

Aus dem
CharitéCentrum für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin (CC 10)
Klinik für Nephrologie
Direktor: Professor Dr. W. Zidek

Habilitationsschrift

Pathophysiologie der vasoaktiven Mediatoren Endothelin-1 und NO sowie ihrer Interaktion am Tiermodell

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

Von
Dr. med Philipp Kalk
geboren am 23.04.1976 in Waiblingen

eingereicht: Mai/2010

Dekanin: Prof. Dr. med Annette Grüters-Kieslich

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Offermanns**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Wenzel**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen:	3
1 Einleitung:	4
1.1 Das Endothelinsystem	4
1.2 Das NO/cGMP-System	7
1.3 ET-NO-Interaktion	9
2 Fragestellungen der eigenen Arbeiten	10
3 Eigene Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext	11
3.1 Übersicht der eigenen Originalarbeiten zum Thema	11
3.2 Eigene Arbeiten zur Pathophysiologie des Endothelinsystems	13
3.3 Eigene Arbeiten zur Pathophysiologie des NO/cGMP-Systems	26
3.4 Eigene Arbeiten zur Pathophysiologie der ET-NO-Interaktion	35
4 Schlußfolgerungen und Ausblick	70
5 Zusammenfassung	74
6 Literaturangaben aus dem freien Text	78
Danksagung:	89
Eidesstattliche Erklärung:	90

Abkürzungen:

ALI: Acute Lung Injury

ARDS: Adult Respiratory Distress Syndrome

ET: Endothelin

ECE: Endothelin-Converting-Enzyme

cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat

(s)GC: (lösliche) Guanylatzyklase

GFR: glomeruläre Filtrationsrate

L-NAME: N(G)-nitro-L-arginine methylester; unspezifischer Blocker der NOS

NO: Stickstoffmonoxid

NOS: Stickstoffmonoxid-Synthasen

iNOS, eNOS, nNOS: induzierbare, endotheliale, neuronale NOS

1 Einleitung:

1.1 Das Endothelinsystem

1988 isolierte M. Yanagisawa aus Aortenendothelzellen ein bis dahin völlig unbekanntes Peptid, welches wegen seines Ursprungsortes Endothelin genannt wurde, und welches über starke vasokonstriktorische Wirkung verfügt (Yanagisawa *et al.*, 1988). 1989 gelang durch Nachforschungen mittels DNA-Bibliothek die Entdeckung von zwei weiteren Isoformen neben dem klassischen Endothelin, so daß die Bezeichnungen Endothelin-1, -2 und -3 (ET-1, -2, -3) eingeführt wurden (Inoue *et al.*, 1989). Endotheline bestehen aus 21 Aminosäuren und erhalten durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken eine gebogene, haarnadelartige Form. ET-1 unterscheidet sich von ET-2 durch zwei Aminosäuren, dagegen von ET-3 durch sechs Aminosäuren. Die Synthese der Endotheline erfolgt über mehrere Zwischenstufen (siehe Abbildung 1):

Das primäre Translationsprodukt ist das Präproendothelin, aus dem durch enzymatische Spaltung das Proendothelin, auch Big-Endothelin genannt, hervorgeht. Dieses Big-Endothelin wird durch ein Endothelin-Konversions-Enzym (ECE) gespalten, wobei das biologisch aktive Endothelin entsteht (Xu *et al.*, 1994).

Die Endotheline unterscheiden sich in ihrer Expression voneinander:

Im Endothel wird überwiegend ET-1 exprimiert; darüberhinaus wird ET-1 auch von Mesangiumzellen, glatter Gefäßmuskulatur und glomerulären und tubulären Zellen gebildet (Zoja *et al.*, 1991; Resink *et al.*, 1990; Kasinath *et al.*, 1992). ET-2 wird in Herz, Lunge, Ovarien und Gastrointestinaltrakt; ET-3 dagegen wird in Lunge, Gehirn, Hypophyse und Intestinaltrakt exprimiert (Uchide *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1989).

Die Wirkungen der Endotheline im Säugetier werden durch spezifische, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt: ET_A und ET_B (Arai *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). ET_A und ET_B besitzen große strukturelle Ähnlichkeit miteinander; beide gehören der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an und besitzen sieben transmembranäre Domänen. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Spezifität für die verschiedenen Endotheline: So ist die Affinität des ET-1 zum ET_A hundertmal und die des ET-2 bis zu zehnmal stärker als die des ET-3. Die Affinität des ET_B dagegen ist zu allen endogenen Endothelinen etwa gleich.

präpro-ET-1

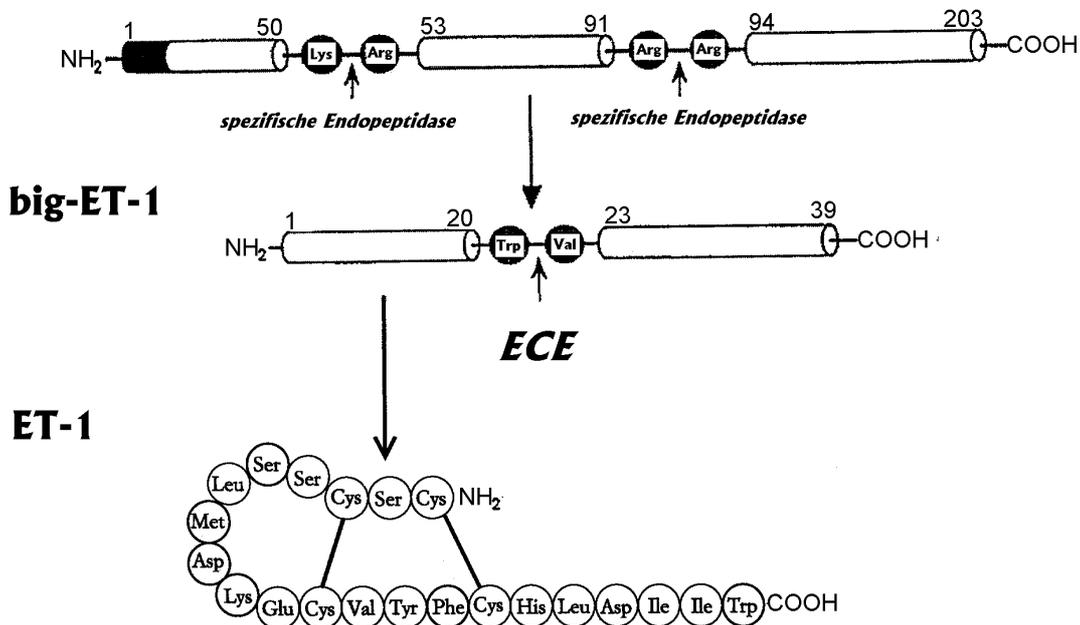


Abb. 1: Schematische Darstellung des Syntheseweges des ET-1 vom primären Translationsprodukt präpro-ET-1 bis zum biologisch aktiven ET-1.

Während ET_A überwiegend in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert wird, findet die Expression des ET_B in den Gliazellen des Gehirns, den epithelialen Zellen des choroidalen Plexus, den Ependymzellen, den endothelialen Zellen der Glomerula und den epithelialen Zellen im dünnen Teil der Henle-Schleife statt (Hori *et al.*, 1992).

Das Endothelinsystem hat vielfältige biologische Wirkungen im Organismus:

1. Endothelin ist ein potenter Vasokonstriktor.
2. Endothelin ist ein Mitogen. Es fördert beispielsweise die Proliferation der Zellen der glatten Muskulatur entweder alleine oder die Proliferation mesangialer Zellen als Mediator des Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Hirata *et al.*, 1989; Noveral *et al.*, 1992; Kohno *et al.*, 1994).
3. Endothelin spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Organismus und der Differenzierung seiner Zellen. In Experimenten mit genetisch veränderten Tieren, die entweder Endothelin- oder Endothelin-Rezeptor-defizient waren, zeigten sich kraniofaziale Malformationen, die mit dem

Leben nicht vereinbar waren, sowie enterische Abnormalitäten im Sinne eines Morbus Hirschsprung (Kurihara *et al.*, 1994; Hosoda *et al.*, 1994).

4. Endothelin greift in den Elektrolyt- und Wasserhaushalt ein. Es ist bekannt, daß Endothelin am Nephron zu gesteigerter Wasser- und Salzausscheidung führt (Kohan, 1997).
5. Endothelin wirkt bronchokonstriktorisch und stört die mukoziliäre Clearance der Atemwege (Fernandes *et al.*, 1996; Sabater *et al.*, 1996).
6. Endothelin ist ein pro-inflammatorischer Mediator. Es stimuliert sowohl die Expression inflammatorischer Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, als auch die Expression von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 (Chen *et al.*, 1997). Desweiteren konnte in Versuchen mit Endothelin-transgenen Tieren nachgewiesen werden, daß eine Überexpression von Endothelin Lymphozyten anlockt, mit der Folge einer chronischen Inflammation und konsekutiver Fibrose (Hoche *et al.*, 2000).

Was die Zuordnung dieser biologischen Aktivitäten zu den Endothelinrezeptortypen angeht, können mittlerweile die konstriktorischen Effekte des Endothelins auf die Zellen der glatten Muskulatur überwiegend dem ET_A zugerechnet werden. Weiterhin konnten die mitogenen Effekte des Endothelins auf eine Vielzahl von Zelltypen ebenfalls dem ET_A zugeordnet werden.

Der ET_B dagegen vermittelt dagegen eine antiproliferative Wirkung (Mallat *et al.*, 1995). Der in der Niere vorherrschende ET_B scheint überdies eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der GFR und der renalen Natriumreabsorption zu spielen (Hoche *et al.*, 2001). Desweiteren ist der ET_B als Clearance-Rezeptor am Abbau des zirkulierenden ET-1 beteiligt (Fukuroda *et al.*, 1994). Dieser Befund legt eine Rolle des ET_B als negativer Rückkoppelungsmechanismus im Endothelinsystem nahe. Diese Vermutung wird weiter unterstützt durch die ET_B –vermittelte Stimulation des wesentlichsten Antagonisten des Endothelinsystems: des NO/cGMP-Systems (siehe 1.2 und 1.3.).

1.2 Das NO/cGMP-System

Der wesentlichste physiologische Gegenspieler der Endotheline ist das Stickstoffmonoxid (NO). 1998 wurde der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an die Amerikaner Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro verliehen für die Identifizierung des NO als ein vom Endothel produzierter, potenter Vasodilatator, welches vor seiner Identifizierung als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) in der Literatur bezeichnet wurde. Der gasförmige Botenstoff NO wird im Organismus durch sogenannte Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus L-Arginin unter Mitwirkung von molekularem Sauerstoff gebildet, wobei Citrullin entsteht (Moncada & Higgs, 1993). Es existieren drei NOS-Isoformen: die induzierbare (iNOS; NOS-2), die endotheliale (eNOS; NOS-3) und die neuronale (nNOS; NOS-1) Synthase. nNOS, iNOS und eNOS werden von unterschiedlichen Genen auf den Chromosomen 12, 17 und 7 vercodiert. Die endotheliale und neuronale NOS sind konstitutionell exprimierte, niedrigaktive und calciumaktivierte Enzyme, welche in der Signaltransduktion wichtig sind. Die induzierbare NOS, welche in Zytokin-aktivierten Makrophagen entdeckt wurde, ist dagegen ein hochaktives Enzym, welches auf auslösende Reize exprimiert wird und toxische Mengen an NO produziert und so eine wesentliche Rolle in der antimikrobiellen und antineoplastischen Wirkung dieser Zellen spielt (Forstermann & Kleinert, 1995).

Im Gegensatz zu der neuronalen und induzierbaren NOS gilt die endotheliale NOS als das Enzym, welches als ubiquitär im Endothel konstitutiv exprimiertes Enzym für die basale NO-Produktion verantwortlich ist. Führen bestimmte Stimuli –z.B. Scherkräfte- am Endothel via Erhöhung des Calciumeinstroms zur eNOS Aktivierung, so wird NO gebildet, welches dann beispielsweise in die Muskelzellen der Gefäßwand diffundiert und dort die lösliche Guanylatzyklase aktiviert. Die daraus folgende cGMP-Produktion mediiert dann die biologischen Effekte des NO wie z. B. Vasorelaxation oder Hemmung der Thrombozytenaggregation (Moncada & Higgs, 1993).

cGMP ist jedoch nicht nur das Produkt der löslichen Guanylatzyklase, sondern auch das der membranständigen Isoformen, welche den Rezeptor für die natriuretischen Peptide (ANP, BNP, CNP) darstellen: natriuretic peptide receptor A und B (NPR-A und NPR-B) (Lee & Burnett, 2007). Das cGMP ist somit also der zweite Botenstoff sowohl des NO als auch der natriuretischen Peptide. Sein Abbau erfolgt durch

Phosphodiesterasen; die Abbildung 2 veranschaulicht die komplexe Regulation des cGMP.

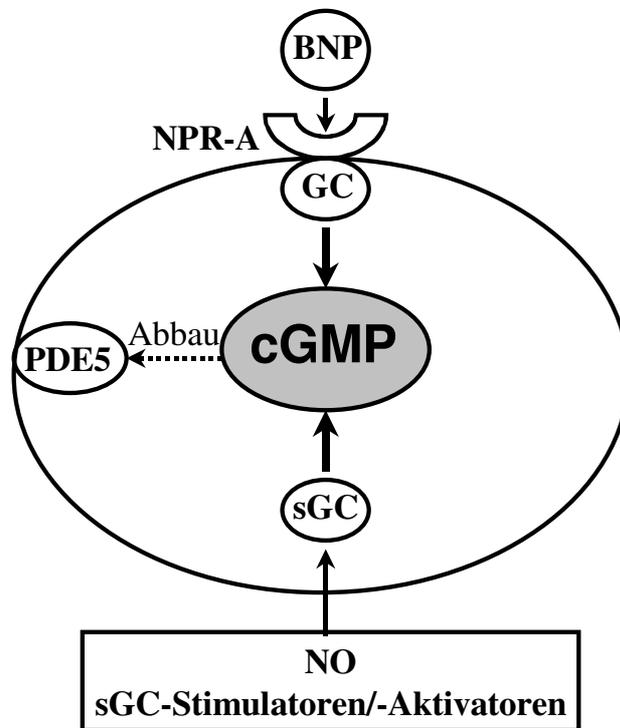


Abb. 2: Übersicht über den cGMP-Stoffwechsel:

BNP: B-Typ natriuretisches Peptid; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; NPR-A: natriuretisches Peptid Rezeptor-A; PDE: Phosphodiesterase; (s)GC: (lösliche) Guanylatzyklase

Pharmakologisch kann man hier also auf mehreren Ebenen ansetzen, um durch Erhöhung des cGMP die positiven Effekte des NO/cGMP-Signaltransduktionswegs auszunutzen: 1. Gabe von Nitraten, welche direkt NO freisetzen; 2. Pharmakologische Stimulation der Guanylatzyklase; 3. Gabe von Phosphodiesterasehemmern; 4. Gabe von rekombinantem BNP oder oral verfügbaren Derivaten des BNP.

Speziell die Punkte 2-4 liegen zur Zeit im Fokus der kardiovaskulären Forschung, in dieser Arbeit wird die Wirkung eines Aktivators der Guanylatzyklase vorgestellt (siehe 3.3).

1.3 ET-NO-Interaktion

Die beiden in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Systeme –das ET- und das NO/cGMP-System sind funktionelle Antagonisten in ihrer Wirkung auf wichtige Prozesse wie Vasotonus, Inflammation und Fibrose. Dies hat zu einem gesteigerten Interesse an der Interaktion beider Systeme geführt: Es ist bekannt, dass ET-1 über den endothelialen ET_B-Rezeptor die Synthese von NO und vasodilatatorischen Prostanoiden stimuliert (de Nucci *et al.*, 1988). Das NO/cGMP-System wiederum inhibiert die ET-1 Expression (Boulanger & Luscher, 1990;Giannessi *et al.*, 2001). Zusammengenommen bilden also beide Systeme einen Regelkreis mit negativer Rückkoppelung, in dem ET-1 die Bildung von NO stimuliert, welches dann wiederum die Expression von ET-1 inhibiert (siehe Abbildung 3). Aus dem Vorangegangenen ergibt sich, dass eine mögliche Imbalance von ET-1- und NO/cGMP-System von großer pathophysiologischer Relevanz mit Blick auf Inflammation, Fibrose und Vasotonus ist.

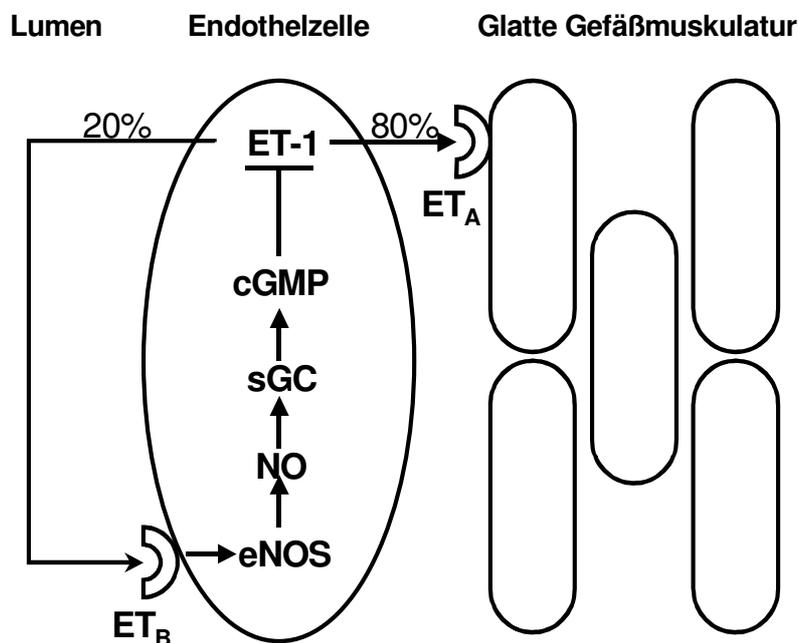


Abb. 3: Schematische Darstellung des ET-NO-Regelkreises am Blutgefäß

2 Fragestellungen der eigenen Arbeiten

Die in dieser Arbeit behandelten Originalarbeiten versuchen folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Wie wirkt sich eine pharmakologische Blockade des ET_A –Rezeptors am Schweinmodell des akuten Lungenversagens aus?
2. Welche Effekte hat eine genetische Defizienz des ET_B –Rezeptors im Rattenmodell der peritonealen Sklerose bei Peritonealdialyse?
3. Wie wirkt sich eine pharmakologische Beeinflussung des NO/cGMP-Signaltransduktionswegs in vivo auf den kardioresalen Endorganschaden im Niereninsuffizienzmodell an der Ratte (5/6 Nephrektomie) aus?
4. Wie verändert sich die renale Endothelinexpression in vivo bei einer pharmakologischen Hemmung der NO-Produktion?
5. Welche Auswirkungen hat eine Defizienz von verschiedenen NO-Synthetasen (iNOS und eNOS) auf den Phänotyp von ET-1 überexprimierenden Mäusen?
6. Welchen Effekt hat eine pharmakologische Blockade der NO-Produktion auf den pulmonalen Phänotyp von ET-1 überexprimierenden Mäusen?

