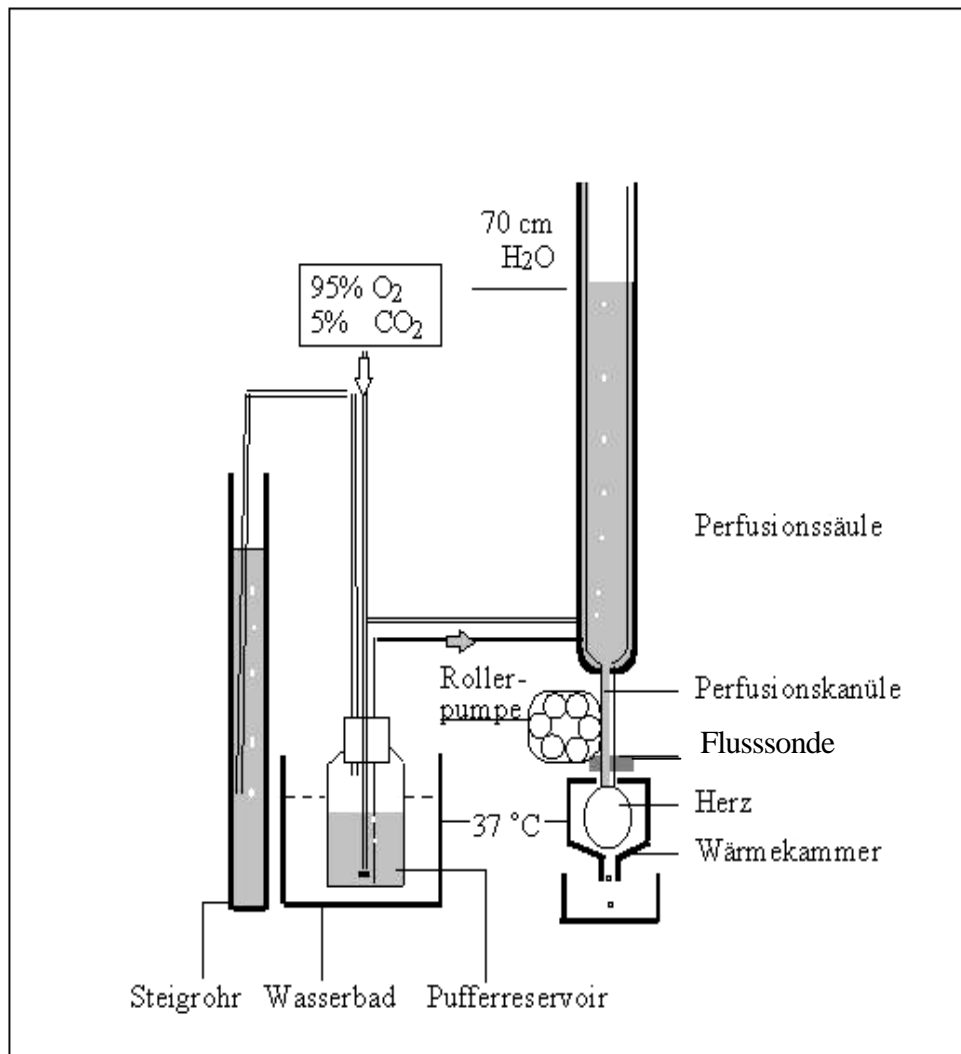


Abbildung1: Versuchsanordnung nach Langendorff für isoliert perfundierte Herzen.

Tabelle 2: Zusammensetzung des modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers

	<i>Konzentration [mM]</i>	<i>Menge [g/ l]</i>
NaCl	116	6,78
KCl	4,63	0,35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,1	0,27
KH ₂ PO ₄	1,2	0,16
NaHCO ₃	24,9	4,09
Glukose·H ₂ O	8,32	1,65
Pyruvat	2	0,22
CaCl ₂	2,5	0,37
EDTA	0,5	0,185

2.4 Organentnahme und Präparation von Mäuseherzen für funktionelle Untersuchungen

Zur Herzentnahme wurden die Mäuse mit Urethan (1,5 mg/g Mausgewicht i.p.) narkotisiert. Gleichzeitig wurde zur Vermeidung einer Thromboembolie Heparin (20 i.E./g Mausgewicht i.p) verabreicht. Nach Fixierung der Maus auf einem OP-Tisch erfolgte die Eröffnung des Thorax und die Entnahme des Herz/Lungenpaketes. Lungen- und Thymusanteile wurden im oxygenierten Pufferbad bei Raumtemperatur entfernt. Das Aufsuchen der Aorta und Absetzen des Aortenbogens in Höhe des Abgangs des Truncus brachiocephalicus erfolgte unter dem Auflichtmikroskop bei 6,4-facher Vergrößerung. Nach Einführen einer Perfusionskanüle in die Aorta wurde das Herz mit einer Ligatur befestigt. Der Zeitraum von der Thoraxeröffnung bis zur Fixierung der Aorta und Starten der Perfusion betrug maximal 3 Minuten.

2.5 Messtechnik und Instrumentierung der Mäuseherzen

Abbildung 2 zeigt die Instrumentierung des Herzens und die dadurch ermittelbaren Messparameter. Zur Messung des Koronarflusses wurde eine Ultraschallflussonde 1N in Verbindung mit dem Small Animal Blood Flow Meter T 206 der Firma Transonic Systems Inc verwendet, das bei einem zu erwartenden Koronarfluss von 0.5-4.0 ml min⁻¹ auch kleinste Flüsse von 0.01 ml min⁻¹ ermittelt. Der linksventrikuläre Druck wurde über einen im linken Ventrikel befindlichen Ballonkatheter und einem

Druckwandler aufgenommen (Statham P23 XL). Aus den Drucksignalen wurden die Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt und die Herzfrequenz abgeleitet. Die Messwerte wurden zusammen mit dem Koronarfluss und dem Perfusionsdruck mit einem Gould Recorder 2600 (Gould Instruments Division, Cleveland, Ohio, USA) kontinuierlich aufgezeichnet. Zur elektrischen Stimulation diente ein Impulsgenerator T 215/T der Firma Hugo Sachs Elektronik. Die Stimulationselektroden wurden aus feinen Kupferdrähten hergestellt und jeweils am linken Herzohr sowie an der Herzspitze angeklemt. Seitständige, intrakoronare Pharmakaapplikationen wurden mit Hilfe der Infusionspumpen Precidor 5003 der Firma Infors AG durchgeführt, mit denen auch kleinste Volumina stufenlos über drei Zehnerpotenzen appliziert werden können. Für eine volumenkonstante Perfusion wurde eine Rollerpumpe Minipuls2 (Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich) zwischen Perfusionssäule und Perfusionskanüle eingeschaltet.

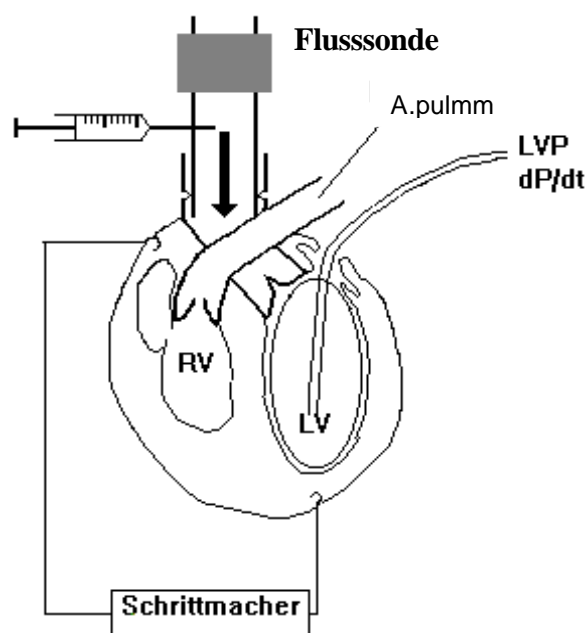


Abbildung 2: Instrumentierung des Mäuseherzens

2.6 Druckkonstante Perfusionsanordnung

Alle Herzen wurden zunächst druckkonstant perfundiert. Nach einer Einschlagphase von ca. 20 Minuten erreichte der Koronarfluss nach initialer Erhöhung durch die während der Präparation eingetretene Hypoxie einen stabilen Basalwert. Die Koronarfunktion wurde durch kurzzeitige Ischämie mittels Abklemmen der Perfusion für 20 Sekunden überprüft. Herzen, bei denen der Maximalfluss der anschließenden reaktiven Hyperämie unter einer Verdoppelung des Basalflusses lagen, wurden verworfen. Der Perfusionsdruck betrug 70 cm H₂O, entsprechend ca. 55 mmHg.

2.7 Volumenkonstante Perfusionsanordnung

Zur volumenkonstanten Perfusion wurden die Herzen bis zum Erreichen eines stabilen Koronarflusses zunächst druckkonstant perfundiert. Dann wurde zwischen die Perfusions-säule und Perfusionskanüle eine Rollerpumpe geschaltet. Um eine Hypoxie bei z.B. hohen Dobutaminkonzentrationen zu vermeiden, wurden die Herzen nach Umschalten auf die volumenkonstante Perfusion mit dem 2,5 fachen des Basalwertes überperfundiert. In dieser Anordnung wurde als Parameter für die Gefäßfunktion der Perfusionsdruck kontinuierlich registriert.

2.8 Messung der antiadrenergen Wirkung von ACh und Adenosin

Die antiadrenerge Wirkung von ACh und Adenosin während einer β -adrenergen Stimulation (antiadrenerger Effekt) wurde an WT-Herzen und eNOS^{-/-}-Herzen sowie auch an WT-Herzen unter Vorbehandlung mit L-NMMA überprüft. Die Untersuchung wurde bei druckkonstanter Perfusion mit einem Perfusionsdruck von 70 cm H₂O sowie unter Verwendung von L-NMMA bei volumenkonstanter Perfusion durchgeführt. Nach der Einschlagphase wurde zunächst mit der β -adrenergen Stimulation durch eine 50 bzw. 100 nmolare Dobutaminlösung begonnen. Nach Erreichen konstanter Messwerte wurden dann zusätzlich jeweils ACh (50nM) bzw. Adenosin (10 μ M) über einen Zeitraum von 10 Minuten seitständig infundiert und die Veränderungen des LVP und der dP/dt kontinuierlich registriert.

2.9 Messung der cAMP/cGMP-Spiegel

Zur Bestimmung der Gewebsspiegel von cAMP und cGMP wurden Herzen von WT- und eNOS^{-/-}-Mäusen nach kompletter Instrumentierung und nach erfolgter Einschlagphase unter basalen

Bedingungen unmittelbar von der Perfusionsapparatur genommen, mit einer Wollweberzange, die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, schock-gefroren und bei minus 80° C eingefroren. Um die cAMP/cGMP-Konzentration unter β -adrenerger Stimulation zu bestimmen, wurden Herzen in vergleichbaren Versuchen mit 300 nM Dobutamin stimuliert, bis der LVP einen Maximalwert erreicht hatte. Zur Isolation von cAMP und cGMP wurde das gefrorene Gewebe gewogen und in einem 10 fachen Volumen einer 6% Trichlor-Essigsäure homogenisiert. Präzipitierte Proteine wurden bei 4 ° C abzentrifugiert (10 min, 7500 Upm). Die Überstände wurden mit einem 5-fachen Volumen eines wassergesättigten Diethylethers extrahiert. Die wässrige Phase wurde in einer Vakuumzentrifuge abgedampft (speed vac). Die Bestimmung der cAMP/cGMP-Konzentration erfolgte mittels ELISA. Zur Erhöhung der Sensitivität wurden die zyklischen Nukleotide gemäß dem Protokoll des Herstellers (Amersham, Braunschweig) azetyliert.

2.10 Verwendete Chemikalien

Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

Urethan, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Dobutamin-Trockensubstanz, Firma Giulini Pharma GmbH, Hannover

L-NMMA (N^G-Methyl-L-Arginin), Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Adenosin, Firma Boehringer Mannheim GmbH

ACh (Acetylcholin), Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

MEP II (9-hydroxynonyl-Hypoxanthin, NPT 15392), Biolog GmbH, Bremen

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse der eNOS in Mäusekardiomyozyten

Die Verteilung der eNOS-Expression im Herzen der Maus wurde mittels Western Analyse untersucht. Dazu wurden gleiche Mengen eines Proteinextraktes aus WT-Herzen und gereinigten WT-Kardiomyozyten auf ihren eNOS-Gehalt untersucht. Als Negativkontrolle diente ein Extrakt aus eNOS^{-/-}-Herzen. Wie Abbildung 3 zeigt konnten eNOS-spezifische Banden in WT-Herzen und in den gereinigten Kardiomyozyten, nicht jedoch in den eNOS^{-/-}-Herzen nachgewiesen werden. Die densitometrische Analyse von drei unabhängigen Experimenten ergab, dass ca. 20% des kardialen eNOS-Proteins in der Fraktion der Kardiomyozyten nachweisbar waren.

