

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Paul

Stellenwert des renalen  $ET_A/ET_B$ - Rezeptor- Gleichgewichtes für die  
Progression der salzabhängigen Hypertonie am Modell der spontan  
hypertensiven Ratte

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Susanne Luckert  
aus Magdeburg

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. L. Rothermund  
2. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Kreuz

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 23.03.2007

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	7
1.1	Salzsensibilität bei arterieller Hypertonie .....	7
1.2	Das Endothelinsystem und seine Bestandteile .....	8
1.3	Tiermodelle .....	11
1.4	Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	12
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Tiere und Tierhaltung .....	14
2.2	Blutdruckmessung .....	15
2.3	Urin- und biochemische Analysen .....	15
2.4	Scatchard-Bindungsstudien .....	16
2.4.1	Theoretische Grundlagen für die Durchführung von Scatchard-Analysen .....	16
2.4.2	Material .....	18
2.4.3	Methoden .....	21
2.5	Northern Blot .....	24
2.5.1	Theoretische Grundlagen zur Northern Blot-Analyse .....	24
2.5.2	Material und Methoden für die RNA-Extraktion .....	24
2.5.3	Material und Methoden für die Northern blot-Analyse .....	28
2.6	Renale Morphologie .....	34
2.6.1	Bestimmung des Glomeruloskleroseindex .....	34
2.6.2	Bestimmung des Fibroseindex .....	35
2.7	Statistische Analyse .....	36
3	Ergebnisse .....	37
3.1	Körpergewicht .....	37
3.2	Das relative Nierengewicht .....	38
3.3	Die Kreatininclearance .....	39
3.4	Blutdruck .....	40
3.5	Das Urinvolumen und Natriumexkretion .....	41
3.6	Proteinurie, Albuminurie und ET-1-Ausscheidung im Urin .....	44
3.7	Northern-Blot-Ergebnisse .....	46
3.8	Ergebnisse der ET <sub>A</sub> - und ET <sub>B</sub> -Rezeptorbindungsstudien .....	48
3.8.1	ET <sub>A</sub> -Rezeptordichte (B <sub>max</sub> ) .....	48
3.8.2	ET <sub>B</sub> -Rezeptordichte (B <sub>max</sub> ) .....	49
3.9	Das Verhältnis zwischen ET <sub>A</sub> - und ET <sub>B</sub> -Rezeptoren .....	51
3.10	ET <sub>A</sub> - und ET <sub>B</sub> -Rezeptoraffinität in der Niere .....	52
3.11	Glomerulosklerose- und Fibroseindices in der Niere .....	53
3.11.1	Glomerulosklerose .....	53
3.11.2	Fibroseindex .....	55
4	Diskussion .....	56
4.1	Die Entwicklung von salzsensiblen spontanem Bluthochdruck und Nierenschäden .....	56
4.2	Aktivierung des renalen Endothelinsystems .....	57
4.3	Die spezifische Rolle der ET <sub>A</sub> / ET <sub>B</sub> -Rezeptorbalance .....	57
5	Zusammenfassung .....	60
6	Referenzen .....	61
7	Veröffentlichungen .....	70
8	Danksagung .....	71
9	Lebenslauf .....	72
10	Erklärung .....	73

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Endothelin-Isomoleküle .....	8
Abbildung 2.1: Bindungskurve .....	17
Abbildung 2.2: Scatchard-Plot .....	18
Abbildung 2.3: Elektrophoretische Auftrennung von RNA .....	27
Abbildung 2.4: Glomerulosklerose .....	35
Abbildung 3.1: Systolischer Blutdruck .....	40
Abbildung 3.2: 24 h Urin-Volumen .....	41
Abbildung 3.3: 24 h Natriumausscheidung .....	42
Abbildung 3.4: Natriumkonzentration im Urin .....	43
Abbildung 3.5: Gesamte Proteinausscheidung im Urin .....	44
Abbildung 3.6: Albuminausscheidung im Urin .....	45
Abbildung 3.7: Endothelin-1-Ausscheidung im Urin .....	45
Abbildung 3.8: Renale Präpro-ET-1 mRNA Expression .....	46
Abbildung 3.9: Renale ECE-1 mRNA Expression .....	47
Abbildung 3.10: Renale ET <sub>A</sub> -Rezeptordichte .....	48
Abbildung 3.11: Renale ET <sub>B</sub> -Rezeptordichte .....	49
Abbildung 3.12: ET-1 Bindung an der Niere .....	50
Abbildung 3.13: Renaler ET <sub>A</sub> /ET <sub>B</sub> -Quotient .....	51
Abbildung 3.14: Glomerulosklerose SHR-NX-NaCl/SHRSP-NX-NaCl .....	53
Abbildung 3.15: Glomeruloskleroseindices der Glomeruli in der Nierenrinde .....	54
Abbildung 3.16: Renale Fibrose SHR-NX-NaCl/SHRSP-NX-NaCl .....	55
Abbildung 3.17: Grad der Fibrose in der Niere .....	55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Körpergewicht .....	37
Tabelle 3-2: Nierengewicht .....	38
Tabelle 3-3: Kreatinin-clearance .....	39
Tabelle 3-4: ET <sub>A</sub> - und ET <sub>B</sub> -Rezeptoraffinität in der Niere .....	52

***Meinen Eltern***

## Abkürzungsverzeichnis

[LR]	Ligand-Rezeptor-Komplex
$^{125}\text{I}$	Jod-125
$^{32}\text{P}$	Phosphor-32
B	Bound (Menge gebundenen Ligandens)
$B_{\text{max}}$	Rezeptordichte
bp	Basenpaare
BP	Bindungspuffer
$C_{\text{krea}}$	Kreatininclearance
$\text{Ca}^{2+}$	Kalzium-Ion
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	Counts per minute/Zerfälle pro Minute
D	Dalton
dCTP	desoxyCytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
ET	Endothelin
$\text{ET}_A/\text{ET}_B$	Endothelin-A/-B Rezeptor
F	Free (Menge ungebundenen Ligandens)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
IP3	Inositoltrisphosphat
$K_d$	Dissoziationskonstante
KG	Körpergewicht
L	Ligand
M	Molar
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger (=Boten)-Ribonukleinsäure

NaCl	Natriumchlorid (in diesem Fall auch für Salzdiät mit 4% Kochsalzgehalt)
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NG	Nierengewicht
NO	Stickstoffmonoxid
NX	Nephrektomie
OD	Optische Dichte
PBS	Kaliumhydrogenphosphat-Natriumchlorid
PIP2	Phosphoinositolbisphosphat
R	Rezeptor
R <sub>t</sub>	totale Rezeptorzahl
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sham	Scheinoperation
SHR	Spontaneously hypertensive rats
SHRSP	Spontaneously hypertensive rats/stroke prone
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
TAE	TRIS-acetat-EDTA
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
tRNA	transfer (=Überträger)-Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
WKY	Wistar-Kyoto-Ratte

## **5 Zusammenfassung**

Es ist nach wie vor unklar, warum eine Untergruppe von Patienten mit essentieller Hypertonie im Laufe der Zeit einen salzsensiblen Bluthochdruck mit Endorganschäden entwickelt. Hier wurde die Rolle des renalen Endothelinsystems in der spontan hypertensiven Ratte mit Endorganschäden (SHRSP) untersucht, einem Modell für salzsensiblen spontanen Bluthochdruck, im Vergleich zu spontan hypertensiven Ratten ohne Endorganschäden (SHR), einem Modell für salzresistenten spontanen Bluthochdruck. Beide Stämme wurden jeweils nach Scheinnephrektomie und Normaldiät (Sham) sowie nach einseitiger Nephrektomie und nachfolgender sechswöchiger Salzdiät (NX-NaCl) untersucht. Der systolische Blutdruck war in der SHRSP-NX-NaCl-Gruppe, verglichen mit der SHRSP-Sham-Gruppe und der SHR-NX-NaCl-Gruppe, erhöht. Innerhalb der SHR-Gruppe trat unter der Nephrektomie und Salzbelastung keine Blutdruckänderung auf. Die Albumin- und ET-1-Ausscheidung im Urin, die renale mRNA-Expression von ET-1, der Glomerulosklerose- und der Fibroseindex waren in der SHRSP-NX-NaCl-Gruppe im Vergleich zur SHRSP-Sham- sowie zur SHR-NX-NaCl-Gruppe erhöht. Dagegen waren diese Werte in der SHR-NX-NaCl-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (SHR-Sham) nicht erhöht. Die Natriumausscheidung im Urin war bei den SHRSP-NX-NaCl-Tieren signifikant niedriger, als bei den ebenfalls salzbelasteten SHR-NX-NaCl-Tieren.

Die SHR-Tiere zeigten nach Nephrektomie und salzreichem Futter einen im Verhältnis gleich starken Anstieg sowohl der  $ET_A$ -, als auch der  $ET_B$ -Rezeptordichte im Vergleich mit der unbelasteten Kontrollgruppe. Dagegen fällt isoliert ein deutlich stärkerer Anstieg der Rezeptordichte des  $ET_A$ -Rezeptors, im Gegensatz zum  $ET_B$ -Rezeptor, bei der SHRSP-NX-NaCl-Gruppe auf, wenn man dies mit der SHRSP-Sham-Gruppe und der SHR-NX-NaCl-Gruppe vergleicht. Dies lässt die Gewichtung zwischen  $ET_A$ - und  $ET_B$ -Rezeptor bei den SHRSP-NX-NaCl-Tieren im Vergleich mit der SHRSP-Sham- und der SHR-NX-NaCl-Gruppe viel deutlicher zugunsten des  $ET_A$ -Rezeptors ausfallen.

Die gezeigte renale Aktivierung des Endothelinsystems, zusammen mit einer deutlichen Veränderung des Verhältnisses der Rezeptoren zueinander, könnte zur Entwicklung und zum Fortschreiten der salzabhängigen spontanen Hypertonie beitragen.



## **7 Veröffentlichungen**

### ***Wissenschaftliche Fachzeitschriften***

1. Rothermund L, Luckert S, Koßmehl P, Paul M, Kreutz R. Renal Endothelin ETA/ETB Receptor Disbalance Differentiates Salt Sensitive From Salt Resistant Spontaneous Hypertension. *Hypertension* 2001; 37:275-280

### ***Abstracts***

2. Rothermund L, Dieterich M, Luckert S, Zidek W, Paul M, Kreutz R. Role of the renal ETA/ETB receptor balance in low-renin compared to renin dependent hypertension. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2001; 126: S169
3. Rothermund L, Dieterich M, Luckert S, Zidek W, Paul M, Kreutz R. Renal ETA/ETB receptor balance is correlated with blood pressure and albuminuria in salt-sensitive but not in renin-dependent hypertension. *ASN 13-17 October 2001, San Francisco, USA*
4. Rothermund L, Luckert S, Koßmehl P, Neumayer H, Paul M, Kreutz R. Renal ETA/ETB receptor disbalance characterizes progression to salt sensitive malignant hypertension in spontaneous hypertension. *Hypertension* 2000; 36: 711
5. Koßmehl P, Rothermund L, Luckert S, Paul M, Kreutz R. The role of renal endothelin ETA/ETB receptor balance in the progression of salt sensitive spontaneous hypertension. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2000; 125: S96
6. Kreutz R, Rothermund L, Luckert S, Koßmehl P, Paul M. Renal endothelin ETA/ETB receptor imbalance differentiates salt sensitive from salt resistant spontaneous hypertension. *Hypertension* 2000; 36: 671
7. Zürcher H, Rothermund L, Luckert S, Schulz A, Paul M, Kreutz R. A decreased renin binding protein to renin expression ratio may contribute to renal hypertensive organ damage in experimental salt- sensitive hypertension. *Kidney Blood Press. Res.* 1999; 22: 386

## **8 Danksagung**

Diese Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der Freien Universität Berlin unter Prof. Dr. Martin Paul und Prof. Dr. Reinhold Kreutz durchgeführt.

Herrn Prof. Paul möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit inklusive der vielen verschiedenen praktischen Arbeiten in seinem Institut danken.

Herrn Prof. Kreutz möchte ich für die Erstellung des Themas, die Unterstützung und Beratung, die Bereitstellung wichtiger und interessanter Literatur zum Thema herzlich danken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Lars Rothermund für die gute Anleitung bei allen praktischen und theoretischen Arbeiten, die vielen hilfreichen Hinweise und für die gute Betreuung.

Heike Marquart danke ich für die geduldige Einarbeitung in die benötigten Methoden der Molekularbiologie.

Bei Peter Koßmehl möchte ich mich besonders für die große Unterstützung bei der Erstellung der mikroskopischen Untersuchungsobjekte und der morphologischen Untersuchungen bedanken.

Dankbar bin ich auch allen anderen Kollegen des Institutes für klinische Pharmakologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen hilfreichen Tips, Tricks und Hände.

Nicht zuletzt danke ich meinem Lebenspartner Dr. Holger Bohnemeier sehr herzlich, der mir mit Rat und Tat, Rückhalt und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite stand.

## **9 Lebenslauf**

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

## **10 Erklärung**

„Ich, Susanne Luckert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Stellenwert des renalen  $ET_A/ET_B$ - Rezeptor- Gleichgewichtes für die Progression der  
salzabhängigen Hypertonie am Modell der spontan hypertensiven Ratte

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die  
(unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt  
habe.“

Datum: 19.06.2006

Unterschrift: