

„With the advent of insulin, we moved from the era of diabetic coma to the era of diabetic complications.“

Dr. Elliot P. Joslin, 1931

A Einleitung

1. Übersicht über das Endothelinsystem

1.1. Entdeckung, Aufbau, Lokalisation und Synthese des Endothelins

Das Gefäßendothel wurde lange Zeit nur für eine passive Diffusionsbarriere gehalten, die Intra- und Extravasalraum voneinander trennt. Dieses Bild hat sich in den letzten Jahren auf Grund der Ergebnisse weltweiter intensiver Forschungsbemühungen entscheidend gewandelt. Heute gilt das Gefäßendothel als sehr stoffwechselaktives Organ mit vielfältigen Funktionen, dessen komplexe, den ganzen Organismus beeinflussenden Regelkreise in ihrer Gesamtheit erst andeutungsweise erfasst werden und noch nicht restlos geklärt sind.

Spätestens seit der Entdeckung der endothelabhängigen Vasodilatation durch FURCHGOTT und ZAWADZKI im Jahre 1980 rückte das Gefäßendothel immer mehr in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Der Mediator dieser Dilatation wurde EDRF (endothel-derived relaxing factor[s]) genannt und später als Stickoxid (NO) identifiziert (PALMER et al., 1987). Zusätzlich wurde schon frühzeitig die Existenz von vasokonstriktorisches Faktoren vermutet, die in ihrer Funktion an ein intaktes Endothel gebunden sind bzw. von diesem in ihrer Wirkung verstärkt werden. Als Auslöser für die endothelabhängige Konstriktion fanden sich verschiedene biochemische bzw. physikalische Stimuli. Dazu gehören z.B. Noradrenalin, Thrombin, Hypoxie/Anoxie, Angiotensin II, erhöhter Gefäßdruck sowie mechanischer Scherstress (DENUCCI et al., 1988; HARDER, 1987; HOLDE und MCCALL, 1984; KATUSIC et al., 1987; RUBANYI et al., 1985).

1988 gelang es YANAGISAWA et al., aus dem Überstand von kultivierten Schweineaortazellen ein bis dahin unbekanntes Peptid mit vorher in diesem Ausmaß nicht bekannter vasokonstriktorisches Potenz zu isolieren und seine Aminosäuresequenz zu entschlüsseln. Es gehörte zu keiner der bis dahin bekannten Peptidfamilien. Mit Blick auf seine Herkunft wurde das Peptid ENDOTHELIN (ET) genannt. Es besteht aus 21 Aminosäuren und enthält 2 Disulfidbrücken, seine Molmasse beträgt 2,5 kDa. Außerdem gelang es, die Vorstufe des

Endothelins, das Präpro-Endothelin zu klonen. Da sich die vasokonstriktorisches Effekte nicht durch den Einsatz verschiedener Antagonisten blockieren ließen, wurde ein direkter Wirkmechanismus an der glatten Muskelzelle vermutet. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen, dass die Endothelin-induzierte Vasokonstriktion absolut an das Vorhandensein extrazellulärer Kalzium-Ionen gebunden ist., und das niedrige Dosierungen eines Kalziumkanalblockers (Nicardipin) die Endothelin-induzierte Vasokonstriktion inhibieren. 1989 entdeckten INOUE et al. zwei Isoformen des Endothelins, ET-2 und ET-3, während das zuerst beschriebene Endothelin als ET-1 bezeichnet wurde (s. Abb.1). Sowohl YANAGISAWA als auch INOUE postulierten bereits damals die Existenz eines speziellen proteolytischen Endothelin-konvertierenden Enzyms. Die neu entdeckten Substanzen erregten weltweit großes wissenschaftliches Interesse, intensive Forschungen wurden zur Klärung der Eigenschaften und Funktionen der Endotheline in immer neuen Bereichen des menschlichen Organismus betrieben, tierexperimentelle Studien untersuchten die Wirkungen der Endotheline in physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhängen und lieferten neue Erkenntnisse über deren komplexe Regulationssysteme.

Die Endotheline bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren. 2 Disulfidbrücken verbinden die Cysteinreste zwischen den Positionen 1 und 15 sowie den Positionen 3 und 11. ET-1 und ET-2 unterscheiden sich in 2 Aminosäuren, während die Sequenzen von ET-1 und ET-3 an 6 Positionen differieren. Alle 3 Isoformen weisen eine hohe Sequenzhomologie (identisch an 10 Positionen) zu den Sarafotoxinen auf (s. Abb. 1), einer Familie von Peptidtoxinen, die aus dem Gift der *Actractaspis engadensis* isoliert werden konnten, und die ihre toxischen Wirkungen durch eine starke Vasokonstriktion an den Koronararterien und nachfolgenden Herzstillstand vermitteln (KLOOG und SOKOLOVSKY, 1989).

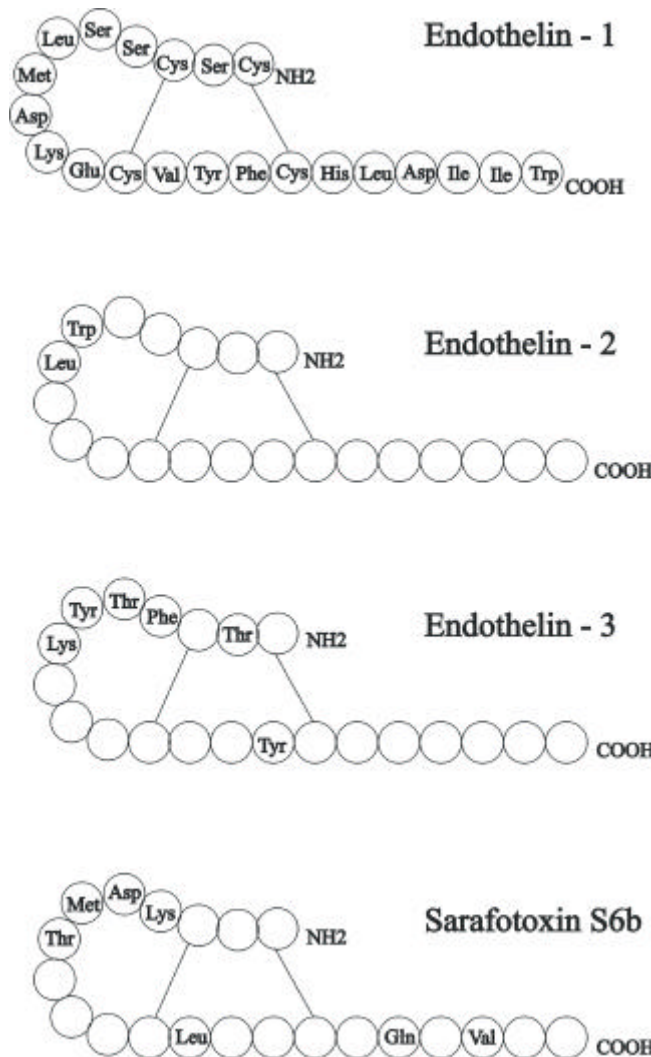


Abb. 1
Strukturformeln der Endotheline im Vergleich zu Sarafotoxin S6b. Für ET-2, ET-3 und Sarafotoxin S6b sind nur die von ET-1 abweichenden Aminosäuren dargestellt. Insgesamt sind die dargestellten Proteine an 12 Positionen identisch. Außerdem sind die charakteristischen Disulfid-Brücken dargestellt.

Die Kodierung der Vorstufen der Endotheline erfolgt auf jeweils eigenständigen Genloci. So ist das Gen für das humane Präpro-Endothelin-1 auf dem Chromosom 6 lokalisiert, während die Gene für die Vorstufen von ET-2 und ET-3 auf den Chromosomen 1 bzw. 20 identifiziert werden konnten (ARINAMI et al., 1991). Das Gen für ET-1 enthält 5 Exons und 4 Introns. Die ET-1 kodierende Nukleotidsequenz befindet sich innerhalb des zweiten Exons. Die prä-mRNA des transkribierten Gens enthält am 3'-Ende eine Region von 250 Basenpaaren, die bei Mensch und Tier (Schwein) hochkonserviert ist und die selektive Destabilisierung der ET-1-Precursor-mRNA reguliert und damit möglicherweise zu ihrer kurzen Halbwertszeit beiträgt (BLOCH et al., 1989; INOUE et al., 1989[1]). Dies bedeutet, dass die ET-1-Synthese auf der Ebene der Transkription reguliert werden kann. Die Promoterregion des Endothelings enthält GAAT-

und TATA-Sequenzen, die die Transkription stimulieren. Sie enthalten eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor, das GATA-2-Protein (WILSON et al., 1990). Außerdem konnten in diesem Bereich regulatorische Elemente, beispielsweise eine AP-1-Bindungsstelle (activating protein-1) für fos/jun-Komplexe, nachgewiesen werden, durch die die Transkription des ET-1-Genes durch Wachstumsfaktoren, vaskuläre Proteine und Hormone moduliert werden kann (INOUE et al., 1989). Obwohl HARRISON et al. (1995) Sekretionsvesikel für ET-1 und Big-ET-1 im Endothel von Rinderaorten nachweisen konnten, scheinen Speichergranula nicht die Hauptbedeutung für die Regulation der Endotheline zu haben. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Regulation auf der Ebene der mRNA besondere Bedeutung für den Endothelinstoffwechsel hat.

Untersuchungen mit chemisch modifizierten Peptiden bzw. mit synthetischen Endothelinanaloga haben ergeben, dass für die Wirksamkeit dieser Peptide sowohl das hydrophobe Carboxylende als auch das Vorhandensein der polaren Aminosäuregruppe zwischen den Positionen 8 und 10 erforderlich sind.

Bekannte Stimuli für die Synthese von ET-1 sind andere endokrin und parakrin/autokrin wirkende Hormone (Adrenalin, Angiotensin II, Cortisol, Insulin), Peptide (Interleukin 1, IGF-1, Cytokine), Ciclosporin, Hypoxie und Thrombin, wahrscheinlich aber auch Veränderungen der Wandspannung und der Fließeigenschaften in Blutgefäßen. Eine bekannte Substanz, die die ET-1-Synthese inhibiert, ist das Stickoxid (NO), außerdem wirken aber auch natriuretisches Peptid sowie vasodilatierende Prostanoiden hemmend.

Schwacher „shear stress“ bewirkt eine Stimulation der Endothelin-1-Synthese (MILNER et al., 1990). Starker „shear stress“ hingegen bewirkt über die Freisetzung von NO die Inhibierung der Endothelin-1-Synthese (MILLER et al., 1992; KUCHAN et al., 1993). Die Inhibierung der ET-1-Synthese (z.B. durch NO, aber auch Atriales Natriuretisches Peptid – ANP) erfolgt über die second-messenger cGMP bzw. cAMP (GRAY et al., 1996).

Endothelin-1 selbst ist in der Lage, über den Endothelin-B-Rezeptor die NO-Synthese zu induzieren. Dies geschieht durch Aktivierung der kalziumabhängigen endothelialen NO-Synthetase (eNOS). Da NO die Endothelin-Synthese inhibiert, handelt es sich hier am ehesten um einen negativen Rückkopplungsmechanismus (WARNER et al., 1993). Die ETB-Rezeptor-vermittelte Freisetzung von NO und Prostazyklin wird für den initialen, kurzdauernden (bis zu einigen Minuten) Abfall des Gefäßwiderstandes nach ET-1-Applikation verantwortlich gemacht (FILEP et al., 1993; BERTI et al., 1993). Die sich anschließende (bis zu einer Stunde andauernde) Vasokonstriktion wird über die auf den glatten Gefäßmuskeln vorhandenen ETA-Rezeptoren übertragen (BIRD et al., 1993).

1.2. Das Endothelin Converting Enzyme (ECE)

Das primäre Produkt der Translation besteht beim Schwein aus 203 Aminosäuren und konnte von Yanagisawa bereits 1988 kloniert werden. Es wird als PRÄPROENDOTHELIN bezeichnet. Durch Spaltung mittels spezifischer Peptidasen entsteht eine aus 39 Aminosäuren bestehende Kette, das als PROENDOTHELIN-1 (oder auch als BIG-ENDOTHELIN-1) bezeichnet wird. Dieses Prohormon wird durch ein Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) zwischen den Aminosäuren an 21. (Trp) und 22. (Val) Stelle proteolytisch zu ENDOTHELIN-1 gespalten (MASAKI et al., 1992; MCMALON et al., 1991; AHN et al., 1992) (s. Abb 2). Das humane Präpro-Endothelin besteht aus 212 Aminosäuren (ITOH et al., 1988), das humane Proendothelin enthält 38 Aminosäuren.

