

4.3 Kooperationsergebnisse in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen

Die im folgenden angeführten Untersuchungsergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen ermittelt und sollen daher hier gesondert dargestellt werden. Die Eigenbeteiligung an diesen Versuchsreihen bezog sich in der Regel auf die chronische Vorbehandlung der untersuchten Tiere die Organentnahme sowie die statistische Auswertung.

4.3.1 Renale mRNA-Expression des AT₁-Rezeptors unter L-NAME

Bereits unter Ausgangsbedingungen unterschieden sich die AT₂-Rezeptor-Knockout-Mäuse von den Wildtyp-Kontrollen hinsichtlich des Expressionslevels des AT₁-Rezeptors. Die von Dr. J. Janke durchgeführte TaqMan-Analyse der entkapselten und im ganzen homogenisierten Nieren belegt eine deutliche Hochregulierung der AT₁-Rezeptortranskription mit $2,11 \pm 0,6$ relativen Expressionseinheiten (RE) bei AT₂-Rezeptor-defizienten Tieren gegenüber $1,41 \pm 0,36$ RE. Einwöchige L-NAME-Gabe führte bei Wildtyp-Mäusen zu einer Verminderung der Transkription des Rezeptorgenes auf $1,05 \pm 0,29$ RE. Bei AT₂⁻/_y zeigt L-NAME in dieser Hinsicht keine Wirkung (Abb. 34). Pro Gruppe wurden 10 rechte Nieren verwendet, die nicht gepoolt wurden. Das Körpergewicht betrug bei den AT₂⁺/_y 31 ± 1 g und bei den AT₂⁻/_y im Durchschnitt 28 ± 1 g.

4.3.2 Kardiale mRNA-Expression nach 3 Wochen L-NAME

Wie bereits in der Niere zeigt die Expressionsanalyse der Herzen einen deutlich hochregulierten AT₁-Rezeptor in AT₂⁻/_y mit $1,1 \pm 0,2$ RE im Vergleich zu AT₂⁺/_y mit $0,6 \pm 0,1$ RE. Nach dreiwöchiger L-NAME-Gabe ist der Expressionslevel in AT₂⁻/_y auf $0,8 \pm 0,2$ RE vermindert. Die mRNA-Synthese der Wildtyp-Mäuse wird durch diese Behandlung nicht beeinflusst (Abb. 35). Die Analyse führte Dr. Jürgen Janke mit jeweils 8 Herzen pro Gruppe durch. Das Durchschnittsgewicht betrug in den AT₂⁺/_y 30 ± 1 g und 28 ± 1 g in den AT₂⁻/_y. L-NAME beeinflusste das Körpergewicht nur unwesentlich.

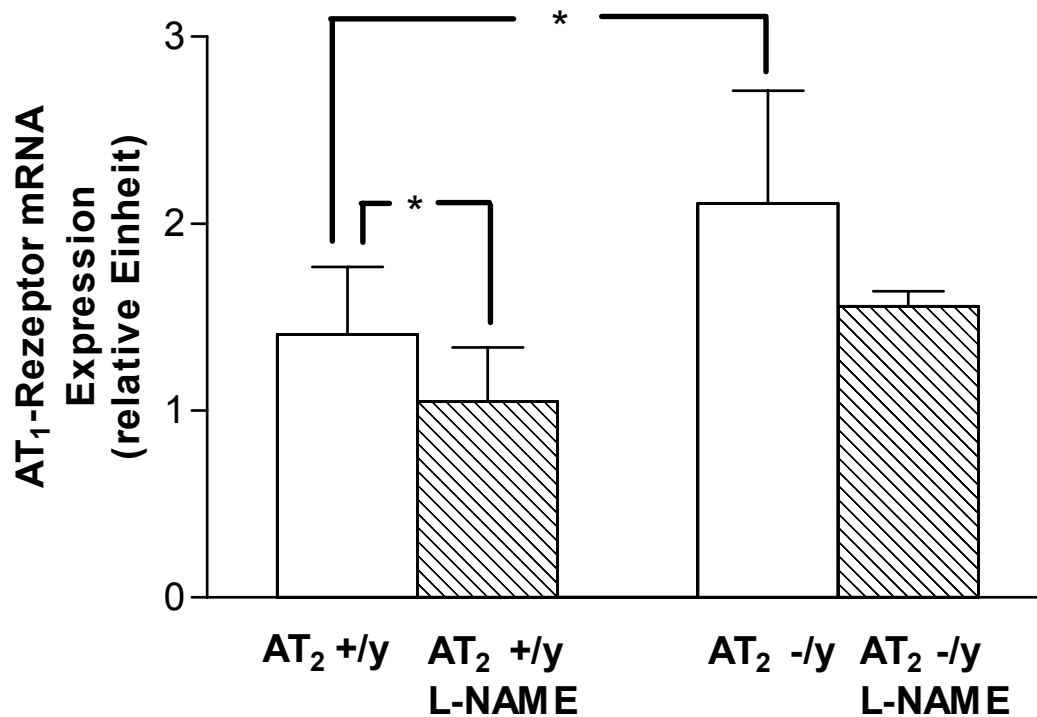


Abb. 34: AT₁-Rezeptor-Genexpression in Nieren von AT₂-Rezeptor-Knockout-Tieren (AT₂-/y) und Kontrollen (AT₂+/y) vor und nach einwöchiger L-NAME-Behandlung. * P<0,05. Die Expressionsanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Janke durchgeführt.

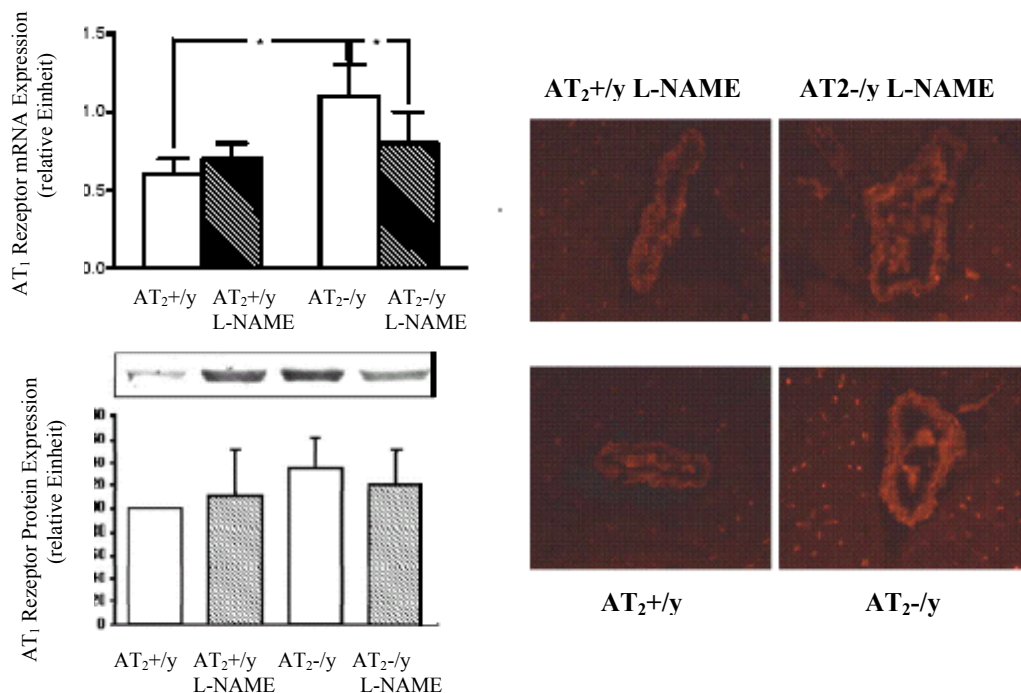


Abb. 35: AT₁-Rezeptor-Expression in Herzen von AT₂-/y und AT₂+/y vor und nach dreiwöchiger L-NAME-Behandlung. * P<0,05 Dargestellt ist die Genexpression auf mRNA- und Protein-Ebene sowie immunohistochemisch als Fluoreszenz-Färbung mit Cy-3-Antikörpern. *Ergebnisse in Zusammenarbeit mit Dr. D. Müller.*

4.3.3 Histologische Veränderungen des linken Ventrikels nach 3-wöchiger L-NAME-Gabe

Fibrose

Die durch Prof. Dr. H.-J. Gröhne durchgeführte morphometrische Untersuchung der Herzen im Hinblick auf den Anteil des Bindegewebes im linken Ventrikel ergab – quantifiziert als totaler Fibrose-Index – keine Unterschiede zwischen AT₂+/y (0,25±0,66 %) und AT₂-/y (0,28±0,05%). L-NAME löste in beiden Gruppen eine vermehrte Bindegewebsbildung aus. So stieg der totale Fibrose-Index nach 3-wöchiger L-NAME-Gabe bei AT₂+/y auf 3,46±0,46 % und bei AT₂-/y auf 4,1±0,94 % um ungefähr den gleichen Betrag an (Tab. 4). Die Berechnung des Perivaskulären Fibrose-Index hingegen zeigte sowohl

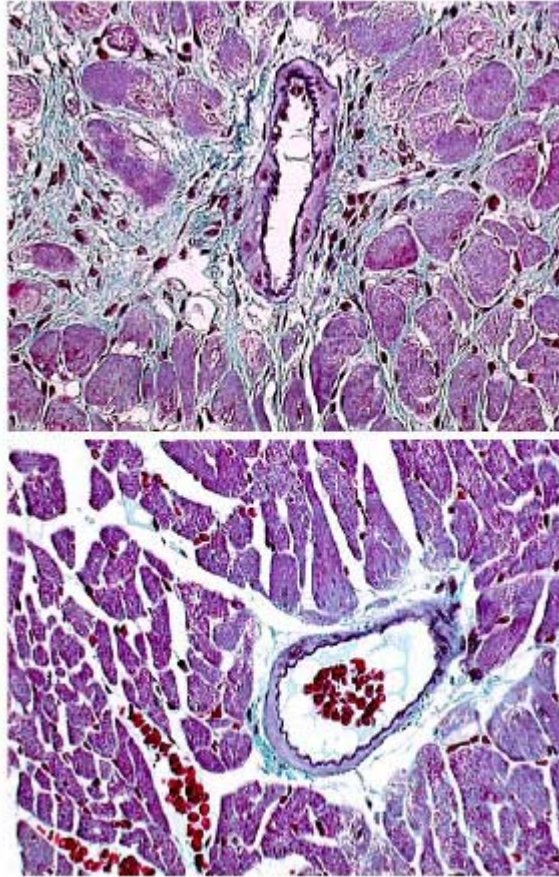
Tabelle 4: Fibrose in Herzen L-NAME-behandelter AT₂ +/y and AT₂ -/y mice
(Fibrosebestimmung durch Prof. Dr. H.-J. Gröhne)

	AT ₂ +/y	AT ₂ +/y L-NAME	AT ₂ -/y	AT ₂ -/y L-NAME
n	5	8	5	8
<i>Fibrose total (%)</i>	0.25 ± 0.66	3.46 ± 0.46 *	0.28 ± 0.05	4.1 ± 0.94*
Perivaskuläre Fibrose (Gefäß/Gefäß + Fibrose)	93.88 ± 0.66	80.62 ± 1.28 *	90.90 ± 0.78	73.81 ± 1.38 *§

(Arithmetisches Mittel ± SEM)

*p < 0.05: AT₂ +/y vs AT₂ +/y mit L-NAME
AT₂ -/y vs AT₂ -/y mit L-NAME

§p < 0.05: AT₂ +/y mit L-NAME vs AT₂ -/y mit L-NAME

AT₂-/y L-NAME**AT₂-/y unbehandelt**

40fache Vergrößerung

Abb. 36: Linksventrikuläre Gewebsschnitte mit Masson-Trichrom-Färbung von L-NAME-behandelten (oben) und unbehandelten (unten) AT₂-/y. Unter L-NAME kommt es zu einer deutlichen Zunahme der perivaskulären und interstitiellen Fibrose sowie größeren Kernoberflächen der Myokardiozyten, indirekte Zeichen einer Hypertrophie. *Ergebnisse in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H.-J. Gröhne.*

zwischen den unbehandelten Gruppen als auch nach Behandlung mit L-NAME signifikante Unterschiede zwischen den Mausstämmen. Die Indizes der Knockout-Tiere liegen mit $90,9 \pm 0,78$ unbehandelt und $73,81 \pm 3,81$ nach L-NAME deutlich unter denen der Wildtyp-Mäuse ($93,88 \pm 0,66$ unbehandelt; $80,62 \pm 1,28$ nach L-NAME) und zeigen somit eine ausgeprägtere perivaskuläre Fibrose an (Tab. 4; Abb. 36). Ferner sind hier im Unterschied zum totalen Fibrose-Index die sich unter L-NAME vollziehenden morphologischen Veränderungen in AT_2^-/y größer als bei AT_2^+/y . Es wurden jeweils fünf Herzen in jeder Gruppe aufgearbeitet. Das mittlere Körpergewicht unterschied sich kaum zwischen den Gruppen: AT_2^+/y 30 ± 1 g; AT_2^-/y 31 ± 1 g; AT_2^+/y nach L-NAME 33 ± 2 g und AT_2^-/y nach L-NAME 28 ± 1 g

Vermessung der Kernoberfläche

Sowohl in Knockout-Tieren als auch Wildtyp-Mäusen wurden nach dreiwöchiger L-NAME-Behandlung vergrößerte Kernoberflächen der Kardiomyozyten des linken Ventrikels vermessen. So vergrößerten sich die Kerne in AT_2^+/y von $31,45 \pm 1,03 \mu\text{m}$ auf $34,39 \pm 0,67 \mu\text{m}$ und in AT_2^-/y von $33,5 \pm 0,92 \mu\text{m}$ auf $38,53 \pm 0,85 \mu\text{m}$ (Abb. 25). Es wurden unter Ausgangsbedingungen 5 Herzen pro Gruppe und nach L-NAME-Behandlung 8 Herzen pro Gruppe vermessen. Diese Untersuchung wurde in Heidelberg durch Prof. Dr. H.-J. Gröhne vorgenommen.

4.3.4 Linksventrikuläre Transkription des Brain Natriuretic Peptide (BNP)

L-NAME führt in den Knockout-Mäusen zu einer gesteigerten Transkription des BNP im linken Ventrikel. Wie Abbildung 37 zeigt, wird die Transkription durch die Behandlung von $10,73 \pm 1$ auf $17,66 \pm 1,76$ relative Expressionseinheiten erhöht. Die Expressionsanalyse führte Dr. T. H. Langenickel durch. Untersucht wurden jeweils 6 Tiere pro Gruppe. Das Körpergewicht der Mäuse betrug durchschnittlich 28 ± 2 g (AT_2^-/y); 33 ± 1 g (AT_2^+/y); 26 ± 1 g (AT_2^-/y nach L-NAME) und 32 ± 1 g (AT_2^+/y nach L-NAME).

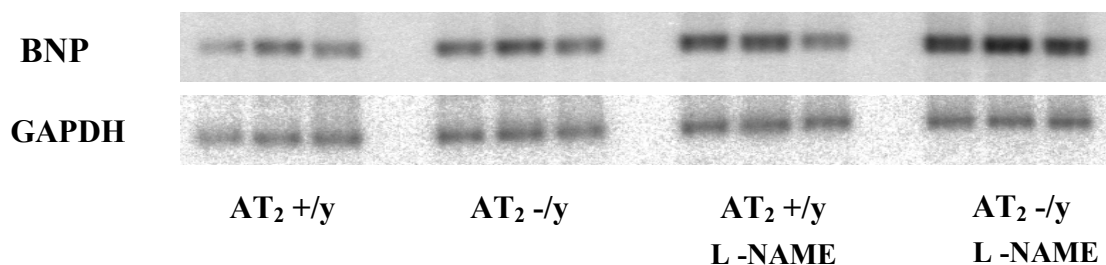
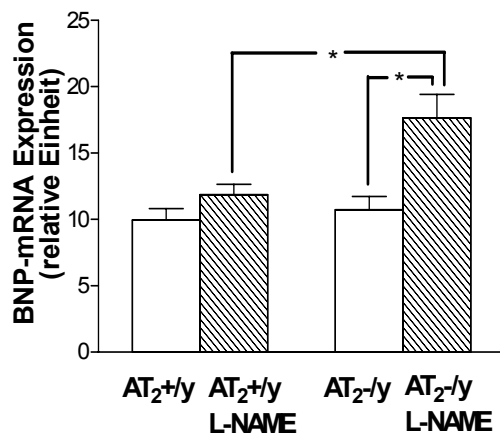


Abb. 37: Linksventrikuläre BNPmRNA-Expression in AT₂^{-/y} und AT₂^{+/y} vor und nach dreiwöchiger L-NAME-Gabe. * P<0,05 In beiden Mauslinien wurde die BNP-Transkription durch L-NAME erhöht. *Messung erfolgte durch Dr. Langenickel.*

4.3.5 Renale mRNA-Expression des AT₁Rezeptors unter DOCA-Salz

Auch bei den Kontrolltieren dieser Serie wurde wie bereits in der L-NAME-Serie die stärkere renale Transkription des AT₁-Rezeptor-Genes bei den Knockout-Tieren festgestellt (Zusammenarbeit mit Dr. J. Janke). DOCA-Salz hemmt die AT₁-Rezeptor-Genexpression in den Nieren AT₂-Rezeptor-defizienter Mäuse (von $1,2 \pm 0,1$ RE auf $0,98 \pm 0,07$), während der Transkriptionslevel bei Wildtyp-Mäusen unverändert bleibt ($0,89 \pm 0,04$ RE bzw. $0,87 \pm 0,05$ RE Abb. 38). Für die TaqMan-Analyse wurden pro Gruppe 10 rechte, ungepoolte Nieren verwendet. Das Körpergewicht betrug für Wildtyp-Mäuse durchschnittlich 32 ± 1 g und für Knockout-Tiere 27 ± 1 g. Die Behandlung mit DOCA-Salz führte zu keinen Gewichtsänderungen.

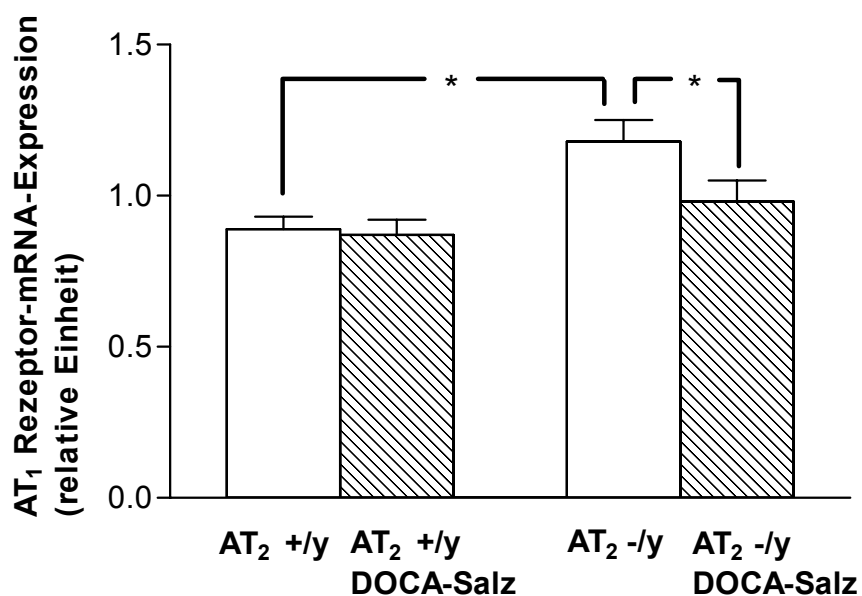


Abb. 38: Renale AT₁-Rezeptor-mRNA-Expression in AT₂+/y und AT₂-/y vor und nach DOCA-Salz-Behandlung. * P<0,05 DOCA-Salz normalisiert die Deregulation des AT₁-Rezeptors in AT₂-/y. Die Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Janke durchgeführt.

4.3.6 Nitrit-Exkretion unter DOCA-Salz

Die mit Hilfe der Griess-Reaktion von Dr. K. Schulze-Forster bestimmte Nitritkonzentration des Urins unterscheidet sich erheblich zwischen den untersuchten Mausstämmen (Abb. 39). Der Urin der unbehandelten AT_2 -Rezeptor-defizienten Mäuse ist mit $11,04 \pm 1,17 \mu\text{mol}$ höher konzentriert als der Urin der Kontrolltiere $8,38 \pm 0,52 \mu\text{mol}$. DOCA-Salz führt zu einer Abnahme der Nitritkonzentration bei Wildtyp-Tieren auf $6,07 \pm 0,68 \mu\text{mol}$. Die Konzentration des Urins von Knockout-Tieren bleibt unverändert ($11,46 \pm 1,49 \mu\text{mol}$).

Bezogen auf das täglich abgegebene Urinvolumen ergibt sich folgende Relation der tatsächlich ausgeschiedenen Nitrit-Menge zwischen den einzelnen Versuchsgruppen: Im gleichen Zeitraum scheiden $AT_2^{+/y}$ signifikant mehr Nitrit als $AT_2^{-/y}$ aus. Bis zur dritten Woche der DOCA-Salz-Behandlung ist die Nitritexkretion sowohl in $AT_2^{+/y}$ als auch $AT_2^{-/y}$ deutlich auf ähnliche Maximalwerte angestiegen. Zwischen den Mausstämmen bestehen zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede mehr. Diesen Ergebnissen liegen die Meßwerte von 13 $AT_2^{-/y}$ mit einem mittleren Körpergewicht von $24 \pm 1 \text{ g}$ und 14 $AT_2^{+/y}$ mit einem Durchschnittsgewicht von $29 \pm 1 \text{ g}$ zugrunde. Die Behandlung mit DOCA-Salz führte zu keinen Gewichtsänderungen.

