

2 Projektbeschreibung

Zur Untersuchung der Interaktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des NO-Systems sollen physiologische Funktionsanalysen an Herz und Niere – zwei wichtigen Stellgliedern der Blutdruckregulation – vorgenommen werden. Die Untersuchungen werden nach Induktion verschiedener Funktionszustände des NO-Systems durch L-NAME und DOCA-Salz an AT₂-Rezeptor-defizienten Mäusen durchgeführt.

2.1 Die AT₂-Rezeptor-Knockout-Maus

Alle Experimente dieses Projektes sollen an AT₂-Rezeptor-defizienten Mäusen und deren Kontrollen vorgenommen werden. Damit kommt eine Spezies zum Einsatz, die etwa die Hälfte der in Deutschland eingesetzten Versuchstiere ausmacht. Gründe, die die Maus als Modellorganismus für die biomedizinische Forschung so interessant machen, sind große Ähnlichkeiten im Hinblick auf Organsysteme, Gewebe, physiologische Mechanismen und sogar Verhaltensfunktionen sowie ein im Vergleich zu anderen Säugern verhältnismäßig einfach zu manipulierendes und gut erforschtes Genom. Das sind ideale Voraussetzungen für Studien zur Beziehung von Genotyp und Phänotyp, die u.a. auch für das Verständnis der primären Hypertonie von Bedeutung sind.

Die AT₂-Knockout-Maus (AT₂^{-/-}) zeichnet sich durch einen definierten Defekt des AT₂-Rezeptor-Genes auf dem X-Chromosom an Position m363aa, P35374 aus. Trotz der starken fetalen Expression des AT₂-Rezeptors scheint die Ontogenese der AT₂-Rezeptor-defizienten Mäuse weitgehend normal zu verlaufen (26). Allerdings werden Verhaltensanomalien beschrieben, die auf eine Expression dieser Rezeptorisoform im Gehirn zurückzuführen ist. Für diesen Stamm wird ein geringeres Explorationsverhalten beim Umsetzen in eine neue Umgebung sowie eine verminderte Lokomotion im Vergleich zu den Kontrolltieren beschrieben (55).

In der AT₂-Rezeptor-Knockout-Maus ist der AT₁-Rezeptor hochreguliert, wodurch AT₁-Effekte ohne den Einfluß des AT₂-Rezeptors untersucht werden können. Mit diesem Modell lassen sich daher funktionelle Zusammenhänge zwischen den AngII-Rezeptoren verständlich machen.

2.2 Zielsetzung und Einordnung der vorliegenden Arbeit vor dem Hintergrund gegenwärtiger biomedizinischer Forschung

2.2.1 Stand der Forschung

Die theoretischen Grundlagen der Wirkungsweise des Renin-Angiotensin-Systems sowie dessen Bedeutung in der Kreislaufregulation als auch an pathophysiologischen Prozessen sind bereits ausführlich im Kapitel 1 besprochen worden. An dieser Stelle soll an das aktuelle Forschungsgeschehen herangeführt und die im Zusammenhang mit dem hier verwendeten Mausmodell bestehenden Möglichkeiten verdeutlicht werden.

Erwartungsgemäß haben AT₂-KO-Mäuse vor dem Hintergrund der beschriebenen Rezeptorwirkung einen normalen bis leicht erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck (46). Die dieser Vermutung zugrunde liegende counterregulatorische Interaktion beider Isoformen wird durch die erwiesene Überexpression des AT₁-Rezeptors in AT₂-KO-Tieren gestützt (34, 105, 122). Nach Gabe von AngII tritt dieser Unterschied im Blutdruckverhalten aufgrund des stärkeren Druckanstieges bei den Knockout-Mäusen deutlicher hervor (55). Einen Hinweis auf den „pathway“, über den der AT₂-Rezeptor wirkt, gibt die Reversibilität der blutdrucksenkenden Wirkung in Mäusen mit AT₂-Rezeptor-Überexpression nach Blockade der NO-Bildung und des BK₂-Rezeptors (125).

