

Aus dem Center of Cardiovascular Research Charité Campus Mitte,  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Endothelin-B-Rezeptor-defiziente diabetische Ratten  
entwickeln schweren ET-1 abhängigen Hypertonus und  
schwere Nephropathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von Ines Ernst

aus Berlin

Gutachter :     1. Priv.-Doz. Dr. med. T. Pfab  
                  2. Prof. Dr. med. M. Tepel  
                  3. Prof. Dr. med. J.-P. Stasch

Datum der Promotion: 03.06.2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Diabetes mellitus .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Diabetische Nephropathie .....	3
1.1.2	Die Induktion von Diabetes mellitus bei gesunden Tieren .....	4
<b>1.2</b>	<b>Das Endothelinsystem .....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Entdeckung der Endotheline .....	7
1.2.2	Genetische Regulation und Abbau des Endothelins .....	8
1.2.3	Vorkommen und Wirkung des Endothelins .....	10
1.2.4	Die Endothelinrezeptoren .....	14
1.2.4.1	Der ETAR .....	14
1.2.4.2	Der ETBR .....	15
1.2.5	Endothelin und Niere .....	17
1.2.6	Endothelin und Hypertonie .....	19
<b>1.3</b>	<b>Regulationsmechanismen des Blutdrucks .....</b>	<b>22</b>
1.3.1	Das NO-System .....	22
1.3.2	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	23
<b>1.4</b>	<b>Transgene Tiermodelle .....</b>	<b>25</b>
1.4.1	ETBR-defiziente Ratten (ETBRd) .....	26
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung der Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>28</b>
2.1.1	Geräte .....	28
2.1.2	Chemikalien .....	29
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Tierhaltung und Studienprotokoll .....	32
2.2.2	Genotypisierung .....	33
2.2.3	Streptozotocin-Verabreichung .....	37
2.2.4	Blutdruckmessung .....	37
2.2.5	Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig .....	38
2.2.6	Organentnahme .....	39
2.2.7	Biochemische Blut- und Urinparameteranalyse .....	40
2.2.7.1	Blutparameter .....	40
2.2.7.2	Urinparameter .....	43
2.2.8	Histologische Methoden .....	45
2.2.8.1	Fixierung .....	45
2.2.8.2	Paraffineinbettung in Histokinette .....	45
2.2.8.3	Färbungen .....	46
2.2.8.4	PAS-Färbung zur Bestimmung der Glomerulosklerose .....	46
2.2.8.4.1	Glomerulosklerose – Auswertung .....	48
2.2.8.5	Sirius-red Färbung zur Analyse der Fibrose an der Niere .....	49
2.2.8.5.1	Auswertung der Interstitiellen Fibrose .....	49
2.2.8.5.2	Auswertung der perivaskulären Fibrose .....	50
2.2.8.6	Elastica-Färbung zur Bestimmung der Media-Lumen-Ratio .....	51
2.2.8.6.1	Digitale Morphometrie der Media-Lumen-Ratio .....	51
2.2.9	Immunhistochemie .....	53
2.2.9.1	Technische Durchführung .....	54
2.2.9.2	Auswertung .....	55
2.2.10	Western-Blot .....	56

2.2.10.1	Organaufbereitung Niere .....	57
2.2.10.2	Proteinbestimmung.....	57
2.2.10.3	Elektrophorese.....	58
2.2.10.4	Blotting.....	59
2.2.10.5	Antikörper .....	59
2.2.10.6	Darstellung auf Film.....	60
2.2.11	Statistische Analyse .....	60
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>61</b>
3.1	Körpergewichte und Organgewichte.....	62
3.2	Blut- und Urinparameter .....	64
3.3	Nierenmorphologie.....	70
3.3.1	Glomerulosklerose.....	70
3.3.2	Media-Lumen-Ratio .....	72
3.3.3	Perivaskuläre Fibrose.....	74
3.3.4	Interstitielle Fibrose .....	75
3.4	Western Blot: Rezeptorprotein-Analyse .....	76
3.4.1	ETBR und ETAR-Darstellung .....	77
3.4.2	Darstellung des epithelialen Natriumkanals (eNaC).....	78
3.5	Blutdruck- und Herzfrequenzergebnisse.....	79
3.6	Blutdruckregulierende Systeme .....	81
3.6.1	Auswertung RAAS.....	81
3.6.1.1	Messung der Renin positiven Glomerula .....	82
3.6.1.2	nNOS positive Glomerula .....	83
3.6.2	Auswertungen zum NO-System .....	84
3.6.3	Auswertungen zum ET-System.....	86
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>87</b>
4.1	Körper- und Organgewichte.....	87
4.2	Progression der Diabetischen Nephropathie .....	88
4.3	Hämodynamik .....	89
4.3.1	Das RAAS.....	90
4.3.2	Das NO-System.....	92
4.3.3	ET-System .....	93
4.4	Studiendesignbedingte Grenzen und Ausblick.....	95
4.5	Schlussfolgerung .....	96
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>112</b>

<b>9</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>114</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIZIERTE ERGEBNISSE.....</b>	<b>115</b>

Meinen Eltern

## **1 Einleitung**

Die diabetische Nephropathie (DN) ist eine der führenden Ursachen für eine Hämodialyse-Behandlung in den Industriestaaten. Die DN infolge des Typ-2 Diabetes mellitus hat in den Industrienationen in epidemischem Ausmaß zugenommen und ist heute die Hauptursache des terminalen Nierenversagens. In Deutschland betrug 2006/07 die Zahl der dialysepflichtig gewordener Patienten fast 92.000. Bei 35 % der Patienten (Daten des QuaSi-Nierenregisters) ist ein Diabetes mellitus (3 % Typ 1, 32 % Typ 2) ursächlich für die Niereninsuffizienz. Die medizinischen Kosten für das Dialyseprogramm sind sehr hoch (Ritz, Rychlik et al. 1999; Joyce, Iacoviello et al. 2004). Strategien um diese Entwicklung aufzuhalten waren bisher nicht effektiv genug. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass das Endothelinsystem (ETS) eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der diabetischen Nephropathie spielt (Benigni, Colosio et al. 1998; Dhein, Hochreuther et al. 2000; Hoher, Schwarz et al. 2001; Gross, Ritz et al. 2003).

Deshalb fokussieren sich aktuelle Untersuchungen auf das Endothelinsystem, um neue Möglichkeiten bei der Behandlung der diabetischen Nephropathie zu eröffnen.

### **1.1 Diabetes mellitus**

Die Erkrankung Diabetes mellitus wird in zwei klinische Formen unterschieden: den Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2. Dem Typ-1 Diabetes mellitus liegt eine Störung der Insulinproduktion in den Beta-Zellen des Pankreas zugrunde. Der Typ-2 Diabetes mellitus zeichnet sich hingegen durch eine Insulinresistenz an den Zielzellen aus. Beide Störungen sind gekennzeichnet durch einen erhöhten Serumglukosespiegel. Die Organe, die Insulin-unabhängig Glukose aufnehmen, wie Niere, Retina, Augenlinse und periphere Nerven, sind als erste von der Schädigung durch den erhöhten Blutzuckerspiegel betroffen. Daher kommt es dort zu den klassischen Komplikationen des Diabetes mellitus wie Nephropathie, Neuropathie, Retinopathie, Kataraktbildung, Taubheitsgefühl und Wundheilungsstörungen haben hier ihre Ursache. Da Glukose sowohl osmotisch wirksam ist als auch durch Autooxidation hochreaktive, freie Radikale bildet, wird auch von Glukose-toxischen Effekten bei Hyperglykämie gesprochen (Rossetti 1995). Im pharmakologischen Sinn handelt es sich allerdings nicht um eine toxische Substanz. Hinsichtlich ihrer Ätiologie, Pathogenese und Häufigkeit

unterscheiden sich beide Formen des Diabetes mellitus. Außerdem unterscheidet man weitere genetische Formen und Ursachen für den Diabetes mellitus, die sich in der aktuellen Einteilung des Diabetes mellitus wiederfinden.

Klassifikation nach der Ätiologie seit 1997 (WHO und ADA = American Diabetes Association)

- **Typ-1** Diabetes mellitus: Zerstörung der Inselzellen des Pankreas führt zu absolutem Insulinmangel
- **Typ-1a** immunvermittelt (Autoimmunerkrankung)
- **Typ-1b** idiopathisch
- **Typ-2** Diabetes mellitus: unterschiedliche Kombination von Insulinresistenz, Hyperinsulinismus, relativem Insulinmangel, Sekretionsstörungen
- **Andere spezifische Diabetes mellitus Typen**
  - A:** genetische Defekte der Beta-Zellefunktion
  - B:** seltene genetische Defekte der Insulinsekretion
  - C:** chronische Pankreatitis
  - D:** Endokrinopathien
  - E:** medikamentös induziert
  - F:** Infektionen
  - G:** seltene immunologische bedingte Formen
  - F:** genetische Syndrome, die gelegentlich mit Diabetes vergesellschaftet sind
- **Gestationsdiabetes**

Der Typ-1 Diabetes mellitus ist eine primäre Erkrankung des Pankreas, die häufig autoimmunvermittelt ist (Nejentsev, Howson et al. 2007). Es liegt ein absoluter Insulinmangel vor. Der Typ-1 Diabetes mellitus erfordert eine lebenslange Insulinsubstitution und tritt vorwiegend im juvenilen Alter auf. Der Anteil der Typ-1 Diabetes mellitus Erkrankten liegt weltweit bei etwa 10 % der Gesamtheit aller Diabetestypen (Kloppel and Clemens 1997)

Den Hauptanteil aller Diabeteserkrankungen stellt weltweit zu 90 % der Typ-2 Diabetes mellitus (Yki-Jarvinen 1994). Diese Erkrankung betrifft in der Regel ältere, v.a. adipöse Menschen. Daher stammt auch der ursprüngliche Begriff Altersdiabetes. Mittlerweile ist

eine große Heterogenität der Ursachen des Typ 2 Diabetes mellitus bekannt. Auch bei jüngeren Patienten tritt dieser Typ des Diabetes mellitus auf. Er wurde früher als "Maturity onset diabetes of the young" (MODY) bezeichnet und wurde in fünf Unterformen (MODY 1-5) unterteilt. Nach neuester WHO Klassifikation werden die MODY-Typen heute zusammengefasst und als genetische Defekte der Zellfunktion bezeichnet.

Das LADA-Syndrom (latent autoimmune diabetes in adults) beschreibt eine Autoantikörperproduktion gegen die pankreatischen Zellen. Bereits im Kindesalter kann die Ausbildung des Diabetes mellitus beginnen, wird aber erst im Erwachsenenalter sichtbar. Ursache für die Insulinresistenz beim Typ-2 ist ein Insulinrezeptordefekt und ein Postrezeptordefekt. Folglich wird der Glukosespiegel im Blut nicht abgesenkt, der Seruminsulinspiegel bleibt hoch. Durch die Erschöpfung der Insulinproduktion im Pankreas kommt es zu einer Herabsetzung der Sekretionskinetik und somit zu einem relativen Insulinmangel. Man spricht dann von einer gestörten Glukosetoleranz. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese multifaktorielle, heterogene Erkrankung möglicherweise nicht nur durch genetische Disposition und Fettleibigkeit ausgelöst wird, sondern ebenso die Akkumulation von Fett in andere Zellen als Adipozyten oder eine Störung der Modulation des Sympathikus/Parasympathikus im zentralen Nervensystem involviert sind. Darüber hinaus konnte eine genetische Interaktion zwischen Typ-1 und Typ-2 Diabetes mellitus gezeigt werden (Stumvoll, Goldstein et al. 2008).

### **1.1.1 Diabetische Nephropathie**

Unter dem Begriff „Diabetische Nephropathie“ versteht man alle renalen Läsionen, die bei Patienten mit Diabetes mellitus auftreten können: die (diffuse oder noduläre) Glomerulosklerose, chronisch interstitielle Nephritis, Papillennekrosen sowie verschiedene tubuläre Läsionen. Die diffuse diabetische Glomerulosklerose ist die häufigste Läsion und findet sich bei den meisten Diabetikern mit Nephropathie, ohne dass es zu klinischen Symptomen gekommen ist. Die noduläre Glomerulosklerose (Typ Kimmelstiel-Wilson) ist spezifisch für einen Diabetes mellitus (Plum and Hader 2002).

Ein dauerhaft erhöhter Blutzuckerspiegel führt zur Schädigung des Endothels der Glomerula, der Tubuli und der Gefäße in der Niere. Eine Entzündungsreaktion und bindegewebige Umbauprozesse sind die Folge. Diese führen zur Sklerosierung und zum Funktionsverlust der Glomerula, der Tubuli und der Gefäße in der Niere.

Chronisches Nierenversagen und gestörte Blutdruckregulation, ein Hypertonus, bilden das Endstadium der diabetischen Nephropathie.

Es kommt zu Ablagerungen von Glykoproteinen in der Basalmembran und in den Mesangiumzellen, was zu einer Störung der Filterfunktion in den glomerulären Kapillaren führt. Kennzeichnend ist eine Albuminurie, ein Verlust von Plasmaprotein über die Niere. Die Entzündungsprozesse in der Niere führen zur Glomerulosklerose und bei fortschreitender Erkrankung zum Verlust der Nierenfunktion. Es kommt kompensatorisch über die Ausschüttung von Renin im juxtaglomerulären Apparat zu einem Blutdruckanstieg, um die Perfusion der Glomerula aufrecht zu erhalten. Der zu hohe Blutdruck führt wiederum zu einer Endothelschädigung in der Niere und damit zur Progression der Nierenerkrankung. Studien in Deutschland belegen die Diabetesprävalenz bei ca. 4,5 %, auf Grundlage der WHO- bzw. ADA-Kriterien wird sie auf ca. 8,5-9 % geschätzt. Patienten mit Typ-1-Diabetes und solche, deren Typ-2-Diabetes bis zum mittleren Alter manifest wird, entwickeln in 30-40 % eine diabetische Nephropathie (Haslacher, Ritz et al. 1989). Ca. 75 % der Typ-1-Diabetiker mit Mikroalbuminurie erreichen ohne adäquate Therapie nach ca. 10-15 Jahren das Stadium der manifesten Proteinurie. Nach den Daten der „QuaSi Niere 2006/07“ ist die Zahl der Dialysepflichtigen weiter gestiegen. Allein 2006 gab es 17.548 Neuaufnahmen zur chronischen Nierenersatztherapie und 12.130 Dialysepatienten sind im gleichen Jahr verstorben. Zusammengefasst befanden sich fast 92.000 Patienten in der Nierenersatztherapie. 1995 erhielten 54.656 Patienten eine Nierenersatztherapie. Das entspricht einem Zuwachs von 67 % in 11 Jahren (QuaSi Niere 2006/2007).

### **1.1.2 Die Induktion von Diabetes mellitus bei gesunden Tieren**

Streptozotocin (STZ) wurde ursprünglich aus dem Schimmelpilz *Streptomyces acromogenes* für die Antibiotika-Therapie isoliert (Vavra, Deboer et al. 1959). Es zeigte sich, dass es im Pankreas selektiv die Insulin-produzierenden Beta-Zellen in den Langerhansschen Inseln zerstört und war daher ungeeignet (Junod, Lambert et al. 1967). Aufgrund dieser Eigenschaft kann STZ eingesetzt werden, um im Versuchsmodell einen Diabetes mellitus nachzuahmen. Chemisch handelt es sich bei dieser Substanz um eine 2-Deoxy-2-(3-Methyl-3-nitroso-urea)-1-D-Glucopyranose aus

der Gruppe der N-Nitrosomethylamide. STZ hat eine Molekularmasse von 265kD, die Summenformel lautet:  $C_8H_{15}N_3O_7$

und besitzt folgende Strukturformel:

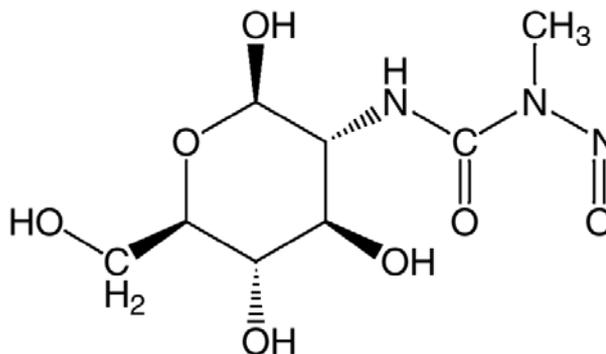


Abbildung 1: Strukturformel Streptozotocin

Aufgrund des Glukoserestes kommt es zur bevorzugten Anreicherung in den Beta-Zellen des Pankreas, da unter physiologischen Bedingungen die Glukose dort aufgenommen wird, um die Insulinsekretion zu initiieren. Die Halbwertszeit der Substanz im Plasma der Ratte beträgt fast sieben Minuten (Herr, Jahnke et al. 1967) und sie zerfällt sehr schnell bei Raumtemperatur (Rossini, Like et al. 1977). Als Beta-Zelltoxin führt STZ zu einer verminderten Produktion von Insulin und zu degenerativen Prozessen in den Zellen.

Das hypothetische Modell der Zellschädigung nach Okamoto (Takasu, Komiya et al. 1991) stellt den Mechanismus der Zellschädigung dar. Durch die Einwirkung von STZ kommt es nach Alkylierung der DNA zu DNA-Strang-Brüchen, die u.a. mit Hilfe der nukleären Poly-(ADP-Ribose)-Synthetase repariert werden. Dieses Enzym verbraucht zelluläres NAD, welches für viele Zellaktivitäten benötigt wird. Sinkt der intrazelluläre NAD-Spiegel unter einen Schwellenwert, tritt Zelltod ein. Daraus folgt ein Blutzuckeranstieg im Serum, da nicht genügend Insulin produziert werden kann (Seino, Usami et al. 1990).

In vitro als auch in vivo konnte an pankreatischen Beta-Zellen die Bildung freier Radikale und ein Anstieg von Stickoxid (NO) durch Einwirkung von STZ beobachtet werden; beide Molekülarten tragen zum zytotoxischen Effekt von STZ bei (Gandy, Buse et al. 1982).

Der Diabetes mellitus Typ kann durch die Wahl der Dosis und des Applikationszeitpunktes von STZ beeinflusst werden. Niedrige Dosierungen von STZ werden von 10 bis 35 mg/kg KG eingestuft. Zu den mittleren werden alle bis 65 mg/kg KG gezählt und als hohe gelten jene bis maximal 120 mg/kg KG. Nach Applikation einer

hohen Dosis kommt es zu einer fast vollständigen Zerstörung der Insulinproduzierenden Zellen und somit zum Anstieg der Mortalitätsrate. Einmalige niedrige Dosierungen ahmen nach längerer Einwirkdauer einen Typ 2 Diabetes nach. Hohe STZ-Dosierungen zeigen die volle Symptomatik einer Typ-1 Erkrankung innerhalb kürzester Zeit (Junod, Lambert et al. 1967; Haacke 1969).

Das Lebensalter der Tiere ist ebenso von Bedeutung. Von Föten oder Neonaten werden hohe Dosen (75 und 100 mg STZ /kg KG) besser toleriert als von älteren Tieren. Bei Letzteren steigt die Mortalitätsrate. Im Gegensatz dazu kommt es bei Neonaten kaum zu Todesfällen nach der STZ-Applikation. Eine perinatale STZ-Behandlung erzeugt einen weniger schweren Verlauf der Erkrankung als eine Applikation bei juvenilen und adulten Tieren. Als mögliche Ursache wird eine noch ungenügende Differenzierung der Rezeptoren an den Zellen diskutiert, um STZ in den Zellen anzureichern. So scheint die hohe Regenerationsfähigkeit der fötalen/neonatalen Zellen die Beta-zell-Schäden kompensieren zu können (Portha, Levacher et al. 1974; Portha, Picon et al. 1979; Bonner-Weir, Trent et al. 1981; Pascoe and Storlien 1990; Wang, Bouwens et al. 1996).

Als Applikationsweg für das STZ ist am häufigsten die intravenöse Gabe unter Narkose gewählt. Daneben wird aber auch die intraperitoneale Applikation sowohl an narkotisierten als auch an wachen Tieren vorgenommen. Die bevorzugte Spezies aller gängigen Versuchstiere sind Ratten (Cam, Rodrigues et al. 1999).

In der in dieser Arbeit beschriebenen Studie wurde den Ratten 65mg/kg KG STZ intravenös verabreicht.

## 1.2 Das Endothelinsystem

### 1.2.1 Entdeckung der Endotheline

1988 wurde von Yanagisawa aus dem Überstand von kultivierten Aortenzellen des Schweins ein Peptid isoliert, welches vasoaktive Eigenschaften aufwies (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). Endothelin besitzt eine 10-100 fach starke vasokonstriktorische Wirkung als Angiotensin II und Noradrenalin und ist damit das stärkste vasokonstriktorische Hormon im menschlichen Körper (Luscher and Barton 2000; Maguire and Davenport 2002). Der Name Endothelin leitet sich von seinem Bildungsort dem Endothel ab.

Zwei weitere Isoformen wurden ein Jahr später von Inoue et al. identifiziert. Das von Yanagisawa entdeckte Endothelin wurde Endothelin-1 (ET-1) genannt, die beiden weiteren Isoformen wurden Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). Die Endotheline sind aus 21 Aminosäuren aufgebaut (Molmasse 2,5 kD). Sie unterscheiden sich nur durch geringfügige Unterschiede in der Primärstruktur (Inoue, Yanagisawa et al. 1989) und besitzen alle drei eine charakteristische Haarnadelform, bedingt durch zwei Sulfidbrücken (siehe Abb. 2.)

Endotheline sind autokrin und parakrin wirkende Gewebshormone, die eine hohe Sequenz -und Bioaktivitätshomologie mit der Familie der Peptidtoxine und der Sarafotoxine (Schlangengift) aufweisen. Es ist wahrscheinlich, dass diese beiden Peptidfamilien einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben (Kloog and Sokolovsky 1989; Landan, Bdolah et al. 1991).

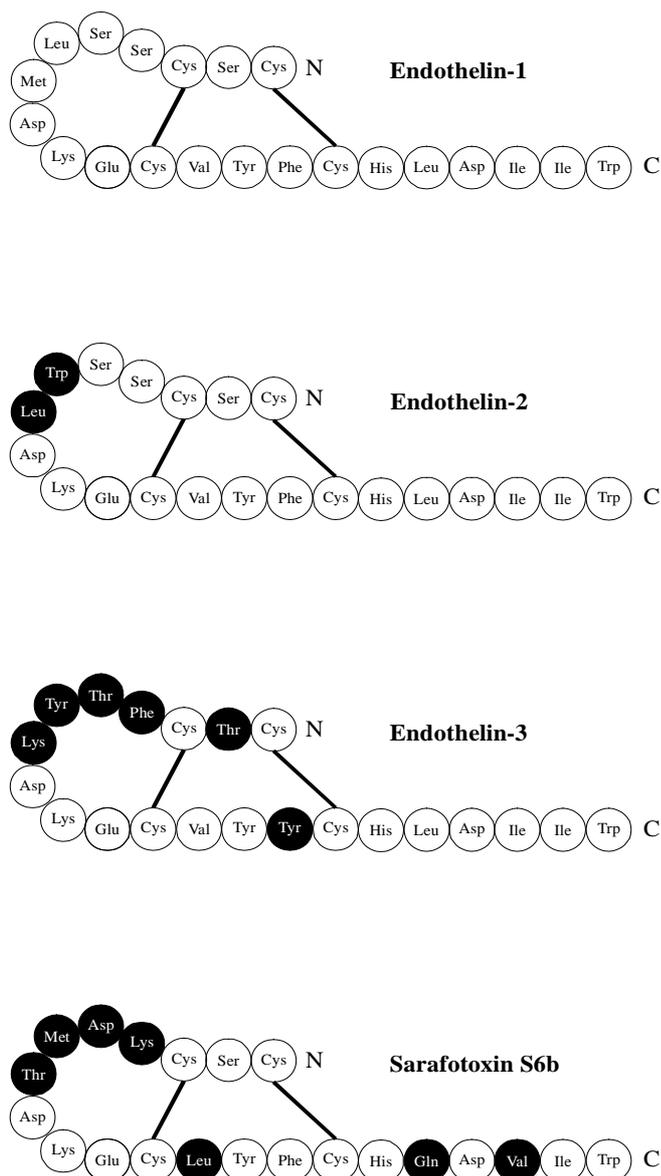


Abbildung 2: Strukturformeln des Endothelin-1, Endothelin-2, Endothelin-3 und des Schlangengiftes Sarafotoxin S6b. Die Aminosäuresequenz der von ET-1 abweichenden Aminosäuren sind schwarz dargestellt

### 1.2.2 Genetische Regulation und Abbau des Endothelins

Die Gene der humanen Endotheline (ET-1, ET-2, ET-3) liegen auf den Chromosomen 6, 1 und 20 (Arinami, Ishikawa et al. 1991).

Die Nukleotidsequenz des humanen ET-1 Gens ist vollständig identifiziert (Inoue, Yanagisawa et al. 1989). Das Gen enthält 5 Exons und 4 Introns. Die kodierte Sequenz für ET-1 ist im zweiten Exon enthalten. Die 5'flankierte Region enthält regulatorische Elemente, wie zum Beispiel AP-1 Bindungsstellen für c-fos/c-jun-Komplexe und

Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor nuclear factor-1. Weiterhin enthalten sie eine Bindungsstelle für das GATA-2-Protein (Wilson, Dorfman et al. 1990), einem Transkriptionsfaktor. Dieses Protein spielt eine wesentliche Rolle in der Produktion von ET-1 in endothelialen Zellen.

Aufgrund dieser Bindungsstellen sind viele vaskuläre Proteine, Hormone und Wachstumsfaktoren in der Lage die Transkription des ET-1 Gens zu beeinflussen.

Am 3'Ende der prä-mRNA des transkribierten Gens ist eine Region von 250 Basenpaaren, die hoch konserviert ist (Bloch, Eddy et al. 1989). Dieses Phänomen tritt bei Genen auf, die eine wesentliche Rolle für den Organismus spielen.

Das primäre Transkriptionsprodukt des Endothelings ist Präproendothelin-mRNA. Präproendothelin als Translationsprodukt besteht beim Menschen aus 212 Aminosäuren, woraus nach Spaltung durch spezifische Endopeptidasen das aus 38 Aminosäuren bestehende Proendothelin-1, auch big-Endothelin-1 genannt, entsteht (siehe Abb. 3).

Dieses Proendothelin wird durch ein spezifisches Konversionsenzym dem endothelin-converting-enzyme (ECE) zum biologisch aktiven ET-1 gespalten (Ahn, Beningo et al. 1992; Masaki, Yanagisawa et al. 1992).

Zwei Isoenzyme des ECE (ECE-1 und ECE-2) konnten bereits identifiziert werden (Emoto and Yanagisawa 1995). ECE ist wahrscheinlich spezifisch für big-Endothelin. Die Konversion von big-Endothelin-1 zu Endothelin-1 ist wahrscheinlich essentiell für die biologische Aktivität. Das zeigte die fast vollständige Hemmung der blutdruckmodulierenden Wirkung von exogen zugeführtem big-Endothelin-1 durch die Proteaseinhibitoren Phosphoramidon und FR 901533 (Matsumura, Hisaki et al. 1990).

Die Inhibierung von ECE führt um ein Drittel zu einer Reduktion des ET-Spiegels (Yanagisawa, Hammer et al. 2000), so dass die Existenz weiterer Subtypen welche die Konversion von ET-1 und ET-3 katalysieren, angenommen wird.

Für den Abbau von ET-1 aus dem Plasma sind bisher folgende Mechanismen bekannt. 80% des zirkulierenden ET-1 wird über den ETBR in der Lunge abgebaut. Weitere Eliminationsorte sind in Leber und Niere (Simonson and Dunn 1993; Luscher and Barton 2000; Johnstrom, Fryer et al. 2005).

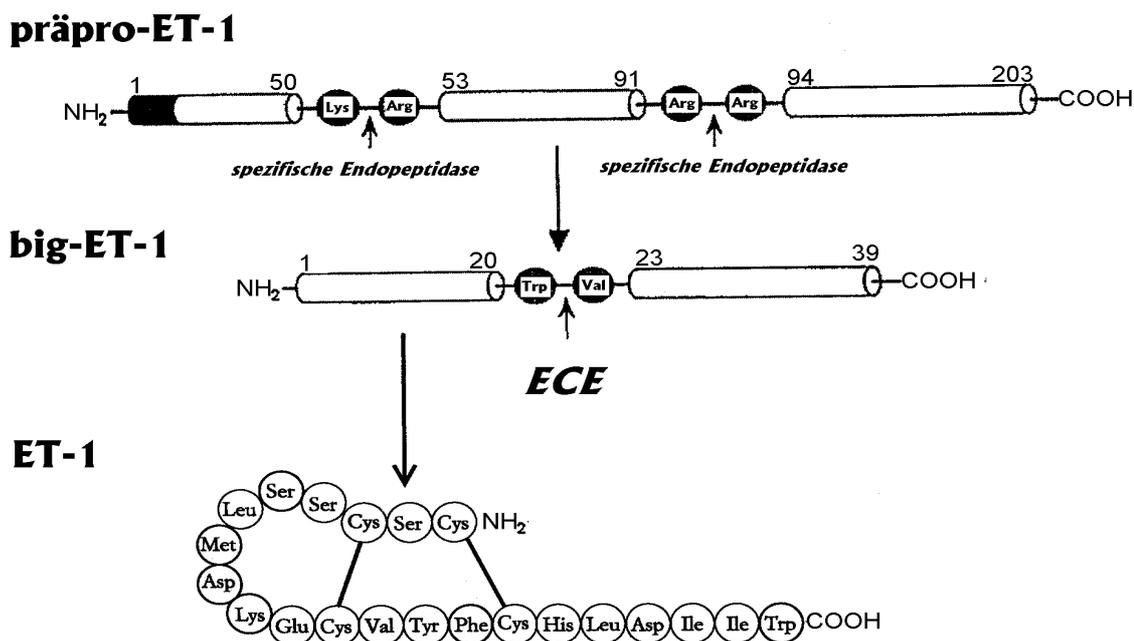


Abbildung 3: Biosynthese des ET-1 (beim Schwein). Nach der Spaltung des Präpro-ET-1 durch eine spezifische Endopeptidase wird big-ET-1 durch das ECE zu reifem ET-1 umgewandelt.

### 1.2.3 Vorkommen und Wirkung des Endothelins

Außer dem Endothel als Synthesort für ET-1 konnte überzeugend gezeigt werden, dass auch von Zellen der Niere, der Leber, des zentralen und peripheren Nervensystem, des Herzens, der Lunge, des Gastrointestinaltrakts, der Nebennieren, der Prostata, der Augen und der Epidermis ET-1 gebildet wird (Lee, de la Monte et al. 1990; Martin, Brenner et al. 1990; Masaki, Yanagisawa et al. 1992; Langenstroer, Tang et al. 1993; Simonson and Dunn 1993; Imokawa, Kobayashi et al. 1997).

In den einzelnen Organen ist die Syntheserate der Endothelinisopeptide sehr unterschiedlich. So konnte gezeigt werden, dass ET-3 vornehmlich im zentralen Nervensystem, der Hypophyse und dem Darm exprimiert wird (Matsumoto, Suzuki et al. 1989). ET-1 hingegen wird hauptsächlich vom Endothel der Gefäße gebildet (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988; Masaki, Yanagisawa et al. 1992). Das synthetisierte ET-1 wird zu 80% nach basolateral und zu 20% nach luminal sezerniert (Wagner, Christ et al. 1992; Hocher, Thone-Reineke et al. 1997).

Auf die Freisetzung von Endothelin in den unterschiedlichen Geweben der Niere wird im Abschnitt „Endothelin und Niere“ genauer eingegangen.

Eine Reihe von Faktoren regulieren die Freisetzung von ET-1 (siehe Tabelle 1). Die Regulierung erfolgt über Präpro-ET-1-mRNA Synthese (Yanagisawa, Inoue et al. 1988).

<b>1) wichtige physiologische Stimuli für die Präpro-ET-1-mRNA-Synthese</b>	- Angiotensin II - <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> (TGF- $\beta$ ) - Thrombin - Gefäßwandspannung - Hypoxie	- (Barton, Shaw et al. 1997) - (Zoja, Orisio et al. 1991) - (Zoja, Orisio et al. 1991) - (Milner, Bodin et al. 1990) - (Kourembanas, Marsden et al. 1991)
<b>2) weitere Peptide zur Stimulierung der Präpro-ET-1-mRNA Synthese</b>	- Adrenalin - Bradykinin - Vasopressin - epidermal growth factor (EGF) - VLDL und LDL - Insulin - Glukose - insulin-like growth factor-1 (IGF-1) - Thromboxan A2 - Zytokine - bakterielle Endotoxine - Cortisol	- (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988) - (Marsden, Dorfman et al. 1991) - (Bakris, Fairbanks et al. 1991) - (Casey, Word et al. 1991) - (Boulanger, Tanner et al. 1992; Horio, Kohno et al. 1993) - (Oliver, de la Rubia et al. 1991) - (Yamauchi, Ohnaka et al. 1990) - (Matsumoto, Suzuki et al. 1990) - (Ikejiri, Endo et al. 1990) - (Zoja, Orisio et al. 1991) - (Sugiura, Inagami et al. 1989) - (Kanse, Takahashi et al. 1991)
<b>Pharmaka, die eine Zunahme von ET-1 bewirken</b>	- Cyclosporin A - FK 506 - Ca <sup>2+</sup> -Ionophoren	- (Nakahama 1990) - (Takeda, Yoneda et al. 1993) - (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988)
<b>Inhibitoren des ET-Systems</b>	- Stickstoffmonoxid (NO)	- (Boulanger and Luscher 1990) - (Boulanger and Luscher 1991)

---

- ANP	- (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988)
- Prostacyclin	- (Milner, Bodin et al. 1990)
- Niedrige Scherkräfte	- (Yokokawa, Kohno et al. 1993)
- Heparin	-

Tabelle 1: tabellarische Darstellung über die Stimuli und Inhibitoren für die Produktion von ET-1

Der wichtigste physiologische Inhibitor der ET-1 Synthese ist Stickstoffmonoxid (NO), wie in Tabelle 1 dargestellt. Über seinen second messenger cGMP hemmt es die Präpro-ET-1-mRNA. Der stärkste endogene Vasodilatator NO und ET-1 bilden einen parakrinen und autokrinen Regelkreis mit negativer Rückkopplung. Dabei inhibiert NO über cGMP die thrombinstimulierte ET-1-Synthese und ET-1 stimuliert die NO-Synthese über den ETBR (Yanagisawa, Inoue et al. 1988).

ET-2 ist im menschlichen Plasma nicht nachweisbar (Suzuki, Matsumoto et al. 1989), kommt aber bei Tieren in der Niere und im Darm vor, ohne dass seine funktionelle Bedeutung geklärt ist.

ET-3 wird hauptsächlich im menschlichen Darm und im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert (Matsumoto, Suzuki et al. 1989; Shinmi, Kimura et al. 1989), nicht dagegen im Endothel oder in den Herzmuskelzellen (Howard, Plumpton et al. 1992).

In großen Teilen des Gefäßsystems wirkt ET-1 nach einer vorübergehenden Dilatation konstringierend (Cocks, Broughton et al. 1989; Inoue, Yanagisawa et al. 1989). So konnte bereits früh nach Entdeckung des Endothelins gezeigt werden, dass die Gefäßkonstriktion nach Bolusgabe von ET-1 in überphysiologischen Dosen zu einer mehr als 60 min anhaltenden Blutdruckerhöhung führt (Inoue, Yanagisawa et al. 1989). Neben den oben genannten Wirkungen hat ET-1 auch einen wichtigen Stellenwert als Faktor zur Stimulation und Regulierung von Zellwachstum, Differenzierung und Entwicklung.

In ET-1-knockout-Experimenten an Mäusen zeigten sich kraniofaziale und kardiovaskuläre Missbildungen, die bei homozygoten Tieren nicht mit dem Leben vereinbar sind. (Kurihara, Kurihara et al. 1994).

In vivo konnte eine ET-1 induzierte Fibroblastenproliferation nachgewiesen werden, auf Rattennierenfibroblasten, humane dermale- und Bruststromafibroblasten (Battistini, Chailer et al. 1993).

Weitere proliferative Effekte konnten bei Rattenmesangiumzellen, Rattenosteoblasten, astrozytischer Rattenglia, Rindergehirn-Kapillarendothelzellen, humanen Melanozyten, humanen Keratinozyten (Bagnato, Venuti et al. 1995) sowie Zona-glomerulosa-Zellen der Ratte und Bronchialepithelzellen (Murlas, Gulati et al. 1995) gezeigt werden.

ET ist wahrscheinlich an der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten beteiligt. Relativ starke experimentelle Evidenzen dafür gibt es u.a. bei folgenden Erkrankungen: Myokardinfarkt, Koronarspasmen, chronische Herzinsuffizienz, akutes Nierenversagen, Cyclosporinnephrotoxizität, Raynaud-Phänomen, Asthma, primäre pulmonale Hypertension, Subarachnoidalblutung (Ortega Mateo and de Artinano 1997).

Da sich die vorliegende Arbeit im Besonderen mit der Wirkung des ET-1 auf die Nierenfunktion befasst, gehe ich in dem Kapitel: „Endothelin und Niere“ gesondert auf die Wirkungsweise des Endothelins an der Niere ein.

## 1.2.4 Die Endothelinrezeptoren

Über membranständige Rezeptoren vermittelt Endothelin seine biologischen Wirkungen (siehe Abb. 4). Man unterscheidet bisher drei Rezeptorsubtypen, den Endothelin-A-Rezeptor (ETAR), Endothelin-B-Rezeptor (ETBR) und Endothelin-C-Rezeptor (ETCR). Der ETCR wurde bisher nur am Xenopusherz beschrieben (Kumar, Mwangi et al. 1994) und beim Säuger im Kleinhirn (Levesque, Moore et al. 1994). Wahrscheinlich handelt es sich um eine Speziesvariante des ETAR oder ETBR (Bax and Saxena 1994). Für den Menschen sind nur ETAR und ETBR relevant. Die drei Rezeptorsubtypen gehören zur Familie der rhodopsinähnlichen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Haendler, Hechler et al. 1992; Arai, Nakao et al. 1993). Die Rezeptordichte wird durch den Rezeptorliganden (ET-1) bestimmt.

Die Endothelinrezeptoren unterscheiden sich in ihrer Bindungsaffinität zu den Endothelinisopeptiden wie folgt:

ETAR : ET-1  $\geq$  ET-2  $\gg$  ET-3

ETBR : ET-1 = ET-2 = ET-3

ETCR : ET-3  $\gg$  ET-2 > ET-1

Nach Bindung von ET an den Rezeptor erfolgt eine schnelle Internalisierung des ET-Rezeptorkomplexes (Resink, Scott-Burden et al. 1990). Es gibt einen autokrinen Feedbackmechanismus, bei dem die ET-Rezeptorexpression über die Verfügbarkeit von ET-1 reguliert wird (Clozel, Loffler et al. 1993).

### 1.2.4.1 Der ETAR

Der ETAR besteht aus 427 Aminosäuren und findet sich überwiegend auf glatten Gefäßmuskelzellen, wo er für die endothelininduzierte Vasokonstriktion verantwortlich ist (Bohm, Pernow et al. 2003) und an glomerulären Mesangiumzellen und in Kardiomyozyten (Molenaar, O'Reilly et al. 1993). Außerdem konnte der ETAR in Kolon, Lunge und Plazenta nachgewiesen werden. Keine m-RNA von ETAR konnte in Endothelzellen und Leber nachgewiesen werden (Hosoda, Nakao et al. 1991).

Der ETAR aktiviert über spezifische G-Proteine die Phospholipase C, dabei werden Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol gebildet. IP3 bewirkt eine intrazelluläre

Kalziumfreisetzung, die zu einer unmittelbaren Beteiligung an der ET-1 vermittelten Muskelkontraktion führt (siehe Abbildung 4). Diazylglyzerol aktiviert außerdem die Proteinkinase C, was wahrscheinlich einen Teil des Mechanismus der proliferationsstimulierenden Wirkung (Mitogenität) von ET-1 am ETAR darstellt. Das wurde bisher in vitro an Zellkulturen von Mesangiumzellen (Simonson and Dunn 1993), von glatten Gefäßmuskelzellen und von Fibroblasten (Takuwa, Masaki et al. 1991; Trenkner, Priem et al. 2002) gezeigt.

Für den ETAR konnte ein Einfluss auf den Zellzyklus und die Expression von Protoonkogenen nachwiesen werden. ET-1 induziert dabei über den ETAR die Expression von Proto-Onkogenen (c-fos,c-myc,c-jun) (Simonson and Dunn 1993) und wirkt demnach stark mitogen auf Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten und glomeruläre Mesangiumzellen (Simonson and Dunn 1993; Bogoyevitch, Glennon et al. 1994).

#### **1.2.4.2 Der ETBR**

Der ETBR besteht aus 442 Aminosäuren findet sich hauptsächlich an Endothelzellen der Gefäße und bewirkt dort vor allem eine Vasodilatation (Batra, McNeill et al. 1993). Er findet sich aber auch in der Niere an Tubuluszellen und Glomerula sowie am ZNS und an der Lunge (Ogawa, Nakao et al. 1991).

Der ETBR aktiviert neben der Phospholipase C auch Phospholipase A2. Dies führt zu einer Freisetzung von Arachnoidonsäurederivaten (insbesondere Prostacyclin).

Die Aktivierung der Phospholipase C hat über die intrazelluläre Erhöhung der Kalziumkonzentration eine Aktivierung der kalziumabhängigen NO-Synthase zur Folge (siehe Abbildung 4). Damit wird die initiale Vasodilatation durch die Freisetzung von NO bewirkt (Bax and Saxena 1994).

Weiterhin fördert er die Natriumausscheidung und die Diurese im renalen Tubulus (Garipey, Ohuchi et al. 2000). Studien lassen vermuten, dass der aktive ETBR tonisch den epithelialen Natriumkanal (eNaC) hemmt und dadurch zu einer Natrium -und Wasserexkretion in den Primärharn führt (Gallego and Ling 1996; Hocher and Paul 2000). In gesunden Mäusen konnte gezeigt werden, dass der durch ETBR-Antagonisten erzeugte Hypertonus durch einen unselektiven Cyclooxygenase-Inhibitor (Indomethacin) gehemmt werden kann (Ohuchi, Kuwaki et al. 1999). In gesundem Gefäßendothel ist nur die Cyclooxygenase COX-1 nachweisbar. Die durch Zytokine induzierbare Isoform (COX-2) ist in den Gefäßendothelien bei entzündlichen

Veränderungen, wie z.B. in entzündlichen Plaques nachweisbar (Schonbeck, Sukhova et al. 1999). Demnach wird das von ET-1 induzierte Prostacyclin wahrscheinlich über COX-1 in gesunden Gefäßen vermittelt und schwächt den vasokonstriktorischen Effekt von ET-1 ab (de Nucci, Thomas et al. 1988; Hirata and Emori 1993).

In anderen Gefäßregionen wie z.B. den Koronararterien des menschlichen Herzens wirkt ET-1 als Vasokonstriktor (Russell, Skepper et al. 1997), da der ETBR auf dem Gefäßendothel des Herzens nicht nachweisbar ist und somit die Wirkung ETAR vermittelt ist.

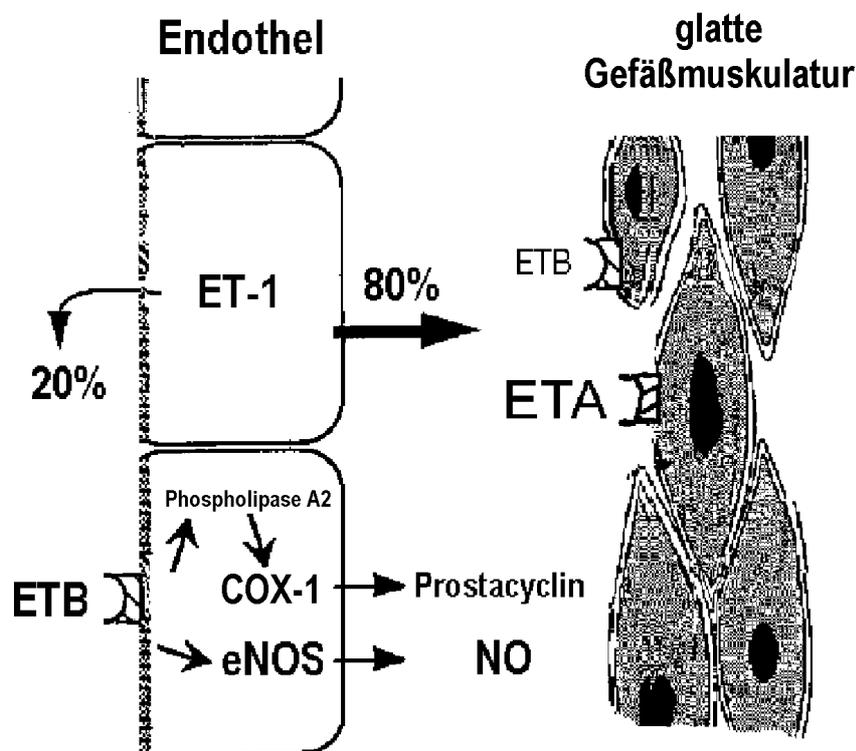


Abbildung 4: ET-System der Arterienwand: Das in den Endothelzellen synthetisierte ET-1 wird zu 80% nach basolateral und zu 20% nach luminal sezerniert. Der ETBR auf den Endothelzellen vermittelt über die Phospholipase A<sub>2</sub> cyclooxygenaseabhängig (COX-1) und über die endotheliale NO-Synthase die ET-1 induzierte Vasodilatation. Auf den glatten Gefäßmuskelzellen wird überwiegend der ETAR exprimiert, welcher die Vasokonstriktion vermittelt. In einigen Gefäßregionen ist der ETBR auch auf glatten Gefäßmuskelzellen nachweisbar und vermittelt hier eine Vasokonstriktion.

Auch bei der Stimulation der Apoptose spielt der ETBR eine wichtige Rolle. Dies konnte für humane Melanomzellen und glatte Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden (Okazawa, Shiraki et al. 1998; Cattaruzza, Dimigen et al. 2000).

Eine wichtige Funktion des ETBR ist die Clearance von ET-1 aus dem zirkulierenden Blut. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des ETBR in Ratten zu einer Zunahme des ET-1 im Plasma führt, und in ETBR-defizienten Mäusen konnte eine herabgesetzte Clearance von radioaktiv markiertem ET-1 belegt werden (Fukuroda, Fujikawa et al. 1994).

### **1.2.5 Endothelin und Niere**

Für das Verständnis der Wirkungsweise von ET-1 in der Niere ist die Verteilung der Rezeptoren von besonderer Bedeutung. So zeigen Glomerula und die innere Medulla reichlich Bindungsstellen für ET-1 auf (Kohzuki, Johnston et al. 1989; Hocher, Rohmeiss et al. 1995).

Die glomerulären Bindungsstellen befinden sich hauptsächlich in Mesangiumzellen, Endothelzellen und Arteriolen, die medullären hingegen im Bereich der Henleschen Schleife und den Sammelrohren. In der Rattenniere ließ sich als überwiegender Rezeptor in den Glomerula und Tubuli der ETBR identifizieren (Hocher, Rohmeiss et al. 1995).

ETAR-mRNA wird in den afferenten und efferenten Arteriolen der Glomerula exprimiert. (Simonson and Dunn 1993). ETAR wurde auch im Bereich der Vasa recta und Arteriae arcuatae nachgewiesen (Terada, Tomita et al. 1992). Mesangiumzellen exprimieren ETAR und ETBR (Sugiura, Inagami et al. 1989; Takeda, Yoneda et al. 1993)

Das Gefäßbett der Niere ist ungefähr 10 mal sensitiver bezüglich der vasokonstriktischen Effekte von ET-1 als andere Gefäßgebiete (Madeddu, Yang et al. 1990). Die systemische Gabe niedriger Dosen von ET-1 rufen eine kurzfristige renale Vasodilatation hervor, gefolgt von einer langanhaltenden Vasokonstriktion (Marsen, Schramek et al. 1994).

Nach Gabe niedriger Dosen von ET-1 kommt es zu einem leichten Abfall der GFR sowie zu einem Anstieg der Natriumausscheidung (Hoffman, Grossman et al. 1990). Der beobachtete GFR-Abfall lässt sich über die Konstriktion der afferenten und efferenten Arteriolen und dem darausfolgendem Anstieg des renalen vaskulären

Widerstands und einer Reduktion des renalen Plasmaflusses erklären (Hirata, Fukuda et al. 1989).

Während höhere Dosen ET-1 auch zu Natrium-Retention führen können, steigt die Natrium-Exkretion durch geringe ET-1-Dosen an (Flowers and Marsden 1994).

Endothelzellen in der Niere synthetisieren ET-1 (Marsden, Dorfman et al. 1991). Bei Mesangiumzellen in Kultur wurde die Synthese und Freisetzung von ET-1, wenn auch in deutlich geringeren Mengen als bei kultivierten Endothelzellen, nachgewiesen (Zoja, Orisio et al. 1991; Kohan and Padilla 1992). Mesangiumzellen sind demnach wie die phylogenetisch verwandten glatten Gefäßmuskelzellen in der Lage, ET-1 zu bilden (Resink, Scott-Burden et al. 1990).

Für glomeruläre epitheliale Zellen wurde gezeigt, dass sie sowohl ET-1 als auch ET-3 freisetzen können (Kurihara, Kurihara et al. 1994). Bezüglich tubulärer epithelialer Zellen wurde beschrieben, dass die innere Medulla die höchste Konzentration an ET-1 im Körper aufweist (Kitamura, Tanaka et al. 1989). Im Bereich des Sammelrohrs befinden sich die Zellen, die hauptsächlich für diese hohen ET-1- Konzentrationen verantwortlich sind (Ujiie, Terada et al. 1992).

Die Interpretation der renalen Effekte von ET wird insofern erschwert, als dass systemische Infusion hoher ET-Dosen eher eine pharmakologische als eine physiologische Reaktion hervorruft, da ET-1 als parakrines Hormon in der Niere wirkt.

Das ET-System wird bei einer Vielzahl von nephrologischen Erkrankungen aktiviert, wie dem akuten Nierenversagen, der Lupusnephritis, der diabetischen Nephropathie und Nierenerkrankungen, die mit Fibrose einhergehen (Shibouta, Suzuki et al. 1990; Fukui, Nakamura et al. 1993; Nakamura, Ebihara et al. 1993; Tharoux, Chatziantoniou et al. 1999). ET-1 wird in neueren Studien auch als Marker für das Ausmaß der Nierenschädigung verwendet (Tharoux, Hagege et al. 2005).

Ebenso ist ET-1 in der Lage Zell-Matrix-Interaktionen zu modulieren und die Produktion von Fibronectin und Kollagen Typ IV in Mesangiumzellen zu erhöhen. Weiterhin werden matrixstimulierende Faktoren wie tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet derived growth factor (PDGF) und epidermal growth factor (EGF) in glatten Muskelzellen induziert (Ruiz-Ortega, Gomez-Garre et al. 1994).

## Endothelin als Mediator der Nierenfibrose

Bei experimentellen Glomerulosklerosemodellen findet sich häufig ein aktiviertes renales Endothelinsystem sowie bei Patienten mit chronisch fibrosierenden Nierenerkrankungen (Murer, Zacchello et al. 1994; Roccatello, Mosso et al. 1994).

Es gibt einige Studien, die daraufhinweisen, dass der ETAR an der Nierenfibrose beteiligt ist. So konnte nachgewiesen werden, dass durch ETAR-Antagonisten die ET-1 induzierte Matrixsynthese von Mesangiumzellen in vitro hemmbar ist (Ishida, Saeki et al. 1992).

Tierexperimente konnten für einen ETAR-Antagonist sowie einen kombinierten ETAR/ETBR-Antagonisten zeigen, dass sie günstige Effekte auf die Progression der DN haben. Sie verbessern die Protein- und Albuminausscheidung und reduzieren die Synthese von Matrixproteinen bei diabetischen Tieren (Dhein, Hochreuther et al. 2000; Hocher, Schwarz et al. 2001).

Aber es gibt eine Vielzahl an Studien, die den ETBR für den entscheidenden Rezeptor bei der Entwicklung der Nierenfibrose sehen. In vitro weisen Studien darauf hin, dass der ETBR das Wachstum von Fibroblasten und die Kollagensynthese vermittelt (Ong, Newby et al. 2003).

Die positiven antagonistischen Effekte auf die Progression der DN und die Tatsache, dass der ETBR als überwiegender Rezeptor in den Glomerula und Tubuli von Rattennieren zu identifizieren ist (Hocher, Rohmeiss et al. 1995), waren ausschlaggebend für das hier dargestellte Experiment mit dem ETBR-defizienten Rattenmodell.

### 1.2.6 Endothelin und Hypertonie

Alle drei Endothelinopeptide führen nach intravenöser Injektion zu einem mehrere Sekunden andauernden Blutdruckabfall (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). Diese Reaktion ist, wie bereits im Kapitel zuvor ausgeführt, ETBR vermittelt, über die Stimulation der NO-Synthasen und der Prostacyclin-Synthese. Der einige Stunden anhaltende Blutdruckanstieg ist der vasokonstriktorischen Wirkung des ETAR durch der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in den glatten Gefäßmuskelzellen zuzuschreiben (King, Brenner et al. 1989). Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine

ETBR-abhängige Vasokonstriktion vor allem in renalen Arterien (Widimsky, Horky et al. 1991; Clozel, Gray et al. 1992; Pollock and Opgenorth 1993; Clozel and Gray 1995). Der Verlauf der Endothelinwirkung auf den Blutdruck ist durch die ET-Rezeptorverteilung und durch die unterschiedlichen Effektor-Proteine in den Zellen der Gefäßwand erklärbar. Die über den ETBR auf dem Gefäßendothel stimulierte NO- und Prostacyclin-Freisetzung beginnt rascher und ist schneller erschöpfbar. Die vornehmlich über den ETAR auf glatten Gefäßmuskelzellen vermittelte Vasokonstriktion beginnt hingegen langsamer und ist länger anhaltend (Hirata 1993).

Bei Menschen mit essentieller Hypertonie ist die vasokonstriktorische Antwort auf endogenes ET-1 gegenüber normotensiven Menschen verstärkt (Taddei, Virdis et al. 1999). Dies ließ sich auch durch ein größeres Ausmaß der Vasodilatation nach Gabe eines ETAR/ETBR -Antagonisten an Gefäßen des menschlichen Unterarms in vivo gegenüber normotensiven Kontrollen zeigen. (Cardillo, Kilcoyne et al. 1999).

Gleiches konnte auch durch Bosentan, einen oral verfügbaren, gemischten ETAR/ETBR-Antagonisten, gezeigt werden. Er senkt bei Gabe über 4 Wochen den Blutdruck bei Menschen mit essentieller Hypertonie (Krum, Viskoper et al. 1998). Die Senkung des Blutdrucks wurde in dieser Studie in einem Ausmaß erzielt, wie er durch einen ACE-Inhibitor (Enalapril) zu erwarten war. Die Autoren der Studie schlussfolgern aus diesem Ergebnis eine mögliche pathogenetische Rolle von Endothelinen bei der essentiellen Hypertonie des Menschen.

In einer weiteren Studie mit dem selektiven ETAR-Antagonisten (Darusentan) konnte die Behandlung über 6 Wochen eine Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks zeigen im Vergleich zu Placebo (Nakov, Pfarr et al. 2002).

In einer weiteren Studie mit Bosentan und einem selektiven ETAR-Antagonisten gelang der Nachweis, dass die kurzzeitige systemische Gabe zu einem signifikanten Abfall des Blutdrucks führte, aber die Antagonisten zeigten hier einen geringeren oder keinen Effekt auf den Blutdruck bei normotensiven Kontrollen (Bunting and Widdop 1999). Bei Haynes et al. 1996 gelang der Nachweis, dass auch in gesunden Menschen die Gabe des unselektiven ETAR/ETBR-Antagonisten TAK-044 zu einer Abnahme des arteriellen Blutdrucks und des totalen peripheren Widerstandes führt, was auf eine Beteiligung des endogenen ET-1 bei der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und des arteriellen Blutdrucks hindeutet (Haynes, Ferro et al. 1996).

Weiterhin fällt auf, dass bei chronischer Applikation von Bosentan im spontan hypertensiven Rattenmodell sich kein Effekt auf den Blutdruck zeigen lässt (Li, Knafo et al. 1996). Die Ursache für den unterschiedlichen Effekt von akuter und chronischer Blockade des parakrinen Endothelin-Systems bleibt unklar. Zum einen spielt möglicherweise die Abnahme gegenregulatorischer Mechanismen (wie z.B. die Abnahme der NO-Synthese) oder die Zunahme der Endothelinrezeptoren, bzw. eine Zunahme der ET-abhängigen Signaltransduktionskette bei chronischer Blockade des Endothelinsystems eine wichtige Rolle. Es könnte aber auch die Blockierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) von Bedeutung sein, da bekannt ist, dass ET-1 in vitro die Reninfreisetzung an juxtaglomerulären Zellen zu inhibieren vermag (Moe, Tejedor et al. 1991).

Die ET-1 Konzentration im Plasma ist bei Menschen mit essentiellen Hypertonus normal, es zeigt sich allerdings eine lokal erhöhte Konzentration von ET-1 in der Gefäßwand bei Hypertonie (Barton, Shaw et al. 1997).

Ein Unterschied der ET-1 Plasmakonzentrationen zwischen normotensiven Menschen unterschiedlicher ethnischer Gruppen in Ruhe und bei der Reaktion auf akuten Stress konnte ebenso gezeigt werden. Schwarze Amerikaner zeigen höhere ET-1 Plasmakonzentrationen und arterielle Blutdrücke, während und nach einer akuten Stresssituation als Amerikaner mit weißer Hautfarbe (Treiber, Jackson et al. 2000; Campia, Cardillo et al. 2004).

Eine Aktivierung des Endothelin-Systems konnte in verschiedenen experimentellen Hochdruckmodellen nachgewiesen werden. Dies sind insbesondere Hochdruckmodelle, die eine Hypertonie durch Salzbelastung hervorrufen (Lariviere, Deng et al. 1995; Schiffrin, Lariviere et al. 1995; Ikeda, Ohta et al. 1999; Garipey, Ohuchi et al. 2000). Auch bei Menschen, die unter einer salzsensitiven arteriellen Hypertonie leiden, konnte eine Aktivierung des vaskulären Endothelin-Systems nachgewiesen werden (Ferri, Bellini et al. 1997). Zur genaueren Klärung der primären physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung des Endothelin-Systems entwickelte man transgene Tiermodelle (Garipey, Ohuchi et al. 2000; Hoher and Paul 2000). Diese Studien konnten zeigen, dass die Ratten mit einer ETBR-Defizienz bei salzreicher Diät hypertensiv sind, weil ihnen wahrscheinlich die normale tonische Inhibition des epithelialen Natriumkanals (eNaC) fehlt. Damit kommt es zur Rückresorption von Natrium und somit zum Hypertonus. Die Regulierung des eNaC scheint somit ETBR vermittelt zu sein.

Daraus lässt sich ableiten, dass das Endothelinsystem auch eine wichtige Rolle in der Natrium- und Volumenregulation spielt.

Dass bei hypertensiven Patienten eine Korrelation zwischen dem Plasma-ET-1-Spiegel und dem Grad der Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (Kohno, Murakawa et al. 1991), sowie dem Grad der Arteriosklerose (Lerman, Holmes et al. 1995) besteht, konnte ebenfalls gezeigt werden.

### **1.3 Regulationsmechanismen des Blutdrucks**

#### **1.3.1 Das NO-System**

Der wichtigste Inhibitor der ET-1 Synthese ist der physiologische Gegenspieler Stickstoffmonoxid (NO). NO wird aus der Aminosäure L-Arginin durch NO-Synthasen (NOS) gebildet und zeichnet sich durch eine Vielzahl von renalen und extrarenalen physiologischen und pathologischen Wirkungen aus.

NO diffundiert aus den Endothelzellen sowohl in das Gefäßlumen als auch in die glatte Muskulatur der Gefäßwand. NO führt zur Modulation des Blutdruckes, indem die lösliche Guanylatcyclyase in der glatten Muskulatur aktiviert wird und somit durch die Bildung von cGMP aus GTP (durch Abspaltung von Pyrophosphat) über Phosphorylierung verschiedener Enzyme und Senkung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der glatten Muskelzelle eine Vasodilatation bewirkt (Kukovetz and Holzmann 1985).

Über seinen "second messenger" cGMP hemmt NO die Bildung der präpro-ET-1 mRNA. Ebenso stimuliert ET-1 durch Interaktion mit dem ETBR die Synthese von NO. So führt an endothelialen Zellen eine ETBR vermittelte Stimulation zur Aktivierung der kalziumsensitiven konstitutiven NO-Synthasen (de Nucci, Thomas et al. 1988; Hirata and Emori 1993). Die Freisetzung von NO erklärt die initiale Vasodilatation bei Infusionsexperimenten mit ET-1 (Bax and Saxena 1994). NO und ET-1 bilden daher einen lokalen negativ-rückgekoppelten Regelkreis.

Die NO-Synthasen (NOS) gehören zur Gruppe der NADPH-abhängigen Dioxigenasen, die durch Strukturanaloga des L-Arginin (z.B. L-NAME) gehemmt werden können (Navarro, Sanchez et al. 1994).

Es sind drei unterschiedlich exprimierte und regulierte Isoformen der NO-Synthasen bekannt. Die NO-Synthasen können sowohl über den ETBR als auch über den ETAR aktiviert werden.

Die neuronale NOS (nNOS) wurde zuerst aus Nervenzellen isoliert, kommt aber auch in anderen Geweben (z.B. Nierengewebe) vor. Die epitheliale NOS (eNOS) wird in Zelltypen des kardiovaskulären Systems exprimiert, hauptsächlich in den Endothelzellen (Ignarro and Kadowitz 1985; Knowles and Moncada 1992; Stamler, Singel et al. 1992).

Die nNOS und eNOS sind im Wesentlichen für die Botenstofffunktionen von NO unter physiologischen Bedingungen verantwortlich. Sie werden unter anderem durch Endothelin, Acetylcholin, Glutamat, ATP, Schubspannung, Thrombin und Bradykinin aktiviert (Ignarro and Kadowitz 1985; Knowles and Moncada 1992).

Die dritte bekannte Isoform ist die induzierbare NOS (iNOS) und wird unter basalen Bedingungen nicht exprimiert, sondern wird u.a. in Leukozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße nur nach Stimulation mit inflammatorischen Reizen, wie bakteriellen Lipopolysacchariden und Zytokinen mit einer Verzögerung von mehreren Stunden induziert (Lowenstein, Dinerman et al. 1994).

Unter physiologischen Bedingungen hat NO in der Niere für die Regulation der glomerulären Ultrafiltration (Baylis, Handa et al. 1990; Zatz and de Nucci 1991), der tubulären Reabsorption und des tubuloglomerulären Feedback-Systems eine große Bedeutung (Vallon and Thomson 1995). Die Macula densa ist der Sensor des tubuloglomerulären Feedbacks, eine lokale Hemmung der NOS in der Macula densa führt zu einem Abfall des glomerulären Kapillardruckes, bedingt durch Konstriktion des Vas afferens (Wilcox, Welch et al. 1992). Metabolite des NO-Systems wie Nitrat und Nitrit sind als Marker für die Produktion von NO im Urin nachweisbar.

### **1.3.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulierung. Bei einem starken Blutdruckabfall oder durch eine mechanische Drosselung der Nierendurchblutung wird im juxtaglomerulären Apparat das Gewebshormon Renin ausgeschüttet. Dieses führt zu einer vermehrten Bildung von Angiotensin II, das neben einer starken Vasokonstriktion auch die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere bewirkt. Unter dem Einfluss von Aldosteron wird die

Natrium aus dem distalen Tubulus rückresorbiert und damit, osmotisch bedingt, weniger Flüssigkeit ausgeschieden. Die Folge ist eine Erhöhung des Blutdrucks.

Effekte durch ET auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ließen sich in Tiermodellen nachweisen. Bei Tieren erhöht ET-1 die Serumkonzentrationen von ADH, ACTH, Aldosteron, Kortisol, Renin und Katecholaminen (Otsuka, Mikami et al. 1989).

Die Blutdruckerhöhung bei Ratten nach Angiotensin-II-Infusion kann durch Gabe von ET-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden, was die Vermutung zulässt, dass ein großer Teil der Angiotensin-II-Wirkung über ET-1 vermittelt wird (Rajagopalan, Laursen et al. 1997). Der Zusammenhang von Endothelin-System und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist komplex und ihr Zusammenspiel noch nicht sicher geklärt. Durch exogen infundiertes Angiotensin II ist das Endothelin-System offensichtlich stimulierbar, wohingegen eine endogene Überexpression von Angiotensin II das blutdruckregulierende, vaskuläre Endothelin-System nicht involviert (Schiffrin 1999).

## 1.4 Transgene Tiermodelle

Mit Hilfe verschiedener transgener Techniken wurden Tiermodelle mit einer Defizienz oder einer Überexpression des Endothelin-Systems generiert (Hochoer and Paul 2000; von Websky, Heiden et al. 2009). Eine der ersten Untersuchungen des Endothelin-Systems mit transgenen Techniken war die transiente Transfektion von Ratten mit humanem Präpro-ET-1 mit Hilfe eines hepatotropen adenoviralen Vektors. Es kam zu einer hepatischen Überexpression von Präpro-ET-1 und in der Folge zu 6fach erhöhten ET-1 Plasmakonzentrationen. Diese ektope ET-1 Überexpression führte ähnlich einer ET-1 Infusion zu einem deutlichen Anstieg des arteriellen Blutdrucks, welcher durch ETAR-Antagonisten auf normale Werte senkbar war (Niranjan, Telemaque et al. 1996). Bei ET-1 transgenen Mäusen wurden Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und renale Zysten beschrieben (Hochoer, Thone-Reineke et al. 1997). Diese Ergebnisse machen die mitogene Potenz von ET-1 deutlich.

Heterozygote ET-1 *knockout* Mäuse hingegen zeigen eine leichte Erhöhung des arteriellen Blutdrucks (Kurihara, Kurihara et al. 1994). Diese unerwartete Beobachtung kann zum einen eine Folge der Hypoxie dieser Tiere durch die mit dem *knockout* assoziierten kraniofazialen Mißbildungen der Tiere sein oder sie ist Zeichen einer prädominanten blutdrucksenkenden Wirkung von endogenem ET-1.

Die Ergebnisse aus den beschriebenen Tiermodellen verdeutlichen die Diskrepanz der Befunde bezüglich der Bedeutung der Elemente des Endothelin-Systems in der Regulation des arteriellen Blutdrucks und der diabetischen Nephropathie in verschiedenen transgenen und nicht-transgenen Tiermodellen. Zur Klärung der Bedeutung von endogenem ET-1 und des ETBR sollen die Experimente der vorliegenden Arbeit beitragen.

### 1.4.1 ETBR-defiziente Ratten (ETBRd)

Für die vorliegende Arbeit wurde ein genetisch veränderter Organismus verwendet, der einen lebensfähigen Rattentyp mit funktioneller ETBR-Defizienz darstellt.

Dafür wurde eine Kreuzung von Ratten verwendet, die zufällig durch eine natürliche Deletion von 301bp zwischen dem Exon 1 und dem Intron 1 im ETBR entstanden sind. Diese Tiere sind homozygot nicht überlebensfähig, da sie eine kongenitale Agangliosie haben. Außerdem bilden sie eine gefleckte Haut/Fell (Spotting Lethal, sl) aus, die durch eine Melanozytenregulationsstörung entsteht (Garipey, Williams et al. 1998). Der nicht überlebensfähige Phänotyp dieser Ratten wurde ETBRsl/sl benannt.

Daraufhin wurden Ratten generiert, die durch Mikroinjektion transgen für die Wildtyp-Ratten-cDNA des Ratten-ETBR sind, unter der Kontrolle des humanen Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase Promotor, als DHB-ETBR benannt. Dieses Fragment führt zu einer ETBR-Expression in der Neuralleiste und im Nervensystem. Kreuzt man diese Tiere mit den ETBRsl/sl-Ratten, erhält man den Phänotyp DBH-ETBRxETBRsl/sl. Diese Tiere entwickeln ein normales enterisches Nervensystem, werden erwachsen und haben normale Reproduktionsraten. Sie exprimieren ETBR nur im adrenergen Gewebe, es handelt sich demnach um eine funktionelle ETBR-Defizienz. Bei natriumarmer Ernährung sind DBH-ETBRxETBRsl/sl Ratten normotensiv. Unter einer natriumreichen Ernährung zeigen die DBH-ETBRxETBRsl/sl Ratten eine ausgeprägte arterielle Hypertension. Die Wildtyp-Ratten hingegen sind unter natriumreicher und natriumarmer Ernährung normotensiv. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schlußfolgern, dass der systemische arterielle Hypertonus eine Folge der mangelnden physiologischen Inhibition des epithelialen Natriumkanals (eNaC) ist, der durch ET-1 über den ETBR beeinflusst wird. (Garipey, Ohuchi et al. 2000).

In einer weiteren Studie mit diesem Tiermodell konnte ebenfalls eine Erhöhung des Blutdrucks gegenüber Wildtyp-Ratten gemessen werden (Hochoer and Paul 2000). Außerdem zeigten die 3 Wochen alten homozygoten DBH-ETBRxETBRsl/sl Ratten eine durch Amilorid antagonisierbare stark herabgesetzte fraktionelle Natriumausscheidung und eine herabgesetzte GFR bei normaler Nierenmorphologie. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass der Hypertonus bei diesen Tieren zum einen durch die herabgesetzte Natriumexkretion mit verursacht sein kann. Ebenso könnte aber auch der Verlust von funktionellem ETBR am Gefäßendothel und die damit fehlende ET-abhängige Stimulation der eNOS eine Rolle spielen.

## 1.5 Fragestellung der Arbeit

Das ETS ist bei diabetischer Nephropathie aktiviert. Dies konnte auch in Tiermodellen mit induzierter DN nachgewiesen werden (Hoher, Lun et al. 1998; Shindo, Kurihara et al. 2002; Klahr and Morrissey 2003; Minchenko, Stevens et al. 2003). Die vasokonstriktive Wirkung des Endothelins und der profibrotische Effekt in der Niere scheinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Nephropathie zu spielen. Es ist bekannt, dass Endothelin das Wachstum von Fibroblasten und die Kollagensynthese fördert. In vitro weisen Studien darauf hin, dass solche Effekte Endothelin-B-Rezeptor (ETBR) vermittelt sind (Ong, Newby et al. 2003).

Tierexperimente zeigen, dass ein Endothelin-A-Rezeptor (ETAR) -Antagonist und ein kombinierter ETAR/ETBR-Antagonist günstige Effekte auf die Progression der diabetischen Nephropathie haben. Sie verbessern die Proteinausscheidung und reduzieren die Synthese von Matrixproteinen bei diabetischen Tieren (Dhein, Hochreuther et al. 2000; Hoher, Schwarz et al. 2001; Gross, Ritz et al. 2003).

Die genannten Studien führten zu folgender Hypothese:

**Eine reduzierte ETBR – Aktivität kann einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der Diabetischen Nephropathie haben.**

Dazu wurden ETBR-defiziente Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus (ETBRd-STZ) untersucht und deren Kontrollgruppen, eine ETBRd-Vergleichsgruppe, eine STZ-Kontrollgruppe und eine gesunde Wildtypkontrollgruppe miteinander verglichen.

Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Funktioniert das Modell des STZ-induzierten Diabetes bei ETBRd- Ratten?
2. Welche morphologischen und physiologischen Veränderungen lassen sich an der Niere beobachten?
3. Welche Mechanismen erklären die histologischen Veränderungen in der Niere?
4. Welche Mechanismen sind an der Entstehung der zu erwartenden Nephrosklerose beteiligt?
5. Welchen Einfluss hat Diabetes mellitus auf die Regulierung des ETS?
6. Welche Mechanismen können Erklärungsmodell für den zu erwartenden Hypertonus der ETBRd Tiere sein?
7. Welche klinische Bedeutung lässt sich aus den Ergebnissen ableiten?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- Beckmann Kühlzentrifuge CEN J2-21, Beckmann Instruments, USA
- Blutdruckmessgerät ML 125/M NIBP System für Ratten, Druckmanschette, Pulsaufnehmer, Tierhalter MLA 5016 und MLA 5018, ADINstruments GmbH, Spechbach
- Bio-Profil Bio-1D 97.04 Software, Froebel, Wasserburg, Deutschland
- CCD-Kamera, KP-140, HITACHI EUROPE, Düsseldorf
- Digital pH-Meter 3500, BECKMAN INSTRUMENTS, Berlin
- Dounce-Homogenisator mit Glaspistill, BRAUN KG, Melsungen
- Gamma-Counter LKB Wallac 1277, GAMMAMASTER, England
- Gamma-Counter MR-480, KONTRON, Neufahrn
- Gelkammer, Biorad Mini Transblot Cell
- Histokinette TP1020, LEICA, Nußloch
- Hitachi 717 (Boehringer Mannheim, Deutschland)
- Kryostat 2800 Frigocut-N, REICHERT-JUNG, Nußloch
- Kühlzentrifuge Centrikon H-401, KONTRON, Neufahrn
- Kunststoffeinmalgefäße der Firmen Greiner, Baxter, Brand und Nunc.
- Membranvakuumpumpe, VAKUBRAND, Wertheim
- Mikroskop Axiovert 100, ZEISS AG, Stuttgart
- Mikroskop BH2, OLYMPUS, Hamburg
- Mikrospritze 100µl, UNIMETRICS, Anaheim, USA
- Mikrotom Jung RM2025, LEICA, Nußloch
- Non-Invasive Blood Pressure Monitor, Semi-Automatic, 209000-series, TSE Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg
- Operationsinstrumente, AESCULAP AG, Tuttlingen
- PE 50 Polyethylenschlauch (ID: 0,58 mm; AD: 0,96 mm), PORTEX, Kent, England
- pH-Meter, KNICK, Berlin
- Photometer Eppendorf 1101 M, EPPENDORF GmbH, Hamburg

- PowerMac (Macintosh) und das Programm Image J
- PowerLab/4sp, ADINSTRUMENTS, Hastings, England
- Spektralphotometer, Spectra Power LTD
- Testkit, Boehringer Ingelheim, Mannheim, Deutschland
- Teflonkatheter (ID: 0,30 mm; AD 0,60 mm), KRONLAB, Sinsheim
- Tischzentrifuge Biofuge 13, HERAEUS, Berlin
- Tissue Tek Unikassetten, LEICA, Nußloch
- Transpac blood pressure transducer, ABBOTT IRELAND, Sligo, Irland
- Varipetten, EPPENDORF GmbH, Hamburg
- Vortex Genie 2, BENDER&HOBEIN AG, Zürich, Schweiz

### 2.1.2 Chemikalien

- Altromin Standard 1320 Ratte/Maus Halungsdiaät
- AmpliTaq Gold® DNA polymerase (5 Units/µl), Applied biosystems, Deutschland
- Beckmann Szintillationsflüssigkeit, BECKMANN INSTRUMENTS, Fullerton, USA
- EDTA, (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Endothelin-1,2 (high sensitivity) [125I] assay system, AMERSHAM, England
- ET-1/2 ELISA mit rattenspezifischer Antikörper, ICN Biomedicals, Eschwege
- ETBR-Primer von TibMolbiol, Berlin (per Auftrag synthetisiert + lyophilisiert)
- Färbelösungen chemilumineszierend, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland
- Fest- und Feinchemikalien der Firmen Merck, Roth, Boehringer, Roth und Sigma, Deutschland
- Feinchemikalien in p.a. Qualität, C. ROTH GmbH & Co., Karlsruhe, E. MERCK AG, Darmstadt, SIGMA, München
- Filme und Chemikalien der Firma KODAK, Hemel Hampstead, England
- Formalin 38 %
- GeneAmp® 10X PCR Puffer II (1.5mL), Applied biosystems, Deutschland
- GeneAmp® dNTPs (10 mM, each dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 320 µL, Applied
- biosystems, Deutschland
- GeneRuler™ 50bp DNA ladder, MBI fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland

- 
- Glycerine (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
  - Haematokrit – Kapillaren, Hirschmann Laborgeräte, heparinbeschichtet
  - Isofluran (FORENE®), Abbott Nr. B506
  - Ketanest 10%® (Wirkstoff: Ketamin), PARKER DAVIS, München
  - MgCl<sub>2</sub> Lösung (25mM, 1.5ml), Applied biosystems, Deutschland
  - Primärantikörper :Rabbit-Antikörper gegen Renin von Prof. Dr. A. Kurtz, Regensburg, Deutschland
  - Primärantikörper: neuronale NO-Synthetase (nNOS) von Axxora, Grünberg, Deutschland
  - Primärer Rabbit- AK gegen ETBR, Prof. Dr. Müller-Esterl, Frankfurt /M, Deutschland
  - Primärantikörper der Alpha Untereinheit des ENaC, Biotrend, Köln, Deutschland
  - Primärer sheep-AK gegen ETAR Axxora, Grünberg, Deutschland
  - Proteinase K (100mg), Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
  - Qiagen Plasmid Midi Kit, QIAGEN, Hilden
  - RenCTK von Sorin Diagnostics Deutschland
  - Rinderserumalbumin, BEHRING, München
  - Rompun® (Wirkstoff: Xylazin), BAYER AG, Leverkusen
  - Roti®-Histokitt, C. ROTH GmbH & Co., Karlsruhe
  - Safe-Lock Reaktionsgefäße von Eppendorf 1,5 ml
  - SeaKem® LE agarose, Biozym diagnostik GmbH, Deutschland
  - Sekundär-AK Anti-sheep HRP (für ETAR), DakoCytomation
  - Sekundär-AK Anti-rabbit HRP (für ETBR), DakoCytomation
  - Sekundärantikörper: Anti-Rabbit-AK von Prof. Dr. A. Kurtz, Regensburg, Deutschland
  - Streptavidin-Biotin-Phosphatase, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
  - Streptozotocin von Fluka bestellt über Sigma-Aldrich Nr. 85882
  - S-Monovetten, Lithium Heparin, Sarstedt
  - Xylene cyanol (C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Puffer und Lösungen

0,5 M EDTA: 186,12 g EDTA, 1 l A. dest., pH 8,0

TE-Puffer : 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.5

K-Puffer : 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3

10x TBE Puffer: Tris 108 g/l, Borsäure 55 g/l, 0.5 M EDTA 40 ml/l, pH 8.0

Blaumarker: 50 mg/ 100 ml Bromophenolblau, 250 mg/ 100 ml Xylene cyanol,  
30 g/100 ml Glycerol

50bp DNA Leiter: 320 µl autoclaviertes, ultrafiltriertes Wasser, 70 µl Blaumarker,

10 µl 50bp DNA Leiter (0.5mg DNA/ml), Konservierung bei -20°C.

10 x PBS: 80,0g/l NaCl, 2,0g/l KCl, 11,5g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,0g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH-Wert: 7,4

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierhaltung und Studienprotokoll

Genehmigung für den Tierversuch wurde beantragt bei Herr Dr. Reimer im Ministerium für Landwirtschaft, Umweltschutz und Raumordnung, Referat 32/ Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten des Veterinärwesens, Tierschutz und Tierarzneimittel, Heinrich-Mann-Allee 103, in 14473 Potsdam.

**Antragsnummer:** 32/48-3560-1/2, Genehmigung 23.01.2002 / Änderungsantrag vom 25.02.2003

Um die Rolle des ETBR für die Pathogenese und die Progression der diabetischen Nephropathie klar zu verifizieren, wurden vier Gruppen sechs Monate alter männlicher Ratten untersucht. Dabei wurden ETBR-defiziente Ratten (DBH-ETBRxETBRsl/sl Ratten) (Gariepy, Williams et al. 1998) und Wildtyp-Ratten (WT), die uns freundlicherweise von Yanagisawa zur Verfügung gestellt wurden, jeweils mit und ohne induzierten Diabetes mellitus verglichen.

Insgesamt wurden 29 Ratten untersucht, die in vier Gruppen eingeteilt wurden.

- Gruppe 1: 6 homozygote ETBR-defiziente Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus (ETBRd+STZ)
- Gruppe 2: 9 homozygote ETBR-defiziente Ratten in der Kontrollgruppe (ETBRd)
- Gruppe 3: 8 Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus (STZ)
- Gruppe 4: 6 gesunde Ratten des Wildtyps (WT) = (Kontrolle)

Alle Tiere wurden unter kontrollierten Umgebungsbedingungen mit 20°C Temperatur, 46% Luftfeuchtigkeit und einer Lichtperiode von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr gehalten. Die Tiere erhielten Standardfutter und hatten freien Zugang zu Wasser. Bei dem pelletierten Futter handelte es sich um ein standardisiertes Ratten- und Mäuse- Alleinfuttermittel (Altromin).

## 2.2.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mittels Standard-PCR der genomischen DNA aus einer Schwanzbiopsie der Ratten im Alter von 2-3 Wochen, wie bereits bei Gariepy, Williams et al. 1998 beschrieben wurde (Gariepy, Williams et al. 1998; Gariepy, Ohuchi et al. 2000).

### DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsie

Lysis-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,3

50 mM KCl

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 % Tween 20

in Aqua ad injectabilia ansetzen, autoklavieren, bei 4°C lagern

vor Gebrauch 2 mg/ml Proteinase K dazugeben

Phenol/Chloroform:

Phenol (mit Tris überschichtet, gut schütteln, Tris muss pH 7,5-8 haben, damit DNA in Überstand übergeht, bei pH 4-5 würde RNA in Überstand übergehen, und DNA + Proteine in der Interphase bleiben) mit Chloroform 1:1 verdünnen

Die Schwanzbiopsie wurde für die Typisierung unter Inhalationskurznarkose mit Isofluran im Alter von 8 Wochen gewonnen. Die Schwanzspitze wurde in ein steriles Eppendorfgefäß (PCR-clean, d.h. DNA und RNA-frei) überführt und wie folgt weiterbehandelt:

- 200µL Lysispuffer mit Proteinase K auf Probe geben
- 16-24h Inkubation bei 55-56°C (Lysis)
- 30 min Inkubation bei 95°C (Inaktivierung Proteinase K)
- Phenol/Chloroform-Extraktion:
  - o Phenol/Chloroform gut schütteln, 200µL auf Probe geben
  - o Vortexen
  - o zentrifugieren (5min, 13000rpm)

- Überstand abnehmen, dabei weiße Interphase nicht mit abnehmen (ist weißliche Schicht) -> wenn Überstand nicht klar ist, Phenol/Chloroform-Extraktion wiederholen mit Überstand
- gekühlten 100%-igen Ethanol zugeben: 2,5-faches Volumen des Überstandes (bei 200µL Überstand 500µL Ethanol)
- 4M LiCl<sub>4</sub> zugeben (entzieht DNA die Hydrathülle -> DNA löst sich nicht in Ethanol, sondern fällt aus): 1:10 des Überstandvolumens (bei 200µL Überstand 20µL LiCl<sub>4</sub>)
- vorsichtig schütteln, ab jetzt DNA nicht mehr vortexen (kann zerbrechen) DNA fällt als farblose viskose Fäden aus
- Inkubation bei -80°C für 30 min
- Zentrifugation: 5 min 4°C
- vorsichtig Ethanol entfernen
- gekühlten 80%-igen Ethanol zugeben
- Zentrifugation: 30 min, 4°C
- Ethanol entfernen, Pellett bei 73°C trocknen lassen
- Pellett in 20µL K-Puffer oder Aqua ad injectabilia lösen

Nun kann die PCR durchgeführt werden oder das Pellett zunächst auf Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert werden.

Anmerkung: ist DNA-Konzentration zu hoch (fetter Schlier in PCR statt klare Bande), Konzentration photometrisch bestimmen; die optimale Menge an DNA in unseren PCRs beträgt 25µg/mL:

- Messung bei 260nm, Quarzküvette verwenden
- 100µL Aqua bidest in Küvette vorlegen, Leerwert bestimmen oder nullen (=Blank drücken)
- 1µL DNA-Probe dazu
- Messung bei 260nm (Messwert ggf. von Leerwert abziehen)
- Absorption von 1,0 entspricht Konzentration von 50µg/mL in unverdünnter DNA-Lösung

ETBR-PCR

Der ETBR-PCR Ansatz wurde wie in Tabelle 2 beschrieben durchgeführt. Die Amplifikation ist in Tabelle 3 beschrieben. Die Denaturierung erfolgte in 40 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, das Annealing bei 60°C für 30 Sekunden, die Extension bei 72°C für 2 Minuten und der finale Extensionschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Materials	Ansatz (50)	Ansatz (22)	Faktor	Ansatz
Wasser	31,2	13,728	50	686,4
10 x PCR Puffer	5	2,2	50	110,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4	1,76	50	88,0
dNTPs (Mix)	1	0,44	50	22,0
Primer 1	2	0,88	50	44,0
Primer 2	2	0,88	50	44,0
Taq DNA Polymerase	0,3	0,132	50	6,6
Template	4,5	1,98	50	99,0
Total (Summe)	50	22	50	1100,0

Tabelle 2: PCR-Protokoll für PCR 1 und PCR 2

Heizdeckel	105°C		
Vorlauf	ein		
Schritt	Temp.	Zeit	Zyklen
1	94°C	Pause	
2	94°C	6 min	
3	60°C	30 sek	
4	72°C	2 min	
5	94°C	30 sek	zu Schritt 39x
		3	
6	60°C	30 sek	
7	72°C	10 min	
8	10°C	Pause	

Tabelle 3: PCR Programm

### Agarosegelelektrophorese

Das PCR Produkt wurde auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, gefolgt von einer Elektrophorese bei 100 V, 250 mA für ca. 30 Minuten, dann gefärbt mit 0,05% (0,5µg/ml) Ethidiumbromid und sichtbar gemacht durch UV-Licht mittels Transilluminator. Die Produktgröße der ETBR PCR 1 liegt bei 650 oder 350 bp. Die Produktgröße der ETBR-PCR 2 liegt bei 500 bp.

Mit Hilfe der ETBR-PCR 1 lässt sich bestimmen, ob eine Ratte den funktionellen Knockout (DβH/ETB sl/sl) für ETBR trägt oder nicht. Es lässt sich aber nicht ableiten, ob sie homozygot oder heterozygot ist. Dafür muss die ETBR-PCR 2 durchgeführt werden. Hier zeigt sich, ob die gekreuzten ETBRd Tiere homozygot oder heterozygot sind, da mit dieser PCR ein Fragment des WT-ETBRs nachgewiesen werden kann.

Zur Veranschaulichung zeigt die Tabelle 4 nochmal das Ergebnis jeder PCR.

<b>ETBR PCR 1</b>	Erkennung, ob Wildtyp oder knockout
Primer:	ETB-Mut se und ETB-Mut ase
Produktgröße:	2 Banden, bei 350 bp (Deletion) und bei 650 bp (Wildtypallel)
Tiere:	ETB-Ratten
<b>ETBR PCR 2</b>	Erkennung, ob die knockouts homozygot oder heterozygot sind
Primer:	ETB-Mut se und ETB-Hetero ase
Produktgröße:	Bande bei 500 bp, wenn ein Wildtypallel vorhanden ist
Tiere:	ETB-Ratten

### verwendete Primer:

PCR 1: Primer 1: ETB-MUT ase mit Sequenz 5' CAC gAC TTA gAA AgC TAC AC 3'

Primer 2: ETB-MUT se mit Sequenz 5' AgC Cgg TgC ggA CgC gCC TT 3'

PCR 2: Primer 1: ETB-MUT se mit Sequenz 5' AgC Cgg TgC ggA CgC gCC TT 3'

Primer 2: ETB-Hetero ase mit Sequenz 5' TgC AgA TCA CTA TCA ggT ACg 3'

Tiere:	PCR 1	PCR 2
Wildtyp	650	500
heterozygot	350	500
homozygot (knock out)	350	Ø

Tabelle 4: zu erwartende PCR Ergebnisse

### 2.2.3 Streptozotocin-Verabreichung

Vor Versuchsbeginn wurde bei den Tieren der Gruppe 1 und 3 eine einmalige intravenöse Gabe von 65mg/kg KG Streptozotocin, gelöst in 0,1 mol Zitrat-Puffer, pH 4,5, in die Schwanzvene verabreicht. Nach 48 h wurden zum Beweis der Ausprägung einer diabetischen Stoffwechselsituation bei diesen Tieren die Blutglukose, der Blutdruck und das Plasmainsulin gemessen. Nur Tiere, die eine Plasmaglukosekonzentration von >15 mmol/L aufwiesen, wurden in die Studie eingeschlossen.

### 2.2.4 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte in der 0., 5. und 10. Woche. Der systolische Blutdruck (SBD) wurde bei allen Tieren, analog zur Methode nach Riva-Rocci beim Menschen, mit der sogenannten „tail-cuff“-Methode gemessen (Rhoden, Leeper et al. 1975). Diese nicht-invasive Methode an der Schwanzarterie der Tiere ist leicht durchführbar und stellt bei Ratten eine gute Alternative zu invasiven Methoden dar.

#### Durchführung:

Dabei werden die Ratten im Wachzustand in einer Plexiglas-Röhre fixiert, deren Durchmesser so gewählt ist, dass sich die Tiere nicht umdrehen können. Um eine Hyperämisierung der Schwanzarterie zu erreichen, wird das Tier für ca. 10 Minuten mittels einer Wärmeplatte vorgewärmt, bei einer Umgebungstemperatur von bis zu 40°C erreicht. Durch eine Öffnung an der Rückwand wird die aufblasbare Druckmanschette an der Schwanzwurzel angelegt. Damit die Körpertemperatur der Ratte während der Messung konstant bleibt, befindet sich neben der Plexiglasröhre ebenfalls eine Rotlichtlampe. Der Pulsabnehmer ist mit einem Pflasterstreifen am Schwanz befestigt. Der Kontakt des Pulsabnehmers mit dem Schwanz muss einerseits fest sein, andererseits soll durch die Befestigung keine Störung des venösen Abflusses entstehen. Eine leicht gekrümmte Stellung des Rattenschwanzes und eine lockere Aufhängung des Pulsabnehmerkabels verhindern Störungen durch die Atembewegung des Tieres. Während der Messung darf sich das Tier nicht bewegen, da sonst Artefakte entstehen. Die Herzfrequenz wird kontinuierlich aus dem Pulssignal durch Mittelwertbildung errechnet. Über eine Druckmanschette und einen Pulsaufnehmer wurde computergestützt eine Pulsationskurve der Schwanzarterie erstellt. Hierbei erscheint zunächst der gemessene Puls graphisch dargestellt mit Hilfe der Powerlab

Software®. Danach füllt sich die Druckmanschette auf Knopfdruck bis zum Erreichen eines vorgewählten Drucks mit Luft. Dann setzt der Druckabfall ein. Der systolische Blutdruck wird bei fallendem Manschettendruck am Auftreten der Pulsationen ermittelt und ebenfalls graphisch dargestellt. Bei 30 mmHg entlüftet sich die Druckmanschette selbständig und die Messung ist beendet.

Die Ratten wurden zwei Tage lang an den Versuchsablauf gewöhnt, die Messungen des darauffolgenden dritten Tages schließlich für die Studie verwendet. An jedem Versuchstag wurden drei Messungen pro Tier durchgeführt und der Mittelwert dieser Messwerte bestimmt.

Dieser Vorgang wurde unter Berücksichtigung zirkadianer Rhythmen nach demselben Schema zur selben Tageszeit durch dieselbe Person wiederholt. Zum Schluss wurden die Ergebnisse aller Messungen gemittelt.

### **2.2.5 Untersuchungen im Stoffwechselkäfig**

Nach Beendigung der Blutdruckmessungen wurden die Ratten über 24h in Stoffwechselkäfige gesetzt, um die Nierenfunktion zu untersuchen. Zu Versuchsbeginn, also in Woche 0, wurden die Tiere gewogen. Dann kamen sie für 24 h in Stoffwechselkäfige, an die sie zuvor gewöhnt wurden, um die Nierenfunktion mittels 24h-Sammelurin und das anschließende Körpergewicht zu protokollieren. Vor und nach dem Aufenthalt im Stoffwechselkäfig wurden neben dem Körpergewicht auch Futter- und Wassermengen protokolliert.

Zur Bestimmung verschiedener Stoffwechselfparameter im Urin wurden die Tiere unter gleichen Haltungsbedingungen in einen Stoffwechselkäfig gesetzt, in dem sie weiterhin freien Zugang zu Futter und Wasser hatten. Nach 24 Stunden wurde der gesammelte Urin in Weithalsflaschen aus Polyethylen dekantiert und das 24h-Urinvolumen durch Auswiegen bestimmt, unter der Annahme, dass 1g Urin 1ml Urin entspricht. Dabei war die Wahl des Gefäßmaterials bedeutsam, damit Albuminablagerungen an Glas- oder bestimmten Kunststoffmaterialien die spätere Albuminbestimmung nicht falsch negativ beeinflussen konnten. Für die analytischen Bestimmungen wurde nach sorgfältigem Durchmischen ca. 1 ml Urin in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß dekantiert, der restliche Urin wurde nach Dekantieren in einem Szintillationsgefäß aus Kunststoff bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Überprüfung der Blutparameter (Glukose, Natrium, Kalium, Osmolarität, ET-1, Kreatinin, Harnstoff, Albumin) wurde den Tieren jeweils nach dem Aufenthalt im Stoffwechsellkäfig in der 0., 5. und 10. Versuchswoche aus dem Retroorbitalsinus, in Kurznarkose mit Isofluran, Blut entnommen. Das Blut wurde bei 4°C mit 4000xg 3 min in der Beckmann Kühlzentrifuge zentrifugiert und das Plasma abpipettiert und anschließend bei -20°C gelagert.

### **2.2.6 Organentnahme**

Am Versuchsende, nach 10 Wochen Behandlung, wurden die Tiere unter Narkose (mit 16 mg/kg KG Rompun und 80 mg/kg KG Ketanest i.p.) durch Eröffnung der großen Blutgefäße schmerzlos getötet. Anschließend wurden die Organe zur weiteren Analyse entnommen.

Die Nieren wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und gewogen. Dann wurde die linke Niere für den späteren Western Blot in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Die rechte Niere wurde zur histologischen Untersuchung in Formalin 4% für 24 h gegeben und wie in den histologischen Methoden beschrieben weiterverarbeitet.

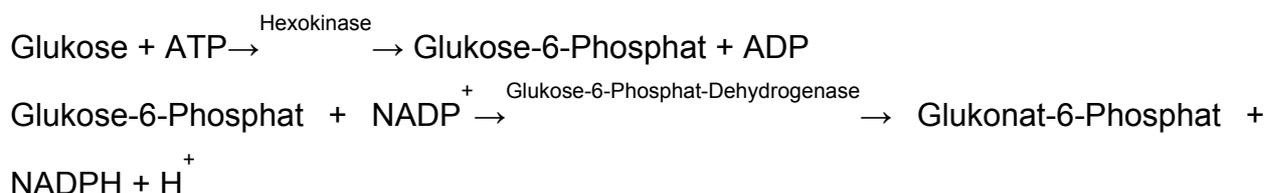
## 2.2.7 Biochemische Blut- und Urinparameteranalyse

### 2.2.7.1 Blutparameter

Die Blutparameter Glucose, Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, Osmolarität und Albumin wurden automatisch analysiert mit Hitachi 717 (Boehringer Mannheim, Deutschland) im Notfalllabor von Prof. Ziebig, der Charité Campus Mitte.

#### Testprinzip für Glucose:

Die Analyse der Serumglukose erfolgte nach der Hexokinase-Methode (Schmidt 1961). Glukose wird durch ATP und Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Glukose-6-Phosphat wird in Gegenwart von NADP durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zur Glukonat-6-Phosphat oxidiert. Andere Kohlenhydrate werden nicht oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADPH-Zunahme ist direkt proportional der Glukosekonzentration und wird photometrisch bei 340 nm gemessen.



#### Testprinzip für Natrium und Kalium:

Die Emissionen von Natrium erfolgten bei 589 nm, von Kalium bei 768 nm und von Kalzium bei 622 nm; sie wurden emissionsflammenphotometrisch bestimmt. Dieses Messverfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung von Alkali- bzw. Erdalkalimetallen in einer Lösung aufgrund der Emission von Strahlung charakteristischer Wellenlänge nach thermischer Anregung.

#### Testprinzip für Kreatinin:

Es handelt sich um einen kinetischen Farbttest, die modifizierte Jaffé-Reaktion (Bartels, Bohmer et al. 1972). Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrat einen gelborange gefärbten Komplex. Dessen Farbintensität wird direkt proportional der Kreatininkonzentration photometrisch bei 505 nm gemessen. Um richtige Werte zu erhalten, wird die Messung in einem Zeitfenster durchgeführt. Um die Messung von

Pseudokreatininen weitestgehend zu verhindern, geht die Anfangs- und Endreaktion nicht in die Messung ein.

Kreatinin + Pikrinsäure → alkalische Lösung → Kreatinin-Pikrinsäure-Komplex

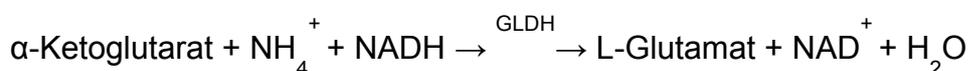
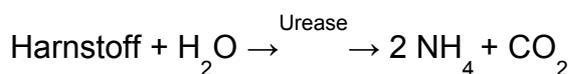
Die Kreatinin-Clearance aus Serumkreatinin sowie Kreatinin und Volumen des 24h Sammelurin wurde als Surrogat für die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) genutzt. Die GFR ist demnach der Quotient aus Kreatinin im Urin (UC) und Kreatinin im Serum (SC), multipliziert mit dem Urinfluß in ml/min (Uvol)

$$\text{GFR} = \text{UC} / \text{SC} \times \text{Uvol}$$

Testprinzip für Harnstoff:

Diese Methode ist ein kinetischer UV-Test (Talke and Schubert 1965).

Zur Bestimmung von Harnstoff wird ein gekoppeltes Enzymsystem von Urease/Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) verwendet. Harnstoff wird durch Urease zu CO<sub>2</sub> und Ammoniak hydrolysiert. Das gebildete Ammoniak reagiert anschließend mit α-Ketoglutarat und NADH in Gegenwart von GLDH und NAD<sup>+</sup>. Die Extinktionsabnahme durch den Verbrauch von NADH wird anschließend kinetisch bei 340 nm gemessen.



Bestimmung der Osmolalität:

Die Osmolalität ergibt sich aus der Summe aller molaren Konzentrationen aller osmotisch wirksamen Teilchen (angegeben in Osmol) pro Gewichtseinheit. Im menschlichen Körper sind die osmotisch wirksamen Substanzen vor allem: Natrium, Glukose und Harnstoff.

Für Glucose und Harnstoff, in mmol/l:

Serumosmolalität = 1,86 x Natrium + Glukose + Harnstoff + 9 (Konzentration in mmol/kg H<sub>2</sub>O)

Die Osmolalität wird im Hitachi 717 über die angegebenen Substanzen ebenfalls photometrisch gemessen und dann automatisch berechnet.

### Albuminbestimmung:

Die quantitative Messung von Albumin im Plasma erfolgte ebenfalls photometrisch bei einer Wellenlänge von ca. 450nm.

Desweiteren wurden im Plasma die Reninkonzentration und Reninaktivität gemessen und die ET-1 Konzentration bestimmt.

### Testprinzip Plasmapreninkonzentration und- aktivität

Die Plasmapreninkonzentration (PRC) und –aktivität (PRA) wurden mit einem indirekten enzyme- kinetic-assay gemessen (Bohlender, Menard et al. 1998). Renin setzt aus dem Substrat Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I frei. Die Plasmapreninaktivität und -konzentration wurde deshalb indirekt über die Menge des pro Zeiteinheit gebildeten Angiotensin I bestimmt. Der Nachweis erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen RenCTK von Sorin Diagnostics Deutschland.

### Testprinzip des ET-1 ELISA

Die Ermittlung der ET-1 Konzentration in Plasma und Urin erfolgte unter Nutzung eines herkömmlichen ELISA-Kit (Immundiagnostik GmbH, Bensheim) (Hocher, George et al. 1999).

Der ELISA (enzym-linked immuno sorbent assay) dient zur quantitativen Bestimmung spezifischer Proteine aus Flüssigkeiten. Dafür wird nach Zentrifugieren des Blutes Plasma abgenommen und bei –80°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurde mit BCA protein assay reagent, nach PIERCE bestimmt. Die Messungen wurden mit bei –80°C gelagerten Proben von Blutplasma und 24h Sammelurin durchgeführt und jeweils für das verwendete Medium standardisiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Microplattenreaders (MR 5000) der Fa. Dynatech, Guernsey. Die quantifizierten Ergebnisse wurden tabellarisch erfasst.

#### Bestimmung der Proteinkonzentration nach PIERCE

Die Messung der Proteinkonzentration im Plasma und der im 24-h-Urin ausgeschiedenen Proteine wurde mit dem Protein-Nachweis-Reagenz BCA von PIERCE durchgeführt. Die eigentliche Bestimmung im Mikroansatz erfolgte mit geringen Modifikationen im Wesentlichen wie bei Ansher beschrieben (Ansher and Jakoby 1986).

Das Arbeitsreagenz besteht aus 100 Teilen Lsg. A. Die enthält entsprechend der Firmenangabe Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-Reagenz und Natriumtartrat in 0,2 molarer NaOH-Lösung und 2 Teilen Lsg. B, 4%-ige Kupfersulfatlösung.

Zur Verdünnung von Plasma und 24h-Sammelurin wurde wie folgt vorgegangen: 20µl Homogenat wurden mit 180µl Homogenisationspuffer verdünnt und anschließend 5µl vom 1:10 verd. Homogenat mit 5µl Aqua bidest. weiter verdünnt. Dann wurden jeweils 10µl Probe mit 20µl Arbeitsreagenz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatter gegeben, gemischt und für 30min bei 37°C inkubiert. Es wurden generell Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 540 nm im Spektralphotometer (Spectra power LTD). Die Berechnung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der parallel ermittelten Standardwerte in einer Excel-Tabelle durchgeführt.

#### **2.2.7.2 Urinparameter**

Aus dem im Stoffwechsellkäfig gesammelten Urinproben wurden später folgende Parameter bestimmt: Urinvolumen, Albuminausscheidung, Uringlucose, Urinosmolalität, Urin-cGMP, Aldosteronausscheidung, Urinnitrat und ET-1-Ausscheidung. Das Urinvolumen wurde durch Wiegen ermittelt (siehe 2.2.5).

Die Albuminausscheidung, die Uringlukose sowie Urinosmolarität wurden automatisch mithilfe des Hitachi 717 im Notfalllabor von Prof. Ziebig, Charité Campus Mitte, analysiert.

##### Aldosteronbestimmung

Die Messung von Aldosteron im Urin wurde nach Extraktion und chromatographischer Aufbereitung auf Celite Columns zur Analyse in ein auswärtiges Labor (Abteilung Dr. Maser-Gluth, Uni Heidelberg) geschickt. Dort wurde dann mittels eines Radioimmunoassays (RIA) die Quantifizierung (Maser-Gluth, Reincke et al. 2000) durchgeführt.

#### Bestimmung der NO-Ausscheidung:

Die Ausscheidung von NO wurde über die Metaboliten Nitrit und Nitrat mit einem kommerziellen Testkit gemessen (Boehringer Ingelheim, Mannheim, Deutschland).

Das angewandte Testverfahren basiert auf der Griess-Reaktion. Die "Griess-Reaktion" beruht auf der Umsetzung von Griess-Reagenz (Sulfanilsäure/N-(1-naphthyl)ethyldiamin) mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff, dessen Ergebnis ist spectrophotometrisch quantifizierbar ab 540nm (Quaschnig, Kocak et al. 2003), da die Absorption bei dieser Wellenlänge proportional zur Nitrit-Konzentration ist. Das Detektionslimit für Nitrit liegt in Abhängigkeit von der Sensitivität des Photometers und des molaren Extinktionskoeffizienten bei einer Konzentration von 0,3 µmol/l (benötigtes Probenvolumen 500 µl). Die Quantifizierung erfolgt bei einer Wellenlänge von 540nm. Nitrate müssen in Nitrite umgewandelt werden, um analysiert zu werden. Dafür werden sie mittels Nitratreduktase reduziert zu Nitrit (Green, Wagner et al. 1982).

#### Bestimmung Urin-cGMP

Zur Bestimmung der Ausscheidung von cyclischem Guanosin- Monophosphat (cGMP) wurde ein handelsüblicher RIA-Kit (IBL, Hamburg Deutschland) verwendet (Stasch, Dembowsky et al. 2002). Die Analyse fand im Labor Dr. Stasch, Bayer Health Care AG, statt.

Die Bestimmung der ET-1-Ausscheidung erfolgte analog dem ET-1 ELISA, in 2.2.7.1 beschrieben.

## **2.2.8 Histologische Methoden**

Die in Formalin gegebenen Organe wurden in Paraffin eingebettet und geschnitten. Anschließend wurden Schnitte in PAS-Färbung, Sirius-Red-Färbung und Elastica-Färbung angefertigt. Diese wurden mikroskopisch untersucht.

### **2.2.8.1 Fixierung**

Die rechten Nieren wurden entnommen und direkt für 24 h in 4%igem Formalin/PBS fixiert.

#### Prinzip:

Durch die Fixierung der Organe wird das Auftreten postmortaler Veränderungen und eine Herauslösung von Zellbestandteilen während histochemischer Reaktionen verhindert. Dies wird durch Fällung der Zellproteine und einer Stabilisierung von Lipiden erreicht.

Die Organe wurden in 4%igem phosphatgepuffertem Formaldehyd für die Einbettung in Paraffin über 24h fixiert.

Formaldehyd führt zur Bildung von Methylenbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine, was eine Blockade dieser Aminogruppen zur Folge hat. Es kommt zu einer Vernetzung der Eiweiße.

### **2.2.8.2 Paraffineinbettung in Histokinette**

#### Prinzip:

Um möglichst dünne Schnitte zu erhalten, bettet man das Gewebematerial ein. Es bekommt hierdurch eine bestimmte Härte und Stabilität. Die Einbettung von Gewebe erfolgt unter der Voraussetzung, dass das zunächst flüssige Einbettungsmittel das Gewebe vollständig durchtränkt. Dann wird es fest und kann schließlich gemeinsam mit dem durchtränkten Gewebe geschnitten werden. Die Paraffin-Methode setzt voraus, dass das Gewebe vollständig entwässert und außerdem alkoholfrei ist. Die Entwässerung wird in Alkohol durchgeführt, der sich nicht mit Paraffin verbindet. Deshalb muss ein Intermedium zwischengeschaltet werden. Das Intermedium, z. B. Xylol, mischt sich sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin.

### Technik:

Die formalinfixierten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iges, 80%iges, 2x 96%iges und 3x absolutes Ethanol) für je 1 h entwässert, anschließend für 4 h in Xylol überführt. Dieser Vorgang wurde 2x mit einer frischen Xylol-Lösung wiederholt.

Danach wurden die Präparate für 1 h in reines geschmolzenes Paraffin bei 56°C gegeben, danach nochmals für 2 h in ein weiteres Paraffinbad überführt.

Diese Schritte wurden über Nacht automatisch in einer Histokinette durchgeführt.

Am folgenden Tag wurden die Organe in TissueTek Unikassetten mit 56°C warmem Paraffin übergossen. Nach dem Erkalten des Paraffins waren die Präparate schnittfähig. Am Mikrotom wurden 3µm dicke Gewebeschnitte hergestellt.

### **2.2.8.3 Färbungen**

Es wurden PAS-Färbungen, Sirius Red-Färbungen und Elastica-Färbungen durchgeführt, die man in die folgenden Färbeschritte unterteilen kann:

#### I. Entparaffinieren und Bewässern

Die Paraffinschnitte wurden 2 mal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe (mit absolutem, 96%igem 80%igem 70%igem Ethanol) für jeweils 5 Minuten bewässert.

#### II. Einsatz der Färbelösungen

Mit den Färbelösungen wurden die spezifischen Strukturen (z.B. Bindegewebe Gefäße) gefärbt.

#### III. Entwässern

Mit aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten in 70%igem, 80%igem, 96%igem und absolutem Ethanol) wurden die gefärbten Schnitte bewässert und dann 2 mal 10 min in Xylol entwässert.

#### IV. Eindecken

Anschließend wurden alle Schnitte mit Deckglas und Roti®-Histokitt eingedeckt.

### **2.2.8.4 PAS-Färbung zur Bestimmung der Glomerulosklerose**

Zur Bestimmung der Glomerulosklerose wurden die angefertigten Schnitte der Niere PAS-gefärbt (Periodsäure-Schiff-Reagenz) und anschließend mikroskopisch die Glomerula untersucht

### Prinzip:

Die Periodsäure-Schiff's-Reaktion dient dazu, Kohlenhydratgruppen nachzuweisen. Ihre Spezifität liegt in der gezielten Spaltung von Kohlenhydraten mit Hilfe der Perjodsäure, wobei benachbarte Hydroxyl- z.T. zu Aldehyd-Gruppen umgewandelt werden. Mit Leukofuchsin (Schiff'schem Reagenz) bildet sich ein stabiler roter Farbkomplex.

Es kommt dabei zur Anfärbung von Glykogen, Cellulose, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteiden sowie Glykolipiden, die sich in Bindegewebsfasern (Kollagen), Basalmembranen und Zellwänden (Glykokalix) finden.

### Färbelösungen:

- Hämalauun nach Mayer: a) 1g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumiodat und 50 g Kaliumaluminiumsulfat werden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wird blauviolett. b) 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Zitronensäure werden in a) gelöst, wobei die Farbe ins Rotviolette umschlägt. Die Lösung ist sofort gebrauchsfähig und lange haltbar.
- Alkoholische Perjodsäurelösung hergestellt aus: 1g Perjodsäure in 30 ml aqua dem. lösen und dann 70 ml Ethanol hinzugemischt
- Alkoholische Disulfitlösung, hergestellt aus: 0,5 g Kaliumdisulfit (oder Natriumdisulfit), in 30 ml aqua dem. lösen, 70 ml Ethanol hinzumischen
- Schiff'sches Reagenz ist eine kommerzielle Mischung, deren Lagerung im Kühlschrank erfolgen muss, Küvetten während des Gebrauchs sind vor Licht zu schützen. Solange die Lösung klar ist, kann man sie wieder verwenden.

### Färbeprozedur:

Die Paraffinschnitte vorher für 20min bei 40°C im Wärmeschrank einbringen, damit der Entparaffinierungsvorgang effektiver wird.

1. Entparaffinieren.
2. In Aqua dem. kurz spülen
3. 10 min in Perjodsäure 1%
4. für 5 min in fließendem Leitungswasser spülen
5. kurz in alkoholischer Disulfitlösung spülen.
6. 20 min in Schiff's-Reagenz ( Wärmeschrank 40°C)

7. kurz in alkoholischer Disulfidlösung spülen
8. 10 min unter fließendem Leitungswasser spülen und kurz in A.dem. spülen
9. 5 - 10 min in Hämalaun nach Mayer legen
10. 10 min in fließendem Leitungswasser spülen und in A.dem spülen
11. Entwässern
12. Eindecken

#### 2.2.8.4.1 Glomerulosklerose – Auswertung

Während der Sklerosierung der Glomerula sammelt sich sklerotisches Material in den Glomerula an, das mikroskopisch als eosinophile Ablagerung in den PAS-gefärbten Präparaten zu sehen ist.

Aus den 29 Paraffinblöcken wurden je 2 Schnitte pro Präparat PAS gefärbt. Die Zuordnung des Glomerulosklerosegrad erfolgte visuell an einem Mikroskop mit 320 facher Vergrößerung. Die Bestimmung des Skleroseindex erfolgte nach (Raij, Azar et al. 1984).

Glomeruloskleroseindex	GI 1	GI 2	GI 3	GI 4
Sklerosierung der Gesamtfläche des Glomerulums	0% -25%	26% -50%	51% -75%	76% - 100%

Der Glomeruloskleroseindex 1 (GI 1) wurde vergeben bei einer maximalen Sklerosierung von 25% der Gesamtflächen eines Glomerulums. GI 2 wurde vergeben bei maximal 50% sklerosierter Fläche des Glomerulums, GI 3 bei maximal 75% und GI 4 bei maximal 100% Sklerosierung des Gesamtflächen des Glomerulums.

Um den Grad der Glomerulosklerose jeder Niere zu bestimmen, wurden 80 Glomerula pro Niere unter dem Mikroskop untersucht. Alle Gewebeschnitte wurden auf diese Weise zweimal gezählt, ohne die Gruppenzugehörigkeit zu kennen. Es wurde ein Mittelwert für jedes Präparat ermittelt und die Gruppen wurden untereinander mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

### **2.2.8.5 Sirius-red Färbung zur Analyse der Fibrose an der Niere**

Die Sirius-Red-Färbung wurde zur Analyse der Nierenfibrose angefertigt. Es wurde dabei der Grad der interstitiellen Fibrose und der Grad der perivaskulären Fibrose in der Niere untersucht.

#### Prinzip:

Sirius Red ist ein anionischer Farbstoff der auf Grund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt. Diese Färbung wurde nach der von (Junqueira, Cossermelli et al. 1978) publizierten Methode durchgeführt.

#### Färbelösungen:

1. Gesättigte wässrige Pikrinsäure:

- 7,5 - 10 g Pikrinsäure in 250 ml heißem A. dest. Lösen
- 6 - 7,5 g Pikrinsäure in 250 ml kaltem A. dest. lösen
- beide Ansätze mischen und filtrieren

2. Sirius Red- 0,1 %ige Lösung:

- 0,2 g Sirius Red in 200 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure lösen, mischen und filtrieren, pH-Wert 2,0

3. HCL 0,01 M:

- 0,5 ml HCL in 199,5 ml abs. Ethanol

#### Färbung:

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte 2 min in Aqua bidest gewaschen, anschließend 60 min in 0,1 %igem Sirius Red in gesättigter wässriger Pikrinsäure gefärbt, danach 2 x 1 min in 0,01 NHCL gesäuert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe je 5 min entwässert. Vor dem Eindecken mit Corbitbalsam wurde 2x10 min in Xylol gespült.

### **2.2.8.5.1 Auswertung der Interstitiellen Fibrose**

Zur digitalen Bildverarbeitung wurde ein PowerMac (Macintosh) und das Programm Image J in der Version 1.30 (Shareware des National Institute of Health, NIH, USA) genutzt. Zur morphometrischen Analyse wurden die histologischen Präparate mit einem Zeiss-Axiovert 100 Mikroskop und einer Hitachi CCD-Kamera in den Rechner

eingelassen. Aus 9 Einzelbildern der CCD-Kamera wird vom Programm Image J ein Durchschnittsbild errechnet. Dies diente der Minimierung von kamerabedingten Artefakten. Zur Bestimmung des Anteils an kollagener Matrix pro Bildausschnitt wurde im Threshold-Modus eine Schwarz/Weißgrenze (zwischen 0 und 255, bei 256 Graustufen) festgelegt, bei der die zu messenden Flächen schwarz zur Geltung kamen. Die interstitielle Fibrose wurde dann als prozentualer Anteil der Sirius Red positiven Fläche an der Gesamtfläche des Bildausschnitts angegeben. Pro Niere wurden 30 Bilder angefertigt und ausgewertet. Ein Mittelwert für jedes Tier wurde berechnet und anschließend die Gruppen mit dem ungepaarten T-Test statistisch verglichen. Alle Präparate der zu vergleichenden Gruppen wurden mit der gleichen Schwarz/Weißgrenze gemessen, dem Threshold.

#### 2.2.8.5.2 Auswertung der perivaskulären Fibrose

Das fibrotische Material erscheint in der Sirius-Red-Färbung als roter Saum um die Nierengefäße. Die Dicke der fibrotischen Ansammlung lässt sich visuell in 5 Grade einteilen. Hierbei wird als visuelle Vergleichsgröße die Dicke der Media (Gefäßwand) verwendet.

Grad 1 bezeichnet demnach eine maximale Fibrosierung von 25% bezogen auf die Mediadicke. In Grad 2 stellt die Fibrosierung maximal 50% der Mediadicke dar, in Grad 3 maximal 75% und in Grad 4 maximal 100%. In Grad 5 ist die perivaskulär fibrosierte Schicht größer 100% der Mediadicke, d.h. sie erscheint unter dem Mikroskop breiter als die Schicht der Media.

Fibrosegrad	1	2	3	4	5
Perivaskuläre Fibrosierung bezogen auf die Mediadicke	≤ 25%	≤ 50%	≤ 75%	≤ 100%	> 100%

Es wurden nur zweifelsfrei beurteilbare Gefäße in die Auswertung einbezogen. Der Schweregrad wird mit der Anzahl der untersuchten Gefäße multipliziert und auf die Gesamtzahl der gezählten Gefäße innerhalb eines Nierenschnitts bezogen. Alle Gewebeschnitte wurde zweimal beurteilt, ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen wurden ermittelt und mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert.

### **2.2.8.6 Elastica-Färbung zur Bestimmung der Media-Lumen-Ratio**

Die Elastica-Färbung wurde zur Untersuchung Media-Lumen-Ratio der Gefäßwanddicke, als Marker für arteriosklerotische Veränderungen, in der Niere durchgeführt.

#### Prinzip:

In der Elastica -Färbung werden die elastischen Fasern der Nierengefäße angefärbt. Durch das Resorcin werden die Hüllschichten der Fasern aufgeraut. An dieser derart vergrößerten Oberfläche kann sich nun das Fuchsin über die Grenzflächenadsorption an die Fasern anlagern.

#### Färbelösungen:

- Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert

#### Färbung:

##### Färbung

Resorcin- Fuchsin- Lösung 10 min

(im Brutschrank bei 60 °C)

mit Leitungswasser spülen

mit Aqua dem. spülen

Entwässern

Eindecken

### **2.2.8.6.1 Digitale Morphometrie der Media-Lumen-Ratio**

Die Media-Lumen Ratio aller querdurchschnittenen, intrarenalen Arterien wurde in einem histologischen Schnitt pro Niere ausgewertet. Zur Analyse der Ratio von Media zu Lumen von intrarenalen Arterien wurde ein digitales Bildverarbeitungssystem genutzt.

Die PAS-gefärbten Präparate wurden bei einer Vergrößerung von 400x am Mikroskop (Axiovert 100) nach Arterien mäanderförmig durchgemustert. Es wurden alle Arterien zur Analyse verwertet, deren innere und äußere Zirkumferenz vollständig im

histologischen Schnitt enthalten war. Dabei ist es nahezu unvermeidlich, die meisten Arterien im Schnitt nicht orthogonal zu treffen. Daher wurde zur Beurteilung der Morphologie die Ratio von Mediafläche zu Lumenfläche herangezogen. Dieser Quotient ist, wie aus dem dreidimensionalen Strahlensatz ersichtlich, unabhängig davon, ob eine Arteriole orthogonal oder schräg getroffen ist.

Von den Arterien wurde ein digitales Photo erstellt. Dies geschah mit Hilfe einer CCD-Kamera und des Programms Image Version 1.61 (Bethesda, MD) (eine shareware des National Institut of Health, USA) auf einem MacIntosh PowerPC 750/100. Die digitalen Bilder der Arterien wurden mit dem Programm Image 1.61 weiter analysiert. Mit Hilfe eines digitalen Zeichenbretts (Wacom ArtPad II) wurde die äußere Zirkumferenz der Media der Arterien umfahren, markiert und die Fläche gemessen. Anschließend wurde die innere Begrenzung der Media ebenso markiert und die Fläche des Lumens bestimmt. Aus diesen so bestimmten Flächen wurde dann die Fläche der Media und die Media-Lumen-Ratio berechnet

Mediafläche = Gesamtfläche - Lumenfläche

Media-Lumen-Ratio = Mediafläche/Lumenfläche

## 2.2.9 Immunhistochemie

Mit Hilfe von Rabbit-Antikörpern gegen Renin und neuronaler NO-Synthetase (nNOS) wurde an 3µm breiten Paraffin-Schnitten von den Tieren aller vier Gruppen immunreaktives Renin und nNOS nachgewiesen.

### Lösungen:

- Xylol 100%
- Primärantikörper: Rabbit-AK gegen Renin von Prof. Dr. Kurtz, Regensburg, Deutschland
- Primärantikörper: neuronale NO-Synthetase (nNOS) von Axxora, Grünberg, Deutschland
- Sekundärantikörper: Anti-Rabbit-AK von Prof. Dr. A. Kurtz, Regensburg, Deutschland
- Streptavidin-Biotin-Phosphatase (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland)
- Ethanol in den Konzentrationen: 100%, 96%, 80% und 70%

PBS nach Dulbecco A:

NaCl 8g  
KCl 0,2g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g  
ad 1l Aqua bidest

TBS-Puffer:

0,1 M TRIS-HCl 12,1g  
0,1 M NaCl 5,84g  
0,05 M MgCl<sub>2</sub> 4,76g  
pH 7,5

Trypsin-Lösung:

0,1% Trypsin 5mg  
0,1% CaCl<sub>2</sub> 5mg  
ad 5 ml TBS-Puffer  
pH 7,5

4M HCl:

37% HCl 1:2,2 verdünnt in Aqua bidest.

Inkubationspuffer:

2,5g Albumin aus Rinderserum  
250 µl Triton X 100  
ad 500 ml PBS nach Dulbecco A

Diaminobenzidin + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Diaminobenzin (im Lieferumfang enthalten) in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 min unter Schütteln lösen, anschließend filtrieren ad PBS nach Dulbecco A
PBS-Glycerin:	PBS nach Dulbecco A mit Glycerin im Verhältnis 2:1

### 2.2.9.1 Technische Durchführung

Folgende Arbeitsschritte wurden an den Paraffin-Schnitten durchgeführt:

Entparaffinieren:

Wiederholungen	Dauer (min)	Lösung
2x	5	Xylol
2x	5	Ethanol abs.
1x	5	Ethanol 96%
2x	5	Ethanol 80%
1x	5	Ethanol 70%
1x	2	Aqua bidest.
2	3	TBS-Puffer

Danach wurden die Gewebeschnitte wie folgt weiter bearbeitet:

1. Trypsin-Verdauung: Auf jeden Organschnitt wurden 25 µl Trypsinlösung pipettiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Mit einer Vakuumpumpe wurde die Trypsinlösung von den Organschnitten abgesaugt und danach die Schnitte 5 min in TBS-Puffer gegeben. Dann wurden die Schnitte in Aqua bidest. überführt und für eine Minute darin belassen.
2. Denaturierung: Die Schnitte wurden für 15 min in 4M HCl gegeben und anschließend 3x für 5 min in Inkubationspuffer gespült.
3. Inkubation mit dem Primärantikörper: Rabbit-Antikörper gegen Renin und neuronale NO-Synthetase (nNOS) wurde in Inkubationspuffer 1:50 verdünnt und davon jeweils 50 µl auf die Nierenschnitte aufgetragen. Es wurde 2 h bei 20°C Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von 12h Inkubation bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte 3x für 2 min in PBS nach Dulbecco A gespült.

4. Inkubation mit dem Sekundärantikörper: Anti-Rabbit-Antikörper wurden mit Inkubationspuffer 1:500 verdünnt und 50 µl davon auf jeden Schnitt aufgetragen. Es wurden 50 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min mit PBS nach Dulbecco A gespült.

Streptavidin-Biotin-Phosphatase wurde mit Inkubationspuffer 1:500 verdünnt und 50 µl auf jeden Schnitt aufgetragen. Es wurde 50 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min mit PBS nach Dulbecco A gespült.

5. Nachweis der Streptavidin-Biotin-Phosphatase: 50 µl der Diaminobenzidin-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurden auf jeden Schnitt pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte jeweils 5 min in PBS nach Dulbecco A und danach 5 min in Aqua bidest. gespült.

6. Die Gewebeschnitte wurden mit PBS-Glycerin eingedeckt. Positive Zellen kommen rot zur Darstellung.

### **2.2.9.2 Auswertung**

Zur Evaluation des arteriellen Reninstatus wurde die Anzahl der renin-positiven Orte im juxtaglomerulären Apparat in einem Areal von 100 Glomerula gezählt.

Dafür wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte am Mikroskop bei 100facher Vergrößerung untersucht. Der gesamte Schnitt wurde mäanderförmig durchsucht.

Die reninpositiven Glomerula bzw. nNOS positiven Glomerula, die unter dem Mikroskop rot zur Darstellung kommen, wurden dann mit x/100 bzw. in Prozent angegeben.

Die Auswertung beruhte auf dem etablierten Fakt, dass mit variierenden Stimuli eine metaplastische Transformation die zwischen reninhaltenen und typischen glatten Muskelzellen der afferenten arteriellen Gefäßwand vorkommt (Hackenthal, Paul et al. 1990).

Der Wechsel korrespondierte mit dem Level der Reninsynthese und dem Plasmapreninlevel unter den verschiedenen Bedingungen (Hackenthal, Paul et al. 1990).

Die Quantifizierung von nNOS erfolgte wie die eben beschriebene Messung des Renins.

### 2.2.10 Western-Blot

Für die Western-Blot Analyse wurden die Nieren von jeweils drei Tieren aus jeder der vier Gruppen analysiert.

#### Lösungen:

PBS	NaCl 8g, KCl 0,2g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,15g H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2g ad 1l Aqua bidest.
Lysepuffer	250mM Succrose, 10mM TEA + 2 Tbl. Proteinaseinhibitor
Tranferpuffer	30 g Tris-Base, 144 g Glycin, ad 1 l A. dest
Elektrophoresepuffer/ Laufpuffer	30 g Tris-Base (0,25M), 144 g Glycin, 10 g SDS (1%), ad 1 l A. dest.) (entspricht pH 8,3)
Trenngel / SDS-Polyacrylamidgel 10%	7 ml Acrylamid-mix, 7 ml Gelpuffer, 2,5 ml Glycerol, 4 ml A. dest, 200 µl APS, 10 µl TEMED
Loading buffer	15 mg Tris-Base und 100 mg SDS auf 50 ml mit A. dest auffüllen (pH 6,8), dazu 4 g SDS, 20 ml Glycin, 10 ml Mercaptoethanol und 600 µl 1% Bromphenolblau (100 mg/10ml).
Gelpuffer	181,65 g Tris-Base (3M), 1,5 g SDS (0,3%), mit 2N HCl auf pH 8,45 einstellen, mit A. dest. auf 500 ml auffüllen
Sammelgel	1 ml Acrylamid-mix, 2 ml Gelpuffer, 5 ml A. dest, 100 µl APS, 10 µl TEMED
Ponceou-Rot	0,5g Ponceou S (0,5%) und 1 ml

	Essigsäure auf 100 ml A. dest. auffüllen und filtrieren)
Coumassie-Blau	Milch (5%), Magermilch
PBS + Tween	PBS + Tween 20 (2,5 ml/l), dann 1x10 min in PBS.
Primärer rabbit- AK gegen ETBR	1: 200 ; von Prof. Dr. Müller-Esterl, Frankfurt /M, Deutschland
Alpha Untereinheit des eNaC	1: 200 ; von Biotrend, Köln, Deutschland
Primärer sheep-Ak gegen ETAR	1: 200 ; von Axxora, Grünberg, Deutschland
Sekundär-Ak Anti-rabbit HRP (für ETBR)	1: 3000 ; horseradish-peroxidase-linked von DakoCytomation
Sekundär-Ak Anti-sheep HRP (für ETAR)	1: 2000 ; horseradish-peroxidase-linked von DakoCytomation

### 2.2.10.1 Organaufbereitung Niere

1/8 der gefrorenen linken Niere wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und in 500 µl Lysepuffer über 20 sek gelöst (ca. 100 µl Lysepuffer/100 mg Gewebe).

Das Gewebe wurde gevortext und danach in 10 min bei 4000G bei 4°C die Zellkerne abzentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde abermals 60 min bei 200-250.000G bei 4 °C zentrifugiert.

Danach erfolgte das Lösen der Pellets in 150-250 µl Lysepuffer und wurde in 3 Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zwei Eppendorfgefäße von jeder Probe wurden mit jeweils 1µl Proteinlösung + 9µl A. dest. für Proteinbestimmung eingefroren.

### 2.2.10.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit Pierce Micro BCA Protein Assay Prod# 232535, Rockford IL durchgeführt.

Lösungen:

Arbeitsreagenz: (im Lieferumfang des Tests enthalten)

100 ml Lösung A (enthält Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-Reagenz und Natriumtartrat in 0,2 molarer NaOH)

2 ml Lösung B (Kupfersulfat (4%))

Extraktionspuffer: 0,2 mol/l  $\text{CH}_3\text{COOH}$

0,5 mol/l  $\text{NaCl}_2$

pH 7,2 (eingestellt mit 0,1 molarer HCl-Lösung)

Protein-Standardlösung: 1 mg/ml Albumin aus Rinderserum in Aqua bidest.

Die Proben wurden in Extraktionspuffer 1:10 verdünnt. Von der so gewonnenen Lösung wurden 5  $\mu\text{l}$  mit 5  $\mu\text{l}$  Aqua bidest. gemischt. In eine Mikrotiterplatte wurden pro Vertiefung 200  $\mu\text{l}$  Arbeitsreagenz und 10  $\mu\text{l}$  verdünnter Probenlösung, bzw. 200  $\mu\text{l}$  Arbeitsreagenz und 10  $\mu\text{l}$  Standardlösung pipettiert. Weiterhin wurde in eine Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  Aqua bidest. als Leerwert pipettiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 540nm im Spektralphotometer (Spectra Power LTD) gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit Hilfe der gemessenen Extinktion der Standardlösung.

BSA 2mg/ml in mitgelieferter Ampulle für Verdünnungsreihe:

0,5 $\mu\text{l}$  (=1 $\mu\text{g}$ ) + 9,5 $\mu\text{l}$  A. dest.  $\rightarrow$  10 $\mu\text{l}$  (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

1	9	0,2
2	8	0,4
...	...	...
10	0	2

Das Vorgehen erfolgte nach Photometer, Standardkurve und Funktionsberechnung in Excel.

### 2.2.10.3 Elektrophorese

Vor der Durchführung werden die Glasplatten mit Ethanol 90% abgerieben und die Spacer (1 mm) festgeklemmt.

Das Trenngel (SDS-Polyacrylamidgel 10%) werden bis zu 2/3 oder 3/4 der Höhe zwischen die Glasplatten eingefüllt. Während der Polymerisierung (Dauer ca. 3-4 h) das Gel wird mit A. dest. überschichten.

Dann wird das A. dest. abgegossen, der Rest mit Papier abgesaugt, das Sammelgel aufgefüllt und der Kamm eingesetzt. Nach ca. 1h ist das Sammelgel hart.

Während der Wartezeit wird das Protein aufgetaut und mit Loading Buffer (blau) auf 10  $\mu\text{l}$  mit 25  $\mu\text{g}$  Protein pro Geltasche verdünnt. Das übrige Protein wird wieder in

flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben werden dann kurz runterzentrifugiert. Die Gelkammer (Biorad Mini Transblot Cell) wird mit Laufpuffer befüllt. Die Membranproteine mit dem Loading Buffer werden in die Geltaschen pipettiert, wobei an den Seiten nur Loading Buffer pipettiert wurde. Eine Tasche wurde mit 4,5 ml Marker befüllt.

Bei ca. 120 Volt, mit angepasster Stromstärke laufen die Proteine ca. 1,5- 2 Stunden.

Proteingrößen:

ETAR	38-40 kD
ETBR	38-40 kD
eNaC	70-90 kD

In dieser Zeit wird der Transferpuffer für Nassblot angesetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Dazu werden 100 ml des 10-fachen Transferpuffers mit 200 ml Methanol gemischt und mit A. dest auf 1l aufgefüllt. Außerdem wird „Whatman“ dickes Löschpapier zurechtgeschnitten (9 x 6 cm, je zwei pro Gel) und jeweils eine Blotmembran (5,5 x 8,5 cm).

#### **2.2.10.4 Blotting**

Das Gel wurde aus der Gelkammer genommen und das Sammelgel entfernt. Zur Kontrolle der Proteindarstellung wurde das Gel mit Coumassieblau gefärbt. In einer Schale mit Transferpuffer wird ein Sandwich aus Klammer, Pads, Löschpapier, Gel und Membran luftblasenfrei geschaffen und für 60-65 min bei 100 Volt in die Blotkammer gestellt. Nach dem Blotten wurde die Membran entnommen und die geblottete Membran, zur Kontrolle der Banden, kurz in Ponceou-Rot gefärbt.

Das Auseinanderschneiden von Banden für verschiedene Antikörper und das Beschriften wurde dann vorgenommen. Die Membran wurde mit A. dest. entfärbt und für 1 h in Milch (5%) geblockt.

#### **2.2.10.5 Antikörper**

Die Primärantikörper (Primär AK) wurden jeweils mit Milch verdünnt:

1:200 Rabbit-Antikörper gegen ETAR, von Axxora Grünberg, Deutschland

1:200 Sheep-Antikörper gegen ETBR, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Müller-Esterl, Frankfurt, Deutschland.

Wobei für einen Streifen ca. 200 µl, für eine ganze Membran ca. 800 µl benötigt wurden.

Die PrimärAK-Lösung wurde auf die Membran gegeben, zusammen eingeschweißt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran ausgeschnitten und gewaschen (3x10 min mit PBS + Tween, dann 1x10 min in PBS).

Die Sekundärantikörper (SekundärAK) von jeweils DakoCytomation wurden ebenfalls mit Milch verdünnt:

1:3000 für horseradish-peroxidase linked (HRP) Anti-Rabbit-IgG

1:2000 für HRP Anti-Sheep-IgG.

Für die Inkubation wurden die gleichen Volumina verwendet wie für den PrimärAK. Die Inkubation dauerte mindestens 1 h, danach wurde die Membran wieder ausgeschnitten und gewaschen wie beim PrimärAK.

#### **2.2.10.6 Darstellung auf Film**

Dazu wurden 2 chemilumineszierende Färbelösungen (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) kurz vorher gemischt, je ca. 0,5 ml, auf die Membran geträufelt und für 3 min bewegt. Die Membran wurde zwischen eine Folie gelegt, die Luftblasen entfernt und in die Filmkassette getan. Ein Film wurde darauf gelegt Die Belichtung dauerte ca. 30-60 min. Dann wurde der belichtete Film entwickelt, beschriftet, eingescannt und quantifiziert mit Bio-Profil Bio-1D 97.04 Software (Froebel, Wasserburg, Deutschland).

#### **2.2.11 Statistische Analyse**

Die Daten wurden mittels SPSS 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL) analysiert.

Die gemessenen und errechneten Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SD) dargestellt.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des parametrischen T-Tests berechnet und bei fehlender Normalverteilung wurden die Ergebnisse mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis Test und Mann-Whitney U Test auf Signifikanz überprüft.

Ein Ergebnis wurde als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als 5% war.

### **3 Ergebnisse**

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie präsentiert.

Es wurden 4 Gruppen verglichen:

1. Ratten mit einem funktionellem knockout und induziertem Diabetes mellitus (ETBRd+STZ),
2. Ratten mit ausschließlich funktionellem knockout des ETBR (ETBRd)
3. Ratten mit ausschließlich induziertem Diabetes mellitus (STZ)
4. Wildtyp-Ratten (WT)

Die altersgleichen (6 Monate alten) männlichen Ratten wurden zu Versuchsbeginn, nach 5 Wochen und nach 10 Wochen gewogen, ihr Blut und Urin untersucht sowie der Blutdruck gemessen. Anschließend wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen, gewogen und deren pathologische Veränderungen analysiert.

### 3.1 Körpergewichte und Organgewichte

Die Mittelwerte der Körpergewichte der vier Gruppen wurden über den Versuchszeitraum miteinander verglichen. Die Tiere wurden jeweils im gleichen Alter getötet und sezziert. Die Organgewichte wurden am Versuchsende verglichen, wobei sich im Vergleich die Organgewichte auf das jeweilige Körpergewicht der Ratte beziehen und damit keine absoluten, sondern relative Organgewichte miteinander verglichen wurden

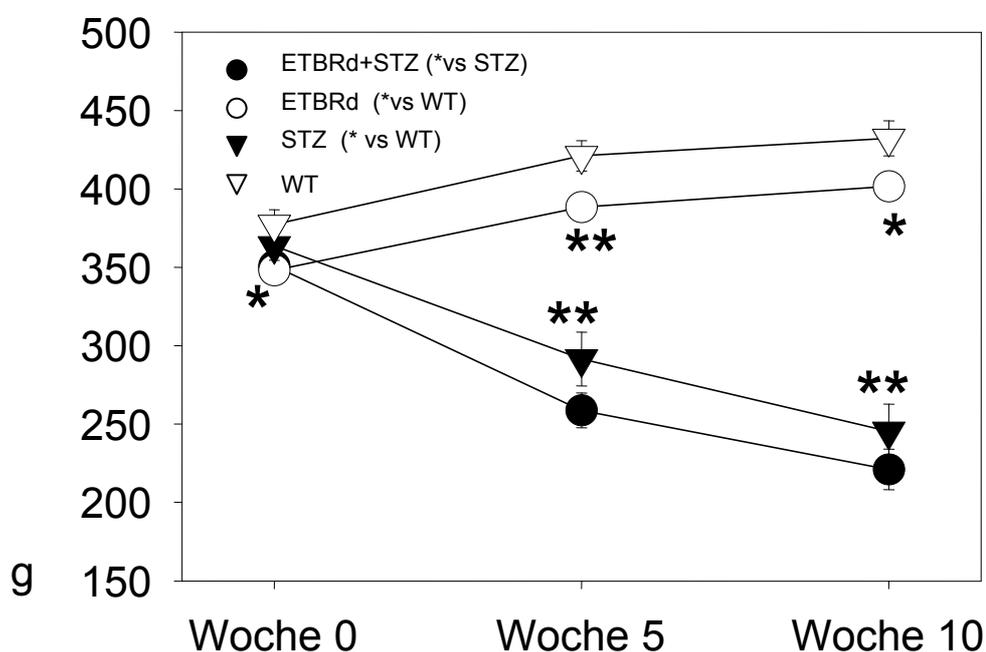


Abbildung 5: Dargestellt ist der Körpergewichtsverlauf der 4 Gruppen über 10 Versuchswochen, die Körpergewichte (KG) der diabetischen Tiere waren signifikant kleiner im Vergleich zu denen der nicht-diabetischen Tiere, pro Gruppe n= 6 bis 9 Tiere, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

Die Körpergewichtsentwicklung ist ein wichtiger Marker für die Entwicklung des Diabetes mellitus, da es bei dieser Erkrankung zu einer ausgeprägten katabolen Stoffwechsellage kommt. Über den Untersuchungszeitraum konnte diese Studie eine signifikante Reduzierung des Körpergewichts bei den diabetischen Tieren zeigen. Die ETBRd-Tiere und die Wildtyp-Tiere nahmen hingegen im Verlauf ihrer Entwicklung an Gewicht zu (siehe Abbildung 5).

Bezüglich der relativen Organgewichte zeigt sich statistisch ein sehr inhomogenes Bild. Signifikante Gewichtsunterschiede finden sich in allen Organen zwischen diabetischen Wildtyptieren und nicht-diabetischen Wildtyptieren. Bei den diabetischen Wildtyptieren sind diese Organe signifikant schwerer als bei den nicht-diabetischen Wildtyptieren. Einzig die Organgewichte der Niere und der Leber zeigen einen signifikanten Gewichtsunterschied zwischen den ETBRd+STZ-Tieren und STZ-Tieren (siehe Abbildung 6).

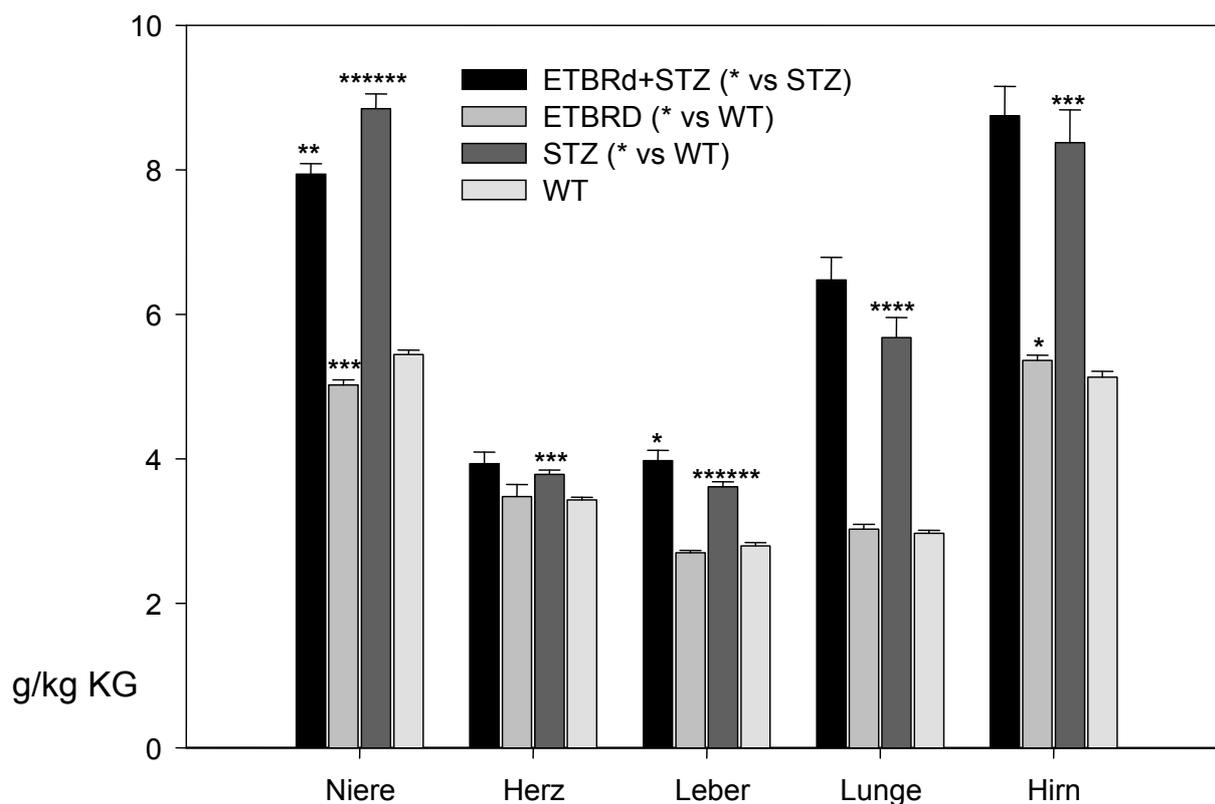


Abbildung 6: relative Organgewichte in g, über alle 4 Gruppen, Gruppengröße n=6-9, männliche Ratten, \*p<0,05, \*\*p<0,01, Mittelwerte ± Standardfehler

### 3.2 Blut- und Urinparameter

Der Urin wurde im Stoffwechsellkäfig über 24h zu Versuchsbeginn, in der 5. und 10. Versuchswoche gesammelt, gewogen und anschließend im Autoanalyzer sowie unter Verwendung der zuvor beschriebenen Methoden analysiert (siehe Kapitel 2.2.5 und 2.2.7.2)

Im Anschluss an den 24 stündigen Aufenthalt im Stoffwechsellkäfig erfolgte die retroorbitale Blutentnahme. Das Blut wurde zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und anschließend analysiert.

Um zu beweisen, dass die Induktion des Diabetes mellitus mit Streptozotocin erfolgreich gelungen war, wurden Blut und Urin analysiert. Da beim Diabetes mellitus per definitionem ein erhöhter Blutzuckerspiegel und eine erhöhte Glukoseausscheidung im Urin vorliegen, wurde die Glukose im Plasma und im Urin bestimmt. Für die diabetischen Tiere konnte ein signifikanter Anstieg der Glukose nachgewiesen werden (diabetische Gruppen vs. nicht-diabetische Gruppen,  $p < 0,01$ ), wie die nachstehenden Grafiken zeigen (Abbildung 7 und 8).

Weiterhin zeigen die diabetischen Versuchsgruppen das Bild eines Diabetes mellitus mit Polyurie (gesteigertes Urinvolumen) und Polydipsie (gesteigerte Flüssigkeitsaufnahme), aufgrund der osmotischen Wirkung (erhöhte Osmolalität im Plasma) der Glukose (siehe Tabelle 5).

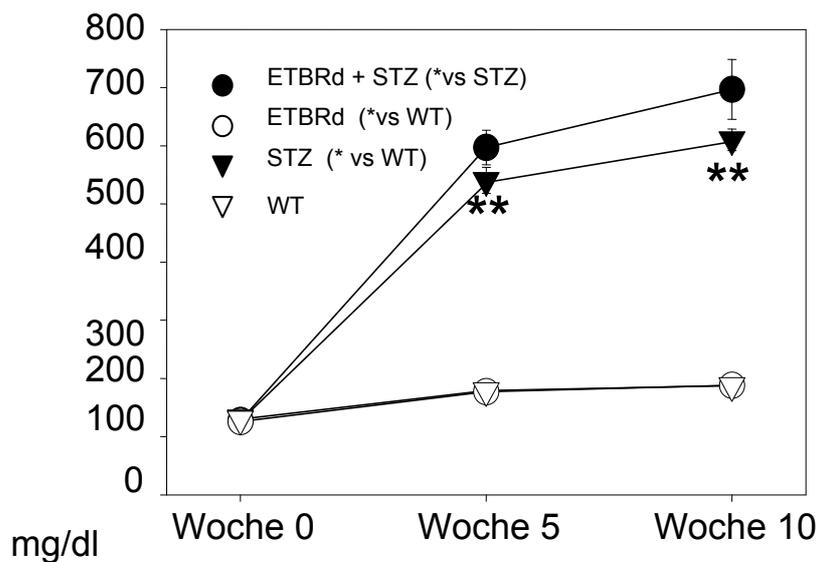


Abbildung 7: Glukose im Plasma, dargestellt über den Versuchszeitraum, Gruppengröße n=6-9, männliche Ratten, \*\*p<0,01, hoch signifikante Glukoseerhöhung in den diabetischen Tieren, nicht diabetische Tiere bleiben normoglykäm, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

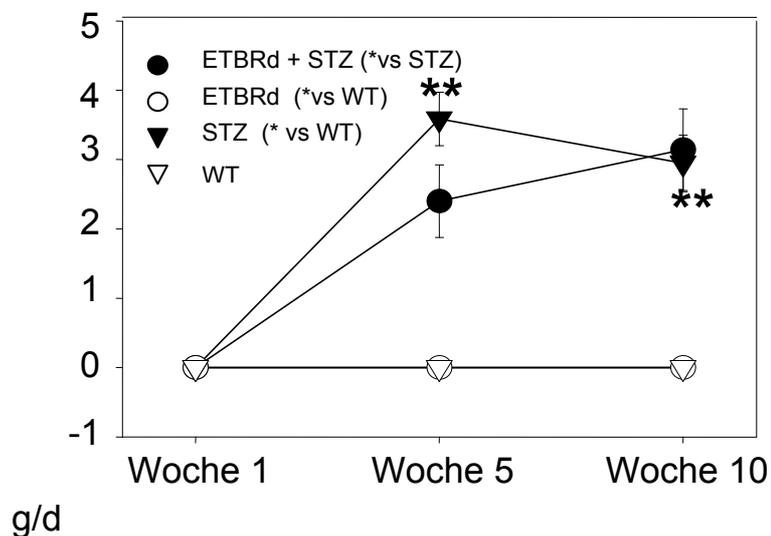


Abbildung 8: Glukose im Urin, dargestellt über den Versuchszeitraum, männliche Ratten, Gruppengröße n=6-9, \*\*p<0,01, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

	ETBRd+STZ	ETBRd	STZ	WT
Osmolalität im Plasma (mmol/kg)	336 ± 9.5**	302 ± 2.1	328 ± 8.6**	302 ± 3.4
Flüssigkeitsaufnahme (ml/d)	56 ± 28*	21 ± 10	61 ± 11**	19 ± 4.1
Urinvolumen (ml/d)	52 ± 19**	18 ± 8.5	46 ± 8.9**	16 ± 5.2

Tabelle 5: Flüssigkeitsaufnahme, Urinvolumen und Osmolalität \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus nicht-diabetische Gruppe des gleichen Genotyps am Versuchsende in der 10. Woche, Gruppengröße n=6-9 (männliche Tiere). Mittelwerte ± Standardfehler.

Weiterhin konnte in der durchgeführten Versuchsanordnung gezeigt werden, dass die Gruppe der ETBRd+STZ-Tiere eine stärkere Proteinurie zeigt. In der Gruppe der ETBRd+STZ-Tiere ist Albumin im Urin im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant erhöht (p<0,01). Im Besonderen fällt auf, dass die Diabetes-Gruppe (STZ) erst am Ende des Versuchszeitraums einen leichten Anstieg der Albuminurie zeigt (Abbildung 9), wohingegen die ETBRd-STZ-Tiere bereits in der Versuchsmitte eine erhöhte Proteinurie zeigen. Dies könnte auf einen schwereren Verlauf des erzeugten Diabetes bei den ETBRd-STZ-Tieren hinweisen.

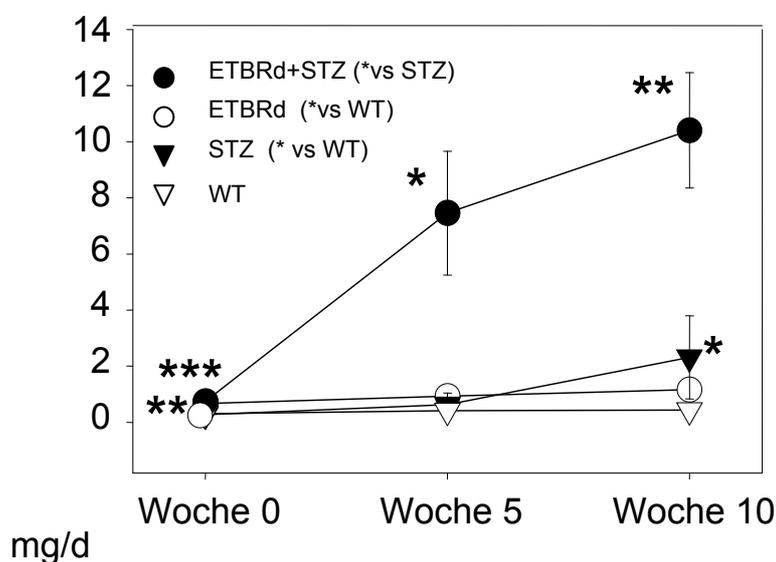


Abbildung 9: Albumin im Urin, gemessen über den Untersuchungszeitraum von 10 Wochen, Messung in der 0., 5. und 10. Woche in allen 4 Gruppen, Gruppengröße n=6-9, \*p<0,05, \*\*p<0,01, Mittelwerte ± Standardfehler

Nach der 10. Woche findet sich ebenfalls signifikant erhöhtes Kreatinin im Plasma der ETBRd+STZ-Tiere im Vergleich zu den STZ-Tieren (ETBRd+STZ-Tiere  $58 \pm 3,4 \mu\text{mol/L}$  versus STZ-Tiere  $39 \pm 3,4 \mu\text{mol/L}$ ) (Abbildung 10).

Ein ähnliches Bild wie bei den zuvor beschriebenen Parametern findet sich auch für die Kreatinin-clearance. Die ETBRd+STZ-Gruppe zeigt nach 10 Wochen eine niedrigere Clearance (siehe Tabelle 6) als die diabetischen Wildtyptiere. Da die Kreatinin-clearance als Äquivalent für die GFR verwendet wird, ist dieses Ergebnis gleichbedeutend mit einem Rückgang der GFR in den ETBRd+STZ-Tieren.

Bei den Werten des Serumharnstoffs (Abbildung 11) ist bezüglich der Erhöhung der Werte der ETBRd+STZ-Gruppe nur eine nicht signifikante Tendenz ( $p=0,09$ ) in der 10. Versuchswoche im Vergleich zu den diabetischen Wildtyptieren erkennbar. In dieser Woche liegt der Mittelwert der ETBRd+STZ-Tiere bei  $17 \pm 3,9 \text{mmol/L}$ . Im Vergleich dazu liegt der Mittelwert der STZ-Tiere bei  $13 \pm 4,7 \text{mmol/L}$ .

Bei den Serumharnstoffwerten, wie auch beim Serumkreatinin, ist allerdings wieder ein signifikanter Unterschied zwischen den diabetischen und nicht-diabetischen Tieren nachzuweisen (siehe Abbildung 10 und 11).

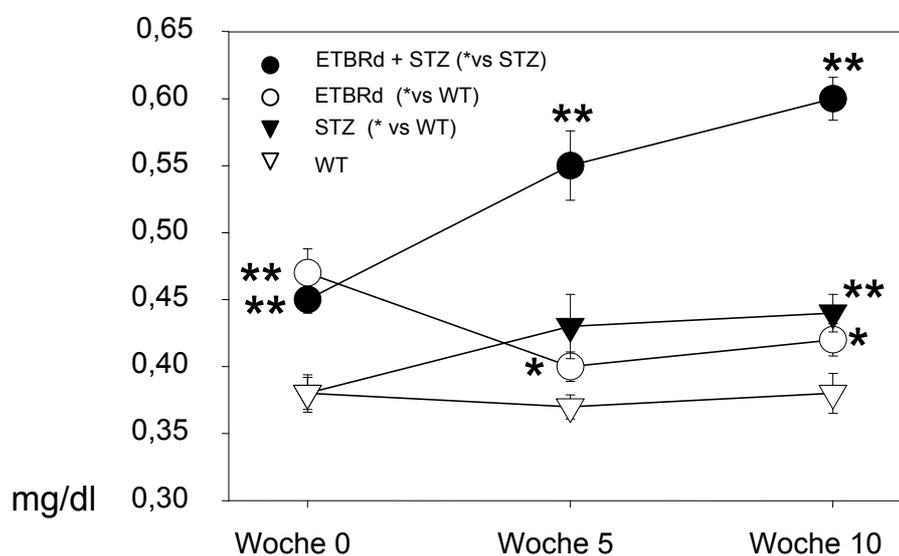


Abbildung 10: Serumkreatinin im Versuchsverlauf, Angabe in mg/dl, männliche Ratten, Gruppengröße  $n=6-9$ ,  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$ , Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

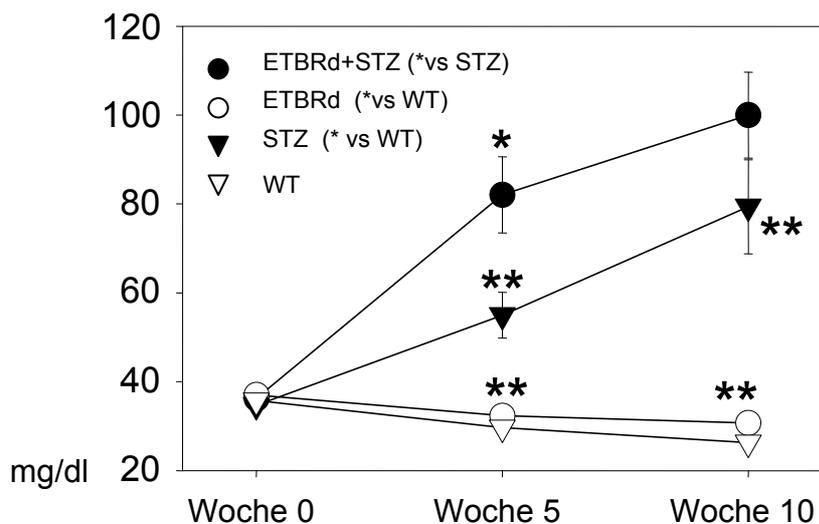


Abbildung 11: Serumharnstoff, Angabe in mg/dl, dargestellt über den Versuchszeitraum, männliche Ratten, Gruppengröße n=6-9, \*p<0,05, \*\*p<0,01, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

Die Auswertung von Natrium zeigt im Blut eine signifikante Hyponatriämie in den ETBRd+STZ-Tieren und STZ-Tieren (siehe Tabelle 6). Beide Diabetes-Gruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Natriumausscheidung im Vergleich zu den nicht-diabetischen Tieren (siehe Tabelle 7). Auch die Osmolalität im Urin unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Gruppe	Kreatinin mg/dl	Kreatinin-Clearance ml/min pro kg	Natrium mmol/l
ETBRd+STZ	0,60 $\pm$ 0,03*	3,2 $\pm$ 0,8*	123 $\pm$ 3,9#
ETBRd	0,42 $\pm$ 0,1\$	3,8 $\pm$ 1,4	133 $\pm$ 2,1
STZ	0,44 $\pm$ 0,04\$\$	4,3 $\pm$ 0,9#	126 $\pm$ 2,2#
WT	0,38 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 1,0	134 $\pm$ 1,7

Tabelle 6: Serum-Kreatinin, Kreatinin-Clearance und Serumnatrium in Versuchswoche 10, Gruppengröße n=6-9, männliche Tiere, \*p<0,05, versus STZ, # p<0,05, versus nicht-diabetische Gruppe des gleichen Genotyps, \$p<0,05 \$\$p<0,01 versus Wildtyp, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

Gruppe	Kreatinin mg/d	Natrium mmol/d	Kalium mmol/d	Osmolalität osmol/kg
ETBRd+STZ	12,6±4,4\$	0,5±0,4	1,6±0,5#	0,65±0,04
ETBRd	57,2±30,1	0,4±0,3	0,8±0,3	0,45±0,23
STZ	14,6±2,5#	0,2±0,3	1,5±0,5#	0,69±0,08
WT	67,9±34,1	0,4±0,1	0,9±0,3	0,57±0,28

Tabelle 7: Urinparameter in Versuchswoche 10, Gruppengröße n=6-9, männliche Tiere, # p<0,05 versus nicht-diabetische Gruppe des gleichen Genotyps, \$p<0,05 versus Wildtyp, Mittelwerte ± Standardfehler

### 3.3 Nierenmorphologie

#### 3.3.1 Glomerulosklerose

Um den Grad der Schädigung der Nieren auch histopathologisch zu untersuchen, wurden Schnitte der Nieren angefertigt, PAS gefärbt und mikroskopisch untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die geschädigten Glomerula gelegt.

In der histologischen Auswertung der Präparate zeigt sich die stärkste Glomerulosklerose in der Gruppe der ETBRd+STZ-Tiere (Abb. 12). Beide Gruppen der an Diabetes erkrankten Ratten zeigen eine signifikante Erhöhung der Glomerulosklerose im Vergleich zum Wildtyp. Die ETBRd-Tiere unterscheiden sich kaum vom Wildtyp und zeigen eine weniger ausgeprägte Glomerulosklerose als die Gruppe gleichen Genotyps mit Diabetes. Abbildung 13 veranschaulicht die Glomerulosklerose in den einzelnen Gruppen.

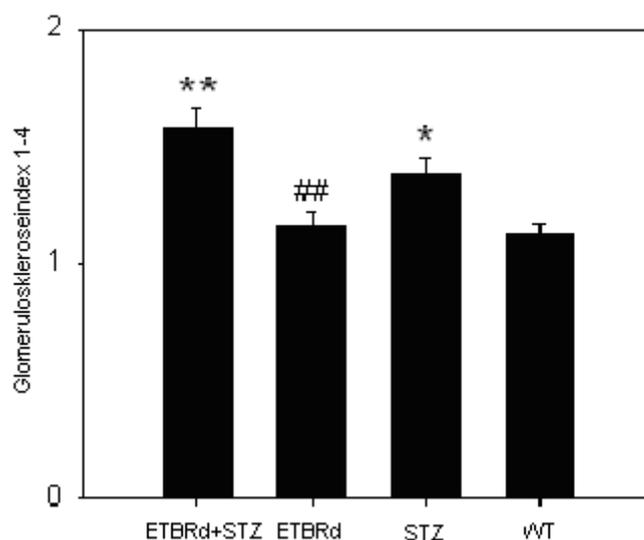


Abbildung 12: zeigt einen höheren Glomeruloskleroseindex bei den ETBRd+STZ, GI 1-4: männliche Ratten, Gruppengröße n=6-9, ##p<0,01 versus ETBRd+STZ, \*p<0,05, \*\*p<0,01 versus WT (Mann-Whitney -U-Test), Mittelwert +/- Standardfehler

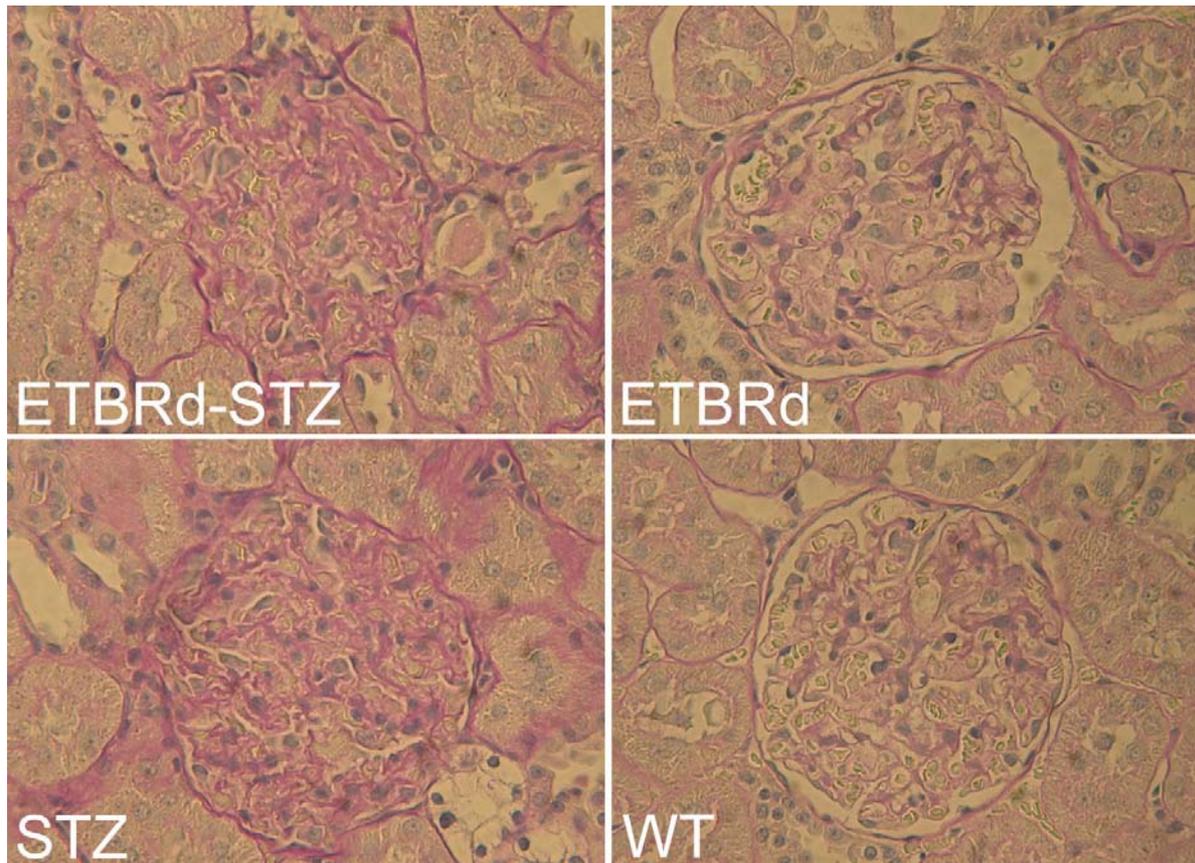


Abbildung 13: PAS-Färbung, repräsentative Glomerula aller vier Gruppen, die zunehmende Glomerulosklerose kommt durch stärkere Färbung zum Ausdruck, deutlich sichtbare Glomerulosklerose in ETBRd+STZ und STZ

### 3.3.2 Media-Lumen-Ratio

Um die Größenzunahme von Gefäßwänden zu überprüfen, deren Dickenwachstum auf pathologische Umbauprozesse schließen lässt, wurde die Media-Lumen-Ratio computergestützt analysiert. Dafür wurde eine Elastica-Färbung der Nierenschnitte angefertigt und computergestützt unter dem Mikroskop fotografiert und mittels Flächenberechnung über ein Computerprogramm analysiert (siehe auch 2.2.8.6.1). Die Media-Lumen-Ratio ist bei den ETBRd+STZ-Tieren erhöht (Abb.14).

Die Media-Lumen-Ratio (MLR) der Nierengefäße in der ETBRd-Gruppe und der STZ-Gruppe ist annähernd gleich. Die Gefäßwanddicke der ETBRd-Gruppe und die STZ-Gruppe sind gegenüber der ETBRd+STZ-Gruppe signifikant kleiner, mit jeweils  $p < 0,01$ , aber auch signifikant größer im Vergleich zur Wildtypgruppe.

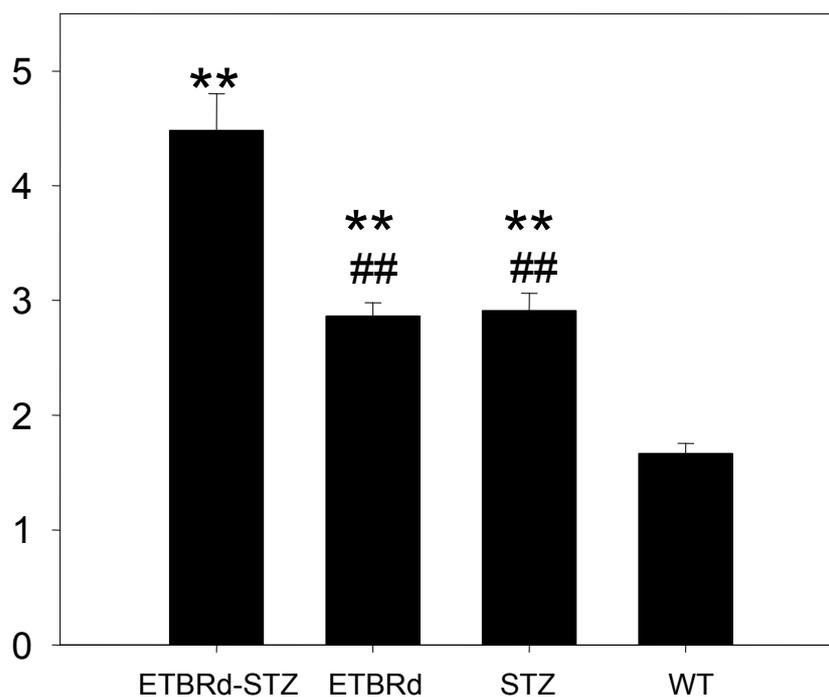


Abbildung 14: zeigt die Media-Lumen-Ratio der vier Versuchsgruppen, männliche Ratten, Gruppengröße  $n=6-9$ , ##  $p < 0,01$  versus ETBRd+STZ, \*\*  $p < 0,01$  versus WT (Mann-Whitney -U-Test), Mittelwert +/- Standardfehler

Für die Berechnung der Media-Lumen-Ratio musste zuvor das Lumen bestimmt werden. Die Lumen (Abb. 15) unterscheiden sich bereits signifikant in den Gruppen. Hierbei fällt auf, dass die Tiere des Wildtyps die größten Lumina haben und die ETBRd+STZ-Gruppe die kleinsten Lumina hat, was möglicherweise auf arteriosklerotische Umbauprozesse schließen lässt.

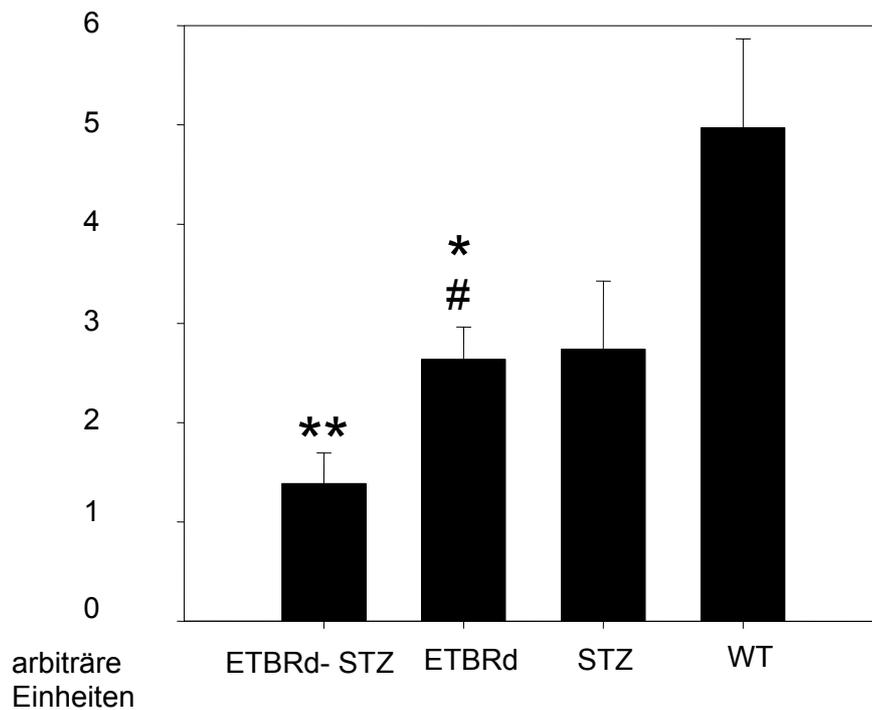


Abbildung 15: zeigt die Lumina der Nierenarterien aller vier Versuchsgruppen, männliche Ratten, Gruppengröße n=6-9, #p<0,05 versus ETBRd+STZ, \*p<0,05, \*\*p>0,01 versus WT (Mann-Whitney -U-Test), Mittelwert +/- Standardfehler

### 3.3.3 Perivaskuläre Fibrose

Um den Grad der Fibrose in den Nieren zu beurteilen, wurden die Schnitte der Nieren Sirius-Red gefärbt und visuell ausgewertet.

Die perivaskuläre Fibrose ist ein weiterer Hinweis für die pathologischen Umbauprozesse in den Nierengefäßen. Es zeigt sich eine signifikant stärkere Fibrosierung in der Umgebung der Nierengefäße der ETBRd+STZ-Gruppe im Vergleich zur genetisch gleichen Gruppe ohne Diabetes (Abb.16). Die ETBRd-Tiere zeigen signifikant weniger perivaskuläre Fibrose als alle anderen drei Gruppen. Es gibt keinen signifikanten Unterschied der perivaskulären Fibrose zwischen den WT-Tieren und der ETBRd+STZ-Gruppe.

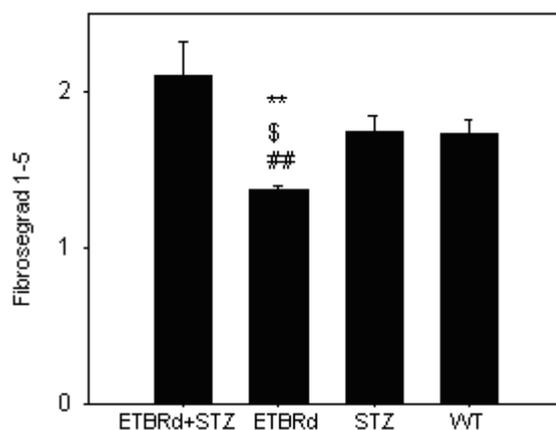


Abbildung 16: zeigt die perivaskuläre Fibrose in der Niere über alle vier Versuchsgruppen, männliche Ratten, Gruppengröße n=6-9, ###p<0,01 versus ETBRd+STZ, \$p<0,05 versus WT, \*\*p<0,01 versus STZ (Mann-Whitney -U-Test), Mittelwert +/- Standardfehler

### 3.3.4 Interstitielle Fibrose

Die computergestützte Auswertung der interstitiellen Fibrose erfolgte nach Anfärbung der Schnitte mit Sirius-Red.

Die interstitielle Fibrose wird in Prozent der Gesamtfläche des untersuchten mikroskopischen Ausschnitts angegeben. Sie gibt Auskunft über pathologische Umbauprozesse im Interstitium der Niere. Anders als die perivaskuläre Fibrose zeigt die interstitielle Fibrose keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Alle vier Gruppen zeigen etwa den gleichen Grad der Fibrosierung (Abb.17).

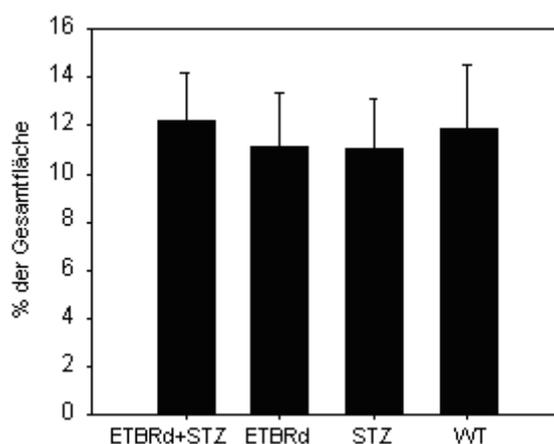


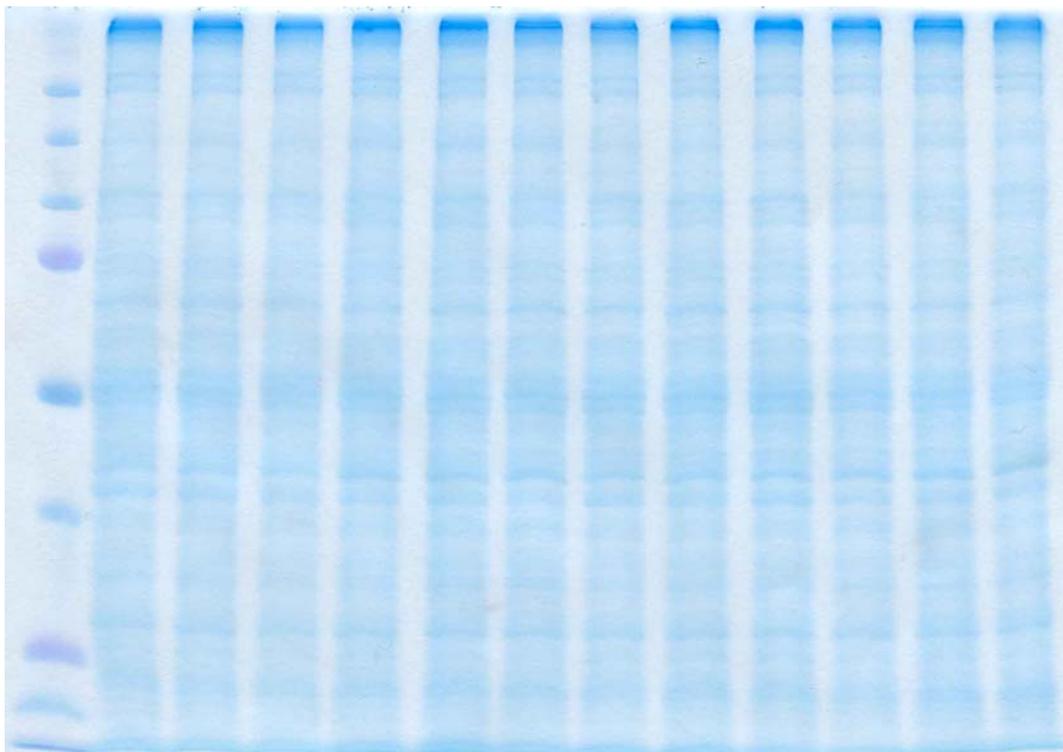
Abbildung 17: zeigt die interstitielle Fibrose im Nierenparenchym, keine signifikanten Unterschiede der interstitiellen Fibrose in den vier Gruppen, männliche Ratten, Gruppengröße n=6-9, getestet mit Mann-Whitney-U-Test, Mittelwert +/- Standardfehler

### 3.4 Western Blot: Rezeptorprotein-Analyse

Zur Analyse der Rezeptorproteine in der Niere wurde ein Western Blot durchgeführt. Dafür wurde das gewonnene Material der linken eingeforenen Niere von jeweils drei Tieren aus jeder der vier Gruppen analysiert. Zunächst wurde eine Proteinbestimmung nach PIERCE durchgeführt, um dann mit den entsprechenden Verdünnungsreihen den Western Blot zu starten.

Zur Veranschaulichung der gleichmäßigen Elektrophorese und Ausbildung der Proteinbanden wurde zur Kontrolle eine Coumassie-Färbung angefertigt (Abbildung 18). An der linken Seite ist der Marker für die nach Proteindichte getrennten Banden aufgetragen. Danach folgen für jede Gruppe drei Proteinbanden, die von jeweils einem Tier dieser Gruppe stammen.

Coumassie-Färbung:



Marker	ETBRd+STZ	ETBRd	STZ	WT
--------	-----------	-------	-----	----

Abbildung 18: Coumassie-Färbung des Western Blot

### 3.4.1 ETBR und ETAR-Darstellung

Um die Expression des ETBR und ETAR zu quantifizieren, wurde ein Western Blot durchgeführt und mittels Computeranalyse ausgewertet. In Abbildung 19 ist dargestellt, dass der ETBR in den ETBRd-Tieren fast nicht nachweisbar ist (ETBRd vs. STZ und WT  $p < 0,05$ ) und in den Wildtyp-Tieren klar nachzuweisen ist. Da es sich bei den Tieren um einen funktionellen knockout mit Expression des ETBR im Nervengewebe und adrenergem Gewebe handelt, bleiben geringe Mengen an ETBR nachweisbar. Bei den diabetischen Tieren ist eine signifikante Erhöhung des ETBR gegenüber den Wildtyp-Tieren nachweisbar ( $p < 0,05$ ). Der ETAR ist dagegen in allen vier Gruppen nachweisbar. In der ETBRd+STZ-Gruppe zeigt sich zudem eine Senkung der ETAR-Expression gegenüber der STZ-Gruppe. Eine verminderte Expression von ETAR findet sich auch bei den nicht-diabetischen ETBRd-Tieren im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe.

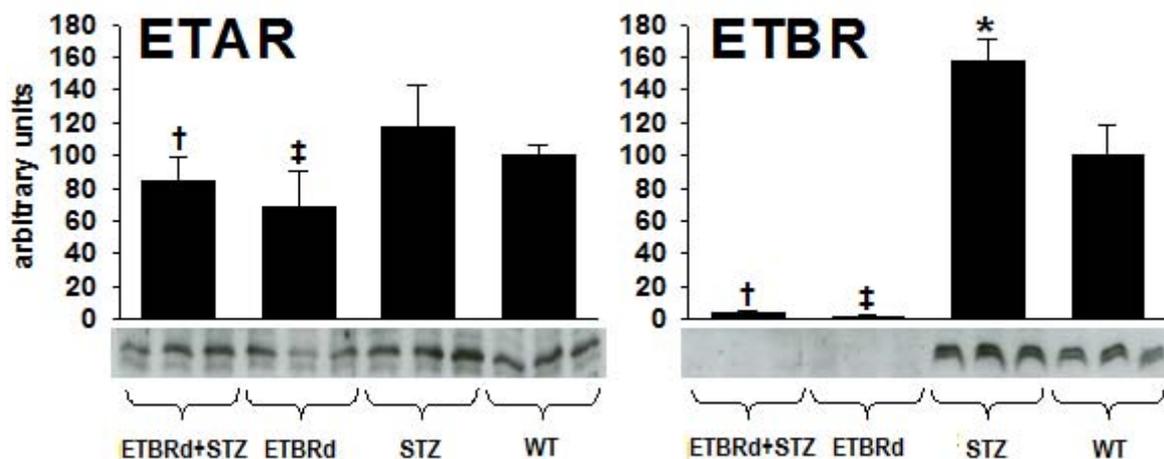


Abbildung 19: zeigt Western Blot für den renalen ETAR und ETBR, männliche Ratten,  $n=3$  pro Gruppe. Bandbreite ca. 41 kD für ETAR und ca. 37 kD für ETBR, \* $p < 0,05$  versus nicht diabetische Gruppe des gleichen Genotyps, † $p < 0,05$  versus STZ. ‡ $p < 0,05$  versus WT, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler

### 3.4.2 Darstellung des epithelialen Natriumkanals (eNaC)

Um einen möglichen Einfluß des eNaC (epithelialen Natriumkanal) im distalen Tubulus der Niere als mögliche Ursache für den Hypertonus zu untersuchen, wurde ebenfalls ein Western Blot durchgeführt. Die Quantität der  $\alpha$ -Untereinheit des Aldosteron-induzierbaren eNaC unterscheidet sich nicht signifikant in den 4 Gruppen (Abbildung 20 und 21).

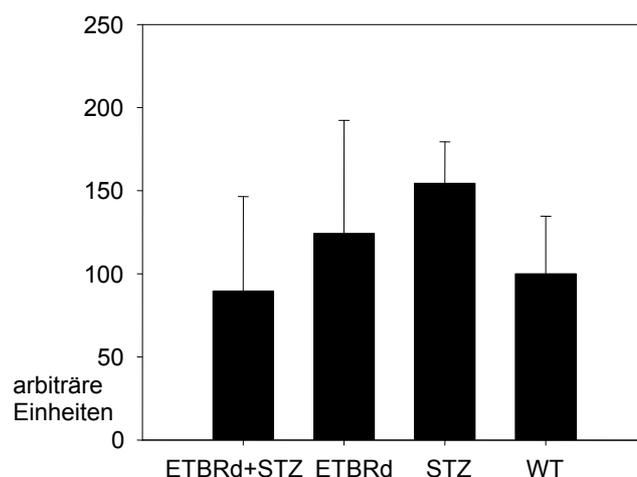
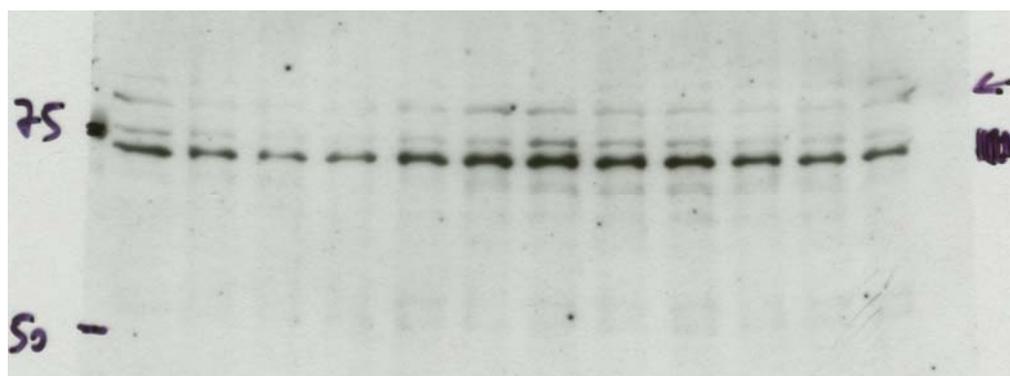


Abbildung 20: zeigt Western Blot für alpha-eNaC bei ca.72 kD, n=3 pro Gruppe, männliche Ratten, keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von eNaC in den 4 Gruppen darstellbar (Mann-Whithney-U-Test), Mittelwert  $\pm$  Standardfehler



Marker	ETBRd+STZ	ETBRd	STZ	WT	

Abbildung 21: Das Foto zeigt die Proteinbanden des alpha-eNaC, bei 72kD, Western Blot über alle 4 Gruppen, die Markerbande ist bei 50 und 75 kD beschriftet

### 3.5 Blutdruck- und Herzfrequenzergebnisse

Die Blutdruckmessung erfolgte nach der Tail-cuff-Methode. Diese nichtinvasive Blutdruckmessmethode wird mit Hilfe einer Druckmanschette und eines Pulsaufnehmers am Schwanz des Tieres durchgeführt. Damit ist es möglich, den mittleren systolischen Blutdruck und die Herzfrequenz zu ermitteln.

Bereits zu Beginn des Versuchs unterschieden sich die ETBRd-Gruppen deutlich von den Wildtyptieren. Alle ETBRd-Tiere zeigen von Beginn an ein höheres Blutdruckniveau.

Die Blutdruckwerte in der 5. Versuchswoche sind signifikant erhöht in der ETBRd/STZ-Gruppe und der ETRRd-Gruppe. In der zehnten Woche ist ebenfalls ein signifikant erhöhter Blutdruck in der ETBRd/STZ-Gruppe und der ETRRd-Gruppe im Vergleich zu den STZ- und WT-Tieren zu messen. Die schwere Hypertonie in den ETBRd-Gruppen bleibt bis zum Versuchsende bestehen (Abbildung 22).

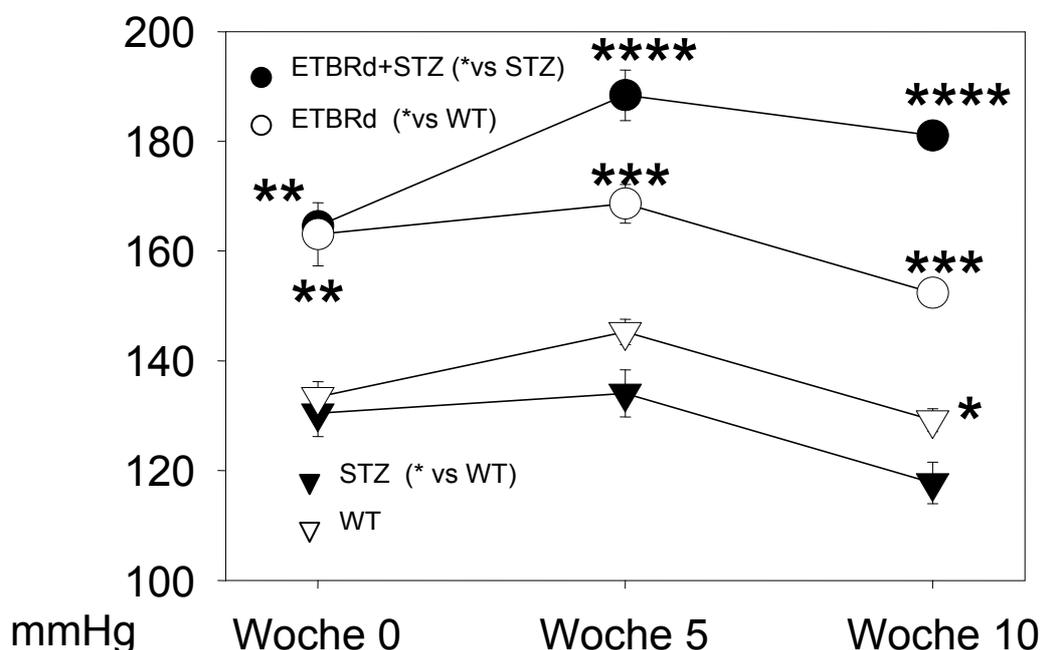


Abbildung 22: Systolischer Blutdruck über den Zeitraum des Experiments (10 Wochen), männliche Ratten, Gruppengröße n=6-9, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, Mittelwerte ± Standardfehler

Wie bereits bei Gariepy 2000 beschrieben, entwickeln die ETBRd Tieren bei normaler Salzdät einen Hypertonus. Der Blutdruck liegt vor Induktion des Diabetes mellitus bei den ETBRd-Tieren im Mittel bei 164 mmHg, bei den Wildtyp-Tieren bei 131 mmHg. Nach der Induktion von Diabetes mellitus zeigt sich ein signifikante Erhöhung des systolischen Blutdrucks zu einem Maximum von 188 mmHg in der ETBRd-STZ-Gruppe (5. Woche, ETBRd-STZ vs. STZ,  $p < 0,0001$ ). (Abbildung 22).

Die Herzfrequenz zeigt ein nicht so homogenes Bild. Die Herzfrequenz der ETBRd-Gruppen ist bei Versuchsbeginn signifikant höher im Vergleich zur WT-Gruppe und STZ-Gruppe. Im Versuchsverlauf sinken die Herzfrequenzen der beiden diabetischen Gruppen und nähern sich am Ende des Versuchszeitraums auf gleichem Niveau an. Die Herzfrequenz der ETBRd-Gruppe sinkt über den Versuchszeitraum ebenfalls ab und nähert sich der Herzfrequenz der WT-Gruppe an, die über den gesamten Versuch nahezu gleich geblieben ist. Insgesamt sind die Herzfrequenzen aller Gruppen, ausgenommen der Wildtypiere, am Ende des Versuchs signifikant niedriger als zu Beginn und in der 5. Woche der Messung. (Abbildung 23)

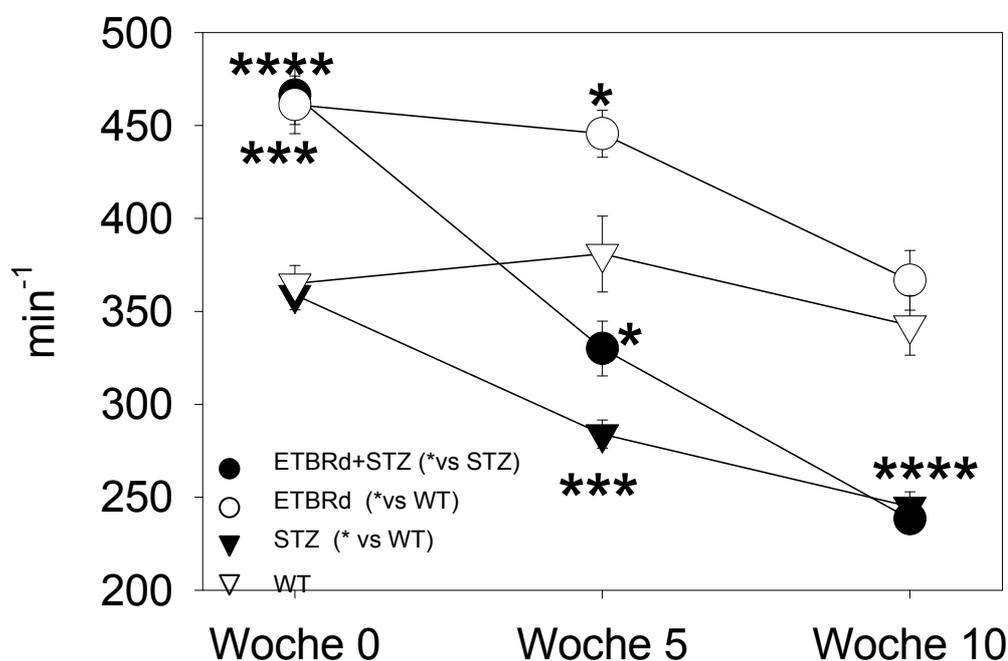


Abbildung 23: Herzfrequenz über den Versuchszeitraum (10 Wochen), männliche Ratten, Gruppengröße  $n=6-9$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

### 3.6 Blutdruckregulierende Systeme

Um zu untersuchen, welches der blutdruckregulierenden Systeme Einfluss auf die Entwicklung des schweren Hypertonus der ETBRd+STZ-Tieren hat, wurden das NO-System, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und das ET-System (ETS) genauer analysiert.

#### 3.6.1 Auswertung RAAS

Zur Analyse des RAAS wurde die Plasmareninaktivität und -konzentration bestimmt und die Aldosteronausscheidung im Urin gemessen. Außerdem wurde die Anzahl der reninpositiven Glomerula bestimmt. Mit Hilfe von Rabbit-Antikörpern gegen Renin und neuronaler NO-Synthase (nNOS) wurde an Paraffin-Schnitten von den Tieren aller vier Gruppen immunreaktives Renin und nNOS nachgewiesen.

In den vorliegenden Ergebnissen gibt es keinen Hinweis darauf, dass das RAAS hochreguliert wird. Die Plasmareninaktivität sowie die Plasmareninkonzentration in den ETBRd+STZ-Tieren sind signifikant reduziert im Vergleich zur ETBRd-Gruppe und zur STZ-Gruppe ( $p < 0,01$ ) (Tabelle 8).

	ETBRd+STZ	ETBRd	STZ	WT
Plasmareninaktivität (ng*ml <sup>-1</sup> *h <sup>-1</sup> )	0.1 ± 0.01**††	0.8 ± 0.2	1.0 ± 1.7	1.0 ± 0.4
Plasmareninkonzentration (ng*ml <sup>-1</sup> *h <sup>-1</sup> )	0.5 ± 0.1**††	3.4 ± 0.9	9.1 ± 16.9	4.2 ± 1.7

Tabelle 8: Plasmareninaktivität und -konzentration, männliche Ratten, Gruppengröße n=6-9, \*\*p<0.01 versus nicht-diabetischen Gruppe des gleichen Genotyps. ††p<0.01 versus STZ, Mittelwerte ± Standardfehler

Aldosteron hat als Hormon einen direkten Einfluss auf die Blutdruckentwicklung. Es bewirkt über die gesteigerte Biosynthese der Natrium/Kalium-ATPase, der Natrium- und Kaliumkanalproteine und des Natrium/Wasserstoff-Austauschers eine verstärkte Rückresorption von Natriumionen im distalen Tubulus und Sammelrohr. Dadurch erhöht sich auch die Rückresorption von Wasser und somit das Volumen im Blutgefäßsystem. Die Ausscheidung des Hormons gibt Rückschlüsse auf die aktivierte vorhandene Menge. Im vorliegenden Versuch zeigt die ETBRd+STZ-Gruppe eine gesteigerte

Aldosteronausscheidung im Vergleich zur STZ-Gruppe ( $p < 0,05$ ) und der nicht-diabetischen Gruppe des gleichen Genotyps ( $p < 0,01$ ) (Tabelle 9). Die ETBRd-Gruppe hat eine signifikant niedrigere Aldosteronausscheidung im Vergleich zur WT-Gruppe und die STZ-Gruppe zeigt eine signifikante Steigerung der Aldosteronausscheidung im Vergleich zur WT-Gruppe.

	ETBRd+STZ	ETBRd	STZ	WT
Aldosteronausscheidung (pmol/d)	$19 \pm 7^{**\dagger}$	$8 \pm 5^{\ddagger}$	$52 \pm 52^{**}$	$13 \pm 3$

Tabelle 9: Aldosteronausscheidung, Gruppengröße  $n=6-9$ , männliche Ratten,  $**p < 0,01$  versus nicht-diabetischen Gruppe des gleichen Genotyps.  $^{\dagger}p < 0,05$  versus STZ,  $^{\ddagger}p < 0,05$  versus WT, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

### 3.6.1.1 Messung der Renin positiven Glomerula

Zur Erfassung der Reninsynthese in den Glomerula wurden die histologischen Schnitte, wie in 3.2.4 beschrieben, immunhistochemisch gefärbt. Anschließend fand eine visuelle Auswertung statt. In der Untersuchung der Renin-positiven Glomerula fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 4 Gruppen. Obwohl durch die Mittelwerte eine Tendenz erkennbar ist, bleibt sie im Mann-Whithney-U-Test, aufgrund des hohen Standardfehlers, nicht signifikant (Abbildung 24).

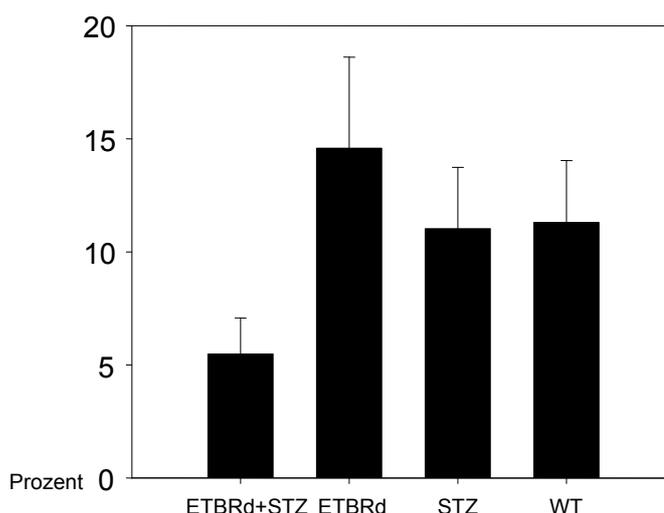


Abbildung 24: prozentuale Verteilung reninpositiver Glomerula über alle vier Gruppen, Gruppengröße  $n=6-9$ , männliche Ratten, keine Signifikanz mit Mann-Whithney-U-Test, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

### 3.6.1.2 nNOS positive Glomerula

Da *in vitro* Studien daraufhinweisen, dass nNOS als positiver Modulator im juxtaglomerulären Apparat auf die Reninsekretion agiert (He, Greenberg et al. 1995), wurde nNOS als weiterer Marker für die Stimulation des RASS bestimmt. Die immunhistochemische Analyse von nNOS wurde ebenfalls, wie in 3.2.4 beschrieben, durchgeführt.

Die immunhistochemisch markierte nNOS zeigt in der vorliegenden Auswertung eine signifikante Senkung in beiden diabetischen Gruppen und der ETBRd-Gruppe im Vergleich zum Wildtyp. Die dargestellte Abbildung (Abb. 25) zeigt die nNOS-positiven Zellen pro 100 Glomerula.

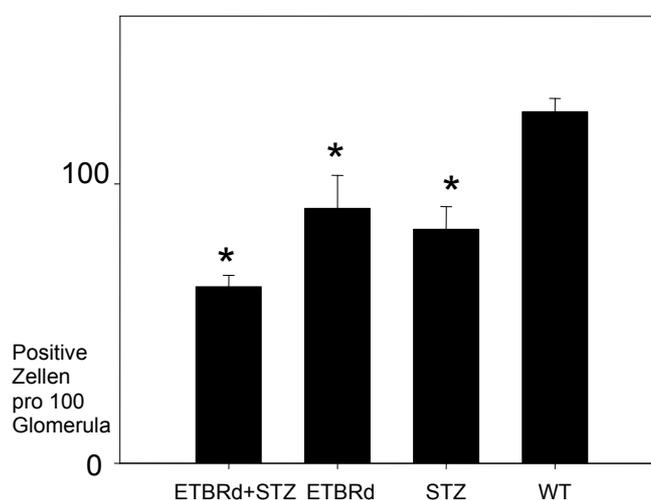


Abbildung 25: nNOS positive Glomerula aller vier Gruppen im Versuchsverlauf, Gruppengröße n=6-9, männliche Ratten, \*p<0,05 versus WT an (im Mann-Whithney-U-Test), Mittelwerte ± Standardfehler

### 3.6.2 Auswertungen zum NO-System

Da bekannt ist, dass ET-1 über den ETBR das NO-System aktiviert, wurden deren Metabolite (Nitrat und Nitrit) sowie der second messenger cGMP, als Marker für die Produktion von NO, im Urin analysiert. Immunhistochemisch wurde die Aktivierung der neuronalen NO-Synthetase (nNOS) in den Glomerula (siehe 3.6.1.2) untersucht. Die Ernährung mit stickstoffhaltigen Produkten war in allen 4 Gruppen gleich. Bei den Messungen der angegebenen Werte zeigten die ETBRd+STZ-Tiere kein erhöhtes Nitrit/Nitrat im Urin (Abbildung 26), jedoch ein signifikant erhöhtes cGMP (Abbildung 27).

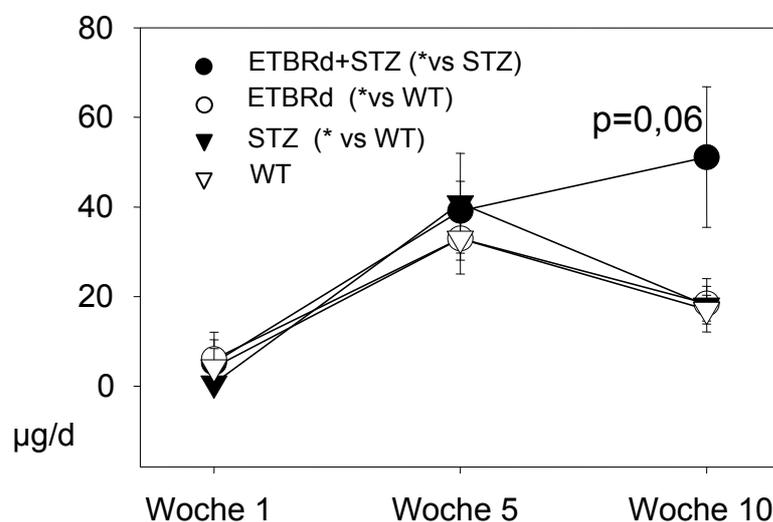


Abbildung 26: Urin-Nitrat über den Versuchszeitraum, Gruppengröße n=6-9, männliche Ratten, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

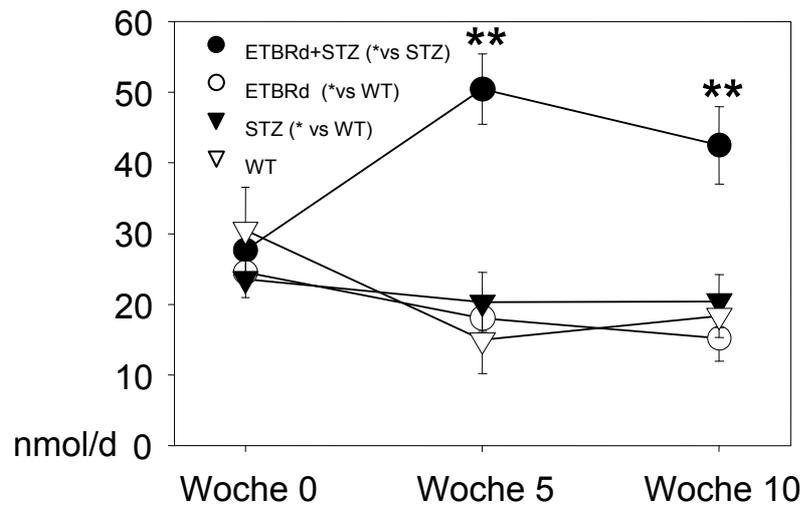


Abbildung 27: cGMP im Urin über den Versuchszeitraum dargestellt, Gruppengröße n=6-9, männliche Ratten, \*p<0,05, \*\* p<0,01, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

### 3.6.3 Auswertungen zum ET-System

Als Parameter für die ET-1 Synthese wurde ET-1 im Plasma gemessen. Um das Ausmaß der physiologischen Veränderungen am deutlichsten zu zeigen, wurden hier die ET-1 Spiegel der 10. Versuchswoche dargestellt. Das ET-1 im Plasma ist in der ETBRd-STZ-Gruppe am stärksten erhöht.

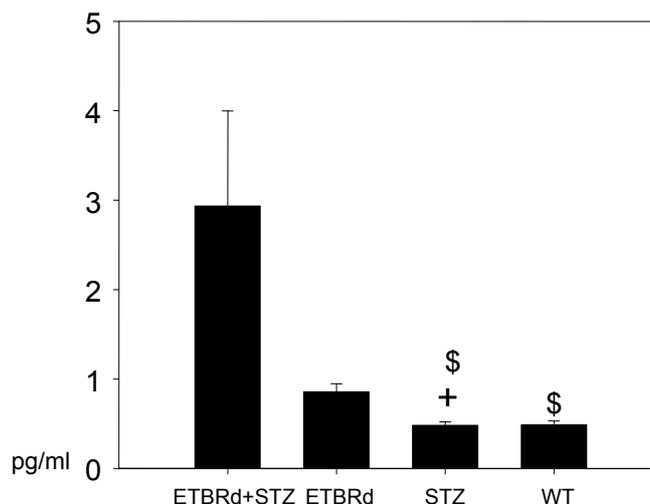


Abbildung 28: ET-1 Konzentration im Plasma in der 10. Versuchswoche. Die gemessenen Konzentrationen des ET-1 im Plasma zeigt einen sehr starken Anstieg des ET-1 in der ETBRd+STZ-Gruppe, Gruppengröße n=6-9, männliche Ratten. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. (+p<0,05 versus ETBRd+STZ, \$p<0,05 versus ETBRd)

Als weiterer Parameter für die renale ET-1 Synthese wurde die Ausscheidung von ET-1 im Urin gemessen. In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 10) ist ein signifikanter Unterschied zwischen den diabetischen und nicht- diabetischen Gruppen erst in der 10. Versuchswoche signifikant nachweisbar. In der 10. Woche des Versuchs besteht ein signifikanter Unterschied zwischen diabetischen Tieren und nicht-diabetischen Tieren (p<0,01).

	ETBRd+STZ	ETBRd	STZ	WT
ET-1 Ausscheidung 5. Woche (pg/d)	116 $\pm$ 86	75 $\pm$ 69	204 $\pm$ 309	47 $\pm$ 49
ET-1 Ausscheidung 10. Woche (pg/d)	723 $\pm$ 891**	55 $\pm$ 35	1108 $\pm$ 945**	36 $\pm$ 12

Tabelle 10: ET-1 Ausscheidung im Urin, \*p<0.05/\*\*p<0.01 versus nicht-diabetischen Gruppe des gleichen Genotyps. Gruppengröße n=6-9, männliche Ratten, Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

## **4 Diskussion**

Die vorliegende Arbeit beschreibt anhand eines funktionellen ETBR-Defizienz-Modells die Auswirkungen eines experimentell induzierten Diabetes mellitus auf den Blutdruck und die pathophysiologischen sowie morphologischen Veränderungen in der Niere.

Für ETBR-Antagonisten konnte gezeigt werden, dass sie zu einer Reduzierung der Proteinurie und der renalen Matrixproteine in Ratten mit STZ-induziertem Diabetes führen (Ong, Newby et al. 2003). Dies gab Anlass zu der Hypothese, dass eine Reduzierung der ETBR-Aktivität einen günstigen Einfluss auf die Progression der diabetischen Nephropathie haben könnte.

Für den vorliegenden Versuch wurde ein Rattenmodell verwendet, das bereits von Garipey et al. 1998 beschrieben wurde. Dabei handelt es sich um transgene Ratten mit einem Mangel an ETBR. Dieses Rattenmodell wurde mit einem Modell für Diabetes mellitus, der durch Gabe von STZ erzeugt wurde, kombiniert. So entstanden eine ETBR-defiziente Ratten mit Diabetes mellitus. Außerdem wurde eine Gruppe ETBR-defizienter Tiere ohne Diabetes mellitus und eine Wildtyp-Vergleichsgruppe mit Diabetes mellitus und ohne Diabetes mellitus gebildet. Insgesamt wurden vier Gruppen gebildet und miteinander verglichen.

### **4.1 Körper- und Organgewichte**

Der Vergleich der Körper- und Organgewichte altersgleicher diabetischer Tiere mit den nicht- diabetischen Tieren zeigt einen signifikanten und zu erwartenden Gewichtsverlust bei den diabetischen Tieren. Die niedrigen Körper- und Organgewichte bei den diabetischen Tieren sind durch katabole Stoffwechselprozesse zu erklären. Da Glucose nicht mehr in die Zelle aufgenommen werden kann, kommt es verstärkt zur Lipolyse und damit zum Gewichtsverlust.

## 4.2 Progression der Diabetischen Nephropathie

Das STZ-Modell in dem durchgeführten Versuch zeigt ein frühes Stadium einer Diabetischen Nephropathie. Die mit STZ behandelten Tiere entwickeln eine Glukosurie und zeigen erhöhte Glukosewerte im Blut. Das bedeutet, dass ein diabetesähnliches Bild ausgelöst werden kann. Im Verlauf des Versuchs unterscheiden sich jedoch die beiden Diabetes-Gruppen. Die Gruppe ohne ETBR-Mangel zeigt nicht sofort eine signifikante Albuminurie, welche charakteristisch für die Erkennung der Diabetischen Nephropathie ist und ebenso nur einen moderaten Anstieg des Serumkreatinins. Allerdings zeigt sich gleich zu Versuchsbeginn ein signifikanter Anstieg des Serumharnstoffs.

In der histologischen Untersuchung kann für alle diabetischen Tiere eine stärkere Glomerulosklerose, perivaskuläre Fibrose und erhöhte Media-Lumen-Ratio im Vergleich zu den Wildtyptieren ohne Diabetes mellitus nachgewiesen werden.

Des Weiteren zeigt die gleichzeitige Anwesenheit von ETBRd und STZ-induziertem Diabetes mellitus eine Zunahme der Beeinträchtigung der Nierenfunktion, eine signifikant erhöhte Albuminurie, Glukosurie sowie erhöhte Serumkreatinin- und Serumharnstoffwerte.

Auch histologisch unterschieden sich die ETBRd-Tiere mit Diabetes mellitus signifikant von den Tieren mit alleinigem Diabetes. Die Glomerulosklerose und die perivaskuläre Fibrose waren ausgeprägter und die Media-Lumen-Ratio in dieser Gruppe signifikant erhöht zur diabetischen Vergleichsgruppe.

Diese Ergebnisse sprechen für eine schwerwiegendere Schädigung der Nieren bei gleichzeitiger Anwesenheit von ETBR-Mangel und Diabetes mellitus. Die Eingangshypothese dieser Arbeit, dass eine reduzierte ETBR – Aktivität einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der Diabetischen Nephropathie haben kann, ist damit widerlegt.

Zwei mögliche Erklärungsversuche sind denkbar. Zum einen könnte der schwere Hypertonus zusätzlich zum Diabetes mellitus zu einer schweren Nierenschädigung führen. Zum anderen könnten die erhöhte renale ET-1-Aktivität und die eingeschränkte

Eliminierung durch die ETBR-Defizienz zu einer Verstärkung der diabetischen Nephropathie beitragen.

Dass ET-1 Podozyten schädigt und damit die Proteinurie fördert, konnten bereits Morigi et.al (Morigi, Buelli et al. 2005) zeigen.

### **4.3 Hämodynamik**

Bei der Analyse des Versuchs fiel ein schwerer Hypertonus in der Gruppe der ETBRd+STZ-Tiere auf. Dieser war nicht nur signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyptieren sondern auch zur genotypisch gleichen Gruppe ohne Diabetes mellitus.

Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass beim Menschen, sowohl ETAR- als auch ETAR/ETBR-Antagonisten den Blutdruck nachgewiesenermaßen senken und mittlerweile in dieser Eigenschaft in klinischen Studien auch am Menschen eingesetzt werden ist dieser Befund überraschend (Krum, Viskoper et al. 1998).

Die Erhöhung des Blutdrucks und die Reduktion der Nierenfunktion in der ETBRd-STZ-Gruppe sind eine parallele Entwicklung. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Blutdruckanstieg ein Sekundäreffekt der Nierenschädigung ist, stellen sich die Unterschiede der Nierenfunktionseinschränkungen zwischen den beiden diabetischen Gruppen nicht so gravierend dar und scheinen somit nicht ursächlich für den schweren Hypertonus in der ETBRd-STZ-Gruppe zu sein. Zumal die Kontrollgruppe der diabetischen Tiere während des Versuchs keine starke Hypertonie entwickelte.

Der bereits erhöhte Ausgangsblutdruck bei Versuchsbeginn in den ETBRd-Gruppen lässt auf eine Vorschädigung durch die ETBR-Defizienz schließen.

Eine weitere Frage stellt sich bzgl. der Bradykardie in der Gruppe der diabetischen Tiere. Die Bradykardie der diabetischen Tiere ist typisch für das STZ-Modell und bereits mehrfach beschrieben, allerdings noch nicht besonders gut verstanden (Hicks, Seifen et al. 1998). In einer Studie von Ramanadham konnte gezeigt werden, dass der STZ-induzierte Diabetes mellitus mit einer Verringerung der Herzfrequenz assoziiert ist (Ramanadham and Tenner 1986). Allerdings konnte diese Studie auch ein normales Ansprechen der Herzmuskelzellen auf Katecholamine zeigen. Das wiederum schließt einen Hypertonus der diabetischen Tiere durch die Einwirkung von Katecholaminen in der vorliegenden Studie aus, da es in diesem Fall zu einem Anstieg der Herzfrequenz gekommen wäre, was die vorliegenden Ergebnisse nicht zeigen.

Auch andere STZ-Versuchsmodelle zeigen einen Hypertonus, wie beispielsweise bei spontan-hypertensiven Ratten (Cooper, Allen et al. 1988) und transgenen (mRen-2)<sup>27</sup> Ratten (Kelly, Wilkinson-Berka et al. 1998). Im Unterschied zu solchen Modellen vollzieht sich der Anstieg des Blutdrucks in der vorliegenden Studie nicht nur unmittelbar nach der Induzierung des Diabetes mellitus in den ETBRd-Tieren, sondern auch im weiteren Verlauf des Versuchs, möglicherweise durch die verstärkte Nierenschädigung während des Versuchs.

Die entscheidende Erkenntnis aus dem Modell zeigt eine zusätzliche Blutdrucksteigerung durch den Diabetes mellitus.

Wie bereits in der Einleitung erläutert, gibt es Wechselwirkungen zwischen dem Endothelinsystem, dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und dem NO-System.

#### **4.3.1 Das RAAS**

Da in der aktuellen Literatur über die Rolle des Renins bei Diabetes mellitus kontrovers diskutiert wird, wurden in dieser Studie unabhängige Methoden genutzt, um die möglichen Einflüsse auf die Blutdruckregulation zu evaluieren.

Hier konnte gezeigt werden, dass es keine signifikanten Veränderungen in der Plasmareninaktivität (PRA) und der Plasmareninkonzentration (PRK) sowie der reninpositiven Glomerula in der STZ-Gruppe nach der 10. Versuchswoche gab.

Studien über eine erhöhte PRA (Hollenberg, Stevanovic et al. 2004) stehen im Gegensatz zu Studien, in denen eine Reduzierung der PRA bei Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus beschrieben wurde (Bojestig, Nystrom et al. 2000). Eine Studie mit STZ-behandelten Ratten konnte eine Reduzierung der PRA nach 4 Wochen zeigen (Ustundag, Cay et al. 1999).

Eine etwas ältere Publikation beschreibt eine biphasische Reaktion mit einem Anstieg der PRA in der ersten Woche und einem darauffolgendem Abfall der PRA bis zur achten Woche (Kikkawa, Kitamura et al. 1986).

Ein unmittelbarer Einfluss von Renin auf die Blutdruckentwicklung kann in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden, da die Reninaktivität und -konzentration in der ETBRd-STZ-Gruppe im Vergleich zu den Wildtyptieren und den ETBRd-Tieren

signifikant vermindert ist. Daher ist eher von einer Down-Regulierung des RAAS auszugehen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es ausschließlich in der ETBRd-STZ-Gruppe zu einer hochsignifikanten Reduzierung der PRA kommt. Die Down-Regulierung beruht möglicherweise auf einem negativen Feedback-Mechanismus als Reaktion auf den schweren Hypertonus.

Die Resultate dieser Studie können eine durch Diabetes induzierte Aktivierung des lokalen RAAS in der Niere nicht vollständig ausschließen, denn die Aldosteronkonzentration im Urin ist in beiden diabetischen Gruppen erhöht, wobei die Aldosteronkonzentration in den ETBRd-Ratten viel niedriger ist als beim diabetischen Wildtyp. Die Aldosteronfreisetzung kann somit nicht Erklärung für den starken Blutdruckanstieg in den ETBR-STZ-Tieren sein.

Es konnte in der Arbeit von Mazzochi et al. (Mazzocchi, Rebuffat et al. 1996) gezeigt werden, dass ET-1 in Ratten einen sekretorischen Effekt auf die adrenale Aldosteronfreisetzung hat, dies scheint primär ETBR-vermittelt zu sein. Somit ist möglicherweise die reduzierte Aldosteronfreisetzung in den ETBRd- Gruppen auf den Mangel an ETBR in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde (NNR) zurückzuführen. Es kann angenommen werden, dass die Hyponatriämie im Blut und die Hyperkaliämie im Urin genotyp-unabhängig den diabetes-induzierten Elektrolytstörungen und der Azidose zuzuschreiben sind (Hebden, Gardiner et al. 1986).

Immunhistochemisch wurde in dieser Arbeit auch die nNOS untersucht, die als positiver Modulator für die Reninsekretion im juxtaglomerulären Apparat beschrieben wurde (He, Greenberg et al. 1995). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den 4 Gruppen, was die oben genannten Ergebnisse zur Reninaktivierung stützt.

### 4.3.2 Das NO-System

Ein weiteres wichtiges Blutdruckregulationssystem ist das NO-cGMP-System. Diverse Studien geben Hinweise darauf, dass Stickstoffmonoxid als physiologischer Gegenspieler von Endothelin-1 zu sehen ist. Sie sind Komponenten eines lokalen negativ rückgekoppelten Regelkreises. Dies ist deshalb besonders interessant, da ET-1 über ETBR die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) aktiviert (Liu, Premont et al. 2003). Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass das NO-System bei den ETBRd-STZ-Tieren nicht downreguliert ist. In der Gruppe der ETBRd-STZ-Ratten sind die NO-Endprodukte (Nitrat/Nitrit) und der second-messenger cGMP sogar deutlich erhöht. Dies gibt Anlass zu der Annahme, dass das hier vorgestellte Modell (ETBRd-STZ) zu einer Aktivierung des NO-Systems führt ohne Einbeziehung des ETBR. Da aber die Endprodukte des NO-Systems und der second-messenger cGMP nur eine begrenzte Sicht auf die Aktivierung von NO zulassen, kann keine abschließende Aussage getroffen werden.

Warum aber kommt es zu einer stärkeren Nierenschädigung bei den ETBRd+STZ-Tieren?

Zwei mögliche Erklärungen wären denkbar. Einerseits beschleunigt die schwere Hypertonie auf dem Höhepunkt der Hyperglykämie die Zunahme der Nierenschädigung. Andererseits nimmt die renale ET-1- Aktivität (Anstieg von ET-1 im Urin) aufgrund des reduzierten Abbaus durch den Mangel an ETBR zu. Es ist bekannt, das renales ET-1 an der Schädigung der Podozyten und der Entwicklung einer Proteinurie (Morigi, Buelli et al. 2005) beteiligt ist.

### 4.3.3 ET-System

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, ist in den ETBRd-STZ-Ratten das Plasma-ET-1 stark erhöht. ET-1 ist bekannt als einer der potentesten Vasokonstriktoren (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988) und löst möglicherweise die schwere Hypertonie über den verbleibenden ETAR aus.

So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine exogene Zufuhr von Plasma-ET-1 einen signifikanten Anstieg der systemischen Vasokonstriktion und damit eine Erhöhung des Blutdrucks zur Folge hat (Mortensen, Pawloski et al. 1990; Lerman, Sandok et al. 1992; Wilkins, Alberola et al. 1993). Allerdings ist die exogene Zufuhr nicht gleichzusetzen mit der endogenen Produktion von ET-1. Da ET-1 zu 80% basolateral sezerniert wird und nur 20% ins Lumen, ist somit nur ein geringer Teil des wirksamen ET-1 im Blut nachweisbar.

In der vorliegenden Studie ist das ET-1 in der ETBRd-STZ-Gruppe sechsfach erhöht, was die Wirkung auf den Blutdruck noch steigert. Möglicherweise sind noch weitere Mechanismen an dem Anstieg der ET-1 Konzentration in den ETBRd-STZ-Ratten beteiligt, wie beispielsweise der fehlende ETBR oder der Einfluss von Diabetes mellitus auf die ET-1 Produktion, auf die ich im folgendem eingehen werde.

Der ETBR ist Rezeptor des Endothelins und eliminiert das zirkulierende ET-1 (Fukuroda, Fujikawa et al. 1994; Bohm, Pernow et al. 2003). Die vorliegende Studie bestätigt erhöhte ET-1 Spiegel im Plasma in der ETBRd-Gruppe (+76% versus Wildtyp am Studienende), wie schon bei Gariepy et al. 2000 beschrieben. Das gleichzeitige Vorhandensein von ETBRd und Diabetes verursachte einen noch stärkeren Anstieg (+503% versus Wildtyp am Studienende). Dies konnte in den ausschließlich diabetischen Tieren mit intaktem ETBR nicht gezeigt werden.

Für den Abbau von ET-1 aus dem Plasma sind bisher folgende Mechanismen bekannt: ET-1 wird hauptsächlich über den ETBR in der Lunge abgebaut. Aber auch in Leber und Niere findet die ET-1 Elimination statt (Simonson and Dunn 1993; Johnstrom, Fryer et al. 2005). Im Western Blot konnte in der vorliegenden Arbeit eine Steigerung des ETBR im Nierengewebe der diabetischen Tiere beobachtet werden. Dies ist möglicherweise eine Gegenregulation, um die durch den Diabetes erhöhte Produktion von ET-1 besser abbauen zu können (Minchenko, Stevens et al. 2003). Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie von Berti-Mattera eine Reduzierung der ETBR im Nervengewebe

unter dem chronischen Einfluss eines Diabetes mellitus (Berti-Mattera, Garipey et al. 2006).

Der Anstieg des Plasma-ET-1 in den ETBRd-STZ-Tieren könnte daher ein synergistischer Effekt aus zwei Faktoren sein. Zum einen wird das ET-System durch den Diabetes mellitus aktiviert und zum anderen kann das erhöhte ET-1 durch die Beeinträchtigung des ETBR nicht eliminiert werden.

Vorangegangene Studien wiesen bereits nach, dass das renale ET-System in diabetischen Tieren aktiviert ist (Hochoer, Lun et al. 1998; Minchenko, Stevens et al. 2003). ET-1 kann im Urin als ein Abbauprodukt der renalen ET-1 Synthese gemessen werden. In dieser Studie zeigt sich eine nahezu gleiche Erhöhung der ET-1 Ausscheidung in beiden diabetischen Gruppen. Dies lässt darauf schließen, dass das erhöhte Plasma-ET-1 in den ETBRd-Ratten nicht durch eine renale ET-Synthese verursacht wird.

Als spekulative Hypothese kommt für den erhöhten ET-1 Plasmaspiegel möglicherweise das aktivierte vaskuläre ET-System in Betracht, denn das Endothel der Gefäße ist die Struktur, die am ehesten die in der Lage ist, große Mengen von ET-1 freizusetzen. Eine generalisierte endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus, die zu einer Freisetzung von ET-1 führt, wurde bereits von Jandeleit-Dahm et al. (Jandeleit-Dahm, Allen et al. 2000) diskutiert. Eine Freisetzung von ET-1 aufgrund einer koronaren endothelialen Dysfunktion wurde auch von Lerman et al. beschrieben (Lerman, Holmes et al. 1995).

Der ETBR scheint im Gefäßsystem eine wichtige Rolle zu spielen, insbesondere die Hochregulierung des ETBR in den Gefäßen diabetischer Ratten, wie Francis et al. 2004 beschrieben (Francis, Abassi et al. 2004).

Neben dem ETAR und ETBR wurde die alpha-Untereinheit des eNaC im Western Blot analysiert. Diese kann über Aldosteron induziert oder über ET-1 via ETBR gehemmt werden. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied in den Gruppen. Zu vermuten wäre jedoch eine Erhöhung des eNaC in den ETBRd-Tieren, da Studien (Garipey, Ohuchi et al. 2000; Hochoer and Paul 2000) zeigen konnten, dass die Ratten mit einem ETBR Mangel bei salzreicher Diät hyperten sind, weil Ihnen wahrscheinlich die normale tonische Inhibition des epithelialen Natriumkanals (eNaC) fehlt.

Auch hier kann nicht unbedingt von einer quantitativen Messung des eNaC auf dessen Aktivierung geschlossen werden. Allerdings lassen die Natriumwerte im Urin, aufgrund ihrer großen gruppeninternen Varianz ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, nicht erkennen, dass es zu einer vermehrten Natriumauscheidung bei den ETBRd-Tieren kommt. Eine sichere Aussage hinsichtlich der Aktivität ist jedoch versuchsbedingt nicht möglich.

#### **4.4 Studiendesignbedingte Grenzen und Ausblick**

Da der Anstieg des Blutdrucks, des ET-1, der Kreatininwerte und der Albuminurie in der ETBRd-STZ-Gruppe parallel verläuft, erschwert dies die Beantwortung der initialen Hypothese welche Entwicklung den Anstoß gegeben hat. Der schwere Hypertonus und die Nierenschädigung gefolgt von der ET-1 Erhöhung oder die ET-1 Aktivierung als Folge einer verminderten Clearance-Rate mit anschließender Blutdruckerhöhung und Nierenschädigung.

Möglicherweise könnten engere Untersuchungsintervalle während der Durchführung der Studie einen besseren zeitlichen Verlauf aufzeigen um somit zu zeigen, ob die Nierenschädigung durch einen Blutdruckanstieg verursacht wurde oder umgekehrt.

Um dies zu klären, sind weitere Studien nötig.

An zwei unterschiedliche Ansätze ist dabei zu denken. Zum einen an ein Studiendesign, das sich mit nicht-ET-modulierenden Vasodilatoren in der Hypertonustherapie beschäftigt, um festzustellen, ob es zu einer geringeren Schädigung der Niere kommt.

Zum anderen ein Modell, bei dem die Antagonisierung von ETAR den Effekt des ET-1 via ETAR genauer untersucht. Denn bisher ist bekannt, dass die ektopische ET-1 Überexpression (wie eine ET-1 Infusion) zu einem deutlichen Anstieg des arteriellen Blutdrucks führt, welcher durch ETAR-Antagonisten auf normale Werte senkbar ist (Niranjan, Telemaque et al. 1996).

#### 4.5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ETBRd-STZ Ratten bei normaler Salzdiät eine schwere reninunabhängige Hypertonie entwickeln. Die ETBRd-STZ-Ratten zeigen eine Albuminurie und eine leicht reduzierte Kreatinin-Clearance. Damit zeigen sie morphologisch und physiologisch eine signifikant stärkere Schädigung der Niere im Vergleich zum gleichen Genotyp ohne Diabetes bzw. zu den diabetischen Wildtyptieren. Der stark erhöhte Blutdruck in der Gruppe der ETBRd+STZ-Tiere scheint nicht auf einer Aktivierung des RAAS oder auf einer Suppression des NO-Systems zu beruhen, wie immunhistochemisch und laborchemisch nachgewiesen werden konnte. Der erhöhte ET-1 Plasma-Spiegel ist möglicherweise bedingt durch eine reduzierte ETBR-abhängige Elimination des ET-1. ET-1 wiederum löst möglicherweise eine schwere Hypertonie, am ehesten über den ETAR, aus.

Die erhobenen Daten stützen nicht die Eingangshypothese, dass eine reduzierte ETBR-Aktivität einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der diabetischen Nephropathie haben könnte. Vielmehr ist das Gegenteil zu sehen, eine Zunahme der Progredienz der Nephropathie und eine schwere Hypertonie, als Folge der ETBR-Defizienz.

Es sollte in zukünftigen Studien mit ETBR-Antagonisten besonders bei Patienten mit Diabetes mellitus ein engmaschiges Monitoring erfolgen, da es unter der Therapie mit ETBR-Antagonisten möglicherweise zu schweren hypertensiven Krisen kommen könnte.

Insbesondere sollte bei diabetischen Patienten ein engmaschiges Monitoring der Kreislauf- und Nierenparameter durchgeführt werden, um sowohl hypertensive Entgleisungen oder ggf. Nierenschädigungen schnell erkennen und behandeln zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die diabetische Nephropathie (DN) infolge eines Typ 2-Diabetes hat in den Industrienationen in epidemischem Ausmaß zugenommen und ist heute die Hauptursache des terminalen Nierenversagens. Das Endothelinsystem hat einen deutlichen Einfluss auf die Pathogenese der diabetischen Nephropathie. Die Rolle des ETBR Rezeptors (ETBR) ist bis jetzt unklar. Der Effekt einer ETBR-Defizienz auf die Progression der diabetischen Nephropathie in einem Streptozotocin-Modell wurde in vier Gruppen analysiert: (1) Homozygote ETBR-defiziente (ETBRd) diabetische Ratten, (2) ETBRd-Ratten, (3) diabetische Kontrolltiere, (4) gesunde Wildtyp-Kontroll-Tiere. Blutdruck und Nierenfunktionsparameter wurden über 10 Wochen gemessen. Danach fand eine histologische und biochemische Auswertung der Nieren und Gefäße statt. Die Versuche konnten zeigen, dass diabetische ETBRd-Ratten bei normaler Salzdiät einen schweren Hypertonus entwickeln sowie eine Albuminurie und eine geringe Reduktion der Kreatinin-Clearance. Der stark erhöhte Blutdruck scheint keine Folge einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems oder einer Suppression des NO-Systems zu sein. Der schwere Hypertonus begründet sich möglicherweise über das erhöhte ET-1 im Plasma, welches vermehrt auf den ETA-Rezeptor (ETAR) zu wirken scheint und nicht über den reduzierten ETBR. Die Ergebnisse stützen nicht die Hypothese, dass eine reduzierte ETBR-Aktivität die Progression der diabetischen Nephropathie verhindert.

Diese Studie zeigt erstmalig, dass die Kombination von Diabetes mellitus und ETBR-Defizienz eine schwere Hypertonie mit niedrigem Plasma-Reninspiegel und progressiver Nephropathie hervorruft.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahn, K., K. Beningo, et al. (1992). "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 **89**(18): 8606-10.
- Ansher, S. S. and W. B. Jakoby (1986). "Amine N-methyltransferases from rabbit liver." J Biol Chem **261**(9): 3996-4001.
- Arai, H., K. Nakao, et al. (1993). "The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment." J Biol Chem **268**(5): 3463-70.
- Arinami, T., M. Ishikawa, et al. (1991). "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 **48**(5): 990-6.
- Bagnato, A., A. Venuti, et al. (1995). "Identification of the ETA receptor subtype that mediates endothelin induced autocrine proliferation of normal human keratinocytes." Biochem Biophys Res Commun **209**(1): 80-6.
- Bakris, G. L., R. Fairbanks, et al. (1991). "Arginine vasopressin stimulates human mesangial cell production of endothelin." J Clin Invest **87**(4): 1158-64.
- Bartels, H., M. Bohmer, et al. (1972). "[Serum creatinine determination without protein precipitation]." Clin Chim Acta **37**: 193-7.
- Barton, M., S. Shaw, et al. (1997). "Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation." Biochem Biophys Res Commun **238**(3): 861-5.
- Batra, V. K., J. R. McNeill, et al. (1993). "ETB receptors on aortic smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats." Am J Physiol **264**(2 Pt 1): C479-84.
- Battistini, B., P. Chailier, et al. (1993). "Growth regulatory properties of endothelins." Peptides **14**(2): 385-99.
- Bax, W. A. and P. R. Saxena (1994). "The current endothelin receptor classification: time for reconsideration?" Trends Pharmacol Sci **15**(10): 379-86.
- Baylis, C., R. K. Handa, et al. (1990). "Glucocorticoids and control of glomerular filtration rate." Semin Nephrol **10**(4): 320-9.
- Benigni, A., V. Colosio, et al. (1998). "Unselective inhibition of endothelin receptors reduces renal dysfunction in experimental diabetes." Diabetes **47**(3): 450-6.
- Berti-Mattera, L. N., C. E. Garipey, et al. (2006). "Reduced expression of endothelin B receptors and mechanical hyperalgesia in experimental chronic diabetes." Exp Neurol **201**(2): 399-406.
- Bloch, K. D., R. L. Eddy, et al. (1989). "cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3." J Biol Chem **264**(30): 18156-61.
- Bogoyevitch, M. A., P. E. Glennon, et al. (1994). "Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy." J Biol Chem **269**(2): 1110-9.
- Bohlender, J., J. Menard, et al. (1998). "Mouse and rat plasma renin concentration and gene expression in (mRen2)27 transgenic rats." Am J Physiol **274**(5 Pt 2): H1450-6.

- Bohm, F., J. Pernow, et al. (2003). "ETA receptors mediate vasoconstriction, whereas ETB receptors clear endothelin-1 in the splanchnic and renal circulation of healthy men." Clin Sci (Lond) **104**(2): 143-51.
- Bojestig, M., F. H. Nystrom, et al. (2000). "The renin-angiotensin-aldosterone system is suppressed in adults with Type 1 diabetes." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **1**(4): 353-6.
- Bonner-Weir, S., D. F. Trent, et al. (1981). "Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia." Diabetes **30**(1): 64-9.
- Boulanger, C. and T. F. Luscher (1990). "Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." J Clin Invest **85**(2): 587-90.
- Boulanger, C. M. and T. F. Luscher (1991). "Differential effect of cyclic GMP on the release of endothelin-1 from cultured endothelial cells and intact porcine aorta." J Cardiovasc Pharmacol **17 Suppl 7**: S264-6.
- Boulanger, C. M., F. C. Tanner, et al. (1992). "Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium." Circ Res **70**(6): 1191-7.
- Bunting, M. W. and R. E. Widdop (1999). "Differential haemodynamic effects of endothelin receptor antagonist, SB 209670, in conscious hypertensive and normotensive rats." Eur J Pharmacol **381**(1): 13-21.
- Cam, M. C., B. Rodrigues, et al. (1999). "Distinct glucose lowering and beta cell protective effects of vanadium and food restriction in streptozotocin-diabetes." Eur J Endocrinol **141**(5): 546-54.
- Campia, U., C. Cardillo, et al. (2004). "Ethnic differences in the vasoconstrictor activity of endogenous endothelin-1 in hypertensive patients." Circulation **109**(25): 3191-5.
- Cardillo, C., C. M. Kilcoyne, et al. (1999). "Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension." Hypertension **33**(2): 753-8.
- Casey, M. L., R. A. Word, et al. (1991). "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 **266**(9): 5762-8.
- Cattaruzza, M., C. Dimigen, et al. (2000). "Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells." Faseb J **14**(7): 991-8.
- Clozel, M. and G. A. Gray (1995). "Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation?" J Cardiovasc Pharmacol **26 Suppl 3**: S262-4.
- Clozel, M., G. A. Gray, et al. (1992). "The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo." Biochem Biophys Res Commun **186**(2): 867-73.
- Clozel, M., B. M. Loffler, et al. (1993). "Downregulation of endothelin receptors by autocrine production of endothelin-1." Am J Physiol **265**(1 Pt 1): C188-92.
- Cocks, T. M., A. Broughton, et al. (1989). "Endothelin is blood vessel selective: studies on a variety of human and dog vessels in vitro and on regional blood flow in the conscious rabbit." Clin Exp Pharmacol Physiol **16**(4): 243-6.
- Cooper, M. E., T. J. Allen, et al. (1988). "Effects of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat--functional and structural characteristics." J Hypertens **6**(12): 1009-16.
- de Nucci, G., R. Thomas, et al. (1988). "Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9797-800.

- Dhein, S., S. Hochreuther, et al. (2000). "Long-term effects of the endothelin(A) receptor antagonist LU 135252 and the angiotensin-converting enzyme inhibitor trandolapril on diabetic angiopathy and nephropathy in a chronic type I diabetes mellitus rat model." J Pharmacol Exp Ther **293**(2): 351-9.
- Emoto, N. and M. Yanagisawa (1995). "Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum." J Biol Chem **270**(25): 15262-8.
- Ferri, C., C. Bellini, et al. (1997). "Elevated plasma and urinary endothelin-I levels in human salt-sensitive hypertension." Clin Sci (Lond) **93**(1): 35-41.
- Flowers, M. A. and P. A. Marsden (1994). "Expression of endothelin-1 and nitric oxide is coupled to endothelial phenotype, especially growth state." Exp Nephrol **2**(2): 115-26.
- Francis, B. N., Z. Abassi, et al. (2004). "Differential regulation of ET(A) and ET(B) in the renal tissue of rats with compensated and decompensated heart failure." J Cardiovasc Pharmacol **44 Suppl 1**: S362-5.
- Fukui, M., T. Nakamura, et al. (1993). "Gene expression for endothelins and their receptors in Glomerula of diabetic rats." J Lab Clin Med **122**(2): 149-56.
- Fukuroda, T., T. Fujikawa, et al. (1994). "Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats." Biochem Biophys Res Commun **199**(3): 1461-5.
- Gallego, M. S. and B. N. Ling (1996). "Regulation of amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels by endothelin-1 in distal nephron cells." Am J Physiol **271**(2 Pt 2): F451-60.
- Gandy, S. E., M. G. Buse, et al. (1982). "Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs." J Clin Invest **70**(3): 650-8.
- Gariepy, C. E., T. Ohuchi, et al. (2000). "Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats." J Clin Invest **105**(7): 925-33.
- Gariepy, C. E., S. C. Williams, et al. (1998). "Transgenic expression of the endothelin-B receptor prevents congenital intestinal aganglionosis in a rat model of Hirschsprung disease." J Clin Invest **102**(6): 1092-101.
- Green, L. C., D. A. Wagner, et al. (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." Anal Biochem **126**(1): 131-8.
- Gross, M. L., E. Ritz, et al. (2003). "Renal damage in the SHR/N-cp type 2 diabetes model: comparison of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and endothelin receptor blocker." Lab Invest **83**(9): 1267-77.
- Haacke, H. (1969). "[Induction of diabetes mellitus of various degree of severity using streptozotocin in rats]." Klin Wochenschr **47**(8): 437-8.
- Hackenthal, E., M. Paul, et al. (1990). "Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiol Rev **70**(4): 1067-116.
- Haendler, B., U. Hechler, et al. (1992). "Molecular cloning of human endothelin (ET) receptors ETA and ETB." J Cardiovasc Pharmacol **20 Suppl 12**: S1-4.
- Hasslacher, C., E. Ritz, et al. (1989). "Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus." Nephrol Dial Transplant **4**(10): 859-63.
- Haynes, W. G., C. J. Ferro, et al. (1996). "Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans." Circulation **93**(10): 1860-70.
- He, X. R., S. G. Greenberg, et al. (1995). "Effect of nitric oxide on renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus." Am J Physiol **268**(5 Pt 2): F953-9.
- Hebden, R. A., S. M. Gardiner, et al. (1986). "The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats." Clin Sci (Lond) **70**(1): 111-7.

- Herr, R. R., J. K. Jahnke, et al. (1967). "The structure of streptozotocin." J Am Chem Soc **89**(18): 4808-9.
- Hicks, K. K., E. Seifen, et al. (1998). "Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control." J Auton Nerv Syst **69**(1): 21-30.
- Hirata, Y. (1993). "[Physiological and pathophysiological role of endothelin-endothelin receptors system in cardiovascular system]." Nippon Rinsho **51**(6): 1540-7.
- Hirata, Y. and T. Emori (1993). "Cellular mechanism of endothelin-induced nitric oxide synthesis by cultured bovine endothelial cells." J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 8**: S225-8.
- Hirata, Y., Y. Fukuda, et al. (1989). "Specific receptor for endothelin in cultured rat cardiocytes." Biochem Biophys Res Commun **160**(3): 1438-44.
- Hocher, B., I. George, et al. (1999). "Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension." Hypertension **33**(3): 816-22.
- Hocher, B., A. Lun, et al. (1998). "Renal endothelin system in diabetes: comparison of angiotensin-converting enzyme inhibition and endothelin-A antagonism." J Cardiovasc Pharmacol **31 Suppl 1**: S492-5.
- Hocher, B. and M. Paul (2000). "Transgenic animal models for the analysis of the renal endothelin system." Nephrol Dial Transplant **15**(7): 935-7.
- Hocher, B., P. Rohmeiss, et al. (1995). "Distribution of endothelin receptor subtypes in the rat kidney. Renal and haemodynamic effects of the mixed (A/B) endothelin receptor antagonist bosentan." Eur J Clin Chem Clin Biochem **33**(8): 463-72.
- Hocher, B., A. Schwarz, et al. (2001). "Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy." Nephron **87**(2): 161-9.
- Hocher, B., C. Thone-Reineke, et al. (1997). "Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension." J Clin Invest **99**(6): 1380-9.
- Hoffman, A., E. Grossman, et al. (1990). "The initial vasodilation and the later vasoconstriction of endothelin-1 are selective to specific vascular beds." Am J Hypertens **3**(10): 789-91.
- Hollenberg, N. K., R. Stevanovic, et al. (2004). "Plasma aldosterone concentration in the patient with diabetes mellitus." Kidney Int **65**(4): 1435-9.
- Horio, T., M. Kohno, et al. (1993). "Stimulation of endothelin-1 release by low density and very low density lipoproteins in cultured human endothelial cells." Atherosclerosis **101**(2): 185-90.
- Hosoda, K., K. Nakao, et al. (1991). "Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA." FEBS Lett **287**(1-2): 23-6.
- Howard, P. G., C. Plumpton, et al. (1992). "Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue." J Hypertens **10**(11): 1379-86.
- Ignarro, L. J. and P. J. Kadowitz (1985). "The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **25**: 171-91.
- Ikeda, T., H. Ohta, et al. (1999). "Pathophysiological roles of endothelin-1 in Dahl salt-sensitive hypertension." Hypertension **34**(3): 514-9.
- Ikejiri, K., H. Endo, et al. (1990). "Structural dissimilarity in insulin-like growth factor II genes of the rat and the human." Biochem Int **21**(5): 967-75.
- Imokawa, G., T. Kobayashi, et al. (1997). "The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis." Pigment Cell Res **10**(4): 218-28.

- Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2863-7.
- Ishida, F., K. Saeki, et al. (1992). "Suppressive effects of the endothelin receptor (ETA) antagonist BQ-123 on ET-1-induced reduction of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes." Biochem Pharmacol **44**(7): 1431-6.
- Jandeleit-Dahm, K., T. J. Allen, et al. (2000). "Is there a role for endothelin antagonists in diabetic renal disease?" Diabetes Obes Metab **2**(1): 15-24.
- Johnstrom, P., T. D. Fryer, et al. (2005). "Positron emission tomography using 18F-labelled endothelin-1 reveals prevention of binding to cardiac receptors owing to tissue-specific clearance by ET B receptors in vivo." Br J Pharmacol **144**(1): 115-22.
- Joyce, A. T., J. M. Iacoviello, et al. (2004). "End-stage renal disease-associated managed care costs among patients with and without diabetes." Diabetes Care **27**(12): 2829-35.
- Junod, A., A. E. Lambert, et al. (1967). "Studies of the diabetogenic action of streptozotocin." Proc Soc Exp Biol Med **126**(1): 201-5.
- Junqueira, L. C., W. Cossermelli, et al. (1978). "Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy." Arch Histol Jpn **41**(3): 267-74.
- Kanse, S. M., K. Takahashi, et al. (1991). "Glucocorticoids induce endothelin release from vascular smooth muscle cells but not endothelial cells." Eur J Pharmacol **199**(1): 99-101.
- Kelly, D. J., J. L. Wilkinson-Berka, et al. (1998). "A new model of diabetic nephropathy with progressive renal impairment in the transgenic (mRen-2)<sup>27</sup> rat (TGR)." Kidney Int **54**(2): 343-52.
- Kikkawa, R., E. Kitamura, et al. (1986). "Biphasic alteration of renin-angiotensin-aldosterone system in streptozotocin-diabetic rats." Ren Physiol **9**(3): 187-92.
- King, A. J., B. M. Brenner, et al. (1989). "Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide." Am J Physiol **256**(6 Pt 2): F1051-8.
- Kitamura, K., T. Tanaka, et al. (1989). "Immunoreactive endothelin in rat kidney inner medulla: marked decrease in spontaneously hypertensive rats." Biochem Biophys Res Commun **162**(1): 38-44.
- Klahr, S. and J. Morrissey (2003). "Progression of chronic renal disease." Am J Kidney Dis **41**(3 Suppl 1): S3-7.
- Kloog, Y. and M. Sokolovsky (1989). "Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins." Trends Pharmacol Sci **10**(6): 212-4.
- Kloppel, G. and A. Clemens (1997). "Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Islet Changes in Relation to Etiology and Pathogenesis." Endocr Pathol **8**(4): 273-282.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1992). "Nitric oxide as a signal in blood vessels." Trends Biochem Sci **17**(10): 399-402.
- Kohan, D. E. and E. Padilla (1992). "Endothelin-1 is an autocrine factor in rat inner medullary collecting ducts." Am J Physiol **263**(4 Pt 2): F607-12.
- Kohno, M., K. Murakawa, et al. (1991). "Plasma immunoreactive endothelin-1 in experimental malignant hypertension." Hypertension **18**(1): 93-100.
- Kohzuki, M., C. I. Johnston, et al. (1989). "Localization of endothelin receptors in rat kidney." Eur J Pharmacol **160**(1): 193-4.

- Kourembanas, S., P. A. Marsden, et al. (1991). "Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium." J Clin Invest **88**(3): 1054-7.
- Krum, H., R. J. Viskoper, et al. (1998). "The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators." N Engl J Med **338**(12): 784-90.
- Kukovetz, W. R. and S. Holzmann (1985). "Mechanisms of nitrate-induced vasodilatation and tolerance on a biochemical base." Z Kardiol **74 Suppl 1**: 39-44.
- Kumar, C., V. Mwangi, et al. (1994). "Cloning and characterization of a novel endothelin receptor from *Xenopus* heart." J Biol Chem **269**(18): 13414-20.
- Kurihara, Y., H. Kurihara, et al. (1994). "Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1." Nature **368**(6473): 703-10.
- Landan, G., A. Bdolah, et al. (1991). "The evolutionary history of the sarafotoxin/endothelin/endothelin-like superfamily." J Cardiovasc Pharmacol **17 Suppl 7**: S517-9.
- Langenstroer, P., R. Tang, et al. (1993). "Endothelin-1 in the human prostate: tissue levels, source of production and isometric tension studies." J Urol **150**(2 Pt 1): 495-9.
- Lariviere, R., L. Y. Deng, et al. (1995). "Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat." J Mol Cell Cardiol **27**(10): 2123-31.
- Lee, M. E., S. M. de la Monte, et al. (1990). "Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system." J Clin Invest **86**(1): 141-7.
- Lerman, A., D. R. Holmes, Jr., et al. (1995). "Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans." Circulation **92**(9): 2426-31.
- Lerman, A., E. K. Sandok, et al. (1992). "Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction." Circulation **85**(5): 1894-8.
- Levesque, H., N. Moore, et al. (1994). "Endothelins. A potential target for pharmacological intervention in diseases of the elderly." Drugs Aging **4**(3): 221-37.
- Li, J. S., L. Knafo, et al. (1996). "Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats." Am J Physiol **271**(1 Pt 2): H88-93.
- Liu, S., R. T. Premont, et al. (2003). "Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt." J Biol Chem **278**(50): 49929-35.
- Lowenstein, C. J., J. L. Dinerman, et al. (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger." Ann Intern Med **120**(3): 227-37.
- Luscher, T. F. and M. Barton (2000). "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs." Circulation **102**(19): 2434-40.
- Madeddu, P., X. P. Yang, et al. (1990). "Efficacy of nifedipine to prevent systemic and renal vasoconstrictor effects of endothelin." Am J Physiol **259**(2 Pt 2): F304-11.
- Maguire, J. J. and A. P. Davenport (2002). "Is urotensin-II the new endothelin?" Br J Pharmacol **137**(5): 579-88.
- Marsden, P. A., D. M. Dorfman, et al. (1991). "Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells." Am J Physiol **261**(1 Pt 2): F117-25.

- Marsen, T. A., H. Schramek, et al. (1994). "Renal actions of endothelin: linking cellular signaling pathways to kidney disease." *Kidney Int* **45**(2): 336-44.
- Martin, E. R., B. M. Brenner, et al. (1990). "Heterogeneity of cell surface endothelin receptors." *J Biol Chem* **265**(23): 14044-9.
- Masaki, T., M. Yanagisawa, et al. (1992). "Physiology and pharmacology of endothelins." *Med Res Rev* **12**(4): 391-421.
- Maser-Gluth, C., M. Reincke, et al. (2000). "Metabolism of glucocorticoids and mineralocorticoids in patients with adrenal incidentalomas." *Eur J Clin Invest* **30 Suppl 3**: 83-6.
- Matsumoto, H., N. Suzuki, et al. (1989). "Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain." *Biochem Biophys Res Commun* **164**(1): 74-80.
- Matsumoto, H., N. Suzuki, et al. (1990). "Insulin-like growth factor-I stimulates endothelin-3 secretion from rat anterior pituitary cells in primary culture." *Biochem Biophys Res Commun* **172**(2): 661-8.
- Matsumura, Y., K. Hisaki, et al. (1990). "Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the hypertensive effect of big endothelin-1." *Eur J Pharmacol* **185**(1): 103-6.
- Mazzocchi, G., P. Rebuffat, et al. (1996). "Evidence that both ETA and ETB receptor subtypes are involved in the in vivo aldosterone secretagogue effect of endothelin-1 in rats." *Res Exp Med (Berl)* **196**(3): 145-52.
- Milner, P., P. Bodin, et al. (1990). "Rapid release of endothelin and ATP from isolated aortic endothelial cells exposed to increased flow." *Biochem Biophys Res Commun* **170**(2): 649-56.
- Minchenko, A. G., M. J. Stevens, et al. (2003). "Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly(ADP-ribose) polymerase activation." *Faseb J* **17**(11): 1514-6.
- Moe, O., A. Tejedor, et al. (1991). "Effects of endothelin on in vitro renin secretion." *Am J Physiol* **260**(4 Pt 1): E521-5.
- Molenaar, P., G. O'Reilly, et al. (1993). "Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium." *Circ Res* **72**(3): 526-38.
- Morigi, M., S. Buelli, et al. (2005). "In response to protein load podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin-1 gene: implication for permselective dysfunction of chronic nephropathies." *Am J Pathol* **166**(5): 1309-20.
- Mortensen, L. H., C. M. Pawloski, et al. (1990). "Chronic hypertension produced by infusion of endothelin in rats." *Hypertension* **15**(6 Pt 2): 729-33.
- Murer, L., G. Zacchello, et al. (1994). "Immunohistochemical distribution of endothelin in biopsies of pediatric nephrotic syndrome." *Am J Nephrol* **14**(3): 157-61.
- Murlas, C. G., A. Gulati, et al. (1995). "Endothelin-1 stimulates proliferation of normal airway epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **212**(3): 953-9.
- Nakahama, H. (1990). "Stimulatory effect of cyclosporine A on endothelin secretion by a cultured renal epithelial cell line, LLC-PK1 cells." *Eur J Pharmacol* **180**(1): 191-2.
- Nakamura, T., I. Ebihara, et al. (1993). "Increased endothelin and endothelin receptor mRNA expression in polycystic kidneys of cpk mice." *J Am Soc Nephrol* **4**(4): 1064-72.
- Nakov, R., E. Pfarr, et al. (2002). "Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension." *Am J Hypertens* **15**(7 Pt 1): 583-9.
- Navarro, J., A. Sanchez, et al. (1994). "Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats." *Am J Physiol* **267**(6 Pt 2): R1516-21.

- Nejentsev, S., J. M. Howson, et al. (2007). "Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A." Nature **450**(7171): 887-92.
- Niranjan, V., S. Telemaque, et al. (1996). "Systemic hypertension induced by hepatic overexpression of human preproendothelin-1 in rats." J Clin Invest **98**(10): 2364-72.
- Ogawa, Y., K. Nakao, et al. (1991). "Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor." Biochem Biophys Res Commun **178**(1): 248-55.
- Okazawa, M., T. Shiraki, et al. (1998). "Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells." J Biol Chem **273**(20): 12584-92.
- Oliver, F. J., G. de la Rubia, et al. (1991). "Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells." J Biol Chem **266**(34): 23251-6.
- Ong, A. C., L. J. Newby, et al. (2003). "Expression and cellular localisation of renal endothelin-1 and endothelin receptor subtypes in autosomal-dominant polycystic kidney disease." Nephron Exp Nephrol **93**(2): e80.
- Ortega Mateo, A. and A. A. de Artinano (1997). "Highlights on endothelins: a review." Pharmacol Res **36**(5): 339-51.
- Otsuka, A., H. Mikami, et al. (1989). "Changes in plasma renin activity and aldosterone concentration in response to endothelin injection in dogs." Acta Endocrinol (Copenh) **121**(3): 361-4.
- Pascoe, W. S. and L. H. Storlien (1990). "Inducement by fat feeding of basal hyperglycemia in rats with abnormal beta-cell function. Model for study of etiology and pathogenesis of NIDDM." Diabetes **39**(2): 226-33.
- Plum, J. and C. Hader (2002). "[Diabetic nephropathy - Treatment]." Dtsch Med Wochenschr **127**(24): 1328-32.
- Pollock, D. M. and T. J. Opgenorth (1993). "Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA receptor activation." Am J Physiol **264**(1 Pt 2): R222-6.
- Portha, B., C. Levacher, et al. (1974). "Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period." Diabetes **23**(11): 889-95.
- Portha, B., L. Picon, et al. (1979). "Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes." Diabetologia **17**(6): 371-7.
- Quaschnig, T., S. Kocak, et al. (2003). "Increase in nitric oxide bioavailability improves endothelial function in endothelin-1 transgenic mice." Nephrol Dial Transplant **18**(3): 479-83.
- Raij, L., S. Azar, et al. (1984). "Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats." Kidney Int **26**(2): 137-43.
- Rajagopalan, S., J. B. Laursen, et al. (1997). "Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension." Hypertension **30**(1 Pt 1): 29-34.
- Ramanadham, S. and T. E. Tenner, Jr. (1986). "Chronic effects of streptozotocin diabetes on myocardial sensitivity in the rat." Diabetologia **29**(10): 741-8.
- Resink, T. J., T. Scott-Burden, et al. (1990). "Internalization of endothelin by cultured human vascular smooth muscle cells: characterization and physiological significance." Mol Pharmacol **38**(2): 244-52.
- Rhoden, C. H., D. B. Leeper, et al. (1975). "Blood pressure changes in mice after lethal staphylococcal infection and endotoxin challenge." Proc Soc Exp Biol Med **149**(3): 622-5.
- Ritz, E., I. Rychlik, et al. (1999). "End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions." Am J Kidney Dis **34**(5): 795-808.
- Roccatello, D., R. Mosso, et al. (1994). "Urinary endothelin in glomerulonephritis patients with normal renal function." Clin Nephrol **41**(6): 323-30.

- Rossetti, L. (1995). "Glucose toxicity: the implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus." Clin Invest Med **18**(4): 255-60.
- Rossini, A. A., A. A. Like, et al. (1977). "Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(6): 2485-9.
- Ruiz-Ortega, M., D. Gomez-Garre, et al. (1994). "Involvement of angiotensin II and endothelin in matrix protein production and renal sclerosis." J Hypertens Suppl **12**(4): S51-8.
- Russell, F. D., J. N. Skepper, et al. (1997). "Detection of endothelin receptors in human coronary artery vascular smooth muscle cells but not endothelial cells by using electron microscope autoradiography." J Cardiovasc Pharmacol **29**(6): 820-6.
- Schiffrin, E. L. (1999). "State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension." Hypertension **34**(4 Pt 2): 876-81.
- Schiffrin, E. L., R. Lariviere, et al. (1995). "Enhanced expression of endothelin-1 gene may cause blood pressure-independent vascular hypertrophy." J Cardiovasc Pharmacol **26** Suppl 3: S5-8.
- Schmidt, F. H. (1961). "[Enzymatic determination of glucose and fructose simultaneously]." Klin Wochenschr **39**: 1244-7.
- Schonbeck, U., G. K. Sukhova, et al. (1999). "Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions." Am J Pathol **155**(4): 1281-91.
- Seino, Y., M. Usami, et al. (1990). "Effect of dietary environment on the development of impaired glucose tolerance and pancreatic hormone secretion in neonatal streptozocin-treated (NSZ) rats." Acta Diabetol Lat **27**(2): 95-104.
- Shibouta, Y., N. Suzuki, et al. (1990). "Pathophysiological role of endothelin in acute renal failure." Life Sci **46**(22): 1611-8.
- Shindo, T., H. Kurihara, et al. (2002). "Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1." J Mol Med **80**(2): 105-16.
- Shinmi, O., S. Kimura, et al. (1989). "Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain." Biochem Biophys Res Commun **164**(1): 587-93.
- Simonson, M. S. and M. J. Dunn (1993). "Endothelin peptides and the kidney." Annu Rev Physiol **55**: 249-65.
- Stamler, J. S., D. J. Singel, et al. (1992). "Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms." Science **258**(5090): 1898-902.
- Stasch, J. P., K. Dembowsky, et al. (2002). "Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies." Br J Pharmacol **135**(2): 344-55.
- Stumvoll, M., B. J. Goldstein, et al. (2008). "Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment." Lancet **371**(9631): 2153-6.
- Sugiura, M., T. Inagami, et al. (1989). "Endotoxin stimulates endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay." Biochem Biophys Res Commun **161**(3): 1220-7.
- Suzuki, N., H. Matsumoto, et al. (1989). "Production of endothelin-1 and big-endothelin-1 by tumor cells with epithelial-like morphology." J Biochem (Tokyo) **106**(5): 736-41.
- Taddei, S., A. Viridis, et al. (1999). "Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increased in the peripheral circulation of patients with essential hypertension." Circulation **100**(16): 1680-3.

- Takasu, N., I. Komiya, et al. (1991). "Streptozocin- and alloxan-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as mediator for DNA fragmentation." Diabetes **40**(9): 1141-5.
- Takeda, Y., T. Yoneda, et al. (1993). "Stimulation of endothelin mRNA and secretion in human endothelial cells by FK 506." J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 8**: S310-2.
- Takuwa, Y., T. Masaki, et al. (1991). "The mechanisms of endothelin action in vascular smooth muscle cells." Contrib Nephrol **90**: 99-104.
- Talke, H. and G. E. Schubert (1965). "[Enzymatic Urea Determination in the Blood and Serum in the Warburg Optical Test.]" Klin Wochenschr **43**: 174-5.
- Terada, Y., K. Tomita, et al. (1992). "Different localization of two types of endothelin receptor mRNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription and polymerase chain reaction assay." J Clin Invest **90**(1): 107-12.
- Tharoux, P. L., C. Chatziantoniou, et al. (1999). "Vascular endothelin-1 gene expression and synthesis and effect on renal type I collagen synthesis and nephroangiosclerosis during nitric oxide synthase inhibition in rats." Circulation **99**(16): 2185-91.
- Tharoux, P. L., I. Hagege, et al. (2005). "Urinary endothelin-1 as a marker of renal damage in sickle cell disease." Nephrol Dial Transplant **20**(11): 2408-13.
- Treiber, F. A., R. W. Jackson, et al. (2000). "Racial differences in endothelin-1 at rest and in response to acute stress in adolescent males." Hypertension **35**(3): 722-5.
- Trenkner, J., F. Priem, et al. (2002). "Endothelin receptor A blockade reduces proteinuria and vascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats on high-salt diet in a blood-pressure-independent manner." Clin Sci (Lond) **103 Suppl 48**: 385S-388S.
- Ujiie, K., Y. Terada, et al. (1992). "Messenger RNA expression and synthesis of endothelin-1 along rat nephron segments." J Clin Invest **90**(3): 1043-8.
- Ustundag, B., M. Cay, et al. (1999). "The study of renin-angiotensin-aldosterone in experimental diabetes mellitus." Cell Biochem Funct **17**(3): 193-8.
- Vallon, V. and S. Thomson (1995). "Inhibition of local nitric oxide synthase increases homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback." Am J Physiol **269**(6 Pt 2): F892-9.
- Vavra, J. J., C. Deboer, et al. (1959). "Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic." Antibiot Annu **7**: 230-5.
- von Websky, K., S. Heiden, et al. (2009). "Pathophysiology of the endothelin system - lessons from genetically manipulated animal models." Eur J Med Res **14**(1): 1-6.
- Wagner, O. F., G. Christ, et al. (1992). "Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells." J Biol Chem **267**(23): 16066-8.
- Wang, R. N., L. Bouwens, et al. (1996). "Beta-cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period." Diabetologia **39**(5): 548-57.
- Widimsky, J., Jr., K. Horky, et al. (1991). "Plasma endothelin-1,2 levels in mild and severe hypertension." J Hypertens Suppl **9**(6): S194-5.
- Wilcox, C. S., W. J. Welch, et al. (1992). "Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 11993-7.
- Wilkins, F. C., Jr., A. Alberola, et al. (1993). "Chronic pathophysiologic circulating endothelin levels produce hypertension in conscious dogs." J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 8**: S325-7.

- Wilson, D. B., D. M. Dorfman, et al. (1990). "A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells." Mol Cell Biol **10**(9): 4854-62.
- Yamauchi, T., K. Ohnaka, et al. (1990). "Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells." FEBS Lett **267**(1): 16-8.
- Yanagisawa, H., R. E. Hammer, et al. (2000). "Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development." J Clin Invest **105**(10): 1373-82.
- Yanagisawa, M., A. Inoue, et al. (1988). "Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6964-7.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels." J Hypertens Suppl **6**(4): S188-91.
- Yki-Jarvinen, H. (1994). "Pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus." Lancet **343**(8889): 91-5.
- Yokokawa, K., M. Kohno, et al. (1993). "Effect of heparin on endothelin-1 production by cultured human endothelial cells." J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 8**: S46-8.
- Zatz, R. and G. de Nucci (1991). "Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation." Am J Physiol **261**(2 Pt 2): F360-3.
- Zoja, C., S. Orisio, et al. (1991). "Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth factor-beta, thrombin, and a thromboxane A<sub>2</sub> analogue." Lab Invest **64**(1): 16-20.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ANP	atriales natriuretisches Peptid
A. dest.	Aqua destillata
ADH	antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	activating protein-1
ATPase	Adenosintriphosphatase
art.	arteriell
Big-ET	Big-Endothelin (=Pro-ET)
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
cGMP	3',5'-cyclo-Guanosinmonophosphat
DN	Diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Desintegrationen pro Minute
ECE	Endothelin Konversionsenzym
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzym-linked immuno sorbent assay
ENaC	epithelialer Natriumkanal
eNOS	epitheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ETAR	Endothelin-A-Rezeptor
ETBR	Endothelin-B-Rezeptor
ETBRd	Endothelin-B-Rezeptor-defizient
ETCR	Endothelin-C-Rezeptor

---

ETS	Endothelinsystem
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GI	Glomeruloskleroseindex
h	Stunde
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ID	Innendurchmesser
IE	internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare NO-Synthase
int.	interna
IP3	Inositoltriphosphat
irET	immunoreaktives Endothelin
kb	kilo Basen
kD	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
L-NAME	L-Nitroarginin-methyl-ester
MAP	Mean arterial Pressure/mittlerer arterieller Druck
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
nNOS	neurale NO-Synthase
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatsalz Puffer)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PRA	Plasmareninaktivität
PRC	Plasmareninkonzentration
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radio-Immunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion

s	Sekunde
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
SE	standard error (Standardfehler)
STX	Sarafotoxin
STZ	Streptozotocin
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
vs.	versus
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Berthold Hoher möchte ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Dissertation sowie die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. med. Thimo Pfab für die Einführung in die Grundlagen der biochemischen experimentellen Methoden und für zahlreiche Ratschläge bei der Durchführung meiner Arbeit und die unendliche Ausdauer und Geduld sowie intensive Betreuung während des Schreibens meiner Dissertation.

Bei Frau Dr. vet. Sophia Herzfeld und bei Frau Dr. vet. Katja Simon bedanke ich mich für die hilfreiche veterinärmedizinische Unterstützung während meiner tierexperimentellen Arbeiten.

Die Mehrzahl der Experimente und insbesondere die Tierversuche wären ohne das großzügige Gastrecht im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin und die Hilfe der Tierpfleger nicht möglich gewesen.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern in der AG Hoher, hier insbesondere Frau Dr. med. Franziska Theilig und Frau Dr. rer. nat. Katharina Relle, ohne deren freundliche Anleitung und Betreuung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinem Ehemann und Freunden danken, die es mir ermöglicht haben, mein Studium der Medizin zu absolvieren und diese Dissertation abzuschließen.

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Ines Ernst, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Endothelin-B-Rezeptor-defiziente diabetische Ratten entwickeln schweren ET-1 abhängigen Hypertonus und schwere Nephropathie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 26.09.2011

Unterschrift Ines Ernst

## **10 Lebenslauf**

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

## 11 Publierte Ergebnisse

Die Ergebnisse der ETBR-defizienten Tiere mit Diabetes wurden im Einverständnis mit dem Betreuer dieser Dissertation (Prof. Dr.med. B. Hoher und PD Dr.med. T. Pfab ) vorab veröffentlicht in:

Artikel:

Pfab, T., C. Thone-Reineke, et al. (2006). "Diabetic endothelin B receptor-deficient rats develop severe hypertension and progressive renal failure." J Am Soc Nephrol **17**(4): 1082-9.

Poster:

9/2005 Poster auf dem Kongress der American Society of Nephrology:

"Diabetic endothelin B receptor-deficient rats develop severe hypertension and pronounced renal pathology", T. Pfab, C. Thöne-Reineke, I. Lange, Michael Godes, Henning Witt, Patricia Ruiz, Masashi, Yanagisawa, Bertold Hoher