

Aus der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Angiotensin II Typ 1- und Endothelin-1 Typ A-Rezeptor aktivierende
Autoantikörper in der systemischen Sklerose mit renaler Krise

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tobias Sebastian Kretzschmar

aus Berlin, Deutschland

Datum der Promotion: 18.12.2020

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	8
Abstract	9
1. Einleitung	10
1.1. Systemische Sklerose	10
1.1.1. Diagnostische und prognostische Parameter bei der systemischen Sklerose	12
1.1.2. Therapie und Prognose	13
1.2. Systemische Sklerose mit renaler Krise	13
1.2.1. Diagnostik der SRC	14
1.2.2. Therapie der SRC	14
1.3. Aktivierung und pathophysiologische Bedeutung von vasoaktiven Peptiden	15
1.3.1. Biosynthese von Angiotensin (Ang II)	15
1.3.2. Beteiligung von Ang II bei der SSc	15
1.3.3. Biosynthese von Endothelin-(ET)-1	16
1.3.4. Beteiligung von ET-1 bei der SSc	16
1.4. Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)	17
1.4.1. Angiotensin II Rezeptoren	17
1.4.2. Endothelin-1 Rezeptoren	18
1.4.3. Interaktion zwischen RAAS und Endothelin System	18
1.5. Funktionale Autoimmunität bei systemischer Sklerose	19
1.6. Ziele der Arbeit	20
2. Materialien und Methoden	21
2.1. Materialien	21
2.1.1. Chemikalien	21
2.1.2. Pharmaka	21
2.1.3. Hormone/Neurotransmitter	22
2.1.4. Kontroll Immunglobulin	22
2.1.5. AT ₁ / ET _A agonistisches Immunglobulin	22
2.1.6. Puffer und Lösungen	23

2.1.7. Versuchstiere	24
2.1.8. Geräte und Hilfsmittel	24
2.1.9. Verbrauchsmaterialien	25
2.1.10. Software	26
2.2. Methoden	26
2.2.1. Isolierung humaner Immunglobuline	26
2.2.2. RNA-Isolation mit Qiazol®	28
2.2.3. Reverse Transkriptase-PCR	28
2.2.4. PCR Nachweis von ET-A und AT-1 Rezeptoren mit real-time quantitative PCR (qRT-PCR)	29
2.2.5. Nierenexplantation	31
2.2.6. Gefäßpräparation	31
2.2.7. Kleingefäß-Myographie	32
2.2.8. Physiologischer Hintergrund	33
2.2.9. Normalisation	34
2.2.10. Funktionsprüfung	36
2.2.11. Myographie Versuchsablauf	37
2.2.12. Datenanalyse und statistische Auswertung	38
3. Ergebnisse	40
3.1. KCl-abhängigen Maximalkontraktion von renaler Interlobararterien	40
3.2. Überprüfung der Intaktheit des Arterienendothels	40
3.2.1. Wirkung von Phenylephrin an Interlobararterien	41
3.2.2. Wirkung von Acetylcholin an Interlobararterien	41
3.3. Rezeptornachweis für die natürlichen Liganden Angiotensin und Endothelin	42
3.4. Wirkung natürlicher Liganden an Interlobararterien	43
3.4.1. Ang II vermittelte Vasokonstriktionen an Interlobararterien	43
3.4.2. ET-1 vermittelte Vasokonstriktionen an Interlobararterien	44
3.5. Ausschluss von Störfaktoren	45

3.5.1. Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien im PBS Bad	45
3.5.2. Auswirkung von Kontroll-Immunglobulin auf Interlobararterien	46
3.5.3. Auswirkung des Dialysepuffers auf Interlobararterien	46
3.5.4. Übersicht der Kontrollversuche an Interlobararterien	47
3.6. Reaktionen renaler Interlobararterien auf AT₁R / ET_AR agonistische Immunglobuline	48
3.6.1. Agonistische IgG bei SSc mit PAH	48
3.6.2. Agonistischen IgG bei Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation	49
3.6.3. Agonistische IgG bei SSc mit renaler Krise	49
3.7. Kontrollexperimente mit selektiven und nicht-selektiven Rezeptorblockern	50
3.7.1. Angiotensin-Rezeptorantagonisten	50
3.7.2. Endothelin-Rezeptorantagonisten	51
3.8. Antagonisierung der Endothelin- und Angiotensin- vermittelten Vasokonstriktion	52
3.8.1. Antagonisierung der Angiotensin II- vermittelten Vasokonstriktionen	52
3.8.2. Antagonisierung der Endothelin- vermittelten Vasokonstriktionen	53
3.9. Potenzierende Effekte von agonistischen IgG und natürlichen Agonisten	54
3.9.1. Wirkung von vasoaktiven IgG auf Ang II vermittelte Vasonkonstriktionen	54
3.9.2. Wirkung von vasoaktiven IgG auf ET-1 vermittelte Vasokonstriktionen	55
3.9.3. Untersuchung auf zeitabhängige Wirkungen von vasoaktiven IgG und ET-1	56
3.10. Pharmakologische Antagonisierung der SRC-IgG induzierten Vasokonstriktion	57
3.10.1. SRC-IgG-induzierte Wandspannungsänderung unter Ang II Stimulation und AT ₁ -R-Antagonisierung	57
3.10.2. SRC-IgG-induzierte Wandspannungsänderung unter ET-1 Stimulation und	

ET _{A/B} -R-Antagonisierung	58
3.11. Reziproke Interaktion von agonistischen IgG mit AT_{1/2}- und ET_{A/B}-R	59
3.11.1. Effekt von ET _A -R-Antagonisten und SRC-IgG/NTx-IgG auf die Ang II induzierte Vasokonstriktion	59
3.11.2. Effekt von AT ₁ -R-Antagonisten und SRC-IgG auf die ET-1 induzierte Vasokonstriktion	60
3.12. Einfluss einer parallelen AT-R- und ET-R-Antagonisierung auf die durch SRC-IgG induzierte Gefäßantwort	61
3.12.1. Einfluss von ET _{A/B} -R-Antagonisten auf die SRC-IgG-induzierte Vasokonstriktion	61
3.12.2. Einfluss von ET _A -R- und AT _{1/2} -R-Antagonisten auf die SRC-IgG-induzierte Vasokonstriktion	62
4. Diskussion	64
5. Literaturverzeichnis	73
Eidesstaatliche Erklärung	82
Lebenslauf	83
Veröffentlichungen	85
Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin-converting-enzyme</i>
ACH	Acetylcholin
AK	Antikörper
Ang II	Angiotensin II
Anti-Pol-3	Anti-RNA-Polymerase-III
AP-1	<i>activator protein-1</i>
AT _{1/2} -R	Angiotensin-II Typ 1/2 Rezeptor
cDNA	<i>complementary-desoxyribonucleicacid</i>
dSSc	diffuse systemische Sklerose
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ET	Endothelin
ET _{A/B} -R	Endothelinrezeptor Typ A/B
IC	<i>normalised internal circumference</i>
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
Kon-IgG	Kontroll-Immunglobulin G (humanes IgG)
KPSS	Kalium enthaltende physiologische Salz Lösung
ISSc	limitierte systemische Sklerose
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MW	Mittelwert
NTx	Nierentransplantat
NO	Stickstoffmonoxid
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline solution</i>)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
qRT-PCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SRC	<i>scleroderma renal crisis</i>
SSc	Systemische Sklerose
TGF-β1	<i>transforming growth factor beta 1</i>

TPR	Totaler peripherer Widerstand
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>

Zusammenfassung

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine Systemerkrankung, die mit Hautveränderungen, Vaskulopathie und Organfibrose einhergeht. Ihre Ätiologie ist weiterhin unklar. In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise auf eine autoimmune Vaskulopathie, verursacht durch Angiotensin II Typ 1 Rezeptoren (AT₁-R) und Endothelin Typ A Rezeptoren (ET_A-R) Autoantikörper untersucht. Dazu wurden *ex vivo* Experimente an renalen Interlobararterien (Widerstandsgefäße) von Ratten vorgenommen. Die Untersuchung an den Widerstandsgefäßen erfolgte mittels Kleingefäß-Myographie. Die Gefäße exprimierten sowohl AT₁-R- als auch ET_A-R-mRNA. Die Gefäße wurden mit Immunglobulin (Ig) G aus zwei Patienten mit SSc und renaler Krise und positivem Nachweis der IgG-Bindung an AT₁-R und ET_A-R inkubiert. Das vasoaktives IgG führte zu einer Wandspannungszunahme der Gefäße zwischen 4,1 und 6,5 % der maximalen Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Mittels spezifischer pharmakologischer AT₁-R- und ET_A-R-Antagonisten konnten diese Effekte wieder aufgehoben werden. Weiter zeigte der ET_A-R-Antagonist gegenüber der AT₁-R-Hemmung eine stärkere Wandspannungsabnahme. Die Wandspannungszunahme war bei simultaner Inkubation mit vasoaktiven IgG und natürlichen Liganden (Endothelin 1, Angiotensin II) teilweise signifikant größer (*add on* Effekt). Diese Effekte ließen sich reziprok aufheben. Das heißt, unter einer ET_A-R-Hemmung kam es zu einer Abnahme der IgG- und Ang II-induzierten Wandspannung. Die duale Rezeptorhemmung durch AT₁-R- und ET_A-R-Antagonisten war in der Lage, die IgG vermittelte Kontraktion vollständig zu inhibieren. Diese Ergebnisse erhärten die Annahme immunologisch bedingter Gefäßveränderungen durch autoimmune Rezeptoraktivierung bei einer SSc mit renaler Beteiligung. Die beschriebenen Pathomechanismen könnten die Grundlage künftiger, spezifischer Therapien bilden.

Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is a systemic disease accompanied by skin alterations, vasculopathy and organ fibrosis. The etiology still remains unclear. In this work, evidence of an autoimmune vasculopathy caused by AT₁-R- and ET_A-R-Autoantibodies was examined. I carried out *ex vivo* experiments in renal interlobar arteries (resistance vessels) of rats. Immunoglobulin G of patients with SSc and renal crisis who had positive proof of autoimmune IgG binding to Ang II type 1 as well as Endothelin-1 type A receptors were used. At first, the physiological reactivity of the vessels and the receptor mRNA distribution were assessed. Studies on resistance vessels were conducted with small vessel myography. Vasoactive IgG led to an increase of vessel contraction between 4.1 and 6.5 percent in relation to a maximum contraction to 60 mmol/l KCL Solution. By means of specific pharmacological AT₁ and ET_A receptor antagonism, these effects could be inhibited. It was noticed that ET_AR specific inhibitor produced a stronger decrease of vessel contraction than AT₁ receptor blocker. In addition, incubation of vasoactive IgG with the receptors natural ligands led to a significant increase of vessel contraction, revealing add-on effects. These effects could be reciprocally blocked, i.e. ET_AR specific inhibitor blocked the vessel contraction induced by vasoactive IgG together with Ang II. The combination out of a dual receptor hindering was able to inhibit the contraction from vasoactive patient IgG completely.

These results support the concept of immunological triggered vessel tone changes by autoimmune receptor activation in systemic sclerosis with renal participation and define a new pathogenic model for the development of future, specific therapies.

1. Einleitung

1.1. Systemische Sklerose

Die systemische Sklerose (SSc) oder Synonym progressive systemische Sklerose (pSS) ist eine Bindegewebserkrankung mit heterogenem Erscheinungsbild und unklarer Ätiologie. Die Prävalenz liegt bei 4–242 Erkrankten pro einer Million Einwohner in den Vereinigten Staaten von America, die jährliche Inzidenz beträgt 0,6–19. Die SSc kommt in den USA häufiger als in Europa und Asien vor. Der Häufigkeitsgipfel liegt im 3. bis 5. Lebensjahrzehnt. Frauen und Männer sind in einem Verhältnis von 3–6 zu 1 betroffen [1, 2, 3].

Kennzeichen der SSc sind die Trias: Autoimmunität, obliterierende Vaskulopathie und Kollagenablagerungen in der Haut und in inneren Organen. Drei Verlaufsformen werden unterschieden: die diffuse (dSSc) mit Sklerose der Haut und Beteiligung innerer Organe, die limitierte Verlaufsform (lSSc) mit akraler Ausprägung und die seltene systemische Sklerose sine Sklerodermie. Bei der lSSc dominieren angiopathische Hautveränderungen, mit den Kennzeichen des CREST-(calcinosis, Raynaud-Syndrom, ösophageale Dysmotilität, Sklerodaktylie, Teleangiektasie)-Syndroms [4, 5]. Die dSSc manifestiert sich mit akralen Ödemen, die Gewebeatrophie führt zu Nekrosen und Akroosteolysen, Retraktion und Sklerose der Dermis erzeugen immobilisierende Kontrakturen [6]. Nahezu alle inneren Organe können bei der dSSc betroffen sein [7]. Die Diagnosestellung erfolgt mit Hilfe der 2013 etablierten ACR (*American College of Rheumatology*)/EULAR (*European league against rheumatism*) Klassifikationskriterien [8]. Gemeinsam ist allen Verlaufsformen die obliterative Vaskulopathie, (siehe Abb. 1.0) [9, 10].

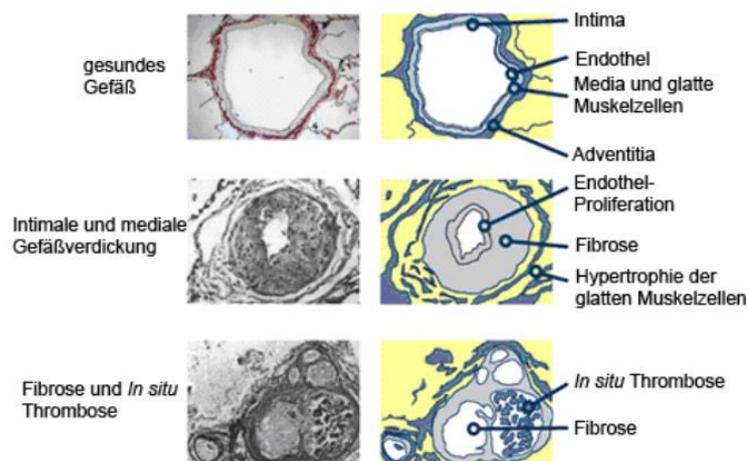


Abb. 1.0: Vaskulopathie bei SSc. Histologischer und schematischer Übergang vom Normalbefund bis zur Gefäßokklusion (Zugriff am 18. September, 2017 <http://www.pah-info.com>).

Als häufigste Mortalitätsursache hat die SSc mit Lungenbeteiligung die SSc mit renaler Krise in den vergangenen Jahren abgelöst. Bei 53 % der dSSc und 35 % der lSSc Patienten besteht eine interstitielle Fibrosierung oder pulmonale Fibrose mit restriktiver Ventilationsstörung. Als assoziierte Komplikation kann sich eine pulmonale Hypertonie (PAH) mit Cor pulmonale und Rechts-Herzversagen entwickeln. PAH und pulmonale Fibrose machen zusammen 61 % der Todesfälle aus [11].

Mittels Magnetresonanztomographie lässt sich bei 25–66 % der dSSc Patienten eine myokardiale Fibrose nachweisen, die mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität einhergeht [12, 13].

Bei 5–15 % der an SSc Erkrankten entwickelt sich als frühe Komplikation ein akutes Nierenversagen. Die "*scleroderma renal crisis*" (SRC) geht mit schwerem Hypertonus, akutem Nierenversagen und einer hämolytischen Anämie einher. Bis zur Einführung der *angiotensin-converting-enzyme*-(ACE)-Hemmer Behandlung war die SRC die häufigste Mortalitätsursache [14, 15].

Als ursächlich für die SSc werden immunologische Prozesse diskutiert. Eine genetische Disposition, Infektionen und chemische Noxen besitzen als auslösende Faktoren eine untergeordnete Rolle. Eine niedrige Konkordanzrate unter Zwillingen widerspricht einem starken genetischen Einfluss [2, 16]. Allerdings wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) z.B. im *major histocompatibility complex* (MHC) II identifiziert, die den inflammatorischen und fibrotischen Antworten z.B. über *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interleukin 1 (IL-1) vorausgehen [17, 18]. Hinweise auf eine Virusinfektion als Auslöser der Immunreaktion wurden bei fehlendem Virus *messenger ribonucleic acid* (mRNA) Nachweis im betroffenen Gewebe nicht erhärtet [10]. Als chemisch-toxische Auslöser können Bleomycin, Taxane und Lösungsmittel SSc-ähnliche Syndrome auslösen [19-20].

Neben einer T-Zell vermittelten Entzündung mit erhöhter Konzentration profibrotischer Zytokine, kommt es zur Endothel-Dysfunktion mit Intimaproliferation. In der Folge entwickelt sich eine schwere Vaskulopathie mit Gefäßobliteration [21, 22]. Die Intimaproliferation und endotheliale Dysfunktion der Arterien sind wesentliche Veränderungen, die bereits früh im Krankheitsverlauf auftreten. Endothelzellen synthetisieren nach Aktivierung durch T-Zellen, IL-1, IL-6, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) und *intracellular adhesion molecule* (ICAM-1). Anschließende Fibrosierungsprozesse über *platelet derived growth factor* (PDGF) führen zu Migration von Makrophagen in das Entzündungsgebiet. Diese unterhalten über TGF- β den Fibrosierungsprozess

aufrecht, der durch Gewebshypoxie mit Plättchenaggregation und Thrombosierung, Endothelin-(ET)-1-Anstieg sowie durch eine verminderte Stickstoffmonoxid-(NO)- und Prostacyclin-Synthese die vaskuläre Okklusion befördert. Die Obliteration führt zu einer weiteren Hypoxie, die die TGF- β -Produktion stimuliert, so dass die Entzündung eine weitere Proliferation der Tunica intima, sowie eine Tunica media Hypertrophie und Fibrosierung unterhält [16, 22, 23]. Grundlage der T-Zell vermittelten Entzündung ist eine Aktivierung des B-Zell-Systems mit CD-19-Überexpression, die mit einer erhöhten Immunglobulin-(Ig)- und Autoantikörper-(Auto-AK)-Synthese einhergeht [21, 24, 25].

1.1.1. Diagnostische und prognostische Parameter bei der systemischen Sklerose

Laborchemisch fällt eine erhöhte Blutsenkung, Anämie (hypoproliferativ, hämolytisch), IgG-Hypergammaglobulinämie (bei 50 % der Patienten), ein niedriger Rheumafaktor-Titer (bei 25 % der Patienten) und ein B-natriuretisches Peptid, das mit der Schwere einer PAH korreliert, auf [10]. Der spezifische AK-Nachweis und Gewebebiopsien gelten als Standard in der Diagnosesicherung. In 90 % der SSc-Fälle sind Anti-nukleäre-AK (ANA) nachweisbar [4]. Die häufigsten mit einer SSc assoziierten Anti-nukleären-AK sind Anti-SCL 70 (entspricht Anti-Topoisomerase-1-AK, (Anti-topo-1-AK)), anti-RNA-Polymerase-III-AK (Anti-Pol-3) und Anti-Th/To-AK. Anti-topo-1-AK finden sich in 40 % der dSSc-Fälle, sie gehen mit einem erhöhten Risiko für eine Lungenfibrose einher. In 25 % der dSSc-Fälle treten Anti-Pol-3-AK auf, die mit einem erhöhten Risiko für eine SRC korreliert sind [5, 22]. Das AK-Profil (siehe Tabelle 1) gibt Informationen zur Assoziation der Erkrankung mit klinischen Symptomen. Es gibt Hinweise, dass ihnen in der Pathophysiologie der Erkrankung eine Rolle zukommt [26], Tab. 1.

Antikörper	ACA	Anti-Th/To	Anti-U1-RNP	Anti-Pm/Scl	Anti-U3-RNP	Anti-Topo-1	Anti-Pol-3
Demografie	weiblich		Afro Amer.		Afro Amer.	Afro Amer.	
Verlauf	limitiert	limitiert	limitiert	limitiert	diffus	diffus	diffus
Gelenke/ Haut	↓Gelenk	↓Gelenk	↑Gelenk				↑↑ Haut
Myositis	↓		<i>overlap</i>	<i>overlap</i>	↑		↓
Calcinosis	↑			↑			
Dig. Ulcus	↑↑	↑	↑	↑	↑	↑↑	↑

Lunge	↑ PAH	PF+PAH	PAH		PF+PAH	↑↑PF	↓ PF
Niere (SRC)					↑	↑	↑↑

Tabelle 1: Assoziation klinischer Symptome der SSc mit spezifischen Antikörpern. Pfeil nach oben weist auf häufige, Pfeil nach unten auf seltene klinische Beteiligung hin [27]. ACA = Anti-Centromer-AK, Anti-Pol 3 = Anti-RNA-Polymerase-III-AK, Anti-Th/To = Anti-tyrosin hydroxylase-AK, Anti Topo-1 = Anti-Topoisomerase 1-AK, Anti-U1 RNP = Uridin 1 ribonucleäres Protein-AK, Anti-U3 RNP = Uridin 3 ribonucleäres Protein-AK, Anti Pm/Scl = Polymyositis/Sclerodermie-AK, PAH = pulmonale Hypertonie, PF = Pulmonale Fibrose, SRC = *scleroderma renal crisis*

1.1.2. Therapie und Prognose

Bei ungeklärter Pathogenese ist eine kausale Therapie bisher nicht möglich. Die Erkrankung ist derzeit nicht heilbar. Bei schweren Verläufen mit generalisierter Fibrose und aktiver Alveolitis werden zytostatische Therapien mit Cyclophosphamid vorgenommen [28]. Interventionen, die sich gegen die vaskuläre Dysfunktion im Rahmen der PAH richten, beinhalten Wirkstoffe wie Bosentan, Phosphodiesterase-5-Hemmer und Prostacycline. Vasodilatative Pharmakotherapien werden beim Raynaud-Symptomen angewendet [29]. Bei einer SRC konnte die Mortalität durch die ACE-Hemmer signifikant gesenkt werden. Hohe Dosen von Glukokortikoiden stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung einer SRC und werden zurückhaltend eingesetzt. Indikationen für eine Glukokortikoid-Behandlung sind Myositis, Perikarditis und die frühe Alveolitis [4, 10, 14]. Für schwere und aggressive Verläufe stellen die autologen Stammzell- sowie Nieren- und Lungentransplantationen Therapieoptionen dar [28]. Neuere Therapieoptionen umfassen den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonalen AK [30].

Die Mortalität ist abhängig vom Verlauf und dem Erscheinungsbild. Unter den Kollagenosen hat die SSc die höchste Todesrate mit einer 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 55 %. Eine Organbeteiligung erscheint häufig in den ersten Jahren der SSc und verschlechtert die Prognose erheblich. In den vergangenen Jahrzehnten hat sich die Überlebensrate verbessert [16, 31].

1.2. Systemische Sklerose mit renaler Krise

Die SRC ist eine der wichtigsten Komplikationen der SSc. Risikofaktoren für eine SRC sind ausgeprägte Hautbeteiligungen bei der dSSc, Gelenkkontrakturen, kongestive Herzinsuffizienz,

der Nachweis von Anti-Pol-3-AK, sowie eine zuvor stattgefundene Glucokortikoid-Behandlung (> 15 mg Prednisolon/Tag) [14–16].

Das klinische Erscheinungsbild ist heterogen. Neben dem klassischen Verlauf mit einem akut einsetzenden Nierenversagen und schwerer Hypertonie (> 150/85 mmHg), verläuft bei 10 % der SRC-Patienten das Nierenversagen unter unauffälligem Blutdruckprofil. Letztere Patientengruppe zeigt signifikant häufiger eine mikroangiopathische hämolytische Anämie mit pulmonaler Hämorrhagie und schwerem klinischen Verlauf [32-34].

1.2.1. Diagnostik der SRC

In der Urinanalyse besteht eine Proteinurie und Hämaturie. Laborchemisch sind rasch ansteigende Retentionswerte, eine Hyperreninämie, ein Abfall des Hämoglobins (Hb) aufgrund hämolytischer Prozesse und lösliche Adhäsionsmoleküle (VCAM, ICAM) nachweisbar. Immunhistochemisch liegt eine Zunahme der Endothelin-Rezeptor Typ A/B (ET_{A/B}-R) Dichte vor [14, 15, 23]. Histopathologische Veränderungen der Nieren sind durch Minderperfusion, konzentrische Intimaproliferation, Fibrose der Tunica adventitia der Segment- und Subsegmentarterien, kortikale Ischämie und Hyperplasie des juxtaglomerulären Apparates gekennzeichnet (siehe Abb. 1.1) [35].

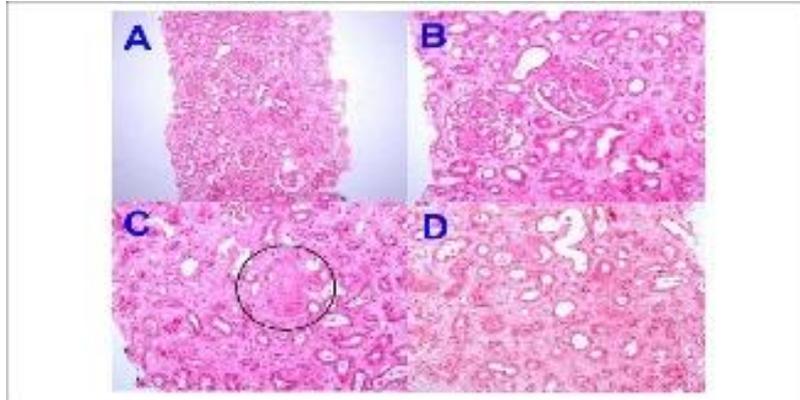


Abb. 1.1: Nierenbiopsie bei SRC: A: minderperfundiertes Glomerulum (Hämatoxylin-Eosin- (HE)-Färbung, 100x Vergrößerung), B: Wandverdickung der glomerulären Kapillaren (HE, 200x), C: Interlobulararterie mit Intimahyperplasie und Lumenobliteration (HE, 400x), D: Tubulusschaden und interstitielles Ödem (HE, 400x) [36].

1.2.2. Therapie der SRC

Die Prognose der SRC war vor Einführung der ACE-Hemmer-Therapie schlecht. Im ersten Jahr nach Beginn der Nierenbeteiligung lag die Mortalität bei 85 %. Durch die ACE-Hemmer-

Behandlung sank die Sterblichkeit auf 24 %. Das 5-Jahres-Überleben liegt bei 59 %. Die Inzidenz wird in der Literatur mit 5–15 % der dSSc Patienten angegeben [14, 16, 33].