3 Eigene Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext

3.1 Übersicht der eigenen Originalarbeiten zum Thema

P1: Kalk P, Senf P, Deja M, Petersen B, Busch T, Bauer C, Boemke W, Kaisers U, Hocher B.

Inhalation of an endothelin receptor A antagonist attenuates pulmonary inflammation in experimental acute lung injury. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008 Aug;86(8):511-5.

P2: Kalk P, Rückert M, Godes M, von Websky K, Relle K, Neumayer HH, Hocher B, Morgera S.

Does endothelin B receptor deficiency ameliorate the induction of peritoneal fibrosis in experimental peritoneal dialysis?

Nephrol Dial Transplant 2009 Nov 26.

P3: Kalk P, Godes M, Relle K, Rothkegel C, Hucke A, Stasch JP, Hocher B.

NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol*. 2006 Jul;148(6):853-9.

P4: Slowinski T*, **Kalk P***, Christian M, Schmager F, Relle K, Godes M, Funke-Kaiser H, Neumayer HH, Bauer C, Theuring F, Hocher B.

Cell-type specific interaction of endothelin and the nitric oxide system: pattern of prepro-ET-1 expression in kidneys of L-NAME treated prepro-ET-1 promoter-lacZ-transgenic mice. *J Physiol*. 2007 Jun 15;581(Pt 3):1173-81.

P5: Kalk P*, Westermann D*, Herzfeld S, Relle K, Pfab T, Bauer C, Tschöpe C, Stasch JP, Hocher B.

Additional lack of iNOS attenuates diastolic dysfunction in aged ET-1 transgenic mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008 Jun;86(6):353-7.

P6: Quaschnig T, Voss F, Relle K, **Kalk P**, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle J, Hocher B.

Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide

synthase knockout mice. J Am Soc Nephrol. 2007 Mar;18(3):730-40.

P7: Kalk P, Mach A, Thone-Reineke C, Godes M, Heiden S, Sharkovska Y, von Websky, K, Relle K, Hoher B.

Pulmonary fibrosis in L-NAME-treated mice is dependent on an activated endothelin system. Can J Physiol Pharmacol. 2008 Aug;86(8):541-5.

*: der Beitrag beider Autoren ist gleichwertig

3.2 Eigene Arbeiten zur Pathophysiologie des Endothelinsystems

Mit der Pathophysiologie des Endothelinsystems in ausgewählten Tiermodellen beschäftigen sich die Studien P1 und P2 (siehe 3.1.). In der Studie P1 war das konkrete Ziel die Rolle des ET_A-Rezeptors im Tiermodell des akuten Lungenversagens.

Das akute Lungenversagen wird je nach Schweregrad unterteilt in das ALI (Acute Lung Injury; PaO₂/FiO₂ < 300) und das ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome; PaO₂/FiO₂ < 300). Trotz deutlicher Verbesserungen bei der Mortalität in den 90er Jahren lag diese immer noch bei 34% (Abel *et al.*, 1998). Das Lungenversagen ist ein relativ uniformes Krankheitsbild gekennzeichnet durch ein nicht-hydrostatisches Lungenödem mit konsekutiver Hypoxämie (Bernard *et al.*, 1994). Die Ätiologie ist vielfältig: Schock, Sepsis, Polytrauma, Aspiration, Pneumonie, Inhalation toxischer Gase, etc. Aufgrund der hohen Letalität des Krankheitsbildes sind neue therapeutische Ansätze notwendig. Es ist bekannt, dass im akuten Lungenversagen sowohl Plasma- als auch pulmonale Gewebespiegel des Endothelin-1 erhöht sind und dass dies mit der Schwere des Krankheitsbildes assoziiert ist (Curzen *et al.*, 1996; Sanai *et al.*, 1996; Langleben *et al.*, 1993; Druml *et al.*, 1993). Diese Befunde legen eine wichtige Rolle des ET-1 als Mediator im akuten Lungenversagen nahe. Da im wesentlichen der ET_A-Rezeptor für die proinflammatorische Wirkung des ET-1 verantwortlich gemacht wird, wurde in unserer Studie P1 die Wirkung eines inhalativ verabreichten ET_A-Rezeptor-Antagonisten (LU 135252) am Tiermodell des ALI untersucht. Der inhalative Applikationsweg wurde gewählt, da in Vorversuchen eine systemische Gabe des ET_A-Antagonisten wegen der begleitenden Blutdrucksenkung zu erhöhter Mortalität führte. In unserer Studie wurde bei Schweinen in Intubationsnarkose mittels repetitiver Lavage der Lunge ein ALI induziert. Anschließend wurde über 30 min das Medikament oder ein Placebo inhalativ appliziert. Nach 6 h des invasiven Monitorings von Kreislauf und Gasaustausch wurde der Versuch beendet, allen Tiere wurden Gewebeproben der Lunge zur histologischen und immunhistochemischen Analyse entnommen. Wir konnten zeigen, dass klinisch Mortalität und arterielle Oxygenierung durch die Inhalation mit dem ET_A-Rezeptor-Antagonisten deutlich verbessert wurden ohne dass systemisch Nebenwirkungen mit Hinblick auf Blutdruck, Herzfrequenz und Herzleistung auftraten. Histologisch konnte durch die Behandlung eine Suppression von IL-6 und der Makrophageninfiltration im pulmonalen Gewebe nachgewiesen

werden. Somit kann festgehalten werden, dass die inhalative Therapie mit einem ET_A- Rezeptor-Antagonisten via bessere Oxygenierung und konsekutive Mortalitätsreduktion und via Suppression der pulmonalen Inflammationsreaktion ein mögliches neues Therapiekonzept des ALI darstellen kann. Ähnliche Effekte konnten auch in anderen Modellen nachgewiesen werden, z.B. in der experimentellen Chlorgasvergiftung (Wang *et al.*, 2006). Leider gibt es derzeit noch keine klinischen Interventionsstudien an ALI-Patienten mit Endothelinantagonisten, jedoch wird dies in einem kürzlich erschienenen Review durchaus empfohlen (Comellas & Briva, 2009).

Die Studie P2 beschäftigte sich schwerpunktmäßig mit einer möglichen pathophysiologischen Rolle des ET-Systems bei der Peritonealfibrose. Peritonealfibrose ist eine häufige Komplikation der Peritonealdialyse (Plum *et al.*, 2001) und limitiert den Einsatz dieser Dialyseart. Ergebnisse aus früheren Studien an humanem Material (Dialyseflüssigkeit und Mesothelzellkulturen) legten eine Beteiligung des ET-Systems an der Peritonealfibrose nahe (Morgera *et al.*, 1999; Morgera *et al.*, 2003). Welcher Rezeptor hierbei die mögliche Hauptrolle spielen würde, war bis dato unklar; eine Zellkulturstudie von Shimizu *et al.* legte eine Rolle des ET_B- Rezeptors nahe (Shimizu *et al.*, 2006). Somit wurde in P2 Peritonealdialyse in vivo am Rattenmodell durchgeführt, wobei eine Gruppe mit genetischem knock-out für den ET_B- Rezeptor mitgeführt wurde. Wir konnten zeigen, dass diese knock-out Tiere in der Tat keine ET_B- Rezeptoren im Peritoneum exprimieren, jedoch hatte diese Defizienz keinen Einfluß auf die dialyseinduzierte Peritonealfibrose in der computergestützten histologischen Auswertung von Peritoneumsproben nach 12wöchiger Dialysedauer. Dies legt den Schluß nahe, dass –zumindest in unserem in vivo Tiermodell- es keinen Anhalt für eine Beteiligung des ET_B- Rezeptors an der Peritonealfibrose gibt. Dies ist ein Widerspruch zur bereits zitierten Arbeit von Shimizu *et al.*, jedoch ist dabei zu bedenken, dass es sich bei dieser um eine in vitro-Studie mit lediglich der Fibronectinproduktion der Zellen als Fibrosemarker handelt; es gab also naturgemäß keine histologisch eindeutig quantifizierbare Fibrose. Es bleibt somit noch der ET_A- Rezeptor zu evaluieren als möglicher Mediator der Peritonealfibrose; hierzu liegen bisher aber in der Literatur noch keine Daten vor, so dass ein abschließendes Urteil zur pathophysiologischen Rolle und zur therapeutischen Nutzbarkeit des ET-Systems in diesem Krankheitsbild noch nicht gesprochen werden kann.

Eigene Originalarbeiten:

P1: Kalk P, Senf P, Deja M, Petersen B, Busch T, Bauer C, Boemke W, Kaisers U, Hocher B.

Inhalation of an endothelin receptor A antagonist attenuates pulmonary inflammation in experimental acute lung injury. Can J Physiol Pharmacol. 2008 Aug;86(8):511-5.

P2: Kalk P, Rückert M, Godes M, von Websky K, Relle K, Neumayer HH, Hocher B, Morgera S.

Does endothelin B receptor deficiency ameliorate the induction of peritoneal fibrosis in experimental peritoneal dialysis?

Nephrol Dial Transplant 2009 Nov 26.

3.3 Eigene Arbeiten zur Pathophysiologie des NO/cGMP-Systems

Mit der Pathophysiologie des NO/cGMP-Systems beschäftigt sich die Studie P3. Wie in der Einleitung dargelegt (siehe 1.2) gibt es mehrere pharmakologische Möglichkeiten die positiven Effekte des NO/cGMP-Systems zu nutzen. Eine der neueren Möglichkeiten lieferte die Entwicklung spezifischer Agonisten der löslichen Guanylatzyklase sGC (Evgenov *et al.*, 2006). Diese Substanzen stimulieren die sGC unabhängig von NO, unterliegen somit im Gegensatz zu den Nitraten keinem Toleranzeffekt und zeigen die volle Bandbreite der cGMP-Wirkungen (beispielsweise auch Thrombozytenaggregationshemmung), da sie keiner weiteren enzymatischen Biokonversion bedürfen. Jedoch gibt es hier Unterschiede in der pharmakologischen Wirkweise: Die sogenannten sGC-Stimulatoren stimulieren die sGC konventionell via Hämgruppe. Diese ist jedoch oxidationsanfällig und somit ergibt sich für die sGC-Stimulatoren wie für die Nitrate ein Wirkungsverlust bei hohem oxidativem Streß. Diesbezüglich gelang jedoch der Arbeitsgruppe um JP Stasch die Entdeckung einer Substanz (BAY 58-2667), welche die sGC häm-unabhängig aktiviert (Stasch *et al.*, 2002). Diese Substanz stimuliert die sGC in normalem Zustand, aktiviert sie jedoch noch potenter in oxidiertem Zustand; diese redox-spezifische Aktivität stellt ein neues pharmakologisches Prinzip dar: die sGC-Aktivatoren. Die chronische Niereninsuffizienz ist ein Krankheitsbild mit hohem oxidativem Streß und konsekutiv eingeschränkter NO-Wirksamkeit, desweiteren ist sie mit Hypertension und einem hohen Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert. Somit wurde die Studie P3 initiiert, um das therapeutische Potential dieses innovativen Wirkprinzips am Rattenmodell der Niereninsuffizienz (5/6 Nephrektomie) zu testen. Hierbei wurden männliche Wistar Ratten nach 5/6 Nephrektomie mit BAY 58-2667 für 18 Wochen behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte nephrektomierte und scheinoperierte Tiere. Wir konnten zeigen, dass die Behandlung mit BAY 58-2667 den Blutdruck der Tiere deutlich senkte, histologisch war eine deutliche Reduktion des kardialen und renalen Endorganschadens nachweisbar und funktionell konnte die Nierenfunktion deutlich besser erhalten werden als ohne Behandlung. Somit kann festgehalten werden, dass im niereninsuffizienten Tiermodell sGC-Aktivatoren sich als therapeutisch hochwirksam im Erhalt der Nierenfunktion und in der Prävention des kardioresalen Endorganschadens erwiesen haben, Hinweise für toxische Effekte traten nicht auf. Ähnlich positive, sogar blutdruckunabhängige Effekte wurden für sCG-Stimulatoren im Modell der anti-thy-1 Glomerulonephritis gefunden. (Wang *et*

al., 2005b). Im direkten Vergleich von sGC-Stimulator und Phosphodiesterase-Inhibitor an diesem Modell konnte eine Überlegenheit des Stimulators gezeigt werden (Wang *et al.*, 2005a). Kürzlich ist der von uns verwendete sGC-Aktivator in einer Studie an Patienten mit akut dekompensierter Herzinsuffizienz getestet worden und hat bei guter Verträglichkeit potente Vor- und Nachlast-senkende Effekte und eine Verbesserung der Herzfunktion gezeigt; die Autoren empfehlen die weitere Entwicklung des Medikamentes in dieser Indikation (Lapp *et al.*, 2009).

Eigene Originalarbeit:

P3: Kalk P, Godes M, Relle K, Rothkegel C, Hucke A, Stasch JP, Hoher B.

NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol.* 2006 Jul;148(6):853-9.

3.4 Eigene Arbeiten zur Pathophysiologie der ET-NO-Interaktion

In der Einleitung (siehe 1.3.) wurde dargelegt, dass experimentelle Daten einen negativen Rückkoppelungsmechanismus zwischen dem ET- und dem NO/cGMP-System nahe legen: Endothelin stimuliert via ET_B-Rezeptor die Produktion von NO, welches die Expression des ET-1 inhibiert. Somit ergibt sich für pathophysiologische Fragestellungen die interessante Konstellation, dass Veränderungen oder Eingriffe in einem der beiden Systeme möglicherweise verstärkt oder auch abgeschwächt werden können durch konsekutive Veränderungen im antagonistischen System. Ein gutes Beispiel wie sich das Gesagte konkret auswirken kann, ist der Blutdruck ET-1 überexprimierender Mäuse: Obwohl seinerzeit ET-1 der stärkste bekannte Vasokonstriktor war, zeigte das Mausmodell mit Überexpression des ET-1 bei seiner Erstbeschreibung erstaunlicherweise keinerlei erhöhten Blutdruck (Hocher *et al.*, 1997). Somit wurde die Hypothese einer Gegenregulation durch NO generiert, welche auf einem erhöhten Niveau ein erneutes Equilibrium zwischen ET und NO und damit Normotension ermöglichte. Diese These wurde durch Nachweis einer bei diesen Tieren überschießend hypertensiven Antwort auf L-NAME (ein unselektiver NOS-Inhibitor) bewiesen (Hocher *et al.*, 2004). Somit stellte die Erforschung der ET-NO-Interaktion in vivo in verschiedenen Organsystemen (Niere, Herz, Lunge) einen Schwerpunkt unserer Arbeit in den Folgejahren dar: in dieser Arbeit werden die Studien P4, P5, P6 und P7 vorgestellt.

Legt man die Theorie eines Regelkreises mit negativer Rückkoppelung zwischen NO- und ET-System zugrunde, so ist nach einer Applikation von L-NAME durch den Wegfall der inhibierenden NO-Produktion eine Erhöhung der ET-1-Expression zu erwarten. Um diese Theorie zu belegen, wurde in der Studie P4 zunächst ein transgenes Mausmodell geschaffen, welches ein lacZ-Reporter gen unter der Kontrolle eines präpro-ET-1-Promotors trägt. Mittels Bluo-Gal-Färbung kann nun durch einfache histologische Färbung der Nachweis einer Aktivität des Endothelinpromotors visualisiert und quantifiziert werden. Wir validierten das Modell zunächst durch Ganzkörperschnitte von Mausembryonen, da die Rolle und Lokalisation von ET-1-Expression in der Embryogenese gut bekannt ist. In der Tat zeigte sich in der Bluo-Gal-Färbung unserer Mäuseembryonen eine starke Aktivität des ET-Promotors in der kraniofazialen Region. Dies ist gut vereinbar mit der Literatur, welche bei angeborener Defizienz für ET-1 oder ET_A letale kraniofaziale Malformitäten beschreibt (Kurihara *et al.*, 1994; Kurihara *et al.*, 1995; Clouthier *et al.*,

1998). Nachdem somit ein Modell geschaffen und validiert war, welches eine histologische Visualisierung und Quantifizierung der ET-1-Expression mittels computergestützter Bildanalyse zuließ, wurde in einem weiteren Schritt die renale ET-NO-Interaktion untersucht: Hierzu wurde den Tieren einmalig intraperitoneal L-NAME verabreicht; nach 12h erfolgte die Entnahme der Nieren und die Bluo-Gal-Färbung. Wie theoretisch gefordert, konnte eine Zunahme der ET-1-Expression in der Niere der L-NAME-behandelten Tiere nachgewiesen werden; die histologische Zuordnung zeigte hierbei gewebespezifische Unterschiede: Am stärksten nahm die ET-Expression im Tubulus zu, gefolgt vom Glomerulum, wohingegen keine signifikante Zunahme im vaskulären Endothel nachzuweisen war. Als alternativer Ansatz zur Validierung dieser Ergebnisse wurden begleitende ET-1-Gewebespiegelmessungen durchgeführt; diese zeigten eine hohe statistische Korrelation zu den Ergebnissen der Bluo-Gal-Färbung, womit eine Verlässlichkeit der Interpretation unserer histologischen Expressionsmessungen belegt wurde. Die gewebespezifische Expressionsantwort auf L-NAME lässt auf eine unterschiedlich ausgeprägte Promotorsensitivität für den negativen Rückkoppelungsmechanismus schließen. Dies ist pathophysiologisch relevant, da es unterschiedliche Wirkungen desselben pharmakologischen Eingriffes in verschiedenen Geweben hervorrufen könnte. Zelltyp-spezifische Expression bei Genen des Endothelinsystems ist jedoch prinzipiell aus anderen Zusammenhängen bekannt; zum Beispiel die ECE-1a Isoform ist Zelltyp-spezifisch exprimiert, wohingegen die 1c-Isoform eher konstitutiv exprimiert wird (Valdenaire *et al.*, 1999; Funke-Kaiser *et al.*, 1998; Funke-Kaiser *et al.*, 2003).

Zusammenfassend konnten wir also in P4 ein neues transgenes Mausmodell zur unkomplizierten *in vivo* Analyse der ET-1-Expression generieren und vermittels dieses Modells die renale ET-NO-Interaktion im Sinne der theoretisch geforderten Rückkoppelung prinzipiell nachweisen, wobei jedoch Zelltyp-spezifische Unterschiede gezeigt wurden.

Da initiale Befunde der iNOS in der Gegenregulation des Endothelins eine Schlüsselrolle zuzuweisen schienen (Hoche *et al.*, 2004), wurde durch Kreuzung von iNOS-knockout Mäusen mit Endothelin-1 transgenen Tieren ein Mausmodell (ET^{+/+} iNOS^{-/-}) geschaffen, von welchem wir uns eine fixierte Dysbalance der Systeme mit allen pathophysiologischen Auswirkungen erwarteten wie beispielsweise Hypertonus und Organschäden durch vermehrte Inflammations- und

Fibrosevorgänge. Teilweise hat sich dies bewahrheitet: In einer Studie konnten wir in der Tat zeigen, dass gegenüber ET-1 transgenen Mäusen der systolische Blutdruck der ET^{+/+}iNOS^{-/-} Mäuse leicht erhöht ist, was auf eingeschränkte endothelabhängige Vasorelaxation zurückzuführen war (Quaschnig *et al.*, 2007). In der Studie P5 wendeten wir uns dann dem kardialen Phänotyp unseres neuen Modells zu: Hierzu wurden bei 13 Monate alten Mäusen eine Herzkatheteruntersuchung zur funktionellen Charakterisierung des linken Ventrikels, sowie anschließend eine histologische Aufarbeitung des linken Ventrikels durchgeführt. Von der Theorie der fixierten ET-NO-Imbalance der Tiere mit konsekutiver Inflammation und Gewebefibrose her gesehen wurde eine histologisch nachweisbare Herzfibrose und diastolische Dysfunktion der ET^{+/+}iNOS^{-/-} Tiere erwartet. Interessanterweise konnte dies so nicht nachgewiesen werden, vielmehr war die Herzfibrose bei den ET-1 überexprimierenden, wie auch bei den iNOS^{-/-} Tieren gegenüber dem Wildtyp erhöht, bei den ET^{+/+}iNOS^{-/-} jedoch normal. Passend dazu war der Plasmaspiegel des BNP als Marker für Herzinsuffizienz ebenfalls bei beiden genannten Gruppe versus Wildtyp erhöht, bei den ET^{+/+}iNOS^{-/-} Tieren jedoch normal. Im Herzkatheter ließ sich eine erhöhte linksventrikuläre Steifigkeit aller Endothelin-überexprimierender Gruppen nachweisen, jedoch war auch hier der Effekt in der ET^{+/+}iNOS^{-/-}-Gruppe signifikant geringer als in der ET^{+/+}-Gruppe. Im Herzkatheter konnten keine Unterschiede bezüglich systolischer Funktionsparameter detektiert werden. Somit lässt sich festhalten, dass am Herz altersabhängig durch ET-1 Überexpression eine Fibrose mit konsekutiver diastolischer Dysfunktion induziert wird; die gleichzeitige Defizienz für iNOS wirkt hier sogar protektiv. Letzteres lässt vermuten, dass der ET-1 induzierte kardiale Gewebeschaden möglicherweise partiell durch iNOS mediert wird. Unsere Ergebnisse sind konsistent mit der Literatur, die eine Ambivalenz der iNOS am Herzen nahe legen: Zum einen wirkt die iNOS zytoprotektiv (Jones & Bolli, 2006), jedoch kann eine Überexpression auch zum kardialen Gewebeschaden via Inflammation und Fibrose führen (Mungrue *et al.*, 2002). Die Erklärung für diese Ambivalenz liegt in der schmalen Balance zwischen benefizieller, physiologischer NO-Produktion und Überproduktion mit konsekutiver Bildung toxischer Metabolite wie Peroxynitrit. Die vorliegenden Befunde machen jedoch eine Hauptrolle der iNOS in dem negativ rückgekoppelten Regulationsgleichgewicht von ET und NO unwahrscheinlich.

Somit generierten wir in weiteren Kreuzungsversuchen zwischen ET-1 überexprimierenden Mäusen und eNOS knock-out-Mäusen ein weiteres Modell mit fixierter Imbalance zwischen ET- und NO-System (Studie P6). In diesem Modell traten in der Tat ein gegen über allen Kontrollgruppen signifikant erhöhter Blutdruck und histologische Gefäßwandveränderungen auf; interessanterweise war in aortalen Gewebeproben in der quantitativen PCR die Expression aller Komponenten des ET-Systems (ET, ECE, ET_{A+B}-Rezeptor) deutlich erhöht, was gut mit einem Wegfall der inhibierenden NO/cGMP-Wirkung vereinbar ist. Damit zeigt das Modell den erwarteten Phänotyp im Sinne der Hypothese, so dass zusammenfassend davon ausgegangen werden kann, dass der ET-NO-Regelkreis im wesentlichen über die eNOS mediiert wird.

Da sich bei der Beschreibung des Phänotyps ET-1 überexprimierender Mäuse ein deutlicher pulmonaler Phänotyp im Sinne von Inflammation und Fibrose nachweisen ließ (Hocher *et al.*, 2000), wurde in der Studie P7 gezielt die Interaktion von ET- und NO-System am pulmonalen Phänotyp untersucht. Hierzu wurden Wildtyp-Mäuse und Endothelin-1 überexprimierende Mäuse im Alter von 8 Wochen (also vor Einsetzen der Lungenfibrose in den ET-überexprimierenden Tieren) in die Studie eingeschlossen und mit dem unselektiven NOS-Blocker L-NAME, beziehungsweise mit L-NAME und einem unselektiven Endothelinantagonisten (LU 302872) behandelt. Nach 6 Wochen wurden die Lungen entnommen und histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet. Wir konnten zeigen, dass weder die Makrophageninfiltration noch die pulmonale Fibrose zwischen unbehandelten transgenen und Wildtypen unterschiedlich war. Bei den L-NAME behandelten Gruppen kam es jedoch nur bei den ET überexprimierenden Tieren zu einer Zunahme von Inflammation und Fibrose. Dieser Effekt war bei gleichzeitiger Gabe des Endothelinantagonisten nicht nachweisbar. Diese Resultate zeigen, dass ein aktiviertes Endothelinsystem, wenn die Gegenregulation durch NO ausfällt, zu einem inflammatorischen Phänotyp mit konsekutiver Fibrose in der Lunge führt. Daß es keineswegs die Defizienz von NO ist, die die beschriebenen Effekte auslöst, sondern ein durch mangelnde Gegenregulation entkoppeltes ET-System, zeigt die vollständige Hemmbarkeit der Effekte durch ET-Antagonisten. Daß Endothelin-Überexpression alleine nicht die Effekte erklären kann, zeigt die Abwesenheit der Effekte in der unbehandelten ET-Gruppe. Somit kann zusammenfassend festgehalten werden, dass für die Ausbildung eines pathologischen pulmonalen

Phänotyps die gleichzeitige Anwesenheit eines aktivierten Endothelinsystems und eine fehlende Gegenregulation durch NO essentiell ist; der Imbalance beider Systeme kommt also größere pathophysiologische Bedeutung zu als der isolierten Veränderung in einem System allein.

Eigene Originalarbeiten:

P4: Slowinski T*, **Kalk P***, Christian M, Schmager F, Relle K, Godes M, Funke-Kaiser H, Neumayer HH, Bauer C, Theuring F, Hocher B.

Cell-type specific interaction of endothelin and the nitric oxide system: pattern of prepro-ET-1 expression in kidneys of L-NAME treated prepro-ET-1 promoter-lacZ-transgenic mice. *J Physiol.* 2007 Jun 15;581(Pt 3):1173-81.

P5: **Kalk P***, Westermann D*, Herzfeld S, Relle K, Pfab T, Bauer C, Tschöpe C, Stasch JP, Hocher B.

Additional lack of iNOS attenuates diastolic dysfunction in aged ET-1 transgenic mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008 Jun;86(6):353-7.

P6: Quaschnig T, Voss F, Relle K, **Kalk P**, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle J, Hocher B.

Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Mar;18(3):730-40.

P7: **Kalk P**, Mach A, Thone-Reineke C, Godes M, Heiden S, Sharkovska Y, von Websky, K, Relle K, Hocher B.

Pulmonary fibrosis in L-NAME-treated mice is dependent on an activated endothelin system. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008 Aug;86(8):541-5.

*: der Beitrag beider Autoren ist gleichwertig

4 Schlußfolgerungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Studien lassen folgende Schlussfolgerungen im Sinne der eingangs gestellten Fragen (siehe 2) zu:

1. Wir konnten im Schweinemodell des akuten Lungenversagens durch inhalative Applikation eines ET_A-Rezeptors-Antagonisten den Gasaustausch verbessern, die Mortalität senken und die pulmonale Inflammationsreaktion supprimieren. Somit ist -gerade auch unter Einbeziehung ähnlicher Ergebnisse in alternativen Modellen des Lungenversagens- von einer starken pathophysiologischen Beteiligung des Endothelinsystems via ET_A-Rezeptor an diesem Krankheitsbild auszugehen und eine mögliche klinisch-therapeutische Nutzbarkeit der Erkenntnisse zur Behandlung dieses mit hoher Letalität behafteten Krankheitsbildes ist naheliegend. Klinische Studien am Menschen sind daher empfehlenswert.
2. Wir konnten keinen Effekt einer Defizienz des ET_B-Rezeptors im Tiermodell der Peritonealfibrose bei Peritonealdialyse nachweisen. Da entsprechende Daten für den ET_A-Rezeptor noch nicht vorliegen, sind analoge Experimente mit ET_A-antagonistischer Intervention empfehlenswert, um den pathophysiologischen Stellenwert und eine mögliche therapeutische Nutzbarkeit des ET-Systems in diesem Krankheitsbild abschließend zu beurteilen.
3. Wir konnten durch orale Applikation eines sGC-Aktivators im hypertensiven, niereninsuffizienten Tiermodell (5/6 Nephrektomie) den Blutdruck signifikant senken, den histologisch nachgewiesenen kardiorenenalen Endorganschaden und die weitere Progression der Niereninsuffizienz abschwächen. Ähnliche, teilweise auch blutdruckunabhängige Effekte in anderen Niereninsuffizienzmodellen anderer Autoren legen eine therapeutische Nutzbarkeit dieser Substanzgruppe in hypertensiologisch-kardiovaskulären Indikationsgebieten nahe; erste Studien an Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz belegen für die von uns verwendete Substanz eine gute Wirksamkeit bei gleichzeitig hoher Verträglichkeit. Die sukzessive Anwendung bei weiteren Krankheitsbildern, speziell Hypertension und Niereninsuffizienz, erscheint im Lichte unserer Daten empfehlenswert.
4. Unter der Annahme eines Regelkreises mit negativer Rückkopplung zwischen Endothelin- und NO/cGMP-System führten wir verschiedene Studien

zur Bedeutung dieser Interaktion in vivo in verschiedenen Organsystemen und verschiedenen Tiermodellen durch. Wir konnten an einem eigens zu diesem Zweck etablierten und validierten Tiermodell zeigen, dass eine Blockade der NO-Synthetasen in der Tat zu einer deutlichen Hochregulation der renalen ET-Expression führt, welche interessanterweise gewebespezifisch unterschiedlich moduliert war. Mit dieser Studie ist eine Interaktion ET-NO-Interaktion im Sinne des beschriebenen Regelkreises im renalen Gewebe in vivo bewiesen.

5. Wir konnten an zwei zu diesem Zweck etablierten transgenen Mausmodellen (ET^{+/+}iNOS^{-/-} und ET^{+/+}eNOS^{-/-}) zeigen, dass die für den ET-NO-Regelkreis pathophysiologisch relevante Rückkoppelung über die eNOS mediiert wird, da das diesbezügliche Tiermodell im Sinne der Hypothese den erwarteten Phänotyp –gekennzeichnet durch Hypertension, histologische Gefäßveränderungen und eine deutliche vaskuläre Hochregulation des Endothelinsystems- zeigt. Jedoch ist auch die Interaktion von ET und iNOS pathophysiologisch relevant, da ein Fehlen der iNOS beim ET-überexprimierenden Tier zu einer Abschwächung der ET-induzierten Herzveränderungen führt. Dies legt eine Rolle der iNOS im ET-vermittelten kardialen Gewebeschaden nahe. Ob dies ein generelles Prinzip des ET-vermittelten Gewebeschadens darstellt, sollte durch weitere Untersuchungen in anderen Organsystemen geklärt werden.
6. An der Lunge führt eine Blockade des NO-Systems bei Endothelin-überexprimierenden Mäusen zu einem inflammatorischen und fibrotischen Phänotyp. Dieser Effekt tritt weder beim Wildtyp, noch bei ET-überexprimierenden Mäusen mit gleichzeitiger ET-Rezeptorblockade auf. Dies verweist auf die ET-NO-Imbalance als wesentlichen pathophysiologischen Auslöser des pulmonalen Gewebeschadens. Dies unterstreicht, dass ET und NO nicht isoliert voneinander betrachtet werden sollten, sondern in ihrer relativen Aktivität zueinander.

Im Gesamtkontext der vaskulären Forschung kann konstatiert werden, dass seit 10-20 Jahren mit der Entdeckung des Endothelinsystems, der Entwicklung spezifischer Agonisten im NO/cGMP-System, sowie der Aufdeckung der engen Interaktion beider Systeme die kardiovaskuläre Forschung deutlich belebt worden ist; die vorliegenden

Arbeiten in dieser Habilitationsschrift geben von dieser Belegung einen bescheidenen Eindruck.

Die gewonnenen Erkenntnisse in diesem Feld haben dazu geführt, dass beispielsweise Endothelinantagonisten seit 2002 zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie zugelassen wurden; weitere Studien mit Blick auf Zulassung bei Sklerodermie, therapierefraktärem Hypertonus und Proteinurie sind abgeschlossen oder noch laufend (Barton & Yanagisawa, 2008). Kritisch ist jedoch anzumerken, dass die (tier-)experimentellen Daten für das Endothelinsystem sehr vielversprechend sind, dass jedoch bei den klinischen Studien mit Endothelinantagonisten durch die begleitende Wasserretention eine Exazerbation der Herzinsuffizienz hervorgerufen wurde, welche bis zum Studienabbruch führen kann (Mann *et al.*, 2010). Der weitere klinische Durchbruch der Endothelinantagonisten ist also noch offen und wird wesentlich davon abhängen inwieweit beispielsweise durch Dosisanpassung und Komedikation mit Diuretika diese Nebenwirkungen beherrschbar sind. Ein neuerer Ansatz dieses offene Problem zu lösen ist die Entwicklung von kombinierten Endothelin-Konversionsenzym/Neutrale Endopeptidase (ECE/NEP) -Inhibitoren. Diese Substanzen hemmen die Produktion von Endothelin und führen durch NEP-Inhibition gleichzeitig zu einer Hemmung des Abbaus der natriuretischen Peptide, welche einer Salz-Wasserretention entgegenwirken. Da diese Substanzen derzeit noch im Experimentalstadium sind ist ihr klinischer Nutzen derzeit noch völlig offen.

Bezüglich der Agonisten im NO/cGMP-System (Gyanylatzyklase-Stimulatoren und –Aktivatoren) ist zu vermerken, dass diese derzeit konsequent in Richtung der Indikationen pulmonale Hypertonie und Herzinsuffizienz entwickelt werden mit vielversprechenden Resultaten (Tamargo *et al.*, 2010;Ghofrani *et al.*, 2010). Das Nebenwirkungsprofil dieser Substanzen scheint günstiger zu sein als das der Endothelinantagonisten, somit steht einer sukzessiven Ausweitung der Indikationen derzeit nichts im Wege; jedoch ist zum jetzigen Zeitpunkt eine Abschätzung der klinischen Bedeutung -speziell im Vergleich zum etablierten hohen Therapiestandard (z. B. ACE-Hemmer, ARBs)- noch nicht möglich.

Die Interaktion zwischen Endothelin- und NO/cGMP-System wirft die meisten offenen Fragen bezüglich der therapeutischen Verwertbarkeit auf, da die Forschung hier noch weitgehend im tierexperimentellen Stadium ist. Bekanntermaßen führt beispielsweise oxidativer Streß sowohl zu einer Aktivierung des Endothelinsystems

als auch zu einer Inhibierung des NO/cGMP-Systems, auch das verbreitete Immunsuppressivum Cyclosporin stört nachweislich die ET/NO-Homöostase. Die klinische Relevanz der ET/NO-Homöostase ist daher hoch anzusetzen; aktuelle experimentelle Befunde bei Cyclosporin-induzierter endothelialer Dysfunktion zeigen darüber hinaus eine Reversibilität unter kombinierter ET-antagonistischer und NO-agonistischer Therapie (Ramzy *et al.*, 2010). Interessanterweise führt eine chronische Endothelinblockade am Tiermodell nicht nur zu einer Verlangsamung der Atherosklerose, sondern auch zu einer verstärkten Wirksamkeit von NO in den Gefäßen (Barton *et al.*, 1998).

Inwiefern jedoch auch am Menschen eine Therapie der gestörten ET/NO-Homöostase durch Einzel- oder Kombinationstherapie mit Endothelinantagonisten und NO-Agonisten klinisch-therapeutisch nutzbar ist -etwa durch Progressionsverlangsamung der Atherosklerose und Prävention kardiovaskulärer Ereignisse- ist momentan noch völlig offen.

5 Zusammenfassung

In dieser kumulativen Arbeit werden insgesamt 7 Studien des Autors zum Thema „Pathophysiologie der vasoaktiven Mediatoren Endothelin-1 und NO sowie ihrer Interaktion am Tiermodell“ vorgestellt. Beide Systeme sind im Gefäßendothel aktiv und bekanntermaßen beteiligt am Vasotonus, sowie an Inflammations- und Fibrosevorgängen. Sie wirken als Antagonisten und man nimmt an, dass sie über einen Regelkreis mit negativer Rückkoppelung verbunden sind, wobei Endothelin via ET_B -Rezeptor die Bildung von NO fördert, welches dann die Expression von Endothelin inhibiert. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die pathophysiologische Bedeutung der Systeme, sowie die ihrer Interaktion in vivo in verschiedenen Tiermodellen zu untersuchen:

Wir konnten im Schweinmodell des akuten Lungenversagens durch inhalative Applikation eines ET_A -Rezeptors-Antagonisten den Gasaustausch verbessern, die Mortalität senken und die pulmonale Inflammationsreaktion supprimieren.

Wir konnten keinen Effekt einer Defizienz des ET_B -Rezeptors im Tiermodell der Peritonealfibrose bei Peritonealdialyse nachweisen.

Wir konnten durch orale Applikation eines sGC-Aktivators im hypertensiven, niereninsuffizienten Tiermodell (5/6 Nephrektomie) den Blutdruck signifikant senken, den histologisch nachgewiesenen kardierenalen Endorganschaden und die weitere Progression der Niereninsuffizienz verlangsamen.

Wir zeigten an einem eigens zu diesem Zweck etablierten und validierten Tiermodell, dass eine Blockade der NO-Synthethasen in der Tat zu einer deutlichen Hochregulation der renalen ET-Expression führt, welche interessanterweise gewebespezifisch unterschiedlich moduliert war. Mit dieser Studie ist eine Interaktion ET-NO-Interaktion im Sinne des beschriebenen Regelkreises in der Niere in vivo bewiesen.

Wir konnten an zwei zu diesem Zweck etablierten transgenen Mausmodellen ($ET_{+/+}iNOS^{-/-}$ und $ET_{+/+}eNOS^{-/-}$) zeigen, dass die für den ET-NO-Regelkreis pathophysiologisch relevante Rückkoppelung über die eNOS mediiert wird, da das diesbezügliche Tiermodell im Sinne der Hypothese den erwarteten Phänotyp – gekennzeichnet durch Hypertension, histologische Gefäßveränderungen und eine deutliche vaskuläre Hochregulation des Endothelinsystems- zeigt. Jedoch ist auch die Interaktion von ET und iNOS pathophysiologisch relevant, da ein Fehlen der

iNOS beim ET-überexprimierenden Tier zu einer Abschwächung der ET-induzierten Herzveränderungen führt.

Wir demonstrierten weiterhin, dass eine Blockade des NO-Systems bei Endothelin-überexprimierenden Mäusen zu einem inflammatorischen und fibrotischen Phänotyp der Lunge führt. Dieser Effekt tritt weder beim Wildtyp, noch bei ET-überexprimierenden Mäusen mit gleichzeitiger ET-Rezeptorblockade auf. Dies verweist auf die ET-NO-Imbalance als wesentlichsten pathophysiologischen Auslöser des pulmonalen Gewebeschadens in unserem Modell.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Endothelinsystem im Tiermodell des Lungenversagens eine wesentliche Rolle spielt, eine therapeutische Nutzbarkeit ist naheliegend und sollte in klinischen Studien evaluiert werden. Die Abwesenheit eines nachweisbaren Effektes einer ET_B-Rezeptordefizienz auf die Peritonealfibrose bei Peritonealdialyse in unserer Arbeit verlangt nach analogen Studien mit ET_A-Antagonisten, bevor ein endgültiges Urteil über die pathophysiologische Bedeutung des ET-Systems in diesem Krankheitsbild gefällt werden kann.

Mit Blick auf das NO/cGMP-System legen unsere Ergebnisse einen Nutzen von sGC-agonistischen Wirkprinzipien in hypertensiologisch-kardiovaskulären Indikationsgebieten nahe; dies ist bereits Gegenstand aktueller klinischer Studien.

Wir konnten in vivo für das renale Gewebe die ET-NO-Interaktion im Sinne eines negativ rückgekoppelten Systems beweisen. Dass dieser Interaktion pathophysiologisch mehr Bedeutung zukommt als der Aktivität des Einzelsystems konnten wir an der Modulation des pulmonalen Phänotyps der ET-überexprimierenden Mäuse demonstrieren. Zwei Mausmodelle mit einer fixierten Dysbalance zwischen ET und NO-System wurden daraufhin beschrieben (ET^{+/+}iNOS^{-/-} und ET^{+/+}eNOS^{-/-}), wobei dem ET^{+/+}eNOS^{-/-} Modell im Sinne des beschriebenen ET-NO-Regelkreises die größere pathophysiologische Bedeutung zukommt.

Schlagerworte: Endothelin, NO, Pathophysiologie, Tiermodell.

Abstract

This work contains a summary of 7 studies that the author has conducted in order to elucidate the pathophysiological impact of the endothelin- and NO/cGMP-system and their interaction in vivo. Both systems are known to be located in vascular endothelium, to regulate vasotonus and contribute to inflammatory/fibrotic tissue damage. They act as antagonists and it is generally assumed that they form a negatively coupled feedback loop thereby endothelin stimulating NO-release and in turn NO inhibiting ET-1 expression. The objective of this work is to investigate the pathophysiological impact of both systems and their interaction in various animal models:

We demonstrated in a pig model of acute lung injury better gas exchange, lower mortality and suppression of pulmonary inflammation after inhalative application of an ET_A-receptor-antagonist.

We failed to detect any effect of ET_B-receptor-deficiency in an animal model of peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis.

We showed a significant reduction of blood pressure and cardiorenal target organ damage in a rat model of hypertension and chronic renal failure (5/6 nephrectomy) by treatment with an sGC-activator.

We created a mouse model for facilitating investigation of ET-1 Expression in vivo and using this model we demonstrated that inhibition of NO-production indeed leads to increased ET-1 expression in the kidney in a cell-type specific manner, thereby providing evidence for the existence of the ET-NO-feedback loop in vivo in the kidney.

We demonstrated via creation of 2 transgenic mouse models (ET₊/+iNOS^{-/-} und ET₊/+eNOS^{-/-}) that the pathophysiologically relevant ET-NO-Interaction seems to be mediated via eNOS as the respective mouse model indeed displayed the phenotype-hypertension, vascular remodelling and significant upregulation of the vascular ET-system-which is expected in ET-NO-Imbalance. However, the iNOS-ET-interaction also bears pathophysiological impact, as the concomitant lack of iNOS in ET-overexpressing mice leads to a significant alleviation of ET-induced cardiac tissue damage.

We further showed that inhibition of NO production in ET-overexpressing mice leads to an inflammatory and fibrotic pulmonary phenotype. This effect was absent both in wildtype animals and in ET-overexpressing mice if a dual ET-receptor-blocker was

given at the same time. These findings indicate a pivotal role for ET-NO-imbalance as the main cause for pulmonary tissue damage in our model.

As a conclusion we state that the ET-system is a major player in acute lung injury. Inhalative ET_A-blockade should be evaluated in clinical trials as a treatment option. The absence of any effect of ET_B-deficiency in a rat model of peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis urges the need for corresponding studies using ET_A-antagonists before a final judgement regarding the pathophysiological impact of ET in this disease can be made.

Our results indicate beneficial effects of sGC-agonistic compounds in cardiovascular diseases; this is currently investigated in clinical trials.

We give evidence for renal ET-NO-interaction in vivo and demonstrated in pulmonary tissue of ET-overexpressing mice that this interaction bears more pathophysiological impact on pulmonary tissue scarring than isolated intervention in one of the systems. Two mouse models (ET^{+/+}iNOS^{-/-} und ET^{+/+}eNOS^{-/-}) with genetically determined imbalance between ET and NO were described in order to study the pathophysiological impact of ET-NO-Imbalance in vivo thereby identifying the ET^{+/+}eNOS^{-/-} mouse as the model with greater pathophysiological relevance concerning vascular ET-NO-Imbalance.

Keywords: endothelin, NO, pathophysiology, animal model.

6 Literaturangaben aus dem freien Text

- Abel, S. J., Finney, S. J., Brett, S. J., Keogh, B. F., Morgan, C. J., & Evans, T. W. (1998). Reduced mortality in association with the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax* **53**, 292-294.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., & Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. **20-27;348**, 730-732.
- Barton, M., Haudenschild, C. C., d'Uscio, L. V., Shaw, S., Munter, K., & Luscher, T. F. (1998). Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 14367-14372.
- Barton, M. & Yanagisawa, M. (2008). Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **86**, 485-498.
- Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., LeGall, J. R., Morris, A., & Spragg, R. (1994). The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **149**, 818-824.
- Boulanger, C. & Luscher, T. F. (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J.Clin.Invest.* **85**, 587-590.
- Chen, Y., Sun, Y., Lin, J., Zhou, A., & Wang, H. (1997). Research on the mechanism of endothelin inflammatory effects on human mesangial cells. *Chin Med.J.(Engl.)* **110**, 530-534.

Clouthier, D. E., Hosoda, K., Richardson, J. A., Williams, S. C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., Kumada, M., Hammer, R. E., & Yanagisawa, M. (1998). Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*. **125**, 813-824.

Comellas, A. P. & Briva, A. (2009). Role of endothelin-1 in acute lung injury. *Transl.Res.* **153**, 263-271.

Curzen, N. P., Jourdan, K. B., & Mitchell, J. A. (1996). Endothelial modification of pulmonary vascular tone. *Intensive Care Med.* **22**, 596-607.

de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T. D., & Vane, J. R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 9797-9800.

Druml, W., Steltzer, H., Waldhausl, W., Lenz, K., Hammerle, A., Vierhapper, H., Gasic, S., & Wagner, O. F. (1993). Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.* **148**, 1169-1173.

Evgenov, O. V., Pacher, P., Schmidt, P. M., Hasko, G., Schmidt, H. H. H. W., & Stasch, J. P. (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**, 755-768.

Fernandes, L. B., Henry, P. J., Rigby, P. J., & Goldie, R. G. (1996). EndothelinB (ETB) receptor-activated potentiation of cholinergic nerve-mediated contraction in human bronchus. *Br.J.Pharmacol.* **118**, 1873-1874.

Forstermann, U. & Kleinert, H. (1995). Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **352**, 351-364.

Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M., & Nishikibe, M. (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **199**, 1461-1465.

Funke-Kaiser, H., Orzechowski, H. D., Richter, M., & Paul, M. (1998). Human endothelin-converting enzyme-1 beta mRNA expression is regulated by an alternative promoter. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **31 Suppl 1**, S7-S9.

Funke-Kaiser, H., Thomas, A., Bremer, J., Kovacevic, S. D., Scheuch, K., Bolbrinker, J., Theis, S., Lemmer, J., Zimmermann, A., Zollmann, F. S., Herrmann, S. M., Paul, M., & Orzechowski, H. D. (2003). Regulation of the major isoform of human endothelin-converting enzyme-1 by a strong housekeeping promoter modulated by polymorphic microsatellites. *J.Hypertens.* **21**, 2111-2124.

Ghofrani, H. A., Hoeper, M. M., Halank, M., Meyer, F. J., Staehler, G., Behr, J., Ewert, R., Weimann, G., & Grimminger, F. (2010). Riociguat for chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a phase II study. *Eur.Respir.J.* **36**, 792-799.

Giannessi, D., Del Ry, S., & Vitale, R. L. (2001). The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol.Res.* **43**, 111-126.

Hirata, Y., Takagi, Y., Fukuda, Y., & Marumo, F. (1989). Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **78**, 225-228.

Hoher, B., Dembowski, C., Slowinski, T., Friese, S. T., Schwarz, A., Siren, A. L., Neumayer, H. H., Thone-Reineke, C., Bauer, C., Nafz, B., & Ehrenreich, H. (2001). Impaired sodium excretion, decreased glomerular filtration rate and elevated blood pressure in endothelin receptor type B deficient rats. *J.Mol.Med.* **78**, 633-641.

Hoher, B., Schwarz, A., Fagan, K. A., Thone-Reineke, C., El Hag, K., Kusserow, H., Elitok, S., Bauer, C., Neumayer, H. H., Rodman, D. M., & Theuring, F. (2000). Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **23**, 19-26.

Hoher, B., Schwarz, A., Slowinski, T., Bachmann, S., Pfeilschifter, J., Neumayer, H. H., & Bauer, C. (2004). In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin. *J.Hypertens.* **22**, 111-119.

Hoher, B., Thone-Reineke, C., Rohmeiss, P., Schmager, F., Slowinski, T., Burst, V., Siegmund, F., Quertermous, T., Bauer, C., Neumayer, H. H., Schleuning, W. D., & Theuring, F. (1997). Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J.Clin.Invest* **99**, 1380-1389.

Hori, S., Komatsu, Y., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1992). Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids

encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology* **130**, 1885-1895.

Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giaid, A., & Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*. **79**, 1267-1276.

Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., & Masaki, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2863-2867.

Jones, S. P. & Bolli, R. (2006). The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J.Mol.Cell Cardiol.* **40**, 16-23.

Kasinath, B. S., Fried, T. A., Davalath, S., & Marsden, P. A. (1992). Glomerular epithelial cells synthesize endothelin peptides. *Am.J.Pathol.* **141**, 279-283.

Kohan, D. E. (1997). Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am.J.Kidney Dis.* **29**, 2-26.

Kohno, M., Horio, T., Yokokawa, K., Yasunari, K., Kurihara, N., & Takeda, T. (1994). Endothelin modulates the mitogenic effect of PDGF on glomerular mesangial cells. *Am.J.Physiol* **266**, F894-F900.

Kurihara, Y., Kurihara, H., Oda, H., Maemura, K., Nagai, R., Ishikawa, T., & Yazaki, Y. (1995). Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J.Clin.Invest.* **96**, 293-300.

Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H., Kodama, T., Maemura, K., Nagai, R., Oda, H., Kuwaki, T., Cao, W. H., Kamada, N., & . (1994). Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature.* **368**, 703-710.

Langleben, D., DeMarchie, M., Laporta, D., Spanier, A. H., Schlesinger, R. D., & Stewart, D. J. (1993). Endothelin-1 in acute lung injury and the adult respiratory distress syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.* **148**, 1646-1650.

Lapp, H., Mitrovic, V., Franz, N., Heuer, H., Buerke, M., Wolfertz, J., Mueck, W., Unger, S., Wensing, G., & Frey, R. (2009). Cinaciguat (BAY 58-2667) improves cardiopulmonary hemodynamics in patients with acute decompensated heart failure. *Circulation* **119**, 2781-2788.

Lee, C. Y. W. & Burnett, J. C. (2007). Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Failure Reviews* **12**, 131-142.

Mallat, A., Fouassier, L., Preaux, A. M., Gal, C. S., Raufaste, D., Rosenbaum, J., Dhumeaux, D., Jouneaux, C., Mavier, P., & Lotersztajn, S. (1995). Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway. *J.Clin.Invest* **96**, 42-49.

Mann, J. F., Green, D., Jamerson, K., Ruilope, L. M., Kuranoff, S. J., Littke, T., & Viberti, G. (2010). Avosentan for overt diabetic nephropathy. *J.Am.Soc.Nephrol.* **21**, 527-535.

Matsumoto, H., Suzuki, N., Onda, H., & Fujino, M. (1989). Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **164**, 74-80.

Moncada, S. & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N.Engl.J.Med.* **329**, 2002-2012.

Morgera, S., Kuchinke, S., Budde, K., Lun, A., Hoher, B., & Neumayer, H. H. (1999). Volume stress-induced peritoneal endothelin-1 release in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J.Am.Soc.Nephrol.* **10**, 2585-2590.

Morgera, S., Schlenstedt, J., Hambach, P., Giessing, M., Deger, S., Hoher, B., & Neumayer, H. H. (2003). Combined ETA/ETB receptor blockade of human peritoneal mesothelial cells inhibits collagen I RNA synthesis. *Kidney Int.* **64**, 2033-2040.

Mungrue, I. N., Gros, R., You, X., Pirani, A., Azad, A., Csont, T., Schulz, R., Butany, J., Stewart, D. J., & Husain, M. (2002). Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J.Clin.Invest* **109**, 735-743.

Noveral, J. P., Rosenberg, S. M., Anbar, R. A., Pawlowski, N. A., & Grunstein, M. M. (1992). Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured rabbit airway smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* **263**, L317-L324.

Plum, J., Hermann, S., Fusholler, A., Schoenicke, G., Donner, A., Rohrborn, A., & Grabensee, B. (2001). Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patients related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int.Suppl* **78**, S42-S47.

Quaschnig, T., Voss, F., Herzfeld, S., Relle, K., Godes, M., Kalk, P., Pfab, T., Kraemer-Guth, A., Bonz, AW., Theuring, F., Galle, J., & Hocher, B. (2007). Additional lack of iNOS impairs endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. *Kidney & Blood Pressure Research* **submitted**.

Ramzy, D., Wallen, J., Badiwala, M. V., Tumiati, L. C., Tepperman, E., Ross, H. J., Delgado, D. H., & Rao, V. (2010). Endothelin-1 antagonism and nitric oxide augmentation prevents cyclosporine-induced vasomotor impairment. *J.Heart Lung Transplant*.

Resink, T. J., Hahn, A. W., Scott-Burden, T., Powell, J., Weber, E., & Buhler, F. R. (1990). Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **168**, 1303-1310.

Sabater, J. R., Otero, R., Abraham, W. M., Wanner, A., & O'Riordan, T. G. (1996). Endothelin-1 depresses tracheal mucus velocity in ovine airways via ET-A receptors. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **154**, 341-345.

Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., & Masaki, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* **20-27;348**, 732-735.

Sanai, L., Haynes, W. G., MacKenzie, A., Grant, I. S., & Webb, D. J. (1996). Endothelin production in sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* **22**, 52-56.

Shimizu, M., Ishibashi, Y., Taki, F., Shimizu, H., Hirahara, I., Kaname, S., & Fujita, T. (2006). Endothelin(B) receptor blocker inhibits high glucose-induced synthesis of fibronectin in human peritoneal mesothelial cells. *Perit.Dial.Int.* **26**, 393-401.

Stasch, J. P., Schmidt, P., Alonso-Alija, C., Apeler, H., Dembowski, K., Haerter, M., Heil, M., Minuth, T., Perzborn, E., Pleiss, U., Schramm, M., Schroeder, W., Schroder, H., Stahl, E., Steinke, W., & Wunder, F. (2002). NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br.J.Pharmacol.* **136**, 773-783.

Tamargo, J., Duarte, J., Caballero, R., & Delpon, E. (2010). Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator for the potential treatment of acute heart failure. *Curr.Opin.Investig.Drugs* **11**, 1039-1047.

Uchide, T., Masuda, H., Mitsui, Y., & Saida, K. (1999). Gene expression of vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 in ovary, uterus and embryo: comprehensive gene expression profiles of the endothelin ligand-receptor system revealed by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis in adult mouse tissues and during late embryonic development. *J.Mol.Endocrinol.* **22**, 161-171.

Valdenaire, O., Lepailleur-Enouf, D., Egidy, G., Thouard, A., Barret, A., Vranckx, R., Tougard, C., & Michel, J. B. (1999). A fourth isoform of endothelin-converting enzyme

(ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur.J.Biochem.* **264**, 341-349.

Wang, J., Oldner, A., Winskog, C., Edston, E., & Walther, S. M. (2006). Effects of endothelin receptor antagonism on acute lung injury induced by chlorine gas. *Crit Care Med.* **34**, 1731-1737.

Wang, Y., Kramer, S., Loof, T., Martini, S., Kron, S., Kawachi, H., Shimizu, F., Neumayer, H. H., & Peters, H. (2005a). Enhancing cGMP in experimental progressive renal fibrosis: soluble guanylate cyclase stimulation versus phosphodiesterase inhibition. *Am.J.Physiol Renal Physiol.*

Wang, Y., Kramer, S., Loof, T., Martini, S., Kron, S., Kawachi, H., Shimizu, F., Neumayer, H. H., & Peters, H. (2005b). Stimulation of soluble guanylate cyclase slows progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **68**, 47-61.

Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D., & Yanagisawa, M. (1994). ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* **78**, 473-485.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* **332**, 411-415.

Zoja, C., Orisio, S., Perico, N., Benigni, A., Morigi, M., Benatti, L., Rambaldi, A., & Remuzzi, G. (1991). Constitutive expression of endothelin gene in cultured human

mesangial cells and its modulation by transforming growth factor-beta, thrombin, and a thromboxane A2 analogue. *Lab Invest* **64**, 16-20.

Danksagung:

Mein erster Dank gilt meiner Familie, welche mir das Medizinstudium ermöglichte und mich stets gefördert hat. Weiterhin möchte ich hiermit meiner Frau danken, welche mich stets in meiner Arbeit unterstützt hat.

Meine wissenschaftliche Arbeit war nur möglich durch die immerwährende Unterstützung und Förderung meines Doktorvaters und Mentors Prof. Dr. Berthold Hocher, sowie mit Hilfe der Mitglieder der von ihm geführten Arbeitsgruppe; insbesondere Dr. Christa Thöne-Reineke, Dr. Michael Godes, Dr. Torsten Slowinski, PD Dr. Thiemo Pfab und Dr. Katharina Relle möchte ich stellvertretend für alle anderen Mitglieder der AG Hocher danken.

Ohne die wissenschaftlichen Möglichkeiten des Center for Cardiovascular Research am Institut für Pharmakologie am CCM, Direktor: Prof. Dr. T. Unger, wären die in dieser Arbeit enthaltenen Projekte nicht möglich gewesen.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. W. Zidek, Direktor der Klinik für Nephrologie am CBF, Charité, Berlin, für die Unterstützung meiner Forschungsaktivitäten.

Abschließend gebührt mein Dank allen wissenschaftlichen Kooperationspartnern der in dieser Arbeit versammelten Projekte, sowie allen Organisationen und Firmen, welche durch finanzielle Unterstützung diese Arbeiten ermöglichten.

Eidesstattliche Erklärung:

Erklärung § 4 Abs 3(k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren angemeldet noch durchgeführt wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Datum

Unterschrift