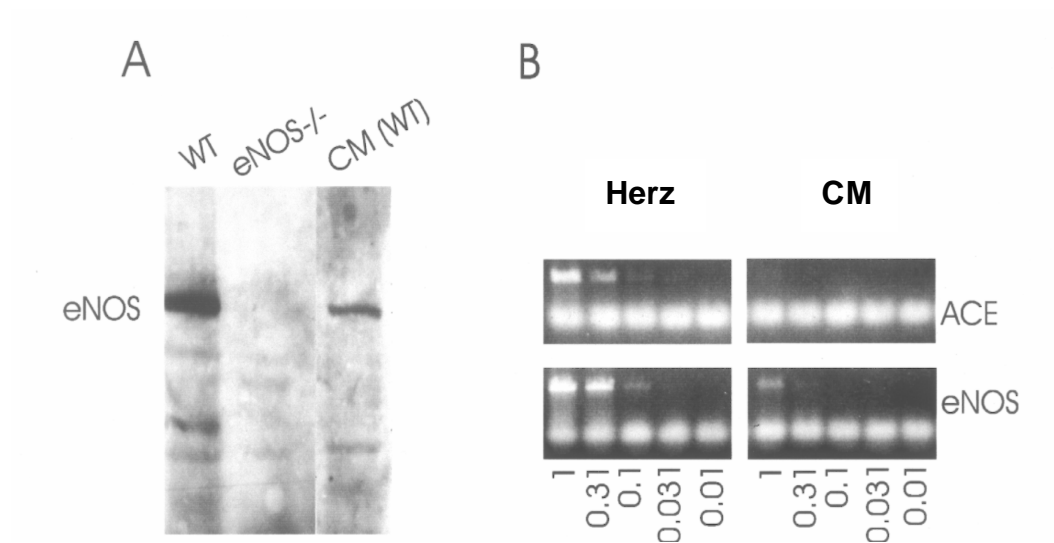


Abbildung 3: Expressionsanalyse der eNOS im Mauserherzen. A: Western Analyse an Herzextrakten von WT- und eNOS^{-/-}-Mäusen sowie Wildtypkardiomyozyten (CM). B: RT-PCR-Analyse der eNOS- und ACE-Expression in WT-Herzen und isolierten Kardiomyozyten (CM). Unter den einzelnen Spuren sind die Verdünnungsstufen angegeben. Stufe 1 entspricht der cDNA, die aus 125 ng Gesamt-RNA revers transkribiert wurde.

Um auszuschließen, dass das eNOS-Signal in der Kardiomyozytenfraktion auf eine Kontamination der Präparation mit Endothelzellen zurückzuführen war, wurde eine RT-PCR-Analyse an RNA aus WT-Herzen und isolierten Kardiomyozyten durchgeführt.

Als Marker für die Endothelfraktion wurde die mRNA des Angiotensin-Converting Enzyms amplifiziert. Abbildung 3 zeigt, dass eNOS-spezifische Transkripte in der Gesamt-RNA aus Herz und Kardiomyozyt nachweisbar sind. Die Signalintensität des eNOS-Fragments in Stufe 1 der Kardiomyozytenfraktion liegt zwischen der Signalintensität der Herz-RNA von Stufe 0,31 und 0,1. Dies bedeutet, dass das Expressionsniveau in der Kardiomyozytenfraktion zwischen 10-30% der gesamten kardialen Expression beträgt. Im Gegensatz dazu ist ein deutliches ACE-Signal nur in der RNA aus Gesamtherz detektierbar und in der Kardiomyozytenfraktion eine sehr schwache Bande nur in der Stufe 1 erkennbar. Der Vergleich mit der Bandenintensität der Gesamtherz-RNA ergibt, dass ca. 3% der ACE-Expression in der Kardiomyozytenfraktion nachweisbar ist. Das Verhalten des Endothelmarkers ACE belegt, dass die Kardiomyozytenfraktion mit maximal 3% Endothelzellen verunreinigt war. Die deutlich höhere Expression der eNOS bestätigt daher die Ergebnisse aus der Western Analyse, wonach ca. 20% der eNOS in Kardiomyozyten exprimiert werden.

3.2 Auslegung der Versuchsanordnung für Mäuseherzen

Da zu Beginn dieser Arbeit die Analyse der Herzfunktion bei Mäusen mit Hilfe der retrograden Perfusion nach Langendorff noch nicht etabliert war, musste zunächst die Langendorff-Perfusionsanordnung von der Auslegung für Herzen größerer Tiere (Ratten, Meerschweinchen) an die Größenverhältnisse der Mäuseherzen angepasst werden. Dies betraf vor allem die Messung des linksventrikulären Drucks (LVP) sowie die Dimensionierung der Perfusionskanüle. Als Ausgangsmaterial für die Perfusionskanüle wurden Stahlkanülen der Größe 20 G (Außendurchmesser 0,9 mm; Innendurchmesser 0,5 mm) verwendet, in die nach Kürzung eine Nut gefräst wurde, um der Aorta bei der Fixierung größeren Halt bieten zu können. Für die Messung des LVP wurden drei verschiedene Systeme getestet, die nach Eröffnen des linken Vorhofs über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingebracht werden konnten und über die neben der Messung des LVP auch die Messung der Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}), der Druckabfallsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) sowie die Bestimmung der Herzfrequenz möglich war:

! ein 2F Millar-Tip Katheter

‡ kommerziell erhältliche vorgefertigtem Latexballons der Größe 1 (Hugo Sachs Elektronik), die nach Herstellerangaben für die Messung des LVP in Mäuseherzen geeignet sind

‡ aus Latexmaterial von Kondomen selbsthergestellte Ballonkatheter.

Die Größenverhältnisse der einzelnen Systeme sind in Abbildung 4 dargestellt.

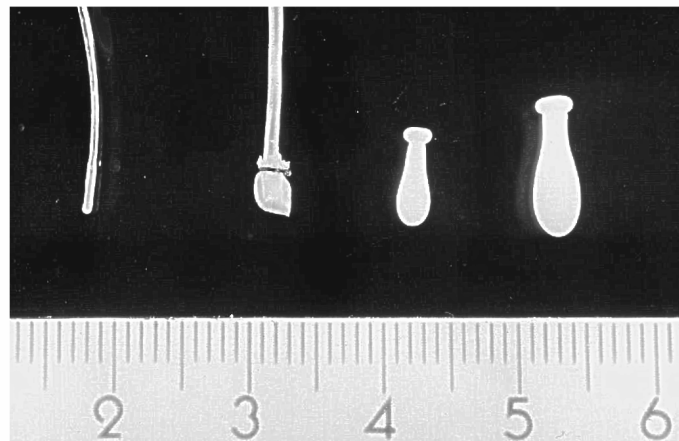


Abbildung 4: Größenverhältnisse der verwendeten Katheter zur Messung des LVP (x-Achse = cm). Von links nach rechts: Millar-TIP-Katheter 2 F, Eigenbau Latexballonkatheter, Latexballons Größe 1 und 2, Hugo Sachs Elektronik.

Versuche mit den im Handel erhältlichen Latexballons führten zu keiner verwertbaren Druckmessung. Da diese Ballons eine relativ große Wandsteife aufweisen, waren sie einerseits nicht in der Lage, sich der Ventrikelwand ausreichend anzupassen. Hinzu kam, dass der Füllungsdruck im Ballon wegen der schlechten Dehnbarkeit des Materials weit über einem enddiastolischen Druck von 5 mmHg eingestellt werden musste, damit es zu einer Anpassung des Ballons an die Ventrikelwand kam.

In weiteren Versuchen mit dem Millar-Tip Katheter betrug der maximale systolische Druck lediglich ca. 60 mmHg. In der Regel lagen die Druckwerte bei 20-40 mmHg was auf eine unvollständige Ventrikelfüllung und einen unvollständigen Mitralklappenschluß zurück-zuführen sein könnte (Abb. 5).

Die besten Ergebnisse lieferten selbstgebaute Katheter. Hierzu wurde das Latexmaterial so an einen feinen PE-Schlauch mit einer Ligatur befestigt, dass sich ein ca. 3 mm langen und im Durchmesser 2 mm großer Ballon ergab, der nach blasenfreier Füllung mit Wasser über den PE-Schlauch mit dem Druckaufnehmer in Verbindung stand und so die Messung der linksventrikulären Druckentwicklung erlaubte.

Abbildung 5 zeigt eine vergleichende Messung der linksventrikulären Druckentwicklung mit einem Latexballonkatheter und einem Millar-Tip-Katheter, die alternierend in dasselbe Herz eingeführt wurden. Es wird deutlich, dass die Druckmessung mit dem Ballonkatheter erheblich genauer ist als mit dem Millar-Tip Katheter.

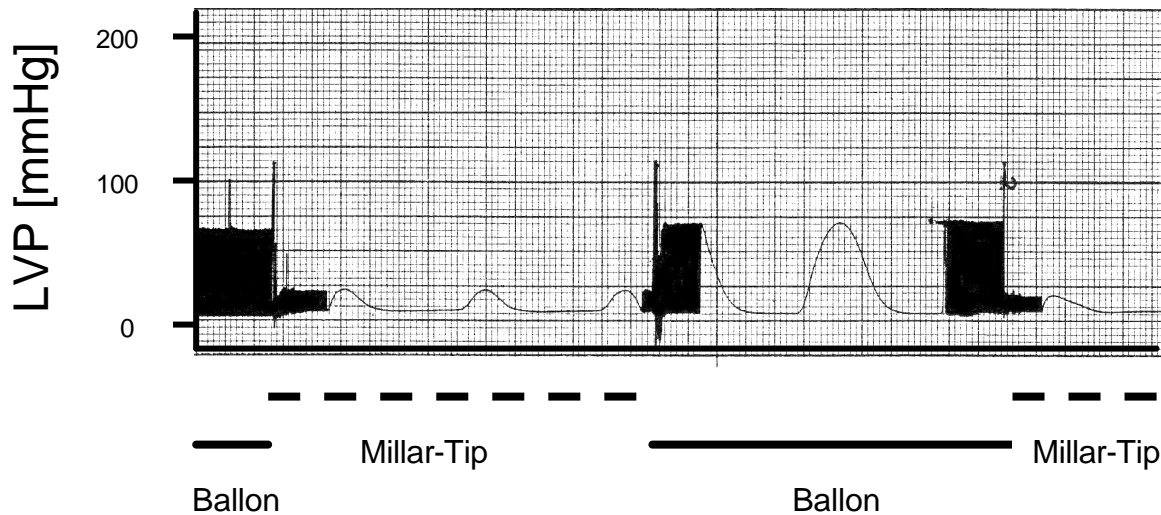


Abbildung 5: Messung der linksventrikulären Druckentwicklung mit dem selbstgebaute Latexballonkatheter (—) und einem Millar-Tip-Katheter (---) im Vergleich bei druckkonstanter Perfusion (70 cm H₂O).

3.3 Stabilität isolierter Mäuseherzen

Nach Optimierung des Druckmessverfahrens wurden zunächst Untersuchungen der Stabilität der Präparate durchgeführt. Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Originalregistrierung von Koronarfluss, LVP und dP/dt in einer Untersuchung zur Langzeitstabilität. Die Experimente wurden unter standardisierten Versuchsbedingungen (Temperatur, Druck, Begasung, Herzfrequenz) durchgeführt. Die aufgezeichneten Parameter zeigten über ein Zeitintervall von ca. 2,5 Stunden praktisch keine Änderungen.

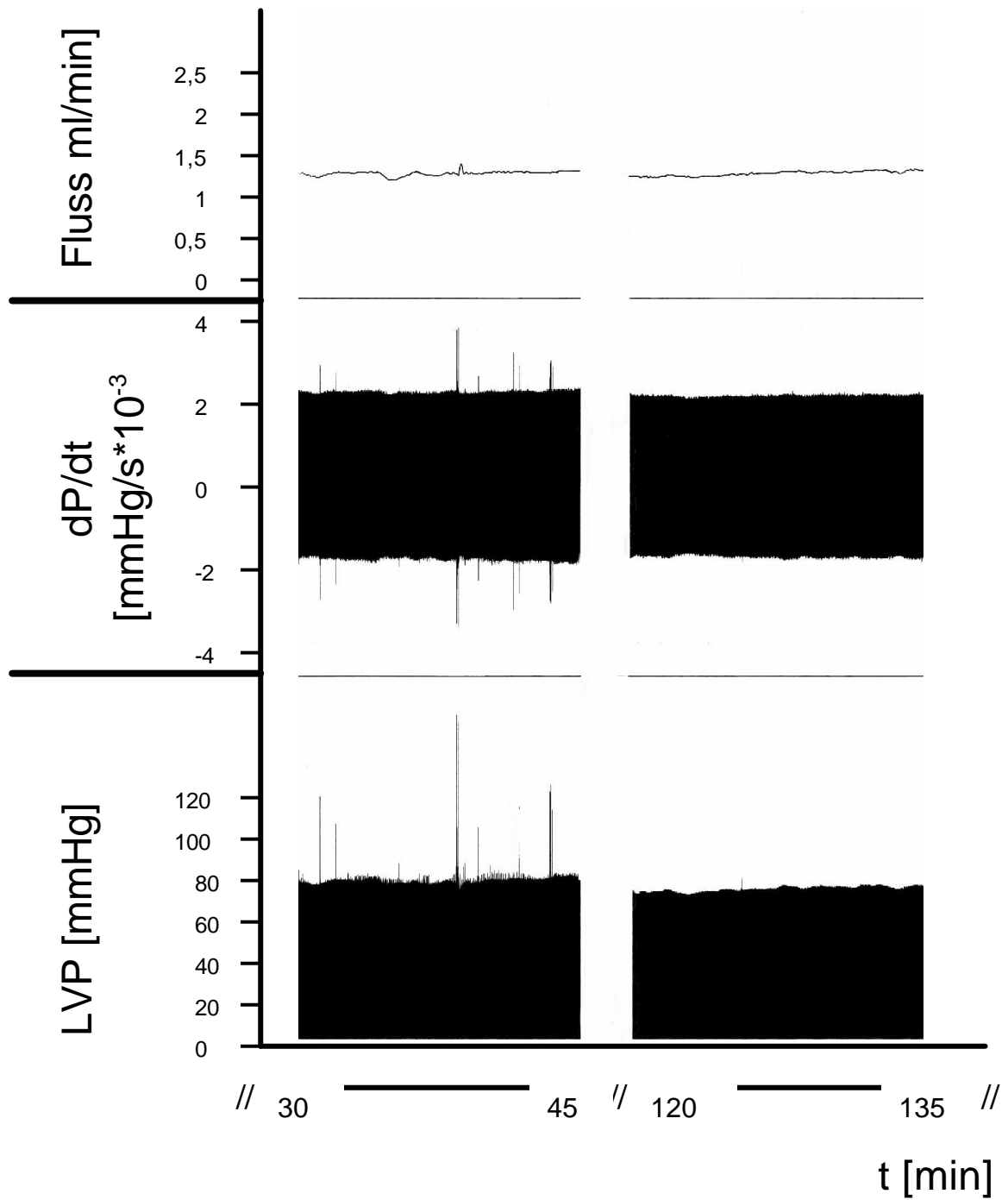


Abbildung 6: Originalregistrierung zur Überprüfung der Stabilität der Versuchsanordnung: LVP, dP/dt und Koronarfluss zeigen über ein Zeitintervall von ca. 2,5 Stunden keine wesentlichen Veränderungen.

3.4 Dosis-Wirkungskurven für Katecholamine

In weiteren Versuchen wurde die inotrope Stimulierbarkeit isolierter Mäuseherzen durch Katecholamingabe überprüft. Dazu wurde die dosisabhängige Wirkung von Dobutamin untersucht, indem eine Stammlösung von 10 μ M Dobutamin seitständig mit steigenden Volumina infundiert wurde, wobei das maximale Infusionsvolumen 3 % des Koronarflusses betrug, um Veränderungen der Pufferzusammensetzung durch Verdünnung zu vermeiden. Insgesamt wurde ein Untersuchungszeitraum von 2 Stunden bei der Verwendung von Dobutamin nicht überschritten. Abbildung 7 zeigt in einer Originalregistrierung exemplarisch die dosisabhängigen Wirkungen von Dobutamin in steigenden Konzentrationen bei einer volumenkonstanten Perfusionsanordnung. Es wird deutlich, dass Dobutamin (10-100 nM) zu einem Anstieg der Kontraktilität führt (LVP, dP/dt). Damit geht eine Erhöhung des Koronarflusses einher um den vermehrten O₂-Bedarf bei isovolumetrischer Arbeit zu decken.

3.5 Frequenz- und Inotropieverhalten unter Dobutamin bei druckkonstanter Perfusion

Die Untersuchungsreihen zum Vergleich der eNOS^{-/-} mit den WT-Herzen bezüglich ihres basalen linksventrikulären Druckes und ihres Inotropieverhaltens bei β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin wurden zunächst bei druckkonstanter Perfusion mit 70 cm H₂O ohne elektrische Stimulation durchgeführt (Abb. 8). Der basale LVP war in eNOS^{-/-}-Herzen gegenüber WT-Herzen ($66.3 \pm 14,4$ mmHg) um 33% erhöht. Dobutamin (10 - 300 nM) steigerte den LVP in WT-Herzen auf maximal $105 \pm 5,8$ mmHg. In eNOS^{-/-}-Herzen betrug der maximale LVP $125 \pm 12,6$ mmHg (100 nM Dobutamin). Die Unterschiede zwischen WT und eNOS^{-/-}-Herzen waren für alle Dobutaminkonzentrationen statistisch signifikant. Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) war in eNOS^{-/-}-Herzen ebenfalls immer höher als die der WT-Herzen, doch erreichten diese Werte nicht das Signifikanzniveau. Die positiv chronotrope Wirkung der Dobutaminstimulation ist in Abbildung 9 zusammengefasst. Dobutamin steigerte die Herzfrequenz in WT-Herzen um 30 % und in eNOS^{-/-}-Herzen um 35%. Die mittlere Herzfrequenz war bei den eNOS^{-/-}-Herzen bei allen eingesetzten Dobutaminkonzentrationen niedriger als bei den WT-Herzen, doch erreichten die Mittelwerte aufgrund der hohen Standardabweichung nicht das Signifikanzniveau.

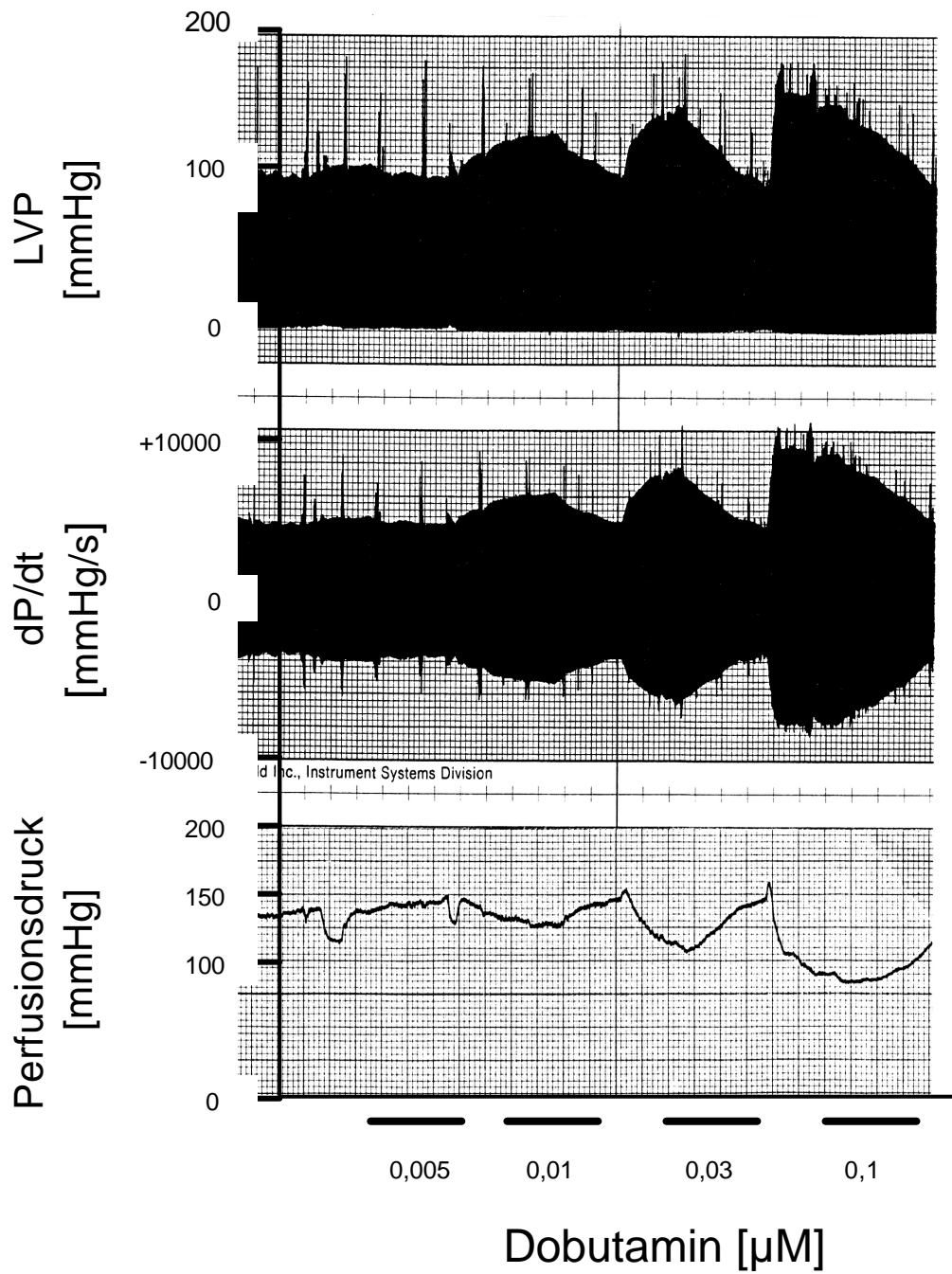


Abbildung 7: Originalregistrierung zur Ermittlung einer Dobutamin-Dosis-Wirkungskurve. Volumenkonstante Perfusionsanordnung, Herz (eNOS^{-/-}) elektrisch stimuliert (600 Schläge/min), Untersuchungszeitraum 2 Stunden.

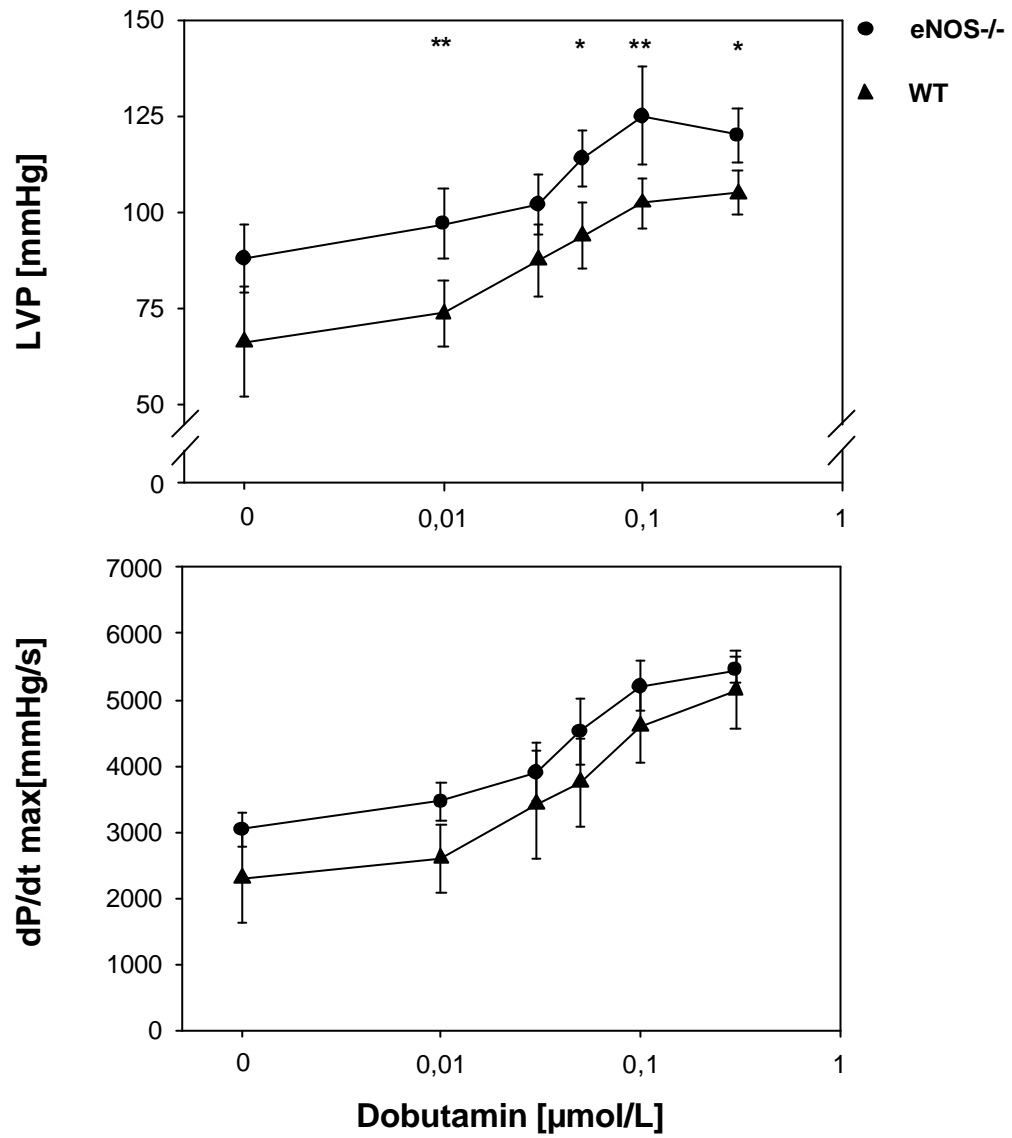


Abbildung 8: Inotropieverhalten unter β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin bei druckkonstanter Perfusion von WT- (?) und eNOS-/-Herzen (?). Datenpaare repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=6$ Experimenten in jeder Gruppe ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

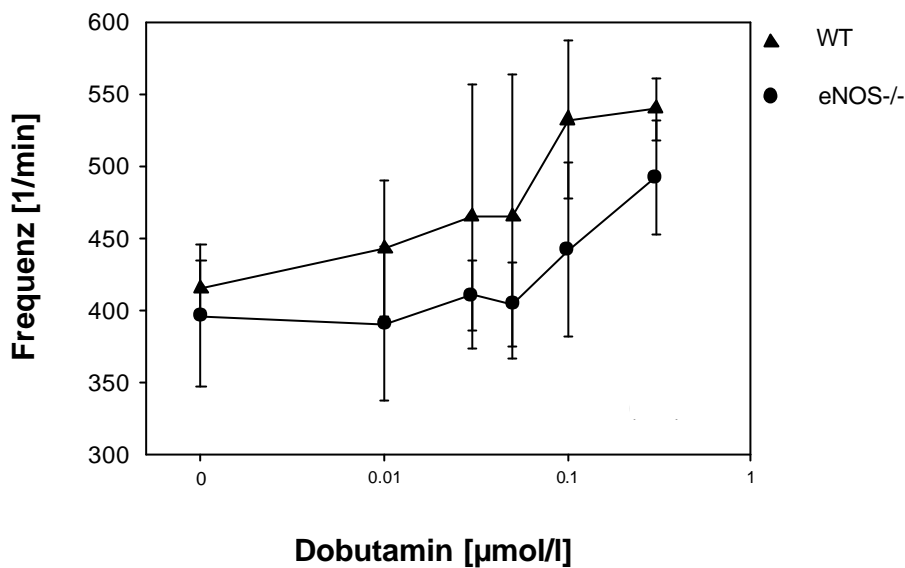


Abbildung 9: Frequenzverhalten unter β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin bei druckkonstanter Perfusion von WT-(?) und eNOS-/-Herzen (?). Datenpaare repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=6 Experimenten in jeder Gruppe.

