

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Funktionelle und morphologische
Charakterisierung des renalen Phänotyps
eines Endothelin-B-Rezeptor-defizienten
Rattenstammes**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Sebastian Tobias Friese
Arzt aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. B. Hoher
 2. Prof. Dr. F. J. Schweigert
 3. Priv.-Doz. Dr. Th. Dschietzig

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

"Wir müssen die Dinge lustiger nehmen als sie es verdienen; zumal wir sie lange Zeit ernster genommen haben, als sie es verdienen."

Friedrich Wilhelm Nietzsche, *Morgenröte* (1881)

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	HINTERGRUND DER ARBEIT	1
1.2	DAS ENDOTHELINSYSTEM	3
1.2.1	<i>Endothelin</i>	3
1.2.2	<i>Endothelinrezeptoren</i>	9
1.2.3	<i>Endothelin und der Amilorid-sensitive (epitheliale) Natriumkanal</i>	11
1.2.4	<i>Die ETB-defiziente Ratte</i>	12
1.3	FRAGESTELLUNGEN UND HYPOTHESEN.....	13
1.3.1	<i>Fragestellungen</i>	13
1.3.2	<i>Hypothesen</i>	13
1.3.3	<i>Experimentelle Überlegungen</i>	14
2	MATERIAL UND METHODEN:.....	15
2.1	TIERE.....	15
2.1.1	<i>Tierhaltung</i>	15
2.1.2	<i>Stoffwechseluntersuchungen</i>	16
2.1.2.1	<i>Allgemeine Stoffwechseluntersuchung</i>	16
2.1.2.2	<i>Amilorid-Intervention</i>	17
2.1.3	<i>Zellproliferationsuntersuchung</i>	18
2.1.4	<i>Tötung und Organentnahme</i>	18
2.1.5	<i>Genotypbestimmung</i>	18
2.1.6	<i>Bestimmung von Trink- und Urinvolumina</i>	20
2.2	PLASMA- UND URINANALYSEN	20
2.3	FEINGEWEBLICHE UNTERSUCHUNG	21
2.3.1	<i>Vorbemerkungen</i>	21
2.3.2	<i>Fixierung</i>	21
2.3.3	<i>Paraffineinbettung</i>	21
2.3.3.1	<i>Prinzip</i>	21
2.3.3.2	<i>Technik</i>	22
2.3.4	<i>Herstellung der Schnitte</i>	22

2.3.5	<i>PAS-Färbung</i>	23
2.3.6	<i>Sirius Red-Färbung</i>	24
2.3.7	<i>TUNEL-Färbung</i>	25
2.3.7.1	Verwendete Lösungen	27
2.3.7.1.1	TDT-Puffer	27
2.3.7.1.2	TB-Puffer.....	27
2.3.7.1.3	DN-Puffer	28
2.3.7.1.4	PBS	28
2.3.7.1.5	BSA.....	29
2.3.7.1.6	TDT	29
2.3.7.1.7	Biotin-dUTP.....	29
2.3.7.1.8	Inkubationsmedium.....	29
2.3.7.1.9	ABC-Komplex.....	30
2.3.7.1.10	AEC-Komplex.....	30
2.3.7.1.11	DNase –Lösung für Positivkontrolle.....	30
2.3.7.2	Ablauf der Färbung	31
2.3.8	<i>HE-Färbung</i>	34
2.3.8.1	Allgemeines Vorgehen	34
2.3.8.2	Hämatoxylin-Gegenfärbung für TUNEL-Methode	35
2.3.8.3	Hämatoxylin-Gegenfärbung für BrdU-Methode.....	36
2.3.9	<i>5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-Methode</i>	36
2.3.9.1	Prinzip	36
2.3.9.2	Verwendetes Kit.....	37
2.3.9.3	Verwendete Lösungen	38
2.3.9.3.1	PBS (phosphate-buffered solution) nach Dulbecco A.....	38
2.3.9.3.2	TBS-(Tris-buffered saline)-Puffer	38
2.3.9.3.3	Trypsin-Lösung	38
2.3.9.3.4	Inkubationspuffer.....	39
2.3.9.3.5	Nachweislösung für alkalische Phosphatase (AP).....	39
2.3.9.4	Vorgehen	39
2.4	VISUELLE HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG	42
2.4.1	<i>Allgemeines</i>	42
2.4.2	<i>Nierenmorphologie</i>	42
2.4.3	<i>Glomerulosklerose</i>	43

2.4.4	<i>Apoptosen</i>	44
2.4.5	<i>Proliferation</i>	44
2.5	DIGITALE BILDAUSWERTUNG	45
2.5.1	<i>Allgemeines</i>	45
2.5.2	<i>Nierenfläche</i>	45
2.5.3	<i>Glomeruläre Fläche und Zellzahl</i>	45
2.5.4	<i>Zellzahl</i>	46
2.5.5	<i>Interstitielle Fibrose</i>	46
2.5.6	<i>Media-Lumen-Ratio</i>	47
2.6	MESSUNG DES ARTERIELLEN BLUTDRUCKS	48
2.6.1	<i>Allgemeine Anmerkungen</i>	48
2.6.2	<i>Messapparatur</i>	48
2.6.3	<i>Ablauf von Narkose und Messkatheterimplantation</i>	49
2.7	BERECHNUNGEN	51
2.7.1	<i>Absolute Ausscheidung</i>	51
2.7.2	<i>Clearance</i>	51
2.7.3	<i>Fraktionierte Ausscheidung</i>	51
2.7.4	<i>Amilorid-Response</i>	51
2.7.5	<i>Zelldichte</i>	52
2.7.6	<i>Gesamtzellzahl</i>	52
2.7.7	<i>Anzahl der Glomerula pro Fläche</i>	52
2.7.8	<i>Glomeruläre Zelldichte</i>	53
2.7.9	<i>Apoptoseindex</i>	53
2.7.10	<i>Proliferationsindex</i>	53
2.7.11	<i>Relatives Organgewicht</i>	53
2.8	STATISTISCHE VERFAHREN	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	VORBEMERKUNGEN	55
3.2	KÖRPERGEWICHT UND ORGANGEWICHTE	56
3.3	NIERENMORPHOLOGIE	57
3.3.1	<i>Allgemeine visuelle Auswertung</i>	57
3.3.2	<i>Renale Zelldichte</i>	59

3.3.3	<i>Glomerulosklerose</i>	60
3.3.4	<i>Anzahl der Glomerula</i>	61
3.3.5	<i>Glomeruläre Fläche</i>	62
3.3.6	<i>Glomeruläre Zelldichte</i>	63
3.3.7	<i>Apoptoseindex</i>	64
3.3.8	<i>Renaler Proliferationsindex</i>	65
3.3.9	<i>Renale interstielle Fibrose</i>	66
3.3.10	<i>Media-Lumen-Ratio</i>	67
3.4	BLUTDRUCKMESSUNG	68
3.5	PHYSIOLOGISCHE DATEN UND NIERENFUNKTION	69
3.5.1	<i>Allgemeine Stoffwechseluntersuchungen</i>	69
3.5.1.1	Trinkmenge und Urinvolumen	69
3.5.1.2	Serumparameter	71
3.5.1.3	Urinparameter und berechnete Größen	73
3.5.1.3.1	Endogene Kreatinin-Clearance.....	74
3.5.1.3.2	Natriumausscheidung	75
3.5.1.3.3	Kaliumausscheidung.....	77
3.5.1.3.4	Kalziumausscheidung.....	78
3.5.1.3.5	Osmolarität und Hydratation	79
3.5.1.3.6	Urin pH-Wert.....	80
3.5.1.3.7	Weitere Parameter.....	81
3.5.2	<i>Amilorid-Intervention</i>	83
3.5.2.1	Vorbemerkungen.....	83
3.5.2.2	Körpergewichtsveränderung	84
3.5.2.3	Trinkmenge und Urinvolumen	85
3.5.2.4	Serumparameter	87
3.5.2.5	Urinparameter und berechnete Größen	88
3.5.2.5.1	Endogene Kreatinin-Clearance.....	88
3.5.2.5.2	Natriumausscheidung	89
3.5.2.5.3	Osmolarität und Hydratation	92
4	DISKUSSION	93
4.1	ENDOGENE KREATININ-CLEARANCE UND GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE	93
4.2	NATRIUMAUSSCHIEDUNG	95

4.3	BLUTDRUCK.....	99
4.4	ZUSAMMENFASSUNG	101
5	KURZFASSUNG / ABSTRACT.....	103
5.1	DEUTSCH	103
5.2	ENGLISCH.....	103
6	LITERATURVERZEICHNIS	105
7	DANKSAGUNG.....	117
8	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	119
9	VORAB PUBLIZIERTE ERGEBNISSE	120
10	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT.....	121
11	LEBENS LAUF.....	122

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der Arbeit

In den westlichen Staaten gehört die arterielle Hypertonie mit ihren Folgeerkrankungen wie Myokardinfarkt, Apoplex und chronischem Nierenversagen zu den Haupttodesursachen. Neben beeinflussbaren Faktoren wie körperliche Aktivität, Ernährung und Konsum von Genussmitteln wie Zigaretten sowie nicht beeinflussbaren Faktoren wie dem Geschlecht ergeben epidemiologische Studien, dass an der Entstehung der arteriellen Hypertonie zu etwa 30% genetische Ursachen beteiligt sind. Typischerweise handelt es sich dabei nicht um monogenetische Leiden, nach Stammbaumanalysen kann auf eine polygenetische Ätiologie geschlossen werden.

Möglicherweise ist eine Ursache auch in Veränderungen am Endothelin B-Rezeptor (ETB-Rezeptor) und seinem Einfluss auf den renal-tubulären Wasser- und Natriumtransport zu suchen.

Endotheline (ET) haben neben ihren Effekten auf das Gefäßsystem mannigfaltige Auswirkungen in anderen Gewebearten und Organen, insbesondere in der Niere.

So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das parakrine renale Endothelinsystem bei der Pathogenese des chronischen Nierenversagens und der renalen Fibrose beteiligt ist.

Ebenfalls wurde dargestellt, dass das Endothelinsystem in der Niere bei der Regulation der renalen Wasser- und Natriumausscheidung beteiligt ist. Wurde zunächst der Effekt von Endothelin-1 auf den renalen Natriumtransport weitgehend unter dem Blickwinkel der Veränderungen der renalen hämodynamischen Parameter und damit einer sekundär beeinflussten

glomerulären Filtrationsrate (GFR) betrachtet, so zeigte sich in weiteren Untersuchungen ein Einfluss von Endothelin auf tubuläre Natriumkanäle. In Patch-clamp-Untersuchungen konnte eine inhibierende Wirkung von Endothelin-1 (ET-1) in picomolaren Konzentrationen, vermittelt durch den ETB-Rezeptor auf apicale Natriumkanäle in distalen Nephronzellen, nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass der ETB-Rezeptor eine Rolle in der Regulation der Wasser- und Natriumausscheidung der Niere spielt. Weiterhin muss der Frage nachgegangen werden, ob ein Eingreifen in diese Regulation Auswirkungen auf den systemischen Blutdruck hat.

Die medizinische Forschung strebt die Aufklärung der Ursachen von Krankheiten an, denn nur so können rationale Therapieansätze gefunden werden. Ethische Gründe verbieten aber in vielen Fällen, die erforderlichen Untersuchungen am Menschen durchzuführen. Einen Ausweg bieten hier Tiermodelle, an denen sowohl die Ätiologie als auch Therapieansätze für Krankheiten des Menschen untersucht werden können.

Um den für diese Arbeit relevanten Fragen nachzugehen, wurde ein Rattenstamm benutzt, der aufgrund einer Deletion im ETB-Rezeptor-Gen einen funktionell inaktiven ETB-Rezeptor aufweist. Es sollte untersucht werden, ob dieser Rattenstamm als Tiermodell für einen Bluthochdruck infolge eines funktionell inaktiven ETB-Rezeptors geeignet ist.

1.2 Das Endothelinsystem

1.2.1 Endothelin

Yanagisawa *et al.* isolierten 1988 aus dem Überstand von kultivierten porzinen Aortenendothelzellen ein bis dahin unbekanntes Peptid aus 21 Aminosäuren, das vasoaktive Eigenschaften aufwies [117]. Bezugnehmend auf seinen Bildungsort, das Endothel, erhielt das Peptid den Namen Endothelin (ET).

Die Arbeitsgruppe um Inoue war ein Jahr später, 1989, in der Lage, zwei weitere Isoformen zu beschreiben [50]. Die von Yanagisawa 1988 entdeckte Form bezeichnete man nun als Endothelin-1 (ET-1), die beiden weiteren wurden Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) genannt.

Alle drei Isoformen des Endothelins sind aus 21 Aminosäuren aufgebaut und besitzen eine Molmasse von ca. 2,5 kDa. Zwischen den einzelnen Endothelinen bestehen geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz. So weist ET-2 im Vergleich zu ET-1 an zwei Positionen andere Aminosäuren auf, ET-3 im Vergleich zu ET-1 an sechs Positionen.

Innerhalb des Moleküls bestehen bei allen Endothelinen zwei Disulfidbrücken, die zu einer charakteristischen Haarnadelform führen.

Kloog *et al.* zeigten 1989, dass die Endotheline eine sehr hohe Sequenz- und Bioaktivitätshomologie mit den Sarafotoxinen, einer Familie von Peptidtoxinen, die aus dem Gift der *Atractaspis engadensis*, einer Viper, gewonnen wurden, aufweisen [56, 57]. Es konnte gezeigt werden, dass das Gift beim Säugetier eine starke Vasokonstriktion insbesondere auch an den Koronarien bewirkt, wodurch schließlich ein Herzstillstand und damit der Tod des Beutetiers oder Angreifers eintritt.

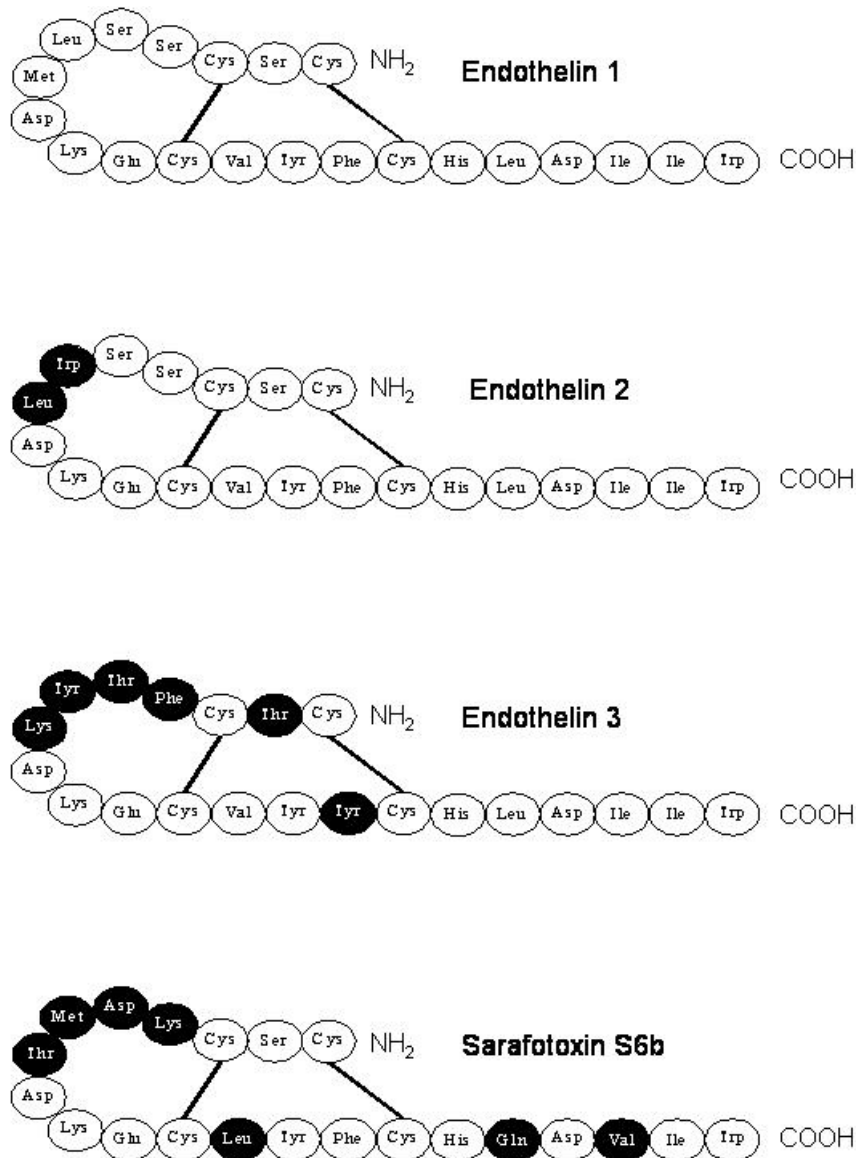


Abb. 1: Vergleichende Darstellung der Sequenzen von ET-1, ET-2 und ET-3 gegenüber Sarafotoxin S6b

Die Gruppen um Kloog und um Landan folgerten, dass die Endotheline und Sarafotoxine einen gemeinsamen evolutionären Hintergrund besitzen. Die hohe Sequenzhomologie zwischen den Familien der Endotheline und Sarafotoxine, aber auch zwischen den Endothelinen verschiedener Spezies der Säugetiere kann den Schluss zulassen, dass für die Endotheline ein hoher Druck zur genetischen Konservierung besteht [56, 57, 64, 65]. Wie Niall *et al.*

beschrieben, besteht dieses Phänomen bei Genen, die im Organismus eine besondere Bedeutung haben [83].

Die humanen Endothelin-Gene liegen für ET-1 auf Chromosom 6, für ET-2 auf Chromosom 1 und für ET-3 auf Chromosom 20 [7].

Am Beispiel von ET-1 sei auf die Synthese eingegangen: Inoue *et al.* stellten 1989 die komplette Nucleotidsequenz des ET-1-Gens dar [50]. Das Gen enthält bei fünf Exons vier Introns, wobei das zweite Exon die für ET-1 kodierende Sequenz enthält. Die Promotorregion des ET-1-Gens enthält GAAT- sowie TATA-Sequenzen, über die eine Stimulation der Transkription bewirkt werden kann. Ebenfalls in der Promotorregion finden sich andere regulatorische Elemente, darunter Bindungsstellen für das *activator protein 1* (AP-1), einem Transkriptionsfaktor für die zellulären Onkogene c-fos und c-jun. Das primäre Translationsprodukt ist das aus 203 Aminosäuren bestehende Präproendothelin-1, das durch spezifische Peptidasen in Proendothelin-1, synonym auch Big-Endothelin-1, von 92 Aminosäuren Länge gespalten wird. Dies wiederum wird durch ein Endothelin-Konversionsenzym (*endothelin-converting-enzyme*, ECE) mittels Proteolyse zwischen den Aminosäuren Tryptophan an Position 21 und Valin an Position 22 (Trp 21 und Val 22) in das biologisch aktive ET-1 gespalten [1, 70, 71, 75, 115]. Die Spaltung des Proendothelins-1 in ET-1 durch das ECE ist der geschwindigkeitsdeterminierende Schritt der ET-1-Synthese. ECE kommt in zwei Formen vor, die verschiedene Lokalisationen aufweisen. So kann ECE-1 in der Plasmamembran sowie extrazellulär in Lunge, Pankreas, Plazenta sowie endothelialen Zellen, ECE-2 intrazellulär am Golgiapparat in Gehirn, Uterus und Hoden nachgewiesen werden. Das Vorhandensein weiterer spezifischer Konversionsenzyme kann nicht ausgeschlossen werden.

Entgegen der ersten Vermutungen, dass das ET-1 jeweils nur nach Bedarf synthetisiert wird und die Regulation auf der Ebene der mRNA erfolgt [117], konnten zumindest im Hypophysenhinterlappen ET-Speichergranula nachgewiesen werden [118]. Außerdem wurden in bovinen Endothelzellen sekretorische Vesikel nachgewiesen [41], was eine mögliche Erklärung für die

beim Menschen innerhalb von zwei Minuten um den Faktor sieben steigerbare ET-1-Konzentration im Plasma ist [28].

Endotheline sind Gewebshormone, die parakrin und autokrin wirken. Sowohl ET-1, ebenfalls aber auch Proendothelin-1 werden überwiegend aluminale sezerniert. Nur ein geringer Anteil der Sekretion erfolgt luminal. Entgegen den ersten Annahmen erfolgt die Synthese und Sekretion des Endothelins nicht nur im Endothel, sondern auch in anderen Organen.

Hinsichtlich der synthetisierten Endotheline findet man deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Organen. Matsumoto *et al.* konnten 1989 zeigen, dass ET-3 zum überwiegenden Teil im zentralen Nervensystem einschließlich der Hypophyse und im Darm produziert wird [73]. Davenport *et al.* konnten 1996 darüber hinaus im Nebennierenmark Hinweise auf die Synthese von ET-3 finden [23].

Im Unterschied dazu wird ET-1 hauptsächlich von Endothelzellen produziert, woraus es ursprünglich 1988 von Yanagisawa *et al.* isoliert werden konnte [117]. Masaki *et al.* konnten 1992 das Endothel als Hauptsyntheseort bestätigen [70]. Allerdings konnte auch im zentralen und peripheren Nervensystem, in Niere, Leber und Herz, im Gastrointestinaltrakt, in der Nebenniere und auch im Auge eine ET-1-Synthese nachgewiesen werden [66, 69, 70, 96].

Genauer betrachtet sei die Endothelinsynthese der Niere: Marsden *et al.* konnten 1991 zeigen, dass renale Endothelzellen ET-1, nicht jedoch ET-3 sezernieren [67]. Kasinath *et al.* konnten 1992 an glomerulären Zellen die Freisetzung von sowohl ET-1 als auch ET-3 zeigen [53]. Auch an kultivierten Mesangiumzellen konnte die Synthese und Freisetzung von ET-1 gezeigt werden, allerdings in deutlich geringerem Maße als an kultivierten Endothelzellen [59, 121]. Wie Kitamura *et al.* 1989 fanden, weisen epitheliale Zellen der Tubuli im Bereich der inneren Medulla im menschlichen Körper die höchsten ET-1-Konzentrationen auf [54, 55]. Daran anschließend konnten Ujii *et al.* 1992 zeigen, dass dafür insbesondere die epithelialen Zellen des inneren medullären Sammelrohres (*inner medullar collecting duct*, IMCD) verantwortlich

sind [106]. Ebendort befindet sich auch der Ort der relativ höchsten Produktion von ET-3, wobei diese Isoform allerdings insgesamt im Körper in erheblich geringerem Maße produziert wird als ET-1 [61]. Marsen *et al.* 1994 konnten entgegen früherer Annahmen im menschlichen Körper keine Synthese von ET-2 nachweisen [68].

Die Synthese von Endothelin kann auf verschiedene Arten sowohl stimuliert als auch inhibiert werden. Als Beispiele für die Stimulation seien die folgenden genannt: Pharmaka, wie zum Beispiel Cyclosporin A und FK506 [78, 79, 101, 102, 103, 104], Glukokortikoide, auch Glucose [116] und Kalzium-Ionophoren [117], physikalische Faktoren, darunter insbesondere Hypoxie [62], die Gefäßwandspannung und Scherkräfte (shear stress) [76], Endotoxine [99], aber auch Thrombin [117, 121] und Peptidhormone, darunter Angiotensin II [27], Insulin [86], Bradykinin [67], Cytokine, zum Beispiel Interleukin-2 [51] und TGF- β (transforming growth factor- β) [51, 52], Vasopressin [9], EGF (epidermal growth factor) [20], Adrenalin [117], IGF-1 (insulin-like growth factor-1) [72], außerdem Thromboxan A2 [121] und oxidiertes LDL (low density lipoprotein) [17]. Vor allem Thrombin, Transforming Growth Factor β und Angiotensin II sind bei der Stimulation der endothelinproduzierenden Zellen von Bedeutung.

Von Bedeutung für die Inhibition der Endothelinfreisetzung ist vor allem Stickstoffmonoxid (NO) [16]. ET-1, der stärkste endogene Vasokonstriktor, wird hierbei von NO, dem potentesten endogenen Vasodilatator, bereits auf der Ebene der Präproendothelin-1-mRNA über cGMP, das als *second messenger* des NO fungiert, gehemmt. Entsprechend wirken auch andere Mediatoren, die cGMP als *second messenger* nutzen, hemmend auf die ET-1-Synthese, so zum Beispiel das atriale antriuretische Hormon (atrial natriuretic factor, ANF), aber auch Prostaglandin E2, Prostacyclin und natürlich cGMP. Auch konnte gezeigt werden, dass Dexamethason zu einer Down-Regulation der Expression von Endothelin-Rezeptoren in der glatten Gefäßmuskulatur führt [81].

Nach intravenöser Gabe hat ET-1 bei der Ratte eine Plasmahalbwertszeit von unter einer Minute [2], beim Menschen von unter fünf Minuten [110].

Der Abbau erfolgt vor allem über schnelle Internalisierung der ET-Rezeptorkomplexe sowie durch Metabolisierung in Lunge und Niere [26]. Der Abbau des zirkulierenden ET-1 erfolgt über zwei Klassen von Endopeptidasen mit einem sauren beziehungsweise einem neutralen pH-Optimum. Simonson und Dunn beschrieben 1993, dass der Abbau im sauren pH-Optimum insbesondere in der Lunge der vorherrschende ist [97]. Desweiteren erfolgt zu geringeren Anteilen der Abbau von Endothelinen auch in Lysosomen.

1.2.2 Endothelinrezeptoren

Bereits kurz nach der Erstbeschreibung des Endothelins schloss man wegen verschiedener Wirkungen der Endothelin-Isopeptide auf das Vorhandensein verschiedener Rezeptoren [50]. Japanische Gruppen konnten drei Rezeptorsubtypen nachweisen, über die das Hormon seine biologische Effekte entfaltet: Endothelin-A- (ETA), Endothelin-B- (ETB) und Endothelin-C-Rezeptoren (ETC) [3, 4, 92, 93]. Hierbei ist zu erwähnen, dass der ETC-Rezeptor bisher nur am Herzen des Krallenfroschs *Xenopus laevis* beschrieben wurde [63, 82]. Es gibt Hinweise, dass es sich beim ETC-Rezeptor um eine Speziesvariante des ETA- oder ETB-Rezeptors handeln könnte [10].

Die beschriebenen unterschiedlichen biologischen Effekte der ET-Isopeptide, die synergistischer aber auch antagonistischer Natur sein können, resultieren aus einer unterschiedlichen Gewebespezifität und Verteilung der verschiedenen Endothelin-Rezeptoren.

Bereits früh nach Entdeckung der verschiedenen Rezeptorsubtypen konnte gezeigt werden, dass der ETA-Rezeptor gegenüber ET-1 eine um den Faktor 100 höhere Bindungsaffinität als gegenüber ET-3 besitzt, jedoch ET-1 im Vergleich zu ET-2 nur zwei- bis zehnfach besser bindet [3, 48]. Der humane ETA-Rezeptor besteht aus 427 Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass seine mRNA beim Menschen vor allem in glatter Gefäßmuskulatur, im Herzen, in der Lunge, im Kolon und in der Plazenta vorkommt [48].

Ebenfalls in Japan gelang die Klonierung des 442 Aminosäuren umfassenden ETB-Rezeptors aus humaner DNA [84, 80]. Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor die drei bekannten Endothelin-Isopeptide mit nahezu der gleichen Affinität bindet [10, 92]. Bei Ratten, aber auch beim Menschen wurde der ETB-Rezeptor zunächst in Endothelzellen beschrieben, aber auch im zentralen Nervensystem, in der Lunge und in der Niere [84].

Bei den Endothelin-Rezeptoren handelt es sich um plasmamembranständige, rhodopsinähnliche, G-Protein-gekoppelte

Rezeptoren, die heptahelikale hydrophobe transmembranäre Domänen aufweisen. Weiterhin verfügen sie über je drei intra- und extrazelluläre Loops, der N-terminale Abschnitt liegt extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär [3, 10, 13, 93].

Die Rezeptoren regulieren verschiedene Effektor-Pathways, so zum Beispiel der ETA-Rezeptor die Phospholipase C über ein G_q -Protein und die Adenylatzyklase über ein G_s -Protein in der glatten Gefäßmuskelzelle. Ebenfalls in die Regulation der Adenylatzyklase greift der ETB-Rezeptor ein, jedoch über ein G_i -Protein, durch das er mittelbar auch die Aktivierung des Natrium-Protonen-Antiports hemmt. Der ETB-Rezeptor aktiviert darüber hinaus die Phospholipase A₂, was zur Freisetzung von Prostazyklin und anderen Arachidonsäurederivaten führt [5, 58, 91, 98]. Es konnte ferner gezeigt werden, dass auch der ETB-Rezeptor die Phospholipase C aktiviert und damit indirekt über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration auch die kalziumabhängige NO-Synthetase, was die initiale Vasodilatation verursacht. Hierbei gleichen sich die Abläufe beim ETA- und ETB-Rezeptor [10].

1.2.3 Endothelin und der Amilorid-sensitive (epitheliale) Natriumkanal

In einer weiteren Untersuchung konnten Gallego und Ling 1996 zeigen, dass picomolare Konzentrationen von Endothelin-1 in der Lage sind, den Amilorid-sensitiven Natriumkanal, auch bekannt als epithelialer Natriumkanal (ENaC), zu hemmen [29]. Durch Patch-clamp-Untersuchungen konnten sie zeigen, dass in Anwesenheit von ET-1 in picomolaren Konzentrationen die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals reduziert ist. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von ETB-Antagonisten ausgeschaltet werden, nicht aber durch die Gabe von ETA-Antagonisten. Es kann daher angenommen werden, dass ET-1 eine inhibierende Wirkung auf den Amilorid-sensitiven Natriumkanal hat, die durch den Endothelin B-Rezeptor vermittelt wird.

In derselben Studie konnte ferner gezeigt werden, dass die Offenwahrscheinlichkeit des Amilorid-sensitiven Natriumkanals bei Gabe von nanomolaren Konzentrationen von ET-1 und Hemmung der ETB-vermittelten Inhibition über einen ETB-Rezeptorantagonisten erhöht ist. Gallego und Ling schließen daraus, dass in höheren (nanomolaren) Konzentrationen ET-1 über einen anderen Rezeptor als ETB einen stimulierenden Effekt auf den ENaC hat. Sie nehmen als wahrscheinlich an, dass es sich hierbei um den Endothelin A-Rezeptor handelt.

Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Ratten mit einer Leberzirrhose die Expression des Endothelin B-Rezeptors in den renalen Tubuli erhöht ist und dass die Behandlung mit einem kombinierten ETA/ETB-Antagonisten unabhängig von Blutdruck und GFR die Ausscheidung von Wasser und Natrium hemmt [45].

1.2.4 Die ETB-defiziente Ratte

Der für diese Untersuchungen verwendete Rattenstamm weist eine 301 Basenpaare lange Deletion im ETB-Gen auf, die sich vom Exon 1 bis zum Intron 1 erstreckt. Der korrespondierende Abschnitt des Genprodukts ist die erste und zweite Transmembrandomäne des ETB-Rezeptors. Die für den Defekt homozygoten Tiere sind durch ein weißes Fell mit scheckigen schwarzen Einsprengeln äußerlich erkennbar. Außerdem weisen sie ein kongenitales aganglionäres Megakolon auf, das der beim Menschen bekannten Hirschprung'schen Erkrankung entspricht [42, 43]. Dieser intestinale Phänotyp limitiert die Lebenserwartung der betroffenen Tiere auf wenige Wochen. Aufgrund ihres scheckigen Aussehens und der frühen Sterblichkeit sind die Tiere in der Literatur auch als *spotting-lethal-rat* oder kurz sl-Ratte eingeführt [30].

Pathogenetisch findet sich beim Menschen wie im beschriebenen Rattenmodell eine verzögerte Migration von Zellen der Neuralleiste in der embryonalen Entwicklung. Insbesondere finden sich bei dem untersuchten Stamm Störungen der Melanozytenmigration und der rostrokaudalen Migration der Vorläuferzellen der Nervenzellen des *Plexus myentericus* [14, 15, 100, 108, 109].

In *Knockout*-Mäusemodellen kann entsprechend nach Ausschalten des ET-3- oder des ETB-Rezeptor-Gens ein aganglionäres *Megacolon congenitum* beobachtet werden. Außerdem fehlen auch bei diesen Tieren regional epidermale Melanozyten [11, 49].

Für die folgenden Untersuchungen wesentlich ist aber, dass den für den Defekt homozygoten Tieren ein funktionell aktiver ETB-Rezeptor vollständig, insbesondere auch in der Niere, fehlt; der intestinale Phänotyp war nicht Gegenstand der Untersuchungen.

1.3 Fragestellungen und Hypothesen

1.3.1 Fragestellungen

- Resultiert aus der funktionellen Inaktivität des Endothelin B-Rezeptors eine veränderte Nierenmorphologie?
- Resultiert aus der funktionellen Inaktivität des Endothelin B-Rezeptors eine veränderte Nierenfunktion?
- Resultiert aus der funktionellen Inaktivität des Endothelin B-Rezeptors ein veränderter arterieller Blutdruck?
- Lässt sich mittels Pharmaka eine Normalisierung der Nierenfunktion erreichen, falls diese verändert ist?
- Kann auf die Ursachen einer veränderten Nierenfunktion geschlossen werden, falls diese sich zeigen lässt?

1.3.2 Hypothesen

- Die funktionelle Inaktivierung des Endothelin B-Rezeptors führt zu einer Reduktion der fraktionellen und absoluten Natriumausscheidung und indirekt zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks.
- Der wesentliche Pathomechanismus besteht in einer fehlenden Inhibition des Amilorid-sensitiven (epithelialen) Natriumkanals.
- Durch die Gabe von Amilorid kann eine Normalisierung der Nierenfunktion erreicht werden.

1.3.3 Experimentelle Überlegungen

Durch die Hirschsprung'sche Erkrankung war die Lebenszeit der für diese Untersuchungen verwendeten Ratten wesentlich verkürzt. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den enteralen Phänotyp möglichst gering zu halten, wurden Tiere bis zu einem Alter von 23 Tagen verwendet.

2 Material und Methoden:

2.1 Tiere

Die benutzten Tiere gehörten zum Wistar-Imamichi AR-Stamm (*congenital anganglionosis rat* oder auch *spotting lethal rat*). Diese Tiere sind durch eine 301 Basenpaare lange Deletion im ETB-Gen charakterisiert, die sich vom Exon 1 bis zum Intron 1 erstreckt. Der korrespondierende Abschnitt des Genprodukts ist die erste und zweite Transmembrandomäne des ETB-Rezeptors. Typisch für diesen Stamm ist bei homozygoten Tieren (sl/sl) die Ausprägung eines *Megacolon congenitum*, ein scheckiges Aussehen mit einzelnen dunklen Flecken, bevorzugt an den Flanken, und der frühe Tod innerhalb von zwei bis drei Tagen nach Entzug der Muttermilch.

Alle für die Untersuchungen verwendeten Tiere entstammten der Zucht aus heterozygoten (+/sl) Männchen und Weibchen. Der Genotyp jedes Tieres wurde nach der Tötung mittels PCR bestimmt.

2.1.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen bezüglich Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Tag-Nacht-Rhythmus in Polyacrylatkäfigen Typ III mit Edelstahldeckel und Tiereinstreufaser im Tierstall des MPI Göttingen gehalten. Die Temperatur betrug konstant 20°C, die Luftfeuchtigkeit 64% und die Lichtperiode 12 Stunden von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr.

Die Versuchstiere hatten freien Zugang zum Muttertier entweder bis zum vierten, fünfzehnten oder zweiundzwanzigsten Tag. Alle Tiere hatten außerdem jederzeit freien Zugang zu Leitungswasser (Göttingen) und Standard-

Rattenfutter. Die Haltung erfolgte in Gruppen mit jeweils dem Muttertier mit den zugehörigen Jungtieren.

Die Tiere zeigten keine Zeichen von Infektionen. Alle Tiere erschienen klinisch gesund und hatten insbesondere ein glattes, nicht struppiges Fell. Es wurden normale Werte weißer Blutzellen und keine erhöhten Werte des C-reaktiven Proteins (CRP) gemessen.

Alle Tierversuche wurden vom MPI Göttingen der zuständigen Aufsichtsbehörde angezeigt und wurden von dieser genehmigt.

2.1.2 Stoffwechseluntersuchungen

2.1.2.1 Allgemeine Stoffwechseluntersuchung

Die für die Stoffwechseluntersuchungen verwendeten Ratten aller drei Genotype verblieben bis zum 22. Tag unter den bei 2.1.1 beschriebenen Bedingungen beim Muttertier. Am 23. Tag wurden sie vereinzelt und in Stoffwechselkäfige (Sonderanfertigung für MPI Göttingen) gesetzt, in denen sie 24 Stunden verblieben. Im Käfig hatten die Tiere freien Zugang zu Leitungswasser (Stadtwerke Göttingen), nicht aber zu Futter. Der Urin wurde aufgefangen und das Volumen bestimmt, danach bei -20°C tiefgefroren. Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Stoffwechselkäfig erfolgten die Tötung der Ratten, wie unter 2.1.4 beschrieben, und die Blutentnahme aus der abdominalen Aorta. Das Blut wurde, wie ebendort beschrieben, weiterbehandelt.

Insgesamt standen für die beschriebenen Untersuchungen neun Tiere des Wildtyps, zwölf heterozygote Tiere und elf Tiere, die hinsichtlich der beschriebenen Deletion homozygot waren, zur Verfügung.

Auf die Untersuchung von Tieren anderer Altersgruppen wurde verzichtet, da Tiere der jüngeren Altersgruppen nicht gut ohne Muttertier lebensfähig waren und die zu erwartenden Urinmengen als zu gering eingeschätzt wurden. Ältere

Tiere scheiden aufgrund der reduzierten Lebenserwartung infolge der intestinalen Grunderkrankung aus.

2.1.2.2 Amilorid-Intervention

Für die Untersuchung der Wirkung von Amilorid auf die Nierenfunktion wurde weitgehend wie unter 2.1.2.1 beschrieben verfahren. Abweichend erhielten die Tiere jedoch entweder eine subkutane Injektion Amilorid (5 mg/kg KG in 0,9% NaCl entsprechend 0,1 ml/10g KG) oder eine gleichgroße Menge Placebo (0,1 ml/10g KG 0,9% NaCl). Beide Gruppen verblieben auch nur sechs Stunden im Stoffwechsellkäfig, um Artefakte durch eine nachlassende Wirkung des Pharmakons zu minimieren. Ferner wurde zusätzlich die Trinkenge bestimmt. Im Weiteren wurde wie unter 2.1.2.1 beschrieben verfahren.

Für diese Versuche wurden aus der Wildypgruppe sieben Tiere mit Placebo behandelt, neun erhielten Amilorid. Aus der Gruppe der homozygot ETB-defizienten Tiere erhielten jeweils sieben das Placebo oder Amilorid. Heterozygote Tiere wurden in diese Untersuchung nicht miteinbezogen. Die zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen bereits vorliegenden Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass zwischen den Tieren des Wildtyps und den für die ETB-Defizienz heterozygoten Tieren keine wesentlichen Unterschiede bestehen (siehe dazu auch 3.5.2.1).

2.1.3 Zellproliferationsuntersuchung

Für die Bestimmung der Zellproliferation wurde die In-vivo-Inkorporation von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) bestimmt. Auf die Methodik wird an anderer Stelle (siehe 2.3.9) genauer eingegangen.

Für die Untersuchung wurde den Tieren am zweiundzwanzigsten Lebenstag eine Lösung mit 200 mg/kg KG BrdU intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden nach 22 Stunden getötet, die Organe wie unten beschrieben entnommen (siehe 2.1.4) und in Paraffin eingebettet (siehe 2.3.3).

2.1.4 Tötung und Organentnahme

Die Tiere wurden gewogen und danach narkotisiert (16 mg/kg KG Xylazin und 80 mg/kg KG Ketamin), anschließend wurde der Leib ventral in der Mittellinie eröffnet und das Blut durch Punktion der abdominalen Aorta gewonnen. Es wurden die Organe (Nieren, Herz, Lungen) entnommen, gewogen, in Bouin'sche Lösung gegeben und wie unter 2.3.2 beschrieben weiterverarbeitet. Das Blut wurde bei 4°C mit 4000 U für 15 min zentrifugiert, das Plasma anschließend in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und bei -20°C tiefgefroren.

2.1.5 Genotypbestimmung

Für alle in die Untersuchungen einbezogenen Tiere erfolgte eine eindeutige Genotypbestimmung bezüglich der sl-Mutation. Die Isolation der DNA aus dem Blut erfolgte durch das Max-Planck-Institut für Molekulare Medizin in Göttingen. Für die PCR wurden Primer benutzt, die die 301 bp-Deletion im ETB-Gen flankieren (CTG CAA CAT GCA ATC GTC A sowie CAT AGA CTC AAC ACT

GTG AT). Es wurden dreißig Zyklen mit 1 min 92°C, 1 min 65°C, 3 min 72°C durchgeführt.

Für die Gelelektrophorese wurden 200 mg Agarose mit 25 ml TAE-Puffer und 25 µl Ethidiumbromid gemischt, daraufhin kurz gekocht und in Form gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer platziert und die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt. Jeweils 1 µl der DNA-Probe wurde mit 1 µl Elektrophorese-Puffer und 9 µl *Aqua bidest.* gemischt, anschließend 6 s bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die gesamte Lösung wurde in jeweils eine Tasche des Gels gegeben. In allen Elektrophoresen wurde jeweils eine Tasche des Gels mit 10 µl DNA-kb Leiter befüllt. Die Elektrophorese wurde mit 200 V und 100 mA für 30 min durchgeführt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert. In der Elektrophorese konnten die Genotypen anhand der unterschiedlichen Größen der Amplifikationsprodukte unterschieden werden (siehe Abb. 2).

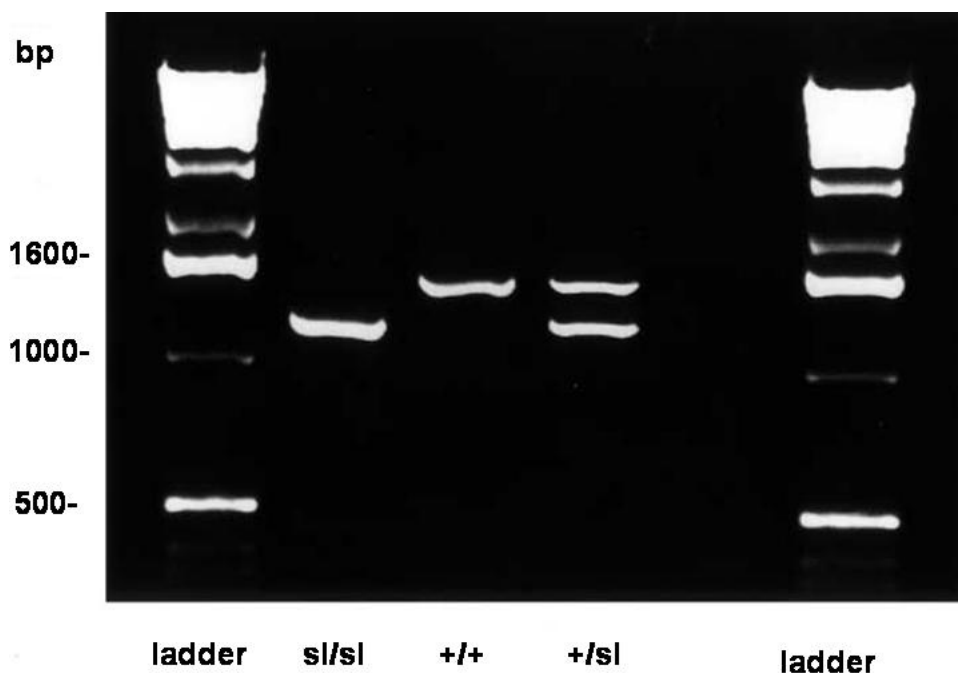


Abb. 2: Beispiel einer DNA-Elektrophorese aus Blut von für die 301 bp-Deletion homozygoten (sl/sl), heterozygoten (+/sl) und Wildtyp-Ratten (+/+)

2.1.6 Bestimmung von Trink- und Urinvolumina

Zur Bestimmung von Trink- und Urinvolumina im Rahmen des allgemeinen Stoffwechselforschungs und der Amilorid-Intervention wurden skalierte Standzylinder (Schott) verwendet. Es wurden die Größen 10 ml und 5 ml verwendet, die kleinste auswertbare Skalierung war 0,1 ml.

2.2 Plasma- und Urinalysen

Das, wie unter 2.1.4 und 2.1.2 beschrieben, gewonnene Plasma und der, wie unter 2.1.2 beschrieben, gewonnene Urin wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin, Campus Mitte, von Herrn Dipl. chem. Priem nach den herrschenden Standards untersucht. Mittels Routineverfahren wurde in den Plasmaproben Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Eiweiß, Kreatinin, Harnstoff, Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), alkalische Phosphatase (AP), Creatininkinase (CK), C-reaktives Protein (CRP) und Osmolarität bestimmt. Die Urinproben wurden ebenfalls nach Standard auf Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Eiweiß, Kreatinin, Osmolarität und pH-Wert untersucht.

2.3 Feingewebliche Untersuchung

2.3.1 Vorbemerkungen

Für die feingeweblichen Untersuchungen standen für alle drei untersuchten Altersklassen zu jedem Genotyp jeweils fünf Tiere zur Verfügung.

Alle genannten Reagenzien und histologischen Materialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (München), Merck (Darmstadt) und Boehringer-Mannheim (Mannheim) erworben.

2.3.2 Fixierung

Die Nieren wurden, wie unter 2.1.4 beschrieben, entnommen, gewogen und direkt in Bouin'scher Lösung (2,5% Kupferazetat, 4% Pikrinsäure, 3,5% Formaldehyd in *Aqua bidest.*) fixiert. Die Organe wurden in der Fixationslösung von Göttingen nach Berlin transportiert und 48 bis 72 Stunden nach Entnahme wie im Folgenden beschrieben in Paraffin eingebettet.

2.3.3 Paraffineinbettung

2.3.3.1 Prinzip

Eine Einbettung des Gewebes ist erforderlich, um möglichst dünne Schnitte herstellen zu können. Das Gewebematerial erhält dadurch Härte und Stabilität. Eine Einbettung von Gewebe ist nur möglich, wenn das zunächst flüssige Einbettungsmittel das Gewebe vollständig durchtränken kann, sich danach verfestigt und danach fest wird und darauf gemeinsam mit dem nun durchtränkten und ebenfalls verfestigten Gewebe geschnitten werden kann.

Die Paraffineinbettung erfordert, dass das Gewebematerial vollständig entwässert und alkoholfrei ist. Da aber die Entwässerung in Alkohol durchgeführt wird, sich der Alkohol aber nicht mit Paraffin verbindet, ist die Zwischenschaltung eines Intermediums erforderlich. Das Intermedium, hier Xylol, mischt sich sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin.

2.3.3.2 Technik

Die Präparate werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iges, 80%iges , 2 x 96%iges und 3 x absolutes Ethanol) je eine Stunde entwässert, darauf aus absolutem Ethanol in Xylol übertragen. Nach jeweils Stunden erfolgt zweimal eine Erneuerung des Xylols. Im Anschluss wird das Gewebematerial für eine Stunde in reines geschmolzenes Paraffin bei 56°C gegeben, darauf folgend noch einmal für zwei Stunden.

Die beschriebenen Schritte werden automatisiert in der Histokinette durchgeführt.

Im Anschluss können die Präparate in Tissue-Tek Unikassetten mit warmem (56°C) Paraffin übergossen werden, nach Erkalten des Paraffins sind sie schnittfähig.

2.3.4 Herstellung der Schnitte

Am Mikrotom Jung RM2025 (LEICA) wurden Schnitte von 3 µm Dicke gefertigt und danach auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Soweit nichts anderes angegeben ist, wurden für alle Untersuchungen Organschnitte nach diesen Vorgaben verwendet.

2.3.5 PAS-Färbung

PAS steht für „periodic acid-Schiff“

Entparaffinieren:

10 min Xylol 1

10 min Xylol 2

3 min 100% Ethanol DAB-rein

3 min 96% Ethanol (192ml Ethanol +8ml *Aqua bidest.*)

3 min 80% Ethanol (160ml Ethanol +40ml *Aqua bidest.*)

3 min 70% Ethanol (140ml Ethanol +60ml *Aqua bidest.*)

10 min in 2% Perjodsäure (2g kristalline Perjodsäure ad 100ml *Aqua bidest.*)

Spülen in drei Portionen *Aqua bidest.* (eine Küvette mit *Aqua bidest.* füllen und dann wieder auskippen)

15 min in SCHIFFS Reagenz

Spülen in Sulfitwasser (18ml 10 % Natriumdisulfit ad 300ml *Aqua bidest.* + 15ml 1N HCl)

15 min in fließendem Leitungswasser, kalt

4 min in MAYERS Hämalaun

10 min Bläuen in fließendem Leitungswasser

Entwässern:

2-5 min 70% Ethanol

2-5 min 80% Ethanol

2-5 min 96% Ethanol

2-5 min 100 % Ethanol

10 min Xylol 3

10 min Xylol 4

Die Objektträger wurden mit Corbitbalsam mit Deckgläschen versehen.

2.3.6 Sirius Red-Färbung

Entparaffinieren:

10 min Xylol 1

10 min Xylol 2

5 min Ethanol 100%

5 min Ethanol 96%

5 min Ethanol 80%

5 min Ethanol 70%

5 min *Aqua bidest.*

60 min Sirius Red 0,1% (Sigma)

Eintauchen in HCl 0,01 N

Entwässern:

5 min Ethanol 70%

5 min Ethanol 80%

5 min Ethanol 96%

5 min Ethanol 100%

10 min Xylol 3

10 min Xylol 4

Die Objektträger wurden mit Histokitt (Roth) mit Deckgläschen versehen.

2.3.7 TUNEL-Färbung

TUNEL steht für „terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling“.

Die TUNEL-Untersuchung ermöglicht eine Detektion von Apoptose mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen, indem sie die während der Apoptose entstehenden DNA-Strangbrüche markiert und so die Identifizierung apoptotischer Zellen ermöglicht. Es erfolgt der Nachweis von Einzelstrangbrüchen in der DNA des Genoms, die durch Nucleasen hervorgerufen werden.

Durch das Enzym TdT werden an die entstandenen freien Enden markierte dNTP-Nukleotide angehängt. Es gibt die Möglichkeit des direkten Verfahrens, in dem dies ein Fluorescein-dNTP ist. Bei den in dieser Untersuchung verwendeten indirekten Verfahren werden Biotin-dUTP und ein Streptavidin-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Der direkte Test ist in der Regel schneller und liefert weniger Hintergrund, der indirekte dagegen ist sensitiver. Bereits in einer sehr frühen Phase der Apoptose kann im Prinzip jede einzelne apoptotische Zelle identifiziert werden [8, 21, 32].

Für die Untersuchung wurde das „In Situ Cell Death Detection Kit“ der Firma Roche Diagnostics verwendet.

2.3.7.1 Verwendete Lösungen

2.3.7.1.1 TDT-Puffer

	Molekulargewicht	für 1 l 1x	für 500 ml 1x
	[g/mol]	[g]	[g]
30 mM Tris Base	121,12	3,63	1,82 (15 ml 1M)
140 mM Na-Cacodylat	214,03	29,96	14,98
1 mM Cobalt-II-Chlorid	129,84	0,13	0,065

in *Aqua bidest.* lösen, pH 7,2 einstellen und auffüllen auf 1l oder 500 ml

2.3.7.1.2 TB-Puffer

	Molekulargewicht	für 1 l 1x	für 500 ml 1x	für 1l 10x
	[g/mol]	[g]	[g]	[g]
300mM NaCl	58,44	17,53	8,765	175,3
30mM Na-Citrat	294,10	8,82	4,41	88,2

in *Aqua bidest.* lösen, pH 7,2 einstellen und auffüllen auf 1l oder 500 ml

2.3.7.1.3 DN-Puffer

	Molekulargewicht [g/mol]	für 1 l 1x [g]	für 500 ml 1x [g]
30 mM Tris Base	121,14	3,63	1,815 (15 ml 1M)
140 mM Na-Cacodylat	214,03	29,96	14,98
4mM Mg-Chlorid	95,21	0,38	0,19
0,1mM DTT (Dithiotretiol)	154,2	0,015	0,0075

in *Aqua bidest.* lösen, pH 7,2 einstellen und auffüllen auf 1l oder 500 ml

2.3.7.1.4 PBS

	Summen- formel	Molekulargewicht [g/mol]	für 1 l 1x [g]	für 500 ml [g]	für 1l 10x [g]
Dinatriumhydro- genphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$	268,07	2,68	1,34	26,8
Kaliumdihydro- genphosphat	KH_2PO_4	136,09	0,43	0,215	4,3
Natriumchlorid	NaCl	58,44	7,2	3,6	72

in *Aqua bidest.* lösen, pH 7,2 einstellen und auffüllen auf 1l oder 500 ml

Die fertige Lösung ist bereits verdünnt auf 0,01 mol/l.

2.3.7.1.5 BSA

Es wird aus bovinem Serumalbumin (BSA) nach folgender Vorschrift eine 2%ige Lösung erzeugt:

2 g BSA + 998 g *Aqua bidest.*

2.3.7.1.6 TDT

Im Kit ist eine TDT-Stammlösung enthalten (500 U / 25 µl). Diese wird mit 50% Glycerol/PBS nach folgender Anweisung verdünnt:

25 µl Stammlösung + 475 µl Glycerol/PBS

Die erhaltene Lösung wird aliquotiert auf 20 Portionen mit jeweils 25 U / 25µl und bei -20°C gelagert.

2.3.7.1.7 Biotin-dUTP

Im Kit ist eine Stammlösung enthalten (50 nmol / 50 µl). Diese wird mit PBS nach folgender Anweisung verdünnt:

50 µl Stammlösung + 450 µl PBS

Die erhaltene Lösung wird aliquotiert auf 10 Portionen mit jeweils 5 nmol / 50µl und bei -20°C gelagert.

2.3.7.1.8 Inkubationsmedium

Das Inkubationsmedium wird nach folgender Vorschrift hergestellt:

25 µl TDT [25 U/25 µl] + 50 µl Biotin-dUTP [5nmol/50 µl] + 425 µl TDT-Puffer.

2.3.7.1.9 ABC-Komplex

Alle erforderlichen Substanzen sind Bestandteil des Kit.

Der Komplex ist 30 min vor der Anwendung herzustellen nach folgender Vorschrift:

5 ml PBS in das grau markierte Fläschchen geben, Zugabe von je 2 Tropfen Reagenz A und B, mischen.

2.3.7.1.10 AEC-Komplex

Die AEC-Tabletten sind Bestandteil des Kit.

Die Stammlösung ist wie folgt herzustellen:

AEC-Tabletten in der Konz. 4 mg/ml N,N Dimethylformamid lösen.

Die Stammlösung ist bei -20°C aufzubewahren. Vor Gebrauch ist nach folgender Anweisung zu handeln:

0,25 ml AEC-Lösung + 3,5 ml 0,1 mol/l Natriumacetat-Puffer + 3,5 µl 30% H₂O₂.

Die entstandene Lösung ist zu mischen und muß danach 5 min ruhen, danach ist sie zu filtrieren.

0,1 mol/l Natriumacetatpuffer: 0,8203g Natriumacetat ad 100ml *Aqua bidest.*, pH 5,2.

2.3.7.1.11 DNase –Lösung für Positivkontrolle

Die Lösung ist nach folgender Vorschrift zuzubereiten:

25 µl MgCl₂ [1 mol/l] + 300 µl Tris [1 mol/l] + 10 µl DTT [0,1 mol/l] + 0,02996 g Kaliumkacodylate + 10 mg DNase.

2.3.7.2 Ablauf der Färbung

Hinweis: Soweit nichts anderes angegeben ist, wurden für jeden Schnitt jeweils 50 µl Lösung aufpipettiert.

Entparaffinieren:

5 min Xylol 1

5 min Xylol 2

5 min Xylol 3

5 min Ethanol 100%

5 min Ethanol 100%

5 min Ethanol 96%

5 min Ethanol 96%

5 min Ethanol 90%

5 min Ethanol 80%

5 min *Aqua bidest.*

5 min PBS

15 min Proteinase K [20 µg/ml] bei RT in feuchter Kammer auf Schüttler.

4 x 2 min Waschen mit *Aqua bidest.*

Blockieren der endogenen Peroxidase:

5 min 2% H₂O₂ in feuchter Kammer auf Schüttler.

3 x 2 min Waschen mit *Aqua bidest.*

Permeabilisieren der Zellmembranen:

3 min 0,1% Triton X in 0,1% Natriumcitrat in feuchter Kammer.

3 x 2 min Waschen mit *Aqua bidest.*

Jetzt die Schnitte in PBS lagern und die Kontrollen mit DNase behandeln.

Nur für DNase (Positiv- und Negativkontrolle):

7,5 min Inkubation mit: DN-Puffer bei RT in feuchter Kammer auf Schüttler.

10 min Inkubation mit: DNase bei RT in feuchter Kammer auf Schüttler.

2 x 2 min Waschen mit *Aqua bidest.* in einer gesonderten Küvette.

Ab jetzt wieder alle Schnitte und Kontrollen:

10 min Inkubation mit TDT- Puffer RT in feuchter Kammer auf Schüttler.

Nur für die Negativkontrolle:

60 min Inkubation nur mit Biotin-dUTP in TDT-Puffer bei 37° C.

Positivkontrolle und Proben:

60 min Inkubation mit Inkubationsmedium (TDT und Biotin-dUTP) bei 37°C.

Reaktion stoppen:

2 x 7,5 min TB-Puffer.

5 min Waschen mit PBS.

10 min Inkubation mit 2% BSA auf Schüttler.

2 x 2 min Waschen mit *Aqua bidest.*

5 min Eintauchen in PBS.

10 min Avidin-Biotin-Komplex bei 37°C.

2 x 5 min Spülen in PBS.

25 min AEC-Komplex auf Schüttler.

5 min Spülen in PBS.

Die Objektträger wurden mit PBS-Glycerin mit Deckgläschen versehen.

Es folgt die mikroskopische Kontrolle und Zählung der apoptotischen Zellen.

Danach folgt die Hämatoxylin-Gegenfärbung (siehe 2.3.8.2) und die Zählung der Gesamtzellkernzahl. Die Apoptoserate wird in TUNEL-positiven Zellen pro 50.000 Zellkerne angegeben.

2.3.8 HE-Färbung

HE steht für „Hämatoxylin-Eosin“

2.3.8.1 Allgemeines Vorgehen

Entparaffinieren:

10 min. Xylol 1

10 min. Xylol I2

5 min. 100% Ethanol

5 min. 96% Ethanol

5 min. 80% Ethanol

5 min. 70% Ethanol

2 min. *Aqua bidest.*

Färbung:

3 min. Hämalaun, filtriert

10 min. bläuen unter fließendem, warmem Leitungswasser

10 min. färben in 0,1 % Eosin (0,1 g Eosin in 99 ml Aqua bidest + 1 ml Eisessig), filtriert

2 min. auswaschen in *Aqua bidest.*

Differenzieren in 80 % Ethanol

2 min. 96 % Ethanol

2 min. 100 % Ethanol

5 min. Xylol 3

5 min. Xylol 4

Die Objektträger wurden mit Corbitbalsam mit Deckgläschen versehen.

2.3.8.2 Hämatoxylin-Gegenfärbung für TUNEL-Methode

Für Proben, die bereits nach der TUNEL-Methode behandelt wurden und mit der Hämatoxylin-Färbung gegengefärbt werden sollen, ist der Ablauf modifiziert worden.

Die Entparaffinierung ist bereits im Rahmen der TUNEL-Färbung erfolgt. Die nur mittels PBS-Glycerin aufgebrachten Deckgläschen werden mittels Einweichen in PBS abgelöst. Der Ablauf ist wie folgt:

10 min PBS (Ablösen der Deckgläschen)

5 min PBS

5 min PBS

5 min PBS

5 min *Aqua bidest.*

2 min Hämalaun, filtriert

10 min. bläuen unter fließendem, warmem Leitungswasser

3 min 70% Ethanol

3 min 80% Ethanol

3 min 90% Ethanol

3 min 100% Ethanol

1 min Rotoclaer

Die Objektträger wurden mit Entellan mit Deckgläschen versehen.

2.3.8.3 Hämatoxylin-Gegenfärbung für BrdU-Methode

Der Ablauf erfolgte analog zur Gegenfärbung bei der TUNEL-Methode (siehe 2.3.8.2).

2.3.9 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-Methode

2.3.9.1 Prinzip

5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ist ein Thymidinanalogon (siehe Abb. 3). In der Synthesephase des Zellzyklus wird es kompetitiv zu Thymidin in die DNA inkorporiert. Der Nachweis am histologischen Schnitt erfolgt über Antikörper. Die ersten polyklonalen und monoklonalen Antikörper wurden bereits vor rund 25 Jahren eingeführt [39, 40]. Der gebundene Antikörper wird mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen [24]. Durch die Anwendung der BrdU-Methode kann auf den Einsatz radioaktiver Verfahren, wie die Verwendung von [³H]-Thymidin ([³H]-TdR) als Thymidinanalogon, verzichtet werden.

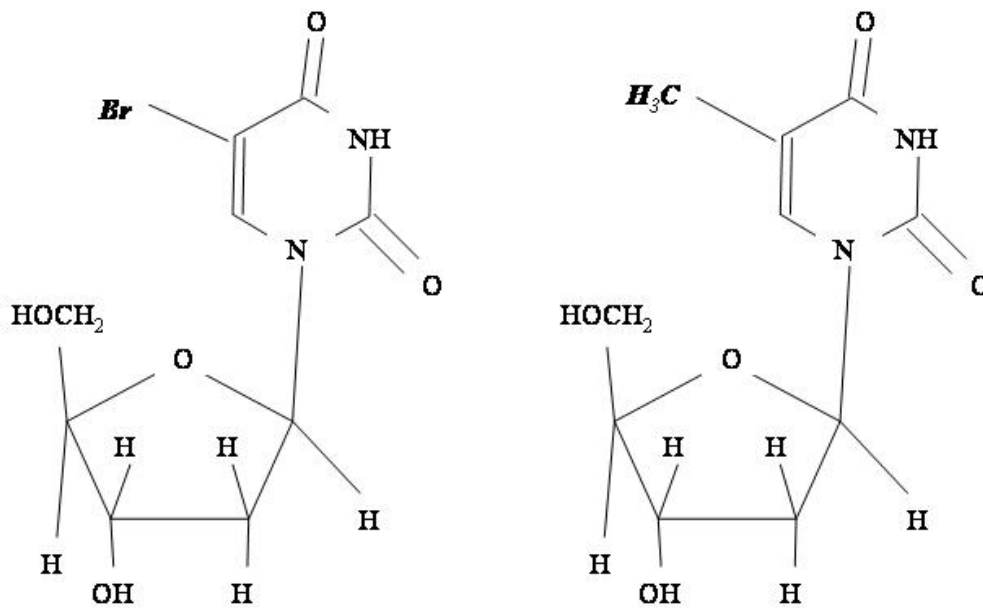


Abb. 3: Vergleich der Struktur von 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, links) und Thymidin (rechts)

2.3.9.2 Verwendetes Kit

5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II (Boehringer Mannheim).

Das Kit verwendet einen monoklonalen Anti-BrdU-Antikörper aus Maus (Klon BMC 9318, IgG1) und eine Anti-Maus-Ig-Alkalische Phosphatase aus Schaf.

Im Kit waren alle nicht-laborüblichen Substanzen enthalten.

2.3.9.3 Verwendete Lösungen

2.3.9.3.1 PBS (phosphate-buffered solution) nach Dulbecco A

NaCl	8g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
pH	7,4

2.3.9.3.2 TBS-(Tris-buffered saline)-Puffer

Tris	0,1 mol/l
NaCl	0,1 mol/l
MgCl ₂	0,05 mol/l
pH	7,5

2.3.9.3.3 Trypsin-Lösung

Trypsin	5 mg
CaCl ₂	5 mg
TBS	ad 5 ml
pH	7,5

2.3.9.3.4 Inkubationspuffer

(bovines Serumalbumin)	2,5 g
BSA	
20%ige TritonX100-Lösung	250 µl
PBS n. Dulbecco A	ad 500 ml

2.3.9.3.5 Nachweislösung für alkalische Phosphatase (AP)

Eine Substrattablette ad 2ml Substratpuffer, 10 min durch Schütteln lösen, filtrieren. Innerhalb von 30 min zu verbrauchen.

2.3.9.4 Vorgehen

Entparaffinieren:

5 min. Xylol 1

5 min. Xylol 2

5 min. 100% Ethanol

5 min. 100% Ethanol

5 min. 96% Ethanol

5 min. 90% Ethanol

5 min. 80% Ethanol

5 min. 70% Ethanol

2 min. *Aqua bidest.*

3 min. TBS

3 min. TBS

Trypsinierung:

15 min mit Trypsinlösung bei 37°C in feuchter Kammer

5 min TBS bei RT

1 min *Aqua bidest.*

Denaturierung

15 min mit 4 mol/l HCl bei RT

5 min Inkubationspuffer

5 min Inkubationspuffer

5 min Inkubationspuffer

Inkubation mit Anti-BrdU-Antikörper

35 min mit 1:5 in Inkubationspuffer verdünntem Anti-BrdU-Ak bei 37°C in feuchter Kammer

2 min PBS bei RT

2 min PBS bei RT

2 min PBS bei RT

AP-Nachweis

20 min mit Nachweislösung für AP bei RT in feuchter Kammer

5 min PBS bei RT

5 min *Aqua bidest.*

Die Präparate wurden mit PBS-Glycerin mit Deckgläschen versehen.

Es folgt die mikroskopische Kontrolle und Zählung der BrdU-positiven Zellen.

Danach folgt die Hämatoxylin-Gegenfärbung (siehe 2.3.8.2) und die Zählung der Gesamtzellkernzahl. Der Proliferationsindex wurde in BrdU-positiven Zellen pro 50.000 Zellkerne angegeben.

2.4 Visuelle Histologische Auswertung

2.4.1 Allgemeines

Für die Auswertung wurde ein Olympus BO 71-Mikroskop mit Fotokamera und Exposure control unit verwendet.

2.4.2 Nierenmorphologie

Nach HE-Färbung (siehe 2.3.8.1) wurden die Nieren von zwei unabhängigen Auswertern ohne Kenntnis des Genotyps auf morphologische Auffälligkeit hin untersucht, insbesondere auf des Vorhandensein von Nierenzysten. Ferner wurden alle in der Schnittfläche sichtbaren Glomerula gezählt.

2.4.3 Glomerulosklerose

An PAS-gefärbten Nierenschnitten (siehe 2.3.5) wurde durch zwei unabhängige Auswerter ohne Kenntnis des Genotyps eine Beurteilung der Glomerulosklerose vorgenommen. Dazu wurde ein semiquantitativer Score benutzt [44, 46]. Der Grad der Sklerose wurde für jedes einzelne Glomerulum unterschieden von 0 bis 4 entsprechend dem Anteil der PAS-positiven Fläche innerhalb des jeweiligen Glomerulum. Die Werte des Glomerulosklerose-Scores wurden wie folgt definiert:

- 0 keine PAS-positive Fläche
- 1 bis zu 25% PAS-positive Fläche
- 2 bis zu 50% PAS-positive Fläche
- 3 bis zu 75% PAS-positive Fläche
- 4 bis zu 100% PAS-positive Fläche

Für die Auswertung wurde ein Index der Glomerulosklerose (I_{GS}) errechnet, der wie folgt bestimmt wurde:

$$I_{GS} = \frac{PAS_1 + 2 * PAS_2 + 3 * PAS_3 + 4 * PAS_4}{PAS_0 + PAS_1 + PAS_2 + PAS_3 + PAS_4}$$

Dabei ist PAS_0 die Anzahl der Glomerula mit dem Glomerulosklerosescore 0 auf einer Schnittfläche, PAS_1 die Anzahl der Glomerula mit dem Glomerulosklerosescore 1 auf einer Schnittfläche, PAS_2 die Anzahl der Glomerula mit dem Glomerulosklerosescore 2 auf einer Schnittfläche, PAS_3 die Anzahl der Glomerula mit dem Glomerulosklerosescore 3 auf einer Schnittfläche, PAS_4 die Anzahl der Glomerula mit dem Glomerulosklerosescore 4 auf einer Schnittfläche.

Der Index kann Werte von 0 (alle Glomerula weisen keine PAS-positive Fläche auf) bis 4 (alle Glomerula weisen 100% PAS-positive Fläche auf) annehmen.

2.4.4 Apoptosen

In Nierenschnitten, die nach TUNEL-Technik (siehe 2.3.7) gefärbt waren, wurde jeweils für die gesamte Fläche des Organs die absolute Anzahl der TUNEL-positiven Zellen ermittelt. Diese wurden als Apoptosen definiert.

2.4.5 Proliferation

In Nierenschnitten, die nach der BrdU-Methode (siehe 2.3.9) gefärbt waren, wurde jeweils für die gesamte Fläche des Organs die absolute Anzahl der BrdU-positiven Zellen ermittelt. Diese wurden als Zellen aufgefasst, die in der Zeit zwischen Gabe der Substanz (siehe 2.1.3) und der Tötung der Tiere BrdU in die DNA inkorporiert hatten, sich also in der Synthesephase befunden hatten. Dies wurde als Zellproliferation definiert.

2.5 Digitale Bildauswertung

2.5.1 Allgemeines

Für die digitale Bildaufnahme wurde ein Axiovert 100-Mikroskop in Kombination mit einer CCD-Kamera KP-140 (Hitachi) benutzt. Zur Bildauswertung wurde das Programm Image 1.61 (National Institute of Health) auf einem Apple PowerPC 750/100 verwendet, der mit der CCD-Kamera und einem digitalen Zeichenbrett (Wacom ArtPad II) gekoppelt war.

2.5.2 Nierenfläche

Zur Bestimmung der Fläche des Nierenschnittes wurden bei HE-gefärbten Nierenschnitten (siehe 2.3.8.1) am beschriebenen Mikroskop mit Hilfe des Programmes Image 1.61 die Flächen der Organschnitte bestimmt.

2.5.3 Glomeruläre Fläche und Zellzahl

Zur Bestimmung der glomerulären Fläche wurden bei HE-gefärbten Nierenschnitten (siehe 2.3.8.1) am beschriebenen Mikroskop Glomerula aufgesucht, mittels des Zeichenbretts und des Programmes Image 1.61 umfahren und hinsichtlich ihrer Fläche berechnet. Dann wurde durch das Programm die Anzahl der hämatoxylin-positiven Zellkerne im ausgewählten Glomerulum bestimmt. Es wurde jeweils das gesamte Organ mäanderförmig durchgemustert und alle in ihrer gesamten Zirkumferenz sichtbaren Glomerula in die Auswertung einbezogen. Die Zelldichte bezeichnet die Zahl der Zellkerne pro Fläche.

2.5.4 Zellzahl

An den nach TUNEL-Färbung bzw. im Anschluss an die BrdU-Methode mit Hämatoxylin gegengefärbten Präparaten (siehe 2.3.8.2 und 2.3.9) wurde mittels der beschriebenen Geräte und Programme die absolute Anzahl der Zellkerne bestimmt. Dazu wurden 25 repräsentative Bildausschnitte vom Programm hinsichtlich ihrer Zellkernzahl ausgewertet und die vermessene Fläche registriert. Analog zu 2.5.2 wurde die Gesamtschnittfläche bestimmt.

2.5.5 Interstitielle Fibrose

Zur Analyse des Ausmaßes der interstitiellen Matrixvermehrung in der Niere wurde nach Sirius-Red-Färbung (siehe 2.3.6) das Verhältnis von positiver (roter) Fläche, die als Bindegewebe interpretiert wurde, und gesamter interstitieller Fläche des Nierenschittes ermittelt [44, 46]. Hierbei wurde jeweils darauf geachtet, dass der Bildausschnitt keinen Rand beinhaltete und keine Glomerula aufwies. Die Gesamtfläche wurde für jede Aufnahme als Gesamtaufnahmefläche der Kamera (307.200 Pixel) definiert, die sirius-red-positive Fläche wurde als Anzahl der von der Kamera unter Grünfilter als positiv erkannten Pixel definiert. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse war es erforderlich, unter konstanten Bedingungen hinsichtlich Blende, Lichtstärke und Vergrößerung zu arbeiten. Für jedes Organ wurden 20 verschiedene Bildausschnitte vermessen und ein Mittelwert gebildet.

2.5.6 Media-Lumen-Ratio

Zur Beurteilung des Verhältnisses von Media zu Lumen von intrarenalen Arterien wurden HE-gefärbten Präparate (siehe 2.3.8.1) bei einer 400-fachen Vergrößerung am Mikroskop nach Blutgefäßen mäanderförmig durchgemustert. All jene Arterien, deren innere und äußere Zirkumferenz vollständig im histologischen Schnitt enthalten war, wurden in die Analyse einbezogen. Da es nicht zu vermeiden ist, dass die meisten Arterien im mikroskopischen Schnitt nicht orthogonal getroffen sind, wurde zur Beurteilung statt der reinen Morphologie das Verhältnis von Media- zu Lumenfläche herangezogen. Der Quotient aus Media- und Lumenfläche ist nicht abhängig vom orthogonalen oder schrägen Anschnitt eines Gefäßes. Dies ergibt sich aus dem dreidimensionalen Strahlensatz der Geometrie.

Mit der beschriebenen Mikroskop-Kamera-Kombination wurden die Arterien aufgesucht, und es wurden von ihnen digitale Bilder angefertigt, die mit dem Programm Image 1.61 und dem digitalen Zeichenbrett weiter verarbeitet wurden. Es wurden jeweils die innere und äußere Zirkumferenz der Media sowie das lichte Lumen des Gefäßes vollständig umfahren und jeweils die eingeschlossene Fläche berechnet. Während sich die Fläche des Lumens direkt ergibt, wurde die Mediafläche berechnet als Differenz der durch die äußere Zirkumferenz der Media begrenzten Fläche und der Fläche, die durch die innere Zirkumferenz der Media begrenzt ist.

Die Media-Lumen-Ratio ist dann der dimensionslose Quotient von Mediafläche und Lumenfläche.

2.6 Messung des arteriellen Blutdrucks

2.6.1 Allgemeine Anmerkungen

Bei der Messung wurden die Techniken nach Welch *et al.* und Wende *et al.* modifiziert angewendet [111, 112]. Die Messungen erfolgten ausschließlich an 23 Tage alten Ratten, da für jüngere Tiere keine ausreichend kleine Technik zur Verfügung stand.

2.6.2 Messapparatur

Zunächst wurde ein Polyethylenkatheter (ID 0,58 mm, AD 0,96 mm) mit einer Länge von ca. 15 cm über einen Teflonkatheter (ID 0,3 mm; AD 0,6 mm) geschoben. Nach Füllung mit isotoner und heparinierter Kochsalzlösung (25.000 IE Liquemin/l NaCl 0,9%) wurde der so zusammengesetzte Schlauch auf Dichtigkeit geprüft. Der Katheter wurde mit einem Transpac-Druckaufnehmer konnektiert, dessen Signal in einen Verstärker (ML 117 BP Amp) geleitet und im PowerLab/4sp digital weiterverarbeitet wurde. Das Signal wurde auf einem Notebook (Intel Celeron 400MHz) durch das Programm Chart 4.0 für Windows (ADInstruments) weiter verarbeitet. Die gemessenen Druckwerte wurden mit einer Frequenz von 100 Hz aufgezeichnet und gespeichert.

Das Programm Chart 4.0 für Windows errechnete den mittleren arteriellen Blutdruck als zyklischen Mittelwert aus der Blutdruckkurve. Der zyklische Mittelwert ist die mittlere Amplitude der Blutdruckkurve. Er lässt eine genauere Annäherung an den geometrischen Mittelwert der Kurve zu als der Wert, der sich aus der Berechnung der Summe von einem Drittel des systolischen Druckes und zwei Dritteln des diastolischen Druckes ergibt. Durch das Programm konnten auch der systolische und der diastolische Blutdruck als zyklisches Maximum bzw. Minimum der Blutdruckkurve sowie die Pulsfrequenz ermittelt werden.

2.6.3 Ablauf von Narkose und Messkatheterimplantation

Um ein Auskühlen während der Messung zu verhindern wurden die Tiere auf eine Wärmeplatte gelegt.

Die Narkose erfolgte durch die subkutane Injektion von 60 mg/kg KG Ketamin (Ketanest, Park Davis/Pfizer) und 2 mg/kg KG Xylazin (Rompun, Bayer AG).

Der Zugang erfolgte über einen Hautschnitt von ca. 1 cm Länge an der linken Halsseite lateral der *Arteria carotis sinistra*, die ebenso wie die *Vena jugularis interna sinistra* stumpf präpariert wurde. Es folgte die Mobilisation der *Arteria carotis* unter Schonung des *Nervus vagus* über ca. 5 mm, danach wurde die *Arteria carotis* mit zwei Fäden angeschlungen und distal ligiert. Darauf erfolgte die Eröffnung der Arterie im spitzen Winkel zur Gefäßachse. Der Teflonkatheter wurde mittels einer Gefäßspinzette ca. 10 mm zentral vorgeschoben und mit dem zentralen Faden, der um den in der Arterie liegenden Katheter geknotet wurde, behutsam fixiert.

Die Messungen wurden ohne weitere Narkosegaben durchgeführt. Es ergaben sich Messdauern von ca. 10 min, wobei in die Auswertung nur artefaktfreie Abschnitte von mindestens 2 min einbezogen wurden (Abb. 4).

Messung 25

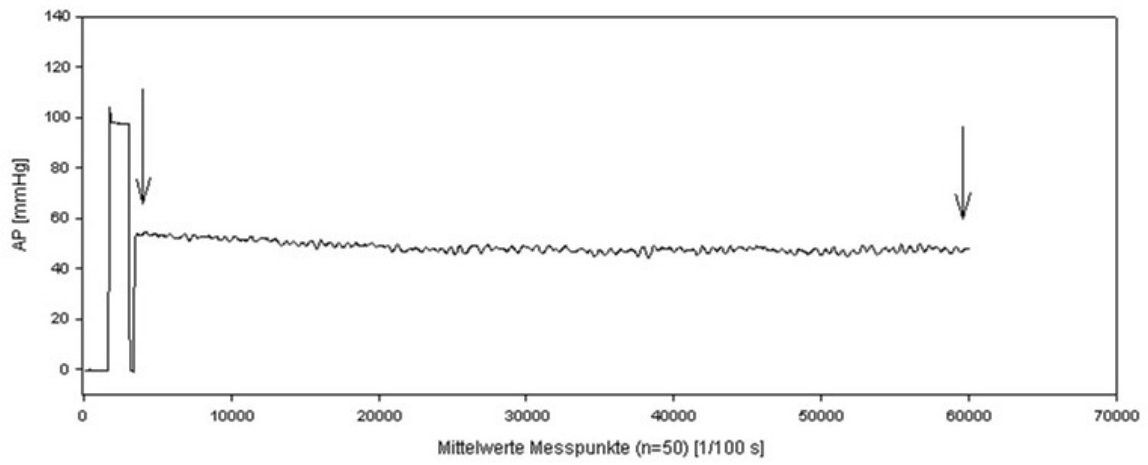


Abb. 4: Grafische Darstellung einer Blutdruckmessung. Die senkrechten Pfeile bezeichnen den in die Auswertung einbezogenen Bereich.

2.7 Berechnungen

2.7.1 Absolute Ausscheidung

Die absolute Ausscheidung eines Stoffes wurde berechnet als Produkt von Konzentration des Stoffes im Urin und Urinvolumen in 24 h.

2.7.2 Clearance

Die Clearance eines Stoffes wurde berechnet nach der Formel

$$C_x = \frac{X_u * V_u}{X_p * t}$$

wobei C_x die Clearance der Substanz X bezeichnet, X_u die Konzentration der Substanz X im Urin, V_u das Urinvolumen, X_p die Konzentration der Substanz X im Plasma und t die Sammelzeit.

2.7.3 Fraktionierte Ausscheidung

Die fraktionierte Ausscheidung eines Stoffes wurde berechnet als Quotient von Clearance des Stoffes und Kreatinin-Clearance, die hilfsweise als Näherungswert für die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) herangezogen wurde.

2.7.4 Amilorid-Response

Die Amilorid-Response ist die Veränderung der fraktionellen Natriumausscheidung unter Behandlung mit Amilorid im Vergleich zur

Behandlung mit Placebo. Sie ist in Prozent ausgedrückt und ergibt sich aus der Formel

$$R_{\text{Amilorid}} = \frac{100 * F_{\text{ENaAmilorid}}}{F_{\text{ENaNaCl}}}$$

wobei R_{Amilorid} die Amilorid-Response ist, F_{ENa} jeweils die fraktionelle Natriumausscheidung bezeichnet. Dabei bezeichnet der Index Amilorid die fraktionelle Natriumausscheidung der mit Amilorid behandelten Tiere, wogegen NaCl als Index die fraktionelle Natriumausscheidung der Tiere bezeichnet, die das Placebo erhalten haben.

2.7.5 Zelldichte

Die Zelldichte wurde definiert als Quotient von Zellkernzahl und Fläche. Gemäß 2.5.4 wurde bei den digitalen Auswertungen jeweils gleichzeitig mit der Zellkernzahl die in die Messung einbezogene Fläche registriert.

2.7.6 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl eines Organschnittes wurde definiert als das Produkt von Organschnittfläche (siehe 2.5.2 und 2.5.4) und Zelldichte (siehe 2.7.5).

2.7.7 Anzahl der Glomerula pro Fläche

Die Gesamtzahl der in einer Schnittfläche vorhandenen Glomerula (siehe 2.4.1) wurde durch die gemäß 2.5.2 ermittelte Nierenschnittfläche in mm^2

dividiert und das Ergebnis mit der Zahl 100 multipliziert. Sie ist jeweils angegeben in der Einheit Glomerula pro 100 mm².

2.7.8 Glomeruläre Zelldichte

Die glomeruläre Zelldichte wurde analog zu 2.7.5 (Zelldichte) aus den gemäß 2.5.3 (Glomeruläre Fläche und Zellzahl) bestimmten Werten ermittelt.

2.7.9 Apoptoseindex

Der Apoptoseindex wurde berechnet aus der absoluten Zahl der Apoptosen in einem Organschnitt (siehe 2.4.4) und der Gesamtzellzahl desselben (siehe 2.5.4). Er ist jeweils angegeben in der Einheit Apoptosen pro 50.000 Zellkerne.

2.7.10 Proliferationsindex

Der Proliferationsindex wurde berechnet aus der absoluten Zahl der BrdU-positiven Zellen in einem Organschnitt (siehe 2.4.5) und der Gesamtzellzahl desselben (siehe 2.7.6). Sie ist jeweils angegeben in der Einheit BrdU-positive Zellen pro 50.000 Zellkerne.

2.7.11 Relatives Organgewicht

Das Relative Organgewicht ist der Quotient aus absolutem Organgewicht und Körpergewicht.

2.8 Statistische Verfahren

Die gemessenen und errechneten Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SE) oder, wenn angegeben, \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

Die Unterschiede zwischen Gruppen wurden mit Hilfe von verbundenen oder unverbundenen t-Tests festgestellt. Die Normalverteilung wurde anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests verifiziert.

Ein Ergebnis wurde als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 5% war. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms SPSS für Windows 9.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbemerkungen

Ziel dieser Arbeit war es, einen Endothelin B-Rezeptor-defizienten Rattenstamm insbesondere hinsichtlich seiner renalen Morphologie und Funktion zu charakterisieren. Es sollte dabei nicht nur der Frage nachgegangen werden, ob sich bei Tieren, die einen funktionell inaktiven Endothelin B-Rezeptor aufweisen, im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede in der Morphologie und primären Funktion der Nieren zeigen, vielmehr wurden auch Versuchsanordnungen gewählt, mit denen Aussagen über das Blutdruckverhalten ermöglicht wurden.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurde in allen Tabellen der Genotyp der Tiere in Form von Abkürzungen dargestellt, (+/+) ist der Wildtyp, (+/sl) entspricht heterozygoten Tieren und (sl/sl) steht für homozygot ETB-defiziente Ratten.

3.2 Körpergewicht und Organgewichte

Wie unter 2.1.4 beschrieben, wurden nach der Tötung die Körpergewichte der Versuchstiere bestimmt, ebenso nach der Entnahme die der Nieren. Aus diesen wurden auch die relativen Organgewichte ermittelt (siehe 2.7.11). Für diese Untersuchung wurden die Daten der Tiere des allgemeinen Stoffwechselversuches (siehe 2.1.2.1) verwendet.

Es zeigte sich ein signifikant geringeres Körpergewicht der homozygot ETB-defizienten Tiere im Vergleich zum Wildtyp und zu heterozygoten Tieren sowie ebenfalls ein geringeres absolutes Nieren- und Herzgewicht. Keine Unterschiede waren dagegen beim relativen Nieren- und Herzgewicht zu verzeichnen (siehe Tab. 1).

	(+/+)	(+/sl)	(sl/sl)
Körpergewicht (g)	51,00±1,48	49,80±2,29	35,25±5,27
abs. Gewicht re Niere (g)	0,284±0,023	0,242±0,019	0,174±0,012 #
rel. Gewicht re Niere (%)	0,557±0,022	0,486±0,019	0,528±0,018
abs. Gewicht li. Niere (g)	0,254±0,036	0,269±0,018	0,175±0,026 #
rel. Gewicht li. Niere (%)	0,499±0,033	0,489±0,004	0,463±0,053
abs. Gewicht Herz (g)	0,262±0,041	0,266±0,025	0,192±0,037 #
rel. Gewicht Herz (%)	0,544±0,052	0,501±0,007	0,529±0,087

Tab. 1: Körpergewicht und Organgewichte. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12)
Angegeben sind die absoluten Gewichte in Gramm und die relativen Gewichte in Prozent des Gesamtkörpergewichts jeweils als Mittelwert ± Standardfehler. Die absoluten Gewichte von rechten Nieren und Herz der ETB-defizienten Tiere (sl/sl) sind signifikant geringer als die der Wildtypratten (+/+) und der heterozygoten Tiere (+/sl). [# p<0.05 vs. (+/+) und vs. (+/sl)] .

3.3 Nierenmorphologie

3.3.1 Allgemeine visuelle Auswertung

Die Nierenmorphologie der untersuchten Tiere wurde anhand verschiedener histopathologischer Verfahren, wie unter 2.4 und 2.5 beschrieben, beurteilt. In allen drei Altersgruppen wurden durch zwei unabhängige Untersucher die histologischen Schnitte im Hinblick auf unspezifische oder spezifische Auffälligkeiten beurteilt. Hierbei wurden keine morphologischen Besonderheiten in den Präparaten gefunden, insbesondere konnten an keinem Präparat Nierenzysten dargestellt werden. Abb. 5 zeigt exemplarisch jeweils eine Übersichtsaufnahme und eine Glomerulum bei einer Ratte der Wildtypgruppe und einer homozygot ETB-defizienten Ratte (Alter 22 Tage). Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und ETB-defizienten Tieren.

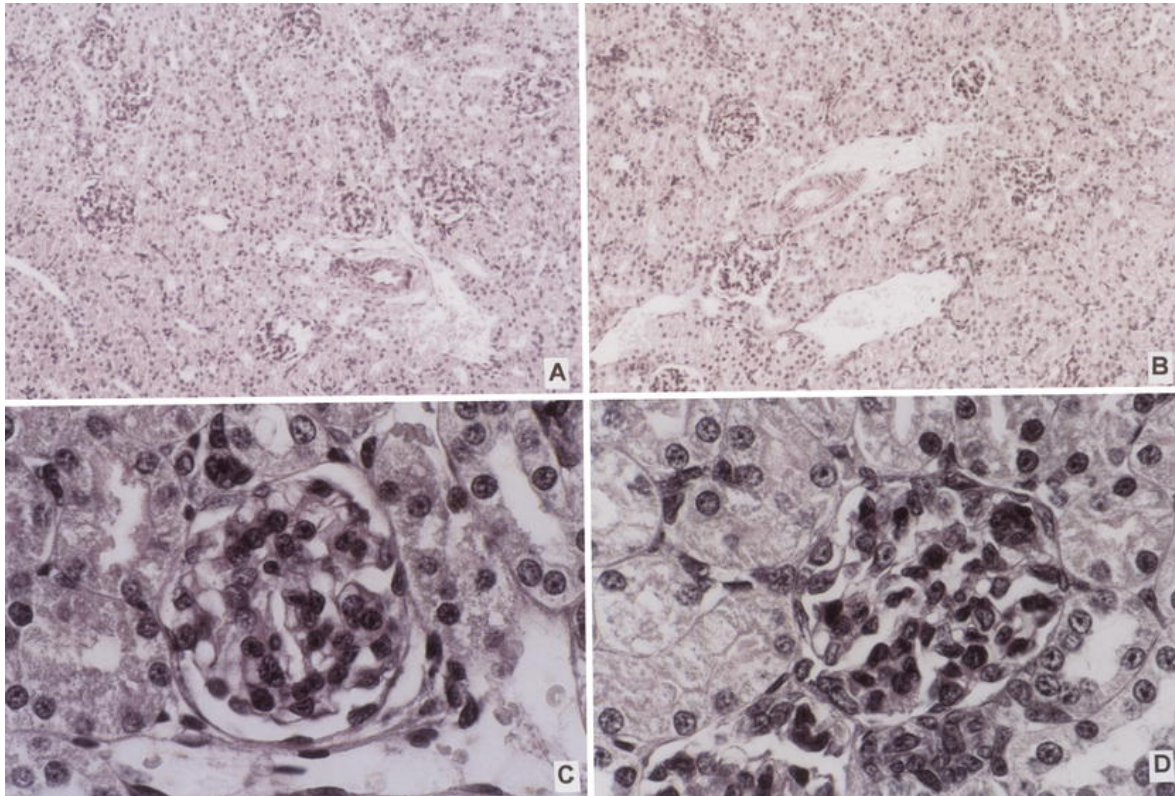


Abb. 5: Exemplarische Darstellung der Nierenmorphologie bei Wildtyp-Ratten und ETB-defizienten Tieren in PAS-Färbung (Alter 22 Tage). (A) Wildtyp, ca. 200-fach vergrößert, (B) ETB-defizient, ca 200-fach vergrößert, (C) Wildtyp, Glomerulum, ca. 100-fach vergrößert, (D) ETB-defizient, Glomerulum, ca. 100-fach vergrößert.

3.3.2 Renale Zelldichte

Die Anzahl der erkennbaren Zellkerne auf der Schnittfläche einer Niere, bezogen auf die Grundfläche des betreffenden Schnittes, wurde wie unter 2.7.5 beschrieben mit Hilfe eines rechnergestützten Bildauswertungssystems ermittelt.

Zwischen den einzelnen Genotypen bestehen hier keine Unterschiede, jedoch ist zu erkennen, dass mit zunehmendem Alter die renale Zelldichte abnimmt (siehe Tab. 2).

	(+/+)	(+/sl)	(sl/sl)
5 Tage	74011±3406	70014±4929	73454±5748
16 Tage	53594±4211	46304±6200	41991±7675
23 Tage	38002±1644	45182±3034	37462±2310

Tab. 2: Renale Zelldichte. Angegeben ist jeweils die Anzahl der Zellen pro mm² ± Standardfehler. (n=5 für alle Altersgruppen pro Genotyp)

3.3.3 Glomerulosklerose

Als Maß für eine mögliche Glomerulosklerose wurde ein semiquantitativer Score benutzt, wie unter 2.4.3 beschrieben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde wie beschrieben ein Index ermittelt.

Es zeigten sich zwischen den verschiedenen Genotypen keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 3). Erwartungsgemäß unterscheiden sich die Werte stark nach Alter, wobei mit zunehmendem Alter eine vermehrte Sklerose zu verzeichnen ist. Dies war jedoch nicht Gegenstand der Auswertung.

	(+/+)	(+/sl)	(sl/sl)
5 Tage	0,308±0,035	0,315±0,031	0,308±0,031
16 Tage	0,686±0,055	0,750±0,052	0,733±0,051
23 Tage	0,781±0,060	0,781±0,073	0,855±0,036

Tab. 3: Glomeruloskleroseindex. Angegeben ist jeweils der Glomeruloskleroseindex ± Standardfehler. (n=5 für alle Altersgruppen pro Genotyp)

3.3.4 Anzahl der Glomerula

Histologische Nierenpräparate in HE-Färbung wurden hinsichtlich der in der Schnittfläche beurteilbaren Glomerula ausgewertet, und gemäß 2.7.7 wurde die Anzahl der Glomerula pro 100 mm² Nierenschnittfläche ermittelt.

Es zeigten sich zwischen den verschiedenen Genotypen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 6).

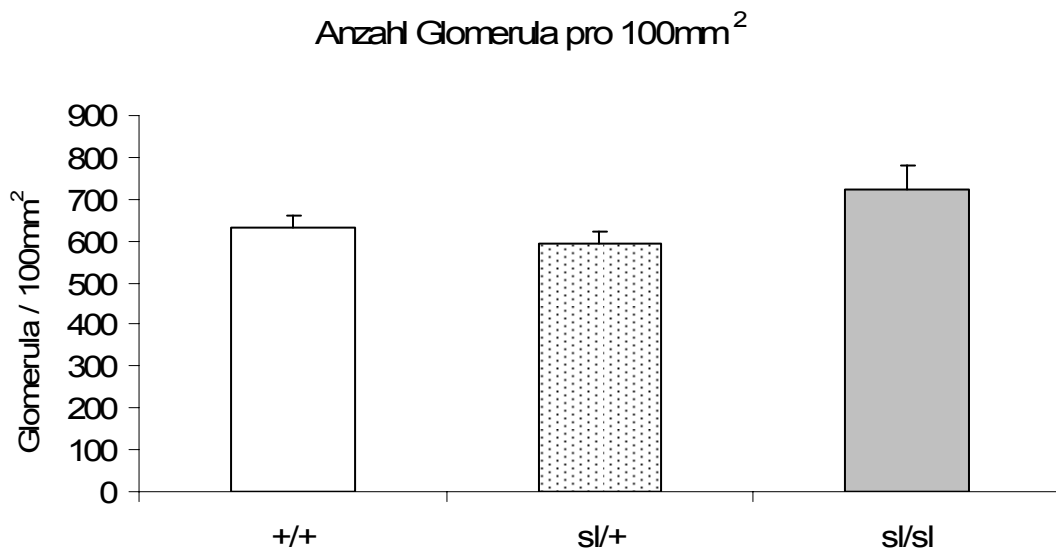


Abb. 6: Anzahl der Glomerula pro 100 mm² Schnittfläche \pm Standardfehler bei 23 Tage alten Ratten (jeweils n=5). Zwischen den Genotypen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.3.5 Glomeruläre Fläche

Histologische Nierenpräparate in HE-Färbung wurden wie unter 2.5.3 beschrieben mit einem rechnergestützten Bildverarbeitungsprogramm ausgewertet und es wurde die mittlere Fläche der beurteilbaren Glomerula bestimmt.

Es zeigten sich zwischen den verschiedenen Genotypen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7).

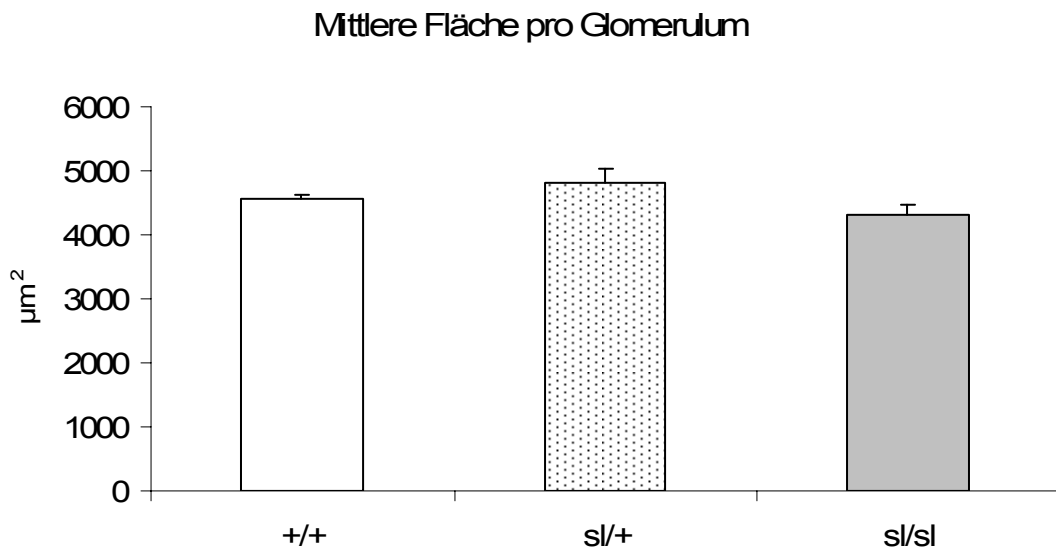


Abb. 7: Mittlere Fläche pro Glomerulum bei 23 Tage alten Ratten (jeweils n=5). Angaben in $\mu\text{m}^2 \pm$ Standardfehler. Zwischen den Genotypen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.3.6 Glomeruläre Zelldichte

Histologische Nierenpräparate in HE-Färbung wurden wie unter 2.5.3 beschrieben mit einem rechnergestützten Bildverarbeitungsprogramm ausgewertet, und es wurde die Zelldichte, hier definiert als die mittlere Anzahl von Zellkernen pro $5.000 \mu\text{m}^2$ glomerulärer Fläche, bestimmt.

Es zeigten sich zwischen den verschiedenen Genotypen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 8).

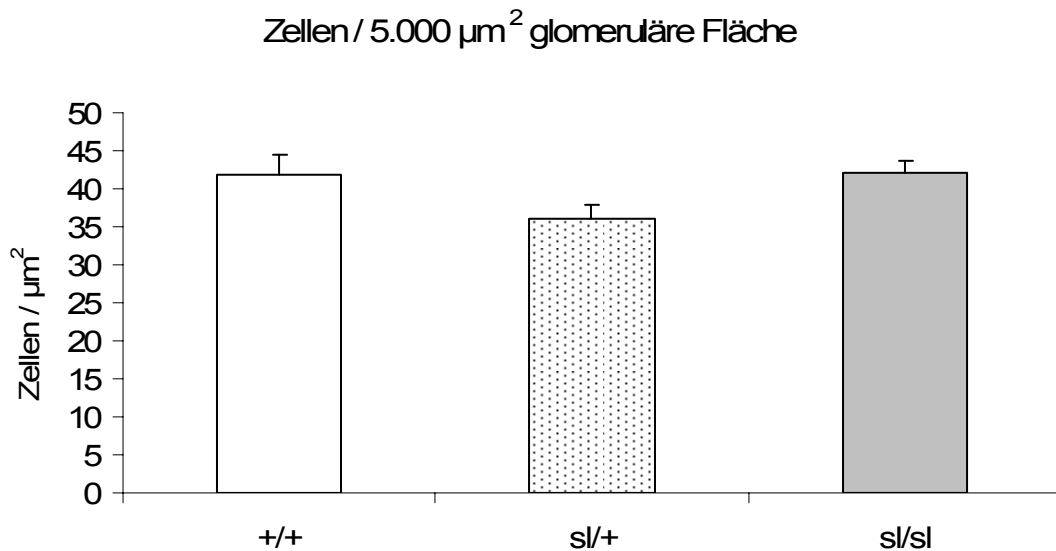


Abb. 8: Mittlere Anzahl von Zellkernen pro $5.000 \mu\text{m}^2$ glomerulärer Fläche \pm Standardfehler bei 23 Tage alten Ratten (jeweils $n=5$). Zwischen den Genotypen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.3.7 Apoptoseindex

Histologische Nierenpräparate wurden nach der TUNEL-Methode gefärbt (siehe 2.3.7), und gemäß 2.4.4 wurde die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen auf dem histologischen Schnitt ermittelt. TUNEL-positive Zellkerne wurden als in Apoptose befindliche Zellen definiert. Wie unter 2.7.9 beschrieben, wurde aus diesen und der im selben Schnitt insgesamt vorhandenen Zellkernzahl der Apoptoseindex als Anzahl der in Apoptose befindlichen Zellen pro 50.000 Zellkernen definiert.

Zwischen den verschiedenen Genotypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 4). Es ist zu bemerken, dass der Apoptoseindex mit zunehmendem Alter sinkt.

	(+/+)	(+/sl)	(sl/sl)
5 Tage	1,55±0,23	1,66±0,22	1,91±0,25
16 Tage	0,64±0,09	0,73±0,16	0,70±0,09
23 Tage	0,57±0,09	0,71±0,19	0,56±0,09

Tab. 4: Renaler Apoptoseindex. Angegeben in Apoptosen pro 50.000 Zellkernen ± Standardfehler (n=5 für alle Altersgruppen pro Genotyp). Zwischen den Genotypen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.3.8 Renaler Proliferationsindex

Die Versuchstiere erhielten, wie unter 2.1.3 beschrieben, 22 Stunden vor der Tötung eine BrdU-Lösung injiziert, wodurch eine Markierung von Zellen erfolgte, die in der Zeit zwischen Gabe der Substanz und Tötung des Tieres die teilweise oder vollständig Synthesephase durchlaufen haben. (Zur Methodik siehe auch 2.3.9.) Die gewonnenen histologischen Nierenschnitte wurden, wie ebendort beschrieben, gefärbt, und die Zahl der BrdU-positiven Zellen wurde gemäß 2.4.5 ermittelt. Wie unter 2.7.10 erläutert, wurde aus diesen und der im selben Schnitt insgesamt vorhandenen Zellkernzahl der Proliferationsindex als Anzahl der BrdU-positiven Zellen pro 50.000 Zellkerne berechnet.

Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 9).

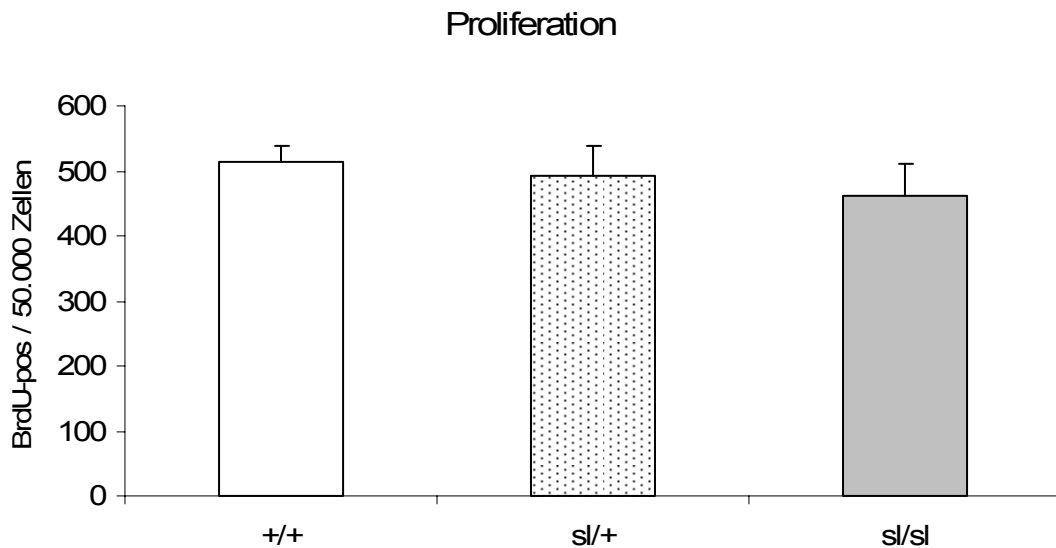


Abb. 9: Renaler Proliferationsindex. BrdU-positive Zellen pro 50.000 Zellkerne \pm Standardfehler bei 23 Tage alten Ratten (jeweils n=5). Zwischen den Genotypen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.3.9 Renale interstielle Fibrose

Gemäß dem unter 2.5.5 beschriebenen Vorgehens wurde an Sirius-red-gefärbten Nierenpräparaten mittels eines rechnergestützten Verfahrens der Anteil der Sirius-red-positiven Fläche ermittelt. Diese wurde als Bindegewebe interpretiert.

Beim Vergleich der Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 10).

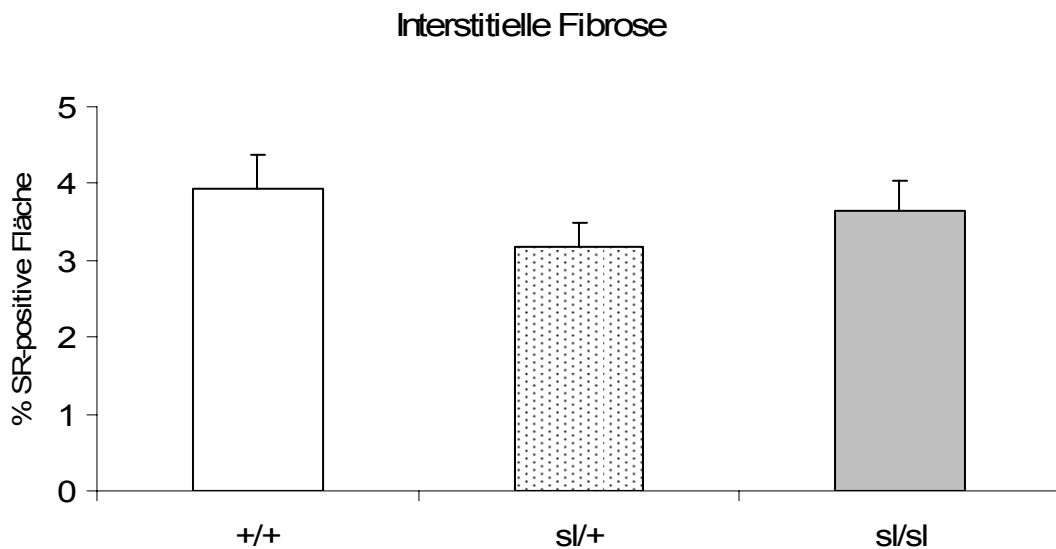
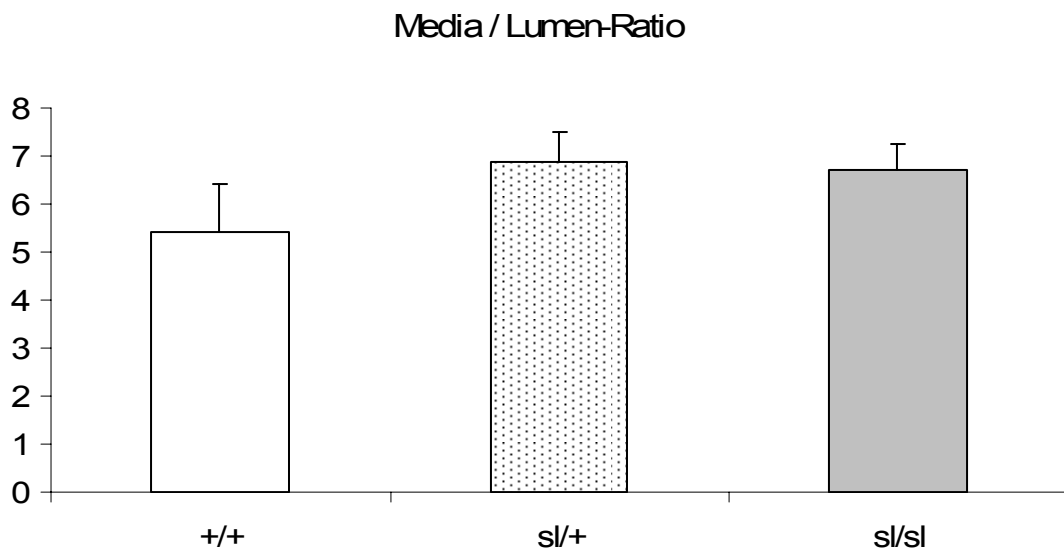


Abb. 10: Renale interstitielle Fibrose. Angegeben ist jeweils der Anteil der Sirius-red-positiven Fläche in Prozent \pm Standardfehler als Ausdruck des interstitiellen Bindegewebes (23 Tage alte Ratten, jeweils $n=5$). Zwischen den Genotypen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.3.10 Media-Lumen-Ratio

Wie unter 2.5.6 beschrieben, wurde an HE-gefärbten Nierenpräparaten mittels eines digitalen Bildauswertungssystems das Verhältnis von Media zu Lumen von intrarenalen Arterien bestimmt. Eine erhöhte Media-Lumen-Ratio bedeutet eine größere Gefäßwanddicke. Die Media-Lumen-Ratio ist dimensionslos.

Beim Vergleich der Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen (siehe Abb. 11).



**Abb. 11: Renale Media-Lumen-Ratio \pm Standardfehler. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=5)
Zwischen den Genotypen bestehen keine signifikanten Unterschiede.**

3.4 Blutdruckmessung

Nach den unter 2.6.2 beschriebenen Vorbereitungen wurden die Messungen wie unter 2.6.3 erläutert durchgeführt.

Es konnten nur Tiere in die Untersuchung einbezogen werden, die aus der Altersgruppe der 23 Tage alten Ratten stammten, da für jüngere Tiere keine ausreichend kleine Messapparatur zur Verfügung stand.

Der mittlere arterielle Blutdruck war bei den Tieren, die für die Endothelin-B-Rezeptor-Defizienz homozygot waren, signifikant höher als bei den heterozygoten und Wildtyp-Ratten der Vergleichsgruppen (siehe Abb. 12).

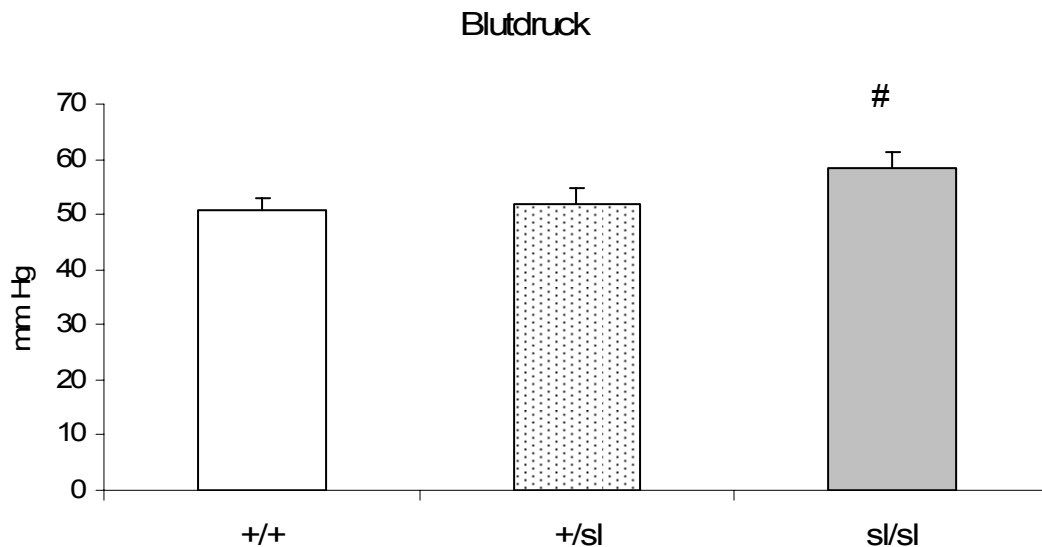


Abb. 12: Mittlerer arterieller Blutdruck bei 23 Tage alten Ratten. (Jeweils n=8) Angaben in mm Hg \pm Standardfehler. Die homozygot ETB-defizienten Tiere weisen einen signifikant höheren Blutdruck auf als die Vergleichstiere der Wildtypgruppe und als die heterozygoten Ratten. [# p<0,05 vs. (+/+) und vs. (+/sl)]

3.5 Physiologische Daten und Nierenfunktion

3.5.1 Allgemeine Stoffwechseluntersuchungen

Die Versuchstiere aller Genotypen wurden unter den unter 2.1.2.1 beschriebenen Bedingungen gehalten, um Daten insbesondere zur Nierenfunktion zu gewinnen. Es wurden nur Tiere der 23 Tage alten Gruppe verwendet. Aus den gewonnenen Urin- und Plasmaproben wurden Daten zur Nierenfunktion und allgemeinen Stoffwechsellage der Tiere ermittelt (siehe auch 2.1.6.).

3.5.1.1 Trinkmenge und Urinvolumen

Alle Ratten hatten während des Stoffwechselversuchs freien Zugang zu Wasser, nicht aber zu Futter. Am Ende des Versuchs wurde das von jeder Ratte getrunkene Volumen bestimmt.

Die Tiere der Wildtypgruppe tranken absolut die größte Menge Wasser während des Versuchs über 24 Stunden, jedoch bestand zu den heterozygoten Tieren kein signifikanter Unterschied. Die für den Defekt homozygoten Ratten tranken signifikant weniger Wasser als die beiden anderen Gruppen (siehe Abb. 13).

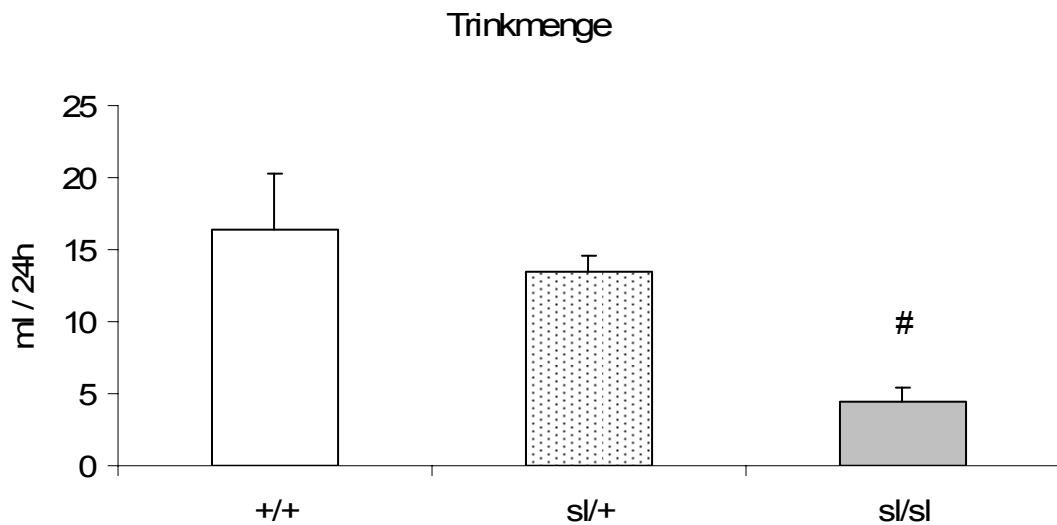


Abb. 13: Absolute Trinkmenge. Angegeben in ml / 24h \pm Standardfehler. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Die homozygot ETB-defizienten Tiere tranken signifikant weniger als die beiden andere Gruppen. [# $p < 0,001$ vs. (+/+) und $p < 0,05$ vs. (+/sl)]

Entsprechend konnte auch hinsichtlich der ausgeschiedenen Urinmenge festgestellt werden, dass die Tiere, die homozygot für die ETB-Defizienz waren, signifikant weniger Urin ausschieden als die Wildtypmatten und als die heterozygoten Tiere. Zum Ausschluss körperrgewichtabhängiger Artefakte wurde das gesammelte Urinvolumen auf das Gewicht des Einzeltieres bezogen verglichen (siehe Abb. 14).

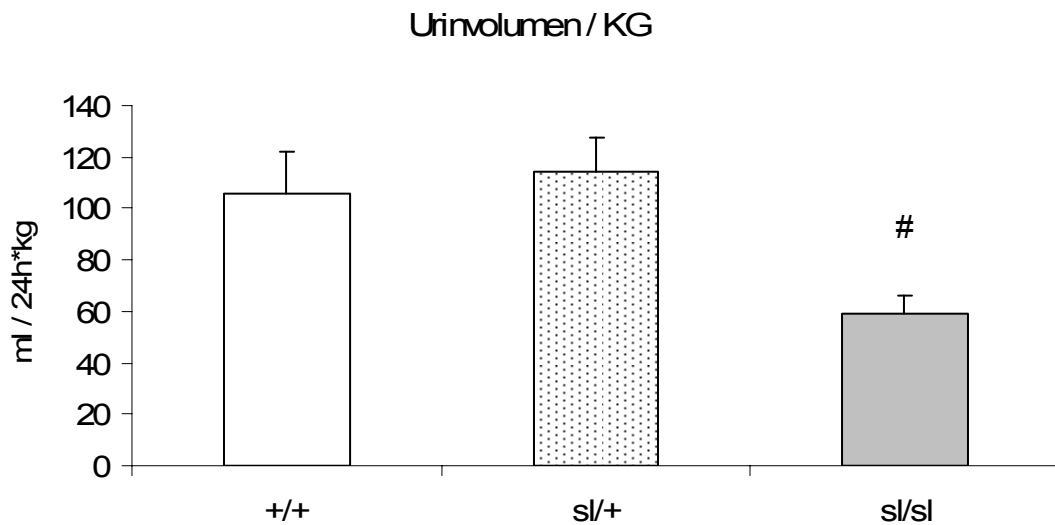


Abb. 14: Urinvolumen in 24h bezogen auf das Körpergewicht. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Angegeben in ml / (24h*kg) ± Standardfehler. Die homozygot ETB-defizienten Tiere schieden signifikant weniger Urin aus als beide andere Gruppen. [# p<0,05 vs. (+/+) und p<0,05 vs. (+/sl)]

3.5.1.2 Serumparameter

Aus dem nach dem Stoffwechselversuch gewonnenen Blut wurden wie vorherbeschrieben (vgl. 2.1.4) Serumproben gewonnen, die im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin, Campus Mitte, nach Standardverfahren analysiert wurden.

Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zeigten sich hinsichtlich der Parameter Natrium, Kalium, Chlorid, Osmolarität, Gesamtprotein, Kreatinin, ALT, AST und CK keinerlei signifikante Unterschiede. Die Tiere, die homozygot für die ETB-Defizienz waren, wiesen allerdings ein signifikant erniedrigtes CRP auf. Auffällig war insbesondere der signifikant erhöhte Harnstoff im Serum der ETB-defizienten Ratten.

Es ist anzunehmen, dass die insgesamt relativ niedrigen CRP-Werte gegen eine aktuelle Infektion sprechen. Dies ist mit dem äußeren Erscheinungsbild der Tiere und dem Fehlen anderer Infektionszeichen (vgl. 2.1.1) gut vereinbar.

Die einzelnen aus dem Serum ermittelten Werte sind in Tab. 5 zusammengefasst.

	(+/+)	(+/sl)	(sl/sl)
Natrium [mmol/l]	136,8±1,8	133,1±1,9	134,3±4,0
Kalium [mmol/l]	5,3±0,09	5,4±0,11	5,5±0,10
Chlorid [mmol/l]	95,1±1,5	93,1±1,2	94,6±3,2
Osmolarität [mosmol/kg]	330±8	345±10	357±24
Gesamtprotein [g/l]	4,71±0,12	4,64±0,10	4,92±0,21
Kreatinin [mg/dl]	0,14±0,01	0,15±0,00	0,17±0,02
Harnstoff [mg/dl]	46,0±6,75	42,5±5,98	99,5±25,5 ‡
ALT [IU/l]	31,4±5,7	32,4±1,0	42,8±8,8
AST [IU/l]	119,4±21,8	98,1±7,6	174,0±20,0
CK [IU/l]	2602±573	1740±204	1650±385
CRP [mg/dl]	3,75±0,12	3,73±0,16	2,24±0,50 #

Tab. 5: Serumparameter. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Die gemessenen Werte zeigen weitgehend keine Unterschiede zwischen den Gruppen, jedoch ist das CRP bei den homozygot ETB-defizienten Tieren signifikant niedriger als bei den beiden anderen Gruppen, der Harnstoff ist bei den ETB-defizienten Tieren signifikant erhöht. Werte ± Standardfehler. [# p<0,05 vs. (+/+) und p<0,01 vs. (+/sl), ‡ p<0,05 vs. (+/+) und vs. (+/sl)]

3.5.1.3 Urinparameter und berechnete Größen

Die durch den Stoffwechselfersuch gewonnenen Urinproben wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin, Campus Mitte, nach Standardverfahren analysiert.

Da aufgrund der unterschiedlichen Urinmengen (vgl. 3.5.1.1) eine Vergleichbarkeit unter Umständen problematisch erscheint, wurde, soweit möglich, bezüglich der im Urin enthaltenen Stoffe jeweils die absolute Gesamtausscheidung während des Stoffwechselfersuchs angegeben. Zur Methodik der Berechnungen von absoluter und fraktioneller Ausscheidung sowie zur Clearance und zu entsprechenden Definitionen sei auf das Kapitel 2.7 verwiesen.

Im Gegensatz dazu wurden die Osmolarität und der pH-Wert des ausgeschiedenen Urins nicht in Relation zum Ausscheidungsvolumen, sondern als reine Messwerte beurteilt. Die Aussagen zum pH-Wert wurden zusätzlich auch anhand der H^+ -Ionenkonzentration im Urin überprüft, wobei sich kein Unterschiede im Signifikanzniveau ergaben.

Auf einzelne besonders herauszuhebende Parameter sei im Folgenden besonders eingegangen.

3.5.1.3.1 Endogene Kreatinin-Clearance

Die endogene Kreatinin-Clearance als Anhalt für die glomeruläre Filtrationsrate war bei den ETB-defizienten Tieren sowohl absolut (siehe Tab. 6 unter 3.5.1.3.7) als auch auf das Körpergewicht bezogen signifikant herabgesetzt (Abb. 15), wobei die absolute endogene Kreatinin-Clearance um ca. 71% im Vergleich zum Wildtyp reduziert war, die auf das Körpergewicht bezogene um ca. 61%.

Zwischen den heterozygoten Tieren und dem Wildtyp ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

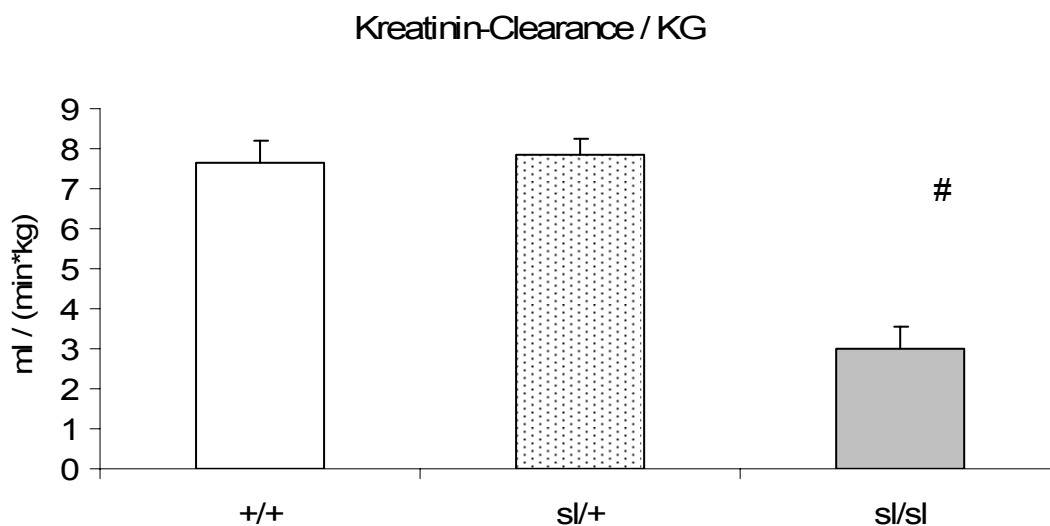


Abb. 15: Endogene Kreatinin-Clearance pro Kilogramm Körpergewicht. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Angaben in ml / (min*kg) \pm Standardfehler. Homozygot ETB-defiziente Tiere (sl/sl) weisen eine hochsignifikant geringere Kreatinin-Clearance im Vergleich zum Wildtyp (+/+) und zu Tieren auf, die für den Defekt heterozygot sind (+/sl). [# p<0,001 vs. (+/+) und vs. (+/sl)]

3.5.1.3.2 Natriumausscheidung

Die Natriumausscheidung war bei den homozygot ETB-defizienten Tieren sowohl absolut pro Tag als auch ausgedrückt als fraktionale Natriumausscheidung in Prozent der endogenen Kreatinin-Clearance hochsignifikant herabgesetzt.

Betrachtet man die absolute Natriumausscheidung, so ergibt sich für die für den Defekt homozygoten Tiere im Vergleich zum Wildtyp ein um nahezu 97% reduzierter Wert, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und heterozygoten Ratten (siehe Abb. 16).

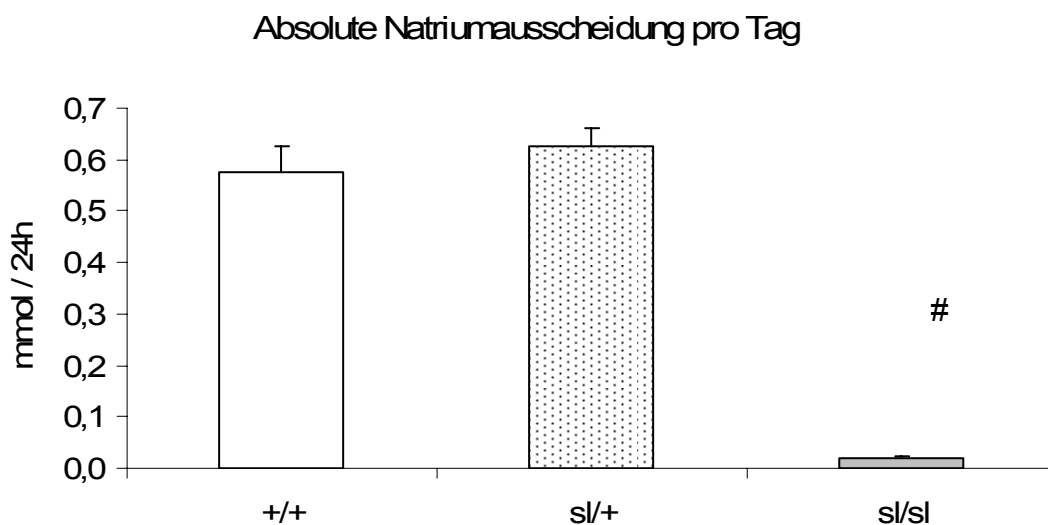


Abb. 16: Absolute Natriumausscheidung. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Angaben in mmol/24h \pm Standardfehler. Homozygot ETB-defiziente Tiere (sl/sl) weisen eine hochsignifikant geringere absolute Natriumausscheidung im Vergleich zum Wildtyp (+/+) und zu Tieren auf, die für den Defekt heterozygot sind (+/sl). [# p<0,001 vs. (+/+) und p<0,001 vs. (+/sl)]

Es ist angesichts der signifikant verschiedenen Parameter hinsichtlich der endogenen Kreatinin-Clearance, die als Näherungswert der GFR verwendet wurde, unumgänglich, die Natriumausscheidung auch als fraktionierte Natriumausscheidung in Relation zur endogenen Kreatinin-Clearance zu setzen.

Auch hier zeigten sich hochsignifikant erniedrigte Werte für die Gruppe der homozygot ETB-defizienten Ratten gegenüber den heterozygoten und Wildtyp-Vergleichstieren (siehe Abb. 17). Die homozygot ETB-defizienten Tiere wiesen eine ca. 84% geringere fraktionale Natriumausscheidung als die Wildtyp-Ratten auf. Kein signifikanter Unterschied bestand auch hier zwischen den Wildtyp-Tieren und den für den Defekt heterozygoten Ratten.

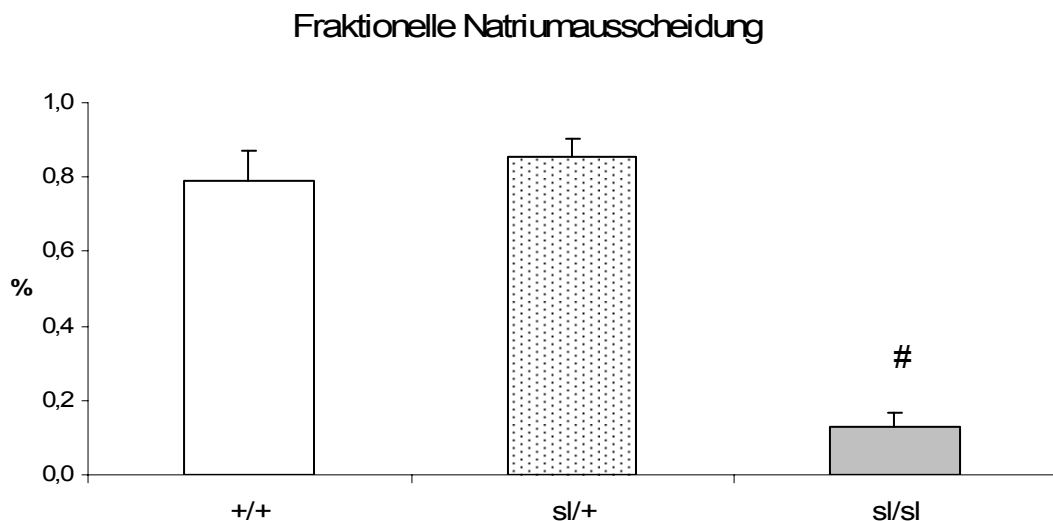


Abb. 17: Fraktionale Natriumausscheidung. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Homozygot ETB-defiziente Tiere (sl/sl) weisen eine hochsignifikant geringere fraktionale Natriumausscheidung im Vergleich zum Wildtyp (+/+) und zu Tieren auf, die für den Defekt heterozygot sind (+/sl). Die Angaben sind in Prozent der endogenen Kreatinin-Clearance \pm Standardfehler dargestellt. [# p<0,001 vs. (+/+) und vs. (+/sl)]

3.5.1.3.3 Kaliumausscheidung

Die absolute Kaliumausscheidung der homozygot ETB-defizienten Tiere pro Tag war gegenüber dem Wildtyp und den für den Defekt heterozygoten Tieren signifikant erniedrigt.

Betrachtet man jedoch angesichts der unter 3.5.1.3.2 angeführten Problematik die fraktionelle Kaliumausscheidung, so zeigen sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr (siehe Abb. 18).

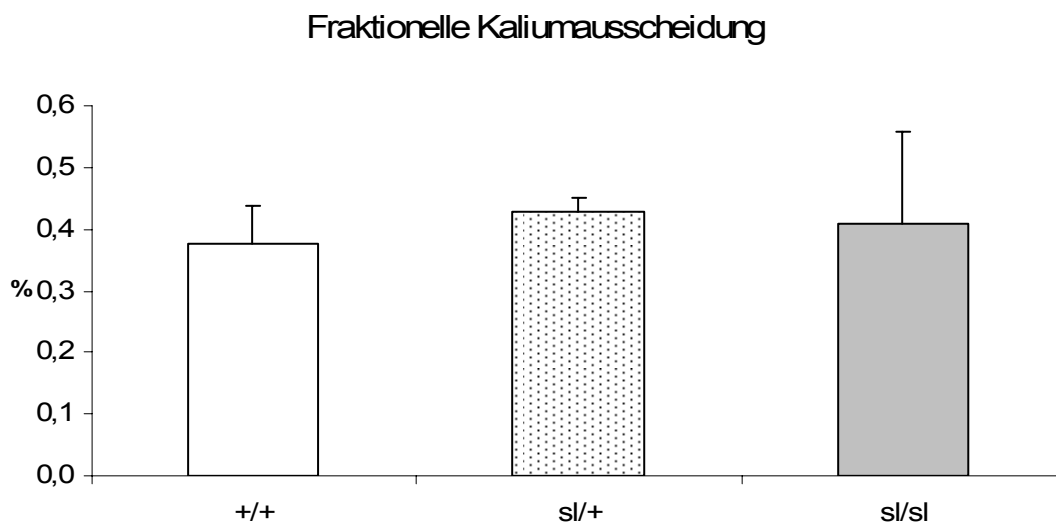


Abb. 18: Fraktionelle Kaliumausscheidung. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12)
Zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Die Angaben sind in Prozent der endogenen Kreatinin-Clearance \pm Standardfehler dargestellt.

3.5.1.3.4 Kalziumausscheidung

Die absolute Kalziumausscheidung pro Tag zeigte zwischen den untersuchten Tieren der drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Eine Bestimmung der fraktionellen Kalziumausscheidung konnte nicht durchgeführt werden, da die für die Blutentnahmen verwendeten Probenbehälter Kalzium-EDTA enthielten und somit keine Daten für die Serumkonzentration des Elements vorliegen.

3.5.1.3.5 Osmolarität und Hydratation

In allen Gruppen war die Osmolarität des Urins vergleichbar (siehe Abb. 19). Angesichts der ebenfalls statistisch nicht unterschiedlichen und für Nagetiere im Normbereich liegenden Serum-Osmolarität (vgl. Tab. 5) kann darauf geschlossen werden, dass alle Ratten, die des Wildtyps und sowohl die für die ETB-Defizienz heterozygoten als auch die homozygoten Tiere, keinen unterschiedlichen Hydratationsstatus aufwiesen und insbesondere nicht dehydriert waren.

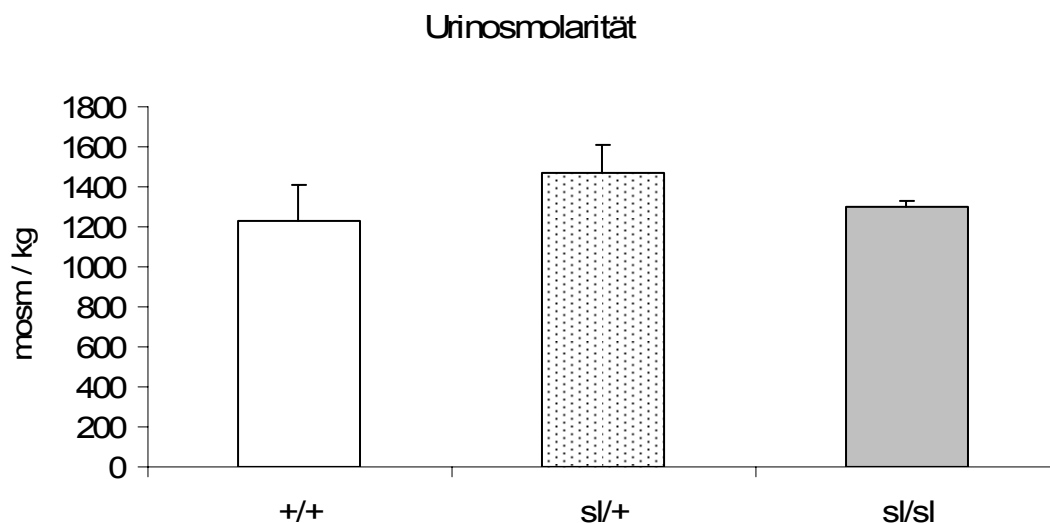


Abb. 19: Urinosmolarität. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Angaben in mosm/kg \pm Standardfehler. Zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.5.1.3.6 Urin pH-Wert

Die pH-Werte des Urins, der während des Stoffwechselfersuchs gesammelt wurde, waren in der Gruppe der ETB-defizienten Tiere hochsignifikant geringer als in beiden anderen Gruppen (siehe Abb. 20). Die Signifikanz wurde unter Ausschaltung der Logarithmizität der pH-Skala anhand der sich ergebenden H^+ -Ionenkonzentrationen ebenfalls überprüft, wobei sich kein Unterschied in den Signifikanzniveaus ergab.

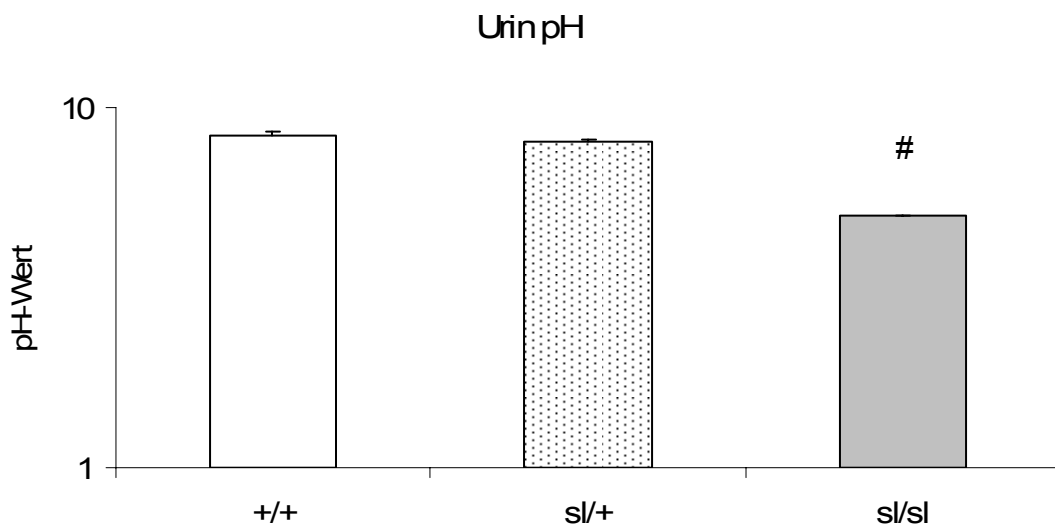


Abb. 20: Urin-pH-Werte. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Die ETB-defizienten Ratten weisen im Vergleich zu Wildtyp- und heterozygoten Ratten einen hochsignifikant erniedrigten Urin-pH-Wert auf. Angegeben ist der pH-Wert \pm Standardfehler, logarithmische Skala. [# $p < 0,001$ vs. (+/+) und vs. (+/sl)]

3.5.1.3.7 Weitere Parameter

Es wurden im Rahmen des Stoffwechselfersuchs weitere Parameter erhoben bzw. aus diesen berechnet. Im Folgenden sind diese zusammengefasst (Tab. 6). Auffällig ist die hochsignifikant erniedrigte absolute Kaliumausscheidung. Betrachtet man jedoch die fraktionelle Kaliumausscheidung, lässt sich kein Unterschied mehr finden. Angesichts der wesentlich veränderten endogenen Kreatinin-Clearance (vgl. 3.5.1.3.2) wird die reduzierte absolute Kaliumausscheidung an dieser Stelle vernachlässigt. Die absolute Chloridausscheidung ist bei den homozygot ETB-defizienten Ratten ebenfalls hochsignifikant geringer als bei beiden anderen Gruppen, bei der fraktionellen Chloridausscheidung findet sich ein signifikanter Unterschied aber nur noch zwischen den für den Defekt heterozygoten und homozygoten Tieren. Die Proteinausscheidung der heterozygot ETB-defizienten Ratten ist signifikant geringer als die der Wildtypgruppe.

Auf die hochsignifikant geringere endogene Kreatinin-Clearance ist bereits an anderer Stelle eingegangen worden (siehe 3.5.1.3.1).

	(+/+)	(+/sl)	(sl/sl)
endogene Kreatinin-Clearance [ml/min]	0,39±0,02	0,39±0,03	0,11±0,04 #
Kaliumausscheidung/24h [mmol/24 h]	1,12±0,13	1,29±0,07	0,26±0,07 #
Fraktionelle Kaliumausscheidung [%]	37,7±13,5	42,9±6,8	40,9±29,9
Kalziumausscheidung/24h [mmol/24 h]	0,0120±0,005	0,0155±0,002	0,0131±0,004
Chloridausscheidung/24h [mmol/24h]	0,73±0,10	0,86±0,07	0,10±0,03 #
Fraktionelle Chloridausscheidung [%]	0,0146±0,0024	0,0170±0,001	0,0089±0,004 §
Proteinausscheidung/24h [mg/24h]	1,31±0,41	0,36±0,30 ‡	0,50±0,45

Tab. 6: Zusammenfassung der weiteren relevanten Parameter des allgemeinen Stoffwechselforschungsversuchs. (23 Tage alte Ratten, jeweils n=9-12) Die endogene Kreatinin-Clearance, die absolute Kalium- und absolute Chloridausscheidung sind bei homozygot ETB-defizienten Ratten im Vergleich zu Wildtyp und heterozygoten Vergleichstieren hochsignifikant reduziert. Die fraktionelle Chloridausscheidung ist bei den homozygoten Tieren signifikant geringer als bei den für den Defekt heterozygoten. Die Proteinausscheidung der heterozygot ETB-defizienten ist signifikant geringer als die der Wildtypiere. Werte ± Standardfehler. [# p<0,001 vs. (+/+) und vs. (+/sl), § p<0,05 vs. (+/sl), ‡ p<0,05 vs. (+/+)]

3.5.2 Amilorid-Intervention

3.5.2.1 Vorbemerkungen

Aus den Daten zur Nierenmorphologie (siehe 3.3), den Ergebnissen des allgemeinen Stoffwechselversuchs (3.5.1), der Blutdruckmessung (3.4) und den nicht unterschiedlichen Körper- und Organgewichten (3.2) konnte geschlossen werden, dass zwischen den Tieren des Wildtyps und den für die ETB-Defizienz heterozygoten Tieren keine wesentlichen Unterschiede bestehen. Dieser Versuchsteil wurde darum auf den Vergleich von Wildtyp und homozygot ETB-defizienten Tieren beschränkt.

Die Untersuchungen wurden an 22 Tage alten Ratten durchgeführt (vgl. auch 2.1.2.2).

Zur besseren Lesbarkeit der grafischen und tabellarischen Darstellungen wurde auch im Folgenden für Wildtyptiere die Bezeichnung (+/+) verwendet, für homozygot ETB-defiziente Tiere die Bezeichnung (sl/sl). Tiere, die das Placebo erhalten haben, tragen die Zusatzbezeichnung „NaCl“, Tiere, die Amilorid erhalten haben, sind mit „Amilorid“ gekennzeichnet.

3.5.2.2 Körpergewichtsveränderung

Alle Tiere nahmen während des Amilorid-Interventions-Versuchs über sechs Stunden ab. Da die Tiere unterschiedlichen Genotyps verschiedene Ausgangsgewichte zu Beginn des Versuchs aufwiesen (vgl. 3.2), wurde die relative Veränderung der Körpergewichte in Prozent zum Ausgangsgewicht verglichen.

Es zeigten sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

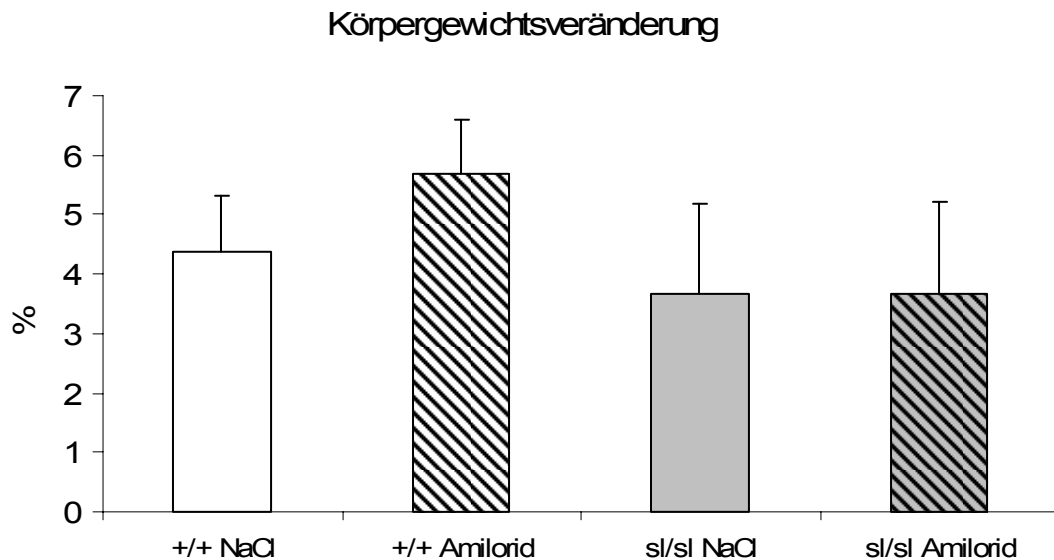


Abb. 21: Körpergewichtsveränderung während des Amilorid-Versuchs. (22 Tage alte Ratten, jeweils n=7-9) Angaben in Prozent Gewichtsverlust zum Ausgangsgewicht vor Einsetzen in den Stoffwechselkäfig. Zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardfehler dar.

3.5.2.3 Trinkmenge und Urinvolumen

Alle Ratten hatten während des Amiloridversuchs freien Zugang zu Wasser, nicht aber zu Futter. Am Ende des Versuchs wurde das von jeder Ratte getrunkene Volumen bestimmt.

Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede im Volumen des im Versuchsverlauf getrunkenen Wassers. Allerdings sind die Volumina über sechs Stunden im Rahmen der Messungengenauigkeit (siehe 2.1.6) möglicherweise zu gering, um hier eine tragfähige Aussage zu treffen.

	+/+ NaCl	+/+ Amilorid	sl/sl NaCl	sl/sl Amilorid
Trinkmenge [ml]	1,34±0,27	0,96±0,15	1,19±0,26	1,00±0,29

Tab. 7: Absolute Trinkmenge. Angaben in ml ± Standardfehler. Zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede. (22 Tage alte Ratten, 6h Sammeldauer, jeweils n=7-9)

Entsprechend konnte auch hinsichtlich der ausgeschiedenen Urinmenge innerhalb der sechs Stunden Versuchsdauer kein Unterschied zwischen den mit Placebo behandelten Wildtyptieren und den Tieren, die homozygot für die ETB-Defizienz waren, festgestellt werden. Erwartungsgemäß schieden die mit Amilorid behandelten Tiere jeweils signifikant mehr Urin aus als die jeweils mit Placebo behandelten Vergleichstiere. Zur Vergleichbarkeit mit 3.5.1.1 ist das

Urinvolumen im Folgenden in ml pro kg Körpergewicht und 24 h angegeben (siehe Abb. 22).

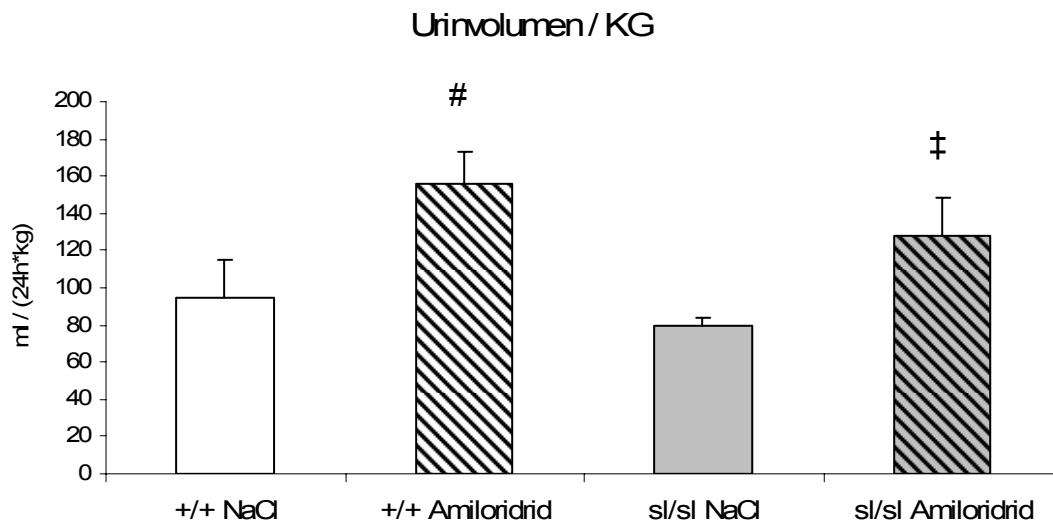


Abb. 22: Urinvolumen bezogen auf das Körpergewicht berechnet auf 24h. (22 Tage alte Ratten, jeweils n=7-9) Angegeben in ml / (24h*kg) ± Sandardfehler. Die Tiere, die Amilorid erhalten haben, scheiden jeweils signifikant mehr Urin aus als die mit Placebo behandelten Vergleichstiere. [# p<0,05 vs. (+/+)NaCl, ‡ p<0,05 vs. (sl/sl)NaCl]

3.5.2.4 Serumparameter

Auch aus dem nach der Amilorid-Intervention gewonnenen Blut wurden wie vorher beschrieben (vgl. 2.1.4) Serumproben gewonnen, die im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Berlin, Campus Mitte, nach Standardverfahren analysiert wurden.

Es zeigten sich vor allem amiloridabhängige Unterschiede zwischen den mit Placebo bzw. Amilorid behandelten Tieren gleichen Genotyps. Hierbei ist insbesondere die natriuretische Wirkung des Wirkstoffs deutlich an einer Reduktion des Serum-Natriums erkennbar.

Die einzelnen aus dem Serum ermittelten Werte sind in Tab. 8 zusammengefasst.

	+/+	+/+	sl/sl	sl/sl
	NaCl	Amilorid	NaCl	Amilorid
Natrium [mmol/l]	141,3±1,1	136,4±0,6 ##	141,7±2,4	137,7±2,4
Kalium [mmol/l]	4,95±0,34	5,85±0,13 #	5,37±0,31	6,68±0,30 ¥
Chlorid [mmol/l]	109,5±1,7	106,2±1,1	112,2±2,3	108,3±2,2
Osmolarität [mosmol/kg]	297,7±2,7	293,4±1,5	304,0±2,3	294,5±0,9 ‡‡
Gesamtprotein [g/l]	4,55±0,11	5,03±0,13 #	4,66±0,07	4,81±0,19
Kreatinin [mg/dl]	0,13±0,01	0,14±0,01	0,14±0,01	0,16±0,01

Tab. 8: Serumparameter. (22 Tage alte Ratten, 6h Sammeldauer, jeweils n=7-9) Werte ± Standardfehler. [# p<0,05 vs. (+/+)NaCl, ## p<0,01 vs. (+/+)NaCl, ‡‡ p<0,01 vs. (sl/sl)NaCl, ¥ p<0,05 vs. (+/+)Amilorid und vs. (sl/sl)NaCl]

3.5.2.5 Urinparameter und berechnete Größen

3.5.2.5.1 Endogene Kreatinin-Clearance

Die endogene Kreatinin-Clearance der Tiere wurde durch die Gabe des Pharmakons nicht beeinflusst. Weder bei den Wildtyptieren noch bei den homozygot ETB-defizienten Ratten bestanden zwischen behandelten und unbehandelten Tieren signifikante Unterschiede, wohl aber zwischen den gleichbehandelten Tieren verschiedenen Genotyps (siehe Tab. 9).

	+/+ NaCl	+/+ Amilorid	sl/sl NaCl	sl/sl Amilorid
endogene Kreatinin-Clearance [ml/min]	0,379±0,033	0,358±0,043	0,232±0,032 #	0,207±0,027 ‡
endogene Kreatinin-Clearance pro kg KG [ml / (min*kg)]	7,15±0,81	7,03±0,68	5,60±0,45 ##	5,51±0,78 ‡‡

Tab. 9: Endogene Kreatinin-Clearance. Oben absolut, unten pro Kilogramm Körpergewicht. Werte ± Standardfehler. (22 Tage alte Ratten, jeweils n=7-9) Es bestehen keine Unterschiede zwischen mit Verum oder Placebo behandelten Tieren gleichen Genotyps, wohl aber zwischen Tieren unterschiedlichen Genotyps, die die gleiche Behandlung erhalten haben. [#p<0,05 vs. (+/+)NaCl, ‡ p<0,05 vs. (+/+)Amilorid, ## p<0,01 vs. (+/+)NaCl, ‡‡ p<0,01 vs. (+/+)Amilorid]

3.5.2.5.2 Natriumausscheidung

Der deutlichste Effekt der Gabe von Amilorid konnte im Hinblick auf die Natriumausscheidung festgestellt werden. In beiden Gruppen wurde die absolute Natriumausscheidung durch die Gabe des Pharmakons wie erwartet deutlich gesteigert (siehe Abb. 23). Wie auch entsprechend bereits unter 3.5.1.3.2 beschriebenen, bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Tieren des Wildtyps und den homozygot ETB-defizienten Ratten, die jeweils die gleiche Behandlung erhalten haben. Es ist erkennbar, dass zwischen den mit dem Placebo behandelten Wildtypratten und den homozygot ETB-defizienten Tieren kein signifikanter Unterschied besteht. Die Werte sind wiederum auf 24 Stunden ausgedrückt.

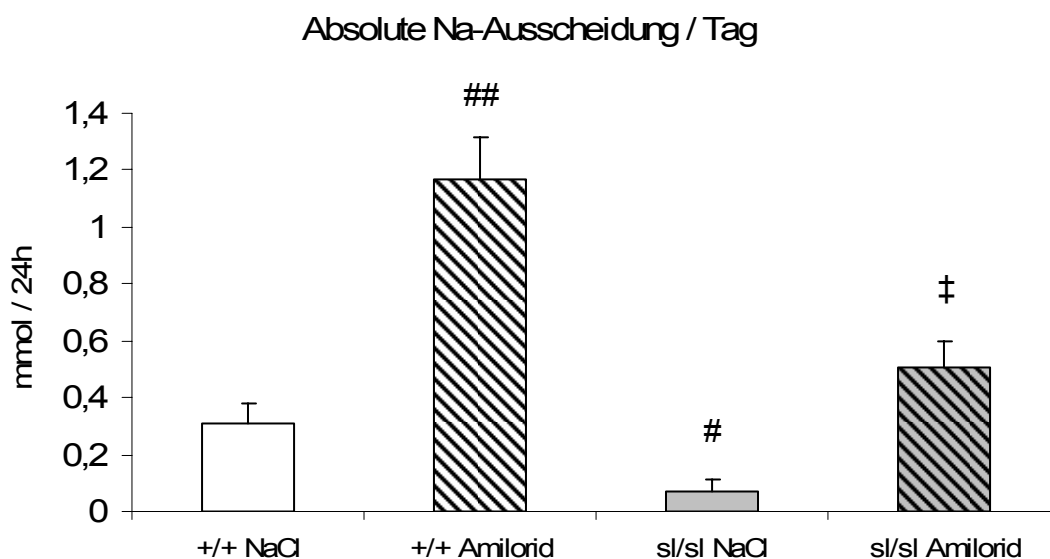


Abb. 23: Absolute Natriumausscheidung. Angaben in mmol/24h \pm Standardfehler. (22 Tage alte Ratten, jeweils n=7-9) Jeweils hochsignifikante erhöhte Werte bei den Tieren, die Amilorid erhalten haben, im Vergleich zu den Tieren, die das Placebo erhielten. Sehr signifikante Unterschiede bestehen jeweils auch zwischen Wildtyp und homozygot ETB-defizienten Tieren. [# p<0,01 vs. (+/+)NaCl, ## p<0,001 vs. (+/+)NaCl, ‡ p<0,001 vs. (sl/sl)NaCl]

Auch aus den Daten des Amilorid-Interventions-Versuchs wurde für die untersuchten Gruppen die fraktionelle Natriumausscheidung errechnet. Es bestätigte sich der Unterschied bei den mit dem Placebo behandelten Tieren der beiden untersuchten Genotypen. Insbesondere auffällig ist jedoch, dass zwischen den mit Placebo behandelten Tieren der Wildtypgruppe und den ETB-defizienten Ratten, die Amilorid erhalten haben, kein signifikanter Unterschied besteht (siehe Abb. 24).

Es kann vermutet werden, dass Amilorid bei den ETB-defizienten Tieren in der Lage ist, die Nierenfunktion hinsichtlich der fraktionellen Natriumausscheidung zu normalisieren.

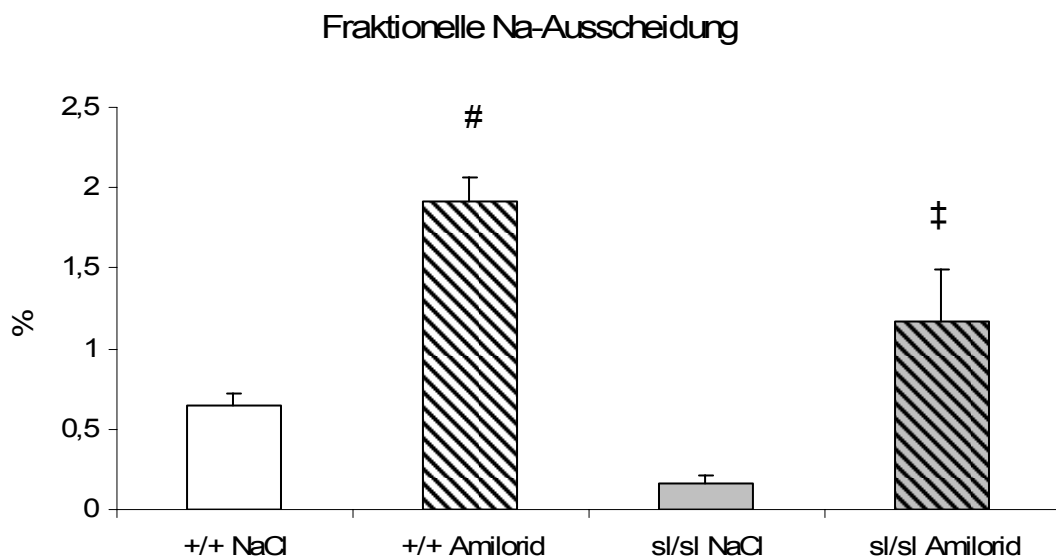


Abb. 24: Fraktionelle Natriumausscheidung. (22 Tage alte Ratten, jeweils n=7-9) Die Angaben sind in Prozent der endogenen Kreatinin-Clearance dargestellt. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm Standardfehler dar. Jeweils ein deutlicher Anstieg der fraktionellen Natriumausscheidung auf Amilorid. Die mit Placebo behandelten Tiere des Wildtyps und die mit Amilorid behandelten homozygot ETB-defizient zeigen keinen signifikanten Unterschied untereinander. [# $p < 0,001$ vs. (+/+)NaCl, ‡ $p < 0,01$ (sl/sl)NaCl]

Es muss weiterhin gefragt werden, wie die Reaktion der beiden verglichenen Genotypen auf Amilorid zu bewerten ist. Zu diesem Zweck wurde für beide Gruppen die Amilorid-Response entsprechend 2.7.4 ermittelt.

Die homozygot ETB-defizienten Tiere wiesen eine wesentlich stärkere Amilorid-Response als die Tiere des Wildtyps auf (siehe Abb. 25).

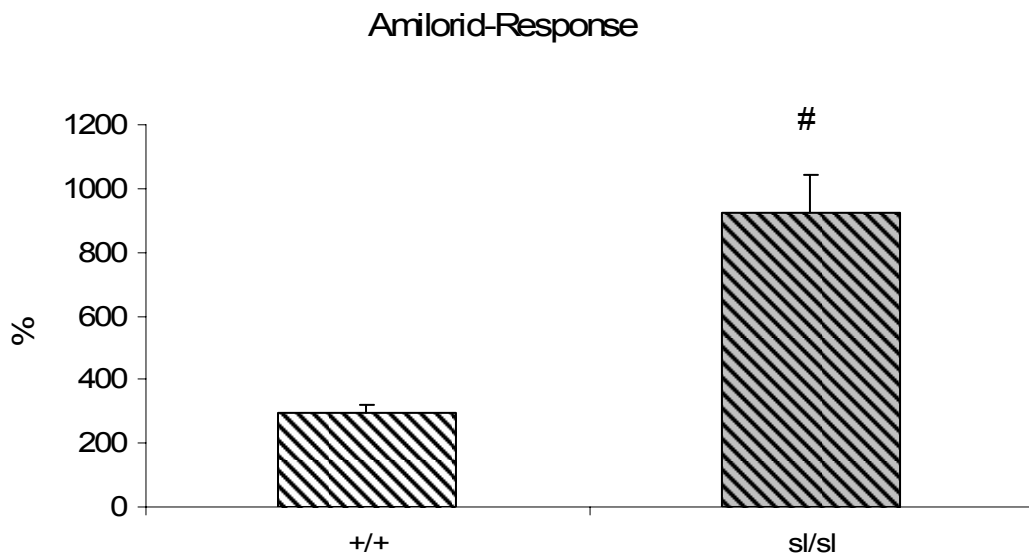


Abb. 25: Amilorid-Response. (22 Tage alte Ratten, jeweils n=7-9) Angegeben ist der Anstieg der fraktionellen Natriumausscheidung der mit Amilorid behandelten Tiere in Prozent \pm Standardfehler im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren. Die Amilorid-Response ist bei den ETB-defizienten Tieren hochsignifikant größer als bei den Tieren des Wildtyps. [# p<0,001 vs. (+/+)]

3.5.2.5.3 Osmolarität und Hydratation

In allen Gruppen war die Osmolarität des Urins vergleichbar (siehe Abb. 26). Tendenziell lag die Osmolarität des Urins der Tiere, die Amilorid erhalten hatten, unter dem der mit Placebo behandelten Vergleichstiere, ohne jedoch statistische Signifikanz zu zeigen.

Betrachtet man die Serum-Osmolarität der einzelnen Gruppen des Amilorid-Interventions-Versuchs (siehe Tab. 8), kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die Tiere einen ausgeglichenen Hydratationsstatus aufwiesen und insbesondere auch die mit Amilorid behandelten Ratten nicht dehydriert waren.

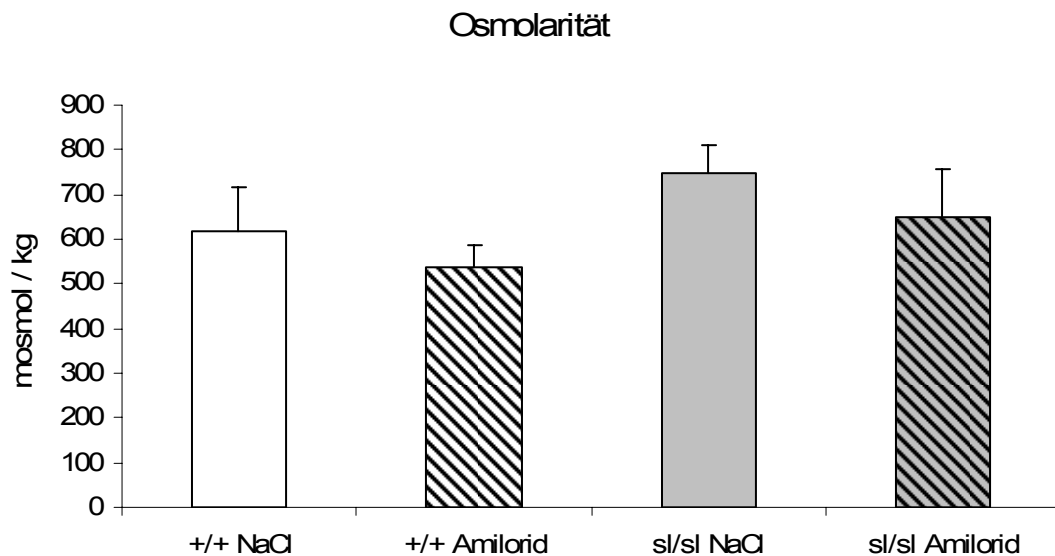


Abb. 26: Urinosmolarität. (22 Tage alte Ratten, jeweils n=7-9) Mittelwerte \pm Standardfehler. Zwischen den Gruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die beschriebene Deletion im Endothelin-B-Rezeptor-Gen, die einen funktionell inaktiven Endothelin-B-Rezeptor zur Folge hat, bei für den Defekt homozygoten Tieren zu einer wesentlich verringerten fraktionellen Natriumausscheidung und einer verringerten endogenen Kreatinin-Clearance als Ausdruck einer verringerten glomerulären Filtrationsrate sowie zu einem erhöhten Blutdruck führt.

Es wurden mit den benutzten Techniken keine morphologischen Veränderungen, die durch den Defekt bedingt waren, festgestellt, wohl aber Veränderungen der Nierenfunktion.

Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch die Gabe von Amilorid insbesondere die Normalisierung der fraktionellen Natriumausscheidung erreicht wird. Es liegt die Vermutung nahe, dass hierbei die Wirkung des Pharmakons auf den epithelialen Natriumkanal entscheidend ist. Insofern kann indirekt geschlossen werden, dass die wesentliche Beeinflussung der fraktionellen Natriumausscheidung in diesem Modell in einer veränderten Regulation des epithelialen Natriumkanals durch den ETB-Rezeptor besteht.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass diejenigen Ratten, die für den untersuchten Defekt heterozygot waren, keine signifikanten Unterschiede zu Wildtyptieren aufweisen.

4.1 Endogene Kreatinin-Clearance und glomeruläre Filtrationsrate

Die Arbeit konnte zeigen, dass ETB-defiziente Ratten bereits frühzeitig eine wesentlich verringerte endogene Kreatinin-Clearance aufweisen. Diese wird dabei als leicht messbarer Näherungswert der glomerulären Filtrationsrate angesehen. Es muss aber beachtet werden, dass die endogene Kreatinin-

Clearance bei Nagetieren nur begrenzt als Ausdruck der GFR angesehen werden darf, da gezeigt werden konnte, dass bei *Rodentiae* auch eine tubuläre Kreatinin-Sekretion erfolgt [6]. Insbesondere bei einer eingeschränkten GFR könnte dies zu wesentlichen Verzerrungen führen, jedoch dahingehend, dass die berechnete GFR überschätzt wird, nicht jedoch unterschätzt. Ferner wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass zumindest die exogene Kreatinin-Clearance bei Ratten auch bei Nephropathien ein verlässliches Maß der GFR darstellt [120]. In den beschriebenen Untersuchungen konnte eine verringerte endogene Kreatinin-Clearance bei homozygot ETB-defizienten Ratten dargestellt werden. Wenn eine Beeinflussung durch eine tubuläre Kreatinin-Sekretion gegeben war, wurde das Ausmaß der GFR-Reduktion eher unterschätzt. Die endogene Kreatinin-Clearance kann also für diese Arbeit durchaus als Parameter zur Beurteilung der GFR verwendet werden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte kein Anhalt dafür gefunden werden, dass die verringerte GFR bei den für den Defekt homozygoten Tieren Ausdruck einer morphologischen Veränderung der Nieren ist. Insbesondere ergab sich weder für vermehrte Glomerulosklerose noch für eine interstitielle Fibrose ein Anhalt (siehe 3.3.3 und 3.3.9), wie es zum Beispiel auch bei einer entzündlichen Nierenerkrankung der Fall gewesen wäre. Es gab auch keine die Veränderungen erklärenden Unterschiede hinsichtlich Zelldichte und Apoptoserate (siehe 3.3.2, 3.3.6 und 3.3.7), auch die Morphologie der untersuchten intrarenalen Gefäße zeigte keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen (siehe 3.3.10).

Es muss also davon ausgegangen werden, dass die Reduktion der GFR auf funktionelle Veränderungen zurückzuführen ist, die durch die ETB-Defizienz bedingt sind.

Vorhergehende Untersuchungen konnten zeigen, dass der ETB-Rezeptor über eine Gs-Protein-vermittelte intrazelluläre Kalziumfreisetzung die Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) steigert [10, 47]. Ebenfalls konnte *in vivo* gezeigt werden, dass an der Regulation des renalen Blutflusses (RBF) und der GFR auch Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt ist, dessen Synthese ET-1-induziert über den ETB-Rezeptor vermittelt wird [19, 22, 33, 34, 74, 119].

Conrad *et al.* konnten 1999 darstellen, dass die Blockade des renalen ETB-Rezeptors den cGMP-Gehalt in kleinen Arterien der Niere wesentlich absenkt, was den Zusammenhang zwischen dem ETB-Rezeptor, der NO-Synthese, dem renalen Blutfluss und der GFR stützt [22].

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit und den vorliegenden Untersuchungen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass sich die reduzierte GFR bei den homozygot ETB-defizienten Ratten möglicherweise aus dem Fehlen der ETB-abhängigen NO-Freisetzung ergibt.

4.2 Natriumausscheidung

Das auffälligste Ergebnis der dargestellten Untersuchungen ist die wesentlich reduzierte Natriumausscheidung im Urin der homozygot ETB-defizienten Tiere. Hierbei muss diskutiert werden, ob diese auf die beschriebene Reduktion der GFR zurückzuführen ist. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nicht nur die absolute, sondern auch die fraktionelle Natriumausscheidung wesentlich reduziert ist. Betrachtet man darüber hinaus die unveränderte fraktionelle Kalium- und Kalziumausscheidung, so ist eine verminderte GFR als alleinige Ursache der reduzierten Natriumausscheidung im Urin abzulehnen. Desweiteren muss eine mögliche Aldosteron-Dysregulation in die Überlegungen einbezogen werden, da Aldosteron eines der wesentlichen Hormone ist, die die renale Natriumausscheidung am lebenden Tier kontrollieren. Jedoch erscheint auch ein Hyperaldosteronismus bei den für den Defekt homozygoten Ratten als Ursache insofern unwahrscheinlich, als bekannt ist, dass die Aldosteron-Sekretion aus Zellen der Zona glomerulosa ETB-vermittelt durch ET-1 stimuliert wird [89, 90]. Es wäre daher eher eine verminderte als eine erhöhte Aldosteron-Freisetzung bei den homozygot ETB-defizienten Tieren zu erwarten. Auch die im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren unveränderte fraktionelle Kaliumausscheidung spricht gegen Aldosteron als wesentliche Ursache der erniedrigten renalen Natriumausscheidung.

Es muss vielmehr angenommen werden, dass der ETB-Rezeptor selbst eine wesentliche Rolle im Natriumhaushalt der Nieren spielt.

Bisherige Untersuchungen, die sich mit der Auswirkung von Endothelin auf den renalen Natriumhaushalt bezogen, lieferten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse [107]. Zum einen wurde gezeigt, dass in hohen Dosen intravenös gegebenes ET-1 sowohl den Blutdruck erhöht als auch die renale Natriumausscheidung verringert. Jedoch kann dies am ehesten auf die ET-1-bedingt verringerte GFR und den reduzierten renalen Blutfluss zurückgeführt werden [36, 107]. Andererseits liegen aber auch Studien vor, die über natriuretische Effekte in Modellen berichten, in denen Endothelin-Infusionen den Blutdruck nicht beeinflusst haben [18, 68, 95], wobei diese erhöhte renale Natriumausscheidung auf einen ETB-vermittelten Effekt zurückgeführt wird [18].

Es muss bei der Beurteilung der genannten Arbeiten berücksichtigt werden, dass die intravenöse Gabe von Endothelin keineswegs den natürlichen Vorgängen *in vivo* entspricht, da Endothelin in der Niere vor allem parakrin sezerniert wird und in äußerst geringen Konzentrationen wirkt (vergleiche dazu 1.2.1). In Patch-clamp-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ET-1 bereits in picomolaren Konzentrationen über eine Bindung an den ETB-Rezeptor die Aktivität des epithelialen Natriumkanals hemmt, wohingegen unphysiologisch hohe, nanomolare ET-1-Konzentrationen, vermutlich ETA-vermittelt, den epithelialen Natriumkanal zu stimulieren vermögen [29].

In der vorliegenden Arbeit ist die Wirkung des Endothelinsystems der Niere *in vivo* betrachtet worden. Es konnte gezeigt werden, dass die homozygot ETB-defizienten Ratten eine wesentlich stärkere Zunahme der fraktionellen Natriumausscheidung nach Gabe von Amilorid aufweisen als die Tiere des Wildtyps. Insbesondere bestand zwischen den mit Amilorid behandelten, für den Defekt homozygoten Tieren und den mit Placebo behandelten Tieren des Wildtyps kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der fraktionellen Natriumausscheidung. Amilorid ist ein Pyrazin-Wirkstoff, der den Natriumkanal epithelialer Zellen, den epithelialen oder auch Amilorid-sensitiven Natriumkanal, spezifisch hemmt [37]. Es erscheint darum am ehesten wahrscheinlich, dass die Ursache der verminderten fraktionellen Natriumausscheidung in einer

fehlenden Hemmung des epithelialen Natriumkanals durch den ETB-Rezeptor zu suchen ist (Abb. 27).

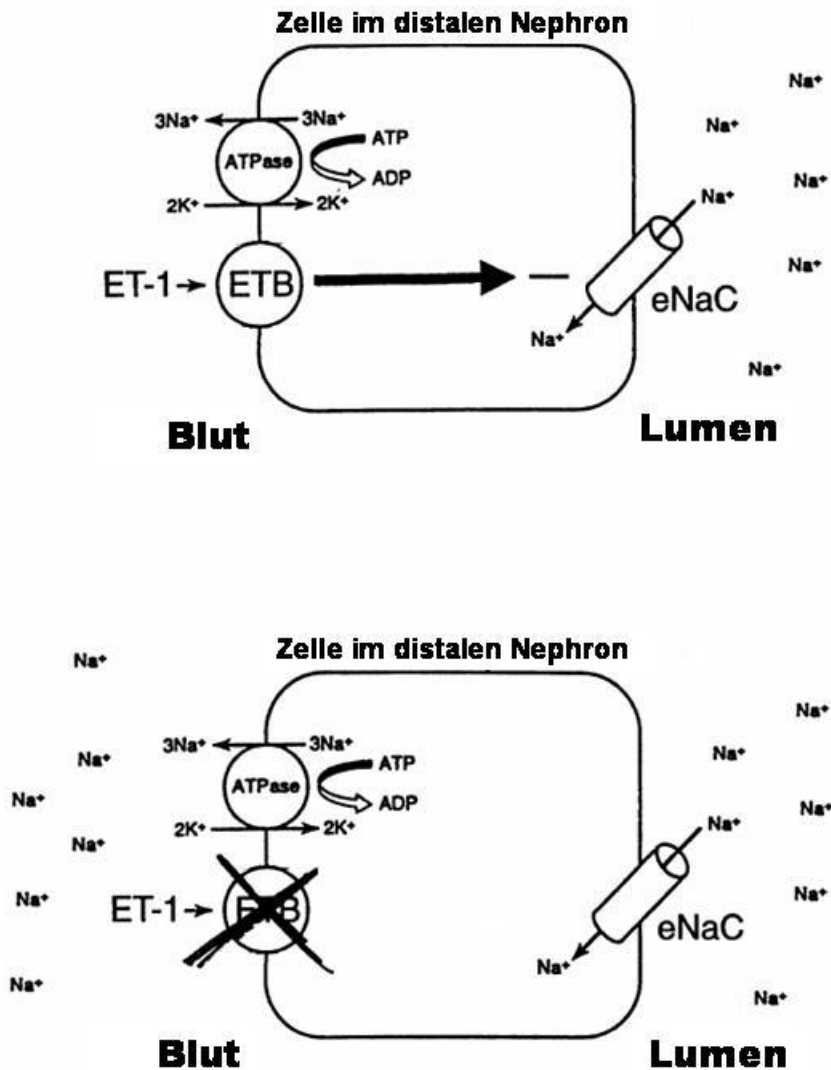


Abb. 27: In Zellen im distalen Nephron hemmt ET-1 in picomolaren Konzentrationen, vermittelt durch den ETB-Rezeptor, die Aktivität des epithelialen Natriumkanals (eNaC). Es kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass die reduzierte fraktionelle Natriumausscheidung der homozygot ETB-defizienten Tiere auf die fehlende Hemmung des epithelialen Natriumkanals durch den ETB-Rezeptor zurückzuführen ist.

Dabei ist anzumerken, dass der genaue molekulare Pathway, durch den der ETB-Rezeptor den epithelialen Natriumkanal hemmt, bisher nicht geklärt wurde. Jedoch ist bereits gezeigt worden, dass durch die Aktivierung des ETB-Rezeptors die Vasopressin-abhängige cAMP-Anreicherung gehemmt wird [35, 60, 87, 113, 114]. Die Insertion der Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals in die apikale Zellmembran wird durch cAMP induziert, wodurch die Anzahl der funktionell aktiven Kanäle zunimmt [12]. Es liegt nahe, dass hier der molekulare Weg vom ETB-Rezeptor zum epithelialen Natriumkanal liegen könnte, doch ist dies bisher nicht ausdrücklich bewiesen worden.

In der Betrachtung der verminderten Natriumausscheidung der homozygot ETB-defizienten Ratten muss die Frage gestellt werden, wie es möglich ist, dass die Tiere sich offensichtlich nicht in der Natriumhomöostase befinden. Im Allgemeinen gilt die Regel, dass in einem Tier stets die Natriumeinfuhr gleich der Ausfuhr ist, wobei dies über einen gewissen Zeitraum zu betrachten ist. Bei Ratten wird dieser Ausgleich in aller Regel bereits innerhalb von Stunden erreicht [77]. Im Gegensatz dazu konnte jedoch gezeigt werden, dass die Natriumbilanz bei schnell wachsenden Jungtieren, um die es sich bei den Untersuchten gehandelt hat, positiv ist [38]. Ferner muss angenommen werden, dass das Absetzen vom Muttertier und Einsetzen in einen Stoffwechsellkäfig trotz freien Zugangs zu Futter und Wasser keiner äquivalenten Situation entspricht. Auch ist der Natriumeintrag durch die Milch des Mutterstiers in den Tagen vor den durchgeführten Stoffwechseluntersuchungen unbekannt.

Wünschenswert wären Untersuchungen an älteren Tieren, die zuvor einige Tage an die Versuchsbedingungen angepasst werden und bei denen von einer tatsächlichen Natriumhomöostase auszugehen ist. Dies war mit den für die vorgelegten Untersuchungen verwendeten Tieren nicht möglich, da sie nach Absetzen vom Muttertier aufgrund ihres intestinalen Phänotyps innerhalb weniger Tage versterben (siehe 1.2.4).

Diese Erkrankung des Darms, die dem Morbus Hirschsprung beim Menschen entspricht, trägt weiterhin dazu bei, die Natriumbilanz insgesamt

schlecht einschätzen zu können. Zum Beispiel konnten Natriumverluste und –resorption über den Darm nicht erfasst werden.

Nach Abschluss der der vorgelegten Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen ist es einer Arbeitsgruppe um Gariepy *et al.* gelungen, ein transgenes Rattenmodell zu etablieren, indem Dopamin-Hydroxylase(DBH)-ETB-transgene Tiere mit heterozygoten Tieren des auch in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Rattenstammes verpaart wurden [31]. Die homozygot ETB-defizienten, jedoch auch DBH-ETB-transgenen Tiere prägen keinen intestinalen Phänotyp aus und sind insofern für weitere Untersuchungen besser geeignet. Leider ist an diesen Tieren keine entsprechende Stoffwechseluntersuchung erfolgt, die mit den vorgelegten Ergebnissen verglichen werden könnte.

4.3 Blutdruck

Die vorgelegte Arbeit konnte zeigen, dass die untersuchten homozygot ETB-defizienten Ratten im Vergleich zum Wildtyp und zu heterozygoten Tieren einen signifikant erhöhten Blutdruck aufweisen. Insbesondere ist hierbei darauf hinzuweisen, dass aufgrund des ebenfalls bestehenden intestinalen Phänotyps, der dem menschlichen M. Hirschsprung entspricht, eher ein geringerer Blutdruck zu erwarten wäre.

Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Blutdruckerhöhung bereits bei 23 Tage alten ETB-defizienten Ratten besteht. Hierin setzt sich das beschriebene Tiermodell von anderen vorliegenden Untersuchungen ab. So wurden zum Beispiel in üblichen Hypertoniemodellen mit spontanhypertensiven Ratten (*spontaneously hypertensive rats*, SHR) Jungtiere von mindestens sechs bis 18 Wochen Alter verwandt [25, 105].

Aufgrund der wesentlich eingeschränkten Fähigkeit der für den Defekt homozygoten Tiere, Natrium und damit auch Wasser auszuschcheiden, kann angenommen werden, dass hier zumindest eine Ursache für die nachweisbare

Blutdruckerhöhung zu suchen ist. Es ist davon auszugehen, dass die deutlich eingeschränkte Natriumausscheidung der Tiere zu einer wesentlichen Zunahme des extrazellulären Volumens und schließlich zu einem erhöhten Blutdruck führt [107]. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass der beobachtete erhöhte Blutdruck durchaus als salzsensitiv zu bezeichnen ist. Wie im Vorhergehenden beschrieben, erscheint als ursächlich für die verminderte Natriumausscheidung am ehesten die fehlende Hemmung des epithelialen Natriumkanals durch den ETB-Rezeptor [29].

Es liegen Arbeiten vor, die an der Maus zeigen konnten, dass in einem *Knock-out*-Modell mit Inaktivierung der β -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals ein salzsensitiver Hypertonus beobachtet werden kann, der dem menschlichen M. Liddle entspricht [88].

Arbeiten an Nagetieren, aber auch an Hunden zeigten, dass das Fehlen der ETB-Rezeptor-vermittelten Freisetzung von NO in extrarenalen arteriellen Gefäßen für die Regulation des Blutdrucks weniger entscheidend ist. Es wurde gezeigt, dass durch die Vorbehandlung mit N ω -Methyl-L-Arginin (L-NMMA), einem kompetitiven Inhibitor der Stickstoffmonoxidsynthetase, die Blutdruckerhöhung nach Gabe von BQ-788, einem ETB-Rezeptorantagonisten, nicht verhindert werden konnte [85]. Im Gegensatz dazu besteht in den intrarenalen arteriellen Gefäßen eine Abhängigkeit des Blutflusses und des Gefäßwiderstandes von der ETB-Rezeptor-vermittelten NO-Synthese [19, 22, 33, 34, 74, 119]. Dies kann, wie bereits beschrieben, ein Grund für die reduzierte GFR sein, nicht jedoch eine schlüssige Erklärung für den beobachteten erhöhten Blutdruck der homozygot ETB-defizienten Tiere.

Wie bereits im Vorhergehenden beschrieben, ist es nach Abschluss der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen einer Arbeitsgruppe um Garipey und Yanagisawa gelungen, ein transgenes Rattenmodell zu etablieren, in dem der auch in dieser Arbeit verwandte ETB-defiziente Stamm mit Dopamin-Hydroxylase(DBH)-ETB-transgenen Tieren verpaart wurde. Die homozygot ETB-defizienten, jedoch auch DBH-ETB-transgenen Tiere konnten von den Genanten für weiterführende Untersuchungen verwendet werden, da sie keinen intestinalen Phänotyp ausprägen. Bei den DBH-ETB-transgenen Tieren findet

im Nervengewebe eine unabhängige ETB-Expression statt, wodurch eine normale Migration der aus der Neuralleiste stammenden neuronalen Zellen im Intestinum gewährleistet ist. In der Niere findet sich jedoch auch bei diesen Tieren kein funktionell aktiver ETB-Rezeptor. Die veröffentlichten Daten stützen die hier vorgelegten Ergebnisse. So konnte gezeigt werden, dass unter einer salzarmen Diät DBH-ETB-transgene Tiere unabhängig von ihrem renalen ETB-Rezeptor-Status vergleichbare Blutdruckwerte aufweisen, wohingegen unter einer salzreichen Kost die renal ETB-defizienten Tiere einen wesentlich erhöhten Blutdruck aufweisen, der sich durch Gabe von Amilorid normalisieren lässt [31].

In der Gesamtbetrachtung erscheint als Erklärungsmodell für die hier vorgelegten Ergebnisse hinsichtlich des Blutdrucks sinnvoll, dass durch das Fehlen eines intakten ETB-Rezeptors eine vermehrte Retention von Natrium und in der Folge auch von Wasser erfolgt, wodurch es zu einer Zunahme des extrazellulären Volumens und konsekutiv zu einer Blutdruckerhöhung kommt.

4.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass homozygot ETB-defiziente Ratten bereits frühzeitig eine Einschränkung ihrer Nierenfunktion im Sinne einer drastisch reduzierten Natriumausscheidung und verminderten GFR aufweisen, ohne dass sich an den Nieren morphologische Veränderungen zeigen. Außerdem weisen diese Tiere im Vergleich zum Wildtyp und zu heterozygoten Tieren einen signifikant erhöhten Blutdruck auf. Aus der vorliegenden Literatur und der Normalisierung der fraktionellen Natriumausscheidung nach Gabe von Amilorid kann gefolgert werden, dass eine fehlende Hemmung des epithelialen Natriumkanals durch den ETB-Rezeptor die Ursache für die Störung der Natriumausscheidung ist. Durch die vermehrte Retention von Natrium und Wasser kommt es zu einer Zunahme des extrazellulären Volumens und zu einem Anstieg des Blutdrucks. Man muss konkludieren, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Stoffwechseluntersuchungen nicht in Natriumhomöostase waren.

Ferner ist anzumerken, dass die Tiere aufgrund ihres intestinalen Phänotyps Einschränkungen in den Untersuchungsbedingungen bieten. So sind weitere Untersuchungen an älteren Tieren mit dem verwendeten Stamm nicht möglich. Dennoch können die vorgelegten Ergebnisse für sich in Anspruch nehmen, einen neuen monogenetischen Weg zur Entstehung eines salzsensitiven Hypertonus aufgezeigt zu haben.

5 Kurzfassung / Abstract

5.1 Deutsch

Es ist bekannt, dass Endothelin (ET) und insbesondere das renale Endothelinsystem eine Bedeutung in der Elektrolyt- und Wasser-Homöostase und in der Regulation des Blutdrucks aufweisen. In der vorliegenden Dissertation wurden anhand eines für den Endothelin-B-Rezeptor (ETB) defizienten Rattenstamms im Tiermodell die Auswirkungen des Fehlens eines aktiven ETB auf die Morphologie und Funktion der Nieren sowie den Blutdruck untersucht. Die homozygot ETB-defizienten Tiere sind aufgrund des intestinalen Phänotyps, der der Hirschsprungschens Erkrankung beim Menschen entspricht, in ihrer Lebenserwartung begrenzt, weswegen die Untersuchungen an 5 - 23 Tage alten Tieren erfolgten. Die relative Nierengröße war gleich. Die feingeweblichen Untersuchungen zeigten keinen Unterschied hinsichtlich der Nierenmorphologie. Die homozygot ETB-defizienten Tiere wiesen einen erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck auf. In den funktionellen Untersuchungen konnte eine veränderte Nierenfunktion insbesondere im Sinne einer signifikant erniedrigten glomerulären Filtrationsrate (GFR) sowie erniedrigten fraktionellen Natriumausscheidung bei den homozygot ETB-defizienten Tieren gezeigt werden. Die Erniedrigung der fraktionellen Natriumausscheidung war nach Gabe von Amilorid, einem spezifischen Inhibitor des epithelialen Natriumkanals (ENaC), reversibel. Es kann gefolgert werden, dass das Fehlen eines aktiven ETB zu einer fehlenden Hemmung des ENaC führt, die über eine vermehrte Retention von Natrium und Wasser für einen erhöhten Blutdruck verantwortlich ist.

5.2 Englisch

Endothelin (ET) and most notably the renal endothelin-system are known to have an impact on the homoeostasis of electrolytes and water and on the

regulation of blood pressure. In this dissertation the effects of the absence of an active endothelin-B-receptor (ETB) on renal morphology and function and on blood pressure were examined in an animal model by using a ETB-deficient rat strain. Due to their intestinal phenotype equal to men's Hirschsprung's disease homozygous ETB-deficient rats are limited in their lifespan, thus all studies were performed in 5 - 23 days old animals. Relative kidney size was similar. In the histological examinations there were no differences in renal morphology. Homozygous ETB-deficient rats had an elevated mean arterial blood pressure. Additionally these animals had a different renal function particularly with regard to a decreased glomerular filtration rate (GFR) and decreased fractional sodium excretion. By treatment with amiloride, a specific inhibitor for the epithelial sodium channel (ENaC), the decrease of fractional sodium excretion was reversible. The conclusion can be drawn, that the lack of an active ETB causes a missing inhibition of ENaC and by an increased retention of sodium and water an elevated blood pressure.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Ahn K *et al.*: The endothelin-converting enzyme from human umbilical vein is a membrane-bound metalloprotease similar to that from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89, S.8606-10
- 2 Änggård E *et al.*: The fate of the radioiodinated endothelin-1 and endothelin-3 in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989, 13 *Suppl.* 5, S.S46-9
- 3 Arai H *et al.*: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 1990, 348, S.730-2.
- 4 Arai H *et al.*: The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem.* 1993, 268, S.3463-70
- 5 Aramori I, Nakanishi S: Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1992, 267, S.12468-74
- 6 Arendshorst WJ, Selkurt EE: Renal tubular mechanisms for creatinine secretion in the guinea pig. *Am J Physiol.* 1970, 218, S.1661-70
- 7 Arinami T *et al.*: Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet.* 1991, 48, S.990-6
- 8 Ay I *et al.*: Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents downregulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001, 87, S.71-80
- 9 Bakris GL *et al.*: Arginine vasopressin stimulates human mesangial cell production of endothelin. *J Clin Invest.* 1991, 87, S.1158-64
- 10 Bax WA, Saxena PR: The current endothelin receptor classification: time for reconsideration?. *Trends Pharmacol Sci.* 1994, 15, S.379-86

- 11 Baynash AG *et al.*: Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*. 1994, 79, S.1277-85
- 12 Benos DJ *et al.*: Diversity and regulation of amiloride-sensitive Na⁺ channels. *Kidney Int*. 1996, 49, S.1632-7
- 13 Birnbaumer L *et al.*: Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1990, 1031, S.163-224
- 14 Bodian M *et al.*: Hirschsprung's disease. *Lancet*. 1950, 1, S.19-22
- 15 Bodian M *et al.*: Hirschsprung's disease. *Lancet*. 1951, 1, S.302-9
- 16 Boulanger C, Luscher TF: Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990, 85, S.587-90
- 17 Boulanger CM *et al.*: Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*. 1992, 70, S.1191-7
- 18 Brooks DP *et al.*: Identification and function of putative ETB receptor subtypes in the dog kidney. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995, 26 Suppl 3, S.S322-5
- 19 Brooks DP *et al.*: SB 234551, a novel endothelin--A receptor antagonist, unmasks endothelin-induced renal vasodilatation in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998, 31 Suppl 1, S.S339-41
- 20 Casey ML *et al.*: Endothelin-1 gene expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in avascular human amnion. Potential source of amniotic fluid endothelin. *J Biol Chem*. 1991, 266, S.5762-8
- 21 Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y: A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*. 1995, 7, S.61-4

- 22 Conrad KP *et al.*: Endothelin mediates renal vasodilation and hyperfiltration during pregnancy in chronically instrumented conscious rats. *Am J Physiol.* 1999, 276, S.F767-76
- 23 Davenport AP *et al.*: Human endothelin receptors characterized using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in situ hybridization, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020: evidence for expression of ETB receptors in human vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993, 22 *Suppl* 8, S.S22-5
- 24 De Fazio G *et al.*: Antiviral effects of dihydroxypropyladenine [(RS)-DHPA] and bromovinyldeoxyuridine (BVDU) on plant viruses. *Antiviral Res.* 1987, 8, S.163-9
- 25 Dukacz SA *et al.*: Short- and long-term enalapril affect renal medullary hemodynamics in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1999, 276, S.R10-6
- 26 Dupuis J *et al.*: Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation.* 1996, 94, S.1578-84
- 27 Emori T *et al.*: Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension.* 1991, 18, S.165-70
- 28 Fyhrquist F *et al.*: Raised plasma endothelin-1 concentration following cold pressure test. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990, 169, S.217-21
- 29 Gallego MS, Ling BN: Regulation of amilorid-sensitive Na⁺ channels by endothelin-1 in distal nephron cells. *Am J Physiol.* 1996, 271, S.F451-60
- 30 Gariépy CE *et al.*: Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93, S.867-72
- 31 Gariépy CE *et al.*: Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest.* 2000, 105, S.925-33

- 32 Gavrieli Y *et al.*: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992, 119, S.493-501
- 33 Gellai M *et al.*: Evidence for the existence of endothelin-B receptor subtypes and their physiological roles in the rat. *Am J Physiol.* 1996, 271, S.R254-61
- 34 Gellai M *et al.*: Contribution of endogenous endothelin-1 to the maintenance of vascular tone: role of nitric oxide. *Pharmacology.* 1997, 55, S.299-308
- 35 Gilmore ES *et al.*: SRC family kinases mediate epithelial Na⁺ channel inhibition by endothelin. *J Biol Chem.* 2001, 276, S.42610-7
- 36 Goetz KL *et al.*: Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1988, 255, S.R1064-8
- 37 Goodman LS, Limbird LE, Milinoff PB *et al.*: Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 9 New York, Mcgraw-Hill, 1996 S.705
- 38 Gouldsbrough I, Ashton N: Effect of cross-fostering on neonatal sodium balance and adult blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998, 25, S.1024-31
- 39 Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982, 218, S.474-5
- 40 Gratzner HG *et al.*: The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp Cell Res.* 1975, 95, S.88-94
- 41 Harrison VJ *et al.*: Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995, 92, S.6344-8
- 42 Hirschsprung H: Stuhlträgheit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Colons. *Jahrb Kinderheilk.* 1888, 27, S.1-7

- 43 Hirschsprung H: Erweiterung und Hypertrophie des Dickdarms. Berliner klinische Wochenschrift. 1899, 36, S.977
- 44 Hocher B *et al.*: Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. Hypertension. 1996, 28, S.196-201
- 45 Hocher B *et al.*: Paracrine renal endothelin system in rats with liver cirrhosis. Br J Pharmacol. 1996, 118, S.220-7
- 46 Hocher B *et al.*: Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. J Clin Invest. 1997, 99, S.1380-9
- 47 Hocher B *et al.*: The paracrine endothelin system: pathophysiology and implications in clinical medicine. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1997, 35, S.175-89
- 48 Hosoda K *et al.*: Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. FEBS Lett. 1991, 287, S.23-6
- 49 Hosoda K *et al.*: Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. Cell. 1994, 79, S.1267-76
- 50 Inoue A *et al.*: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1989, 86, S.2863-7
- 51 Kanse SM *et al.*: Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. Life Sci. 1991, 48, S.1379-84
- 52 Kanse SM *et al.*: Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. J Cardiovasc Pharmacol. 1991, 17 Suppl 7, S.S113-6
- 53 Kasinath BS *et al.*: Glomerular epithelial cells synthesize endothelin peptides. Am J Pathol. 1992, 141, S.279-83

- 54 Kitamura K *et al.*: Erratum on: Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, *163*, S.666
- 55 Kitamura K *et al.*: Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, *161*, S.348-52
- 56 Kloog Y *et al.*: Three apparent receptor subtypes for the endothelin/sarafotoxin family. *FESB Lett.* 1989, *253*, S.199-202
- 57 Kloog Y, Sokolovsky M: Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol Sci.* 1989, *10*, S.212-4
- 58 Koh E *et al.*: Endothelin stimulates Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells. *Biochem Int.* 1990, *20*, S.375-80
- 59 Kohan DE: Production of endothelin-1 by rat mesangial cells: regulation by tumor necrosis factor. *J Lab Clin Med.* 1992, *119*, S.477-84
- 60 Kohan DE: Endothelins: renal tubule synthesis and actions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996, *23*, S.337-44
- 61 Kohan DE *et al.*: Endothelin B receptor mediates ET-1 effects on cAMP and PGE₂ accumulation in rat IMCD. *Am J Physiol.* 1993, *265*, S.F670-6
- 62 Kourembanas S *et al.*: Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest.* 1991, *88*, S.1054-7
- 63 Kumar CS *et al.*: Novel endothelin receptors in the follicular membranes of *Xenopus laevis* oocytes mediate calcium responses by signal transduction through gap junctions. *Mol Pharmacol.* 1993, *44*, S.153-7
- 64 Landan G *et al.*: Evolution of the sarafotoxin/endothelin superfamily of proteins. *Toxicon.* 1991, *29*, S.237-44

- 65 Landan G *et al.*: The evolutionary history of the sarafotoxin/endothelin/endothelin-like superfamily. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991, *17 Suppl 7*, S.S517-9
- 66 Lee ME *et al.*: Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest.* 1990 , *86*, S.141-7
- 67 Marsden PA *et al.*: Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells. *Am J Physiol.* 1991 , *261*, S.F117-25
- 68 Marsen TA *et al.*: Renal actions of endothelin: linking cellular signaling pathways to kidney disease. *Kidney Int.* 1994, *45*, S.336-44
- 69 Martin ER *et al.*: Heterogeneity of cell surface endothelin receptors. *J Biol Chem.* 1990, *265*, S.14044-9
- 70 Masaki T *et al.*: Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev.* 1992, *12*, S.391-421
- 71 Masaki T, Yanagisawa M: Endothelins. *Essays Biochem.* 1992, *27*, S.79-89
- 72 Matsumoto H *et al.*: Insulin-like growth factor-I stimulates endothelin-3 secretion from rat anterior pituitary cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, *172*, S.661-8
- 73 Matsumoto, H *et al.*: Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, *164*, S.74-80
- 74 Matsuo G *et al.*: Effects of sarafotoxin S6c on renal haemodynamics and urine formation in anaesthetized dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997, *24*, S.487-91
- 75 McMahon EG *et al.*: Phosphoramidon blocks the pressor activity of porcine big endothelin-1-(1-39) in vivo and conversion of big endothelin-1-(1-39) to endothelin-1-(1-21) in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, *88*, S.703-7

- 76 Milner P *et al.*: Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990, *170*, S.649-56
- 77 Mohring J *et al.*: Salt and water balance and renin activity in renal hypertension of rats. *Am J Physiol.* 1975, *228*, S.1847-55
- 78 Nakahama H: Stimulatory effect of cyclosporine A on endothelin secretion by a cultured renal epithelial cell line, LLC-PK1 cells. *Eur J Pharmacol.* 1990, *180*, S.191-2
- 79 Nakahama H *et al.*: Comparative effects of cyclosporine A and FK-506 on endothelin secretion by a cultured renal cell line, LLC-PK1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991, *17 Suppl 7*, S.S172-3
- 80 Nakamuta M *et al.*: Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, *177*, S.34-9
- 81 Nambi P *et al.*: Dexamethasone down-regulates the expression of endothelin receptors in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1992, *267*, S.19555-9
- 82 Nambi P *et al.*: Identification of a novel endothelin receptor in *Xenopus laevis* liver. *Neuropeptides.* 1994, *26*, S.181-5
- 83 Niall HD: The evolution of peptide hormones. *Annu Rev Physiol.* 1982, *44*, S.615-24
- 84 Ogawa Y *et al.*: Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, *178*, S.248-55
- 85 Ohuchi T *et al.*: Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of the ETB receptor in mice. *Am J Physiol.* 1999, *276*, S.R1071-7
- 86 Oliver FJ *et al.*: Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1991, *266*, S.23251-6

- 87 Ozaki S *et al.*: Endothelin ETB receptors couple to two distinct signaling pathways in porcine kidney epithelial LLC-PK1 cells. *Pharmacol Exp Ther.* 1994, 270, S.1035-40
- 88 Pradervand S *et al.*: A mouse model for Liddle's syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 1999, 10, S.2527-33
- 89 Rebuffat P *et al.*: Comparison of the signaling mechanisms involved in the ETB receptor-mediated secretagogue action of endothelin-1 on dispersed zona glomerulosa cells and capsule-zona glomerulosa preparations of the rat adrenal gland. *Int J Mol Med.* 2000, 5, S.43-7
- 90 Rossi GP *et al.*: Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res.* 1999, 43, S.300-7
- 91 Rubanyi GM, Polokoff MA: Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 1994, 46, S.325-415
- 92 Sakamoto A *et al.*: Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, 178, S.656-63
- 93 Sakurai T *et al.*: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* 1990, 348, S.732-5
- 94 Sakurai T *et al.*: Level of ETB receptor mRNA is down-regulated by endothelins through decreasing the intracellular stability of mRNA molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992, 186, S.342-7
- 95 Sandgaard NC, Bie P: Natriuretic effect of non-pressor doses of endothelin-1 in conscious dogs. *J Physiol.* 1996, 494, S.809-18
- 96 Simonson MS, Dunn MJ: Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.* 1990, 4, S.2989-3000
- 97 Simonson MS, Dunn MJ: Renal actions of endothelin peptides. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993, 2, S.51-60

- 98 Sokolovsky M: Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGMP cascades. *Cell Mol Neurobiol.* 1995, *15*, S.561-71
- 99 Sugiura M *et al.*: Endotoxin stimulates endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, *161*, S.1220-7
- 100 Swenson O: Hirschsprung's disease (aganglionic megacolon). *N Engl J Med.* 1959, *260*, S.972-6
- 101 Takeda Y *et al.*: Endothelin-1 release from the mesenteric arteries of cyclosporine-treated rats. *Eur J Pharmacol.* 1992, *213*, S.445-7
- 102 Takeda Y *et al.*: Cyclosporine A induces endothelin-1 release from cultured rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1993, *233*, S.299-301
- 103 Takeda Y *et al.*: Stimulation of endothelin mRNA and secretion in human endothelial cells by FK 506. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993, *22 Suppl 8*, S.S310-2
- 104 Takeda Y *et al.*: Mechanisms of FK 506-induced hypertension in the rat. *Hypertension.* 1999, *33*, S.130-6
- 105 Touyz RM *et al.*: Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension.* 1999, *33*, S.366-72
- 106 Ujiiie K *et al.*: Messenger RNA expression and synthesis of endothelin-1 along rat nephron segments. *J Clin Invest.* 1992, *90*, S.1043-8
- 107 Venkatesh S *et al.*: Mechanisms of tubular sodium chloride transport. *Ren Fail.* 1998, *20*, S.783-99
- 108 Waldeyer A, Mayet A: *Anatomie des Menschen 1.* 16 Berlin / Ney York, de Gruyter, 1993 S.161
- 109 Waldeyer A, Mayet A: *Anatomie des Menschen 1.* 16 Berlin / New York, de Gruyter, 1993 S.308

- 110 Weitzberg E *et al.*: Long-lasting vasoconstriction and efficient regional extraction of endothelin-1 in human splanchnic and renal tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, *180*, S.1298-1303
- 111 Welch WJ *et al.*: Validation of miniature ultrasonic transit-time flow probes for measurement of renal blood flow in rats. *Am J Physiol.* 1995, *268*, S.F175-8
- 112 Wende P *et al.*: [Autoregulation of kidney circulation, glomerular filtration rate and plasma renin activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar rats]. *Med Klin (Munich).* 1993, *88*, S.207-11
- 113 Wong NL *et al.*: Vasopressin regulates endothelin-B receptor in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000, *278*, S.F369-74
- 114 Woodcock EA, Land SL: Functional endothelin ETB receptors on renal papillary tubules. *Eur J Pharmacol.* 1993, *247*, S.93-5
- 115 Xu D *et al.*: ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* 1994, *78*, S.473-85
- 116 Yamauchi T *et al.*: Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* 1990, *267*, S.16-8
- 117 Yanagisawa M *et al.*: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988, *332*, S.411-5
- 118 Yoshizawa T *et al.*: Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. *Science.* 1990, *247*, S.462-4
- 119 Yukimura T *et al.*: Renal vasodilating and diuretic actions of a selective endothelin ETB receptor agonist, IRL1620. *Eur J Pharmacol.* 1994, *264*, S.399-405
- 120 Zager RA: Exogenous creatinine clearance accurately assesses filtration failure in rat experimental nephropathies. *Am J Kidney Dis.* 1987, *10*, S.427-30

121 Zoja C *et al.*: 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.* 1991, 64, S.16-20

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern danken, deren Unterstützung mir immer sicher war. Sie haben mir die Möglichkeit gegeben, meinen Weg zu gehen und mich Vertrauen gelehrt. Vor allem danke ich meinem Vater für seine orthographischen Hinweise, deren Umsetzung er nun nicht mehr erlebt.

Herzliche danke ich auch Herrn Prof. Dr. Berthold Hocher für die Überlassung des Themas sowie die gute und engagierte Betreuung. Er hat viel Geduld mit mir gehabt, auch wenn es mich von der Arbeit wegzog.

Meine Lehrmeisterin im Labor war Frau Dr. Christa Thöne-Reinecke, die mir mit viel Geduld beim Erlernen der praktischen Fertigkeiten zur Seite stand und mir für Gegenkontrollen ihre Augen geliehen hat.

Frau Ines Müller, die mir durch Ihre Assistenz das Leben deutlich erleichtert hat.

Mein Dank gilt außerdem der ehemaligen Dahlemer Arbeitsgruppe, deren wunderbare Atmosphäre Lust aufs Labor gemacht hat und mir die Zeit, die wir dort verbracht haben, deutlich angenehmer gemacht hat. Namentlich seien hier vor allem Dr. Saban Elitok und Dr. Michael Godes genannt, die mir als Freunde in Erinnerung bleiben werden und Dr. Torsten Slowinski, ohne dessen Hilfe die technische Durchführung der Blutdruckmessungen nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere die Tierversuche wären ohne die hervorragende Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen nicht möglich gewesen, so danke ich Frau Prof. Dr. Hannelore Ehrenreich für die Überlassung der Tiere und ihren Mitarbeitern für die stets freundliche und unproblematische Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an Herrn Dipl. chem. Priem für die Messungen der Plasma- und Urinproben.

Zuletzt möchte ich auch meiner Frau Solveigh danken, ohne deren Ansporn ich diese Arbeit vielleicht nicht zu einem Abschluss gebracht hätte. Sie hat mir geholfen zu erkennen, was wichtig ist.

8 Eigene Veröffentlichungen

- 1.) Hoher B, Dembowski C, Slowinski T, Friese ST *et al.*: Impaired sodium excretion, decreased glomerular filtration rate and elevated blood pressure in endothelin receptor type B deficient rats. *J Mol Med.* 2001, 78, S.633-41

- 2.) Vargas Hein O, Friese ST, Spies C: Controlled Therapeutic Hypothermia: When is it Indicated?. Hrsg.: Vincent JL: *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 2004 S.823-9

- 3.) Mueller N, Mast J, Friese S, Spies C, Rundshagen I: Nervus medianus-evozierte Potentiale, Narcotrend und Bispektralindex während Sedierung mit Propofol: Differenzierung von Wachheit und Bewusstlosigkeit. *Journal f. Anästhesie und Intensivbehandlung.* 2005, 2, S.173-4

- 4.) Friese ST, Kleine-Tebbe A, Worm M, Rundshagen I: Allergische Reaktion auf Patentblau V – Zwei Fallberichte über ein unterschätztes Risiko. *Journal f. Anästhesie und Intensivbehandlung.* 2006, 2, S.72

9 Vorab publizierte Ergebnisse

Teile der Ergebnisse wurden mit dem Einverständnis des Betreuers dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. Berthold Hocher, und mit Genehmigung des Büros für akademische Grade (Promotionsbüro) der Charité vorab veröffentlicht in:

Hoche B, Dembowski C, Slowinski T, Friese ST *et al.*: Impaired sodium excretion, decreased glomerular filtration rate and elevated blood pressure in endothelin receptor type B deficient rats. *J Mol Med.* 2001, 78, S.633-641

10 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Sebastian Tobias Friese, an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Funktionelle und morphologische Charakterisierung des renalen Phänotyps eines Endothelin-B-Rezeptor-defizienten Rattenstammes“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen, keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Weiterhin erkläre ich, dass keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind, von mir weder früher noch gleichzeitig ein Dissertationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern vollständig angegeben sind und mir die geltende Dissertationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 13. November 2009

Sebastian Tobias Friese

11 Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“