Die aufgeführten Unterschiede im Blutdruckverhalten implizieren natürlich auch funktionelle Unterschiede der beiden wichtigsten Stellglieder in der Blutdruckregulation – dem Herz und der Niere. Es liegen Untersuchungen an isolierten Ratten-Kardiomyozyten vor, die auf eine Zellproliferation und Hypertrophie hemmende Wirkung des AT₂-Rezeptors hindeuten (11, 106). Diese Befunde werden durch Arbeiten an Ratten *in vivo* untermauert, bei denen die Blockade des AT₂-Rezeptors zu einer Steigerung der durch den AT₁-Rezeptor vermittelten Zellproliferation führte (74). Andererseits konnte gezeigt werden, daß die Infusion von AngII bei AT₂-KO-Mäusen im Gegensatz zu den Kontrolltieren zu keiner linksventrikulären Hypertrophie führte (54, 56). An Nervenzellen hingegen konnte eine wachstumsfördernde und regenerative Wirkung des AT₂-Rezeptors nachgewiesen werden (78). Demnach kann unter bestimmten Bedingungen auch der AT₂-Rezeptor zur Hypertrophie und Fibrose beitragen. Vor dem Hintergrund eines counterregulatorischen Wechselspiels muß

die modellhafte Gegenüberstellung des AT₁- und AT₂-Rezeptors, wie sie in Kapitel 1 vorgenommen wurde, demnach unvollständig sein. Die geschilderten strukturellen Veränderungen des Herzens ziehen auch funktionelle Unterschiede mit sich (35), die durch linksventrikuläre Konduktanz-Katheteruntersuchungen gemessen werden können. Das NO-System ist einerseits sowohl an der Regulation des Gefäßtonus als auch an zahlreichen strukturverändernden Prozessen beteiligt und beeinflusst zudem die Aktivität des RAS. Die spezifischen Zusammenhänge im Hinblick auf die hier untersuchten Rezeptor-Isoformen sind noch unzureichend geklärt.

Widersprüchlich sind auch Befunde, die den Einfluß der AngII-Rezeptoren auf die Nierenfunktion betreffen. So zeigten Versuche mit AT₂-Rezeptorantagonisten an Ratten eine Antidiurese und Antinatriurese vermittelnde Wirkung des Rezeptors (77, 79). An Mäusen hingegen wurde eine entgegengesetzte Wirkung des AT₂-Rezeptors beschrieben. Für das Ausscheiden äquivalenter Urinvolumina pro Zeiteinheit wurden im Vergleich zu den Kontrolltieren bei AT₂-KO-Mäusen höhere Perfusionsdrücke der Niere gemessen (34, 115, 116). Der Druck-Diurese-Natriurese-Mechanismus ist nach rechts verschoben. An diesen Effekten scheinen auch hier Bradykinin und NO beteiligt zu sein, wobei aber auch Befunde für eine Bradykinin-unabhängige Wirkkette vorliegen (29, 114, 115, 125).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, daß – wie im in Kap. 1 skizzierten Modell bereits dargestellt wurde – das NO-System eine besondere Rolle beim Negativ-Feedback auf das RAAS spielt. Dies ist insofern bedeutsam, als beide Systeme mit ihren Wirkmechanismen eng miteinander verwoben sind. Sowohl für den AT₁- und AT₂-Rezeptor werden direkte oder indirekte NO-abhängige Signalketten angenommen, bei letzterem unter Beteiligung der Bradykinin-NO-cGMP-Kaskade (3, 72). Trotz prinzipiell unterschiedlicher Signaltransduktionen ist hier eine gegenseitige Beeinflussung der Rezeptorisoformen denkbar. In diesem Zusammenhang ist der Befund interessant, daß die Gabe von L-NAME sowohl AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor hochreguliert während die Expression des AT₂-Rezeptors nicht beeinflusst wird (126, 130). Es ist daher denkbar, daß den zum Teil gegensätzlichen Wirkungen der beiden AngII-Rezeptoren nicht nur unterschiedliche Signaltransduktionen zugrunde liegen, sondern dies auch Folge einer gegenseitigen Beeinflussung von AT₁- und AT₂-Rezeptor sein kann, beispielsweise auf mRNA-Ebene. Mit anderen Worten, eine Vasodilatation könnte demnach durch die direkte Rezeptorwirkung des AT₂-Rezeptors oder aber indirekt durch das Herunterregulieren des AT₁-Rezeptors erfolgen. Im Einklang mit

dieser Vermutung steht der Befund, daß der Expressionslevel des AT₁-Rezeptor in verschiedensten Geweben der AT₂-KO-Mäuse signifikant erhöht ist (34, 105, 122).

In den nun im folgenden beschriebenen Experimenten bieten die AT₂-Rezeptor-defizienten Mäuse die Möglichkeit, einerseits direkt die physiologischen Effekte des AT₁-Rezeptors ohne Beeinflussung durch den AT₂-Rezeptor untersuchen zu können, andererseits aber auch im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen indirekt Rückschlüsse auf die Funktion des AT₂-Rezeptors – zumindest im systemischen Zusammenhang des Gesamtorganismus – ziehen zu können. Das ist besonders wichtig, da im Vergleich zum AT₁-Rezeptor die Rolle des AT₂-Rezeptors bei der Herz-Kreislaufregulation nur unzureichend geklärt ist. Untersuchungen an der AT₂-KO-Maus können damit zur Klärung der teilweise widersprüchlichen physiologischen Befunde in vivo beitragen.

2.3 Hypothese und Zielstellung der experimentellen Arbeit

In dieser Arbeit soll die Beteiligung der beiden AngII-Rezeptoren an blutdruckrelevanten Funktionsbeeinflussungen von Herz und Niere – zwei wichtigen Stellgliedern der Langzeitblutdruckregulation – untersucht werden. Die im vorhergehenden Kapitel dargestellten Befunde zum AT₁- und AT₂-Rezeptor deuten auf eine Interaktion der beiden Rezeptortypen hin, deren z.T. entgegengesetzte Wirkungen nicht allein auf eine differente Signalverarbeitung zurückzuführen ist.

Es wird von der **Hypothese** ausgegangen, daß AngiotensinII über den AT₂-Rezeptor und Stickoxid das Verhalten des AT₁-Rezeptors beeinflusst, was letztlich in renalen und kardialen Funktionsänderungen resultiert.

Da noch weitgehend unbekannt ist, wie und auf welcher Ebene sich der AT₁- und AT₂-Rezeptor in ihrer Wirksamkeit beeinflussen und welche renalen und kardiovaskulären Funktionsänderungen daraus resultieren, sollen neben der Messung physiologischer Parameter in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen unter einem integrativen Blickwinkel auch Veränderungen auf mRNA und Proteinebene sowie histologische Auffälligkeiten erfaßt werden.

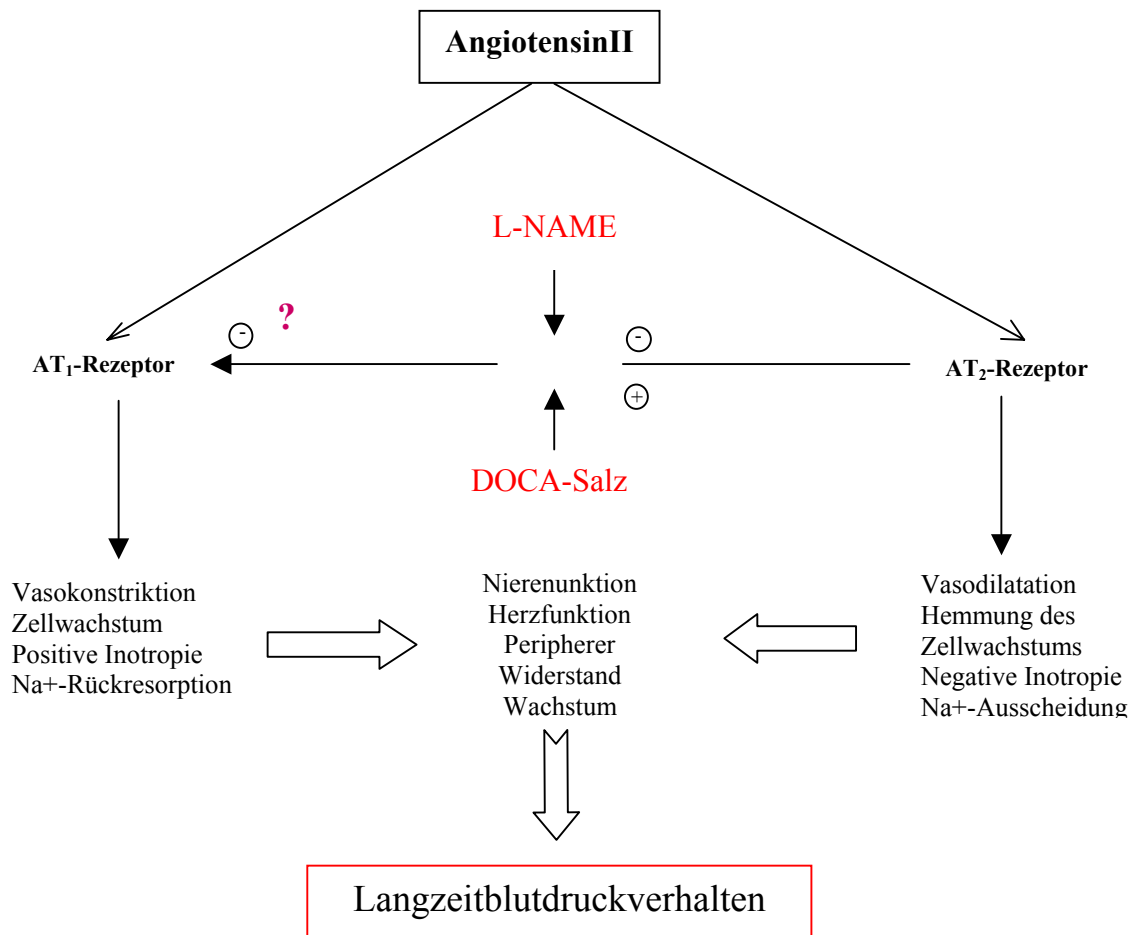


Abb. 3: Modellvorstellung einer NO-abhängigen Kommunikation der AngII-Rezeptoren und deren Konsequenzen für das Blutdruckverhalten. Dargestellt sind außerdem die Manipulationsmöglichkeiten der den Versuchen zugrunde liegenden Hypertoniemodelle L-NAME und DOCA-Salz.

2.3.1 Fragestellungen

Aus den eingangs dargestellten Befunden zur AngII-Rezeptor-vermittelten Regulation renaler und kardiovaskulärer Funktionen und der daraus abgeleiteten Hypothese, einer NO-vermittelten Kommunikation von AT₁- und AT₂-Rezeptor ergeben sich folgende konkrete Fragestellungen:

1. Zu welchen physiologischen Funktionsänderungen von Herz und Niere kommt es nach Hemmung der NO-Synthese mit L-NAME in Abwesenheit des AT₂-Rezeptors?
2. Zu welchen physiologischen Funktionsänderungen von Herz und Niere kommt es nach Stimulation der NO-Synthese mit DOCA-Salz in Abwesenheit des AT₂-Rezeptors?
3. Wie verhält sich die Genexpression des AT₁-Rezeptors bei fehlendem AT₂-Rezeptor und zu welchen histologischen Veränderungen kommt es unter den unter 1 und 2 genannten Bedingungen und in welchem Zusammenhang stehen diese Befunde mit den ermittelten physiologischen Funktionsänderungen? (Heranziehen molekularbiologischer und histologischer Befunde; siehe Kooperationen)

Für eine hämodynamische Analyse der verwendeten sekundären Hypertoniemodelle sollen außerdem simultan Blutdruck und Herzminutenvolumen in Kontrolltieren chronisch erfaßt werden.

2.4 Experimentelle Grundlage der Versuche – Einsatz von L-NAME und DOCA-Salz

Zur Klärung der Rolle von NO im „cross talk“ beider Rezeptortypen werden Tiere beider Stämme mit Desoxycorticosteronazetat (DOCA), einem Mineralkortikoid, das bei der Biosynthese von Aldosteron entsteht, sowie N^o-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) – einem nonselektiven Inhibitor der NO-Synthasen – behandelt und nachfolgend untersucht. In beiden Fällen wird eine sekundäre Hypertonie induziert, die sich sowohl auf den NO-Haushalt als auch auf die Aktivität des RAAS auswirkt. Bei DOCA-Salz kommt es dabei zu einer Stimulation des NO-Systems bei gleichzeitiger Supprimierung des RAAS (gesenkter Plasma-Reninspiegel) (131), während L-NAME nonselektiv die Aktivität von NO-Synthasen hemmt aber auch durch verminderte Reninfreisetzung eine Aktivitätsminderung des RAAS bewirkt (12). Während allgemein bekannt ist, daß die L-NAME-Hypertonie auf einem

Widerstandshochdruck beruht, ist es bisher umstritten, ob die DOCA-Salz-Hypertonie zumindest initial durch einen Volumenhochdruck hervorgerufen wird. Die im Rahmen dieser Promotion modifizierte Methode der Bestimmung des peripheren Widerstandes anhand der Direktmessung des HMV sowie des MAP kann zur Klärung der Ursachen beitragen.

Das zur Klärung der Hypothese aufgestellte experimentelle Versuchsprogramm basiert neben den Kontrollgruppen somit auf vier sekundär induzierten physiologischen Funktionszuständen, die in Tab. 2 zusammengefaßt sind.

Tab. 2: Charakteristik der Untersuchungsgruppen in bezug auf den Funktionszustand des NO-Systems und des RAAS

	<i>Supprimiertes NO-System/ Supprimiertes RAAS</i>	<i>Stimuliertes NO-System/ Supprimiertes RAAS</i>
Wildtyp-Mäuse	Wildtyp-Mäuse+L-NAME	Wildtyp-Mäuse+DOCA-Salz
AT ₂ KO-Mäuse	AT ₂ KO-Mäuse+L-NAME	AT ₂ KO-Mäuse+DOCA-Salz

2.5 Arbeitsprogramm

Auf der Grundlage der angeführten Fragestellungen wurde das in Abb. 4 dargestellte Arbeitsprogramm entwickelt. Im Falle der Untersuchung des Druck-Diurese-/Natriurese-Mechanismus sollten zunächst Messungen an nichtnarkotisierten Tieren in Stoffwechselfäfigen vorgenommen werden, um die Befunde dann durch weitergehende Messungen an narkotisierten Tieren zu spezifizieren. Für die übrigen Versuchsserien wurde kein Algorithmus festgelegt.

Arbeitsprogramm

Wildtyp/AT₂-KO

DOCA-Salz

L-NAME

1/3 Wochen

Langzeitver-
halten von Blutdruck und
Herzfrequenz

Telemetrie

Expression
des AT₁-
Rezeptors auf
mRNA- und
Proteinebene

*Northern-,
Western Blot,
Immunohisto-
Chemie*

Histologische
Untersuchungen

Unterstrichene
Versuchsserien in
Zusammenarbeit mit
anderen Arbeits-
gruppen!! (siehe S.24)

Nierenfunktion:
Druck- Diu/
Natriurese, GFR,
RBF

*Akute Experimente,
Stoffwechsellkäfige*

Herzfunktion:
Druck-Volumen-
Kurven;
Herzminuten-
volumen

*Herzkatheter,
chronische
Flowprobe um die
aszendierende Aorta*

Abb. 4: Darstellung des
Versuchsvorhabens.

2.6 Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen

Für die Klärung der vorgestellten Fragestellungen und Hypothese wurden neben den hier vorgenommenen physiologischen Untersuchungen auch ergänzende molekularbiologische Befunde herangezogen. Durch die molekularbiologischen Befunde sollte die Möglichkeit geschaffen werden, die erhobenen physiologischen Ergebnisse auch im Hinblick auf die ihnen zugrunde liegenden möglichen molekularen Wirkmechanismen umfassender diskutieren zu können. Dieser integrative Blickwinkel ist für das Verständnis der reell im Organismus ablaufenden Prozesse unerlässlich. Die chronische Behandlung der dafür verwendeten Tiere sowie die Organentnahme erfolgte im Labor Dr. Groß. Die im Anschluß vorgenommenen Untersuchungen der Kooperationspartner sind im folgenden aufgelistet:

- Prof. Dr. H.-J. Gröhne: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Messung der Kernoberfläche und Fibroseanalyse
- Dr. K. Schulze-Forster: Cell Trend GmbH Luckenwalde, Bestimmung von Urin-Nitritkonzentrationen
- Dr. D. N. Müller: MDC-Berlin: Immunohistochemie sowie Western-Blot-Analyse der NO-Synthase-Isoformen und des AT₁-Rezeptors
- Dr. J. Janke: Helios-Klinikum Berlin, mRNA-Expressionsanalyse des AT₁-Rezeptors sowie der NO-Synthase-Isoformen
- Dr. T. H. Langenickel: MDC-Berlin: Genexpressionsanalyse des BNP

Alle aus diesen Untersuchungen resultierenden Ergebnisse sind dann statistisch und grafisch aufgearbeitet und in einem separaten Kapitel des Ergebnisteils dieser Arbeit aufgeführt worden. Das Einverständnis für die Veröffentlichung ihrer Versuchsergebnisse haben die Beteiligten der anderen Arbeitsgruppen bereits in den Teilpublikationen gegeben, die im Anhang angeführt sind. In der Diskussion wird dann gesondert auf diese in anderen Arbeitsgruppen erhobenen Befunde hingewiesen und entsprechend zitiert. Das komplett eigenständig durchgeführte physiologische Versuchsprogramm ist in Abb. 4 ersichtlich.