3.6 Kontraktilitätsverhalten unter Dobutamin an elektrisch stimulierten Herzen bei druckkonstanter Perfusion

Um die Daten vergleichbar zu machen wurde in einer weiteren Serie der chronotrope Einfluss von Dobutamin durch elektrische Stimulation mit 600 Schlägen/min eliminiert, da diese Frequenz oberhalb der maximalen Herzfrequenz liegt, die durch Dobutamingabe am Mäuseherzen erreicht werden konnte. Unter diesen Bedingungen zeigte die basale linksventrikuläre Druckentwicklung vergleichbare Werte für WT-Herzen ($74,2 \pm 10,7$ mmHg) und eNOS-/-Herzen ($75,8 \pm 6,7$ mmHg, n=6, n.s.). Dobutamin steigerte in WT-Herzen dosisabhängig LVP um 48 %. In eNOS-/-Herzen verlief der Druckanstieg steiler und erreichte signifikant höhere Maximalwerte (Steigerung um 74 %; 100 nM Dobutamin: $123 \pm 9,3$ mmHg vs. $104 \pm 8,6$ mmHg, $p < 0,05$; 300 nM Dobutamin: $125 \pm 3,5$ mmHg vs. $102 \pm 7,6$ mmHg, $p < 0,01$). Gleiche Ergebnisse wurden für die dP/dt_{\max} erhalten

(basal: WT 2633 ± 599 mmHg/s, eNOS^{-/-} 2667 ± 301 mmHg/s; 300 nM Dobutamin: WT 5160 ± 456 mmHg/s, eNOS^{-/-} 6240 ± 260 mmHg/s; $p < 0,01$. Abb. 10).

Abbildung 11 zeigt, dass die β -adrenerge Stimulation mit einem Anstieg des Koronarflusses verbunden war. Die Flusszunahme war in WT- und eNOS^{-/-}-Herzen jedoch nicht signifikant unterschiedlich (+60 %).

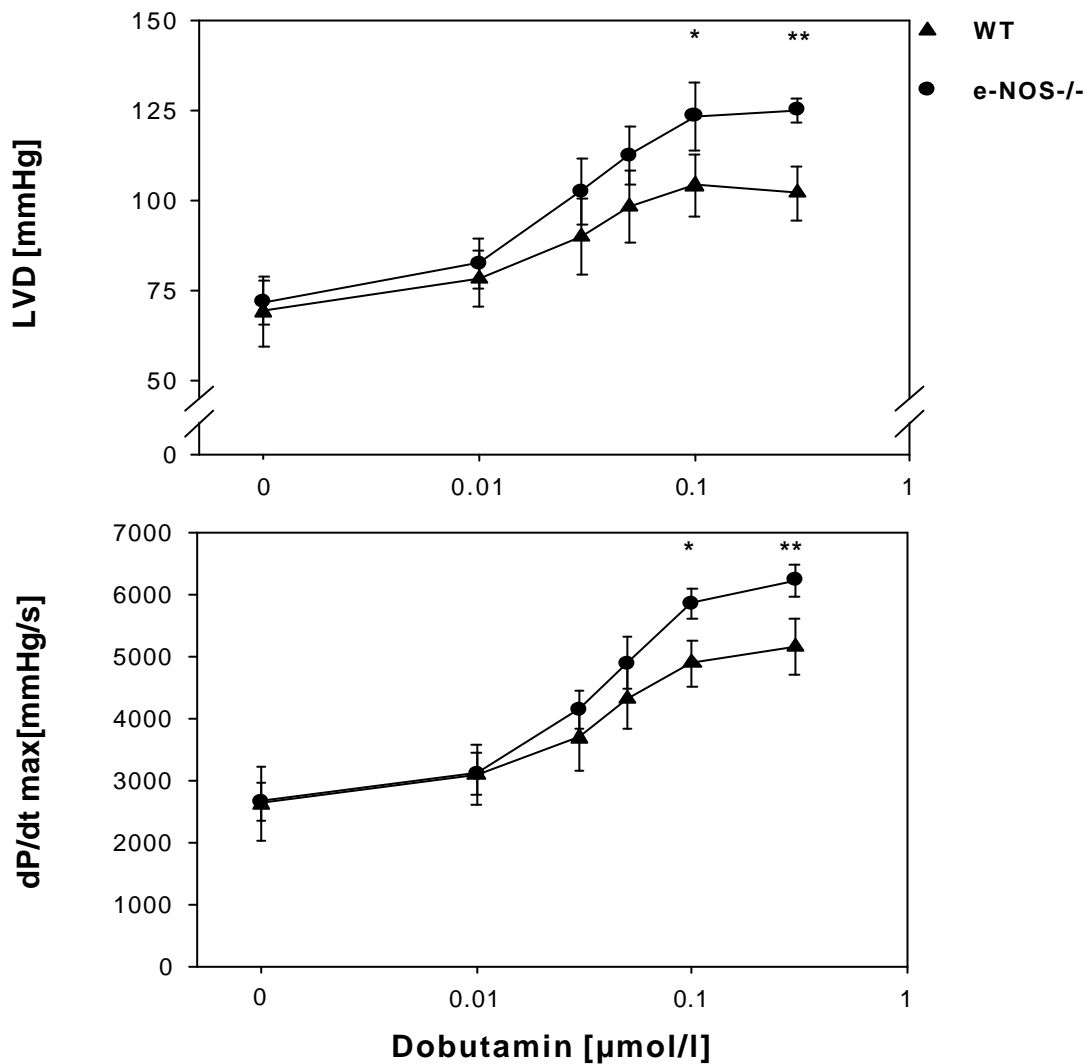


Abbildung 10: Inotropieverhalten unter β -adrenergen Stimulation bei druckkonstanter Perfusion und elektrischer Stimulation (600bpm) von WT- (?) und eNOS^{-/-}-Herzen (?). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=6 Experimenten in jeder Gruppe ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

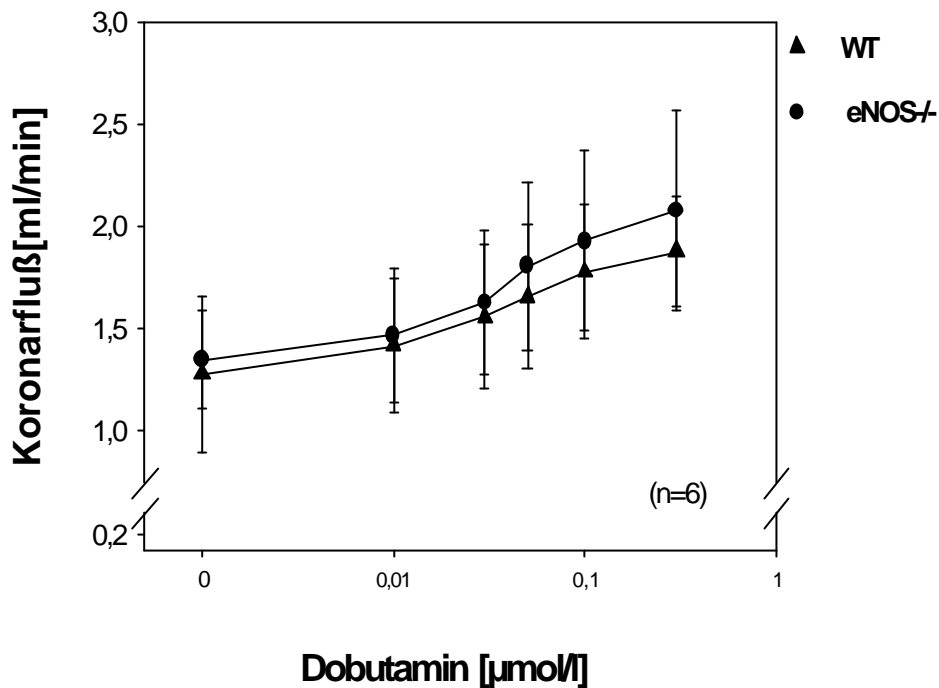


Abbildung 11: Koronarfluß unter β -adrenerger Stimulation bei druckkonstanter Perfusion und elektrischer Stimulation (600bpm) von WT- (▲) und eNOS^{-/-}-Herzen (●). Datenpaare repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=6 Experimenten in jeder Gruppe.

3.7 Kontraktilitätsverhalten bei akuter Hemmung der eNOS durch L-NMMA

Es wurde weiterhin untersucht, welchen Effekt eine akute NOS-Hemmung auf die Kontraktionskraft der Mäuseherzen hat. Da die Applikation von NOS-Inhibitoren in WT-Herzen den Koronarfluß um ca. 30% reduziert, wurden diese Versuche unter volumenkonstanten Perfusionsbedingungen durchgeführt um Flusseffekte auszuschließen. Als Inhibitor wurde L-NMMA, ein kompetitiver, nicht selektiver NOS-Inhibitor in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ verwendet. Wie Abbildung 12 zeigt steigerte Dobutamin (0,3 $\mu\text{mol/l}$) in WT-Herzen den LVP von basal $94 \pm 11,1$ mmHg um 38,3% auf $130 \pm 8,4$ mmHg. Akute NOS-Inhibition mit L-NMMA hatte keinen Einfluss auf den basal entwickelten Druck (WT+L-NMMA: 92 ± 17 mmHg), führte aber zu einem steilen Anstieg des LVP und zu einem signifikant höheren LVP (WT 130 ± 8 mmHg, WT+L-NMMA 152 ± 8 mmHg, n=6, $p < 0,05$). Damit wurden durch akute NOS-Hemmung in WT-Herzen qualitativ und quantitativ vergleichbare Veränderungen des LVP ausgelöst wie durch chronische Inaktivierung der eNOS (

basal: 110 ± 10 mmHg; $0,3 \mu\text{M}$: 160 ± 11 mmHg). Prinzipiell gleiche Ergebnisse wurden für die abgeleiteten Größen dP/dt_{max} und die dP/dt_{min} erhalten (Abb.13).

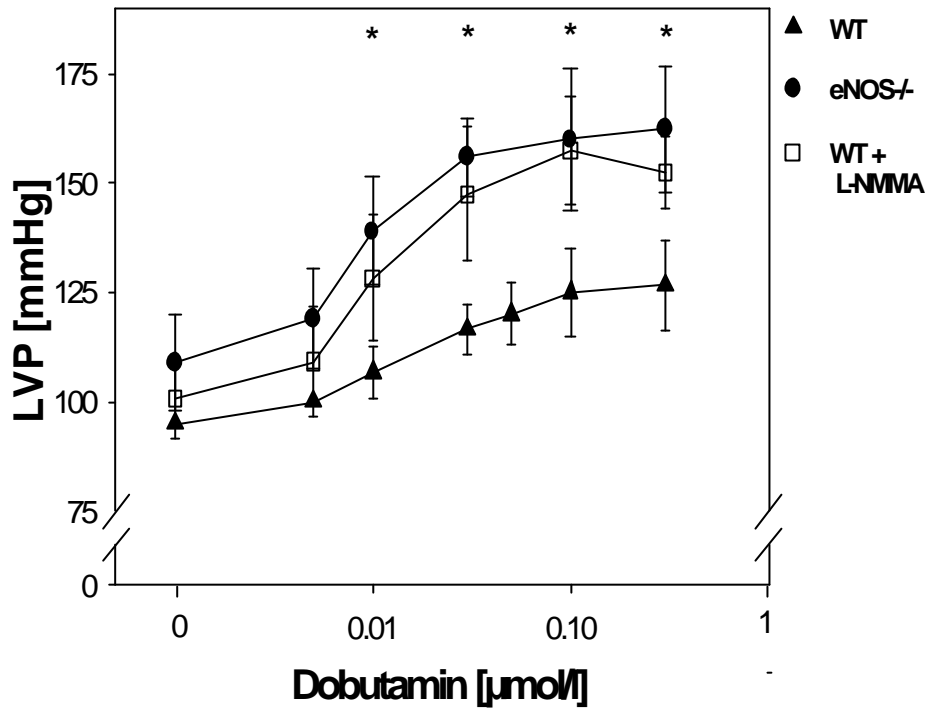


Abbildung 12: Effekt einer akuten NOS-Hemmung auf den Dobutamin-induzierten Anstieg des LVP im Mäuseherzen. WT-Herzen (▲) wurden mit steigenden Dobutaminkonzentrationen mit (?) und ohne (?) NOS-Inhibition gemessen. Zum Vergleich wurden eNOS^{-/-}-Herzen (●) analysiert. Volumenkonstante Perfusionsanordnung, elektrische Stimulation (600 bpm). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=6 Experimenten in jeder Gruppe ; * p< 0,05 vs. WT.