4.3.7 NO-Synthaseaktivität unter DOCA-Salz

Zwischen den verschiedenen Isoformen der NO-Synthase bestehen im Hinblick auf den Expressionslevel in der Niere auf mRNA-Ebene erhebliche Unterschiede (Abb. 40). Während die eNOS-Aktivität in beiden Mausstämmen unter Ausgangsbedingungen annähernd gleich ist, wurde sowohl für iNOS als auch nNOS mehr mRNA in $AT_2^{-/y}$ als in $AT_2^{+/y}$ nachgewiesen. Unter DOCA-Salz kommt es zu einer Hochregulierung der iNOS-Aktivität aber zu einer Abnahme der nNOS-Aktivität. Diese Veränderungen der Gentranskription nach DOCA-Salz-Behandlung erreichen bei beiden Isoformen statistische Signifikanz. Bei eNOS führt DOCA-Salz zu keinerlei Änderungen in der renalen mRNA-Synthese. Es wurden jeweils die rechten Nieren von 7 Tieren verwendet. Die Expressionsanalyse führte Dr. J. Janke durch. Das mittlere Körpergewicht betrug bei $AT_2^{+/y}$ $32 \pm 1 \text{ g}$ und bei $AT_2^{-/y}$ $25 \pm 1 \text{ g}$. Die Behandlung mit DOCA-Salz führte zu keinen Gewichtsänderungen.

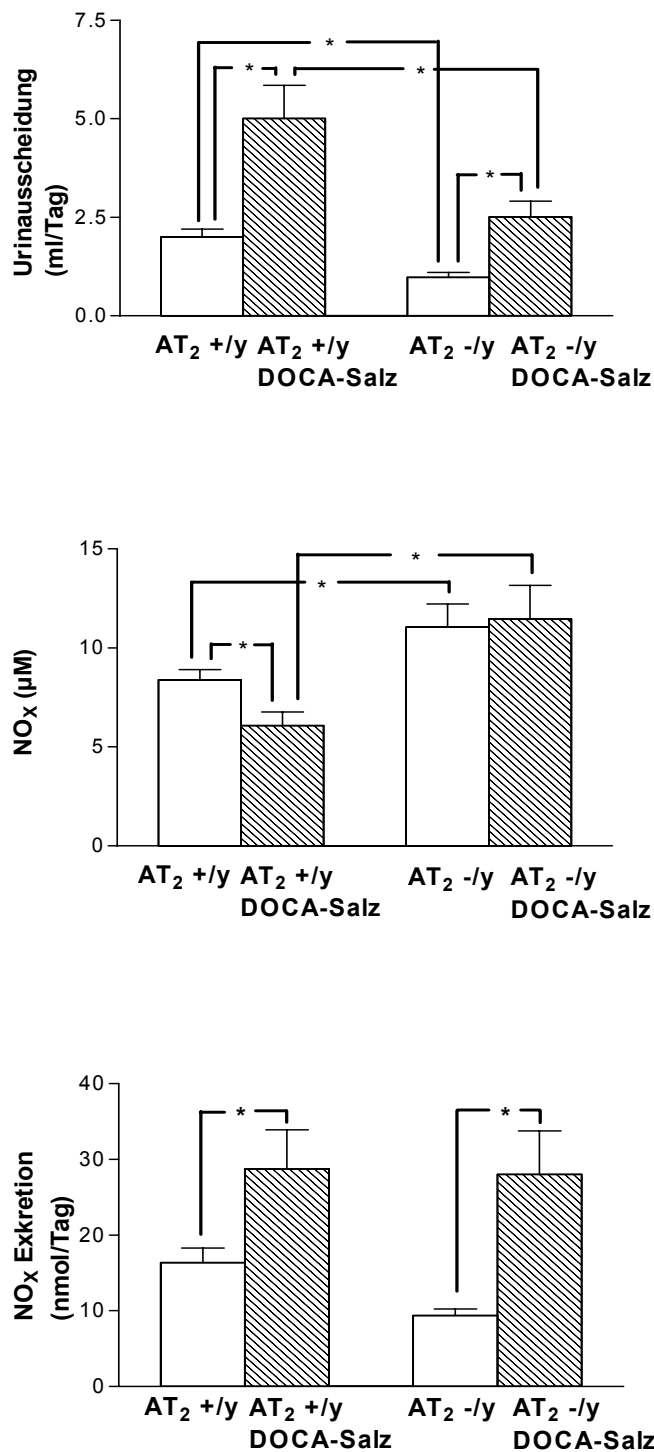


Abb. 39: Nitritausscheidung in AT_2+/y und AT_2-/y vor und nach DOCA-Salz-Behandlung. Dargestellt sind 24-Stunden-Mittelwerte. * $P < 0,05$ DOCA-Salz führt zu einem Anstieg der Nitrit-Exkretion in beiden Maus-Stämmen. *Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Schulze-Forster erhoben.*

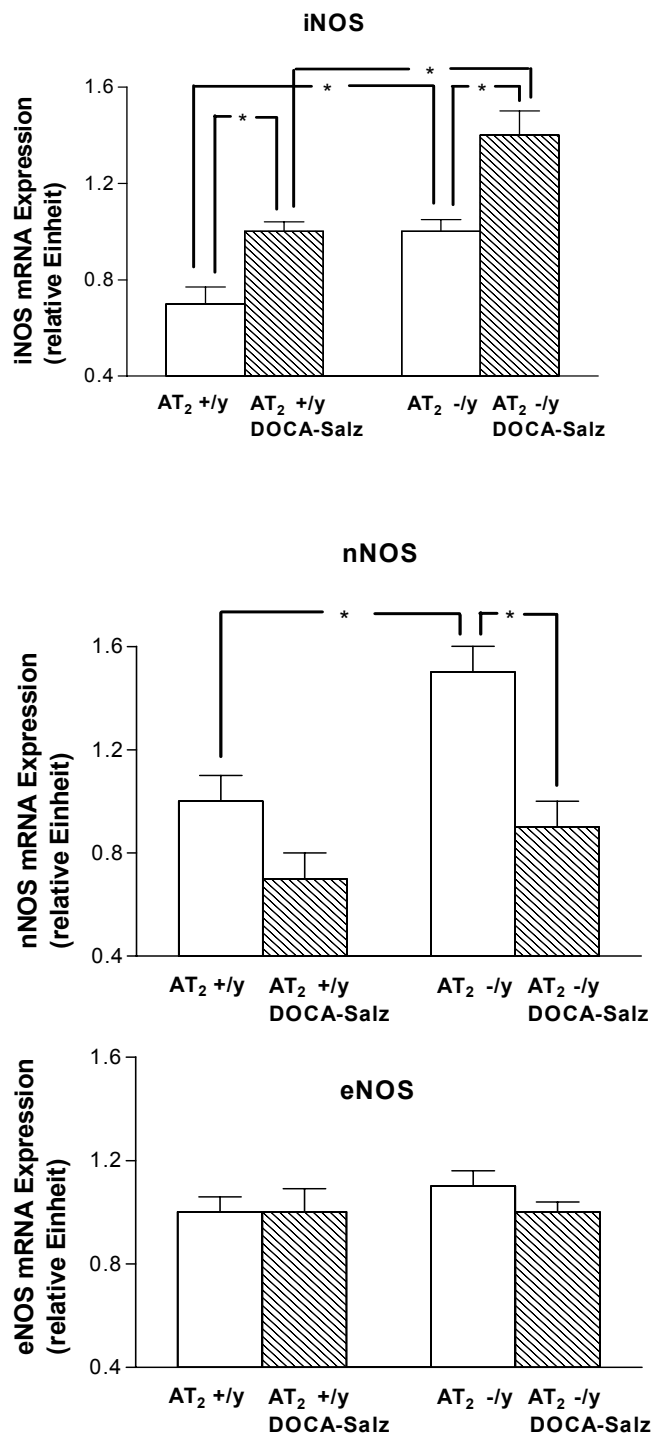


Abb. 40: Renale mRNA-Expression der verschiedenen NO-Synthase-Isoformen in AT₂+/y und AT₂-/y vor und nach DOCA-Salz-Behandlung. * P<0,05 Die Messung erfolgte durch Dr. J. Janke, MDC.