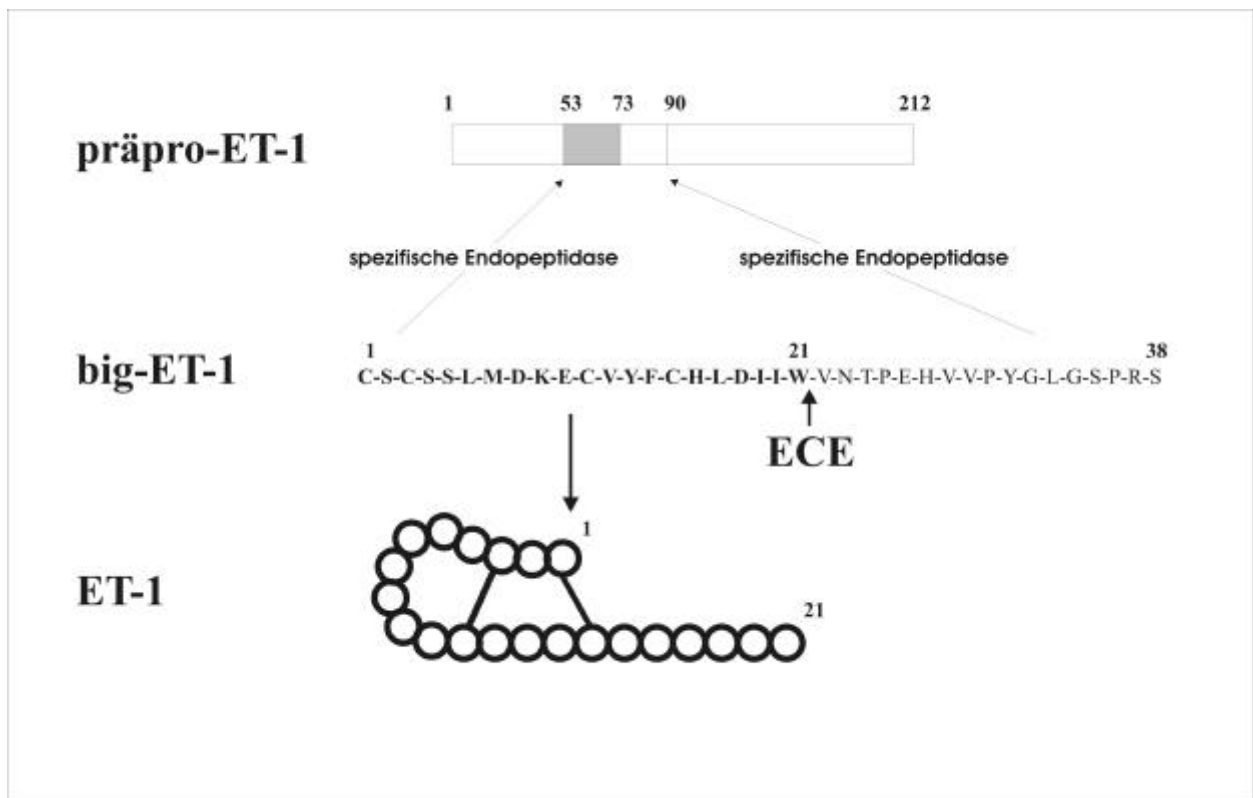


Abb. 2 :

Darstellung der Funktion des Endothelin Converting Enzyme (ECE) in der ET-Synthese. Spezifische Endopeptidasen spalten Präproendothelin zu Proendothelin (auch big-endothelin genannt), durch das ECE erfolgt dann die Spaltung zum biologisch aktiven ET-1.

Die Affinität des ECE (das sowohl extra- als auch intrazellulär vorkommt) zu den Isoformen des Endothelins ist unterschiedlich ausgeprägt. Die relative Konversionsrate von Proendothelin zu Endothelin beträgt ET-1 : ET-2 : ET-3 wie 4 : 1 : 2. Unspezifische Proteaseinhibitoren wie Phosphoamidon und FR 901533 hemmen die Umwandlung von Proendothelin zu Endothelin,

wobei FR 901533 nur die extrazelluläre Form des ECE hemmt, während Phosphoamidon sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Form inhibiert (XU et al., 1994). Die Sequenzen des extrazellulären (ECE-1) und des intrazellulären (ECE-2) Endothelin-Converting-Enzyme zeigen eine Homologie von 52% im N-terminalen Bereich bzw. von 72% im C-terminalen Bereich. ECE-1 und ECE-2 unterscheiden sich in der Anzahl der Aminosäuren (758 bzw. 787), in der Aminosäuresequenz der transmembranen Domäne (21 bzw. 23 Aminosäuren), im pH-Optimum (6,8 bzw. 5,4), in der Lokalisation (Plasmamembran und extrazellulär bzw. nur intrazellulär am Golgiapparat) und im Vorkommen (Lunge, Herz, Pankreas, Plazenta und Endothelzellen bzw. Gehirn, Uterus, Hoden). Möglicherweise gibt es weitere ECE-Subtypen, die spezifisch die Konversion von ET-2 zu ET-3 katalysieren.

ECE-1 wurde 1994 geklont und als membrangebundene Metalloprotease charakterisiert, die die proteolytische Aktivierung der Big-Endotheline durch Spaltung zwischen den Positionen 21 (Trp) und 22 (Val für big-ET-1 und big-ET-2 bzw. Ile für bog-ET-3) katalysiert (XU et al.). 1995 berichteten EMOTO et YANAGISAWA von der erfolgreichen Klonierung einer weiteren membrangebundenen Metalloprotease mit einem pH-Optimum im sauren Bereich, dem ECE-2. Strukturelle Verwandtschaft der ECE's konnte u.a. zum humanen Kell-Blutgruppen-Protein festgestellt werden.

Die Möglichkeit der Aktivierung durch verschiedene Promoter ist verantwortlich für die Existenz von drei Isoformen des ECE-1, die sich in ihren N-terminalen Regionen unterscheiden und sich vom gleichen Gen herleiten. Die Isoformen ECE-1a und ECE-1c sind auf den Zelloberflächen lokalisiert, während ECE-1b intrazellulär auftritt (SCHWEIZER et al., 1997).

1.3. Endothelinrezeptoren

Bislang konnten durch Rezeptorbindungsstudien zwei unterschiedliche Endothelinrezeptoren in Säugetieren identifiziert werden, durch die die biologischen Wirkungen des Endothelins vermittelt werden. Die Endotheline sind hydrophil, können deshalb nicht allein die Plasmamembranen passieren und sind darum auf spezifische Rezeptoren angewiesen. Der Endothelin-Rezeptor Subtyp A (ETA-Rezeptor; zunächst als ET-1-Rezeptor bezeichnet) besitzt eine hohe Affinität für ET-1 und ET-2, die Affinität gegenüber ET-3 ist geringer ausgeprägt. Er kommt an den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur vor, und ARAI et al. (1990) gelang es, die entsprechende cDNA aus Rinderlungen zu klonen. Der zweite, durch pharmakologische Methoden entdeckte Rezeptortyp (ETB-Rezeptor) besitzt für die Endothelin-Isopeptide eine gleichgroße Affinität (deshalb auch als Nicht-Isopeptid-selektiv bezeichnet), wird von Endothelzellen exprimiert und kommt in allen Geweben vor. Die Klonierung der cDNA gelang

SAKURAI et al. (1990) aus Rattenlungen. Beide Rezeptorsubtypen gehören zur Familie der rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und sind durch sieben transmembranäre Regionen und jeweils drei extra- und intrazelluläre Loops gekennzeichnet (BIRNBAUMER et al., 1990). Höchstwahrscheinlich vermitteln die Rezeptortypen sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte, da sie in unterschiedlichen Geweben in verschiedenen absoluten Konzentrationen und differierenden Verhältnissen auftreten und damit variierende, organabhängige Nettoeffekte verursachen. Es gibt Anzeichen dafür, dass ETA-Rezeptoren vorrangig vasokonstriktive und mitogene Effekte an der glatten Gefäßmuskulatur verursachen. Dabei vermittelt der ETA-Rezeptor die vasokonstriktorische ET-1-Wirkung über die G-Protein-gekoppelte Aktivierung der Phospholipase C, in der Folge kommt es durch die Spaltung von Phosphatidylinositol zur Bildung von Inositol-Triphosphat und Diacylglycerin und schließlich zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Öffnung der intrazellulären Speicher und erhöhte Passage durch die Zellmembran (KASUYA et al., 1989, RUBANYI et al., 1994). Vergleichbare Effekte vermittelt der ETA-Rezeptor auch bei der Bindung von ET-2, während die Wirkungen durch ET-3 und Sarafotoxin 6c weniger deutlich ausgeprägt sind. Zusätzlich können mitogene Effekte durch die Proteinkinase C ausgelöst werden, da diese durch die erhöhte Konzentration von Diacylglycerin und Kalzium stimuliert wird (GRIENDING et al., 1989; BATTISTINI et al., 1993). Dagegen besteht die Annahme, dass der ETB-Rezeptor über die Freisetzung von NO und Prostacyclin vasodilatorische Wirkungen vermittelt (BATRA et al., 1993). Ein weiterer Rezeptorsubtyp wurde beim *Xenopus laevis*-Frosch entdeckt und als Endothelinrezeptor Subtyp C (ETC-Rezeptor) bezeichnet. Seine Aktivierung führt beim genannten Tier zu einer Zerstreuung der Pigment-Granula in den Melanophoren. Er besitzt vor allem eine hohe Affinität zu Endothelin-3 (KARNE et al., 1993). Seine Aminosäuresequenz stimmt zu 47% mit dem ETA- bzw. zu 52% mit dem ETB-Rezeptor überein, während die Übereinstimmung zwischen ETA- und ETB-Rezeptor 48% beträgt. Der ETC-Rezeptor wurde bei Rindern sowohl an Endothelzellen (wo seine Aktivierung zur Freisetzung von NO führt – EMORI et al., 1991) als auch in der vorderen Hirnanhangsdrüse (wo die Rezeptorstimulation zur Inhibierung der Prolaktinfreisetzung führt – SAMSON et al., 1990,1991) nachgewiesen. Weitere Subtypen werden möglicherweise durch den Einsatz von natürlichen und synthetischen Endothelinrezeptoragonisten und -antagonisten spezifiziert. So wird die Existenz von zwei unterschiedlichen ETB-Rezeptoren diskutiert (WARNER et al., 1993; BAX et al., 1994). Außerdem wird vermutet, dass es Bindungsstellen für ET-1 an Zellkernen gibt (HOCHER et al., 1992), wenn auch ihre Funktion noch nicht geklärt ist.

Die Regulation der Synthese des ETA-Rezeptors ist oft gleichsinnig der ET-1-Synthese, z.B. wird ihre Produktion in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen durch Hypoxie und Cyclosporin stimuliert (NAMBI et al., 1990), ebenso wird die ETB-Synthese durch Hypoxie und nephrotoxische Schäden, wie sie unter Cyclosporin-Gabe auftreten, verstärkt (WILKES et al., 1991). Der Abbau der Endotheline erfolgt nach SIMONSON (1993) auf drei Wegen:

- hydrolytische Spaltung durch Endopeptidasen
- Abbau in Lysosomen
- Abbau von zirkulierendem Endothelin in der Lunge

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Isoformen des Endothelins über die Rezeptortypen sowohl *in vitro* also auch *in vivo* eine Vielzahl von zum Teil gegensinnigen Wirkungen (beispielsweise abhängig von der Konzentration des ET bzw. der Dichte der Rezeptortypen und deren Verhältnis zueinander) vermitteln. Hauptwirkungsort der Endotheline scheint nicht das Plasma bzw. der intravasale Raum zu sein, im Gegenteil wird der größere Teil des ET-1 vom Endothel an die umgebende glatte Gefäßmuskulatur abgegeben (YOSHIMOTO et al., 1991; WAGNER et al., 1992). Endothelin wurde aber nicht nur im Endothel gefunden, sondern in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe sowie in Tumorzelllinien. So konnte Endothelin in Endometrium, Plazenta und Nebenschilddrüse, in Lunge, Herz und Pankreas, in der Milz und im Hypothalamus, in der Niere und im ZNS nachgewiesen werden. Dabei spielt im Gefäßbereich ET-1 die größte Rolle. ET-2 wurde im menschlichen Plasma nicht nachgewiesen, kommt aber in Niere und Darm vor, während ET-3 z.B. im ZNS sezerniert wird (SHINMI et al., 1989).

Interessanterweise konnte in Mäusen mit ECE-1/ECE-2-Mangel reifes Endothelin nachgewiesen werden, so dass möglicherweise weitere Enzyme für diesen Schritt des Endothelinstoffwechsels in Frage kommen (YANAGISAWA et al., 2000)

1.4. Endothelinrezeptorblocker

Endothelinrezeptorblocker der ersten Generation waren Varianten des physiologischen Effektorpeptids, die zwar die Eigenschaft hatten, sich an die Rezeptoren zu binden, aber ihre intrinsische Aktivität ganz oder teilweise eingebüßt hatten. Die Peptide BQ123 und FR-139317 gehören zu den selektiven ETA-Rezeptor-Antagonisten, BQ788 und IRL1038 (ebenfalls Peptide) antagonisieren die durch den ETB-Rezeptor vermittelten Endothelineffekte. Bei PD142893 und Tak-044 handelt es sich um kombinierte ETA/ETB-Rezeptorantagonisten. Eine weitere Gruppe von Endothelinrezeptor-Antagonisten sind Nicht-Peptid-Substanzen vom Sulphisoxazol- und Pyrimidylsulphonamid-Typ (DOUGLAS et al., 1994; CLOZEL et al., 1994), die durch bestimmte pharmakokinetische Eigenschaften (orale Applizierbarkeit, längere

Halbwertszeit) sehr vielversprechend sind. Bosentan, SB209670, BMS182874 und LU135252 (RASCHAK et al., 1995; RIECHERS et al., 1996) gehören dazu und inhibieren den ETA-Rezeptor, Bosentan zeigt zusätzlich noch eine Wirkung auf den ETB-Rezeptor. Ein weiterer Vertreter der kombinierten ETA/ETB-Rezeptorantagonisten ist LU224332. Mit Hilfe der verschiedenen Rezeptorblocker ist eine genauere Untersuchung des Einflusses des Endothelinsystems auf verschiedene pathophysiologische Vorgänge möglich. Der mitogene Effekt von Endothelin auf das Gefäßsystem kann beispielsweise durch die Gabe eines selektiven ETA-Rezeptorblockers verringert werden, was nahelegt, dass der ETA-Rezeptor in diesen Vorgang involviert ist.

Die Komplexität des Endothelinsystems wird deutlich angesichts der verschiedenen Komponenten, die es in physiologischen und pathophysiologischen Zuständen zu beeinflussen in der Lage ist. In Blutgefäßen wirken die Endotheline konstriktiv und spielen bei der Entwicklung von Krankheiten wie Arterieller Hypertonus und Atherosklerose eine Rolle, am Herz beeinflussen Endotheline sowohl Inotropie und Chronotropie als auch kardiale Hypertrophie und das Remodeling bei angeborenen Herzfehlern. In der Lunge ist das Endothelinsystem an der Regulierung des Tonus der Atemwege und der Blutgefäße beteiligt und außerdem in die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie involviert. In der Niere kontrolliert es die Salz- und Wasserexkretion sowie den Säure/Basen-Haushalt und spielt eine wichtige Rolle bei akutem und chronischem Nierenversagen. Im Gehirn modulieren Endotheline kardiorespiratorische Zentren und die Freisetzung von Hormonen. Neben den genannten Organen beeinflussen Endotheline u.a. auch noch die Leber, Muskulatur und Knochen, Haut, Prostata, das Fettgewebe sowie den Reproduktionsapparat (KEDZIERSKI et YANAGISAWA, 2001).

1.5. Wirkungen des Endothelins auf den Blutdruck

Bereits bei seiner Entdeckung wurde das Endothelinsystem mit Effekten auf die glatte Gefäßmuskulatur in Verbindung gebracht und galt seinerzeit (bis zur Beschreibung des Ausmaßes der vasokonstriktorisches Eigenschaften von Humanem Urotensin-II durch AMES et al. im September 1999) als der Vasokonstriktor mit der höchsten bekannten Potenz. Alle drei Peptide haben die gleichen Effekte auf das Gefäßsystem in vivo und in vitro. Einer vorübergehenden (kurzdauernden, meist einige Minuten) ETB-Rezeptor-vermittelten Dilatation folgt eine ETA-Rezeptor-vermittelte (länger andauernde, bis zu einigen Stunden) Vasokonstriktion. Einige Studien berichten auch von einer ETB-Rezeptor-vermittelten Vasokonstriktion, besonders im renalen Gefäßsystem (CLOZEL et al., 1992; GELLAI et al., 1994). Der zeitliche Unterschied zwischen den Endothelinwirkungen ist in der unterschiedlichen

Kinetik der second-messenger-Systeme der beiden Endothelinrezeptortypen begründet. Betrachtet man die Gefäßkontraktion, so zeigt ET-1 die stärkste und ET-3 die schwächste Reaktion. In Hinblick auf die initiale vorübergehende Vasodilatation hat ET-3 den stärksten Effekt, während ET-1 und ET-2 etwa gleich stark agieren.

Endotheline sind hochpotente Vasokonstriktoren sowohl im arteriellen als auch venösen Gefäßbett (YANAGISAWA et al., 1988). Von Anfang an wurde vermutet, dass die Endothelin-Familie in der Blutdruckregulation sowie in der Pathogenese der Arteriellen Hypertension eine Rolle spielt. Tatsächlich wurden erhöhte ET-1-Konzentrationen bei schwerem Hypertonus (WIDIMSKY et al., 1991) und bei der Prä-Eklampsie gemessen (FLORIJN et al., 1991).