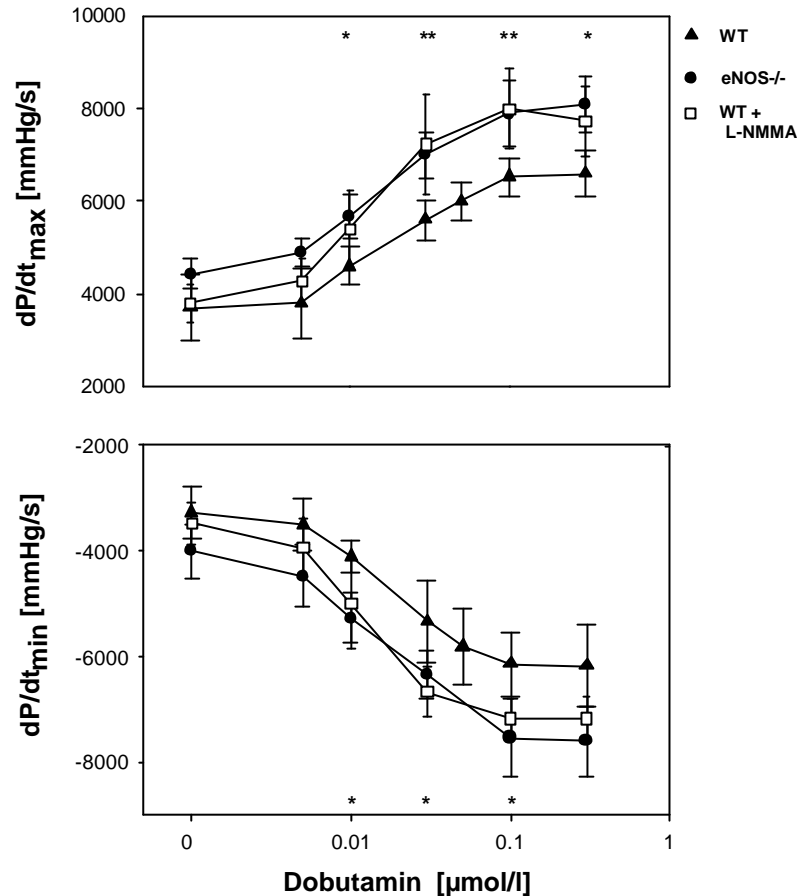


Abbildung 13: Effekt einer akuten NOS-Hemmung auf die durch Dobutamin induzierten Veränderungen der dP/dt_{max} und dP/dt_{min} im Mäuseherzen. WT-Herzen (▲) wurden mit steigenden Dobutaminkonzentrationen mit (●) und ohne (□) NOS-Inhibition gemessen. Zum Vergleich wurden eNOS^{-/-}-Herzen (●) analysiert. Volumenkonstante Perfusionsanordnung, elektrische Stimulation (600 bpm). Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=6 Experimenten in jeder Gruppe ; * p < 0,05, ** p < 0,005.

3.8 Inotrope Stimulation durch Ca^{2+}

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die gesteigerte inotrope Stimulierbarkeit in eNOS^{-/-}-Herzen die Folge einer veränderten Ca^{2+} -Empfindlichkeit ist. Zur Klärung dieser Frage wurden die WT- und eNOS^{-/-}-Herzen mit steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen (1,5-4,5 mM) perfundiert. Abbildung 14 zeigt, dass eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in WT-

Herzen zu einem dosisabhängigen Anstieg des LVP von 85 ± 18 mmHg ($1,5$ mM Ca^{2+}) auf 175 % führte. Die Ca^{2+} -induzierte Steigerung des LVP in eNOS $^{-/-}$ -Herzen war im Vergleich zu den WT-Herzen nicht verschieden. Gleiche Ergebnisse wurden auch für die Druckerhöhungsgeschwindigkeit ermittelt.

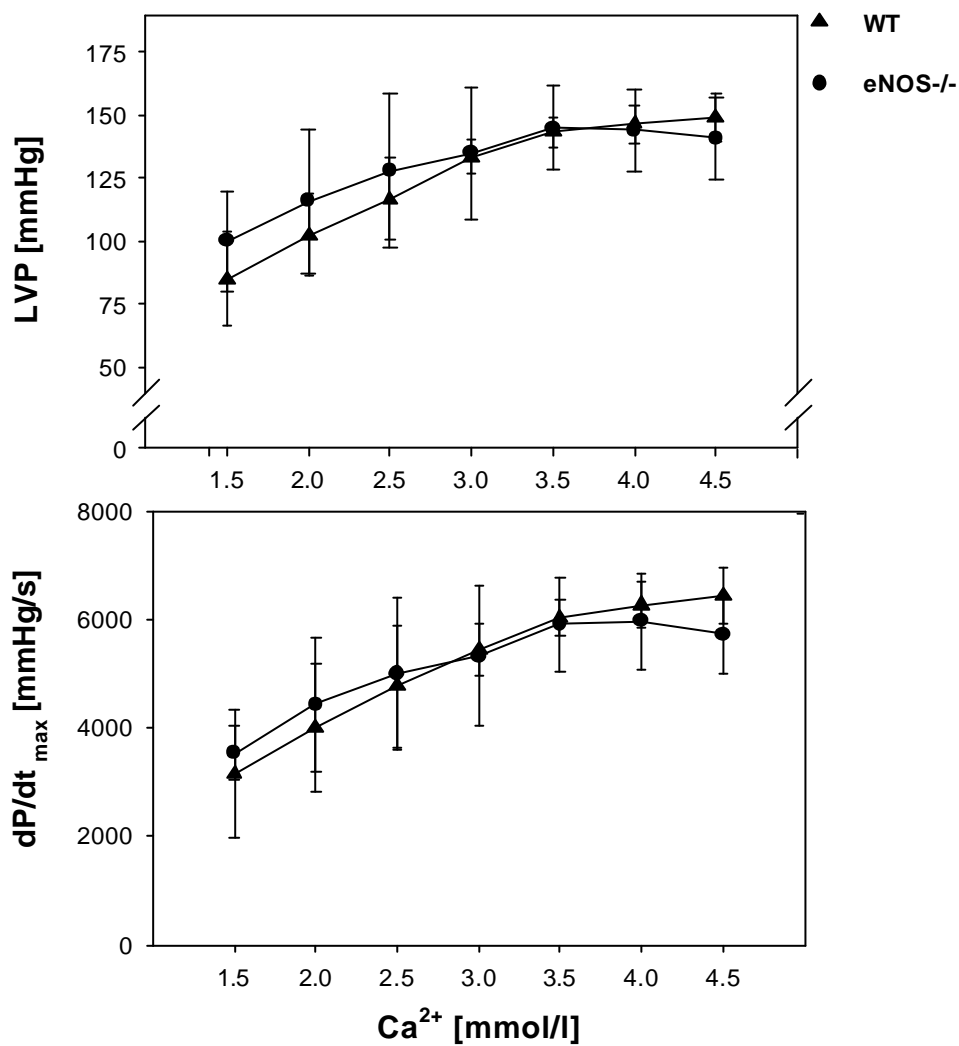


Abbildung 14: Inotropieverhalten unter steigender extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei druckkonstanter Perfusion und elektrischer Stimulation (600bpm) von WT-(\blacktriangle) und eNOS $^{-/-}$ -Herzen (\bullet). Datenpaare repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=6$ Experimenten in jeder Gruppe.

3.9 cAMP/cGMP-Verhältnis unter β -adrenerger Stimulation

Eine mögliche Erklärung für die NO-abhängige Modulation der β -adrenergen Stimulierbarkeit könnte in einer Abnahme der cAMP-Spiegel durch Aktivierung der cGMP-stimulierten Phosphodiesterase (PDE II) liegen. Deshalb wurden cAMP- und cGMP-Konzentrationen in WT- und eNOS^{-/-}-Herzen unter basalen Bedingungen und nach maximaler Stimulation mit Dobutamin (300 nM) mit Hilfe eines ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben. In WT-Herzen kam es dabei zu einem signifikanten Anstieg des cAMP bei maximaler Stimulation mit Dobutamin ($P < 0.01$; $n=6$). In den eNOS^{-/-}-Herzen stieg die cAMP-Konzentration ohne signifikanten Unterschied an ($n=6$). Signifikante Unterschiede in der cGMP-Konzentration konnten in keinem der Experimente nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Einfluss einer Dobutaminstimulation auf die kardialen cAMP und cGMP-Spiegel

	cAMP [fmol/mg Protein]		cGMP [fmol/mg Protein]	
	basal (6)	Dobutamin (6)	basal (6)	Dobutamin (6)
WT	403±103	772±97	275±57	306±111
eNOS ^{-/-}	476±193	663±101	256±114	244±91

3.10 Kontraktilitätsverhalten unter β -adrenerger Stimulation nach Inhibition der cGMP-induzierten PDE II

Die Bedeutung der PDE II für den negativ inotropen Effekt von NO in Mäuseherzen wurde in salin perfundierten Herzen untersucht. Dazu wurden der LVP unter basalen Bedingungen und nach maximaler Dobutaminstimulation in WT- und eNOS^{-/-}-Herzen gemessen. Zur Hemmung der PDE II wurde MEP II (1 hydroxynonyl-hypoxanthin, 20 μ M) als Dauerinfusion seitständig appliziert. Eine Veränderung von LVP und dP/dt konnte dabei weder unter Basalbedingungen noch unter maximaler Dobutaminstimulation nachgewiesen werden.

3.11 Antiadrenerge Wirkung von ACh und Adenosin bei β -adrenerger Stimulation

In weiteren Experimenten wurde in salin-perfundierten Herzen von WT und eNOS^{-/-}-Mäusen untersucht, ob die antiadrenerge Wirkung von Adenosin und Acetylcholin (ACh) durch eine Aktivierung der eNOS erfolgt. Dazu wurden WT- und eNOS^{-/-}-Herzen mit 50 nM Dobutamin über ca. 75 Minuten stimuliert und der Einfluss von 10 μ M Adenosin und 50 nM ACh über jeweils 15 Minuten untersucht. Diese Dobutaminkonzentration führte in WT und eNOS^{-/-}-Herzen zu einer submaximalen Steigerung von LVP und dP/dt, die im Gegensatz zur maximalen Dobutaminstimulation in beiden Gruppen nicht unterschiedlich war. Dadurch sollten die beobachteten Effekte von Adenosin und ACh quantitativ direkt miteinander vergleichbar sein.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch den Verlauf eines solchen Experiments. In WT-Herzen steigerte eine kontinuierliche Dobutamingabe LVP und dP/dt. Zusätzliche Applikationen von Adenosin bzw. ACh hemmten den dobutamininduzierten Druckanstieg nahezu vollständig. Die Wirkung beider Agonisten war reversibel. Ein gleiches Bild ergab sich für die eNOS-defizienten Herzen: Auch hier führten Adenosin und ACh zu einer vollständigen und reversiblen Hemmung des Kontraktilitätsanstieg.

Abb. 16 zeigt die quantitativen Daten aus je 6 Experimenten an WT und eNOS^{-/-}-Herzen. Bei einem basalen LVP bei den WT-Herzen von 69 \pm 9 mmHg kommt es nach Gabe von Dobutamin (50nM) zu einer Steigerung des LVP auf 135,4% (97 \pm 8 mmHg; n=6, p<0,05). Nach zusätzlicher Gabe von Adenosin (10 μ M) wird der LVP auf 112,8% (79 \pm 8 mmHg) reduziert. ACh (50nM) reduzierte LVP auf 103,3% (70 \pm 9 mmHg). Für die eNOS^{-/-}-Herzen ergaben sich nahezu gleiche Messwerte (n.s. vs. WT).

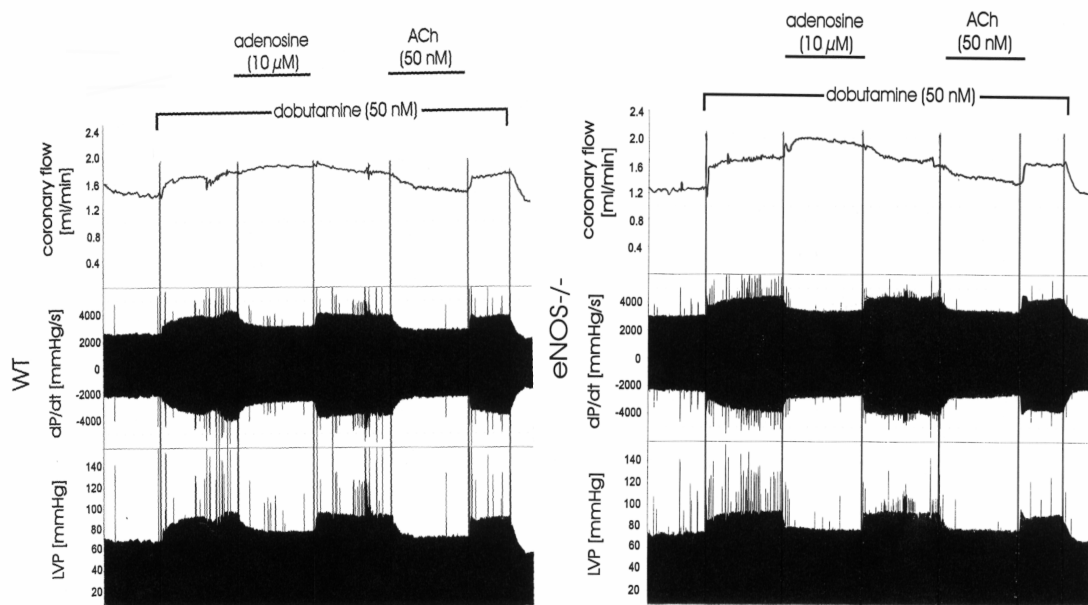


Abbildung 15: Originalregistrierungen (WT und eNOS^{-/-}) zur Untersuchung der antiadrenergen Wirkungen von Adenosin und ACh.

