

# 1 Einleitung

## **1.1 Salzsensibilität bei arterieller Hypertonie**

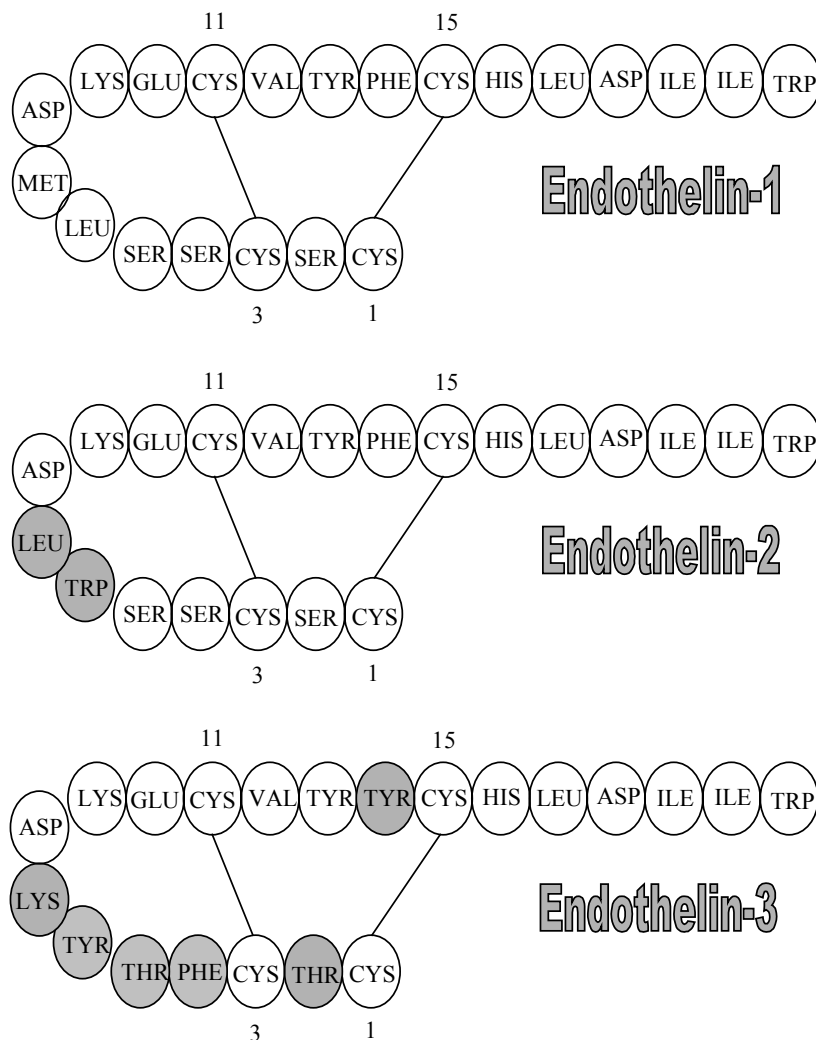
Die Ursachen für einen essentiellen Bluthochdruck, der nach Ausschluss sekundärer Ursachen 95% aller chronischen Hypertoniefälle ausmacht, können vielfältig sein und sind noch immer Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte<sup>1</sup>. Im Großen und Ganzen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der essentiellen Hypertonie um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei dem ein inadäquates Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die eigentlich für eine normale Blutdruckregulation verantwortlich wären, vorliegt<sup>1</sup>.

Auch der Höhe der Kochsalzaufnahme scheint ein Einfluss auf die Entstehung und Aufrechterhaltung eines hohen Blutdruckes zuzukommen. So können beispielsweise bei Naturvölkern mit sehr niedrigem Salzverzehr von weniger als drei Gramm täglich keine chronischen Hypertonien beobachtet werden, wohingegen sich bei Bewohnern von Industrienationen mit einem sehr viel höheren Salzkonsum von 10 bis 15 Gramm je Tag auch häufig eine arterielle Hypertonie findet. Dass die Blutdruckreaktion auf die Salzzufuhr auch genetische Ursachen haben kann, zeigte Dahl 1962, indem er aus *Sprague-Dawley*-Ratten eine Linie selektiv weiterzüchtete, die auf hohe Salzzufuhr mit der Ausbildung eines Bluthochdruckes reagierte, während aus dem gleichen *Sprague-Dawley*-Stamm gezüchtete Kontrolltiere keinen Blutdruckanstieg unter denselben Bedingungen zeigten<sup>2,3</sup>. Auf den Menschen übertragen, gibt es Hinweise, dass dunkelhäutige Hypertoniker im Gegensatz zu hellhäutigen sehr viel häufiger auf Salzzufuhr mit Blutdruckanstieg und der Ausbildung von schweren Endorganschäden reagieren<sup>4,5,6</sup>. Der Blutdruck und nachfolgend auch der Endothelin-1-Spiegel im Plasma reagieren bei diesen Patienten oft in ausgeprägter Art und Weise mit einem Anstieg nach Salzaufnahme<sup>7</sup> in Kombination mit einer erhöhten Sensibilität für Katecholamine<sup>8</sup>.

Es ist bisher unklar, welche Faktoren im Einzelnen dafür verantwortlich sind. Es gibt eine Reihe von experimentellen Daten, die belegen, dass das Endothelin-System eine wichtige Rolle in der salzsensitiven Hypertonie und den Endorganschäden dieser Krankheit spielt<sup>9,10</sup>. Nachgewiesen wurde dies zum großen Teil durch experimentelle Rattenmodelle, wie das DOCA (Desoxycorticosteronacetat)-Salz hypertensive Rattenmodell<sup>11</sup> und andere hypertensive Modelle, wie das genetische Dahl-<sup>12</sup> und das salzsensible Sabra-Modell<sup>13</sup>.

## 1.2 Das Endothelinsystem und seine Bestandteile

Yanagisawa et al. isolierten 1988 erstmals Endothelin-1 aus dem Kulturüberstand von Endothelzellen der Schweineaorta<sup>14</sup>. Diese Substanz zeigte einen sehr starken gefäßverengenden Effekt, der sogar denjenigen von dem bis dahin als stärkstes vasokonstriktorisches Molekül bekannten Angiotensin II übertraf. Bis heute zählt Endothelin zu den stärksten Vasokonstriktoren<sup>15</sup>. Die Endothelin-Familie besteht aus 3 Isoformen (Endothelin 1, -2 und -3), die je aus 21 Aminosäuren aufgebaut sind und ein Molekulargewicht von 2492 Dalton aufweisen (siehe Abbildung 1.1)<sup>16</sup>. Sie unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz in zwei bzw. sechs Positionen voneinander. Die Endotheline sind an identischen Stellen mit je zwei Disulfidbrücken ausgestattet<sup>17</sup>.



**Abbildung 1.1: Endothelin-Isomoleküle**

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz und Struktur der Endothelinmoleküle (grau unterlegte Aminosäuren sind diejenigen, die sich von den jeweiligen Positionen im Endothelin-1 unterscheiden)

Die Synthese und Freisetzung von ET-1, das diejenige Isoform ist, welche die größte Rolle bei der renalen Dysfunktion spielt<sup>18</sup>, verläuft über folgende Zwischenschritte:

Das humane Endothelin-1-Gen (Endothelin-2 und -3 werden durch separate Gene kodiert) enthält 5 Exons, von denen für das Präpro-Endothelin-1, ein 212 Aminosäuren enthaltendes Peptid, kodiert wird<sup>14</sup>. Dieses wird posttranslationalen Prozessen unterzogen, so dass Präpro-Endothelin durch eine zweibasige, paarspezifische Endopeptidase an ganz bestimmten gepaarten Stellen erkannt wird—so an den Verbindungen Lysin-Arginin oder Arginin-Arginin, die eine Erkennungssequenz für zahlreiche bearbeitende Endopeptidasen darstellen. Proteolytische Spaltung an diesen Stellen führt zum Pro-Endothelin (*big-Endothelin*), einem nur noch 38 Aminosäuren enthaltenden Peptid. Fertige ET-Peptide entstehen dann durch die ungewöhnliche Spaltung zwischen Tryptophan an Stelle 21 und Valin an Stelle 22 am Proendothelin. Durch die Aktion des *Endothelin-converting-enzyme* (ECE) wird Proendothelin letztendlich in seine aktive Form, das Endothelin, umgewandelt<sup>19</sup>.

Bisher wurden zwei Typen von ECE gefunden: ECE-1<sup>20</sup> und ECE-2<sup>21</sup>. Bei ECE-1 handelt es sich um eine membrangebundene, durch Phosphoramidon hemmbare Metalloprotease. Sie spaltet bei einem neutralen pH-Wert extrazelluläres Pro-Endothelin-1 zu Endothelin-1 und ist strukturell den neutralen Endopeptidasen zugehörig<sup>20</sup>. ECE-2 hat dagegen ein saures pH-Optimum, ist aber ebenfalls durch Phosphoramidon hemmbar und spaltet Pro-Endothelin intrazellulär am Golgi-Apparat<sup>21</sup>.

Die Expression von Präpro-ET-mRNA, und letztendlich die Sekretion von ET-1, konnte in Gefäßendothelzellen (abluminale Sekretion), glatten Gefäßmuskelzellen, proximalen und distalen Tubuluszellen, Mesangiumzellen, Gliazellen, Makrophagen, Mastzellen, Pituizyten, Bronchialepithelzellen, Tumorzellen und in den Augen durch eine Reihe heterogener Faktoren stimuliert werden<sup>22, 23, 24, 25</sup>.

- vasoaktive Substanzen (Adrenalin, Angiotensin II, Vasopressin, Bradykinin)<sup>14, 26, 27, 28</sup>
- Zytokine (Interleukin-1, Transforming growth factor  $\beta$ , Tumor Necrosis factor)<sup>25, 29</sup>
- Thrombin, Insulin, Erythropoetin, Hypoxie, niedrige Scherbeanspruchung, ET-1 und ET-3 im Sinne einer positiven Rückkopplung und Pharmaka (z.B. Ciclosporin A)<sup>22, 23, 30, 31</sup>

Eine Inhibition der ET-1-Sekretion wurde für den funktionellen Gegenspieler des Endothelins, das Stickstoffmonoxid (NO)<sup>22, 23</sup> und den Atrialen Natriuretischen Faktor<sup>32</sup>, nachgewiesen.

Spezifische Bindungsstellen für Endothelin wurden, außer an Zellen des Gefäßsystems, unter anderem auch am Nierengewebe, am Herzen und am Nervengewebe identifiziert<sup>24</sup>.

Pharmakologische Untersuchungen mit ET-1 und ET-3 ermöglichten die Differenzierung von zwei funktionell unterschiedlichen Rezeptor-Subtypen in Säugetieren. Der ET<sub>A</sub>-Rezeptor zeigt gegenüber ET-1 eine große Affinität, die gegenüber ET-2 und ET-3 jeweils abnimmt<sup>33</sup>. An Endothelzellen, aber auch an Zellen des glatten Gefäßmuskels und auf Makrophagen wurde der ET<sub>B</sub>-Rezeptor gefunden, der für alle Endothelin-Isoformen die gleiche Affinität aufweist<sup>34</sup> und im Endothel die Freisetzung von NO und Prostacyclin stimuliert. Dies führt zu einer Vasodilatation<sup>35, 36</sup>, wohingegen der ET<sub>A</sub>-Rezeptor an den glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion<sup>14</sup> und außerdem eine Zellproliferation und –hypertrophie vermittelt<sup>37</sup>. Außerdem gibt es pharmakologische Hinweise für die Existenz von zwei verschiedenen ET<sub>B</sub>-Rezeptoren (ET<sub>B1</sub> und ET<sub>B2</sub>)<sup>38</sup>.

