

Aus dem Institut für
Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Untersuchungen zur renalen Regulation des Endothelinsystems
und zur nephroprotektiven Wirkung von Darusentan im Modell der
salzsensitiven hypertensiven SABRA Ratte**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Maïke Dieterich
aus München

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Kreutz
2. Priv.-Doz. Dr. med. J. Beige
3. Prof. Dr. med. M. Tepel

Datum: 23.03.2007

Meinen Eltern

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG</u>	6
1.1	<u>Hypertonie und Nierenfunktion</u>	7
1.2	<u>Morphologie der hypertensiven Nephropathie</u>	8
1.3	<u>Blutdruckregulation und Kochsalzeinfluss</u>	9
1.4	<u>Endothelinsystem</u>	11
1.4.1	<u>Biosynthese des Endothelins</u>	11
1.4.2	<u>Endothelinrezeptoren</u>	14
1.4.3	<u>Endothelinrezeptorantagonisten</u>	16
1.5	<u>Endothelin und Hypertonie</u>	17
1.6	<u>Untersuchungen des Endothelin Systems in hypertensiven Tiermodellen</u>	17
1.7	<u>Tiermodell der Sabra-Ratte</u>	18
1.8	<u>Zielsetzung</u>	20
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	21
2.1	<u>Versuchstiere</u>	21
2.1.1	<u>Tiermodell</u>	21
2.1.2	<u>Haltung und Diät</u>	21
2.2	<u>Methoden</u>	22
2.2.1	<u>Messung physiologischer Parameter</u>	22
2.2.2	<u>Morphologische Untersuchung der Nieren</u>	23
2.2.3	<u>Northern blot</u>	24
2.2.4	<u>Scatchard-Bindungsanalyse</u>	29
2.2.5	<u>Statistische Analyse</u>	34
<u>3</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	35
3.1	<u>Arterieller Blutdruck</u>	35
3.2	<u>Körpergewicht und Nierengewicht</u>	36
3.3	<u>Albuminurie</u>	37
3.4	<u>Natrium- und ET-1-Konzentration im Urin</u>	38
3.5	<u>Glomerulosklerose-Index und tubulointerstitieller Schädigungsindex</u>	39
3.6	<u>Northern Blot-Analyse</u>	44
3.6.1	<u>Expression der renalen Osteopontin mRNA</u>	44
3.6.2	<u>Expression der renalen ET_A- und ET_B-Rezeptor mRNA</u>	47
3.7	<u>Endothelinrezeptordichte</u>	49
3.7.1	<u>ET_A-Rezeptordichte</u>	51
3.7.2	<u>ET_B-Rezeptordichte</u>	52
3.7.3	<u>ET_A/ET_B Verhältnis</u>	53
3.7.4	<u>Rezeptoraffinität</u>	54

<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	55
<u>4.1</u>	<u>Entwicklung des Bluthochdrucks und seiner Folgeerscheinungen</u>	57
<u>4.2</u>	<u>Endothelinausscheidung und Natriurese</u>	59
<u>4.3</u>	<u>Osteopontin mRNA Expression</u>	60
<u>4.4</u>	<u>Die Regulation der Endothelinrezeptoren</u>	61
<u>4.5</u>	<u>Der Einfluss einer ET_A-Rezeptorblockade</u>	63
<u>4.6</u>	<u>Perspektiven</u>	64
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	66
<u>6</u>	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	68
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	70
<u>8</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	84
<u>9</u>	<u>PUBLIKATIONEN</u>	85
<u>10</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	86
<u>11</u>	<u>ANHANG</u>	87
<u>11.1</u>	<u>Material</u>	87
<u>11.1.1</u>	<u>Geräte, Hilfsmittel</u>	87
<u>11.1.2</u>	<u>Chemikalien, Peptide und Proteine</u>	88
<u>11.1.3</u>	<u>Sonden, Primer und Nukleinsäuren</u>	89
<u>11.1.4</u>	<u>Lösungen und Puffer</u>	90

5 Zusammenfassung

Die Sabra-Ratten stellen ein Tiermodell mit genetisch determinierter salzabhängiger Hypertonie dar. Wir testeten den Effekt einer selektiven ET_A -Rezeptorblockade auf die Blutdruckerhöhung sowie auf die Nierenschädigung bei der salzbelasteten SBH/y Ratte.

Sowohl Tiere der salzsensitiven (SBH/y), als auch Ratten der salzresistenten Linie (SBN/y) wurden entweder unbehandelt mit normalem Futter versorgt, oder mit DOCA und Salz behandelt. Zusätzlich zur DOCA-Salz Belastung erhielten Vertreter beider Linien den selektiven ET_A -Rezeptorblocker Darusentan.

Die renale ET-1 Ausscheidung und die Natriuresis erhöhten sich als Folge der Salzbelastung sowohl bei den salzresistenten SBN/y Ratten als auch bei den salzsensitiven SBH/y Tieren. Die Blockade des ET_A -Rezeptors zeigte in beiden Linien keine Veränderung der Natrium- und ET-1-Konzentration im Urin.

Die ET_A - Rezeptordichte war bei den salzbelasteten SBH/y Ratten signifikant erhöht, wohingegen beim ET_B -Rezeptor keine Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen waren. Das Verhältnis von ET_A - zu ET_B -Rezeptor war in der SBH/y Gruppe mit Salzbehandlung signifikant erhöht.

Bei den salzbelasteten SBH/y Tieren stieg einerseits der Blutdruck erwartungsgemäß signifikant an, andererseits erhöhte sich die Albuminurie um das 23fache im Vergleich zur SBH/y Gruppe ohne DOCA-Salzbehandlung. Die Ratten der salzresistenten SBN/y Linie zeigten unter Salzbelastung keine Veränderung hinsichtlich Blutdruck und Albuminurie. Durch Darusentan wurden die Blutdruckerhöhung und die Albuminausscheidung im Urin bei den SBH/y Tieren unter DOCA-Salzbelastung signifikant vermindert.

Die DOCA-Salz Behandlung hatte bei den SBH/y Tieren außerdem eine Schädigung der Niere zur Folge. Diese wurde durch die gestiegene renale Osteopontinexpression sowie durch die erhöhte glomeruläre und tubulointerstitielle Schädigung deutlich. Die Nierenschädigung konnte durch Darusentan ebenfalls verhindert werden.

Mit diesen Daten konnte die positive Wirkung einer chronischen ET_A-Rezeptorblockade auf die arterielle Hypertonie und die Nierenschädigung unter Salzbelastung bei diesem Tiermodell demonstriert werden.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
AGEs	Advanced glycation end products
ANOVA	Analysis of variance
ANG II	Angiotensin II
B	Bound
BP	Bindungspuffer
Big-ET	Prepro-Endothelin
C	Celsius
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	Komplementär-DNA
cpm	Zerfälle pro Minute; counts per minute
d	Desoxy
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
ECE	Endothelin-Konversionsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E _{max}	Maximale Wirkung
ENaC	Epithelialer Na ⁺ -Kanal
ET	Endothelin
ET _A	Endothelin Typ _A -Rezeptor
ET _B	Endothelin Typ _B -Rezeptor
F	Free (Menge an ungebundenem Ligand)
FSGS	fokale und segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GSI	Glomeruloskleroseindex
h	Stunde / Stunden
HA	Humanalbumin
¹²⁵ [I]	Jod-125-Isotop
IP3	Inositol- 1,4,5,-triphosphat
k	Kilo
K _d	Dissoziationskonstante
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MWF	Munich Wistar Frömter Ratten
u.a.	unter anderem
µl	Mikroliter
n	Anzahl
NF-κB	nuclear factor- κB; Transkriptionsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
³² [P]	Phosphor-32-Isotop

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publikationen

Rothermund L, Dieterich M, Kossmehl P, Gögebakan Ö, Yagil C, Yagil Y, Vetter R, Kreutz R. (2002): Endothelin A Receptor Blockade Prevents Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction in salt-sensitive Experimental Hypertension. *Circulation* **106**, 2305-2308

Rothermund L, Traupe T, Dieterich M, Kossmehl P, Yagil C, Yagil Y, Kreutz R. (2003): Nephroprotective effects of the endothelin ET_A receptor antagonist darusentan in salt-sensitive genetic hypertension. *European Journal of Pharmacology* **468**, 209-216

Kongressbeitrag

Dieterich M, Rothermund L, Yagil Y, Yagil C, Kreutz R.

Pharmakogenetische Untersuchung des Endothelinsystems bei der salzsensitiven Sabra-Ratte

Abteilung für klinische Pharmakologie und Medizinische Klinik VI Nephrologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin

Hypertonie 2000; Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes; Deutsche Hypertonie Gesellschaft

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. med Reinhold Kreutz für die Bereitstellung des Themas, seine intensive Betreuung, Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken.

Für die sehr gute Arbeitsatmosphäre danke ich allen DoktorandInnen und MitarbeiterInnen der Abteilung, insbesondere bedanke ich mich bei Frau Heike Marckwardt für ihre motivierende Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Lars Rothermund, der diese Studie maßgeblich betreute. Ich möchte mich besonders für sein Interesse an dieser Arbeit sowie für seine geduldige Anleitung bedanken, ohne die diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Danken möchte ich nicht zuletzt meinem Bruder Holger Dieterich und Markus Wehland- von Trebra, welche mir bei manchen Schwierigkeiten und Überraschungen mit dem Computer immer aufmunternd zur Seite standen.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, da sie mir mein Studium und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

10 Anhang

10.1 Material

10.1.1 Geräte, Hilfsmittel

- Analysewaage (Sartorius AG)
- Anatomische Pinzette, 115mm
- Chirurgische Pinzette, 115mm
- Digital pH-Meter 3500 (Beckmann Instruments, Schottland)
- Eppendorf Centrifuge 5417R (Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf)
- Eppendorf Pipetten 10-100, 50-250 und 100-1000 µl (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Eppendorf Safe-Lock 2,0 und 1,5 ml Micro Test tubes (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Eppendorf Standardtips 100 und 1000 µl (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Feine Präparierschere, 120mm
- Feinwaage (Sartorius L610D, Sartorius GmbH, Göttingen)
- Filterpapier Whatman No. 3MM (Whatman, London, England)
- Gamma-Counter Multi Prias 4 (Packard, USA)
- Glasgeräte, sonstige (Braun KG, Melsungen)
- Glasröhren für die Hybridisierung (Amersham international, England, Eigenanfertigung) Hand-Homogenisator „Dounce“ (B.Braun Biotech International GmbH, Mesungen, Germany)
- Hand-Homogenisator (Dounce-Homogenisator mit Glaspistill; Braun KG, Melsungen)
- Membranfilter Porengröße 0,45 µm (Sartorius AG)
- Kamerasystem (Video) Sony MC-3255 (AVT-Horn GmbH, Aalen)
- Kodak X-OMAT AR® Röntgenfilme (Eastman Kodak Company, USA)
- Kühlzentrifuge 5417 R (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Küvette für Photometer (Zeiss, Oberkochen)

- Membran (Hybond N® Membran; Amersham International plc, Little Chalfont, England)
- Mischgerät Vortex VF2 (Janke+Kunkel GmbH+ Co KG, Ika-Werk, Staufen)
- MRX Microplate Reader (Dynex Technologies, Denkendorf)
- Non-Invasive Blood Pressure Monitor, Semi-Automatic, 209000-series (TSE Technical&Scientific Equipment, Bad Homburg)
- Phosphor imaging plate scanner BAS 1500 (Fuji Foto Film Co. Tokyo)
- Photometer Eppendorf 1101 M (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- Polaroid ®-Filme 667 Sofortbild (Fa. Piechulek, Berlin)
- Polytron® Typ PT 10203500 (kinematica GmbH, Luzern, Schweiz)
- Potter S Homogenisator (B.Braun Biotech International GmbH, Mesungen)
- Programm Scion Image 1.62a (Scion Co. Maryland USA)
- Sigmaplot 8.0 für Windows (SPSS Inc., USA)
- Sorvall Zentrifuge RC5C (Du Pont Comp., Wilmington)
- SPSS 11.0 für Windoes (SPSS Inc., USA)
- Stoffwechsellkäfig (Ehret)
- Szintillationszähler (Flüssigkeitsszintillationszähler Wallace System 1400®; Pharmacia, Turku, Finnland)
- Ultrazentrifuge TGA-50 (Kontron, Eching, Germany)
- verschiedene Gefäße von den Firmen „Greiner“ und „Eppendorf“
- Wasserstrahlabsaugung als Spezialglasforderung zur Waschung der extrahierten Proteine
- Whatman-Läufer (Whatman Filterpapier No.3mm; Whatman, London)

10.1.2 Chemikalien, Peptide und Proteine

- Agarosegel (Agarose Merck, Darmstadt)
- Bacitracin (SIGMA Chemical Company, St. Luis, USA)
- BQ123 (Calbiochem biosciences, Merck KGaA, Darmstadt)
- BQ3020 (Calbiochem biosciences, Merck KGaA, Darmstadt)
- DC Protein Assay (Bio-Rad, Kalifornien, USA)
- DEPC-Wasser (DEPC Merck, Darmstadt)
- DNA-labelling-kit rediprime® (Amersham International, England)

- DOCA (Desoxicorticosteronacetat) (Innovative Research, Tampa, Florida, USA)
- Elisa, spezifischer Antikörper zur Albuminbestimmung (ICN Biomedicals, Eschewege, Deutschland)
- Endothelin-1 (human), (BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg)
- Enzyme immunoassay für die ET-1 Messung im Urin (Immundiagnostik GmbH, Bernsheim, Deutschland)
- Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt)
- Hybridisierungsflüssigkeit (QuickHyb®-Hybridisierungsflüssigkeit Stratagne GmbH, Heidelberg)
- [125I] Tyr13-Endothelin-1 human, (NEN Live Science Products, Boston, USA)
- Lu 135252 (≈ Darusentan), (Knoll AG, Ludwigshafen)
- Mops (MOPS Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Quiagenkit (QIAquick PCP Purification Kit 250, Quiagen, Hilden, Deutschland)
- Rediprime™ random prime labelling system (Amersham Pharmacia Biotech, UK)
- Rinderserumalbumin (C. Roth GmbH&Co, Karlsruhe)
- RNase-Away® (c.Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland)
- Phenobarbital (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (Amersham Pharmacia Biotech, UK)
- Säulen (ProbeQuant™ G-50 Micro Columns, Amersham, England)
- SDS (SIGMA Chemical Company, St. Luis, USA)
- Spezifischer Rattenantikörper (ICN Biomedicals, Eschewege, Deutschland)
- Standart Rattenfutter (SSNIFF, Soest, Deutschland)
- Taq DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim)
- TRizol-Reagenz (GIBCO, Life Technologies GmbH, Eggstein)

10.1.3 Sonden, Primer und Nukleinsäuren

- GAPDH mRNA, 3541 bp, designed auf accession number BC 004319
 Primer GAPDH Sense: 5`TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT 3
 Antisense: 5`CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3

- Osteopontin mRNA, 1457 bp, designed auf accession number M14656
Primer Osteopontin Sense: 5`CTG TTC GGC CTT GCC TCC TGT CTC 3`
Antisense: 5`TGC ATC CGG CTT CTC GGC ACT ATC 3`
- ET_A mRNA Ratte, 1436 bp, designed auf accession number M60786
- Primer ET_A Sense: 5`ACG GCC CCA ATG CGC TCA TAG 3`
Antisense:5`GGA CCA GCA CAG GGC GAA GAT GAC 3`
- ET_B mRNA Ratte, 1892 bp, designed auf accession number X57764
Primer ET_B Sense: 5`GGC TGG AGT CCC GCC AAG ATC 3`
Antisense: 5`TTG CTA GCG GCA AGC AGA AGT AGA 3`
- Heringssperma-DNA (Gibco, Life Technologies)
- RNA-Leiter 0,24-9,5 Kb (Gibco BRL®, Live Technologies)
- [32P] dCTP (Amersham, England)

10.1.4 Lösungen und Puffer

Lösung	Inhaltsstoff	Menge
Loading -buffer	Glycerol EDTA (0,5 M, pH 8) Bromphenolblau Xylene Cyanol DEPC-H ₂ O	50% 1mm 0,25% 0,25% im Verhältnis 1/1000 auffüllen, autoklavieren
1fach TE Puffer	Tris HCL (pH 7,4) EDTA Aqua bidest.	5 ml 0,5 M auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren
10 fach MOPS	MOPS DEPC-H ₂ O Na-Acetat (3 M) EDTA (0,5 M, pH 8)	41,2 g 800 ml 26,7 ml 20 ml

10 fach SDS	SDS Aqua bidest.	10 g ad 1 l
20 fach TAE-Puffer	Tris (pH 7,8) Na-Acetat EDTA Aqua bidest.	193,6 g 54,4 g 14,8 g ad 2 l
20 fach SSC	NaCl (3 M) Na-Citrat (0,3 M) Aqua bidest.	876,5 g 441 g ad 5 l
Scatchard- Bindungspuffer	Tris (pH 7,4) MgCl	12,13 g 1,02 g auf 1 l auffüllen
Scatchard-Bindungspuffer mit Humanalbumin	Albumin	1 g
PBS-Puffer	Dinatrium- hydrogenphosphat Kalium- dihydrogenphosphat Natriumchlorid Aqua bidest.	2,68 g 0,43 g 7,2 g auf 1 l auffüllen

Maike Dieterich
Am Katzenstadel 6

86152 Augsburg

Campus Benjamin Franklin
Promotionskommission
Hindenburgdamm 30
12203 Berlin

Berlin, den 02. Januar 2007

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie enthält auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Maike Dieterich