Bei den meisten unterschiedlichen Hochdruckformen konnten allerdings keine erhöhten ET-1-Plasma-Konzentrationen ermittelt werden. Zu diesen Hochdruckformen gehören typische Vertreter von Tiermodellen des Hochdrucks, wie spontaner Hypertonus bei Ratten (SHR – Spontaneously Hypertensive Rats), aber auch Essentieller Hypertonus beim Menschen (LÜSCHER et al., 1993). Das bedeutet jedoch nicht, dass Endothelin keine Rolle in der Pathogenese des Hypertonus spielt, vielmehr zeigen die Ergebnisse, dass das Plasma ein ungeeignetes Kompartiment für die Analyse dieses parakrin-wirkenden Hormonsystem ist. Dafür sprechen auch die Plasmakonzentrationen der Endotheline, die im pikomolaren Bereich liegen. Endothelin agiert in parakrin/autokriner Weise und wird von den Endothelzellen hauptsächlich abluminal sezerniert. Es scheint also ratsamer, für die Genese der Hypertension das Gewebsendothelin zu untersuchen (z.B. Gewebs-ET-1- und ET-Rezeptor-Konzentrationen). Wegen der dabei auftretenden methodischen Probleme (fehlende Untersuchungsmöglichkeit für menschliches Gewebe; Schwierigkeiten beim Nachweis der *primären* Funktion von Endothelin in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen, wenn endothelin-unabhängig getriggerte Krankheitsprozesse zu einer *sekundären* Endothelinabgabe im Zusammenhang mit Endothelschädigungen führen) greift man auf Tiermodelle mit primär-aktiviertem Endothelinsystem (endothelin-transgene Tiere) ohne andere Hypertensionsstimuli zurück.

Sowohl vorübergehende ET-1-Genüberexpression (mittels replikationsgestörten adenoviralen Vektoren) als auch ET-1-Infusionen erhöhen den Blutdruck, während chronische Überexpression von humanem ET-1 bzw. ET-2-Gen von Maus und Ratte keine Hypertension verursacht (HOCHER et al., 1996). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die kurzfristige Blockade des parakrinen Endothelinsystems (z.B. mit Bosentan oder BQ 123) den Blutdruck signifikant senkt (GELLAI et al., 1994; HOCHER et al., 1995; BAZIL et al., 1992; HOCHER et al., 1996), während die langfristige orale Behandlung spontan hypertensiver Ratten mit Bosentan keinen Effekt auf den Blutdruck hat (LI et al., 1995). Die Gründe für diese Diskrepanz zwischen akuter

und chronischer Endothelinwirkung sowie zwischen akuter und chronischer ET-Rezeptorblockade sind noch ungeklärt. Vermutlich führen längerfristige Aktivierung oder Blockade des Endothelinsystems zur Aktivierung potenter gegenregulatorischer Elemente, welche möglicherweise zu den Komponenten des parakrinen Endothelinsystems oder aber zu anderen Mechanismen gehören, z.B. der NO-System-Aktivierung. Interessanterweise entwickeln ET-1-defiziente Mäuse trotz erniedrigter ET-1-Konzentrationen in Plasma und Lungengewebe erhöhte systolische und diastolische Blutdruckwerte, was die Vielschichtigkeit und Komplexität der Endothelin(inter)aktionen bzw. von kompensatorischen Mechanismen in Abhängigkeit von Konzentration, Gewebe, Spezies, Alter und weiteren Parametern weiter unterstreicht (KURIHARA et al., 1994). Übrigens erwiesen sich im gleichen Experiment homozygot ET-1-defiziente Mäuse als nicht-lebensfähig.

In den Nieren spontan-hypertensiver Ratten (SHR) konnte eine Überexpression (im Vergleich zu gleichalten Wistar-Kyoto-Ratten) des ETA-Rezeptors in den Glomeruli und in den glatten Muskelzellen der Arterien sowie des ETB-Rezeptors in den Glomeruli gefunden werden (HOCHER et al., 1995). Die Blockade der Rezeptoren durch Bosentan (komb. ETA/ETB-Blockade) bzw. durch BQ 123 (ETA-Blocker) führte zu einer Senkung des Arteriellen Mitteldrucks sowie zu einem Anstieg des Renalen Blutflusses in den SHR, wobei die zusätzliche Blockade des ETB-Rezeptors durch Bosentan nicht zu einer signifikanten Wirkung führte. Allerdings resultierte die kombinierte ETA/ETB-Blockade in einer verminderten Glomerulären Filtrationsrate in den SHR im Gegensatz zu den nicht-hypertensiven Kontrolltieren.

1.6. Endothelin in der Pathogenese der Atherosklerose

Das Endothel wird als eigentlicher Modulator des Gefäßtonus und -wachstums angesehen. Es produziert vasoaktive Substanzen und setzt diese frei, wie NO mit seinen vasodilatativen und antiproliferativen Eigenschaften, als auch Endothelin mit seinen vasokonstriktiven und mitogenen Eigenschaften. Die Aufrechterhaltung eines bestimmten Gefäßtonus ist an die Ausgewogenheit dieser Faktoren gebunden. Ein Ungleichgewicht kann zu Zuständen mit Zeichen einer kardiovaskulären Erkrankung führen, wie beispielsweise die Atherosklerose (LERMAN et BURNETT, 1992). Ursache könnte ein NO-Mangel oder ein Endothelinübergewicht sein, oder beides. Ein aktiviertes parakrines Gefäßendothelsystem wurde in Zusammenhang mit atherogenen Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes und Hyperlipidämie gefunden.

Es wurde gezeigt, daß die Endothelinproduktion und -sekretion in Anwesenheit von oxidierten LDL verstärkt ist, vor allem in Endothelzellkulturen, intakten Blutgefäßen und Makrophagen (BOULANGER et al., 1992; MARTIN-NIZARD et al., 1991).

Ein interessantes Phänomen beschrieben im Jahr 2001 CORDER et al.. Sie konnten zeigen, dass ethanolfreie Extrakte von verschiedenen Rotweinen in der Lage sind, die ET-1-Synthese in den Endothelzellen von Rinderaorten zu inhibieren. Roter Traubensaft war dazu ebenfalls in der Lage, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß, während die zum Vergleich herangezogenen Weiß- und Roséweine keinen Effekt auf die ET-1-Synthese hatten. Die Autoren sehen damit Vermutungen bestätigt, dass die Aufnahme moderater Mengen Rotwein möglicherweise vor Koronarer Herzerkrankung schützen kann. Die Charakterisierung der vaskulären Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen, könnte zu neuen Strategien zum Schutz vor Gefäß- und Kreislaufkrankungen führen.

1.7. Das Renale Endothelin-System

Im Vergleich zu anderen Gefäßbetten, wie z.B. Bronchial-, Femoral- und Koronargefäßen, in denen Endothelin ein starker Vasokonstriktor ist, reagiert das renale Blutgefäßsystem um einige 10-fache sensibler auf Endothelin (PERNOW et al., 1988), obwohl eine entsprechende Überrepräsentation der Rezeptoren in der Niere nicht gefunden werden konnte (MARSEN et al., 1994).

Für die Nierenfunktion ist Endothelin in vielfältiger Weise von Bedeutung, es beeinflusst die Vasokonstriktion, die Tubulusfunktion, die Zellproliferation und Matrixproduktion, besonders aber die renale Mikrozirkulation. Die afferente Arteriole reagiert auf Endothelin mit stärkerer Konstriktion als die efferente, beide Effekte vermindern den glomerulären Plasmafluss und die glomeruläre Filtrationsrate. Weiterhin werden die Tubulusfunktion und somit die Salz- und Wasserexkretion beeinflusst. Die Tubuli können Endothelin bilden und besitzen Endothelinrezeptoren, so kann Endothelin direkt in autokriner Weise die Tubulusfunktion beeinflussen (KOHAN et PADILLA, 1992). Die Wirkungen auf den Salz- und Wasserhaushalt sind komplex und stark konzentrationsabhängig, sie variieren je nach untersuchter Tierart und heben sich zum Teil gegenseitig auf. Bei verschiedenen pathologischen Zuständen, wie Hämolytisch-Urämisches Syndrom, Radio-Kontrast-Nephropathie und chronischem Nierenversagen wurde eine erhöhte ET-1-Exkretion im Urin beobachtet, interessanterweise ohne das Vorliegen erhöhter Endothelin-Plasmaspiegel, was nahe legt, dass dieses ausgeschiedene ET-1 renalen Ursprungs ist (MARGULIES et al., 1991; OHTA et al., 1991; WARRENS et al., 1990; SAITO et al., 1991; DERAY et al., 1992). Bei Untersuchungen mittels RT-PCR (reverse

transcriptase – polymerase chain reaction) und immunozytochemischer Methoden durch KARET und DAVENPORT (1996) konnte in menschlichen Nieren zwar mRNA für alle drei bekannten Endothelin-Isoformen nachgewiesen werden, aber nur ET-1 sowie die ET-1-Vorstufe Big-ET-1 wurden gefunden, während Big-ET-2 und Big-ET-3 nicht nachweisbar waren.

1996 publizierten NAKAMURA et al. ihre Untersuchungen zu der Fragestellung, ob sich mit einem spezifischen ETA-Rezeptor-Antagonisten (in diesem Falle FR139317) die glomeruläre mRNA-Expression wachstumsbezogener Proto-Onkogene in Diabetischen Rattenglomeruli beeinflussen lässt, da chronische Nierenerkrankungen mit einer verstärkten renalen Synthese von Endothelin-1 einhergehen. Dabei kamen sie nach 24-wöchiger Behandlung von Ratten mit STZ-induziertem Diabetes mellitus zu dem Schluß, dass durch die Verminderung der mRNA-Level von wachstumsbezogenen Genen mittels ETA-Blockade eine Möglichkeit zum Schutz vor Glomerularschädigung besteht. BENIGNI et al. (1998) untersuchten, ob ein unselektiver ETA/ETB-Antagonist (PD142,893) eine renoprotektive Wirkung bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes hat, wenn bereits eine Proteinurie besteht. Zur Kontrolle wurde die Behandlung mit einem ACE-Hemmer (Lisinopril) herangezogen. Die diabetischen Tiere wurden dazu mit an die Blutglukosekonzentrationen angepassten Insulingaben behandelt, und nach einem Zeitraum von 6 Monaten (bei Vorliegen der Proteinurie) in die Untersuchungsgruppen aufgeteilt. Die renoprotektiven Effekte (normalisierter systemischer Blutdruck, verminderte Protein- und Albuminausscheidung im Urin, verbesserter renaler Blutfluß) waren in ihrem Ausmaß miteinander vergleichbar, in den Nichtdiabetischen Kontrolltieren waren keine Veränderungen der untersuchten Parameter zu finden. Außerdem konnte mittels Northern-Blot-Analyse der ET-1-mRNA eine Aktivierung des ET-1-Gens in den diabetischen Nieren bestätigt werden. Sowohl die Behandlung mit dem kombinierten ETA/ETB-Rezeptor-Antagonisten als die ACE-Hemmer-Therapie schwächten diese Genaktivierung deutlich ab. Das verdeutlicht die Möglichkeit, dass mit den ET-Rezeptorantagonisten eine Therapieoption für die Behandlung der progressiven diabetischen Nephropathie gegeben ist. Weitere Hoffnungen zur Verbesserung der Nierenfunktion diabetischer Patienten beziehen sich auf Ansätze, die Endothelin-konvertierenden Enzyme (vergleichbar der Hemmung des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, die sich im klinischen Alltag bereits für eine Vielzahl von Patienten durchgesetzt hat) in ihrer Funktion zu inhibieren.

2. Bedeutung der Diabetischen Nephropathie

Der Diabetes mellitus zählt mit einer Prävalenz von 3-4% zu den häufigsten chronischen Erkrankungen in Europa und hat in den letzten 30 Jahren vor allem in den Industriestaaten einen rapiden Anstieg zu verzeichnen. Es handelt sich dabei um eine komplexe endokrine Regulationsstörung, die durch einen primären oder sekundären Insulinmangel bedingt ist und überwiegend mit Hyperglycämie und Glucosurie einhergeht. Pathophysiologisch ist das Insulin von zentraler Bedeutung, das von den B-Zellen im Pankreas gebildet wird. Nach einer WHO-Empfehlung von 1980 werden die Krankheitsbilder des Diabetes-mellitus-Syndroms folgendermaßen klassifiziert:

-Diabetes mellitus

- Typ-I-Diabetes („insulinabhängiger Diabetes“ = IDDM)

- Typ-II-Diabetes („nicht insulinabhängiger Diabetes“ =NIDDM)

- einschließlich MODY-Typ (Maturity Onset Diabetes of the Young – Typ-II-Diabetes des Kinder- und Jugendalters)

- Typ-IIa (nicht fettsüchtig)

- Typ-IIb (fettsüchtig)

- Diabetes mellitus assoziiert mit Syndromen

-Gestörte Glukosetoleranz

-Gestationsdiabetes

Bei zunehmender Dauer des Diabetes mellitus stellen sich verschiedene Veränderungen am Gefäßsystem ein (Makroangiopathie, Mikroangiopathie), die man unter dem Begriff Diabetisches Spätsyndrom zusammenfaßt. Dazu gehören zum Beispiel die diabetische Retinopathie und die diabetische Katarakt, die diabetische Nephropathie, Koronarerkrankungen, periphere Durchblutungsstörungen und der diabetische Fuß sowie die diabetische Neuropathie.