Die Klonierung der cDNA beider Rezeptor-Subtypen wurde 1990 beschrieben<sup>39</sup>. Daraus lassen sich Rezeptoren mit 427 (ET<sub>A</sub>-Rezeptor) bzw. 415 (ET<sub>B</sub>-Rezeptor) Basenpaaren ableiten. Die Polypeptidketten beider Rezeptoren durchlaufen siebenfach die Plasmamembran und enthalten Sequenzen für N-Glycosilierungen. Sie gehören mit diesen Strukturmerkmalen der Familie der G-Protein- gekoppelten Rezeptoren an<sup>40, 41</sup>. Beide Endothelinrezeptoren aktivieren innerhalb der Zelle über ein spezifisches G-Protein (GTP-bindendes Protein) die Phospholipase C, die das membranständige Phosphoinositol-bisphosphonat (PIP<sub>2</sub>) in das wasserlösliche Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und in Diacylglycerin aufspaltet. IP<sub>3</sub> setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum kurzfristig Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) frei<sup>42</sup>. Gleichzeitig werden durch Bindung von Endothelin-1 an den Rezeptor spannungsabhängige Kalziumkanäle in der Plasmamembran aktiviert, die zu einem anhaltenden Einstrom von Kalzium in die Zelle führen<sup>43</sup>. Dadurch wird erklärt, warum Kalziumantagonisten die Wirkung der ET-1-vermittelten Vasokonstriktion teilweise wieder aufheben können<sup>44, 45</sup>. Diacylglycerin aktiviert die Ca<sup>2+</sup>- abhängige Proteinkinase C, was zum Beispiel an Herzmuskelzellen und Mesangiumzellen zu mitogenen Effekten führt<sup>18, 46</sup>.

Bindung von Endothelin an den ET<sub>B</sub>-Rezeptor führt an Endothelzellen zu einer Freisetzung von NO und Prostacyclin, was zu einer Gefäßdilataion führt. Dagegen kommt es bei der Bindung

von ET-1 an den ET<sub>B</sub>-Rezeptor glatter Muskelzellen zu der oben genannten Signaltransduktion über ein spezifisches G-Protein, PIP, IP3 usw.<sup>47</sup>. Außerdem kann es am ET<sub>B</sub>-Rezeptor durch Bindung des Liganden zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle, zur Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> und konsekutiv zur Freisetzung von Leukotrienen über die Arachidonsäurekaskade kommen<sup>38, 48, 49</sup>.

Neben dem vasokonstriktorisches Effekt wurden für Endothelin-1 auch zahlreiche andere Wirkungen nachgewiesen:

- Hemmung des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate<sup>50</sup>
- Hemmung der Reninfreisetzung und Blockade des antidiuretischen Effekts von Vasopressin an der Niere<sup>51, 52</sup>
- positive Inotropie und Chronotropie, sowie ANF-Freisetzung am Herzen<sup>53, 54</sup>
- cerebraler Vasospasmus nach Subarachnoidalblutungen<sup>55</sup>
- Herzversagen<sup>56</sup>
- mitogene Effekte auf Zellkulturen von Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Mesangiumzellen<sup>18</sup>

Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass speziell in der Niere auch autokrine und parakrine Wirkungen des Endothelins stattfinden<sup>19, 57, 58</sup>

### 1.3 Tiermodelle

*Spontaneously hypertensive rats* (SHR) und der Unterstamm, *spontaneously hypertensive rats/stroke prone* (SHRSP), der Schlaganfälle und Endorganschäden entwickelt, werden im Moment am häufigsten als Tiermodell für die essentielle Hypertonie genutzt. Sie eignen sich besonders gut, weil der Bluthochdruck in SHR-Ratten eine große Anzahl an Gemeinsamkeiten mit der essentiellen Hypertonie beim Menschen aufweist. So sind solche Aspekte, wie der genetische Einfluss auf die Entstehung der Hypertonie, pathophysiologische Entwicklung und Verlauf mit den bekannten kardiovaskulären Folgeerkrankungen bei diesem Stamm ähnlich beschaffen, wie beim Menschen. Diese Modelle berücksichtigen außerdem auch äußere Einflüsse, die sich auf die Bluthochdruckentstehung auswirken und sind daher eher auf die

wirklichen Umstände, denen ein Mensch ausgesetzt ist, übertragbar, als rein genetische Modelle<sup>59</sup>.

Die essentielle Hypertonie ist eine Erkrankung unbekannter Ätiologie, für die bis 1950 kein Tiermodell existierte<sup>60</sup>. Der erste Durchbruch auf diesem Gebiet wurde durch die Entwicklung des genetisch hypertensiven *New-Zealand*-Stammes erzielt<sup>61</sup>. Später wurde der japanische Stamm der SHR etabliert und Forschern auf der ganzen Welt zur Verfügung gestellt, wodurch sich die Erforschung des Bluthochdruckes an genetischen Hochdruckmodellen schnell weiterentwickelte, sowie weitere Bluthochdruckmodelle entwickelt wurden. Die Entwicklung des SHR-Stammes begann im Labor von Kozo Okamoto, Pathologieprofessor an der Universität von Kyoto Ende der 50er Jahre. Er und Aoki paarten eine männliche *Wistar-Kyoto* (WKY) Ratte mit leichter Hypertonie (systolischer Blutdruck 145-175mmHg) mit einer weiblichen mit relativ hohem Blutdruck (130-140mmHg) und begründeten einen Inzuchtstamm<sup>62</sup>.

In ihrem Bemühen, ein besseres Modell für hochdruckassoziierte kardiovaskuläre Störungen des Menschen zu entwickeln, erschufen Yamori und Okamoto durch selektives Inzüchten der Nachkommen von SHR, deren Eltern durch Schlaganfälle gestorben waren, einen neuen Stamm, nämlich SHRSP (*stroke prone*). Über 80% der Population entwickelt Schlaganfälle. Diese sind pathogenetisch Schlaganfällen beim Menschen ähnlich<sup>63</sup>.

#### **1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Es ist unklar, ob die Aktivierung des Endothelinsystems bei der Progression vom spontanen Bluthochdruck zum salzsensitiven mit schweren Endorganschäden auch von Bedeutung ist. Speziell der einzelne Beitrag der renalen ET-Rezeptorsubtypen zur Ausbildung und zum Fortschreiten der spontanen Hypertonie zur salzsensitiven Hypertonie ist größtenteils unbekannt. Die meisten Studien haben nicht die Regulation der Endothelin-Rezeptorsubtypen durch direkte Messung der renalen ET-Rezeptordichte und Affinität untersucht, haben jedoch indirekte Schlüsse durch Gabe selektiver oder unselektiver ET-Rezeptorantagonisten und deren Auswirkungen gezogen. So wurde beispielsweise in einer interessanten Studie gezeigt, dass man nach Gabe eines spezifischen ET<sub>A</sub>-Antagonisten bei den salzsensiblen SHRSP-Tieren nach einseitiger Nephrektomie und anschließender salzreicher Diät den in der nicht mit ET-Antagonisten behandelten Kontrollgruppe entstehenden morphologisch und laborchemisch deutlich nachweisbaren Nierenschaden fast vollständig verhindern konnte<sup>64</sup>. Interessanterweise war dieser Effekt unabhängig vom Blutdruckverhalten beider Gruppen. Leider wurde keine tiefer

gehende Analyse des Endothelinsystems im Einzelnen, insbesondere der Verteilung und Gewichtung der ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren und der Veränderung der einzelnen Parameter unter den verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

In der folgenden Arbeit wurde das renale Endothelinsystem anhand der spezifischen Gewichtung der renalen ET-Rezeptorsubtypen sowie deren Dichte und Affinität direkt durch Rezeptorbindungsstudien sowie durch Messung von ET-1 im Urin, der mRNA von ET-1 und ECE-1 der Niere im SHRSP-Modell für salzsensitiven spontanen Bluthochdruck untersucht. Verglichen wurde dieses Modell mit einem salzresistenten Bluthochdruckmodell, welches durch die spontan hypertensiven Ratten (SHR) repräsentiert wird. Außerdem wurden die Blutdruckwerte, Körper- und Nierengewichte, laborchemische Parameter (Kreatinin in Plasma und Urin, Proteinurie, Albuminurie, Natriumauscheidung und -konzentration im Urin) bestimmt und die Nierenschnitte aller Tiere mikroskopisch auf Glomerulosklerose und Fibrose untersucht.

Beide Stämme waren jeweils unterteilt in Untergruppen und folgenden Behandlungen unterzogen:

- einseitige Nephrektomie mit konsekutiver Salzdiät (4%),
- Scheinnephrektomie mit Normaldiät