Für die Pathogenese relevante Faktoren sind ein aktiviertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), profibrotische Wachstumsfaktoren, TGF- β und *connective tissue growth factor* (CTFG) [32].

Ein prophylaktischer Einsatz von ACE-Hemmern kann eine SRC nicht verhindern. Wird die Diagnose nicht frühzeitig gestellt, bevor das Serum-Kreatinin oberhalb von 3 mg/dl liegt, und eine ACE-Hemmer-Behandlung eingeleitet, sind irreversible Organschäden und letale Verläufe wahrscheinlich [14, 15]. Weitere Therapieoptionen umfassen eine direkte Renin-Inhibition und die selektive ET_A-R-Blockade. Letztere ist vor dem Hintergrund einer erhöhten ET-1-Expression in Glomeruli und Arteriolen von Biopsien und einem therapeutischen Ansprechen in klinischen Fallstudien bemerkenswert [37, 38].

1.3. Aktivierung und pathophysiologische Bedeutung von vasoaktiven Peptiden

1.3.1. Biosynthese von Angiotensin II (Ang II)

Ang II ist ein aus acht Aminosäuren bestehendes Gewebshormon. Es spielt eine entscheidende Rolle im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Ang II entsteht aus Angiotensinogen (Agt), das durch Renin zu Ang I umgesetzt wird. Danach spaltet das ACE zwei Aminosäuren vom Ang I ab, wodurch das aktive Ang II entsteht [39].

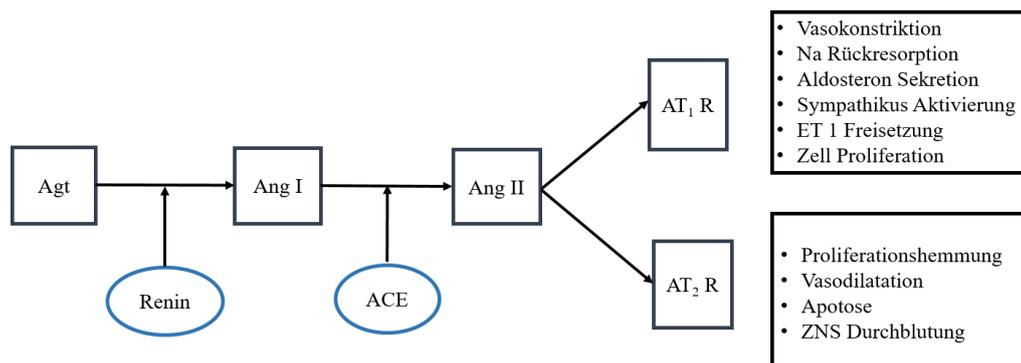


Abb. 1.2: Synthese des biologisch wirksamen Angiotensin (Ang) II aus Angiotensinogen (Agt), mit Übersicht der rezeptorvermittelten Wirkungen [39].

1.3.2. Beteiligung von Ang II bei der SSc

SSc-Patienten mit renaler Beteiligung weisen erhöhte Reninspiegel auf. Korrelierend dazu wurden im Serum von dSSc-Patienten signifikant erhöhte Ang II Spiegel festgestellt [15, 40]. Zudem zeigten immunhistochemische Verfahren einen erhöhten Gehalt von Ang-Vorstufen im Gewebe von dSSc-Patienten [41].

Neben der klassischen Biosynthese von Ang II wurde in Hautfibroblasten von dSSc-Patienten ein alternativer Syntheseweg gefunden. Dort wird Ang II unabhängig von zirkulierenden Renin und ACE durch Enzyme wie Cathepsin, Chymase, oder Tonin aus Ang I synthetisiert [41].

1.3.3. Biosynthese von Endothelin-(ET)-1

ET ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon mit drei paralogen Varianten: ET-1 wirkt hauptsächlich im Herz-Kreislauf-System. ET-2 bzw. ET-3 unterscheiden sich um zwei bzw. sechs Aminosäuren vom ET-1. Die enzymatische Synthese des aktiven ET erfolgt in zwei Schritten. Das biologisch inaktive Präpro-ET (-1, -2, -3) wird durch die Prohormonconvertase in das aus 37–41 Aminosäuren bestehende Pro-ET (-1, -2, -3) (Big-ET) gespalten. Die weitere Aktivierung erfolgt mit Hilfe von Zink-Metalloproteasen (ET-Konversions-Enzyme, ECE). Weiter existieren alternative Aktivierungswege über nicht-ECE, Chymasen und VSMC-Chymasen [42].

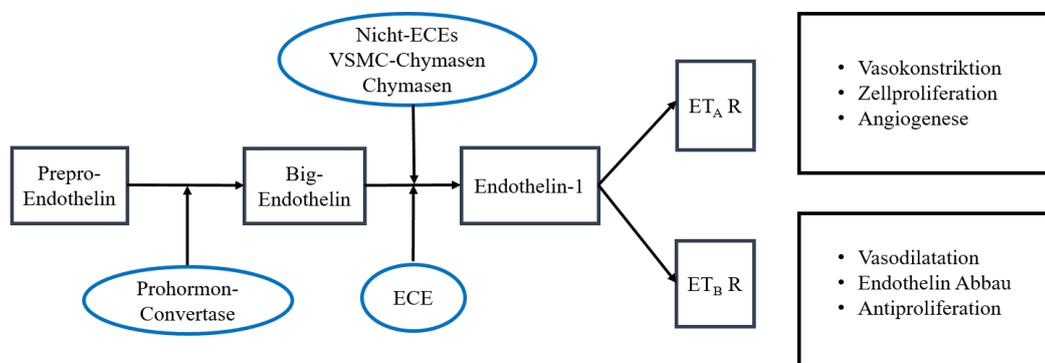


Abb. 1.3: Biosynthese von Endothelin mit Übersicht der rezeptorvermittelten Wirkungen, modifiziert nach Barton et al. [42].

1.3.4. Beteiligung von ET-1 bei der SSc

Bei SSc-Patienten kann sowohl im frühen als auch im späten Stadium eine Überexpression von ET-1 in Plasma und Serum und eine erhöhte ET-R-Expressionen in den betroffenen Organen nachgewiesen werden. Erhöhte ET-1-Spiegel werden bei SSc-Patienten mit ausgeprägten Hautfibrosierungen, PAH und einer hypertensiven renalen Krise assoziiert [43-45].

Veränderungen im ET-System gehen mit Vasokonstriktion, Vasospasmus und vaskulärer Hypertrophie einher. Stimuli der Promoter der ET-1-Gene sind u.a. TGF- β , IL-1 und Hypoxie. Die wichtigsten ET-1-vermittelten Reaktionen, die mit einem Gewebeumbau einhergehen sind die Proliferation von VSMC, die Chemotaxis von Makrophagen und die Zelldifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [46].

Der Nachweis einer Beteiligung von ET-1 an der Pathophysiologie der SSc konnte über eine Blockade der ET_{A/B}-R erbracht werden. ET-1 induziert in kultivierten Lungenfibroblasten ein Expressionsmuster, das dem der SSc-Fibroblasten ähnelt. Der ET_{A/B}-R-Blocker Bosentan schwächt die Wirkung von ET-1 in den Lungenfibroblasten ab, wodurch es zu einer Rückbildung ihres SSc-Phänotyps kommt [47].

1.4. Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCR) sind Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Sie werden durch Bindung von Liganden an extrazelluläre oder transmembranöse Domänen aktiviert. Bei Bindung des Liganden ändert sich die Konformation der Bindungsstellen an den intrazellulären Schleifen (IL-2, IL-3) und am Carboxyterminus, wodurch das G-Protein binden kann. Das G-Protein aktiviert die weitere intrazelluläre Signalkaskade [48].

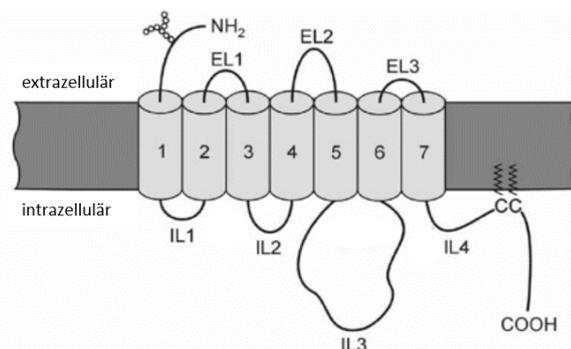


Abb. 1.4: G-Protein-gekoppelter Rezeptor (NH₂ = Aminoterminus, COOH = Carboxyterminus, EL1-3 = extrazelluläre Schleifen und IL1-4 = intrazelluläre Schleifen), modifiziert nach Löffler, Petrides [48].

1.4.1. Angiotensin II Rezeptoren

Ang II wirkt über G-Protein-gekoppelte Angiotensin-Rezeptoren (AT₁-, AT₂-R), die vor allem in den VSMC sowie in Herz und Nieren vorkommen. Ang II steuert die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) durch die Vasokonstriktion an den Nierenglomerula, zudem spielt Ang II eine bedeutende Rolle bei der zellulären Hypertrophie und ist an Proliferation und Apoptose beteiligt [49].

Ang II aktiviert über den AT₁-R eine Vielzahl inflammatorischer und profibrotischer Signalwege. So wird über eine *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-kappaB) die Transkription von chemotaktischen Proteinen (z.B. MCP-1, Adhäsionsmoleküle, *tissue-factor*) gesteuert. Diese sind an vaskulitischen Prozessen und an der thrombotischen Gefäßokklusion beteiligt [50]. Ang II induziert in Mesangiumzellen die Freisetzung von *plasminogen activator inhibitor* (PAI) und IL-6. Diese inflammatorischen Moleküle spielen bei der Glomerulonephritis mit Proteinurie eine Rolle [51]. Daneben aktiviert Ang II weitere Transkriptionsfaktoren wie *activator-protein* (AP-1), *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) und *cAMP response element-binding protein* (CREB). AP-1 wird mit tubulären Schäden und Zellinfiltration assoziiert [52]. Die profibrotischen Eigenschaften von Ang II fördern die Bildung der extrazellulären Matrix. In Herz- und Nierenfibroblasten konnte eine erhöhte Freisetzung von Typ-I Prokollagen und TGF-β1 nach AT₁-R-Stimulation aufgezeigt werden [41]. Die Rolle des AT₂-R ist nicht eindeutig geklärt, bisher wurden antiproliferative und apoptotische Eigenschaften festgestellt [53].

1.4.2. Endothelin-1 Rezeptoren

ET fungiert in VSMC als hochwirksamer Vasokonstriktor. ET wird von vielen Zelltypen (z.B. Fibroblasten, respiratorische Epithelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen) freigesetzt und wirkt parakrin, endokrin und autokrin [42].

Das aktive ET kann an zwei unterschiedliche Rezeptoren (ET_A- bzw. ET_B-R) binden. ET-R sind im menschlichen Körper weit verbreitet (z.B. Gefäße, Herz, Lunge, Niere, Leber Haut). Sie sind wie AT-R, G-Protein-gekoppelt und durch sieben Transmembranhelices gekennzeichnet [42].

Die ET_A-R-vermittelte Vasokonstriktion in den VSMC beruht auf einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Über den ET_A-R wird eine Zellproliferation in und außerhalb des Gefäßsystems vermittelt. ET_B-R kommen hauptsächlich auf Endothelzellen vor und hemmen das Zellwachstum. Der ET_B-R wirkt einer Vasokonstriktion durch Aktivierung der NO-Synthase und Prostacyclin-Synthese entgegen. ET_B-R sind an einer ET-abbauenden *clearance* Funktionen beteiligt [54].

1.4.3. Interaktion zwischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und ET-System

Ang II stimuliert über ET-Konversionsenzyme die Produktion von ET-1 in Endothelzellen und VSMC. Die Vasokonstriktion der Arteriolen durch Ang II wird daher einerseits durch ET-1

vermittelt, andererseits durch die AT_1 -R-gesteuerte Aktivierung von Nicotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat-(NADPH)-Oxidasen in VSMC [39]. Zeng et al. stellten fest, dass in hypertensiven Ratten AT_1 -R Heterodimere mit dem ET_B -R bilden. Ein Einfluss auf die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie wird angenommen [55]. Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass ET-1 die Ang-Bildung über direkte Wirkung auf Renin beeinflusst [56, 57].

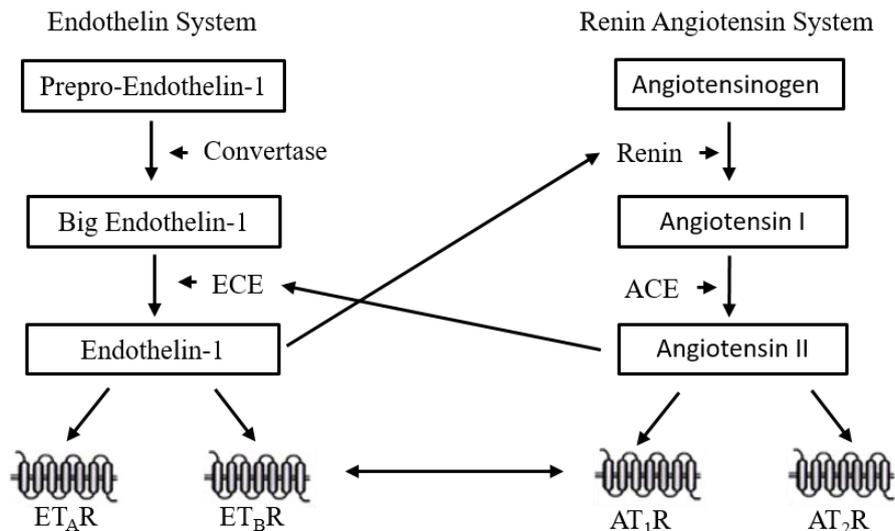


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Angiotensin- und Endothelin-Aktivierung und Interaktionen, modifiziert nach Rossi et al. [57]. ACE = Angiotensin Konversions Enzym, ECE = Endothelin Konversions Enzym.

1.5. Funktionelle Autoimmunität in der systemischen Sklerose

Trotz der bisherigen Erfolge einer spezifischen Rezeptorblockade im ET- und Ang-System verläuft bei einem Teil der Patienten die Erkrankung weiter progredient. Als "missing link" der Pathogenese der SSc wurden agonistische Peptide vermutet [58].

Bereits in den 1970er Jahren wurden in immunpathologischen Untersuchungen von SSc-Patienten mit Nierenbeteiligung Ig-Ablagerungen an den renalen Gefäßen nachgewiesen. Bei 55 % der SSc-Erkrankten konnten im Serum IgG-AK detektiert werden [59-61].

Unsere Arbeitsgruppen konnte in Kooperation mit der Klinik für Rheumatologie der Charité Mitte 2011 eine Beteiligung von funktionalen AK gegen Gefäßrezeptoren bei der SSc nachweisen. In der Untersuchung von Riemekasten et al. wurden Auto-AK gegen AT_1 -R und ET_A -R bei der

Mehrzahl der SSc-Patienten nachgewiesen. Die Serumspiegel der AK waren gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Der diagnostische Wert lag für AT₁-R-Auto-AK bei 85,1 % Sensitivität und 77,8 % Spezifität, für ET_A-R-Auto-AK bei 83,7 % Sensitivität und 77 % Spezifität. Im *enzyme linked immunosorbent Assay* (ELISA) konnte gezeigt werden, dass IgG von Patienten mit AT₁-R-Auto-AK und ET_A-R-Auto-AK mit AT₁-R und ET_A-R präzipitierten, während IgG von gesunden Kontrollpersonen zu keiner Immunpräzipitation der untersuchten Rezeptoren führten. In einer anschließenden prospektiven Studie wurden 186 Patienten mit positiven AT₁-R- und ET_A-R-Auto-AK-Status über 48 Monate beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass hohe Spiegel der AT₁-R- und ET_A-R-Auto-AK eine erhöhte krankheitsbezogene Mortalität vorhersagten [62, 63].

1.6. Ziele der Arbeit

Die renale Krise ist als schwerste Komplikation der SSc therapeutisch bisher nicht ausreichend behandelbar und in ihrer Pathogenese nur unzulänglich erforscht.

Pharmakologische Studien zeigten protektive Effekte von ACE-Hemmern sowie AT₁-R- und ET-R-Antagonisten für die Manifestation und Progression von Entzündung und Fibrosierung in dSSc-Patienten. Daher könnte der Stimulation der AT₁-R und ET_A-R in der SRC eine pathophysiologische Rolle zukommen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem experimentellen *ex vivo* Organmodell zu untersuchen, inwieweit Auto-AK von SRC-Patienten, die positiv für ET_A-R-/AT₁-R-Auto-AK getestet wurden, an der Vaskulopathie der SRC beteiligt sind. Dazu wurde zunächst ein *ex vivo* Organmodell mit isolierten renalen Interlobararterien der Ratte etabliert, das isolierte Kontraktionsmessungen mit pharmakologischen Stimulantien ermöglichte. Nach dessen Validierung wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Induzieren agonistische IgG von Patienten mit renaler Krise eine erhöhte Kontraktilität renaler Widerstandsgefäße?
- Gibt es additive oder potenzierende Effekte durch die gleichzeitige Applikation von Patienten IgG und den AT₁-R- und ET_A-R-Agonisten Ang II und ET-1?
- Sind die Effekte durch Einsatz von einfachen, dualen oder reziproken Rezeptorantagonisten beeinflussbar und ergibt sich somit ein translationaler Aspekt?

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Die Grundchemikalien wurden in analysenreiner Qualität (p.a.) von folgenden Herstellern bezogen:

- Natriumchlorid (NaCl)	Merck
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
- Mononatriumphosphatdihydrat	Merck
- Glycin	Merck
- Chlorwasserstoff	Merck
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
- Glukose	Merck
- Kaliumchlorid (KCl)	Merck
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
- Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck
- Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
- Medical Carbogen	Air Liquide Medical GmbH
- Agarose	Merck
- Ethidiumbromid	Merck

Für die Lösungen und Puffer wurde deionisiertes Wasser verwendet.

- Bidestilliertes Wasser	Fluka Mikropor
--------------------------	----------------

2.1.2. Pharmaka

- Valsartan	Novartis,
- Bosentan	FActelion,
- Sitaxentan	Encysive Pharma. Inc.
- PD 123319	Sigma-Aldrich
- BQ 123	Alexis Biochemicals
- BQ 610	Alexis Biochemicals
- BQ 788	Alexis Biochemicals

Für die Myographieexperimente wurden laut Herstellerangaben folgende Medikamente in Wasser aufgelöst: Bosentan, Sitaxentan, PD 123319, BQ 123. Valsartan, BQ 610 und 788 sind nicht wasserlöslich und wurden mit DMSO aufgelöst um sie für die Versuche zu verwenden. Die Dosierung erfolgte anhand von Dosierungsempfehlungen aus der Zellkulturforschung. Sitaxentan wurde 12/2010 aufgrund von Hepatotoxizitäten vom Markt genommen, daher erfolgten die weiteren Versuchsreihen mit Bosentan.

2.1.3. Hormone/Neurotransmitter

- humanes Angiotensin II	Sigma-Aldrich
- Acetylcholin	Merck
- Phenylephrin	Sigma-Aldrich
- humanes Endothelin	Sigma-Aldrich

2.1.4. Kontroll-Immunglobulin

Humanes IgG wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und nach Herstellerangaben angesetzt. Das eingesetzte IgG enthielt die IgG-Subklassen in folgenden Anteilen: IgG₁ 66 %, IgG₂ 23 %, IgG₃ 7 % und IgG₄ 4 %. Die Versuche wurden mit verschiedenen IgG-Konzentrationen vorgenommen.

2.1.5. AT₁-/ ET_A- agonistische Immunglobuline

Für die IgG-Isolation wurden Serumproben von vier Patienten verwendet. Die Patienten wurden im klinischen Bereich der Rheumatologie und Immunologie, Charité Mitte, sowie in der Abteilung Nephrologie und internistische Intensivmedizin der medizinischen Fakultät Charité –

Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, akquiriert. Alle verwendeten Patientenseren wurden positiv auf AT₁-R- und ET_A-R-Auto-AK getestet (Konzentration 20–25 Units). Für die Verwendung von Blutbestandteilen für Forschungszwecke lag von allen Patienten eine Zustimmung vor.

Die Bestimmung der Titer erfolgte durch die CellTrend GmbH (Biotechnologiepark 14943 Luckenwalde) mittels *Sandwich*-ELISA. Der ELISA-Test ist nach den Richtlinien der *Food and drug administration* (FDA: „*Guidance for industry: Bioanalytical method validation*“) ein validiertes Verfahren. CellTrend überprüfte die Spezifität der AT₁-R- und ET_A-R-Auto-AK-Bindung durch spezifische Rezeptor-blockierende Versuchsreihen. Hierbei konnte nach Rezeptorblockade eine dosisabhängige Abnahme der AK-Bindung nachgewiesen werden.

Im Einzelnen wurden agonistische AK von zwei Patienten mit systemischer Sklerose und renaler Beteiligung (SRC-IgG) untersucht. Die Patienten erfüllten die Kriterien eines akuten Nierenversagens mit Hypertonus sowie einer hämolytischen Anämie und vorbestehender SSc. Weiterhin wurde für die Versuchsreihen isoliertes IgG von einem Patienten mit Nierentransplantat-Abstoßung (NTx-IgG) sowie von einem weiteren Patienten mit SSc und PAH (PAH-IgG) eingesetzt.

2.1.6. Puffer und Lösungen

<u>Puffer/Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	NaCl 119 mmol/l, KCl 4,7 mmol/l, KH ₂ PO ₄ 1,2 mmol/l, NaHCO ₃ 25 mmol/l, MgSO ₄ 1,2 mmol/l, Glukose1 1,1 mmol/l, EDTA 0,026 mmol/l, CaCl ₂ 2 mmol/l
Kalium reiche, Phosphat gepufferte Salzlösung (KPSS, im Text als KCl aufgeführt)	NaCl 63,7 mmol/l, KCl 60 mmol/l, KH ₂ PO ₄ 1,2 mmol/l, NaHCO ₃ 25 mmol/l, MgSO ₄ 1,2 mmol/l, Glukose1 1,1 mmol/l, EDTA 0,026 mmol/l, CaCl ₂ 2 mmol/l
Bindungspuffer	Na ₂ HPO ₄ , 0,02 M, pH=7

Elutionspuffer	Glycin-HCl, 0,01 M, pH=2,7
Neutralisationspuffer	Tris-HCl, 1 M, pH=9
Dialysepuffer	siehe Kapitel 2.2.1
10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	0,89 M Tris-Base, 0,89 M Borsäure, 25 mM Natrium-EDTA

2.1.7. Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Lewis-Ratten mit einem Gewicht von 200–300 g (Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland) verwendet. Das Durchschnittsalter betrug 10 Wochen. Die Tiere wurden unter standardisierten Tierstallbedingungen in klimatisierten Räumen mit automatischer Luftwechsel- und Lichtenanlage gehalten. Es lag ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 h vor. Die Versuchstiere erhielten pelletiertes Standardfutter (Altromin) und Wasser *ad libitum*. Alle Experimente stimmten mit den geltenden Tierschutzbestimmungen überein. Eine Genehmigung durch die zuständige Landesbehörde lag vor (Projekt G 0306/06, LaGeSo, Berlin).

2.1.8. Geräte und Hilfsmittel

- Analysewaage	Sartorius
- Computer	Medion
- Powerlab	DMT
- Kleingefäß Myograph Model 610 M	DMT
- Vakuum Gas Pumpe	VWR
- Gefrierschränke - 80 °C	Heraeus, Forma
- Gefrierschränke - 20 °C	Liebherr, Bosch
- Glasbehälter (Kolben etc.)	Brand
- Kühlschränke	Bosch, Liebherr
- Magnetrührer	IKA-Werk
- Mikroskop SMZ 645	Nikon

- Mikroskophalter C-PS, C-FMA	Nikon
- pH-Messgeräte	Beckman
- pH-Messelektrode MI-410	Microelectrodes
- Pipetten	Eppendorf
- Rotator	Rettenberg
- Schüttler	New Brunswick
- Vortex	Roth
- Wasserbäder	Haake, Julabo
- Zentrifugen	FHeraeus, Sorvall, VWR
- Elektrophoresekammer	Owl Separation Systems
- Thermocycler PTC 200	GeneTool
- Real Time PCR	Applied Biosystems
- Heizblock	WiseTherm
- Spektrophotometer	Thermo Scientific

2.1.9. Verbrauchsmaterialien

- Skalpellklingen No. 19	Bayha
- Nahtmaterial	Firma Johnson
- Pipettenspitzen	Eppendorf AG
- Präparationsbesteck	FST
- Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt
- Reaktionsgefäße 1,0 ml, 2,0 ml	Sarstedt
- Reaktionsgefäße 20 ml, 50 ml	Falcon, Greiner
- Schläuche	VWR

- | | |
|-------------------------------------|------------------|
| - Spritzen und Kanülen (Sterican) | Braun |
| - Latex Untersuchungshandschuhe | Terang Nusa |
| - Parafilm | Pechiney Plastic |
| - Edelstahl Draht 40 µm Durchmesser | ADInstruments |
| - Petrischalen | Sterilin |

2.1.10. Software

- | | |
|-------------------------------|------------------------|
| - MS Office 2003 Professional | Microsoft Corp. |
| - MS Office 2007 Professional | Microsoft Copr. |
| - MS Explorer 7.0 | Microsoft Corp. |
| - Chart 5 | ADInstruments |
| -GraphPad Prism 5.02 | GraphPad Software Inc. |

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung humaner Immunglobuline

Die Isolierung der G-Fraktion humaner IgG erfolgt mit der *protein g sepharose 4 fast flow* Säule (GE Health care), nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Das bakterielle Protein G hat eine hohe Affinität zum Fc-Teil der IgG-Isotypen IgG1, 2a, 2b und 3. Mit abnehmenden pH-Werten sinkt die Bindungsaffinität des Fc-Teils zu Protein G, dadurch können gebundene AK bei niedrigem pH eluiert werden.

Benötigte Reagenzien:

Bindungspuffer: 0,02 mol/l Na₂HPO₄, pH = 7,0

Elutionspuffer: 0,01 mol/l Glycin-HCl, pH = 2,7

Neutralisationspuffer: 1 mol/l Tris-HCl, pH = 9,0

Dialysepuffer (10fach):

Lösung 1: 8,9 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O in 500 ml H₂O lösen

Lösung 2: 3,45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 250 ml H_2O

Lösung 3: Lösung 2 in Lösung 1 geben bis der pH = 7,2 erreicht ist

Lösung: 45 g NaCl in 500 ml Lösung 3 lösen (pH = 6,46), anschließend Verdünnung mit H_2O 1:10 und damit pH-Wert Einstellung auf 7,4

Ablauf der Probenvorbereitung für 20 ml Endvolumen (10 ml Patientenserum und 10 ml Bindungspuffer):

- Das Serum wurde für 20 min bei 3000 rpm zentrifugiert, um feste Rückstände aus den Proben zu entfernen.
- Anschließend wurde das Serum durch einen Mikrofilter (Porengröße: 0,45 μm) gegeben.
- Es folgte eine 1:1 Verdünnung des Serums mit Bindungspuffer, da die Bindungskapazität der Säule bei 25 mg/ml lag.

Säulenvorbereitung und IgG-Isolation:

- Die 5 ml Sepharose-Säule wurde mit 25 ml Bindungspuffer bei einer Flussrate von 20 ml/min äquilibriert.
- Das verdünnte Serum wurde über die Säule gegeben. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen.
- Die Säule wurde mit 25 ml Bindungspuffer durchgespült, um die ungebundenen Bestandteile auszuwaschen.
- Die Säule wurde anschließend mit vier 5 ml Fraktionen Elutionspuffer eluiert, die erste und die vierte Fraktion wurde aufgrund der geringen IgG-Konzentration verworfen.
- Die zweite und dritte Fraktion wurden zusammengefasst mit 100 μl Neutralisationspuffer pro Milliliter Fraktion versetzt und anschließend über 24–48 h bei 4° C dialysiert.
- In dieser Zeit erfolgten 4–5 Mal ein Wechsel des Dialysats und PH-Messungen.

Lagerung und Reinigung der Säule

- Nach dem Elutionsschritt wurde die Säule mit 25 ml Bindungspuffer reäquilibriert.
- Die Lagerung der Säule erfolgte in 20 ml 70% Ethanol bei 48° C.

Jeweils 200 μl des Patientenserums wurden in reiner Form sowie in verdünnter Form vor und nach der Dialyse im Zentrallabor auf den Gesamt-IgG-Gehalt und bei Celltrend auf die $\text{AT}_1\text{-R-}$ und $\text{ET}_\text{A}\text{-R-}$ Bindung überprüft. Die Gesamt-IgG-Konzentrationen sind in Tab. 2.1 zusammengestellt.

Erkrankung	Gesamt-IgG
PAH	7,98 mg/ml
Nierentransplantat-Abstoßung	5,74 mg/ml
Systemische Sklerose renale Krise (1)	5,62 mg/ml
Systemische Sklerose renale Krise (2)	4,47 mg/ml

Tab. 2.1: Konzentration des isolierten IgG in mg/ml aus den verwendeten Patientenseren

Zum Zeitpunkt der Erstellung der Dissertation konnten leider keine zusätzlichen Seren von weiteren Patienten mit SRC isoliert und verwendet werden, da diese Komplikation zwar eine klinisch sehr schwere jedoch seltene Manifestation darstellt. In unserer Patientenkohorte wurden keine weiteren Patienten mit AT₁-R und ET_A-R agonistischer Positivität detektiert.

2.2.2. RNA-Isolation mit Qiazol®

Die Gewebeproben der Nieren wurden manuell mit einem Mörser zerkleinert, in 2 ml Röhrchen überführt und mit 1 ml Qiazollösung versetzt. Proben der Interlobararterien wurden nach Zugabe der Qiazollösung mit einem Homogenisator homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation nach Anleitung des Herstellers (Qiazol Handbook 2006). Die Reinheit und die Quantität der isolierten RNA wurde durch Absorptionsmessung (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) bei den Wellenlängen $\lambda=260$ nm (Nukleinsäure-Absorption) und $\lambda=280$ nm (Protein-Absorption) photometrisch bestimmt. Aus dem Verhältnis der Werte bei 260 nm und 280 nm wurde der Reinheitskoeffizient gebildet. Er lieferte einen Hinweis auf mögliche Kontamination mit Proteinen und sollte im Bereich 1,7–2,0 liegen.

Zur Kontrolle der Qualität der RNA wurden 500 ng der Gesamt-RNA (RNA-Gel: 14 μ l = 500 ng, RNA 4,5 μ l, Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-H₂O 7,2 μ l, Ladepuffer 2,3 μ l) in einem einprozentigen Agarose-Gel mit Ethiumbromid (50 ng/ml) und TBE-Puffer für 55 min bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde bei -80° C gelagert.

2.2.3. Reverse Transkriptase-PCR

Die Reverse Transkription (RT) der RNA in *complementary-desoxyribonucleicacid* (cDNA) mittels reverser Transkriptase aus Retroviren erlaubt die Amplifikation von Zielgenen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Der PCR-Prozess besteht aus einer variablen Anzahl von Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten.

Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die DNA- bzw. RNA-Doppelstränge erhitzt, um sie zu trennen. Im zweiten Schritt erfolgt die Primerhybridisierung. Länge und Sequenz der Primer bestimmen die Temperatur, die im Thermocycler vorherrschen muss, damit sich die Primer an die DNA-Abschnitte anlagern. Im dritten Schritt findet die Elongation statt. Die DNA-Polymerase verlängert am angelagerten Primer den Einzelstrang und führt somit zur Bildung eines cDNA-Stranges. Die beiden Einzelstränge werden somit amplifiziert.

Folgende Lösungen wurde dem RNA-Ansatz zugesetzt:

25 mM MgCl ₂	4 µl
10x PCR Buffer II	2,5 µl
dGTP, dATP, dTTP, dCTP	je 2 µl
Rnase Inhibitor	1 µl
MuLV Reverse Transcriptase	1 µl
Random Hexamers/Oligod(T)	1 µl
500 ng RNA	7.5 µl
Gesamt:	25 µl

Der Reaktionsansätze für die Reverse Transkription wurde im PTC 200 Thermal Cycler mit folgendem Programm inkubiert:

- 25° C für 10 min
- 42° C für 45 min
- 9° C für 5 min

Die Konzentration der cDNA wurde für die anschließende PCR auf 10 ng/µl verdünnt.

2.2.4. PCR-Nachweis von ET_A-R und AT₁-R mit *real-time* quantitative PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der PCR beruht. Zusätzlich erlaubt sie mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen die Quantifizierung der gewonnenen DNA während der PCR-Zyklen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge

der PCR-Produkte zu. Die Quantifizierung wird in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da hier optimale Reaktionsbedingungen vorliegen.

Die qRT-PCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR von Applied Biosystems unter Verwendung des Power SYBR® Green PCR Master Mix von Applied Biosystems durchgeführt. Die qRT-PCR erfolgte in Reaktionsvolumina von 20 µl, die 2 µl cDNA und je 0,5 µmol/l Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-Primer (vorwärts 5'-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3', rückwärts 5'-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3'), je 0,5 µmol/l ICAM-1-Primer (vorwärts 5'-GGCTGGAGCTGTTTGAGAAC-3', rückwärts 5'-ACTGTGGGGTTCAACCTTCTG-3') und 10 µl Power SYBR® Green PCR-Master-Mix (Applied Biosystems) enthielten. Nach einer Initialisierung (2 min bei 50 °C) und Denaturierung (10 min bei 95 °C) folgten 40 Zyklen (15 Sek bei 95 °C und 1 min bei 60 °C). Nach jeder Serie von Proben wurden Denaturierungskurven angelegt, um die Spezifität der Reaktion nachzuprüfen. Die relative Menge der Kopien wurde nach der *cycle threshold method* (Applied Biosystems mit der 7500 System Software (Version 1.2.3; Applied Biosystems)) normalisiert zur endogenen Referenz (GAPDH) berechnet.

Gen	Primer	5'-3'-Primersequenzen
AT ₁ -R (Ratte)	sense	CGGAGTTCCGAGACTTTCTG
	antisense	CTCCCGAAGGGCCTTATTAC
AT ₂ -R (Ratte)	sense	CCTTCTTGGATGCTCTGACC
	antisense	TGGAGCCAAGTAATGGGAAC
ET _A -R (Ratte)	sense	CTGGCCCTTGAGACCTTAT
	antisense	CGCAGAGATTCAGGACAGTG

ET _B -R (Ratte)	sense	GCTAGCCATCACTGCGATCT
	antisense	TCAGAATCCTGCTGAGGTG

Tabelle 2.2: Genspezifische Primersequenzen

2.2.5. Nierenexplantation

Die Nierenexplantation aus den Versuchstieren erfolgte unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran (“Forene”, Abbott GmbH & Co., KG Wiesbaden). Nach einer medianen Laparatomie mit Durchtrennung der *linea alba* wurde der Darm nach lateral mobilisiert, um freie Sicht auf den Retroperitonealraum herzustellen. Der Ureter wurde ohne Naht durchtrennt. Die Nierenarterie und Nierenvene wurden in einem Abstand von ca. 3 mm vom Nierenhilus dargestellt und mit einer Naht legiert. Danach wurden die Gefäße distal der Naht durchtrennt und die Niere atraumatisch aus der Fettkapsel gelöst. Das Organ wurde zügig in eine auf 4° C gekühlte und mit medizinischem Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaste PBS-Lösung transferiert.

2.2.6. Gefäßpräparation

Für die myographischen Untersuchungen wurden renale Interlobararterien mit einem Durchmesser von 150–200 µM verwendet. Das Nierenpräparat wurde am Hilus paramedian in zwei Sagittalebene geschnitten, so dass Präparate mit ventralen, dorsalen Anteilen und ein Abschnitt mit medianen Anteilen der Niere vorlagen. Die Nierenpräparate mit den ventralen und dorsalen Anteilen wurden in eine Präparationspetrischale gegeben, die mit auf 4° C gekühlter und Carbogen-begaster PBS-Lösung befüllt war. Die anschließende Präparation erfolgte mikrochirurgisch unter dem Stereomikroskop. Dabei lag die Präparationsschale in einer mit Eis gefüllten Styroporbox. Zuerst wurden die Hilusgefäße dargestellt und von hier aus den segmentalen Aufzweigungen folgend die Interlobararterien präpariert. Unter atraumatischer Präparation wurden Gefäße mit einer Mindestlänge von 1,5–2 mm gewonnen und in eine weitere Präparationsschale transferiert. Das Gefäßsegment wurde falls nötig von Bindegewebe befreit und atraumatisch auf einen 40 µm breiten Draht mit einer Länge von ca. 2 cm aufgezogen. Bis zum Einspannen in den Myographen wurden die Gefäße in gekühlter und mit Carbogen begaster PBS-Lösung aufbewahrt.

2.2.7. Kleingefäß-Myographie

Für die *in vitro* Studien wurden Widerstandsgefäßen mit einem Innendurchmesser von mindestens 60 µM benutzt. Untersucht wurden vasokonstriktive und vasodilatative Reaktionen einzelner Gefäßabschnitte auf natürliche Liganden oder pharmakologische Agonisten bzw. Antagonisten. Die Änderung der Wandspannung in mN wurde mittels entsprechender Hardware digital umgewandelt und über spezielle Software in Echtzeit wiedergegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Experimente mit dem DMT 610M Multi-Chamber Myograph (Danish Myo Technology A/S Aarhus, Denmark) durchgeführt (siehe Abbildung 1). Die Methode wurde erstmals von Mulvany Halpern 1976 beschrieben [64].

Der DMT 610 verfügte über vier 8 ml fassende Edelstahlkammern, so dass bis zu vier Gefäße parallel getestet werden konnten. Die Kammern waren über eine Abdeckung verschlossen, um die Evaporation zu minimieren. Öffnungen in der Abdeckung erlaubten die Zugabe der zu untersuchenden Substanzen. Über ein Begasungssystem wurde die Zufuhr von Carbogen sichergestellt. Bei konstantem Sauerstoffpartialdruck lag in den Kammern ein physiologischer pH-Wert von 7,4 vor. Eine an den Myographen angeschlossene Vakuumpumpe ermöglichte das Absaugen der eingebrachten Flüssigkeiten. Für die Versuche wurden die Kammern mit jeweils 5 ml PBS gefüllt. Über eine integrierte Heizung mit Temperaturregler konnte der Myograph auf 37° C erwärmt und für den weiteren Versuchsablauf konstant auf diesem Niveau gehalten werden. Ein Temperaturmesser am Gerät lieferte kontinuierlich Temperaturangaben in 0,1° C Auflösung. Um temperaturbedingte Veränderungen am Kraftmesser und am Präparat zu vermeiden, wurden die einzubringenden Lösungen in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

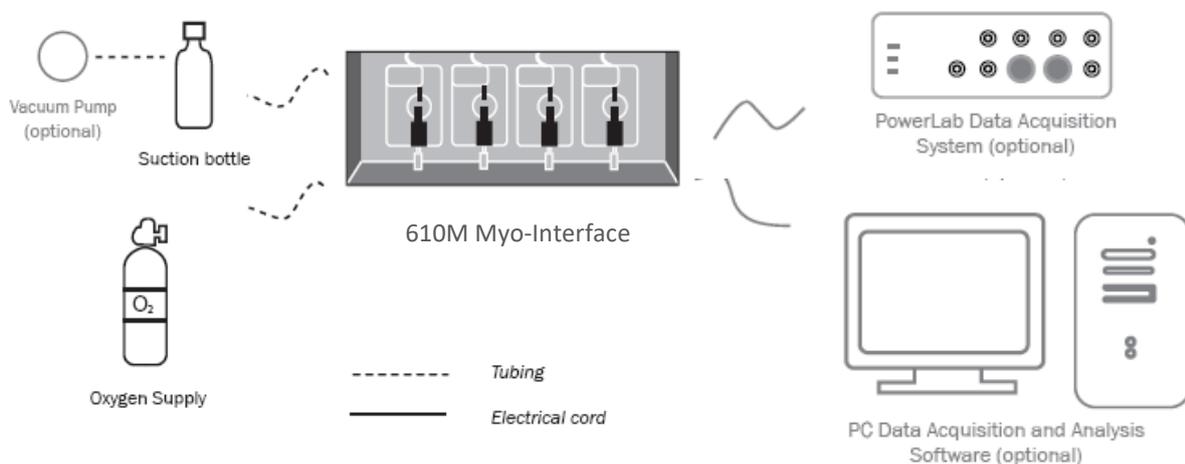


Abb. 1: Schema der Geräteanordnung, modifiziert nach DMT Brochures Wire Myograph Systems 610 M.

Bei der hier verwendeten Draht-Myographie wurden die Gefäßabschnitte unter Mikroskopsicht mit einem Draht in den mechanoelektrischen Signalwandler und mit einem zweiten Draht, der ebenfalls durch das Gefäß gezogen wurde, in den Befestigungsschrauben der Mikrometer-Aufhängung eingespannt (siehe Abbildung 2).

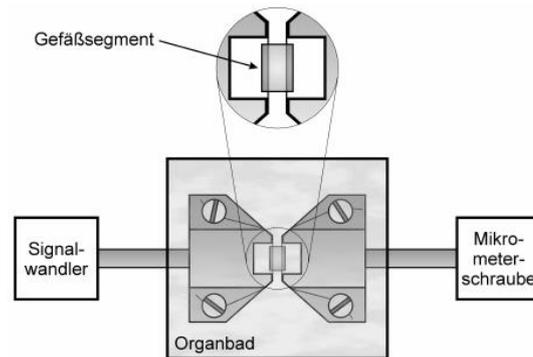


Abb. 2: Schema der Gefäßhalterung in der Myographie-Kammer, modifiziert nach DMT Multi Wire Myograph Systems User Manual Model 610M Version 2.2 [65].

Über die Mikrometerschraube wurde der Abstand zwischen den beiden Aufhängevorrichtungen in μm -Schritten fein justiert. Durch Normalisationsschritte wurden die anschließenden Messungen unter festgelegten isometrischen Bedingungen durchgeführt. Die Änderung der Wandspannung an den Gefäßen wurde vom Signalwandler registriert. Am Gerätdisplay wurde der Kraftgrad in mN angezeigt. Über die Verbindung mit der Powerlabhardware und der Chart Software erfolgte die Aufzeichnung der Änderung der Wandspannung in Abhängigkeit von der Messzeit. Der Messbereich lag für das DMT 601 zwischen -200 mN und 1600 mN, die Auflösung bei 0,01 mN.

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte in regelmäßigen Abständen nach dem Protokoll des Herstellers [64].

2.2.8. Physiologischer Hintergrund

Kleine Arterien und Arteriolen sind am Aufbau des totalen peripheren Widerstandes (TPR) im Blutgefäßsystem beteiligt. Der präkapilläre Druckverlust wird zu 47 % von kleinen, als Widerstandsgefäße bezeichneten Arterien erzeugt, deren Innendurchmesser zwischen 100 und 300 μm liegt. Jede Änderung des Arteriolen- und Arterienradius wirkt sich auf den TPR als Hochdruck

oder Blutdruckabfall aus. In diesen präkapillären Sphinkteren der Gefäßabschnitte wird die Blutverteilung des betreffenden Organs reguliert. Die Kapillaren steuern den Blutzufuhr zu den einzelnen Zellen des Organs und sind zu 47 % am Aufbau des TPR beteiligt [49]. Mit dem benutzten Kleingefäß-Myographen können proximale Widerstandsgefäße mit einem Innendurchmesser von 100–400 μm untersucht werden. Durch den Druck im Kreislaufsystem werden die Blutgefäße gedehnt. Der Dehnungszustand ist vom transmuralen Druck, der im Wesentlichen dem intravasalen Druck entspricht, und den elastischen Rückstellkräften der Membrana elastica der Arterien abhängig. Der transmurale Druck erzeugt im Blutgefäß eine Wandspannung, die von der Größe des transmuralen Drucks, der Wanddicke und des Innenradius abhängt (Laplace-Beziehung) [49].

Die Eigenschaften der untersuchten Gefäße sind je nach Organ und Spezies unterschiedlich. Zum Beispiel relaxieren renale Widerstandsgefäße unter Einwirkung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP), während mesenteriale und koronare Gefäße nicht reagieren. Die gewonnenen Aussagen sind daher nicht ohne weitere physiologische Untersuchungen auf andere Organe bzw. Spezies übertragbar [66].

2.2.9. Normalisierung

Ziel der Normalisierung ist es, das Gefäßpräparat auf einen normalisierten Innendurchmesser (*normalised internal circumference*, IC 1) zu dehnen. Der IC 1 ist definiert als ein bestimmter Bruch des Innendurchmessers. Erst der definierte Lumendurchmesser erlaubt es, zwischen Gefäßen vergleichende Messungen anzustellen. Die Sensitivität des Gefäßes gegenüber Agonisten ist vom Grad der Vorspannung abhängig. Die Amplitude der Kraftdehnung ist Folge der Interaktion von Myosin- und Aktinfilamenten und in allen Muskeln längenabhängig. Der Standardisierungsvorgang soll den optimalen Lumendurchmesser bei einem relaxierten Gefäß und dem Vorliegen eines transmuralen Drucks von 100 mmHg abbilden. Dieser Durchmesser wird als IC 100 bezeichnet. Für renale Interlobararterien ist der transmurale Zieldruck $100 \text{ mmHg} = 13,3 \text{ kPA}$ [64].

Praktisch erfolgte die Normalisierung durch schrittweises Ausdehnen des eingespannten Gefäßes. Dabei wurde die jeweilige Einstellung auf dem Mikrometer abgelesen und im Software-Programm eingegeben. Die Kraft, die auf den Drähten einwirkte, wurde vom Myographen erfasst. Diese Daten, die Mikrometerveränderung und die dabei entstehende Kraft, wurden in Gefäßdurchmesser (μm) und Wandspannung (mN/mm) konvertiert. Der interne Umfang des Gefäßes wurde durch den Abstand der Haltevorrichtung, die Breite des Drahtes und die Gefäßlänge ermittelt. Die

Gefäßlänge wurde mit einer Millimeterskalierung erfasst. Die Gefäßlänge wurde für die Wandspannungsberechnung verdoppelt, da die Länge von der oberen und unteren Gefäßwand gebildet wird.

Um den effektiven Druck (P) zu berechnen, wurde die Gleichung nach Laplace angewendet [49].

$$P = \frac{T}{\left\{\frac{IC}{2\pi}\right\}} \quad P = \text{effektiver Druck, } T = \text{Wandspannung, } IC = \text{innerer Gefäßumfang}$$

Die einzelnen, bei den Normalisierungsschritten ermittelten Werte ergeben grafisch gegenübergestellt (Wandspannung (Ordinate), Gefäßdurchmesser (Abszisse)) eine exponentielle Kurve. Durch Anlage einer isobaren 100 mmHg Kurve kann der IC 100 Punkt anhand des Laplace-Gesetzes am Schnittpunkt beider Kurven berechnet werden (Abb. 3). Ist dieser Punkt erreicht, wird die Gefäßdehnung beendet. Der normalisierte Innendurchmesser (IC 1) wird berechnet, indem der IC 100 mit einem speziesspezifischen Faktor multipliziert wird. Dadurch ergibt sich der Innendurchmesser, bei dem eine maximale Kontraktion erfolgen kann. Der Faktor liegt für Widerstandgefäße von Ratten bei 0,9 [65]. Die vorliegenden Experimente erfolgten alle an Gefäßen mit IC 1 Einstellung (Abb. 4).

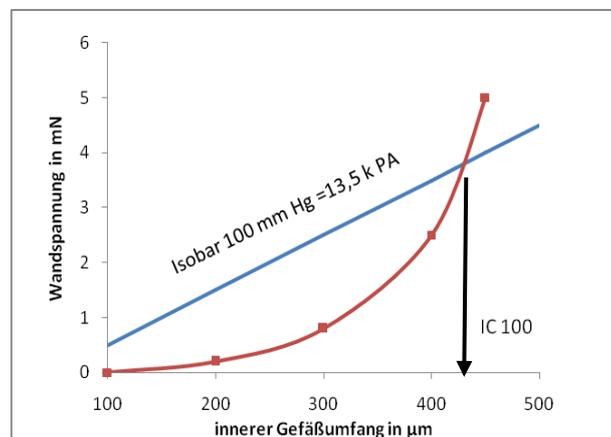


Abb. 3: Exponentialkurve mit IC 100 Berechnung, modifiziert nach DMT Multi Wire Myograph Systems User Manual Model 610M Version 2.2 [65].

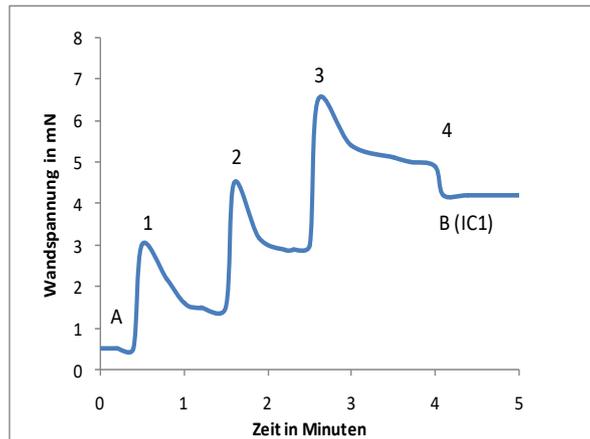


Abb. 4: Schema der Normalisierungsschritte.

Am Messpunkt A liegt die Ausgangsspannung vor. An den Punkten 1 bis 3 wird die Spannung am Gefäß durch Dehnung erhöht. Die Spitzen entstehen synchron beim manuellen Hochjustieren der Mikrometerschraube und fallen danach rasch auf ein Plateau mit höherer Wandspannung ab. Am Messpunkt 4 liegt ein transmuraler Druck oberhalb von 100 mmHg vor, sodass die Wandspannung gemäß der Berechnung auf den IC1 Wert verringert wird, der am Messpunkt B vorliegt. Modifiziert nach DMT Multi Wire Myograph Systems User Manual Model 610M Version 2.2 [65].

2.2.10. Funktionsprüfung

Durch Zugabe einer K^+ -reichen Lösung wird der Ionenkonzentrationsgradient an der Zelloberfläche verändert. K^+ liegt durch die Natrium-Kalium-Pumpe intrazellulär in höheren Konzentrationen vor (120–150 mmol/l). Steigt extrazellulär die K^+ -Konzentration, nimmt die Konzentrationsdifferenz zwischen dem extra- und intrazellulären Raum ab. Dadurch sinkt die Leitfähigkeit für K^+ , es diffundieren weniger K^+ aus der Zelle. Positiv geladene Valenzen bleiben in der Zelle, das Membranpotential nimmt ab, es kommt zur Membrandepolarisation. Dies hat zur Folge, dass sich Ca^{2+} -Kanäle öffnen, und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Über Bindung des Ca^{2+} an Calmodulin wird die Kontraktion der VSMC gefördert. Eine Kontraktion zeigt sich durch Zunahme der Wandspannung. Für die Versuche wurden nur Gefäße verwendet, deren Wandspannungszunahme nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung über 5 mN/mm lag.

Phenylephrin ist ein sympathomimetischer Agonist der α_1 -Adrenozeptoren. Der G-Protein gekoppelte α_1 -Adrenozeptor kommt in hoher Dichte in Blutgefäßen vor und vermittelt dort die

Vasokonstriktion. Die Wirkung von Phenylephrin mit der von Noradrenalin vergleichbar. Phenylephrin wurde aufgrund des Auslösens lang anhaltender Kontraktionen am Ende der Versuche als Reagibilitätskontrolle eingesetzt.

Die durch Acetylcholin (ACH) induzierte Gefäßdilatation wird über das Endothel vermittelt. ACH stimuliert die endotheliale NO-Freisetzung und führt so zu einer verstärkten Vasodilatation. Die Versuche mit ACH dienten vor Beginn der Versuchsreihen der Überprüfung einer möglichst atraumatischen Präparationstechnik (intaktes Endothel).

2.2.11. Myographie Versuchsablauf

1. Zwei Styroporboxen zum Präparieren und Kühlen der Lösungen bzw. Präparate wurden mit Eis gefüllt.
2. Ein 5,0 ml Falcon-Röhrchen wurde mit PBS gefüllt, 10 min mit Carbogen begast und im Eisbad gekühlt.
3. 500 ml PBS-Lösung wurde mit Carbogen begast und im Eisbad gekühlt.
4. Das Wasserbad wurde auf 37° C eingestellt, KCl (KPSS)-Lösung und PBS-Lösung wurden darin erwärmt.
5. Die Nierenentnahme erfolgte nach der oben beschriebenen Vorgehensweise.
6. Zwei Präparationsschalen wurden mit Carbogen versetzter PBS-Lösung gefüllt.
7. Die Niere wurde durch zwei paramediane Sagittalschnitte in drei Teile zerlegt.
8. Ein geeignetes Schnittpräparat wurde in der Präparationsschale mit Silikonbett fixiert.
9. Unter dem Mikroskop wurden mikrochirurgisch die Arteriae interlobaris dargestellt, frei präpariert und in die zweite Präparationsschale überführt.
10. Ein geeignetes Gefäßpräparat mit einer Länge von ca. 1–2 mm wurde in dieser Schale weiter dargestellt ggf. von Bindegewebe befreit und auf einen 2 cm langen und 40 µm breiten Draht aufgezogen.
11. Die Schritte 9–10 wurden solange wiederholt, bis vier Präparate vorhanden waren.
12. 20 min vor Abschluss der letzten Präparationsschritte wurden die Kammern des Myographen mit PBS-Lösung gefüllt, die Temperaturregelung auf 37 ° C eingestellt und mit der Carbogen-Begasung begonnen.
13. Lag die Kammertemperatur bei 37 °C wurde das Gefäßpräparat in die Haltevorrichtungen der ersten Kammer des Myographen eingespannt. Danach wurde der zweite Draht durch das Gefäß gezogen und an der gegenüberliegenden Haltevorrichtung festgeschraubt.

14. Die Zähne der Haltevorrichtung der Drähte wurden so eingestellt, dass sich die gegenüberliegenden Seiten nicht berührten und das Gefäß nicht unter Spannung stand. Dabei wurde das Mikrometer möglichst auf einen graden Ausgangswert eingestellt. Die Mikrometer-Einstellung und die Gefäßlänge wurden abgelesen und im Normalisierungsprogramm der Software eingegeben.
15. Bei den weiteren Kammern wurde, wie unter Punkt 13–14 beschrieben, vorgegangen.
16. Waren vier Gefäße eingespannt, wurde die Spannungsanzeige in den Kammern auf null gesetzt. Hiernach erfolgte eine Äquilibrationsphase von 15 min.
17. Die Normalisierungsschritte erfolgten durch Dehnung des Präparates über die Mikrometereinstellung. In jedem Schritt wurde das Präparat um 50–100 μM gedehnt. Das Programm konnte nach drei bis vier Eingaben die optimale Einstellung für den IC 1 berechnen und zeigte den einzustellenden Wert für die Mikrometerschraube an.
18. Waren die Gefäße auf den IC 1 Wert normalisiert erfolgte eine Äquilibrationsphase (15 min).
19. Die Kammern wurden mit Hilfe der Absaugvorrichtung von der PBS-Lösung geleert.
20. Zügig wurde pro Kammer 5 ml vorgewärmte 60 mmol/l KCl-Lösung eingebracht. Die Lösung bewirkte bei intakten Gefäßen eine Depolarisation mit Anstieg der Wandspannung.
21. Anhand der Chart-Software wurde der Ausgangswert der Wandspannung von der Kontraktion durch die KCl-Stimulation subtrahiert. Gefäße, mit nur geringer Reaktionsfähigkeit (Wandspannungsänderung unter 5mN) wurden nicht für weitere Versuche verwendet.
22. Es folgten drei Waschschrte mit auf 37 °C vorgewärmter PBS-Lösung.
23. Nach einer Äquilibrationsphase von 15 min, bei der die Gefäße die Ausgangswerte wieder erreichten oder unterschritten, waren die Gefäße für weitere Versuche bereit.

2.2.12. Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Wandspannungsänderung wurde vom Signalwandler in mN registriert und im Analyseprogramm gegen die Zeit grafisch dargestellt. Diese Rohdaten wurden in Wandspannungsänderung (mN) in Excel-Tabellen erfasst und gespeichert. Die Antwort der Gefäße auf 60 mmol/l KCl wurde als 100 % gesetzt. In Excel erfolgte dann die Umrechnung der Wandspannungsänderung in Prozent der KCl-Stimulation.

Alle Daten wurden als Gruppenmittelwerte (MW) +/- Standardfehler (SEM) dargestellt. Der Term „n“, stand für die Anzahl der untersuchten Interlobararterien-Segmente. Die statistische Auswertung und Darstellung erfolgte mit dem Analyseprogramm GraphPad Prism ® Version 5.02.

Die Ergebnisse stellen Gruppen von verbundenen und unverbundenen Stichproben mit unterschiedlicher Standardabweichung dar. Daher wurde für die statistische Auswertung der zweiseitige Student´s t-test verwendet. Messungen am gleichen Gefäßring wurden als verbundene Stichproben verglichen. Vergleiche zwischen Messergebnissen verschiedener Gefäßringe wurden mit dem t-test für unverbundene Stichproben getestet.

Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests bei $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. KCl-abhängige Maximalkontraktion renaler Interlobararterien

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Änderung der Wandspannung renaler Interlobararterien von Ratten bei ansteigenden KCl-Konzentrationen überprüft. Diese Versuche dienten dazu, die KCl-Dosis zu finden, bei der die Gefäße maximal kontrahieren. Für weitere Untersuchungen wurde diese Gefäßantwort mit den durch verschiedene Liganden ausgelösten Wandspannungsänderungen verglichen. Weiterhin belegte die Vasokonstriktion in Form einer objektivierbaren Wandspannungsänderung eine weitgehend intakte Media und damit die erfolgreiche Präparation mit Funktionserhalt der glatten Muskulatur.

Nach einem Anstieg der Wandspannung bei steigender KCl-Konzentration zwischen 30 und 60 mmol/l, ergab sich von 60–80 mmol/l KCl ein Plateau mit einer mittleren Wandspannung zwischen 15,6 und 16,6 mN/mm (Abb. 3.0).

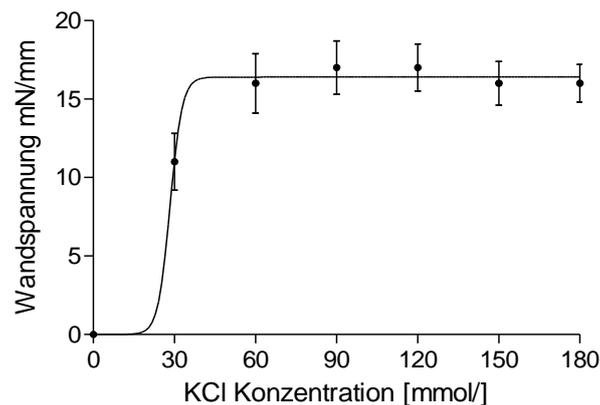


Abb. 3.0: KCl-Dosisabhängigkeit der Kontraktion renaler Interlobararterien im Kleingefäß-Myographen. Die Gefäße wurden mit KCl-Konzentrationen von 30, 60, 90, 120, 150, 180 mmol/l behandelt. Die Kontraktion wurde als Wandspannungsänderung in mN/mm gemessen. Ergebnisse als MW \pm SEM, n = 8, p < 0,05 vs. nicht KCL stimulierter Interlobararterien.

3.2. Überprüfung der Intaktheit des Arterienendothels

Nachdem über die K⁺-vermittelte Depolarisation mit Anstieg der Wandspannung ein Nachweis für die Funktion der VSMC in den Interlobararterien erbracht werden konnte, wurde die Funktion des Arterienendothels überprüft. ACH ist als parasymphathischer Transmitter an der Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen NO-Synthese im Endothel beteiligt und führt hierüber zu einer

Vasodilatation. Der sympathische Gegenspieler Phenylephrin bindet an endotheliale α_1 -Rezeptoren und führt zur Vasokonstriktion. Für die weiteren Versuchsreihen war es wichtig, dass nach der Präparation mit Aufzug der Gefäße auf die Fixierungsdrähte und nach der Normalisation im Myographen das Gefäßendothel noch reagibel war.

3.2.1. Wirkung von Phenylephrin an Interlobararterien

Zur Überprüfung der Endothelfunktion und zur Bestimmung der maximalen Kontraktion auf adrenerge Rezeptorstimulation wurde die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zwischen Phenylephrin und der Wandspannung der Gefäße untersucht. Phenylephrin ist ein potenter Vasokonstriktor mit langanhaltender Wirkung. Im Experiment wurde daher nach Dosisgabe die Plateauphase abgewartet und hiernach die nächst höherer Dosis im logarithmischen Intervall appliziert. Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Wandspannung mit sigmoidalen Verlauf (Abb. 3.1).

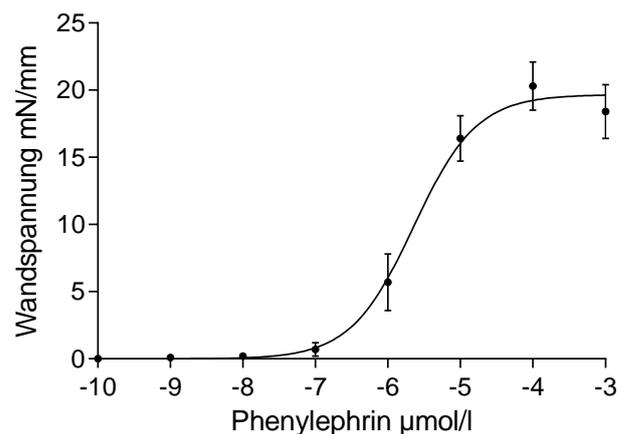


Abb. 3.1: Dosisabhängige Änderung der Wandspannung renaler Interlobararterien nach Zugabe von Phenylephrin, gemessen im Kleingefäß-Myographen. Die Gefäße wurden mit aufsteigenden Konzentrationen: 0,001 (n = 6), 0,01 (n = 6), 0,1 (n = 6), 1 (n = 14), 10 (n = 14), 100 (n = 15) bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ (n = 10) behandelt. Die Maximalkontraktion wurde als Wandspannungsänderung in mN/mm gemessen. Ergebnisse als MW \pm SEM, $p < 0,05$ vs. Kontrolle unbehandelter Gefäße.

3.2.2. Wirkung von Acetylcholin an Interlobararterien

Als weiterer Parameter für eine intakte Endothelfunktion wurde die ACH-vermittelte Relaxation überprüft. Hierzu wurden die renalen Interlobararterien mit Phenylephrin vorkontrahiert. Nach Erreichen des Kontraktionsplateaus unter 10 $\mu\text{mol/l}$ Phenylephrin wurde ACH in steigenden

Konzentrationen in die Myographiekammer gegeben. Es zeigte sich eine Abnahme der Wandspannung mit einer Dilatation von 31 % bei einer ACH-Gabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 3.2).

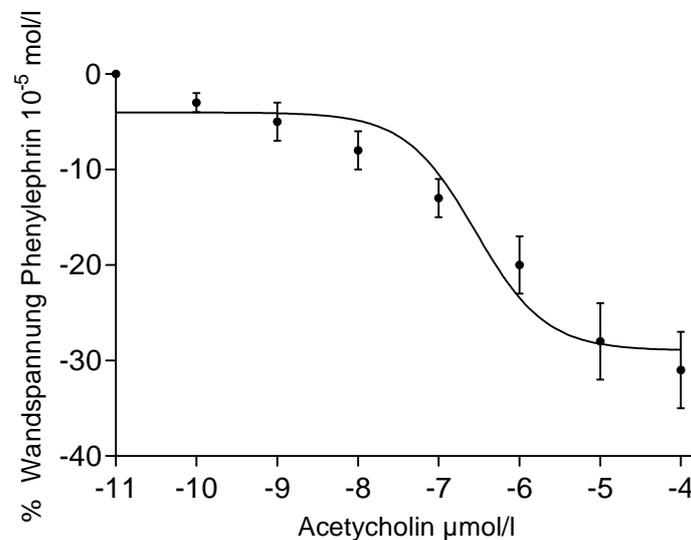


Abb. 3.2: Abnahme der Wandspannung von renalen Interlobulararterien bei Gabe von ACH nach Vorkontraktion mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Phenylephrin. ACH wurde in den Konzentrationen 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, und 100 $\mu\text{mol/l}$ zugegeben. Die Ergebnisse wurden im Kleingefäß-Myographen als Wandspannungsänderung erfasst und als MW \pm SEM in Prozent der Wandspannungsabnahme nach Kontraktion durch 10 $\mu\text{mol/l}$ Phenylephrin dargestellt. n = 12, p < 0,05 vs. Kontrolle mit unbehandelten Interlobulararterien.

3.3. Rezeptornachweis für die natürlichen Liganden Angiotensin und Endothelin

Um die Hypothese, dass AT₁-R- und ET_A-R-Auto-AK zu einer Gefäßkontraktion führen, näher zu untersuchen, wurde zunächst die mRNA-Expression der AT_{1/2}-R und ET_{A/B}-R in renalen Interlobulararterien und im Nierengewebe analysiert.

Es wurden insgesamt von drei Ratten Nierengewebe und einzelne Interlobulararterien entnommen, die mittels qRT-PCR analysiert wurden. Die Ergebnisse sind in relativen Maßeinheiten in den Abbildungen 3.3 dargestellt. In den Interlobulararterien waren die ET_A-R- und AT₁-R-mRNAs im Vergleich zu den ET_B-R und AT₂-R-mRNAs stärker vertreten. Im gesamten Nierengewebe war die AT₁-R-mRNA am stärksten exprimiert.

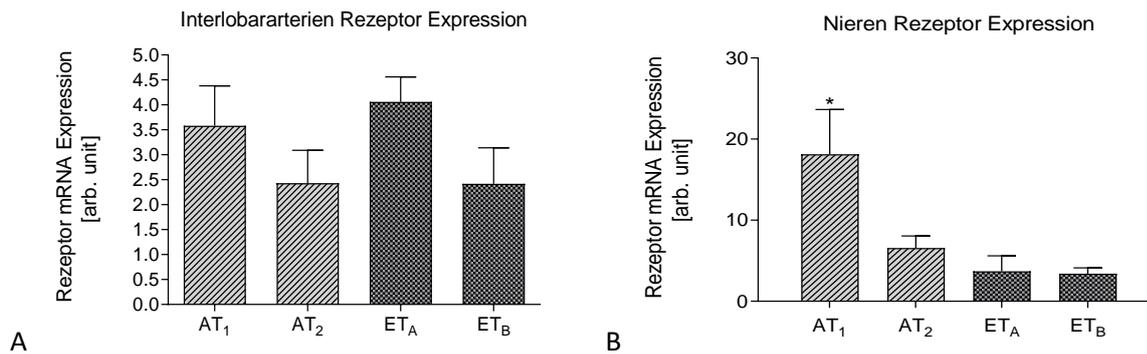


Abb. 3.3: mRNA-Rezeptorexpression in Interlobararterien (A) und in renalem Gewebe (B) mittels qRT-PCR. Die mRNA-Expression für AT₁-, AT₂-, ET_A- und ET_B-R ist in relativen Einheiten [arb. Unit] angegeben. Ergebnisse als MW ± SEM, n = 3, *p < 0,05 AT₁-R vs. AT₂-R.

3.4. Wirkung natürlicher Liganden an Interlobararterien

Die natürlichen Liganden Ang II und ET-1 vermitteln über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren am Gefäßendothel und den VSMC eine Vasokonstriktion. Nachdem gezeigt wurde, dass die entsprechenden Rezeptor-mRNAs in Gefäßen und Nierengewebe nachweisbar sind, wurde die Liganden-gesteuerte Funktion der Rezeptorproteine überprüft. Dadurch konnten Vergleichswerte für Folgeexperimente geschaffen werden.

3.4.1. Ang II vermittelte Vasokonstriktion an Interlobararterien

Vor dem Einsatz von agonistischen IgG wurde die durch den natürlichen Liganden Ang II vermittelte Kontraktion an renalen Interlobararterien überprüft. Im Myographen konnte eine sigmoidale Zunahme der Wandspannung bei logarithmisch steigender Ang II Konzentration verzeichnet werden. Vor der Zugabe der nächst höheren Dosis wurde jeweils die Plateauphase abgewartet. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ang II lieferte die Vergleichswerte für alle folgenden Versuche mit Ang II, vasoaktiven IgG oder AT_{1/2}-R-Antagonisten (Abb. 3.4).

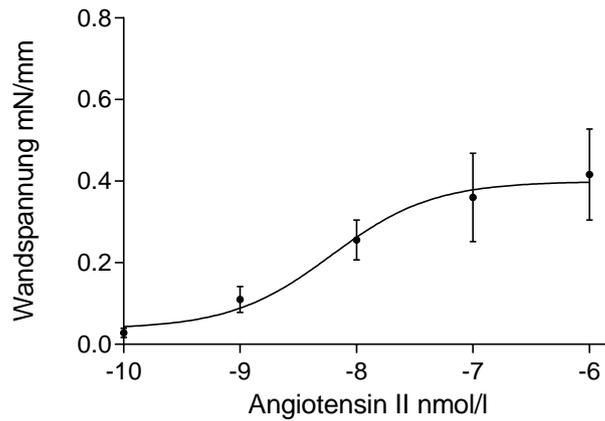


Abb. 3.4: Einfluss des natürlichen Liganden Ang II auf die Wandspannung [mN/mm] renaler Interlobararterien, gemessen im Kleingefäß-Myographen. Die Gefäße wurden mit 0,1 (n = 7), 1 (n = 7), 10 (n = 7), 100 (n = 6) und 1000 (n = 6) nmol/l Ang II behandelt. Ergebnisse als MW ± SEM, p < 0,05 vs. Kontrolle mit nicht stimulierten Interlobararterien.

3.4.2. ET-1 vermittelte Vasokonstriktion an Interlobararterien

Weiter wurde die Vasokonstriktion von Interlobararterien unter dem Einfluss des natürlichen Liganden ET-1 untersucht. Hierdurch konnten Vergleichswerte für spätere Untersuchungen mit agonistischen IgG ermittelt werden. Die Gefäßsegmente reagierten auf die Zugabe von logarithmisch steigenden ET-1-Konzentrationen mit einer sigmoidalen Spannungszunahme. ET-1 zeigte experimentell ein hohes vasokonstriktorisches Potential. Die Konzentrations-Wirkungskurve von ET-1 lieferte die Vergleichswerte für alle folgenden Versuche mit ET-1, vasoaktiven IgG oder ET_{A/B}-R Hemmern (Abb. 3.5).

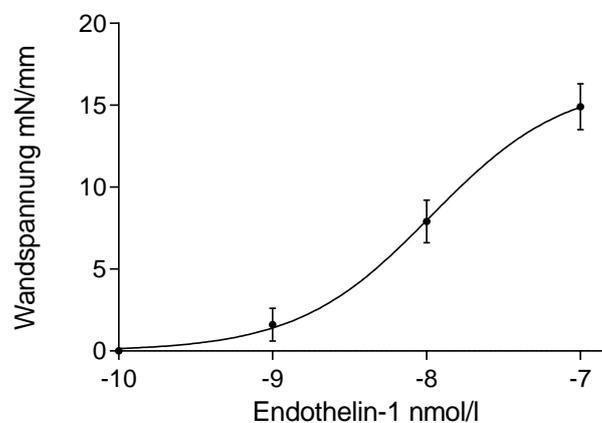


Abb. 3.5: Einfluss des natürlichen Liganden ET-1 auf die Wandspannung [nM/mm] renaler Interlobararterien gemessen im Kleingefäß-Myographen. Die Gefäße wurden mit 0,1, 1, 10 und 100 nmol/l ET-1 behandelt. Ergebnisse als MW \pm SEM, n = 11, p < 0,05 vs. Kontrolle mit nicht stimulierten Interlobararterien.

3.5. Ausschluss von Störfaktoren

Vor der Analyse der Auswirkungen von Auto-AK auf die Wandspannung von renalen Interlobararterien wurden im Vorfeld mögliche Störfaktoren ausgeschlossen. Im Einzelnen wurde untersucht, ob die Myographie-Bedingungen an den Interlobararterien zu einer ungewollten Wandspannungsänderung führten. Weiterhin wurde die Wandspannung der Gefäße nach Zusatz von nicht agonistisch wirkenden IgG (Kon-IgG) untersucht. Zuletzt erfolgten Versuche, um mögliche Gefäßreaktionen auf die eingesetzte Dialysepufferlösung der agonistischen IgG zu detektieren.

3.5.1. Wandspannungsänderungen renaler Interlobararterien im PBS-Bad

Zum Ausschluss von Reaktionen auf die Versuchsbedingungen wurden Interlobararterien entsprechend dem Versuchsprotokoll im Carbogen-begasteten PBS-Bad im Myographen eingespannt und ohne Zusatz weiterer Substanzen 2 h beobachtet. Die Wandspannung wurde in acht unabhängigen Experimenten alle 10 Minuten über zwei Stunden gemessen. Sie lag im Mittelwert bei 0,54 % der KCl-vermittelten Kontraktion. Es kam zu einer geringen, nicht signifikanten Zunahme über die Zeit (Abb. 3.6). Die mittlere Kontraktion von 0,54 % im PBS-Bad wurde für die weiteren Vergleiche und Analysen als Baseline gewählt.

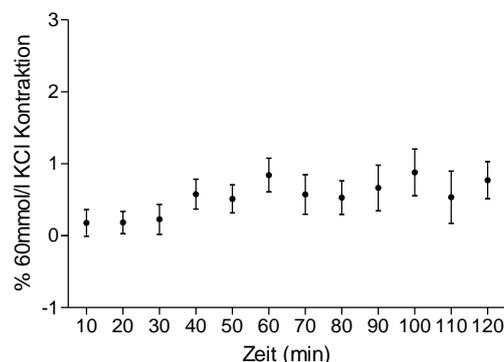


Abb. 3.6: Änderung der Wandspannung von renalen Interlobararterien im Kleingefäß-Myographen. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe

von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM; n = 8, Versuchsdauer 2 h; p = 0,19 (10 min vs. 120 min).

3.5.2. Auswirkung von Kontroll-Immunglobulinen auf Interlobararterien

In diesem Versuch wurde der Einfluss von humanen IgG gesunder Personen (Kon-IgG) auf Interlobararterien untersucht. Die Untersuchung diente der Etablierung von Kontrollwerten für die in den folgenden Versuchen eingesetzten aktivierenden IgG. Zudem sollte ein möglicher Effekt von Kon-IgG in Form von Wandspannungsänderungen an den Gefäßen im Vorfeld ausgeschlossen werden. Kon-IgG wurde in verschiedenen Konzentrationen in die Myographie-Kammern gegeben. Die Wandspannungsänderung wurde über 2 h aufgezeichnet. Der Mittelwert der prozentualen Wandspannungsänderung in den einzelnen Gruppen lag zwischen 0,5 und 0,7 %. Eine Änderung der Wandspannung über die Zeit konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3.7.).

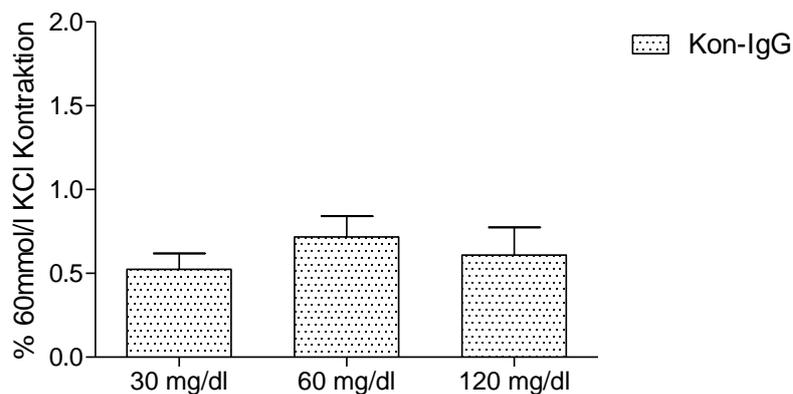


Abb. 3.7: Einfluss von humanen Kontroll-Immunglobulinen (Kon-IgG) auf renale Interlobararterien. Die Wandspannung wurde über 2 h mittels Kleingefäß-Myographen erfasst. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM, 30 mg/dl Kon-IgG, n = 5, 60 mg/dl Kon-IgG, n = 5, 120 mg/dl Kon-IgG, n = 7.

3.5.3. Auswirkung des Dialysepuffers auf Interlobararterien

Die Dialysepufferlösung diente als Trägersubstanz für die aus den Patientenserum isolierten agonistischen IgG. Da in den weiteren Versuchen die IgG in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben wurden, sollten mögliche Wandspannungsänderung durch den eingesetzten Dialysepuffer analysiert werden. Es wurden verschiedene Verdünnungen des Dialysepuffers

analysiert. Die Versuchsdauer betrug 2 h. Der Mittelwert der Wandspannung lag zwischen 0,6 und 0,8 % (Abb. 3.8.).

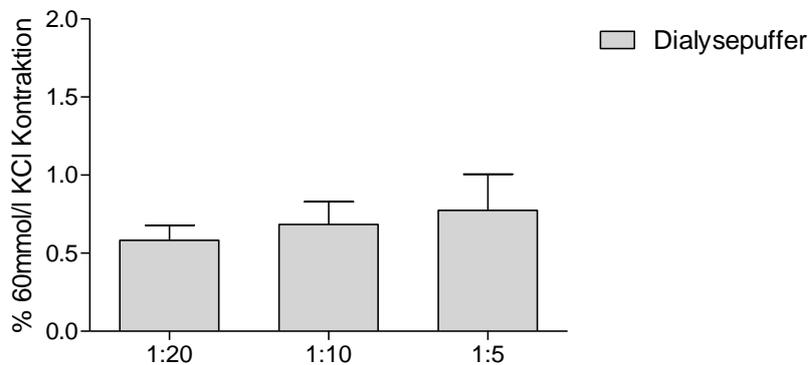


Abb. 3.8: Einfluss des Dialysepuffers auf renale Interlobararterien. Der Dialysepuffer wurde im Verhältnis 1:20 (0,25 ml, n = 5), 1:10 (0,5 ml, n = 4) und 1:5 (1 ml, n = 4) zum Gesamtvolumen (5 ml) der Myographie-Kammer zugegeben. Die Wandspannung wurde über 2 h mittels Kleingefäß-Myographen erfasst. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM.

3.5.4. Übersicht der Kontrollversuche an Interlobararterien

Die durchgeführten Kontrollversuche sind in Abb. 3.9 in einer Übersicht dargestellt. Die mittlere Wandspannungsänderung der Interlobararterien lag in allen Ansätzen unter 1 %. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen PBS und Dialysepuffer oder PBS und Kon-IgG feststellbar.

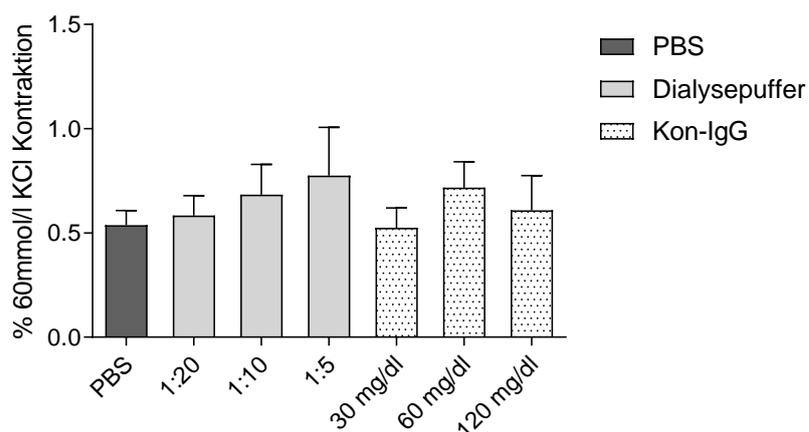


Abb. 3.9: Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien unter Zusatz von Dialysepuffer oder Kon-IgG. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von

60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM. PBS-Bad (n = 8), Dialysepufferlösung in aufsteigender Konzentration (n_{insgesamt} = 13), humanes Kon-IgG in aufsteigender Konzentration (n_{insgesamt} = 17), p > 0,05 für PBS vs. Dialysepuffer und PBS vs. Kon-IgG.

3.6. Reaktionen renaler Interlobararterien auf AT₁-R / ET_A-R agonistische Immunglobuline

In den folgenden Experimenten wurden renale Interlobararterien im Kleingefäß Myographen mit agonistischen IgG inkubiert. Die IgG wurden in aufsteigender Konzentration eingesetzt, um mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu detektieren. Die Wandspannungsänderungen an den Gefäßen wurden über 2 h aufgezeichnet. Mit den Versuchen sollte die Arbeitshypothese überprüft werden, dass eine autoimmune Rezeptorstimulation eine Wandspannungsänderung am renalen Gefäßbett hervorruft.

3.6.1. Agonistische IgG bei SSc mit PAH

In den Versuchen wurden isolierte IgG aus dem Serum von einem Patienten mit SSc mit Lungenbeteiligung und PAH (PAH-IgG) in aufsteigenden Konzentrationen untersucht. Es konnte nur ein geringer Anstieg mit steigender IgG-Konzentration festgestellt werden. Die Wandspannungsänderung in den Versuchsansätzen mit PAH-IgG (160 mg/dl) und mit Kon-IgG war signifikant verschieden (Abb. 3.10). Kon-IgG in einer Dosis von 60 mg/dl zeigte im Kontrollexperiment (s. Abb. 3.7) den höchsten Mittelwert und wurde daher als Kontrolle für die weiteren Versuch mit agonistischen Ig ausgewählt.

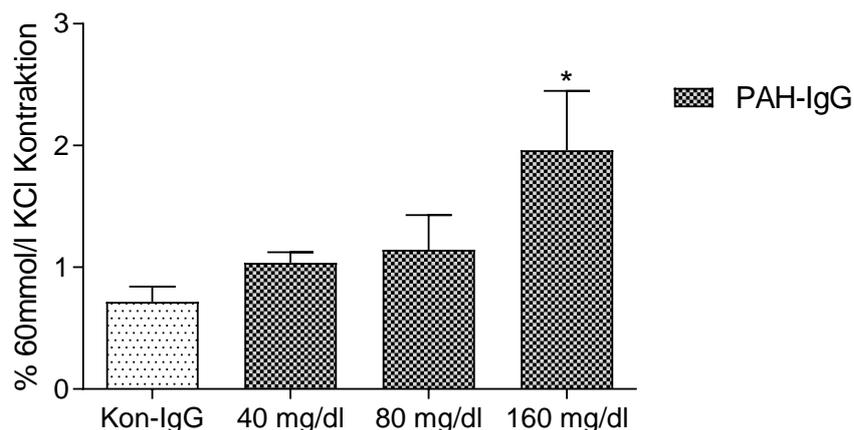


Abb. 3.10: Wandspannungsänderung von renalen Interlobararterien nach Zugabe von IgG eines Patienten mit SSc und PAH (PAH-IgG). Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM. Kon-IgG: 60

mg/dl, n = 5, PAH-IgG: 40 mg/dl, n = 8, 80 mg/dl, n = 2 und 160 mg/dl, n = 1. Kon-IgG vs. PAH-IgG 160 mg/dl *p = 0,04.

3.6.2. Agonistische IgG bei Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation

Im folgenden Versuch wurden agonistische IgG aus dem Serum eines Patienten mit Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation (NTx-IgG) untersucht. NTx-IgG wurde im Kleingefäß-Myographen in ansteigenden Konzentrationen eingesetzt. NTx-IgG führten an den Interlobararterien zu einer konzentrationsabhängigen Wandspannungszunahme zwischen 3 – 5,4 %. Gegenüber den Vergleichsansatz mit Kon-IgG bestand ein signifikanter Unterschied (Abb. 3.11).

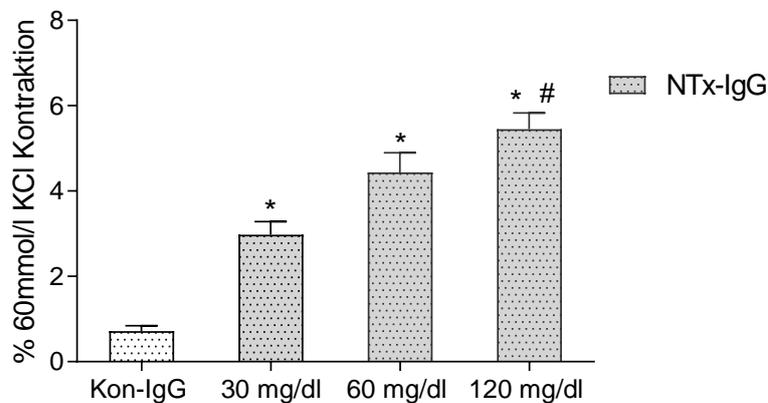


Abb. 3.11: Wandspannungsänderung von renalen Interlobararterien nach Zugabe von IgG eines Patienten mit Nierentransplantat-Abstoßung (NTx-IgG). Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. Kon-IgG: 60 mg/dl, n = 5, NTx-IgG: 30 mg/dl, n = 4, 60 mg/dl, n = 7 und 120 mg/dl, n = 4. Kon-IgG vs. NTx-IgG 30 mg/dl *p < 0,05. Kon-IgG vs. NTx-IgG 60 mg/dl *p < 0,05. Kon-IgG vs. NTx-IgG 120 mg/dl *p = 0,0001. NTx-IgG 120 mg/dl vs. NTx-IgG 30 mg/dl #p = 0,0002.

3.6.3. Agonistische IgG bei SSc mit renaler Krise

Weiter wurde der Effekt von IgG von Patienten mit SSc und renaler Krise (SRC-IgG) auf renale Interlobararterien im Kleingefäß-Myographen untersucht. Die konzentrationsabhängige Wandspannungszunahme lag zwischen 4,1 % (30 mg/dl) und 6,5 % (120 mg/dl). Gegenüber den Vergleichsansätzen mit Kon-IgG bestand ein signifikanter Unterschied (Abb. 3.12).

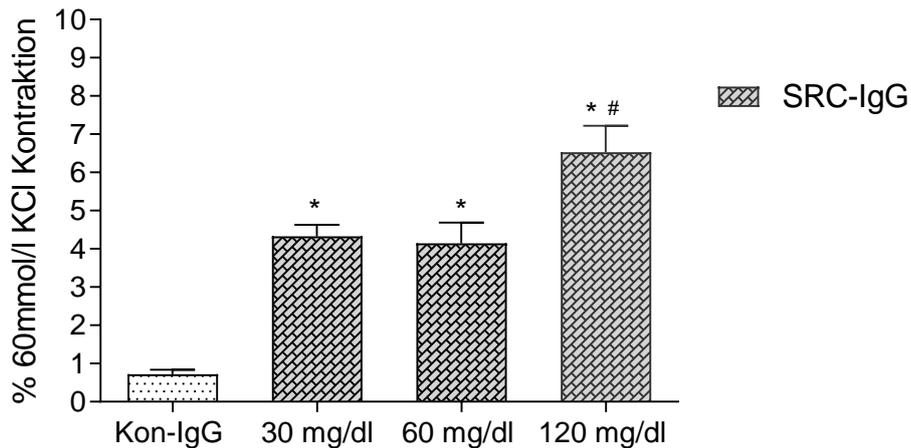


Abb. 3.12 Wandspannungsänderungen von renalen Interlobararterien nach Zugabe von IgG von Patienten mit SSc und renaler Krise (SRC-IgG). Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM. SRC-IgG: 30 mg/dl (n = 7), 60 mg/dl (n = 12) und 120 mg/dl (n = 10); Kon-IgG: 60 mg/dl, n = 5. SRC-IgG in allen Dosierungen vs. Kon-IgG *p = 0,0001. SRC-IgG 120 mg/dl vs. SRC-IgG 30 mg/dl sowie 60 mg/dl #p = 0,01.

3.7. Kontrollexperimente mit selektiven und nicht-selektiven Rezeptorblockern

Bevor Rezeptor-antagonistische Pharmaka in den Versuchen mit den autoreaktiven IgG verwendet werden konnten, wurden Kontrolluntersuchungen zum Ausschluss möglicher Gefäßreaktionen vorgenommen. Die Rezeptorantagonisten wurden in festgelegter Konzentration zu der PBS-Lösung in die Myographiekammer gegeben. Die Wandspannungsänderungen an den Interlobararterien wurden über 2 h aufgezeichnet. Durch diese Versuche sollten kontraktile oder dilatative Antworten der Interlobararterien durch die eingesetzten Wirkstoffe aufgedeckt werden.

3.7.1. Angiotensin-Rezeptorantagonisten

Der AT₁-R-Blocker Valsartan und der AT₂-R-Antagonist PD 123319 wurde den Gefäßen in einer Konzentration von 10 μ mol/l zugesetzt. Als Kontrolle wurden Versuchsansätze ohne Wirkstoffe (PBS-Bad) durchgeführt Die Wirkstoffe veränderten die Wandspannung der Interlobararterien nicht (Abb. 3.13).

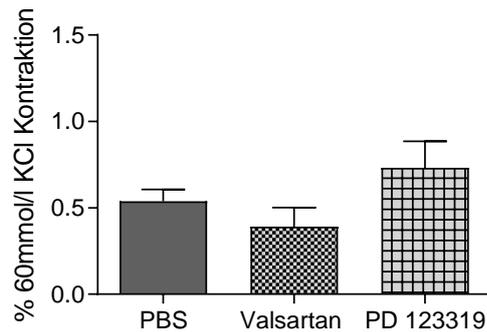


Abb. 3.13: Wandspannungsänderung von renalen Interlobararterien nach Zugabe von Valsartan (AT₁-R-Antagonist) oder PD 123319 (AT₂-R-Antagonist). Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. PBS, n = 8; Valsartan 10 µmol/l, n = 4; PD 123319 10 µmol/l, n = 4; AT_{1/2}-R-Antagonisten vs. PBS p > 0,05.

3.7.2. Endothelin-Rezeptorantagonisten

Im folgenden Experiment wurde der Effekt von ET_{A/B}-R-Antagonisten auf renale Interlobararterien überprüft. Es wurden die ET_A-R-Antagonisten Sitaxentan, BQ 123, BQ 610, der ET_{A/B}-R-Antagonist Bosentan und der ET_B-R-Antagonist BQ 788 untersucht. Die Wirkstoffe wurden in einer Konzentration von 10 µmol/l in die Myographiekammer gegeben. Als Kontrolle wurden Versuchsansätze ohne Wirkstoffe (PBS-Bad) durchgeführt. Die Wirkstoffe veränderten die Wandspannung der Interlobararterien nicht (Abb. 3.14).

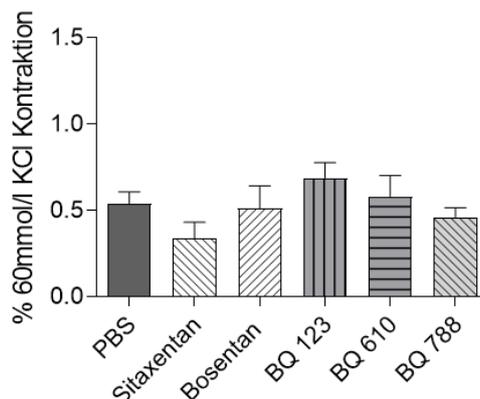


Abb. 3.14: Wandspannungsänderung von renalen Interlobararterien nach Zugabe von ET_{A/B}-R-Antagonisten. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe

von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM. Alle Antagonisten wurden in einer Konzentration von 10 μ mol/l zugegeben. PBS n = 8. Sitaxentan (ET_A-R-Antagonisten) n = 4, Bosentan (ET_{A/B}-R-Antagonisten) n = 4, BQ 123 (ET_A-R-Antagonisten) n = 4, BQ 610 (ET_A-R-Antagonisten) n = 4 und BQ 788 (ET_B-R-Antagonisten) n = 4. PBS vs. ET_{A/B}-R-Blocker p > 0,05.

3.8. Antagonisierung der Endothelin- und Angiotensin-vermittelten Vasokonstriktion

Im Weiteren wurde die pharmakologische Wirksamkeit der Rezeptorantagonisten bei Einsatz der natürlichen Liganden des Angiotensin- und Endothelin-Systems an renalen Interlobararterien untersucht. Diese Versuche dienten dem Nachweis der generellen Wirksamkeit der Antagonisten und der Aufdeckung eventueller Unterschiede bei der Hemmung der Gefäßkontraktion. Die Ergebnisse wurden als Vergleichswerte für die Untersuchungen zur Hemmung der durch vasoaktive IgG vermittelten Vasokonstriktion verwendet.

3.8.1. Antagonisierung der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion

In den Versuchen wurde die Hemmung der Ang II induzierten Wandspannungsänderung durch AT_{1/2}-R-Antagonisten analysiert. Jeweils 10 μ mol/l des AT₁-R-Antagonist Valsartan oder des AT₂-R-Antagonisten PD 123319 wurden 30 min vor der Ang II Stimulation in die Myographiekammer gegeben. Danach wurde Ang II in logarithmisch aufsteigender Konzentration zugesetzt. Als Kontrollen dienten Ang II Ansätze ohne Rezeptorantagonisten. Es zeigt sich eine Hemmung der Gefäßantwort auf Ang II mit Signifikanz zwischen der Dosiskurve von Ang II und der Valsartan Gruppe (Abb. 3.15).

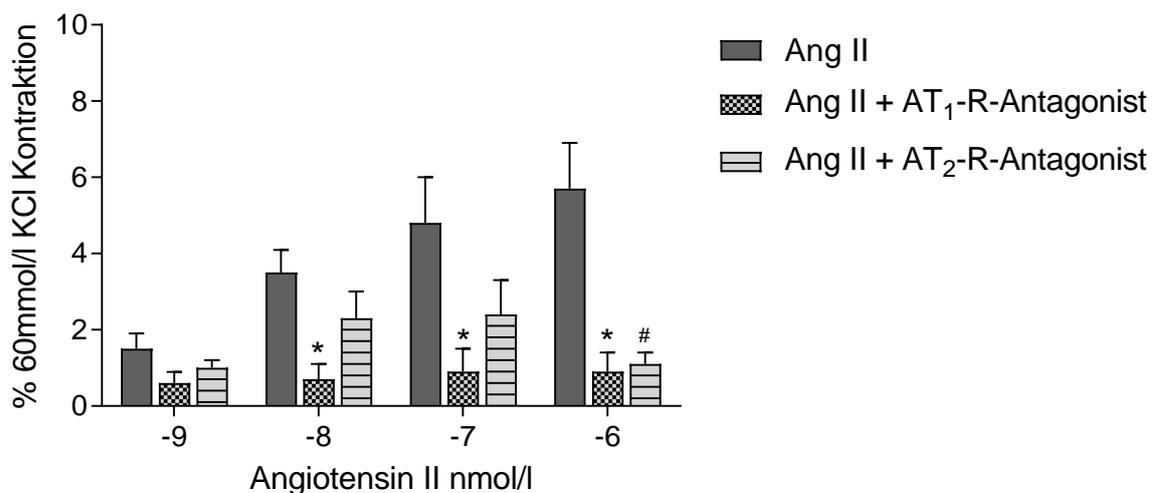


Abb. 3.15: Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien unter Ang II Stimulation mit und ohne Zugabe von AT_{1/2}-R-Antagonisten. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. Kontrolle: Ang II in 1, 10, 100 und 1000 nmol/l Dosierung ohne AT_{1/2}-R-Antagonisten, n = 7. Ang II und 10 µmol/l Valsartan (AT₁-R-Antagonisten) n = 4, unter Zugabe von Ang II in 1, 10, 100 und 1000 nmol/l Dosisschritten. Ang II und 10 µmol/l PD 123319 (AT₂-R-Antagonisten) n = 3, unter Zugabe von Ang II in 1, 10, 100 und 1000 nmol/l Dosisschritten. Ang II vs. Valsartan und Ang II *p < 0,05. Ang II 1000 nmol/l vs. PD 12319 mit Ang II 1000 nmol #p < 0,05.

3.8.2. Antagonisierung der Endothelin-vermittelten Vasokonstriktion

In den Experimenten wurde die pharmakologische Blockade der ET-1 vermittelten Wandspannungsänderung mittels ET_{A/B}-R-Antagonisten untersucht. Je 10 µmol/l der ET_A-R-Antagonisten Sitaxentan und BQ 610 sowie des ET_B-R-Antagonisten BQ 788 wurden 30 min vor der ET-1 Zugabe in die Myographiekammer gegeben. Das ET-1 wurde in logarithmisch aufsteigender Konzentration zugesetzt. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne ET_{A/B}-R-Antagonisten. Sitaxentan und BQ 610 blockierten die ET-1 vermittelte Kontraktion in allen Dosierungen nahezu vollständig (p < 0,05). Auch die Hemmung mit dem ET_B-R-Blocker BQ 788 war signifikant (p = 0,04) (Abb. 3.16).

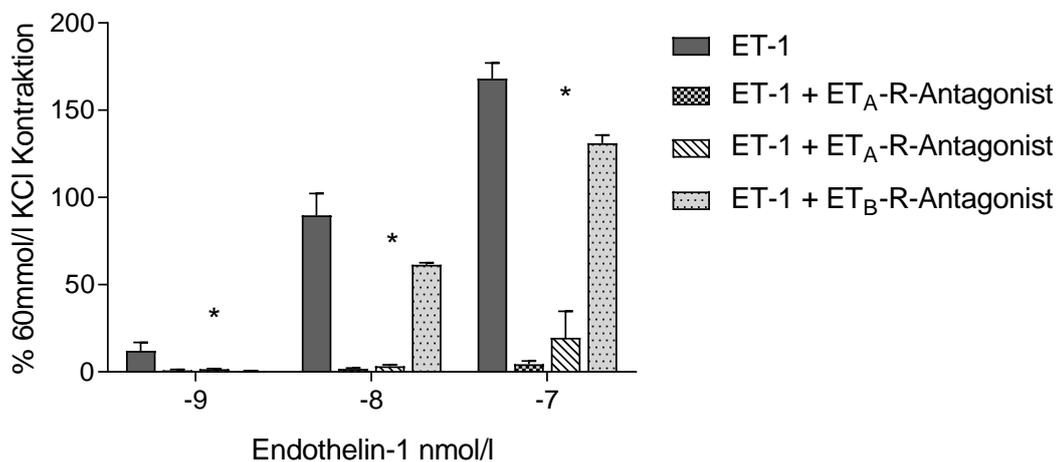


Abb. 3.16: Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien unter ET-1-Stimulation mit und ohne Zugabe von ET_{A/B}-R-Antagonisten. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. Kontrolle: ET-1 in 1, 10, 100 nmol/l Konzentrationsschritten ohne ET_{A/B}-R-Antagonisten, n= 11. ET-1 und 10

$\mu\text{mol/l}$ Sitaxentan ($\text{ET}_A\text{-R-Antagonist}$) $n = 4$, unter Zugabe von 1, 10 und 100 nmol/l ET-1 Dosisschritten. ET-1 und 10 $\mu\text{mol/l}$ BQ 610 ($\text{ET}_A\text{-R-Antagonist}$) $n = 4$, unter Zugabe von 1, 10 und 100 nmol/l ET-1 Dosisschritten. ET-1 und 10 $\mu\text{mol/l}$ BQ 788 ($\text{ET}_B\text{-R-Antagonist}$) $n = 3$, unter Zugabe von 1,0, 10 und 100 nmol/l ET-1. ET-1 vs. Sitaxentan $*p < 0,05$, ET-1 vs. BQ 610 $*p < 0,05$, ET-1 vs. BQ 788 $*p < 0,05$ in allen Dosierungsschritten.

3.9. Potenzierende Effekte von agonistischen IgG und natürlichen Agonisten

Wie zuvor dargestellt bewirkten IgG mit positiven $\text{AT}_1\text{-R-}/\text{ET}_A\text{-R-Auto-AK-Titern}$ eine Zunahme der Wandspannung an Interlobararterien. Da natürlicherweise Liganden wie ET-1 und Ang II im Gefäßsystem zirkulieren, wurde in den folgenden Versuchen untersucht, ob sich vasoaktives IgG und natürliche Agonisten in ihrer kontraktile Wirksamkeit gegenseitig beeinflussen.

3.9.1. Wirkung von vasoaktiven IgG auf die Ang II vermittelte Vasokonstriktionen

Um mögliche potenzierende Effekte zwischen Ang II und SRC-IgG bzw. NTx-IgG aufzuzeigen, wurden Interlobararterien mit vasoaktiven IgG versetzt und anschließend mit Ang II in aufsteigender Konzentration stimuliert. Hierbei konnten geringe Unterschiede aufgezeigt werden. Bei der niedrigsten Konzentrationen von Ang II (1 nmol/l) mit SRC-IgG war die Wandspannung signifikant gegenüber Ang II erhöht. SRC-IgG zeigte im Vergleich zur Kon-IgG-Gruppe in den Ansätzen mit 100 und 1000 nmol/l Ang II eine signifikant höhere Wandspannung (Abb. 3.17).

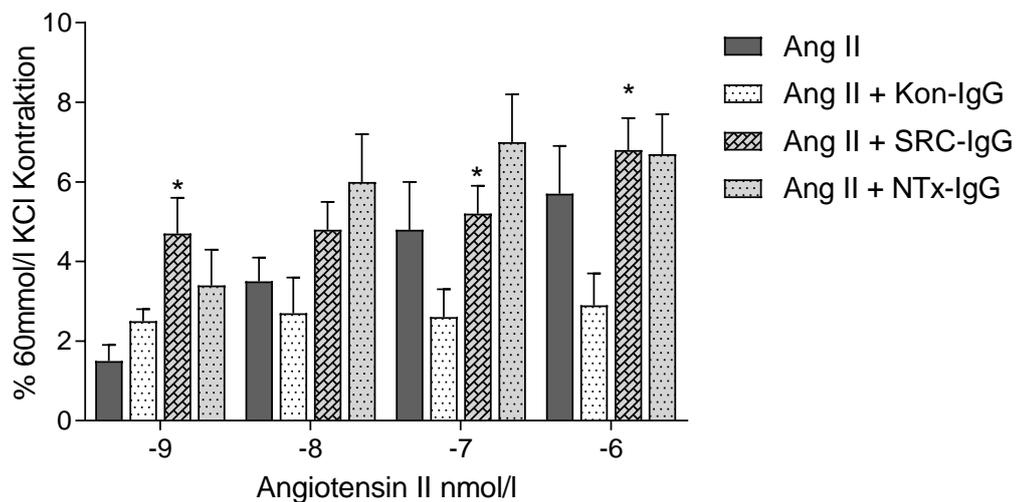


Abb. 3.17: Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien unter Ang II mit und ohne Zugabe von IgG. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60

mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM. IgG jeweils 60 mg/dl (SRC-IgG, n = 13, NTx-IgG, n = 4, Kon-IgG, n = 4); Ang II: 1, 10, 100 und 1000 nmol/l. Kontrolle (Ang II ohne IgG), n = 7. SRC-IgG und Ang II 1 nmol/l vs. Ang II 1 nmol/l, *p < 0,05. SRC-IgG und Ang II 100 nmol/l sowie 1000 nmol/l vs. Kon-IgG und Ang II 100 nmol/l sowie 1000 nmol/l, * p<0,05.

Die folgende Übersicht stellt den Unterschied zwischen der Wandspannungsänderung bei Zugabe der vasoaktiven IgG mit und ohne zusätzliche Ang II Stimulation dar. Bei den Ansätzen mit SRC-IgG konnte eine signifikante Zunahme der Wandspannung (2 %) nach Zugabe von 1000 nmol/l Ang II ermittelt werden (Abb. 3.18).

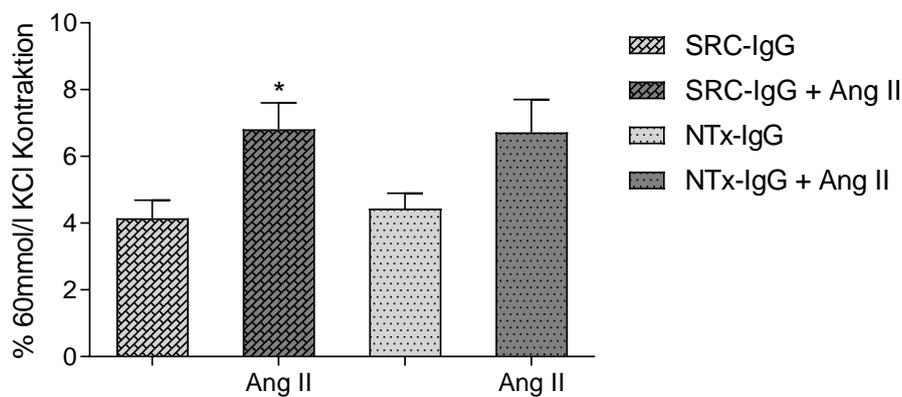


Abb. 3.18: Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien unter SRC-IgG bzw. NTx-IgG mit und ohne Ang II. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM. SRC-IgG 60 mg/dl ohne Ang II, n = 10. SRC-IgG 60 mg/dl und Ang II 1000 nmol/l, n = 13. NTx-IgG ohne Ang II, n = 7. NTx-IgG und Ang II 1000 nmol/l, n = 4. SRC IgG mit Ang II 1000 nmol vs. SRC IgG * p < 0,05.

3.9.2. Wirkung von vasoaktiven IgG auf die ET-1 vermittelte Vasokonstriktionen

In diesem Experiment wurde die Gefäßantwort auf SRC-IgG mit ET-1 in ansteigenden Konzentrationen ermittelt, um mögliche additive oder potenzierende Effekte zwischen vasoaktiven IgG und dem natürlichen Liganden ET aufzuzeigen. Als Kontrollen wurden Ansätze mit Kon-IgG und ET-1 bzw. ET-1 ohne weitere Zusätze vorgenommen. Zwischen der Wandspannungszunahme in den Ansätzen mit SRC-IgG und Kon-IgG konnte ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. ET-1 und SRC-IgG war gegenüber ET-1 ohne Zusätze nicht signifikant erhöht (Abb. 3.19).

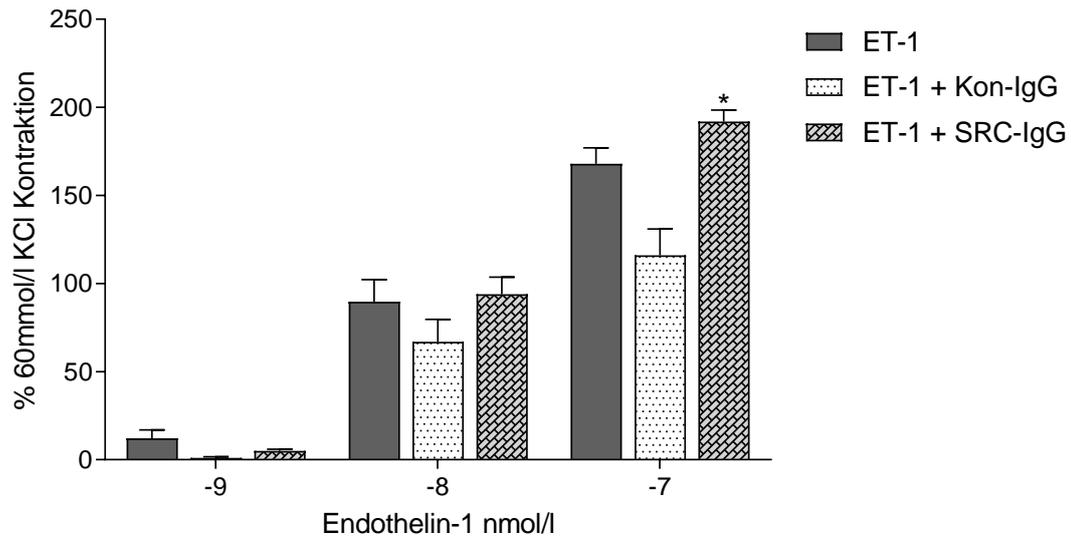


Abb. 3.19: Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien unter ET-1 mit und ohne Zugabe von IgG. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM. Kontrolle (ET-1 ohne IgG): n = 11; Kon-IgG 60 mg/dl, n = 6 unter Zusatz von ET-1 in 1,0, 10 und 100 nmol/l. SRC-IgG 60 mg/dl, n = 9 unter Zusatz von ET-1 in 1,0, 10 und 100 nmol/l Dosierungsschritten. ET-1 100 nmol/l mit SRC-IgG vs. ET-1 100 nmol/l mit Kon-IgG: * p < 0,05.

3.9.3. Untersuchung auf zeitabhängige Wirkungen von vasoaktiven IgG und ET-1

Um über einen Zeitverlauf mögliche additive Effekte zwischen dem natürlichen Agonisten ET-1 und SRC-IgG aufzuzeigen, wurde die Kontraktion an Interlobararterien nach Zugabe von 60 mg/dl SRC-IgG und ET-1 (10, 15, 20 oder 50 nmol/l) über 1 h aufgezeichnet. Als Kontrolle dienen Gefäße, die nur mit ET-1 behandelt wurden. Aus den sechs Einzelwerten zu den Zeitpunkten 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min wurde ein Mittelwert berechnet (Abb. 3.20). Zwischen den Ansätzen mit und ohne SRC-IgG konnte kein signifikanter Unterschied bei der Kontraktion der Interlobararterien festgestellt werden.

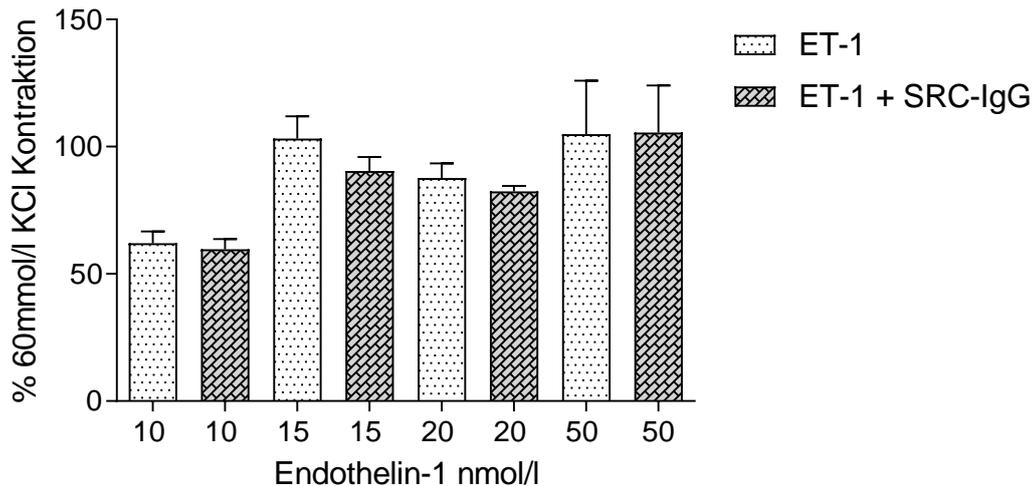


Abb. 3.20: Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien nach Zugabe von SRC-IgG mit und ohne ET-1. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM (Messwerte 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min). ET-1 10 nmol/l: n = 3; ET-1 15 nmol/l: n = 2; ET-1 20 nmol/l: n = 3; ET-s 50 nmol/l: n = 4. SRC-IgG: 60 mg/dl und ET-1: 10 nmol/l (n = 3), 15 nmol/l (n = 2), 20 nmol/l (n = 4), 50 nmol/l (n = 7). $p > 0,05$ zwischen allen verbundenen Gruppen.

3.10. Pharmakologische Antagonisierung der SRC-IgG-induzierten Vasokonstriktion

In diesem Abschnitt wurden Interlobararterien mit SRC-IgG bzw. Kon-IgG mit AT_1 -R- bzw. $ET_{A/B}$ -R-Blockern versetzt. Anschließend wurde die Kontraktion der Interlobararterien durch natürliche Agonisten in ansteigenden Konzentrationen aufgezeichnet. Durch diese Versuche konnte ermittelt werden, über welche Rezeptoren die Gefäßreaktion verursacht wird.

3.10.1. SRC-IgG-induzierte Wandspannungsänderung unter Ang II Stimulation und AT_1 -R-Antagonisierung

Zur Blockierung des AT_1 -R wurden Interlobararterien zunächst mit 10 μ mol/l Valsartan versetzt und nach 30 min mit SRC-IgG in einer Konzentration von 60 mg/dl inkubiert. Nach weiteren 30 min erfolgte eine Ang II Stimulation in logarithmischer Dosisreihe. Als Kontrolle dienten die bereits ermittelten Werte für SRC-IgG mit Ang II Zusatz (vgl. 3.9.1). In der Valsartan-Gruppe kam es zu einer deutlichen Abnahme der Ang II induzierten Gefäßkontraktionen. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Valsartan bei allen Ang II Konzentrationen (Abb. 3.21).

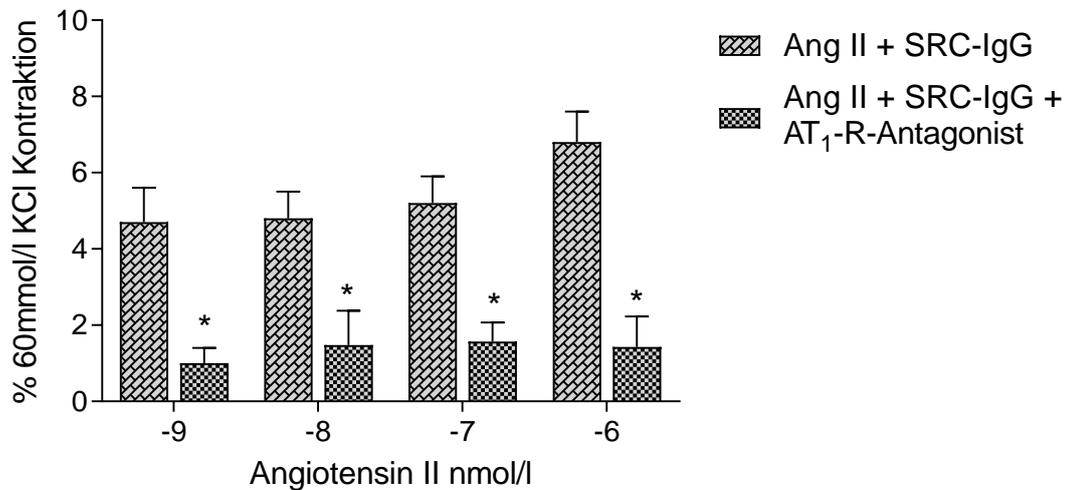


Abb. 3.21: Ang II induzierte Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien nach Inkubation mit SRC-IgG ± Valsartan (AT₁-R-Antagonist). Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. Ang II (1,0, 10, 100 und 1000 nmol/l) und SRC-IgG 60 mg/dl, n = 13; Ang II (1,0, 10, 100 und 1000 nmol/l) mit SRC-IgG 60 mg/dl und 10 µmol/l Valsartan, n = 4. Ang II und SRC-IgG vs. Ang II und SRC-IgG mit AT₁-R-Antagonist * p < 0,05 in allen Ang II Dosierungsschritten.

3.10.2. SRC-IgG-induzierte Wandspannungsänderung unter ET-1 Stimulation und ET_{A/B}-R-Antagonisierung

Die Interlobararterien wurden in den Myographiekammern mit jeweils 10 µmol/l Bosentan, Sitaxentan oder BQ 610 versetzt. 30 min später erfolgte die Zugabe von 60 mg/dl SRC-IgG und nach weiteren 30 min ET-1 in logarithmischer Dosisreihe. In den Ansätzen mit Bosentan und Sitaxentan kam es zu einer kompletten Aufhebung der ET-1-vermittelten Kontraktion. Bei dem selektiven ET_A-Blocker BQ 610 lag die unter 100 nmol/l ET-1 vermittelte Kontraktion bei 54 %. Als Kontrolle dienten SRC-IgG Ansätze ohne ET_{A/B}-R-Antagonisten (vgl. Abschnitt 3.9.2), (Abb. 3.22).

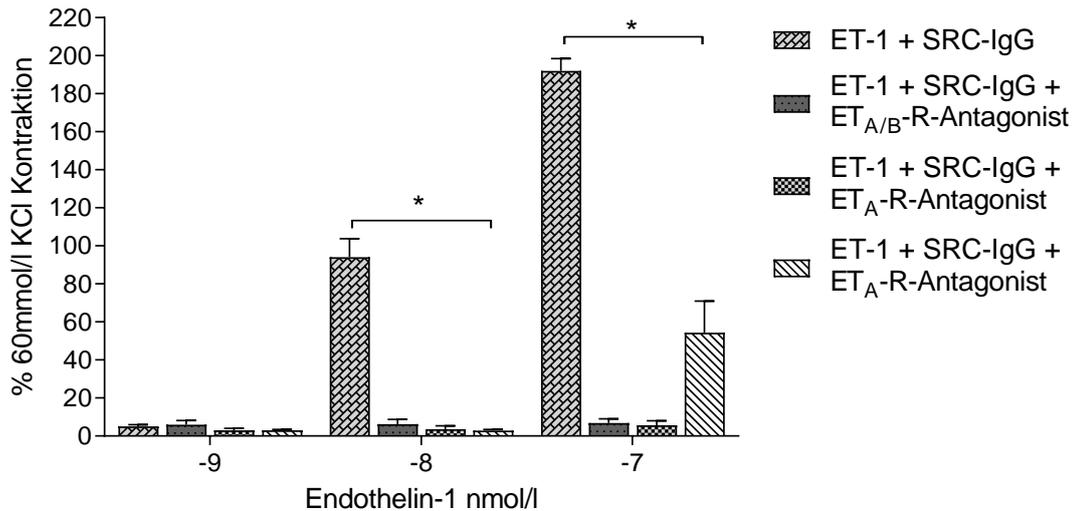


Abb. 3.22: ET-1 induzierte Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien nach Inkubation mit SRC-IgG ± ET_{A/B}-R-Antagonisten. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. ET-1 (1, 10, 100 nmol/l) mit SRC-IgG 60 mg/dl, n = 9; ET-1 (1, 10, 100 nmol/l) mit SRC-IgG + 10 µmol/l Bosentan (ET_{A/B}-R-Antagonist), n = 4. ET-1 (1, 10, 100 nmol/l) mit SRC-IgG + 10 µmol/l Sitaxentan (ET_A-R-Antagonist), n = 4. ET-1 (1, 10, 100 nmol/l) mit SRC-IgG + 10 µmol/l BQ 610 (ET_A-R-Antagonist), n = 4. ET-1 und SRC-IgG vs. ET-1 und SRC-IgG mit ET_{A/B}-R-Blocker *p < 0,05 für 10 und 100 nmol ET-1 Dosisstufen.

3.11. Reziproke Interaktion von agonistischen IgG mit AT_{1/2}- und ET_{A/B}-R

Zum Nachweis einer möglichen reziproken Rezeptorstimulation durch agonistische IgG wurden Kombinationen aus Rezeptorantagonisten und Liganden eingesetzt. Die Versuchsanordnung sollte dazu dienen, eine über AT₁- bzw. ET_A-R ausgelöste Vasokonstriktion durch vasoaktives IgG zu differenzieren. Die renalen Gefäße wurden mit ET_{A/B}-R-Antagonisten behandelt, danach mit SRC-IgG versetzt und anschließend mit Ang II stimuliert. Analog wurde bei der ET_{A/B}-R-Untersuchung nach einer AT_{1/2}-R-Hemmung und SRC-IgG-Zugabe mit ET-1 stimuliert.

3.11.1. Effekt von ET_A-R-Antagonisten und SRC-IgG/NTx-IgG auf die Ang II induzierte Vasokonstriktion

Die Experimente wurden wie in Kapitel 3.10 beschrieben durchgeführt. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Interlobararterien mit dem ET_{A/B}-R-Antagonisten Bosentan (10 µmol/l) wurde

vasoaktives IgG zugegeben. Nach weiteren 30 min wurden die Gefäße mit Ang II stimuliert. Alle mit Bosentan behandelten Ansätze zeigten gegenüber den Vergleichsansätzen ohne Bosentan eine verminderte Wandspannungszunahme. Weiterhin waren die Wandspannungsänderung in den Ansätzen mit Bosentan + SRC-IgG im Vergleich zu den ausschließlich mit SRC-IgG behandelten Ansätzen signifikant vermindert jedoch nicht so stark vermindert wie in der Kon-IgG und der alleinigen Bosentangruppe. In dieser Grafik sind die Ergebnisse von NTx-IgG ohne Bosentan unter 1000 $\mu\text{mol/l}$ Ang II Gabe (vergleiche Abb. 3.18) nicht dargestellt. Mit dort erzielten Mittelwerten zwischen 6,7 %. In diesem Experiment zeigt sich eine deutliche Abnahme der Ang II / NTx IgG Wirkung unter $\text{ET}_{\text{A/B}}$ -Rezeptor Hemmung auf 0,9–1,8 % (Abb. 3.23).

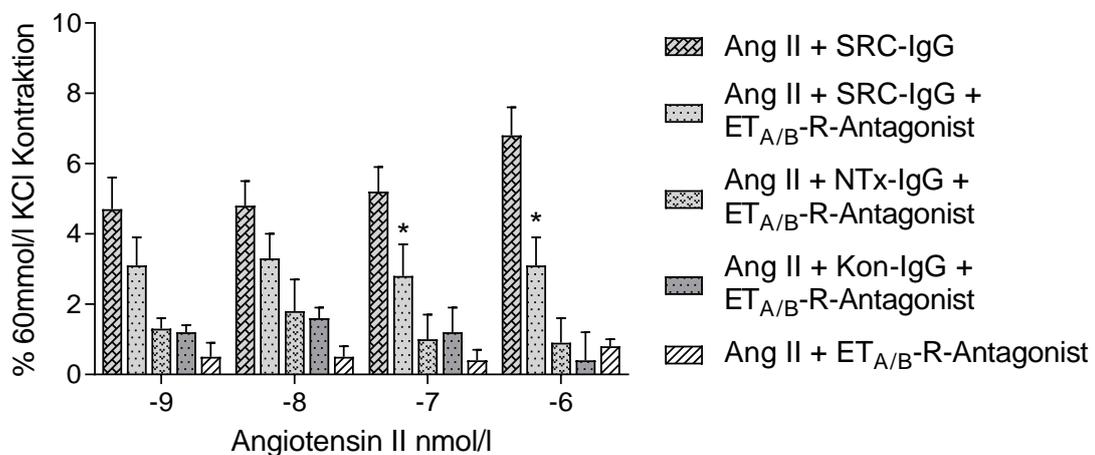


Abb. 3.23: Ang II induzierte Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien nach Inkubation mit SRC/NTx-IgG und Bosentan. SRC: 60 mg/dl, n = 13; NTx-IgG 60 mg/dl + 10 $\mu\text{mol/l}$ Bosentan: n = 4; SRC-IgG 60 mg/dl + 10 $\mu\text{mol/l}$ Bosentan: n = 8; Kon-IgG 60 mg/dl + 10 $\mu\text{mol/l}$ Bosentan: n = 4; Bosentan 10 $\mu\text{mol/l}$: n = 7, Ang II in 1,0, 10, 100 und 1000 nmol/l Dosierungsschritten. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW \pm SEM. Ang II 100 sowie 1000 nmol/l mit SRC-IgG und Bosentan vs. Ang II 100 sowie 1000 nmol und SRC-IgG *p < 0,05.

3.11.2. Effekt von AT_1 -R-Antagonisten und SRC-IgG auf die ET-1 induzierte Vasokonstriktion

Der Versuch wurde analog dem in Kapitel 3.11.1 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Abb. 3.24 zeigt eine Abnahme der Gefäßantwort in allen mit Valsartan behandelten Arterien. Hervorzuhebende Wandspannungsänderungen zeigten die Ansätze mit SRC-IgG und Valsartan

unter 10 sowie 100 nmol ET-1 Stimulation gegenüber den nicht AT₁-R antagonisierten Gefäßen mit SRC-IgG. Auffällig war hierbei eine stärkere Hemmung der Kontraktion in der SRC-IgG mit Valsartan Gruppe unter Zugabe von 10 nmol/l ET-1 gegenüber der Kon-IgG bzw. Valsartan Gruppe bei selbiger ET-1 Stimulation (Abb. 3.24).

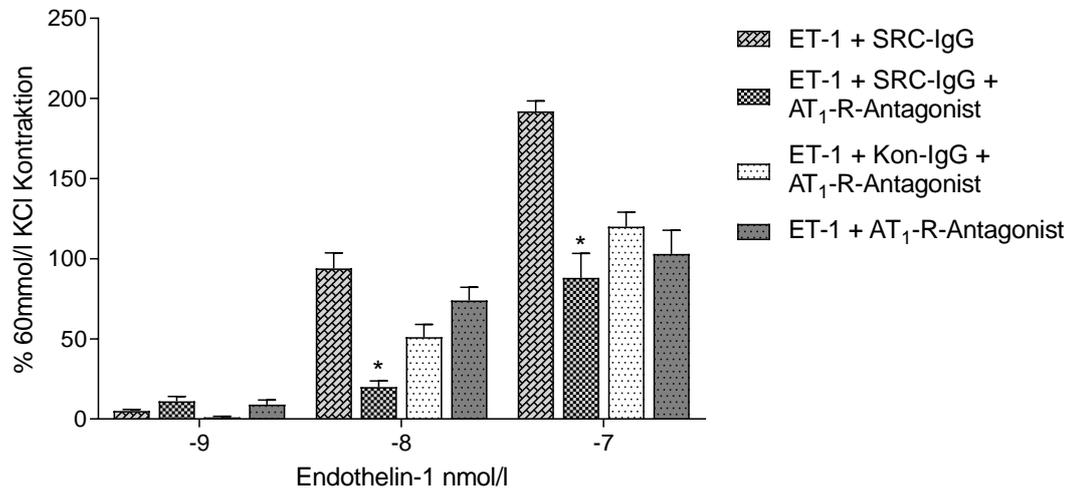


Abb. 3.24: ET-1 induzierte Wandspannungsänderung renaler Interlobararterien nach Inkubation mit SRC-IgG + Valsartan. SRC-IgG 60 mg/dl: n = 9; SRC-IgG 60 mg/dl + 10 µmol/l Valsartan: n = 8; Kon-IgG 60 mg/dl + 10 µmol/l Valsartan: n = 9; Valsartan 10 µmol/l: n = 4; ET-1 wurde in 1, 10 und 100 nmol/l Dosierungsschritten verabreicht. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. ET-1 10 nmol/l sowie 100 nmol/l + SRC-IgG vs. ET-1 10 sowie 100 nmol + SRC-IgG + AT₁-R-Antagonist * p < 0,05.

3.12. Einfluss einer parallelen AT-R- und ET-R-Antagonisierung auf die durch SRC-IgG induzierte Gefäßantwort

Im letzten Teil der Arbeit wurden die ET_{A/B}-R und AT_{1/2}-R durch Pharmaka geblockt. Anschließend wurde SRC-IgG zu den Interlobararterien gegeben und die Gefäßantwort über 2 h aufgezeichnet. Durch dieses Vorgehen konnten Unterschiede in der Kontraktion aufgezeigt und das Ausmaß der Antagonisierung ermittelt werden.

3.12.1. Einfluss von ET_{A/B}-R-Antagonisten auf die SRC-IgG-induzierte Vasokonstriktion

Interlobararterien wurden mit unterschiedlichen ET-R-Antagonisten (Bosentan, Sitaxentan, BQ 123, BQ 610 oder BQ 788) in einer Dosierung von jeweils 10 µmol/l inkubiert. Nach 60 min wurde

SRC-IgG (120 mg/dl) zugegeben und die Wandspannungsänderung für 2 h aufgezeichnet (Abb. 3.25). Als Kontrolle diente die Gefäßantwort auf SRC-IgG (120 mg/dl) ohne Rezeptorhemmung (vgl. Abb. 3.12). Die mittlere relative Kontraktion betrug in den Ansätzen mit ET_A-R-Antagonisten 0,1 und 1 % und in den Ansätzen mit ET_B-R-Antagonist 3 %. Alle mit Antagonisten behandelten Gefäße zeigten gegenüber unbehandelten SRC-IgG eine signifikant verminderte Vasokonstriktion. Im direkten Vergleich zwischen ET_A- und ET_B-R-Antagonisten war die Wandspannungsabnahme unter ET_B Hemmung geringer ausgeprägt.

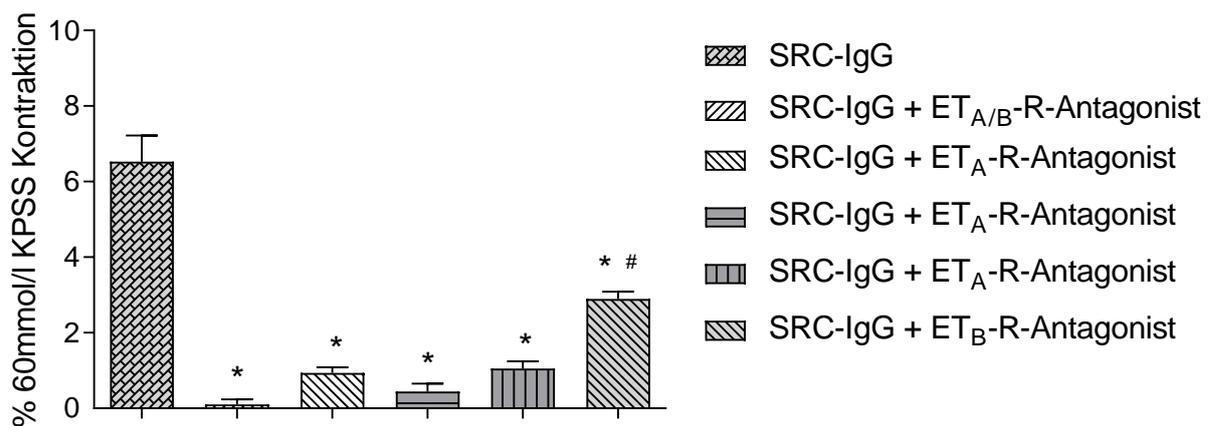


Abb. 3.25: SRC-IgG-induzierte Änderung der Wandspannung renaler Interlobulararterien mit und ohne ET_{A/B}-R-Antagonisten. SRC-IgG 120 mg/dl: n = 10; SRC-IgG + 10 µmol/l ET_{A/B}-R-Antagonist: n = 4; SRC-IgG + 10 µmol/l ET_A-R-Antagonist: n = 4; SRC-IgG + 10 µmol/l ET_A-R-Antagonist: n = 4; SRC-IgG + 10 µmol/l ET_A-R-Antagonist: n = 4; SRC-IgG + 10 µmol/l ET_B-R-Antagonist: n = 4. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. SRC-IgG vs ET_{A/B}-R-Antagonisten* p < 0,05. ET_A- vs. ET_B-R-Antagonist # < 0,05.

3.12.2. Einfluss von ET_A-R- und AT_{1/2}-R-Antagonisten auf die SRC-IgG-induzierte Vasokonstriktion

Interlobulararterien wurden mit jeweils 10 µmol/l Valsartan, PD 123319 oder Valsartan und BQ 123 inkubiert. Nach 60 min wurde SRC-IgG (120 mg/dl) zugegeben und die Wandspannungsänderung über 2 h aufgezeichnet. Als Vergleich dienten Ansätze ohne Rezeptorhemmung (vgl. Abb. 3.12). Die mittlere relative Kontraktion der SRC-IgG-Ansätze mit AT₁-R-Antagonisten betrug 3,0 % und mit AT₂-R-Blocker 4,4 %. Die Inkubation der Gefäße mit ET_A und AT₁-R-Antagonisten reduzierte die relative Kontraktion auf 0,2 % und war damit am deutlichsten ausgeprägt. Zwischen SRC-IgG

ohne Rezeptorantagonisten und den Ansätzen mit Rezeptorantagonisten lagen signifikante Unterschiede vor (Abb. 3.26).

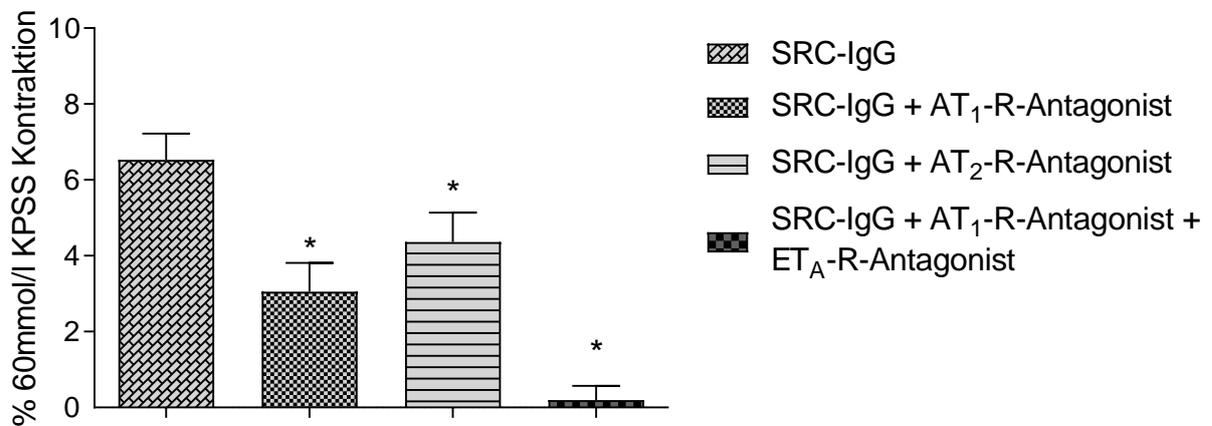


Abb. 3.26: SRC-IgG-induzierte Änderung der Wandspannung renaler Interlobararterien mit und ohne ET_A-R- und AT_{1/2}-R-Antagonisten. SRC-IgG 120 mg/dl, n = 10; SRC-IgG: 60 mg/dl + AT₁-R-Antagonist 10 µmol/l, n = 5; SRC-IgG 120 mg/dl + AT₂-R-Antagonist 10 µmol/l, n = 3; SRC-IgG 120 mg/dl + AT₁-R-Antagonist + ET_A-R-Antagonist 10 µmol/l: n = 6. Die prozentuale Angabe bezieht sich auf die maximale Kontraktion nach Zugabe von 60 mmol/l KCl-Lösung. Ergebnisse als MW ± SEM. SRC IgG vs SRC IgG + ET_A-R/AT_{1/2}-R-Antagonist* p < 0,05.

4. Diskussion

1990 entdeckten Mulvanj und Alkjaer, dass kleine präkapilläre Arterien mit einem Innendurchmesser unter 500 μm eine entscheidende Rolle in der Regulation des Gefäßwiderstandes spielen [67]. Die Organdurchblutung wird durch die über humorale Botenstoffe regulierte Kontraktion oder Dilatation des Gefäßdurchmessers an diesen Widerstandgefäßen gesteuert. Mit Hilfe der Kleingefäß-Myographie lassen sich diese Prozesse an Widerstandsgefäßen unter isometrischen *in vitro* Bedingungen untersuchen. Die Technik ist für Studien an isolierten Gefäßen mit einem Durchmesser von 100–400 μm geeignet [68].

Die Myographie ist ein anerkanntes Verfahren zur Analyse von Blutgefäßen verschiedener Tierspezies und von Gefäßbetten unter pathologischen Bedingungen. Laut Mulvany et al. sind die Widerstandsgefäße von Ratten ein annehmbares Vergleichsmodell für menschliche Widerstandsgefäße [67, 69].

In ersten Untersuchungsabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die physiologischen Reaktionen von Interlobararterien auf eine Elektrolyt-bedingte Depolarisation sowie auf verschiedene Liganden untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Kontext der vorhandenen Literatur diskutiert.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Depolarisation und Zunahme der Wandspannung von Interlobararterien bei Inkubation mit einer KCl-reichen Lösung (siehe Abschnitt 3.1) entspricht annähernd den Ergebnissen von Bartels-Stringer et al. in ihrer Untersuchung der vaskulären Reaktivität von Nierengefäßen der Ratte. In der Literatur werden KCl-reiche Lösungen zur Stimulation renaler Kleingefäße in Konzentrationen von 60–125 mmol/l eingesetzt [70, 71]. Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass höhere KCl-Dosierungen zu keiner weiteren signifikanten Zunahme der Kontraktion führten, wurden für die folgenden Experimente die Antwort bei Inkubation mit 60 mmol/l KCl als Maß für die maximale Kontraktion gewählt.

Die Versuche zur alpha-adrenergen Vasokonstriktion durch Phenylephrin ergaben eine konzentrationsabhängige Zunahme der Wandspannung (vgl. Abb. 3.1). In vergleichbaren Arbeiten an renalen Gefäßen von Ratten wurden vergleichbare Phenylephrin-induzierte Änderungen der Wandspannung gefunden [70, 72]. Diese Ergebnisse bestätigten damit auch die Intaktheit der endothelialen und muskulären Strukturen [70, 72].

Die Intaktheit des Endothels wurde zusätzlich durch die Messung der ACH-induzierten Vasodilatation nach Vorkontraktion mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Phenylephrin überprüft. Der zeitliche Verlauf der Wandspannung mit einer Dilatation um 31 % bei einer Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ ACH (vgl. Abb. 3.2) ist vergleichbar mit den Daten von Gabriels et al. [72]. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme einer weitgehend vollständigen Funktionsfähigkeit des Endothels. Jiang et al. konnten nachweisen, dass die Relaxation renaler Gefäße durch ACH hauptsächlich über hyperpolarisierende Mechanismen und den EDHF (*endothelium-derived hyperpolarisation factor*) und weniger über die NO-Freisetzung erfolgt. Unter NO-Gabe und Histamin-vermittelter NO-Freisetzung wurden Gefäßdilatationen bis 90% beobachtet. In diesem Kontext spielt auch die eingesetzte Konzentration von Phenylephrin zur Vorkontraktion der Gefäße eine Rolle. Jiang et al. fanden nach Vorkontraktion der Gefäße mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Phenylephrin eine ACH-induzierte Dilatation von bis zu 95 % der Ausgangsspannung [71]. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Vorkontraktion 10 $\mu\text{mol/l}$ Phenylephrin eingesetzt, so dass die gemessene Dilatation niedriger lag.

Die Untersuchung zur Rezeptorverteilung im Abschnitt 3.3 belegte eine Dominanz der ET_A -R und AT_1 -R in den Interlobararterien. Miyata et al. fanden in ihrer Untersuchung zur Verteilung von AT_1 -R und AT_2 -R in Rattennieren mittels RT-PCR und Immunhistochemie eine besonders hohe Dichte an AT_1 -R in kortikalen Gefäßen und in den äußeren Markanteilen [73]. Arbeiten zur ET-R-Verteilung zeigen, dass sowohl ET_A -R als auch ET_B -R in der Rattenniere vorkommen und dass sich die Verteilung mit zunehmendem Alter in Richtung ET_B -R verschiebt [74]. Anders als Wendel et al., die ausschließlich ET_A -R an Interlobararterien nachweisen konnten [75], konnte in der vorliegenden Untersuchung auch ET_B -R-mRNA detektiert werden. Die insgesamt inkongruente Datenlage könnte auf die unterschiedlichen Testverfahren zurückzuführen sein, oder auf Unterschiede in der ET_B -R-Genexpressionen, deren Ursache bisher nicht geklärt ist.

Die durch den natürlichen Liganden Ang II ausgelöste Gefäßkontraktion ist im Abschnitt 3.4 dargestellt. Die Wandspannungsänderung lag bei max. 0,4 mN/mm bzw. zwischen 2 und 7 % der KCl-vermittelten Kontraktion (vgl. Abb. 3.4). Gabriels et al. erstellte an Widerstandsgefäßen (Durchmesser 220–270 μm) von transplantierten Lewis-Rattennieren und an Kontrolltieren eine Ang II Dosiskurve. Die Gefäßkontraktion betrug ca. 2 % in der nicht transplantierten Gruppe, und ca. 8 % bei den nierentransplantierten (syn- und allogenen) Tieren [72]. Yang et al. untersuchte die Ang II induzierte Kontraktilität verschiedener Gefäße von Ratten. Die Wandspannungsänderungen bei Inkubation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Ang II betrugen 1 mN/mm für die Arteria cerebri media, 2 mN/mm für Koronararterien und 16 mN/mm für thorakale Aortensegmente [76].

Das unterschiedliche Ansprechen verschiedener Gefäße auf den Ang II ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche AT₁-R-Expression zurückzuführen. Die insgesamt als niedrig zu bewertende Gefäßreaktion auf Ang II könnte auf einer niedrigen Sensitivität des Testverfahrens zurückgehen. Falloon et al. erzielten mit der Druck-Myographie im Vergleich zur Draht-Myographie bei der Analyse der Reaktion mesenterialer Widerstandsgefäße auf Ang II eine höhere Sensitivität [77].

Im Weiteren wurde der potente Vasokonstriktor ET-1 untersucht. Untersuchungen zur renalen Hämodynamik an Ratten belegen nach ET-Gabe eine Zunahme des Blutdrucks und eine Abnahme der renalen Durchblutung [78]. In der vorliegenden Arbeit kam es nach ET-1-Inkubation zu maximalen Wandspannungsänderungen von 15 mN/mm bzw. 168 % (vgl. Abb. 3.5). Die Werte von Devadason et al. und Clark et al. an deepithelialisierten renalen Arterien waren mit 143 % bzw. 177 % auf ET-1 vergleichbar [79, 80].

In weiteren Kontrollexperimenten wurde die autochtone Aktivität der Interlobararterien unter Myographiekammer-Bedingungen beobachtet (vgl. Abb. 3.6) Das Phänomen der *Vasomotion* wurde in einer geringen Anzahl von Arterien beobachtet [81]. Oszillationen traten nach Hyperpolarisationen mit KCl auf und konnten durch Waschschriffe mit PBS behoben werden. Gefäße, die eine Oszillation zeigten, wurde nicht in die Auswertung aufgenommen.

Zum Ausschluss von ungewollten Effekten wurden humanes Kon-IgG und Dialysepuffer als Trägerlösung des IgG auf konstriktorische bzw. dilatative Effekte untersucht, ohne dass Hinweise auf Störfaktoren auftraten (vgl. Abb. 3.7, 3.8, 3.9.).

Die Untersuchungen zum potentiellen vasoaktiven Effekt von IgG aus einem Patient mit SSc und PAH (siehe Abschnitt 3.6.1) ergab dezente Hinweise auf eine vasoaktive Wirkung im Vergleich zu Kon-IgG. Hierzu sind jedoch weitere myographische Untersuchungen notwendig, da nur wenige Kontrollansätze aufgrund der zur Verfügung stehenden IgG Menge untersucht werden konnten (vgl. Abb. 3.10).

Weiter konnte gezeigt werden, dass vasoaktives IgG von zwei Patienten mit systemischer Sklerose und renaler Krise (SRC-IgG) und von einem Patient mit Nierentransplantatabstoßung (NTx-IgG) signifikante Vasokonstriktionen an renalen Widerstandsgefäßen hervorrufen. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig (vgl. Abb. 3.11 und 3.12). Bislang existieren nur wenige Myographie-Untersuchungen an renalen Gefäßen mit den in der vorliegenden Arbeit verfolgten Fragestellungen. Yang et al. untersuchten den Einfluss von AT₁-R-Auto-AK von Patienten mit Präeklampsie an Gefäßsegmenten der Aorta, der Koronararterien und an den mittleren

Zerebralarterien von Ratten mittels Draht-Myographie. Die Autoren wiesen eine signifikante Gefäßreaktion auf AT₁-R-Auto-AK nach, deren Ausmaß einer Ang II (1 µmol/l) induzierten Gefäßreaktion entsprach [76]. Diese Resultate sind vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnissen an renalen Interlobararterien. Die Wandspannungsänderung durch Ang II (1 µmol/l) betrug 0,4 mN/mm bzw. 6 % der KCl vermittelten Kontraktion (vgl. Abb. 3.4 und 3.18), bei Inkubation mit SRC-IgG und NTx-IgG betrug die Werte 5,4 und 6,5 % (vgl. Abb. 3.11 und 3.12). Lukitsch et al. inkubierten renale Widerstandsgefäße von Ratten mit AT₁-R-Auto-AK und zeigten zwar eine geringere, aber ebenfalls signifikante Zunahme der Wandspannung um 3,2 % [82]. Die in dieser Arbeit gemessenen höheren Wandspannungszunahmen (5,4–6,5 %) sind möglicherweise Folge der höheren Konzentration der vasoaktiven IgG. Lukitsch et al. setzten Dilutionen von 1:40 ein, während in der vorliegenden Arbeit Dilutionsschritte von 1:20 (30 mg/dl), 1:10 (60 mg/dl) und 1:5 (120 mg/dl) verwendet wurden.

Im Vordergrund AK-vermittelter Reaktion am Gefäßsystem steht die vaskuläre Dysfunktion. Der bekannteste Vertreter, der AT₁-R-Auto-AK, spielt bei der Präeklampsie, der essentiellen Hypertonie und bei der Nierentransplantatabstoßung eine pathophysiologische Rolle [83-85]. Zhou injizierte trächtigen Mäusen Ig von präeklampsischen Frauen mit positiven AT₁-R-Auto-AK-Status. In der Folge entwickelten die Tiere Präeklampsiezeichen wie Hypertonie, plazentale Ischämie und Proteinurie [86]. Auto-AK der IgG-Klasse mit Bindungsfähigkeit an AT₁-R wurden von Dragun et al. auch bei Patienten mit Nierentransplantat-Abstoßungsreaktionen nachgewiesen. Die Subklassen IgG 1 und 3 banden an zwei verschiedene Epitope der zweiten extrazellulären Schleife des AT₁-R [87, 88]. Behandlungen mit AT₁-R-Antagonisten oder Renin-Angiotensin-Aldosteron-System-Hemmern führten in Folgeuntersuchungen zu einer verlängerten Transplantat-Überlebenszeit [89].

In Abschnitt 3.7 sind die Ergebnisse der Kontrollexperimente mit AT_{1/2}-R- und ET_{A/B}-R-Blockern dargestellt. Keiner der Antagonisten führte im Vergleich zu Kontrollansätzen zu signifikanten Wandspannungsänderungen an den Interlobararterien (vgl. Abb. 3.13 und 3.14).

Anschließend wurde der Einfluss der AT_{1/2}-R- und ET_{A/B}-R-Blocker auf die Liganden-induzierte Vasokonstriktion durch ET-1 und Ang II überprüft. Die Ang II vermittelte Kontraktion an Interlobararterien konnte durch Valsartan signifikant verringert werden. In der Literatur sind für Widerstandsgefäße ähnliche Resultate beschrieben [76]. Der AT₂-R-Antagonist PD 123319 führte zu einer Abnahme der Ang II induzierten Kontraktionen, wenn auch der Effekt geringer war als

bei Valsartan. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle ohne AT₂-R-Antagonist wurden bei einer Ang II Dosis ab 1000 nmol/l ermittelt (vgl. Abb. 3.15). Dieses Ergebnis widerspricht der Forschungslage zum AT₂-R-Blocker PD 123319. Veränderungen der renalen Hämodynamik wurden bisher nicht beschrieben [90]. Andererseits wird die Rolle des AT₂-R in Bezug auf vasokonstriktive und dilatative Effekte jedoch kontrovers diskutiert [91].

Cavarape et al. waren die Ersten, die eine Beteiligung von ET-1 an vasokonstriktiven Prozessen an renalen Gefäßen der Rattenniere nachwies [92]. Die ET-1 vermittelte Konstriktion der Interlobararterien sowie deren Hemmung durch ET_{A/B}-R-Antagonisten wurden in Abb. 3.16 dargestellt. Sitaxentan und BQ 610 unterdrückten die ET-1 vermittelte Kontraktion nahezu komplett. Der ET_B-R-Antagonist BQ 788 führte zu einer geringeren, jedoch ebenfalls signifikanten Wandspannungsabnahme. In der Literatur werden eine Abnahme, Aufhebung oder Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve an renalen und anderen Gefäßen durch eine ET_A-R-Hemmung beschrieben [79, 93]. Das unterschiedliche Ausmaß der Hemmung in der vorliegenden Arbeit lässt sich durch die eingesetzten Pharmaka und Konzentrationen erklären. In dieser Arbeit wurden höhere Konzentrationen an ET_{A/B}-R-Antagonisten (10 µmol/l) gewählt als in den oben angeführten Arbeiten. Für mesenteriale Widerstandsgefäße von Ratten war die Hemmung der ET-1 vermittelten Kontraktion durch BQ 123 und 610 vergleichbar. Es existieren auch Hinweise, dass die ET-vermittelte Kontraktion zu einem geringen Anteil auch über ET_B-R vermittelt wird [94, 95]. Die Abnahme der Kontraktion unter BQ 788 (ET_B-R-Blocker) in dieser Arbeit unterstützt diesen Befund.

Weiter wurde in der vorliegenden Arbeit ein potentieller potenzierender Effekt zwischen natürlichen Liganden und vasoaktiven IgG untersucht (siehe Abschnitt 3.9). Es zeigte sich eine tendenziell höhere Wandspannung unter Ang II und SRC-IgG bzw. NTx-IgG (6,8 bzw. 6,7 %) als in den ausschließlich mit Ang II behandelten Gefäßen (Abb. 3.17). Signifikante Unterschiede ergaben sich zu den Ansätzen mit Kon-IgG bei höheren Ang II Konzentrationen (100, 1000 nmol/l), sowie zwischen den Ansätzen mit SRC-IgG und Ang II (1 nmol/l) vs. den Ansätzen mit Ang II (1 nmol/l). Die Plasmakonzentration von Ang II unterliegt Schwankungen und wird in der Literatur zwischen 30 und 100 pg/ml angegeben [96, 97]. Es ist anzunehmen, dass 1 nmol/l Ang II (1 nmol entspricht 1,046 pg) nur geringe Wandspannungszunahmen an der glatten Muskulatur, wie auch im Versuchsteil gemessen, bewirkt.

Insgesamt konnte eine dezente bis signifikante Zunahme der Kontraktion unter vasoaktiven IgG

und natürlichem Liganden (vgl. Abb. 3.18) festgestellt werden. Die geringe Zunahme der Kontraktion bei einer kombinierten Behandlung mit vasoaktiven IgG und natürlichen Agonisten deckt sich mit den Ergebnissen von Lukitsch et al., welcher den Effekt von Ang II ($1 \mu\text{mol/l}$) und vasoaktiven IgG auf renale Widerstandgefäße von Fisher-Ratten myographisch untersuchte [82]. Die Autoren erzielten mit ihren Versuchsbedingungen 25 % einer KCl-vermittelte Kontraktion. Die höheren Messergebnisse im Vergleich zu den vorliegenden Daten sind unter Umständen auf das verwendete Tiermodell und oder auf eine andere Patientenkohorte zurückzuführen. Weiterhin geht aus der Arbeit nicht hervor, welche Widerstandsgefäße präpariert wurden. Insgesamt lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die Effekte weiter untersucht werden sollten, insbesondere da bekannt ist, dass im Verlauf der SSc die Expression der AT-R steigt und die Ang II Plasmakonzentrationen zunimmt.

In den bisher erzielten Ergebnissen konnte eine durch vasoaktives IgG induzierte Veränderung der Wandspannung an Interlobararterien zwischen 5–7 % aufgezeigt werden. Unter einer kombinierten Behandlung mit dem natürlichen Liganden ET-1 und vasoaktiven IgG wurde eine signifikant höhere Kontraktion im Vergleich zu den Ansätzen mit Kon-IgG festgestellt. Gegenüber ET-1 alleine wurde kein signifikanter Unterschied detektiert (vgl. Abb. 3.19). Die Evaluation eines additiven Effektes ist aufgrund der starken Gefäßreaktion auf den Liganden ET-1 im dreistelligen Prozentbereich gegenüber der AK-vermittelten Reaktion im einstelligen Prozentbereich schwierig. In der folgenden Beobachtung der additiven Effekte über einen Zeitraum von 60 min unter Inkubation mit ET-1 und vasoaktiven IgG wurden keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle ermittelt (Abb. 3.20).

Die SSc geht mit erhöhten ET-1-Plasmakonzentrationen einher [45]. LaMarca et al. zeigten, dass $\text{AT}_1\text{-R-Auto-AK}$ die ET-1-Spiegel im Cortex der Nieren um das Elffache und in der Plazenta um das Vierfache anheben. $\text{AT}_1\text{-R-Auto-AK}$ regen Endothelzellen zu einer vermehrten ET-1-Produktion an. Diese Reaktion spielt bei der Entstehung von Hypertonus und Plazenta-Ischämie eine wichtige Rolle [85].

Im Rahmen der renalen Krise kommt es zu großen pathophysiologischen Veränderungen am Gefäßendothel mit einer erhöhten Expression von $\text{ET}_A\text{-R}$. Daher spielen vermutlich natürliche Liganden und vasoaktive IgG bei der Entstehung der obliterativen Vaskulopathie eine bedeutende Rolle [43, 44]. Unter diesem Gesichtspunkt ist es möglich, dass bei dem hier untersuchten gesunden Tiermodell additive bzw. potenzierende Effekte unerkannt geblieben sind.

Im Abschnitt 3.10. wurde die pharmakologische Hemmung der natürlichen Liganden bei Inkubation mit vasoaktiven IgG untersucht. Die Antagonisierung des AT₁-R verhinderte die Kontraktion der Interlobararterien auf eine Stimulation mit vasoaktiven IgG und Ang II. Die Reaktionen der Gefäße gegenüber der Kontrolle ohne AT₁-R-Antagonist waren signifikant verschieden (vgl. Abb. 3.21). Die Senkung des peripheren Widerstandes an renalen Widerstandsgefäßen durch AT₁-R-Antagonisten wurde vielfach untersucht und wird mit den vorliegenden Ergebnissen weiter bestätigt [98]. AT₁-R-Auto-AK wurden bei Patienten mit maligner, therapierefraktärer und sekundärer Hypertonie nachgewiesen. AT₁-R-Auto-AK erhöhen wie Ang II dosisabhängig die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und führen zu einer Proliferation von VSMC. Diese Effekte können durch Losartan geblockt werden [99]. Beim Vorliegen von AT₁-R-Auto-AK kann mit AT₁-R-Antagonisten verglichen mit ACE-Hemmern eine bessere Blutdruckkontrolle erreicht werden [100].

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene ausbleibende Kontraktion mit Wandspannungen von 1,5 % unter Valsartan konnte Lukitsch et al. an transplantierten Rattennieren, die mit vasoaktiven IgG und 1 µmol/l Irbesartan behandelt wurden, nicht feststellen [82]. Trotz AT₁-R-Hemmung zeigten die Gefäße eine Wandspannung um 15 %. Allerdings entspricht die eingesetzte Irbesartan-Äquivalenzdosis in etwa einem Zehntel der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Valsartan-Dosis. Zudem verwendeten Lukitsch et al. ein pathologisches Tiermodell.

In der vorliegenden Arbeit konnten Bosentan und Sitaxentan die durch Zugabe von SRC-IgG und einer aufsteigendem ET-1-Dosis ausgelöste Kontraktion antagonisieren (vgl. Abb. 3.22). Wie in den vorangegangenen Untersuchungen (vgl. Abb. 3.16) erwies sich BQ 610 bei höherer ET-1-Konzentration (100 nmol/l) als weniger wirksam. Der Vergleich mit der ET-1 Rezeptor Hemmung unter Sitaxentan (vgl. Abb. 3.16) zeigt, dass unter Inkubation mit vasoaktiven IgG die Abnahme der Wandspannung durch Bosentan etwas geringer ausfällt (5,7 % (Bosentan und vasoaktives IgG) vs. 4,4 % (Sitaxentan) unter 100 nmol/l ET-1, respektive 3,6 % (Bosentan und vasoaktives IgG) vs. 1,8 % (Sitaxentan) bei 10 nmol/l ET-1).

Unter dem Begriff Rezeptortranslokation wird eine Interaktion der Signalwege nach der Stimulation verschiedener Rezeptoren verstanden. Für AT- und ET-R sind solche Interaktionen bekannt. Über aktivierte AT-R wird über Konversionsenzyme ET-1 freigesetzt, das an ET-R bindet [39]. Zeng et al. konnten an renalen proximalen Tubuluszellen eine direkte Interaktion zwischen ET_B-R und AT₁-R aufzeigen [55]. Auch die Studie von Parrish et al. lässt auf eine

pathophysiologische Interaktion schließen. Die Autoren erzeugten bei schwangeren Ratten mit AT₁-R-Auto-AK eine Hypertonie. Die Interlobararterien dieser Tiere zeigten eine endotheliale Dysfunktion mit abgeschwächter Gefäßrelaxation. Diese Veränderungen konnten durch ET_A-R-Antagonisten aufgehoben werden [101].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Abnahme der Gefäßreaktion auf Ang II bzw. ET-1 durch reziproke Rezeptorhemmung gemessen werden. In den mit Bosentan (ET_{A/B}-R-Antagonist) behandelten Gefäßen fand eine geringere durch Ang II stimulierte Kontraktion statt. Möglicherweise wurde diese über die Ang II vermittelte Stimulierung der VSMC mit Freisetzung von ET-1 an den ET-R inhibiert (vgl. Abb. 3.23). Die Reaktion auf vasoaktives IgG konnte signifikant abgeschwächt werden, wobei die Hemmung im Vergleich zu der AT₁-R-Hemmung mit Valsartan schwächer ausgeprägt war (vgl. Abb. 3.21). Letzteres deutet daraufhin, dass die Vasokonstriktion auf unterschiedlichen Wegen vermittelt wird.

In den Versuchen zur ET-1-vermittelten Vasokonstriktion mit AT₁-R-Antagonisten konnte eine um 70 % verminderte Wandspannungsänderung bei einer ET-1-Konzentration von 100 nmol/l gemessen werden (vgl. Abb. 3.24). Im Vergleich zu dem Effekt von ET_A-R-Blockern auf die ET-1 vermittelte Reaktion war die Hemmung ebenfalls schwächer (vgl. Abb. 3.22). Weiterhin kam es zu einer Abnahme der Hemmung bei steigender ET-1 Dosis.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine AT₁-R/ET_A-R-Interaktion hin. Auch Mitchell et al. fanden in einer humanen *in vivo* Studie zur kutanen Mikrozirkulation eine Inhibition der ET-1-vermittelten Vasokonstriktion durch die orale Gabe von Valsartan [102].

Im letzten Teil der Arbeit (Abschnitt 3.12) wurde durch mono bzw. dualen Rezeptorantagonismus unter Abwesenheit natürlicher Liganden die Aufhebung der Vasokonstriktion durch vasoaktive IgG untersucht. Bei einer ET-R-Hemmung nahm die Wandspannung unter diesen Bedingungen auf Werte unter 1 % ab (vgl. Abb. 3.25). Der Effekt der ET-R-Antagonisten war unter diesen Bedingungen deutlicher als nach einer kombinierten SRC-IgG- und ET-1-Gabe (3,0–5,7 %) (vgl. Abb. 3.22). Wurde der AT₁-R antagonisiert, nahm die IgG-vermittelte Kontraktion auf 3 % ab (vgl. Abb. 3.26). Diese Effekte waren etwas geringer als in den Versuchen mit SRC-IgG und Ang II unter AT₁-R Hemmung (vgl. Abs. 3.10) bleiben aber weiter signifikant. Bei einer AT₂-R- bzw. ET_B-R-Hemmung nahm die Wandspannung um ca. 30 respektive 50 % ab (vgl. Abb. 3.25 und 3.26). Letzteres kann mit der bereits angesprochenen vasokonstriktiven Funktion von Subklassen des ET_B-R zusammenhängen [95, 103]. Die Abnahme bei AT₂-R-Hemmung deutet auf bisher

nicht vollständig geklärte Funktionen des AT₂-R hin. In der Literatur finden sich Beispiele für eine *crosstalk* Interaktion zwischen AT₁-R und AT₂-R, die bei den vorliegenden Ergebnissen eine Rolle spielen könnten [104]. Auch Touyz et al. stellten eine Abnahme der Wandspannung von Mesenterialarterien spontan hypertensiver Ratten bei einer AT₂-R-Blockade fest [105]. Yang et al. beschrieben die Aufhebung einer AT₁-R-Auto-AK vermittelten Vasokonstriktion für IgG präeklampsischer Patienten. An verschiedenen Rattengefäßen konnte die kontraktile Antwort auf AT₁-R-Auto-AK durch Losartan aufgehoben werden [76].

Letztlich zeigte ein dualer Rezeptorantagonismus mit Valsartan und BQ 123 eine nahezu komplette Aufhebung der kontraktilen Antwort.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit am Tiermodell eine dosisabhängige Zunahme der Wandspannung renaler Gefäße bei Inkubation mit AT₁-R-Auto-AK- und ET_A-R-Auto-AK-positiven Seren von zwei Patienten mit SSc und renaler Krise bzw. einem Patient mit Nierentransplantatabstoßung gezeigt werden. Die Ergebnisse werden jedoch aufgrund der geringen Zahl zur Verfügung stehender Patientenserum in ihrer Aussagekraft abgeschwächt.

Bei Anwesenheit der natürlichen Liganden ET-1 und Ang II war die Wandspannung teilweise signifikant erhöht. Diese ligandeninduzierten Effekte waren durch spezifische Rezeptorblocker antagonisierbar. Trotz der stärkeren AT₁-R-Expression in Interlobararterien scheint ET-1 die Gefäßkonstriktion maßgeblicher zu beeinflussen. Die duale AT₁-R- / ET_A-R-Hemmung erwies sich als effektiver (Abnahme der Wandspannung auf Werte unter 1 %) als die ausschließliche Hemmung von AT₁-R oder ET_A-R. Die gekreuzte Rezeptorhemmung lieferte Hinweise auf ein gekoppeltes Signalwegssystem, das für weitere pathophysiologische Modelle relevant sein kann. Innovative therapeutische Interventionen sollten diese möglichen Interaktionen berücksichtigen.

Trotz der relativ geringen Tonuszunahme der untersuchten Interlobararterien ist hervorzuheben, dass nach den physiologischen Grundlagen der Hämodynamik der Gefäßwiderstand in der vierten Potenz zum Radius abhängt. Das bedeutet, dass geringe Vasokonstriktionen zu einem deutlichen Blutdruckanstieg und einer Abnahme der Durchblutung führen können. Im Verlauf der renalen Krise der SSc spielen diese Mechanismen eine relevante Rolle. Um diese Mechanismen in Zukunft besser verstehen und darstellen zu können, sind weitere Untersuchungen an einem pathophysiologischen Tiermodell sinnvoll.

5. Literaturverzeichnis

1. Barnes JI, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol*. 2012 Mar;24(2):165-70.
2. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, Moinzadeh P, Müller-Ladner U, Pfeiffer C, Riemekasten G, Schulze-Lohoff E, Sunderkoetter C, Weber M, Worm M, Klaus P, Rubbert A, Steinbrink K, Grundt B, Hein R, Scharffetter-Kochanek K, Hinrichs R, Walker K, Szeimies RM, Karrer S, Müller A, Seitz C, Schmidt E, Lehmann P, Foeldvári I, Reichenberger F, Gross WL, Kuhn A, Haust M, Reich K, Böhm M, Saar P, Fierlbeck G, Kötter I, Lorenz HM, Blank N, Gräfenstein K, Juche A, Aberer E, Bali G, Fiehn C, Stadler R, Bartels V; The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement.. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Aug; 47(8):1185-92.
3. Mayes MD. Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin North Am*. 2003 May; 29(2):239-54.
4. Herold G. *Innere Medizin*. Köln 2011:657-659
5. Kayser C, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis: unanswered questions. *Front Immunol*. 2015 Apr 15;6:167.
6. Moll I. *Duale Reihe Dermatologie*. Stuttgart 2005:181-187
7. Sallam H, McNearney TA, Chen JD. Systematic review: pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Mar 15; 23(6):691-712
8. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, Distler O, Clements P, Cutolo M, Czirjak L, Damjanov N, Del Galdo F, Denton CP, Distler JHW, Foeldvari I, Figelstone K, Frerix M, Furst DE, Guiducci S, Hunzelmann N, Khanna D, Matucci-Cerinic M, Herrick AL, van den Hoogen F, van Laar JM, Riemekasten G, Silver R, Smith V, Sulli A, Tarnier I, Tyndall A, Welling J, Wigley F, Valentini G, Walker UA, Zulian F, Müller-Ladner U; EUSTAR Coauthors. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2016 Nov 9. pii: annrheumdis-2016-209909. doi: 10.1136/annrheumdis-2016
9. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*. 2007 Mar; 117(3):557-67.

10. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. *Lancet*. 2017 Apr 13. pii: S0140-6736(17)
11. Cappelli S, Randone SB, Camiciottoli G, Paulis AD, Guiducci S, Matucci-Cerinic M. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: where do we stand? *European Respiratory Review* Sep 2015, 24 (137) 411-419
12. Tzelepis GE, Kelekis NL, Plastiras SC, Mitseas P, Economopoulos N, Kampolis C, Gialafos EJ, Moysakis I, Moutsopoulos HM. Pattern and distribution of myocardial fibrosis in systemic sclerosis: a delayed enhanced magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum*. 2007 Nov; 56(11):3827-36.
13. Hunter C. The Heart in Scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008 February; 34(1): 181-viii
14. Penn H, Howie AJ, Kingdon EJ, Bunn CC, Stratton RJ, Black CM, Burns A, Denton CP. Scleroderma renal crisis: patient characteristics and long-term outcomes. *QJM*. 2007 Aug; 100(8):485-94.
15. Steen VD. Kidney involvement in systemic sclerosis. *La Presse Médicale*, Volume 43, n° 10P2, pages e305-e314 (octobre 2014)
16. Desbois AC, Cacoub P. Systemic sclerosis: An update in 2016. *Autoimmun Rev*. 2016 May;15(5):417-26.
17. Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, Sestini P, Renzoni EA, Holmes AM, Spagnolo P, Pantelidis P, Leoni P, McHugh N, Stock CJ, Shi-Wen X, Denton CP, Black CM, Welsh KI, du Bois RM, Abraham DJ. A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Eng J Med*. 2007 Sep 20; 357 (12):1210-20
18. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE Pathogenesis of Systemic Sclerosis.. *Front Immunol*. 2015 Jun 8;6:272.
19. Okada K, Endo Y, Miyachi Y, Koike Y, Kuwatsuka Y, Utani A. Glycosaminoglycan and versican deposits in taxane-induced sclerosis. *Br J Dermatol*. 2015 Oct; 173(4):1054-8.
20. Kettaneh A1, Al Moufti O, Tiev KP, Chayet C, Tolédano C, Fabre B, Fardet L, Cabane J. Occupational exposure to solvents and gender-related risk of systemic sclerosis: a metaanalysis of case-control studies. *J Rheumatol*. 2007 Jan;34(1):97-103
21. Furue M, Mitoma C, Mitoma H, Tsuji G, Chiba T, Nakahara T, Uchi H, Kadono T. Pathogenesis of systemic sclerosis-current concept and emerging treatments. *Immunol Res*. 2017 Aug;65(4):790-797.
22. Denton CP. Systemic sclerosis: from pathogenesis to targeted therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2015 Jul-Aug;33(4 Suppl 92):S3-7.

23. Asano Y, Sato S. Vasculopathy in scleroderma. *Semin Immunopathol.* 2015 Sep;37(5):489-500.
24. Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Pathogenesis of systemic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *J Dermatol Sci.* 2005 Jul; 39(1):1-7.
25. Hasegawa M, Sato S, Fujimoto M, Ihn H, Kikuchi K, Takehara K. *J Rheumatol.* Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. 1998 Feb;25(2):308-13
26. Hénault J, Robitaille G, Sénécal JL, Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of anti-topoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum.* 2006 Mar; 54(3):963-73.
27. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum.* 2005 Aug;35(1):35-42
28. Riemekasten G, Dragun D. Clinical risk-adapted therapies in systemic sclerosis. *Z Rheumatol.* 2007 Dec; 66(8):672-4, 676-8.
29. Gholam P, Sehr T, Enk A, Hartmann M. Successful treatment of systemic-sclerosis-related digital ulcers with a selective endothelin type A receptor antagonist (sitaxentan). *Dermatology.* 2009; 219(2):171-3.
30. Lee JJ, Pope JE. Emerging drugs and therapeutics for systemic sclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2016 Dec;21(4):421-430.
31. Woodworth TG, Suliman YA, Furst DE, Clements P. Scleroderma renal crisis and renal involvement in systemic sclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016 Nov;12(11):678-691
32. Lee S, Lee S, Sharma K. The pathogenesis of fibrosis and renal disease in scleroderma: recent insights from glomerulosclerosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2004 Apr; 6(2):141-8.
33. Logee KM, Lakshminarayanan S. Scleroderma renal crisis as an initial presentation of systemic sclerosis: a case report and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol.* 2015 Jul-Aug;33(4 Suppl 91):S171-4.
34. Helfrich DJ, Banner B, Steen VD, Medsger TA. Normotensive renal failure in systemic sclerosis. *Jr. Arthritis Rheum.* 1989 Sep; 32(9):1128-34.
35. Cannon PJ, Hassar M, Case DB, Casarella WJ, Sommers SC, LeRoy EC. The relationship of hypertension and renal failure in scleroderma (progressive systemic sclerosis) to structural and functional abnormalities of the renal cortical circulation.

- Medicine (Baltimore). 1974 Jan; 53(1):1-46.
36. Vij M, Agrawal V, Jain M. Scleroderma renal crisis in a case of mixed connective tissue disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2014 Jul;25(4):844-8.
 37. Dhaun N, MacIntyre IM, Bellamy CO, Kluth DC. Endothelin receptor antagonism and renin inhibition as treatment options for scleroderma kidney. *Am J Kidney Dis.* 2009 Oct; 54(4):726-31.
 38. Mouthon L, Mehrenberger M, Teixeira L, Fakhouri F, Bérezné A, Guillevin L, Noël LH. Endothelin-1 expression in scleroderma renal crisis. *Hum Pathol.* 2011 Jan; 42(1):95-102.
 39. Siegenthaler W. *Klinische Pathophysiologie.* Stuttgart 2006: 664 ff
 40. Prisant LM, Loebel DH, Mulloy LL. Scleroderma renal crisis. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2003 Mar-Apr; 5(2):168-70, 176.
 41. Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, Fukasawa C, Sugiura T, Nishimagi E, Harigai M, Kamatani N. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan; 50(1):216-26.
 42. Barton M, Yanagisawa M. *Can. J. Endothelin 20 years from discovery to therapy.* *Physiol. Pharmacol.* 2008; 86(8):485-498
 43. Fonseca C, Renzoni E, Sestini P, Pantelidis P, Lagan A, Bunn C, McHugh N, Welsh KI, Du Bois RM, Denton CP, Black C, Abraham D. Endothelin axis polymorphisms in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep;54(9):3034-42
 44. Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, Southcott AM, Black CM, du Bois RM, Laurent GJ, McAnulty RJ. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994 Oct; 11(4):439-45
 45. Schmidt J, Launay D, Soudan B, Hachulla E, de Groote P, Lambert M, Queyrel V, Morell-Dubois S, Hatron PY. Assessment of plasma endothelin level measurement in systemic sclerosis. *Rev Med Interne.* 2007 Jun; 28(6):371-6.
 46. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 2:S2
 47. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Pearson JD, Dashwood M, du Bois RM, Black CM, Leask A, Abraham DJ. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of

- fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2004 Jun; 15(6): 2707–2719
48. Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg, 7. Auflage. 2003. 797 ff.
 49. Silbernagel S, Despopoulos A. *Taschenatlas der Physiologie*. Stuttgart, 6. Auflage. 2003: Kapitel 7 und 8
 50. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:27-33
 51. Bobst SM, Day MC, Gilstrap LC, Xia Y, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *Am J Hypertens*. 2005 Mar;18(3):330-6.
 52. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Blanco J, Egido J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol*. 2001 May;158(5):1743-56.
 53. Lemarié CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2010 Mar;11(1):19-31.
 54. Mickley EJ, Gray GA, Webb DJ. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*. 1997 Apr;120(7):1376-82.
 55. Zeng C1, Wang Z, Asico LD, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Aberrant ETB receptor regulation of AT receptor in immortalized renal proximal tubule cells of spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int*. 2005; 68:623-631
 56. Kammerl MC1, Grimm D, Kromer EP, Jabusch HC, Reif R, Morhard S, Endemann D, Fischereder M, Riegger GA, Krämer BK. Effects of Aortic Stenosis on Renal Renin, Angiotensin Receptor, Endothelin and NOS Gene Expression in Rats. *Am J Nephrol* 2002;22:84–89
 57. Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res*. 1999 Aug 1;43(2):300-7
 58. Dragun D, Catar R, Philippe A. Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. *Kidney Int*. 2016 Aug;90(2):280-288.
 59. Lapenas D, Rodnan GP, Cavallo T. Immunopathology of the renal vascular lesion of progressive systemic sclerosis. *Am J Pathol*. 1978 May; 91(2):243-58.

60. Gerber MA. Immunohistochemical findings in the renal vascular lesions of progressive systemic sclerosis. *Hum Pathol.* 1975 May;6(3):343-7
61. Tan EM, Pearson CM. Rheumatic disease sera reactive with capillaries in the mouse kidney. *Arthritis Rheum.* 1972 Jan-Feb;15(1):23-8.
62. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirják L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Catar R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Mar;70(3):530-6.
63. Kill A, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis pathogenesis. *Curr Rheumatol Rep.* 2015 May;17(5):34.
64. Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature.* 1976 Apr 15;260(5552):617-9.
65. Multi Wire Myograph System Model 610 M, User Manual Version 2.2
66. Mulvany MJ. Procedures for investigation of small vessels using small vessel myograph. Department of Pharmacology, Aarhus University Denmark, December 1988
67. Mulvany MJ, Aalkjaer C Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990
68. Spiers A, Padmanabhan N. A guide to wire myography. *Methods Mol Med.* 2005;108:91-104.
69. Aalkjaer C, Mulvany MJ. Human and rat resistance vessels: a comparison of their morphological and pharmacological characteristics. *Gen Pharmacol.* 1983;14(1):85-7.
70. Bartels-Stringer M, Terlunen L, Siero H, Russel FG, Smits P, Kramers C. Preserved vascular reactivity of rat renal arteries after cold storage. *Cryobiology.* 2004 Feb;48(1):95-8.
71. Jiang F, Dusting GJ. Endothelium-dependent vasorelaxation independent of nitric oxide and K(+) release in isolated renal arteries of rats. *Br J Pharmacol.* 2001 Apr;132(7):1558-64.
72. Gabriëls G1, August C, Grisk O, Steinmetz M, Kosch M, Rahn KH, Schlatter E. Impact of renal transplantation on small vessel reactivity.. *Transplantation.* 2003 Mar 15;75(5):689-97.
73. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Jr. Am J Physiol.* 1999 Sep;277(3 Pt 2):F437-46.
74. Hocher B1, Rohmeiss P, Diekmann F, Zart R, Vogt V, Schiller S, Bauer C, Koppenhagen K, Distler A, Gretz N. 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.* 1995 Aug;33(8):463-72.
75. Wendel M, Knels L, Kummer W, Koch T. Distribution of endothelin receptor subtypes ETA and ETB in the rat kidney. *J Histochem Cytochem.* 2006 Nov;54(11):1193-203.
 76. Yang X1, Wang F, Chang H, Zhang S, Yang L, Wang X, Cheng X, Zhang M, Ma XL, Liu H. Autoantibody against AT1 receptor from preeclamptic patients induces vasoconstriction through angiotensin receptor activation. *J. Hypertens.* 2008 Aug; 26(8):1629-35.
 77. Falloon BJ, Stephens N, Tulip JR, Heagerty AM. Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wire-mounted preparations. *Am J Physiol.* 1995 Feb;268(2 Pt 2):H670-8.
 78. Murakawa K, Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, Horio T, Kurihara N, Takeda T. Endothelin-induced renal vasoconstriction and increase in cytosolic calcium in renal vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Hypertens A.* 1990;12(6):1037-48.
 79. Devadason PS, Henry PJ. Comparison of the contractile effects and binding kinetics of endothelin-1 and sarafotoxin S6b in rat isolated renal artery. *Br J Pharmacol.* 1997 May;121(2):253-63
 80. Clark KL, Pierre L. Characterization of endothelin receptors in rat renal artery in vitro. *Br J Pharmacol.* 1995 Feb; 114(4):785-90.
 81. Nilsson H, Aalkjaer C. Vasomotion: mechanisms and physiological importance. *Mol Interv.* 2003 Mar; 3(2):79-89, 51.
 82. Lukitsch I, Kehr J, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelhä M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M. Renal Ischemia and Transplantation Predispose to Vascular Constriction Mediated by Angiotensin II Type 1 Receptor-Activating Antibodies. *Transplantation* 2012;94: 8-13.
 83. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.* 1999 Apr;103(7):945-52.
 84. Walther T, Wallukat G, Jank A, Bartel S, Schultheiss HP, Faber R, Stepan H. Angiotensin II type 1 receptor agonistic antibodies reflect fundamental alterations in the uteroplacental vasculature. *Hypertension.* 2005 Dec;46(6):1275-9.
 85. LaMarca B1, Parrish M, Ray LF, Murphy SR, Roberts L, Glover P, Wallukat G, Wenzel

- K, Cockrell K, Martin JN Jr, Ryan MJ, Dechend R. Hypertension in response to autoantibodies to the angiotensin II type I receptor (AT1-AA) in pregnant rats: role of endothelin-1. *Hypertension*. 2009 Oct;54(4):905-9.
86. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med*. 2008 Aug;14(8):855-62.
87. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schönemann C, Unger T, Budde K, Neumayer HH, Luft FC, Wallukat G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005 Feb 10;352(6):558-69.
88. Dragun D. The role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in renal allograft vascular rejection. *Pediatr Nephrol*. 2007 Jul;22(7):911-4.
89. Dragun D. Agonistic antibody-triggered stimulation of Angiotensin II type 1 receptor and renal allograft vascular pathology. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Jul;22(7):1819-22.
90. Champion HC, Bivalacqua TJ, Lambert DG, McNamara DB, Kadowitz PJ. The influence of candesartan and PD123319 on responses to angiotensin II in the hindquarters vascular bed of the rat. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Jan;10 Suppl 11:S95-7.
91. Pinaud F, Bocquet A, Dumont O, Retailleau K, Baufreton C, Andriantsitohaina R, Loufrani L, Henrion D. Paradoxical role of angiotensin II type 2 receptors in resistance arteries of old rats. *Hypertension*. 2007 Jul;50(1):96-102.
92. Cavarape A, Bartoli E. Effects of BQ-123 on systemic and renal hemodynamic responses to endothelin-1 in the rat split hydronephrotic kidney. *J Hypertens*. 1998 Oct;16(10):1449-58.
93. . Mickley EJ, Gray GA, Webb DJ. Activation of endothelin ETA receptors masks the constrictor role of endothelin ETB receptors in rat isolated small mesenteric arteries *Br J Pharmacol*. 1997 Apr;120(7):1376-82.
94. Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Endothelin receptor subtypes in resistance arteries from humans and rats. *Cardiovasc Res*. 1995 Apr;29(4):532-5.
95. Betts LC, Kozlowski RZ. Electrophysiological effects of endothelin-1 and their relationship to contraction in rat renal arterial smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 2000 Jun;130(4):787-96.
96. Franco M, Martínez F, Quiroz Y, Galicia O, Bautista R, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe B. Renal angiotensin II concentration and interstitial infiltration of immune cells are

- correlated with blood pressure levels in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Jul;293(1):R251-6.
97. Blüher M, Kratzsch J, Paschke R. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha, angiotensin II, growth hormone, and IGF-I are not elevated in insulin-resistant obese individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*. 2001 Feb; 24(2):328-34.
 98. Watanabe S, Okura T, Kurata M, Irita J, Manabe S, Miyoshi K, Fukuoka T, Gotoh A, Uchida K, Higaki J. Valsartan reduces serum cystatin C and the renal vascular resistance in patients with essential hypertension. *J. Clin Exp Hypertens*. 2006 Jul;28(5):451-61.
 99. Zhu F, Sun YX, Liao YH, Wei YM, Chen M, Wang M, Zhou ZH. Agonistic AT(1) receptor autoantibody increases in serum of patients with refractory hypertension and improves Ca(2+) mobilization in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Cell Mol Immunol*. 2008 Jun;5(3):209-17.
 100. Wei F, Jia XJ, Yu SQ, Gu Y, Wang L, Guo XM, Wang M, Zhu F, Cheng X, Wei YM, Zhou ZH, Fu M, Liao YH; SOT-AT1 Study Group. Candesartan versus imidapril in hypertension: a randomised study to assess effects of anti-AT1 receptor autoantibodies. *Heart*. 2011 Mar; 97(6):479-84.
 101. Parrish MR, Ryan MJ, Glover P, Brewer J, Ray L, Dechend R, Martin JN Jr, Lamarca BB. Angiotensin II Type 1 Autoantibody Induced Hypertension During Pregnancy Is Associated With Renal Endothelial Dysfunction. *Gend Med*. 2011 Jun; 8(3): 184–188.
 102. Mitchell A, Rushentsova U, Siffert W, Philipp T, Wenzel RR. The angiotensin II receptor antagonist valsartan inhibits endothelin 1-induced vasoconstriction in the skin microcirculation in humans in vivo: influence of the G-protein beta3 subunit (GNB3) C825T polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Mar;79(3):274-81.
 103. Just A, Olson AJ, Arendshorst WJ. Dual constrictor and dilator actions of ET(B) receptors in the rat renal microcirculation: interactions with ET(A) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Apr;286(4):F660-8.
 104. Cosentino F, Savoia C, De Paolis P, Francia P, Russo A, Maffei A, Venturelli V, Schiavoni M, Lembo G, Volpe M. Angiotensin II type 2 receptors contribute to vascular responses in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Am J Hypertens*. 2005 Apr;18(4 Pt 1):493-9.
 105. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL. Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1 Pt 2):366-72.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tobias Kretzschmar versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Angiotensin II Typ 1 und Endothelin-1 Typ A Rezeptor aktivierende Autoantikörper in der systemischen Sklerose mit renaler Krise, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Sämtliche Experimente und deren Ergebnisse wurden von mir geplant, durchgeführt und ausgewertet.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Kongressbeiträge

Catar R, **Kretzschmar T**, Näther M, Philippe A, Wagner P, Luft FC, Riemekasten G, Dragun D (2010) *Agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1 receptors act synergistically in systemic sclerosis patients*. 1st systemic sclerosis world congress, 11.-13.02.10 Florenz, Italien

Catar R, **Kretzschmar T**, Näther M, Philippe A, Wagner P, Luft FC, Riemekasten G, Dragun D *Agonistic Autoantibodies Targeting ETA- and AT1 Receptors Act Synergistically in Systemic Sclerosis Patient*. Renal Week 2009: American Society of Nephrology (ASN) 2009 Annual Meeting, San Diego, USA

Catar R, **Kretzschmar T**, Näther M, Philippe A, Wagner P, Luft FC, Riemekasten G, Dragun D *Synergy of agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1 receptors increases sensitivity to natural ligands*. APS Conference ET-11: APS International Conference on Endothelin Montréal, Canada

Catar R, **Kretzschmar T**, Näther M, Philippe A, Wagner P, Luft FC, Riemekasten G, Dragun D *Agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1-receptors act synergistically in systemic sclerosis patient*. Kongress für Nephrologie 2009, 26.-29.09 Göttingen, Deutschland

Catar R, **Kretzschmar T**, Näther M, Philippe A, Wagner P, Luft FC, Riemekasten G, Dragun D *Agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1-receptors act synergistically in systemic sclerosis patients* Jahrestagung der Gesellschaft Jahrestagung der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie e.V. 2009, 23.-26.09.09 Köln, Deutschland

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Duska Dragun für die Themenvergabe und die Betreuung. Herrn Dr. Rusan Catar für die Anleitung und Supervision, sowie Frau Dr. Angelika Kusch für die Korrektur dieser Arbeit. Meiner Familie danke ich für die fortwährende Unterstützung.