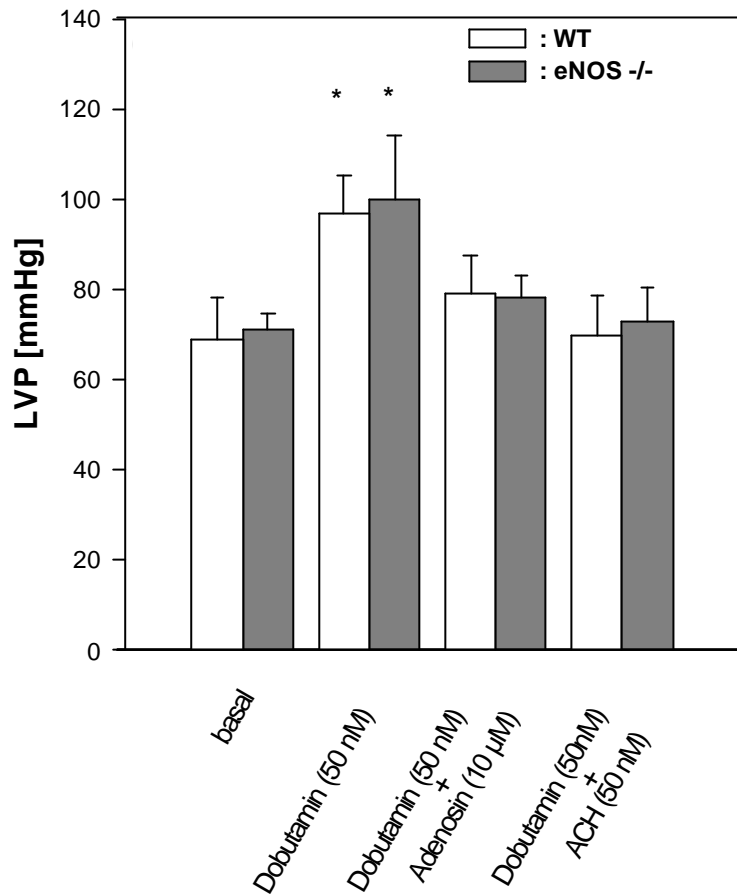


Abbildung 16: Antiadrenerge Wirkung von Adenosin und ACh bei druckkonstanter Perfusion und elektrischer Stimulation (600 bpm). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT (?) - und eNOS^{-/-} (-/-) -Herzen ergaben sich nicht. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=6 Experimenten in jeder Gruppe; * p< 0,01.

Um zu überprüfen, ob die beschriebene antiadrenerge Wirkung von ACh und Adenosin durch andere NOS-Isoformen (nNOS, iNOS) vermittelt wird, wurden Untersuchungen unter akuter Hemmung aller NOS-Isoformen mit L-NMMA durchgeführt. Um Flusseffekte durch die akute NOS-Hemmung auszuschließen wurden die Versuche unter volumenkonstanter Perfusion durchgeführt. Abbildung 17 zeigt, dass Stimulation mit 100 nM Dobutamin in WT-Herzen zu einer

signifikanten Steigerung (148%) des LVP führte. Zusätzliche Gabe von 100 nM ACh führte zu einer signifikanten Reduktion des Druckanstiegs. Ebenso zeigte sich eine Verminderung des LVP durch 10 μ M Adenosin. Bei akuter eNOS-Hemmung durch L-NMMA führte die Dobutamingabe zu einer signifikanten Steigerung des LVP auf 152%, welche signifikant höher war als ohne NOS-Hemmung und das gleiche Ausmaß wie in eNOS-/-Herzen erreichte. Diese positiv-inotrope Antwort auf Dobutamin wurde durch Gabe von ACh oder Adenosin in allen Gruppen auf dasselbe Maß reduziert. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei der Auswertung der dP/dt (nicht gezeigt).

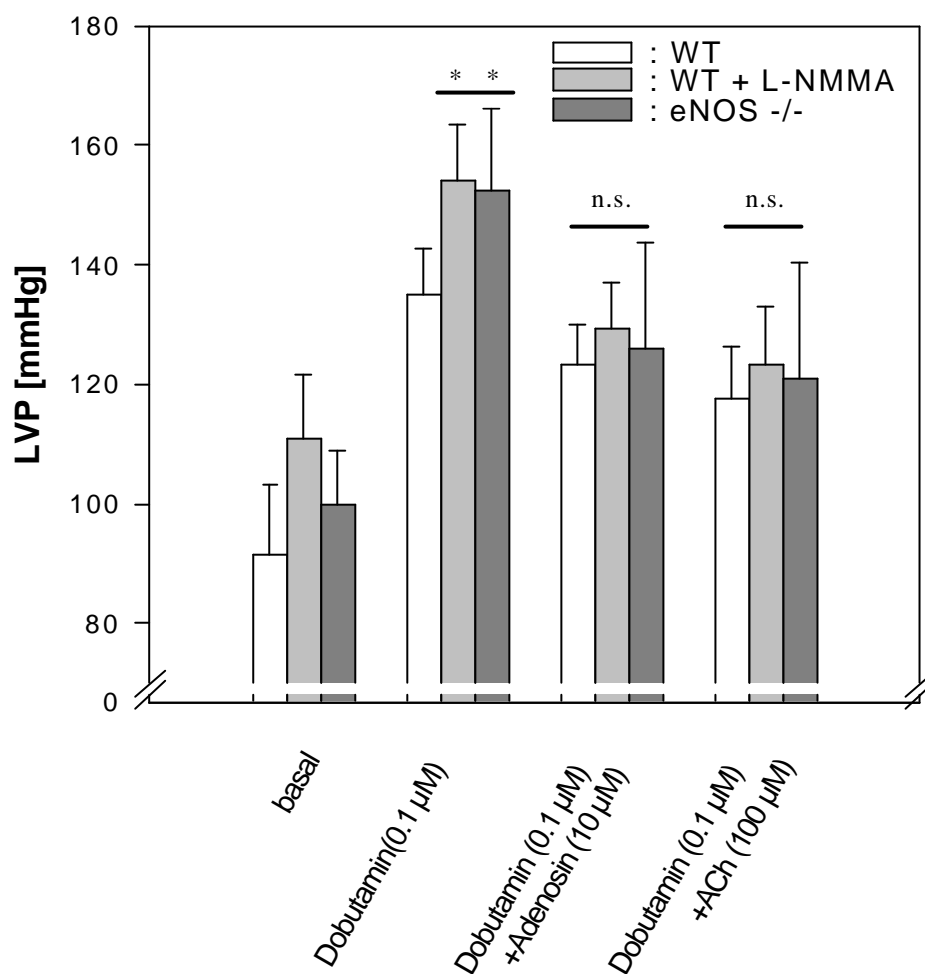


Abbildung 17: Antiadrenerge Wirkung von Adenosin und ACh bei druckkonstanter Perfusion und elektrische Stimulation (600 bpm). Datenpaare repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=6 Experimenten in jeder Gruppe; * $p < 0,02$ (vs basal).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde an retrograd salin perfundierten Mäuseherzen (Langendorff-Präparat) aus Wildtyp- und eNOS-knockout-Mäusen die Rolle der endothelialen NO-Synthase bei der Modulation der inotropen Antwort auf β -adrenerge Stimulation untersucht. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- 1) Die endotheliale NO-Synthase antagonisiert die inotrope Antwort auf β -adrenerge Stimulation.
- 2) Diese Hemmung kann sowohl parakrin als auch autokrin erfolgen, da etwa 20% der eNOS-Expression in Kardiomyozyten lokalisiert sind.
- 3) Die antiadrenerge Wirkung von ACh und Adenosin wird in Mäuseherzen nicht durch eine eNOS-Aktivierung vermittelt.

Eine wesentliche Voraussetzung für die hier durchgeführten Untersuchungen war die Optimierung der Druckmessung am Langendorff-Herzen der Maus. Dabei stellte sich heraus, dass die Messung mit selbstgefertigten Latexballons die besten Resultate ergab. Im Gegensatz dazu führte die Messung mit einem Millar-Tip Katheter konsistent zu sehr niedrigen Druckwerten, was vermutlich auf die nicht ausreichende Füllung des linken Ventrikels zurückzuführen war. Ebenso erwiesen sich kommerziell erhältliche Latexballons, die für die Druckmessung am Mäuseherzen vertrieben werden, als ungeeignet. Die vorgefertigten Ballons passten sich nicht der Form des linken Ventrikels an, so dass es bei unterschiedlich großen Mäuseherzen zu einem unterschiedlichen Grad an Vordehnung kam. Die genaue Einstellung des end-diastolischen Druckes, als konstantes Maß für den Grad der Vordehnung war bei diesen Ballons aufgrund der Steifheit des Materials nicht möglich.

Zur Untersuchung der Funktion der eNOS bei der Modulation der Herzfunktion wurde zunächst untersucht, in welchen Zelltypen des Herzens die eNOS exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass im Mäuseherzen die eNOS nicht nur im Endothel exprimiert wird, sondern auch in Kardiomyozyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch eine Kombination aus Western-Blot Analyse und RT-PCR erstmalig ein quantitatives Maß für die zelluläre Verteilung der eNOS ermittelt: Es zeigte sich, dass etwa 20 % der gesamten kardialen eNOS in den Kardiomyozyten lokalisiert

sind. Eine kardiomyozytäre Expression der eNOS wurde qualitativ bereits für die Ratte und den Menschen beschrieben (Balligand et al., 1995; Seki et al., 1996; Wei et al., 1996). Man kann also davon ausgehen, dass die eNOS generell die Kontraktilität sowohl autokrin als auch parakrin modulieren kann.

In Western Analysen von Proteinextrakten aus Gesamt-Herz oder isolierten Kardiomyozyten konnten andere NOS-Isoformen (nNOS, iNOS) nicht nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen einerseits, dass die Expression dieser Isoformen im Herzen erheblich niedriger ist als die der eNOS. Darüber hinaus zeigen sie, dass es im Falle der eNOS^{-/-}-Herzen nicht zu einer massiven Heraufregulation der iNOS bzw. nNOS im Sinne einer Kompensation der eNOS-Defizienz kommt. Zu einer vergleichbaren Schlussfolgerung kamen auch Vandecasteele et al. (1999), die mittels semi-quantitativer PCR ebenfalls keine vermehrte Expression der anderen NOS-Isoformen nachweisen konnten. Phänotypische Veränderungen der NO-Wirkung an eNOS^{-/-}-Herzen können daher im wesentlichen auf die eNOS-Defizienz zurückgeführt werden.

Die Untersuchung der myokardialen Kontraktilität ergab unter basalen Bedingungen ähnliche Werte für LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} in WT und eNOS^{-/-}-Herzen. Im Gegensatz dazu war die inotrope Antwort auf Katecholamingabe in eNOS^{-/-}-Herzen gesteigert. Dies äußerte sich in einer signifikant höheren Kontraktilität und auch Relaxation bei eNOS^{-/-}-Herzen. Interessanterweise führte akute NOS-Hemmung mit dem nicht-selektiven Inhibitor L-NMMA zu quantitativ ähnlichen Veränderungen wie die genetische Inaktivierung der eNOS, ein Argument dafür, dass die myokardiale Kontraktilität im wesentlichen durch die eNOS moduliert wird. Diese Befunde sind mit Daten von Gyurko et al. (2000) konsistent. Diese Autoren fanden bei der Untersuchung eines unabhängig erzeugten Stammes von eNOS^{-/-} Mäusen (Huang et al., 1995) ebenfalls keine Veränderungen der kardialen Kontraktilität unter basalen Bedingungen, aber ebenfalls deutlich höhere Werte bei maximaler β -adrenerger Stimulation. Bei β -adrenerger Stimulation wird mit der eNOS-Aktivierung also ein endogener Mechanismus aktiviert, der das Ausmaß der positiv inotropen Wirkung balanciert.

Über welche Mechanismen wird eine NO-Ausschüttung durch Katecholamine gesteigert? Infolge der β -adrenergen Stimulation stellt sich in den Kardiomyozyten eine gesteigerte mittlere Ca^{2+} -Konzentration ein, die über die bekannte Ca^{2+} -Abhängigkeit die eNOS aktivieren könnte. Ein

solcher Mechanismus wäre in Analogie zu Befunden von Finkel et al. (1995) zu sehen, die die negative Kraft-Frequenz-Beziehung elektrisch stimulierter Papillarmuskelpräparate auf eine Aktivierung der eNOS in Kardiomyozyten über eine Steigerung der mittleren Ca^{2+} -Konzentration zurückführten. Da β -adrenerge Stimulation über eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration wirkt, wäre es ebenfalls denkbar, dass eine Erhöhung der NOS-Aktivität über eine PKA-abhängige Phosphorylierung erfolgt, die zur Steigerung der NOS-Aktivität führt. Dieser Regulationsmechanismus würde sowohl zu einer gesteigerten endothelialen NO-Freisetzung als auch zu einer erhöhten kardiomyozytären NO-Synthese führen, denn in beiden Zelltypen wurde eine cAMP-Erhöhung bei β -adrenerger Stimulation nachgewiesen (Kelly et al., 1996). NO könnte also in autokriner und parakriner Weise die Kontraktionskraft des Myokards bei β -adrenerger Stimulation beeinflussen. Neuere Befunde deuten darauf hin, dass eine direkte Kopplung β -adrenerger Stimulation an den NO/cGMP-Signaltransduktionsweg besteht. So wurde an Muskelpräparaten aus humanem Myokard gezeigt, dass Stimulation myokardialer β_3 -Rezeptoren über eine eNOS-Aktivierung einen negativ inotropen Effekt ausübt (Kohout et al., 2001). Dass diesem Mechanismus eine wesentliche Rolle bei der Induktion des negativen Feed-Back-Mechanismus bei β -Rezeptor-Stimulation zukommt, zeigen β_3 -Rezeptor-defiziente Mäuse, die eine reduzierte NOS-Aktivierung und eine gesteigerte inotrope Antwort der Herzen auf Isoproterenol aufweisen (Varghese et al., 2000).

Stimulation der β -Rezeptoren führt in einem G_s -Protein-gesteuerten Prozess zur Steigerung der Aktivität der Adenylatzyklase. cAMP wiederum aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase, die u.a. die spannungsabhängigen L-type Ca^{2+} -Kanäle phosphoryliert und damit zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom führt. NO wiederum, das in die Zelle eingetreten ist oder intrazellulär gebildet wird, aktiviert die lösliche Guanylat-Zyklase, wodurch das cGMP im Kardiomyozyten ansteigt. cGMP aktiviert einerseits die cGMP-abhängigen Proteinkinasen und moduliert andererseits die Aktivität von Phosphodiesterasen. Im Herzen werden vor allem die cGMP-stimulierbare PDE2 und die cGMP-hemmbar PDE3A exprimiert. Beide besitzen eine spezifische Aktivität für cAMP, so dass bei einer Hemmung der PDE3A durch cGMP ein cAMP-Anstieg, bei Aktivierung der PDE2 aber ein cAMP-Abfall erfolgt. Die Aktivierung der PDE2 könnte demnach ein Mechanismus sein, über den NO die Steigerung der Kontraktionskraft reduziert. Untersuchungen mit dem PDE2-Inhibitor MEP2 (Coffey et al., 1984) führten in dieser Arbeit zu keiner Veränderung der Kontraktilität bei β -adrenerger

Stimulation. Damit ist eine Beteiligung der PDE2 an dem beobachteten negativ inotropen Effekt der eNOS eher unwahrscheinlich.

Es wurde verschiedentlich berichtet, dass NO die Ca^{2+} -Sensitivität von Kardiomyozyten beeinflussen kann, indem es direkt oder indirekt die Funktion von Proteinen moduliert, die zusammen das Ausmaß der Ca^{2+} -Transienten bestimmen (z.B. Phospholamban, Ryanodin-Rezeptor), (Bartel et al., 1995). Darüber hinaus könnte auch die Ca^{2+} -abhängige Funktion der Myofilamente z.B. durch cGKI-vermittelte Phosphorylierung des Troponin I eingeschränkt sein (Shah et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit löste die Rezeptoren-unabhängige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Steigerung der Kontraktilität aus, die in WT- und eNOS^{-/-}-Herzen ein gleiches Ausmaß erreichte.

Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass das Ziel der NO-Wirkung zwischen dem β -Rezeptor und den Ca^{2+} -Kanälen liegt. Der genaue Mechanismus der Hemmwirkung ist bisher allerdings nicht geklärt.

Weiterführende Untersuchungen über diese Arbeit hinaus ergaben, dass im Gegensatz zu dem klaren antiadrenergen Effekt der eNOS auf der Ebene des Herzens, keine Veränderung des Ca^{2+} -Einstroms über den L-type Ca^{2+} -Kanal an isolierten Kardiomyozyten nachweisbar war (Gödecke et al., 2001). Sowohl der basale als auch der dosisabhängige Anstieg des $I_{\text{Ca-L}}$ bei Gabe des β -Agonisten Isoproterenol war in WT- und eNOS^{-/-}-Zellen nicht unterschiedlich. Diese deutet darauf hin, dass zur Modulation der β -adrenergen inotropen Wirkung die eNOS-Aktivität in den Kardiomyozyten nicht ausreicht. Vielmehr scheint die eNOS vor allem auf parakrinem Wege die Kontraktilität durch NO zu modulieren, das vom Endothel freigesetzt wird. Diese Annahme könnte auch die Ergebnisse von Vandecasteele et al. (1999) erklären, die eine unveränderte inotrope Antwort an Papillarmuskeln von WT- und eNOS^{-/-}-Mäusen nachgewiesen haben. Da die Fluss-abhängige Zunahme der Wandschubspannung bekanntermaßen ein wesentlicher Aktivator der eNOS-Aktivität ist, kann man davon ausgehen, dass dieser wichtige Stimulus im Gegensatz zu den Langendorff-Herzen bei den nicht perfundierten Papillarmuskeln fehlt. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Papillarmuskel-Präparate eine limitierte Sauerstoffversorgung aufwiesen, da sie nur maximale Stimulationsraten von 240 min^{-1} ertrugen. Dieser Wert liegt weit unter der basalen

Herzfrequenz einer Maus (ca. 550 min⁻¹) und unter der in dieser Arbeit verwendeten Stimulationsfrequenz von 600 min⁻¹.

Die Möglichkeit, dass β -adrenerge Stimulation der eNOS in Kardiomyozyten bei Belastung eine erhöhte NO-Freisetzung aus Kardiomyozyten auslösen könnte, legt das interessante Konzept nahe, dass auf diesem Wege vom Kardiomyozyten ein NO-vermitteltes Signal zur Relaxation auf die glatten Gefäßmuskelzellen und damit zur Vasodilatation ausgehen könnte. Nach dieser Überlegung könnte die Aktivierung der kardiomyozytären eNOS durch eine Flusserhöhung dazu beitragen, den erhöhten Sauerstoffbedarf des Herzens zu decken. Die Untersuchung der Steigerung des Koronarflusses infolge eines Dobutamin vermittelten Anstieges der Kontraktionskraft ergab keinen Unterschied zwischen WT- und eNOS^{-/-}-Herzen. Ein entsprechender parakriner Effekt der eNOS auf den Koronarfluss ist nicht nachweisbar.

Zusammengenommen bestätigen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass die eNOS ein wesentlicher Modulator der β -adrenergen inotropen Stimulierbarkeit des Herzens darstellt. Damit bestätigen diese Daten die Rolle von NO, die bereits mit Hilfe nicht selektiver NOS-Inhibitoren an Kardiomyozyten der Ratte sowie am Herzen des Menschen und des Hundes in situ erhalten worden waren. Darüber hinaus weist der Befund, dass die spezifische genetische Inaktivierung der eNOS und die nicht selektive pharmakologische Hemmung aller NOS-Isoformen zu Veränderungen quantitativ ähnlichen Ausmaßes führen, darauf hin, dass die eNOS die entscheidende NOS-Isoform darstellt, die diese Effekte ausübt.

Die Rolle der eNOS als Mediator des antiadrenergen Effekts von NO wurde in der Vergangenheit in einer Vielzahl experimenteller Modelle wie isolierten Kardiomyozyten und Papillarmuskeln bis hin zum Hundeherzen in situ untersucht. Dabei wurden Ergebnisse erzielt, die eine Funktion der eNOS als nachgeschalteten Effektor muskarinischer Signaltransduktion entweder belegten (Balligand et al., 1993; Hare et al., 1995; Han et al., 1996) oder ihr widersprachen (MacDonell et al., 1995; Kilter et al., 1995; Vandecasteele et al., 1999). Ein starkes Argument für eine Rolle der eNOS schien 1998 durch Han et al. geliefert worden zu sein. Die Autoren zeigten, dass die antiadrenerge Wirkung von Acetylcholin bei isolierten Kardiomyozyten aus eNOS-knockout-Mäusen vollständig aufgehoben war (Han et al., 1998). Überraschenderweise zeigten Vandecasteele et al., dass in isolierten Kardiomyozyten aus eNOS-knockout-Mäusen der antiadrenerge Effekt von Carbachol vollständig

intakt war (Vandecasteele et al., 1999). Generell könnten derartig ausgeprägte phänotypische Unterschiede in der Strategie zur Erzeugung der knockout-Maus oder auf einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund zurückzuführen sein. Allerdings entfallen in diesem speziellen Fall beide Möglichkeiten, da die Zellen, die Han et al. bzw. Vandecasteele et al. verwendet haben aus demselben Stamm von eNOS-knockout-Mäusen (Huang et al. 1995) gewonnen worden waren. Meine Ergebnisse zeigen an einem unabhängig erzeugten Stamm von eNOS^{-/-}-Mäusen (Gödecke et al. 1998), dass der antiadrenerge Effekt von Acetylcholin auf der Ebene des intakten Herzens weder bei genetischer Inaktivierung der eNOS noch bei pharmakologischer NOS Blockade verändert ist. Ebenso war die antiadrenerge Wirkung von Adenosin unverändert. In die gleiche Richtung deuten Experimente zur Messung des I_{Ca-L} an isolierten Kardiomyozyten des in dieser Arbeit verwendeten eNOS^{-/-}-Stammes: Auch auf zellulärer Ebene zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Carbachol-vermittelten antiadrenergen Wirkung auf den Isoproterenol-induzierten I_{Ca-L} .

Neuere Arbeiten weisen ebenfalls daraufhin, dass der NO-cGMP-Weg am adulten Herzen keine wesentliche Rolle bei der parasympathischen Modulation der β -adrenergen Inotropiesteigerung spielt. So zeigen Langendorff-Herzen aus Mäusen mit herzspezifischer Überexpression der eNOS eine quantitativ gleiche antiadrenerge Wirkung von Acetylcholin wie die WT-Kontrollen (Brunner et al., 2001). Dies zeigt, dass unter Bedingungen einer stark gesteigerten eNOS Aktivität Acetylcholin in derselben Weise wirkt wie in WT-Herzen und macht dadurch die Beteiligung der eNOS an der ACh-vermittelten Signaltransduktion zur Senkung der β -adrenergen Inotropie-Steigerung unwahrscheinlich. Die Sichtweise, dass die eNOS keine Rolle bei der Vermittlung des antiadrenergen Effekts von ACh spielt, wird auch durch Untersuchungen von Wegener et al. unterstützt: In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in knockout-Mäusen mit defekter cGKI der antiadrenerge Effekt von ACh in Kardiomyozyten vollständig erhalten ist (Wegener et al., 2001). Auch auf der Ebene des nachgeschalteten Effektors des NO-cGMP-Weges konnte so keine Bestätigung für das Konzept erhalten werden, dass NO bei der parasympathischen Modulation der sympathischen Inotropiesteigerung eine Rolle spielt.

Wie lassen sich die diskrepanten Ergebnisse erklären? Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse von Han et al. einerseits und Vandecasteele und dieser Arbeit andererseits könnte auf altersabhängige Veränderungen des muskarinischen Signaltransduktionsweges liegen. So benutzten Han et al. 2-3 Monate alte Mäuse, während von Vandecasteele et al. und in dieser Arbeit Mäuse im

Alter von 3-6 Monaten benutzt wurden. So vermuteten Hare und Stamler (1999), dass eine mit fortschreitendem Alter zunehmende Kompensation des eNOS-Defekts für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnte. Eine weitere Erklärung könnte sich aus den Befunden von Ji et al. (1999) ergeben. Diese Autoren zeigten, dass die Signaltransduktionswege zur parasymphathischen Modulation des kardialen I_{Ca-L} während der fortschreitenden Differenzierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen umgeschaltet werden: In frühen Differenzierungsstadien wurde die β -adrenerge Signaltransduktion überwiegend über den NO-cGMP-Phosphodiesterase-Weg moduliert. Im Gegensatz dazu erfolgte in späteren Stadien, die adulten Kardiomyozyten ähneln, eine eindeutige Hemmung der cAMP-Bildung durch Aktivierung der G_i -Proteine. Der Vergleich von Kardiomyozyten aus jungen bzw. adulten eNOS^{-/-}-Mäusen könnte Aufschluss darüber geben, ob dieses Prinzip, das bei der in vitro Differenzierung nachgewiesen wurde, sich auch auf das sich entwickelnde Mausherz übertragen lässt.

5 Literaturverzeichnis

- Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615.
- Auffray, C., Rougeon, F. (1980). Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur J Biochem.* 107, 303-314.
- Balligand, J. L., Kelly, R. A., Marsden, P. A., Smith, T. W. and Michel, T. (1993). Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 347-351.
- Balligand, J. L., Kobzik, L., Han, X., Kaye, D. M., Belhassen, L., O'Hara, D. S., Kelly, R. A., Smith, T. W. and Michel, T. (1995). Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 14582-14586.
- Bartel, S., Willenbrock, R., Haase, H., Karczewski, P., Wallukat, G., Dietz, R., Krause, E.-G. (1995). Cyclic GMP-mediated phospholamban phosphorylation in intact cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214, 75-80.
- Belhassen, L., Kelly, R. A., Smith, T. W., Balligand, J. L. (1996). Nitric oxide synthase (NOS3) and contractile responsiveness to adrenergic and cholinergic agonists in the heart. *J. Clin. Invest.* Volume 97, number 8, 1908-1915.
- Brady, A. J., Poole-Wilson, P. A., Harding, S. E. and Warren, J. B. (1992). Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am. J. Physiol.* 263, H1963-H1966.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R. and Snyder, S. H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351, 714-718.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 682-685.
- Brunner, F., Andrew, P., Wolkart, G., Zechner, R., Mayer, B. (2001). Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 104, 3097-102.
- Coffey, R. G., Hartley, L., Polson, J. B., Krzanowski, J. J., Hadden, J. W. (1984). Selective inhibition by NPT 15392 of lymphocyte cyclic GM phosphodiesterase. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3411-7.

- Cotton, J. M., Kearney, M. T., MacCarthy, P. A., Grocott-Mason, R. M., McClean, D. R., Heymes, C., Richardson, P. J. and Shah, A. M. (2001). Effects of nitric oxide synthase inhibition on basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. *Circulation* 104, 2318-2323.
- Finkel, M. S., Oddis C. V., Jacob, T. D., Watkins, S. C., Hattler, B. G., Simmons, R. L. (1992). Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257:387-389.
- Finkel, M. S., Oddis, C. V., Mayer, O. H., Hattler, B. G., Simmons, R. L. (1995). Nitric oxide synthase inhibitor alters papillary muscle force-frequency relationship. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272:945-952.
- Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E. I. and Kleinert, H. (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1321-1332.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Gödecke, A., Decking, U. K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Bidmon, H. J., Gödecke, S. and Schrader, J. (1998). Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ. Res.* 82, 186-194.
- Gödecke, A., Flögel, U., Zanger, K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Decking, U. K. and Schrader, J. (1999). Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10495-10500.
- Gödecke, A., Heinicke, T., Kamkin, A., Kiseleva, I., Strasser, R. H., Decking, U. K., Stumpe, T., Isenberg, G. and Schrader, J. (2001). Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *J. Physiol* 532, 195-204.
- Gödecke, A. and Schrader, J. (2000). Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice lessons from eNOS and myoglobin knockout mice. *Basic. Res. Cardiol.* 95, 492-498.
- Grocott-Mason, R., Anning, P., Evans, H., Lewis, M. J. and Shah, A. M. (1994 a). Modulation of left ventricular relaxation in isolated ejecting heart by endogenous nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 267, H1804-H1813.
- Grocott-Mason, R., Fort, S., Lewis, M. J. and Shah, A. M. (1994 b). Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting hearts. *Am. J. Physiol.* 266, H1699-H1705.
- Gyurko, R., Kuhlencordt, P., Fishman, M. C. and Huang, P. L. (2000). Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am. J. Physiol.* 278, H971-H981.
- Han, X., Kobzik, L., Balligand, J. L., Kelly, R. A. and Smith, T. W. (1996). Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca²⁺ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ. Res.* 78, 998-1008.

- Han, X., Kubota, I., Feron, O., Opel, D. J., Arstall, M. A., Zhao, Y. Y., Huang, P., Fishman, M. C., Michel, T., Kelly, R. A. (1998). Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte I_{Ca-L} is absent in mice with target disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Vol. 95, 6510-6515.
- Hare, J. M., Loh, E., Creager, M. A., Colucci, W. S. (1995). Nitric oxide inhibits the positive inotropic response to β -adrenergic stimulation in human with left ventricular dysfunction. *Circulation* 92, 2198-2203.
- Hare, J. M., Stamler, J. S. (1999). NOS: Modulator, not mediator of cardiac performance. *Nature Med.* 5, 273-274.
- Horackova, M., Armour, J. A., Hopkins, D. A., Huang, M. H. (1995). Nitric oxide modulates signaling between cultured adult peripheral cardiac neurons and cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 269, C504-10.
- Huang, P. L., Dawson, T. M., Brecht, D. S., Snyder, S. H. and Fishman, M. C. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75, 1273-1286.
- Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A. and Fishman, M. C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239-242.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 9265-9269.
- Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B. and Bloch, K. D. (1992). Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267, 14519-14522.
- Ji, G. J., Fleischmann, B. K., Bloch, W., Feelisch, M., Andressen, C., Addicks, K., Hescheler, J. (1999). Regulation of L-type Ca^{2+} channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J.* 13, 313-324.
- Keaney, J. F., Hare, J. M., Balligand, J. L., Loscalzo, J., Smith, T. W. and Colucci, W. S. (1996). Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol.* 271, H2646-H2652.
- Kelm, M., Schafer, S., Dahmann, R., Dolu, B., Perings, S., Decking, U. K., Schrader, J. and Strauer, B. E. (1997). Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation. *Cardiovasc. Res.* 36, 185-194.
- Kelm, M. and Schrader, J. (1990). Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ. Res.* 66, 1561-1575.
- Kibbe, M., Billiar, T., Tzeng, E. (1999). Inducible nitric oxide and vascular injury. *Cardiovasc Res.* 43, 650-7.

- Kilter, H., Lenz, O., La Rosee, K., Flesch, M., Schwinger, R. H., Madge, M., Kuhn-Regnier, F., Bohm, M. (1995). Evidence against a role of nitric oxide in the indirect negative inotropic effect of M-cholinoceptor stimulation in human ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 352, 308-12.
- Kirstein, M., Rivet-Bastide, M., Hatem, S., Benardeau, A., Mercadier, J. J. and Fischmeister, R. (1995). Nitric oxide regulates the calcium current in isolated human atrial myocytes. *J. Clin. Invest* 95, 794-802.
- Kohout, T. A., Takaoka, H., McDonald, P. H., Perry, S. J., Mao, L., Lefkowitz, R. J., Rockmann, H. A. (2001). Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation* 104, 2485-91.
- Kojda, G., Kottenberg, K., Nix, P., Schluter, K. D., Piper, H. M. and Noack, E. (1996). Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 78, 91-101.
- Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Brecht, D. S. and Snyder, S. H. (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 6711-6715.
- MacDonell, K. L., Tibbits, G. F., Diamond, J. (1995). cGMP elevation does not mediate muscarinic agonist-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 269, 1905-1912.
- Mery, P. F., Pavoine, C., Belhausen, L., Pecker, F., Fischmeister, R. (1993). Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanyl cyclase activation. *Journal of Biological Chemistry* 268, 26286-26295.
- Michel, T. and Lamas, S. (1992). Molecular cloning of constitutive endothelial nitric oxide synthase: evidence for a family of related genes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 Suppl 12, S45-S49.
- Mohan, P., Sys, S. U., and Brutsaert, D. L. (1995). Positive inotropic effect of nitric oxide in myocardium. *Int. J. Cardiol.* 50, 233-237.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- Paulus, W. J., Frantz, S. and Kelly, R. A. (2001). Nitric oxide and cardiac contractility in human heart failure: time for reappraisal. *Circulation* 104, 2260-2262.
- Piper, H. M., Volz, A., Schwarz, P. (1990). Adult ventricular rat heart muscle cells. In Piper HM ed. Cell culture techniques in heart and vessel research. Heidelberg, FRG. *Springer Verlag*: 36-60.
- Seki, T., Hagiwara, H., Naruse, K., Kadowaki, M., Demura, H., Hirose, S., Naruse, M. (1996). In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocyte. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 218, 601-605.
- Shah A. M., Spurgeon H. A., Sollot S. J., Talo A., Lakatta E. G. (1994). 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocyte. *Circ. Res.* 74, 970-978.

- Smith, J. A., Shah, A. M. and Lewis, M. J. (1991). Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J. Physiol* 439, 1-14.
- Sterin-Borda, L., Echague, A. V., Leiros, C. P., Genaro, A. and Borda, E. (1995). Endogenous nitric oxide signalling system and the cardiac muscarinic acetylcholine receptor-inotropic response. *Br. J. Pharmacol.* 115, 1525-1531.
- Takita, T., Ikeda, J., Sekiguchi, Y., Demachi J., Li, S. L. and Shirato, K. (1998). Nitric oxide modulates sympathetic control of left ventricular contraction in vivo in the dog. *J. Auton. Nerv. Syst.* 71, 69-74.
- Vandecasteele, G., Eschenhagen, T., Scholz, H., Stein, B., Verdi, I., Fischmeister, R. (1999). Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nature medicine*, Vol. 5, Number 3.
- Wegener, J. W., Nawrath, H., Wolfgruber, W., Kuhbandner, S., Werner, D., Hofmann, F., Feil, R. (2002). cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ. Res.* 90, 18-20.
- Weyrich, A. S., Ma, X. L., Buerke, M., Murohara, T., Armstead, V. E., Lefer, A. M., Nicolas, J. M., Thomas, A. P., Lefer, D. J. and Vinten-Johansen, J. (1994). Physiological concentrations of nitric oxide do not elicit an acute negative inotropic effect in unstimulated cardiac muscle. *Circ. Res.* 75, 692-700.
- Wie, C. M., Jiang, S. W., Lust, J. A., Daly, R. C., McGregor, C. G. A. (1996). Genetic expression of endothelial nitric oxide synthase in human atrial myocardium. *Mayo Clin. Proc.* 74, 346-350.
- Wyeth, R. P., Temma, K., Seifen, E., Kennedy, R. H. (1996). Negative inotropic actions of nitric oxide require high doses in rat cardiac muscle. *Pflügers Arch.-Eur J Physiol.* 432, 678-684.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der endothelialen NO-Synthase für die β -adrenerge inotrope Stimulierbarkeit und die antiadrenerge Wirkung von Adenosin und Acetylcholin untersucht.

Zur Analyse der eNOS-Funktionen wurden knockout-Mäuse mit spezifischen Defekt der endothelialen NO-Synthase (eNOS^{-/-}) im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen (WT) untersucht.

Western Blot und PCR-Analysen ergaben, dass die eNOS nicht nur im kardialen Endothel exprimiert wird, sondern auch in Kardiomyozyten nachgewiesen werden kann. Dabei betrug der Anteil der eNOS in den Herzmuskelzellen etwa 20% der gesamten kardialen eNOS-Expression.

Funktionelle Untersuchungen wurden in retrograd perfundierten Mäuseherzen durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass die β -adrenerge inotrope Stimulierbarkeit eNOS-defizienter Herzen ausgehend von einem gleichen Basalniveau für den LVP bzw. die dp/dt_{max} signifikant gesteigert ist. Die genauen Mechanismen für die eNOS-vermittelte Hemmung sind bisher ungeklärt, doch konnte hier eine veränderte Ca^{2+} -Empfindlichkeit des kontraktile Apparats und eine Beteiligung der Phosphodiesterase II ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob NO und speziell eine eNOS-Aktivierung ein essentielles Element für die antiadrenerge Wirkung von Adenosin und Acetylcholin darstellt. Untersuchungen an eNOS-defizienten Herzen zeigten keine Veränderung der antiadrenergen Wirkungen von Adenosin und Acetylcholin. Prinzipiell gleiche Ergebnisse wurden an WT-Herzen unter NOS-Hemmung mit L-NMMA erhalten.

Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die endotheliale NO Synthase bei β -adrenerger Stimulation im Herzen aktiviert wird und die inotrope Antwort des Herzen auf Katecholamine balanciert. Dieser Effekt kann sowohl parakrin durch endothelial gebildetes NO als auch autokrin durch die eNOS in Kardiomyozyten vermittelt werden. Es besteht aber keine Beteiligung von NO bzw. der eNOS an dem antiadrenergen Effekt von Adenosin und Acetylcholin.

7 Lebenslauf

Name Heinicke
Vorname Thomas
Geb. 16.07.1964 in Ratingen
Familienstand verheiratet, 3 Kinder

Schulbildung

05/70 bis 07/74 Albert-Schweitzer-Grundschule, Ratingen
08/74 bis 06/83 Theodor-Heuss-Gymnasium, Ratingen
Abschluss Abitur
09/83 bis 12/ 84 Zivildienst in der Werkstätte für Behinderte,
Ratingen
09/85 bis 05/94 Medizinstudium an der
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Praktisches Jahr an den Städtischen
Krankenanstalten Krefeld, Wahlfach Anästhesie
09/94 bis 03/96 AiP in der chirurgischen Abteilung des
St. Josef-Hospitals Cloppenburg
03/96 bis 03/97 Anstellung als Assistenzarzt in der
chirurgischen Praxis Abdel-Hadi in Dortmund
05/97 bis 04/98 Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft
im Rahmen der Promotionsarbeit am Institut für
Herz- und Kreislaufforschung Prof. Dr. Schrader,
Uni Düsseldorf
05/98 bis 06/99 Assistenzarzt Chirurgie am Marien-Hospital,
Dortmund
Seit 06/99 Assistenzarzt am Klinikum Niederberg, Velbert
10/2001 Gebietsbezeichnung Facharzt für Chirurgie
Seit dem Weiterbildungsassistent im Schwer-
punkt Unfallchirurgie

8 Veröffentlichungen

T. Heinicke: Koronare Hämodynamik und Kontraktilität am salin-perfundierten Herzen (Langendorff). Workshop: Erfassung physiologischer Parameter des Herz-Kreislaufsystems in Mäusen, 26. Februar 1998 in Knechtsteden/ Düsseldorf.

Gödecke, A., Heinicke, T., Kamkin, A., Kiseleva, I., Strasser, R. H., Decking, U. K., Stumpe, T., Isenberg, G. and Schrader, J. (2001). Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *J. Physiol* 532, 195-204.