Die Diabetische Nephropathie ist die Hauptursache des terminalen Nierenversagens in der westlichen Welt. Etwa ein Drittel der Nierentransplantationen wird durch das Entwickeln einer terminalen Niereninsuffizienz aufgrund einer Diabetischen Nephropathie notwendig. Die Häufigkeit der Diabetischen Nephropathie beträgt bei Typ-I-Diabetikern etwa 30% bzw. bei Typ-II-Diabetikern etwa 20% (KROLEWSKI et al.,1987). Die klinischen und morphologischen Kennzeichen der Diabetischen Nephropathie sind bei Typ-I- und Typ-II-Diabetikern prinzipiell gleich. Pathomorphologisch ist die Diabetische Nephropathie durch die bereits von Kimmelstiel und Wilson 1936 beschriebene charakteristische noduläre oder eine diffuse Glomerulosklerose gekennzeichnet, das klinische Korrelat ist die Proteinurie von mehr als 0,5g/ 24h. Im Verlauf

kommt es zu einem Abfall der Glomerulären Filtrationsrate und über Jahre hinweg zur terminalen Niereninsuffizienz. Diese Komplikation wird auch als Kimmelstiel-Wilson-Syndrom bezeichnet. Daneben werden die begleitende Pyelonephritis sowie die Arterio- und Arteriosklerose in den klinischen Begriff der Diabetischen Nephropathie einbezogen. Prognostische Bedeutung für das Auftreten der Diabetischen Nephropathie wird der Entwicklung einer Mikroalbuminurie von 30-300 µg/ min beigemessen.

Die ersten Merkmale der renalen Veränderungen sind die Glomeruläre Hypertension und Hyperfiltration, die sich innerhalb von Tagen und Wochen entwickeln. Bleiben diese bestehen, entwickelt sich nach ungefähr 5 Jahren eine Mikroalbuminurie. Sie ist der erste Indikator für die Verletzung der glomerulären Filtrationsbarriere. Nach weiteren 5 bis 10 Jahren treten neben Proteinurie, Hypertension und progredientem Nierenfunktionsverlust Merkmale der tubulointerstitiellen Schädigung auf, z.B. Hyperkaliämie. Letztendlich kommt es 15 bis 25 Jahre nach Beginn der Diabetes-Erkrankung zum terminalen Nierenversagen. Die ersten morphologischen Zeichen der Diabetischen Nephropathie sind eine Verdickung der Glomerulären Basalmembran und die Ausdehnung des Mesangiums durch Ansammlung von extrazellulärer Matrix, die als eosinophile, PAS-positive Glomerulosklerose sichtbar wird.

Im Unterschied zu anderen Formen der chronischen Niereninsuffizienz sind die Glomeruli und Nieren von Diabetikern normalgroß oder vergrößert, wobei insbesondere die Größe der Nieren sehr variabel sein kann und von weiteren Faktoren wie Typ und Dauer des Diabetes, Auftreten einer arteriellen Hypertonie oder zusätzlich einer Gefäßerkrankung sowie dem Vorliegen von akuten oder chronischen Infektionen beeinflusst wird. Die renalen Gefäße zeigen aufgrund der Hyperlipidämie eine Atherosklerose und eine hypertensive Arteriosklerose. Die molekularen Mechanismen, die diese Läsionen verursachen, sind bislang nur zum Teil bekannt, mit Hilfe von Tiermodellen wird ein besseres Verständnis für die komplexen Vorgänge gesucht. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass die Shear-stress verursachende glomeruläre Hyperfiltration (HOCHER et al., 1997) und Hyperglykämie (YAMAUCHI et al., 1990) Endothelin-1 stimulieren. Verschiedene Studien beschrieben dann folgerichtig ein aktiviertes renales Endothelinsystem in tierexperimentellen Diabetes-mellitus-Modellen. Möglicherweise trägt ein aktiviertes Endothelinsystem zur Diabetischen Nephropathie bei, da gezeigt werden konnte, dass ein primär aktiviertes renales Endothelinsystem sowohl in ET-1-transgenen Mäusen (HOCHER et al., 1997) als auch in ET-2-transgenen Ratten (HOCHER et al., 1996) eine Nierenfibrose verursacht, ohne dass weitere Stimuli (beispielsweise Hypertension) dazu vorliegen müssen. Als Folge der Nierenfibrose (Glomerulosklerose und Interstitielle Fibrose) war die Glomeruläre Filtrationsrate signifikant erniedrigt. Außerdem wurde in den ET1-transgenen Mäusen das

Auftreten von Nierenzysten beschrieben. Die Autoren schlossen daraus, dass ein aktiviertes Endothelinsystem in Tieren mit primärer (endothelinunabhängiger) Prädisposition für Nierenzysten das Wachstum und die Entwicklung dieser Zysten fördert. In weiteren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einem aktivierten renalen Endothelin-System und der Pathogenese der Glomerulosklerose nachgewiesen werden (MURER et al., 1994; ORISIO et al., 1993; ROCCATELLO et al., 1994). BENIGNI et al. (1993) bestätigten die Hypothese, dass der ETA-Rezeptor bei verschiedenen chronischen Nierenerkrankungen eine Rolle spielt, indem sie nachwiesen, dass die Blockade der ETA-Rezeptoren die Proteinpermeabilität senkt, die Glomerularläsionen verringert und vor Funktionseinschränkungen der Niere schützt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte eines ETA-Rezeptor-Antagonisten (LU135252) im Vergleich zu einem kombinierten ETA/ETB-Rezeptor-Antagonisten (LU 224332) zu analysieren, und zwar hinsichtlich der Nephropathie in Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus.