

Sabine Wessels
Dr. sc. hum.

Molekularbiologische Untersuchungen zur kardialen Genexpression von Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems sowie der Zytokine Endothelin-1 und Transforming Growth Factor- β 1 bei experimenteller Niereninsuffizienz

Geboren am 26.06.1963 in Oldenburg
Reifeprüfung am 04.06.1982 in Oldenburg
Studiengang der Fachrichtung Diplom-Biologie vom WS 85/86 bis WS 93/94
Vordiplom am 22.04.88 an der Universität Oldenburg
Diplom am 17.12.93 an der Universität Oldenburg

Promotionsfach: Pathologie
Doktormutter: Frau Prof. Dr. med Kerstin Amann

Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz unterschiedlicher Genese ist gekennzeichnet durch einen progressiven Untergang funktionsfähigen Nierengewebes. Kardiovaskuläre Komplikationen stellen die Hauptursache der verkürzten Lebenserwartung chronisch niereninsuffizienter Patienten dar. Das strukturelle Remodeling des Herzens ist charakterisiert durch eine linksventrikuläre Hypertrophie mit Hypertrophie der Kardiomyozyten, Aktivierung und Expansion des interstitiellen Gewebes, Wandverdickung der intramyokardialen Arterien und verringerte Kapillarversorgung mit einem Anstieg der mittleren interkapillären Sauerstoff-Diffusionsdistanz und resultierender reduzierter ischämischer Toleranz des Herzens. Diese kardialen Strukturveränderungen können zumindest partiell vom systemischen Blutdruck dissoziiert werden.

Die fehlende Aktivierung des systemischen Renin-Angiotensin-Systems sowie die aus dessen Blockade resultierenden kardioprotektiven Effekte deuten auf eine Beteiligung gewebeständiger Systeme. Neben dem Renin-Angiotensin-System werden pathogenetisch der Vasokonstriktor Endothelin-1 und das Profibrogen Transforming Growth Factor- β 1 diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung der nicht-radioaktiven RNA:RNA-*in situ* Hybridisierung zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen *in vivo* sowie die Anwendung im Tiermodell der subtotalen Nephrektomie. Mittels Klonierung selektiv amplifizierter Genfragmente sollten markierte Ribosonden synthetisiert werden. Deren Einsatz sollte die nicht-hämodynamischen Auswirkungen durch die Induktion der pathologischen Veränderungen auf die kardiale Genexpression von Angiotensinogen und Renin als Komponenten der lokalen Renin-Angiotensin-Systeme sowie von Endothelin-1 und TGF- β 1 in der Frühphase der chronischen Niereninsuffizienz darstellen. Als Modell der experimentellen chronischen Niereninsuffizienz wurde das Tiermodell der subtotalen Nephrektomie mittels Polektomie gewählt.

Subtotal nephrektomierten sowie scheinoperierten Tieren wurde nach Ablauf von 14 Tagen Versuchsdauer Herzgewebe entnommen und kryokonserviert. Mittels RT-PCR selektiv amplifizierte Genfragmente wurden in Plasmidvektoren mit Promotoren für Bakteriophagen-Polymerasen ligiert. Nach Amplifikation und Linearisierung der Rekombinanten erfolgte in der *in vitro* Transkription die Synthese von Digoxigenin-markierten RNA-Molekülen, die in der *in situ* Hybridisierung zur Detektion der gewählten Genabschnitte bzw. zur Kontrolle an den fixierten Herzpräparaten eingesetzt wurden. Die Lokalisierung erfolgte mittels indirekter Affinitätszytochemie.

Für die Ribosonde des Genfragmentes von Angiotensinogen als Komponente des Renin-Angiotensin-Systems mit 291 bp wurde eine optimale Konzentration von 125 pg/µl und eine Hybridisierungstemperatur von 52°C ermittelt. Eine Genexpression des Reninsubstrates konnte im Kontrolltier in Myozyten lokalisiert werden. Unter dem Einfluß der subtotalen Nephrektomie war diese Expression deutlich verstärkt.

Die Ribosonde Renin mit 295 bp Genfragment wurde in einer Konzentration von 100 pg/µl bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C eingesetzt. Eine Genexpression dieses Enzyms des Renin-Angiotensin-Systems konnte jedoch weder in den Kontrolltieren noch in den Versuchstieren dargestellt werden.

Die für die Ribosonde Endothelin-1 mit 340 bp Genfragment empirisch ermittelte Sondenkonzentration lag bei 50 pg/µl bei 50°C Hybridisierungstemperatur. Ein spezifisches Signal dieses Vasokonstriktors war im Kontrolltier im Interstitium und in Endothelzellen lokalisiert. In den Versuchstieren zeigte sich durch die Induktion der chronischen Niereninsuffizienz eine verstärkte Genexpression in interstitiellen und Endothelzellen sowie zusätzlich in Myozyten.

Die Sondenkonzentration der Ribosonde TGF-β1 mit 404 bp Genfragment betrug 100 pg/µl bei ebenfalls 50°C Hybridisierungstemperatur. Eine geringe Expression des Profibrogens konnte in Myozyten, interstitiellen und Endothelzellen dargestellt werden. Nach Ablauf der Versuchsdauer war in den Versuchstieren eine gesteigerte Expression in diesen Zelltypen erkennbar.

Im dargestellten Tiermodell der subtotalen Nephrektomie konnte eine gesteigerte kardiale Substratexpression des Renin-Angiotensin-Systems, jedoch keine Reninexpression, nachgewiesen werden. Der gezeigte Expressionsanstieg des Profibrogens TGF-β1 in der nach Ablauf der Versuchsdauer vorliegenden interstitiellen Myokardfibrose impliziert die Existenz von Myofibroblasten, die mittels einer erhöhten ACE-Aktivität zur lokalen Regulation der Angiotensin II- und Bradykininkonzentration befähigt sind. Korrelierend mit einer *de novo* Angiotensin II-Synthese konnte in diesem Kurzzeitversuch durch die Induktion der pathologischen Veränderungen ebenfalls eine verstärkte Expression des Vasokonstriktors Endothelin-1 nachgewiesen werden, dessen Effekte sich durch den inhibitorischen Effekt von TGF-β1 auf das gegenregulatorische NO potenzieren. Kritisch muß angemerkt werden, daß diese Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung auf Transkriptionsebene keinen allgemeingültigen Rückschluß auf die Proteinebene erlauben. Das dargestellte Exzisionsmodell der subtotalen Nephrektomie ermöglicht die Dissoziation der Frühphase der chronischen Niereninsuffizienz *per se* von sekundären Erscheinungen wie Hyperreninstatus oder Hypertonie. Der hier gezeigte Expressionsanstieg von Angiotensinogen, Endothelin-1 und TGF-β1 bei fehlender Aktivierung des systemischen Renin-Angiotensin-Systems unterstreicht somit die Bedeutung interagierender gewebeständiger humoraler neben physikalisch-mechanischen Faktoren in der kardialen Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz.