

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. MED. ARMIN KURTZ
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Der Einfluss von PACAP auf die Reninsekretion der Niere:
Eine Untersuchung am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Günther Hautmann

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. MED. ARMIN KURTZ
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Der Einfluss von PACAP auf die Reninsekretion der Niere:
Eine Untersuchung am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Günther Hautmann

2008

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Schweda
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Luchner
Tag der mündlichen Prüfung:	18.11.2008

1	Einleitung	11
1.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	11
1.1.1	Physiologische Grundlagen des RAA-Systems	11
1.1.2	Reninsynthese in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates.....	13
1.1.3	Reninsekretion.....	13
1.1.4	Intrazelluläre Kontrolle der Reninsekretion.....	15
1.1.4.1	Intrazelluläre cAMP Kaskade	15
1.1.4.2	Regulation der Reninausschüttung durch Kalzium (Ca ²⁺).....	18
1.1.4.3	Einfluss von cGMP auf die Reninsekretion	21
1.1.5	VIP als Aktivator der Adenylatzyklase und Stimulator der Reninsekretion....	22
1.2	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)	23
1.2.1	Biochemische und physiologische Grundlagen	23
1.2.2	Vorkommen und Funktion von PACAP	24
1.2.3	PACAP-Rezeptoren	26
1.2.4	PACAP als direkter Stimulator der Reninsekretion ?	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Isoliert perfundierte Rattenniere.....	29
2.1.1	Vorbereitung und Isolierung der Rattenniere.....	29
2.1.2	Perfusion der isolierten Rattenniere	31
2.2	Messung der PACAP-Plasmakonzentration in vivo	33
2.2.1	Versuchsdurchführung	33
2.2.2	Probengewinnung und Messung der PACAP-Plasmakonzentration	34
2.3	Renin-RIA	34

2.4	Auswertung	35
2.4.1	Berechnung der Reninaktivität.....	35
2.4.2	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Wirkung von PACAP auf die Reninsekretion der Niere.....	37
3.1.1	Stimulation der Reninsekretion durch PACAP.....	37
3.1.2	Abhängigkeit der Stimulation von der PACAP-Konzentration.....	38
3.1.3	Wirkung von PACAP(1-38).....	40
3.1.4	Hemmung der Effekte von PACAP auf die Reninsekretion durch Angiotensin II	41
3.2	Wirkungsmechanismus von PACAP	42
3.2.1	Wirkung von PACAP in Abhängigkeit von Ca ²⁺	42
3.2.2	Wirkung von PACAP in Abhängigkeit von cAMP	43
3.2.2.1	Wirkung von PACAP in Kombination mit Isoproterenol.....	43
3.3	Wirkung von PACAP in Kombination mit VIP.....	45
3.4	PACAP Konzentration im Plasma	47
4	Diskussion	49
4.1	Wirkungsweise von PACAP auf die Reninsekretion.....	49
4.1.1	Stimulation der Reninsekretion durch PACAP.....	49
4.1.1.1	Reversibilität des PACAP-Effektes	50
4.1.1.2	Hemmung des PACAP-Effektes durch Angiotensin II.....	51

4.1.2	Wirkungsunterschiede zwischen PACAP(1-38) und PACAP(1-27)	51
4.1.3	Wirkungsweise von PACAP in Abhängigkeit von Ca ²⁺	52
4.1.4	Wirkungsweise von PACAP in Abhängigkeit von cAMP	53
4.2	Interaktion von PACAP und VIP	54
4.3	PACAP-Konzentration im Plasma in vivo	57
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	61
7	Danksagung	79

1 Einleitung

1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

1.1.1 Physiologische Grundlagen des RAA-Systems

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist ein zentraler Regulationsmechanismus des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes des Körpers. Es ist ein hormonelles System, dessen Aktivierung durch die Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere erfolgt. Renin ist eine Protease und spaltet aus dem in der Leber synthetisierten und ins Plasma freigesetzten Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab. Angiotensin I wird durch das Angiotensin-Konversionsenzym („angiotensin-converting enzyme“, ACE), das vor allem an der luminalen Oberfläche des Endothels, zum Beispiel in der Lunge lokalisiert ist, in das stark vasokonstriktorisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II kann durch eine Reihe von Mechanismen die Homöostase des Kreislaufs beeinflussen und zu einer Erhöhung des Blutdrucks führen. So steigert Angiotensin II den systemischen Blutdruck durch seine verengende Wirkung auf die Arteriolen. Es erniedrigt des weiteren den renalen Blutfluss und damit die glomeruläre Filtrationsrate, vermutlich über die vasokonstringierende Wirkung auf die Arteriolen der Niere. ^(61;62)

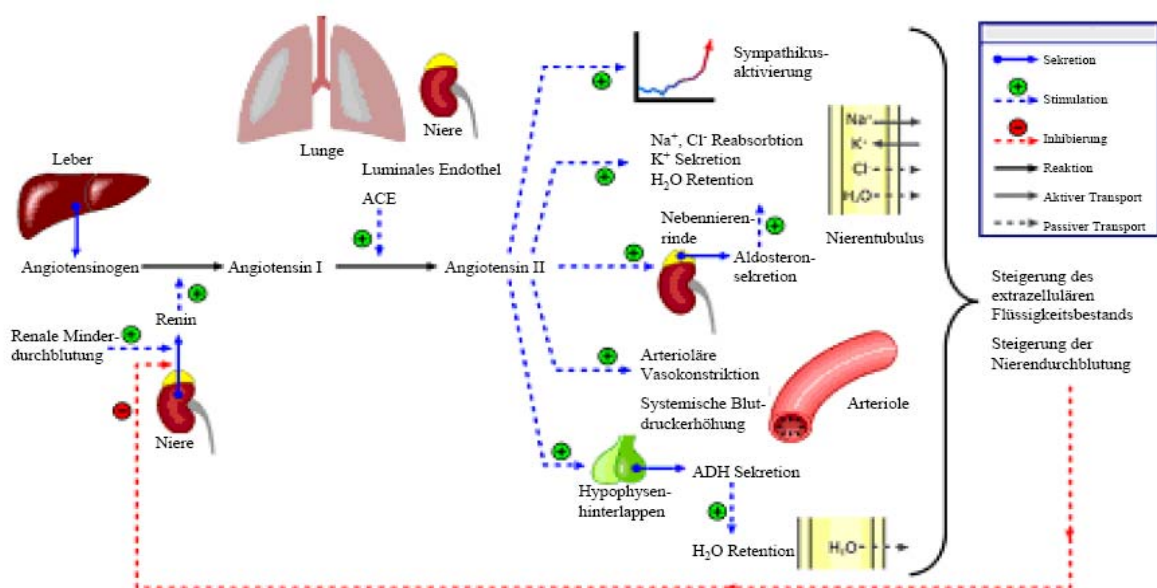


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems.

Angiotensin II wird von Angiotensinasen durch die Abspaltung einer weiteren Aminosäure zu dem unwirksamen Angiotensin III abgebaut. Die Halbwertszeit von Angiotensin II im Blut liegt bei ca. einer Minute. ⁽⁶¹⁾

Die Freisetzung von Renin aus den granulierten Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere ist Voraussetzung für die Bildung von Angiotensin II im Plasma. Jede Form der renalen Minderdurchblutung, gleichgültig ob sie auf einer systemischen Blutdrucksenkung oder lokalen vasokonstriktorischen Reaktionen bzw. pathologischen Veränderungen der Nierengefäße beruht, löst eine vermehrte Reninfreisetzung aus den granulierten Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere aus. Auch ein Mangel an NaCl im Gesamtorganismus steigert über einen noch nicht genau bekannten Mechanismus die Freisetzung von Renin. Eine gesteigerte Aktivität der sympathischen Nierennerven, wie sie als Folge einer verminderten Erregung der Vorhofrezeptoren und arteriellen Pressorezeptoren bei Abnahme des intravasalen Volumens auftritt, führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Reninfreisetzung. Diese Sekretion ist β -Adrenozeptor vermittelt. ^(45;61)

Angiotensin II ist neben seiner vasokonstriktorischen Wirkung ein starker Stimulator der Aldosteronsekretion. Bei einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems nimmt daher auch die Aldosteronkonzentration im Blut zu. Wegen dieser engen Verknüpfung werden die drei Substanzen oft auch als Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zusammengefasst.

Aldosteron steigert die tubuläre Resorption von Na^+ und H_2O sowie die K^+ - und H^+ -Sekretion und erhöht auf diese Weise den Natrium- und extrazellulären Flüssigkeitsbestand des Körpers. Zugleich verstärkt Aldosteron die Erregbarkeit der glatten Gefäßmuskulatur gegenüber konstriktorischen Reizen und unterstützt somit die blutdrucksteigernde Wirkung von Angiotensin II. ^(45;61;62)

Über die Erhöhung der Sekretion von Antidiuretischem Hormon (ADH) im Hypothalamus bewirkt Angiotensin II eine Steigerung des Durstgefühls und Appetites auf NaCl.

Über einen rückkoppelnden Mechanismus hemmt Angiotensin II die Ausschüttung von Renin in den juxtaglomerulären Zellen der Niere. ⁽⁶¹⁾

Zusätzlich zu diesem globalen Renin-Angiotensin-System gibt es in vielen Organen (z.B. Gehirn, Hoden, Herz) ein lokales Renin-Angiotensin-System, das alle notwendigen Komponenten zur Synthese von Angiotensin II enthält (extrarenales System). Die Bedeutung dieses

Systems ist noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen stützen jedoch die Hypothese, dass dieses lokale System zum Beispiel eine pathogenetische Rolle bei der Entstehung bestimmter Hochdruckformen spielt. ⁽⁶¹⁾

1.1.2 Reninsynthese in Zellen des juxtaglomerulären Apparates

Das Reningen ist sowohl bei Ratten und Mäusen als auch beim Menschen auf Chromosom 1 lokalisiert. Bei Ratten besteht das Renin-Gen aus 9 Exons und 8 Introns, während beim Menschen ein zusätzliches Miniexon (Exon Va), das nur für drei Aminosäuren codiert, existiert. ⁽¹⁾

Das Gen wird transkribiert, die mRNA prozessiert und letztendlich ins Protein Pre-Pro-Renin mit 401 Aminosäuren translatiert. Pre-Pro-Renin wird ins Endoplasmatische Retikulum überführt, in welchem 20 Aminosäuren abgespalten werden, so dass Pro-Renin entsteht. Das inaktive Pro-Renin wird entweder kontinuierlich ins Blutsystem abgegeben oder in sekretorischen Vesikeln des Golgi-Apparates gespeichert. Pro-Renin wird durch Entfernen einer - aus 46 Aminosäuren bestehenden - Prosequenz am N-terminalen Ende in aktives Renin umgewandelt.

Der genaue Mechanismus durch den die Prosequenz von Pro-Renin entfernt wird, ist noch nicht bekannt. Da Cathepsin B in den sekretorischen Vesikeln vorkommt, ⁽⁵⁰⁾ gibt es die Vermutung, dass diese Protease an der Prozessierung von Renin beteiligt ist. ⁽⁹⁾ Es existieren aber auch Hinweise, dass Kallikreine und Proprotein-Konvertase PC5 ⁽⁵⁰⁾ an der Prozessierung beteiligt sind.

1.1.3 Reninsekretion

Die Reninfreisetzung aus den reninbildenden juxtaglomerulären Zellen erfolgt durch regulierte Exozytose.

Hinweise auf Exozytose als Sekretionsmechanismus gab es in in vitro Versuchen, die zeigten, dass Renin nicht kontinuierlich in die afferenten Arteriolen abgegeben wird, sondern in quantenartigen Einheiten. ⁽⁵⁰⁾

In vivo Versuche haben gezeigt, dass bei Stimulation die Anzahl der Renin speichernden Vesikel abnimmt, während die Größe der verbleibenden Vesikel unverändert bleibt. ⁽²²⁾ Es handelt sich um einen „alles oder nichts“ – Typ von Exozytose, bei der die Vesikel mit der Zellmembran verschmelzen. ^(19;20)

Auch elektrophysiologische Untersuchungsmethoden sprechen für die Exozytose als Weg der Reninabgabe in den Kreislauf. ⁽⁵⁰⁾

Es gibt eine kontinuierliche Exozytose von Pro-Renin, die hauptsächlich von der aktuellen Syntheserate abhängig ist, sowie eine Freisetzung von aktivem Renin aus den sekretorischen Vesikeln. Diese Freisetzung von aktivem Renin ist ein sehr schnell ablaufender Prozess, der unter Kontrolle mehrerer intrarenaler und systemischer Faktoren steht. Bei der Regulation, ob Pro-Renin direkt systemisch freigesetzt wird oder gespeichert wird, ist die Glykosilierung Pro-Renins an Mannose-6-Phosphatreste ein wichtiger Regulationsmechanismus. ^(50;6)

Wie die Fusion der Speichervesikel mit der Zellmembran funktioniert, ist bis jetzt nur unvollständig verstanden. Wichtig scheint dabei vor allem die Rolle des Ca^{2+} zu sein. Bisherige Studien gaben Hinweise dafür, dass einerseits die Schwellung der Speichervesikel, andererseits das Zytoskelett der JG-Zellen die bedeutendsten Rollen spielen. ^(25;30)

Ähnlich wie bei anderen exokrinen Zellen scheint die Schwellung der Speichervesikel der zentrale Mechanismus im Rahmen der Exozytose zu sein. ^(25;50) Erniedrigung der extravasikalen Osmolarität führt zu einer Schwellung der Speichervesikel und zu einer Zunahme der Fusionen von Zellmembran und Speichervesikel. Es wird vermutet, dass das Vesikelvolumen, nicht das Zellvolumen, den Reiz für die Exozytose darstellt. Darauf deuten Studien an isolierten Reninvesikeln hin. ⁽²⁴⁾

Funktionelle Studien geben Hinweise, dass das Vesikelvolumen chemoosmotischer Kontrolle unterliegt und dass eine H^+ -Pumpe und ein KCl-H^+ Austauscher die Hauptkomponenten sind, welche die Vesikelschwellung regulieren. ⁽²⁸⁾

Die Reninspeichervesikel enthalten neben Renin lysosomale Enzyme. Sie haben autophagozytotische Kapazität und einen pH von ungefähr 5,5 ähnlich dem von Lysosomen. Der niedrige pH wird hauptsächlich durch die H^+ -ATPase bewirkt, der KCl-H^+ Austauscher nutzt diesen Protonengradienten aus und bewirkt somit einen KCl Einstrom in die Vesikel. Der mit dem KCl gekoppelte Wassereinstrom in die Vesikel bewirkt die eigentliche Schwellung der Vesikel. ⁽²⁹⁾

Wahrscheinlich wird die Exozytose neben dem Mechanismus der Vesikelschwellung auch durch das Zytoskelett der JG-Zelle reguliert.

Juxtaglomeruläre Zellen entspringen den selben Vorläuferzellen wie glatter Muskelzellen. Trotz Ihrer Spezialisierung enthalten sie Aktin- und Myosinfilamente.⁽⁵⁰⁾

Abhängig vom Kontraktionszustand der Filamente können die Reninvesikel Kontakt mit der Zellmembran bekommen. Dabei verhindert eine Kontraktion der Filamente die Fusion der Vesikelmembran mit der Zellmembran.⁽³⁰⁾

Eine Zerstörung von Aktin- und Myosinfilamenten in JG-Zellen der Maus zeigt eine Zunahme der Exozytoserate.⁽²⁰⁾ Während eine Ca^{2+} induzierte Kontraktion die Reninsekretion zu hemmen scheint.^(33;50)

1.1.4 Intrazelluläre Kontrolle der Reninsekretion

Wie bei anderen sekretorischen Zellen gibt es auch in JG-Zellen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden und „second messenger“, wie cAMP, cGMP und Ca^{2+} , welche die Reninausschüttung regulieren. Dabei sind nach dem heutigen Stand der Dinge cAMP der potenteste Stimulator der Reninsekretion, Ca^{2+} die wichtigste inhibierende Substanz, während die Rolle von cGMP sowohl stimulierend als auch inhibierend sein kann.

1.1.4.1 Intrazelluläre cAMP Kaskade

Von allen „second messenger“ sind die Effekte von cAMP auf das Renin-Angiotensin-System am besten erforscht.

Eine direkte Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels bewirkt auch eine Steigerung der Reninsekretion. Das direkte Einbringen von cAMP mittels Patch-Pipette führt zu einer nachweisbaren Stimulation der Exozytosevorgänge.⁽⁵⁰⁾

Der zytoplasmatische cAMP-Spiegel kann einerseits durch einen Aufbau von cAMP mittels Adenylatzyklase, andererseits durch die Hemmung des Abbaus von cAMP mittels Phosphodiesterasen erhöht werden.

Eine nicht Rezeptor vermittelte Steigerung der Aktivität des Enzyms Adenylatzyklase stimuliert die Reninsekretion. Das als direkter Aktivator der Adenylatzyklase bekannte Diterpen Forskolin, erhöht den cAMP-Spiegel in JG-Zellen und führt zu einer signifikanten Steigerung der Reninausschüttung. ⁽⁴⁸⁾

Hormone, die den intrazellulären cAMP Spiegel nachweislich anheben, stimulieren auch die Reninsekretion. Die meisten Daten existieren dabei über den β -Adrenozeptor, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, der die Adenylatzyklasen stimuliert. Pharmakologische Stimulation des β -Adrenozeptors in vivo steigert die Reninausschüttung, während seine Blockade den gegenteiligen Effekt zeigt. ^(48;49) Auch die Steigerung der Reninsekretion über Stimulation des renalen Nervensystems scheint β -Adrenozeptor vermittelt zu sein. ⁽⁵¹⁾

Andere Metabolite, die bekanntermaßen die Adenylatzyklase zu stimulieren, wie Prostazyklin, Prostaglandin E₂, Dopamin oder Glukagon stimulieren ebenfalls die Reninausschüttung. ^(50;54;57)

Eine Hemmung der Adenylatzyklase bewirkt einen Rückgang der Reninsekretion, auch unter einer Vorstimulation mit Isoproterenol oder Prostazyklin. ⁽⁵⁹⁾ Dieser Effekt wurde in neueren Arbeiten für Ca^{2+} nachgewiesen. ⁽²⁷⁾ Ca^{2+} inhibierte die Adenylatzyklasen AC5 und AC6, und konnte auf diesem Weg die Reninausschüttung vermindern. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Membrangängigen cAMP-Derivaten aufgehoben werden. ⁽²⁷⁾

Die zytosolische Konzentration von cAMP wird neben dem Aufbau mittels Adenylatzyklase auch durch die Hydrolyse zu 5'-AMP mittels cAMP-Phosphodiesterase (PDE) katalysiert. ⁽⁶⁰⁾ Es wurde beobachtet, dass nichtselektive Hemmung der Phosphodiesteraseaktivität zum Beispiel durch Xanthinderivate, wie Isomethylbutyl Xanthin oder Theophyllin die Reninabgabe stimuliert. Die bedeutende Rolle der PDE bei der Regulation des cAMP-Spiegels in der Zelle wurde durch spezifische Blockade der verschiedenen PDE Isoformen deutlich. Hauptsächlich die PDE-3 und PDE-4 sind an der Regulation des cAMP Spiegels in JG-Zellen beteiligt. ^(65;66) Selektive Hemmung von PDE-3 und PDE-4 stimuliert stark die Ausschüttung von Renin aus JG-Zellen. ⁽⁶⁷⁾

Während noch kein Regulationsmechanismus von PDE-4 bekannt ist, wird PDE-3 über cGMP reguliert. Eine Zunahme von cGMP führt zu einer Hemmung von PDE-3 und damit zu einer Steigerung von cAMP, was zu einer vermehrten Reninsekretion führt. ^(65;67)

Auch wenn allgemein akzeptiert wird, dass cAMP ein potenter Stimulator der Reninsekretion ist, kennt man den genauen Mechanismus der Stimulation der Reninabgabe über die

Exozytose von Vesikeln mittels cAMP nicht. Forschungsschwerpunkte sind dabei die Rolle von Proteinkinase A und zu der These, dass der Effekt indirekt über Ca^{2+} vermittelt wird.

Eine Hypothese besagt, dass der Effekt von cAMP über die Aktivitätszunahme von Proteinkinase A, wie in anderen Zelltypen, vermittelt wird. Dieser Ansatz wird dadurch gestärkt, dass in isoliert perfundierten Rattennieren und bei isolierten JG-Zellen die Blockade von Proteinkinase A die cAMP getriggerte Stimulation der Reninsekretion unterdrückt. ^(68;69)

Eine mögliche Erklärung wie Proteinkinase A die Fusion von Speichervesikeln und Zellmembran beeinflussen könnte, ist über den Kontraktionszustand der Aktin-Myosinfilamente. Es ist bekannt, dass cAMP zu einer Erschlaffung von glatten Muskelzellen führt, und zwar über eine Phosphorylierung von leichten Myosinketten, was bei JG-Zellen zu einer gesteigerten Reninsekretion führen würde. ⁽⁵⁰⁾

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass cAMP die Vesikelschwellung über Proteinkinase A vermittelte Aktivierung von H^+ -Pumpen beeinflusst. Auch das würde zu einer erhöhten Rate von Verschmelzungsvorgängen zwischen Speichervesikeln und der Zellmembran führen.

Weiterhin könnte die Stimulation der Reninausschüttung mittels cAMP indirekt über eine Erniedrigung der zytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration vermittelt sein. Diese These wird dadurch gestützt, dass cAMP in JG-Zellen die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speicher hemmt, und dass Adenylatzyklase die Permeabilität der Plasmamembran für Ca^{2+} herabsetzt. ^(34;48)

Diese These wird indirekt dadurch gestützt, dass die cAMP vermittelte Stimulation der Reninausschüttung durch eine Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration abgeschwächt wird, zum Beispiel durch Angiotensin II.

Gegen diese These spricht allerdings, dass eine Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zwar die Reninsekretion erhöht, die Stimulierbarkeit durch cAMP unter diesen Umständen aber nicht reduziert sondern sogar verstärkt ist.

1.1.4.2 Regulation der Reninausschüttung durch Kalzium (Ca^{2+})

Während cAMP der Hauptstimulator für die Reninsekretion ist, scheint das nicht proteingebundene zytosolische Ca^{2+} der wesentliche inhibitorische Faktor der Reninsekretion zu sein. Im Gegensatz zu anderen exokrinen Zellen, bei denen Ca^{2+} die Hormonausschüttung steigert, hemmt Ca^{2+} die Exozytose von Renin, was auch als „Calcium-Paradoxon“ der Reninabgabe bezeichnet wird.

Das momentane Wissen über die Effekte intrazellulären Ca^{2+} ist durch Untersuchungen, die indirekt die zytosolische Ca^{2+} Konzentration beeinflussen entstanden.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass klassische Vasokonstriktoren wie Angiotensin II oder Vasopressin, die auch die Ca^{2+} Konzentration in glatten Muskelzellen erhöhen, starke Inhibitoren der Reninsekretion sind. ^(75;76;30;99) Dieser Effekt der Vasokonstriktoren ist vom Vorhandensein extrazellulären Ca^{2+} abhängig. Schließlich wurde auch ein direkter Ca^{2+} Einstrom in die Zelle als eine Wirkung von - die Reninsekretion hemmenden - Hormonen wie Angiotensin II und Vasopressin nachgewiesen. Aufgrund dieser Forschungsergebnisse ist es naheliegend, dass die Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} Spiegels für den Effekt der Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems verantwortlich ist. ^(48;99)

Neben der Manipulation der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration mittels Hormonen, wurde auch der Einfluss der extrazellulären Ca^{2+} Konzentration eingehend untersucht. Eine Erniedrigung des extrazellulären Ca^{2+} Spiegels erhöht die Reninausschüttung, während durch eine zusätzliche Infusion von Ca^{2+} bei in vivo Versuchen die Reninausschüttung gehemmt werden kann. ⁽³⁴⁾ Man nimmt an, dass ursächlich hierfür eine Ca^{2+} Verschiebung von intrazytoplasmatisch nach extrazellulär und umgekehrt ist. ^(30;50;75)

Neuere Arbeiten konnten einen Zusammenhang zwischen der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} Spiegels und einer Erniedrigung des cAMP Spiegels finden. ⁽²⁷⁾ Dafür wurden die Ca^{2+} abhängigen Adenylatzyklen AC5 und AC6 verantwortlich gemacht.

Während der Einfluss des Ca^{2+} auf die Reninausschüttung mittlerweile unbestritten ist, gibt es noch intensive Forschung über die Art des Ca^{2+} Einstroms in die Zelle und die Ausschleusung von Ca^{2+} aus der Zelle. Ein Ca^{2+} -Einstrom kann entweder aus dem Extrazellulärraum oder aus intrazellulären Speichern erfolgen.

Lange Zeit erschien die Forschung bezüglich des Ca^{2+} Einstroms aus dem Extrazellulärraum mittels L-Typ Ca^{2+} -Kanälen am vielversprechendsten, ihre Rolle ist trotz vieler Studien aber immer noch umstritten.

Da die JG-Zellen transformierte glatte Muskulatur darstellen und in glatten Muskelzellen spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle für die Kontraktion hauptverantwortlich sind, nahm man an, dass diese Kanäle auch bei der Reninsekretion in juxtaglomerulären Zellen eine Rolle spielen. Es gibt einige Versuche, die indirekte Hinweise auf eine Rolle der Kanäle geben. So stimulieren L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker die Reninsekretion und eine pharmakologische Öffnung der Kanäle bewirkt eine Hemmung der Reninausschüttung. ⁽⁷⁶⁾

Andere Studien zeigen keinen Einfluss der Blockade der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle auf die Reninausschüttung. Direkte Untersuchungsmethoden, zum Beispiel elektrophysiologischen Methoden, ergaben ebenfalls keinen Beweis für einen Einfluss der Kanäle auf die Reninsekretion. ^(34;81;82)

Eine mögliche Erklärung für die Beeinflussung der Reninsekretion durch L-Typ Ca^{2+} -Kanal Modulatoren ist ein direkter Einfluss dieser Stoffe auf die Reninausschüttung. ⁽⁸³⁾

Einfluss auf die Reninsekretion scheint hingegen der Einstrom von Ca^{2+} über Calcium abhängigen Ca^{2+} -Kanälen (CRAC) zu haben. Solch ein Ca^{2+} Einstrom über CRAC entsteht zum Beispiel durch die Leerung der intrazellulären Speicher mittels Thapsigargin, das die sarkoendoplasmatische Ca^{2+} -ATPase hemmt. ⁽³⁸⁾ Es führt zu einer starken Hemmung der Reninausschüttung, und schwächt den stimulierenden Effekt von β -Adrenozeptoragonisten ab bzw. hebt ihn auf. Erniedrigung der extrazellulären Ca^{2+} Konzentration hemmt nahezu sofort diesen Effekt von Thapsigargin, so dass der Effekt sehr wahrscheinlich über den Einstrom des extrazellulären Ca^{2+} zu Stande kommt. ⁽³⁴⁾

Neben dem Ca^{2+} Einstrom aus dem Extrazellulärraum kann Ca^{2+} auch aus intrazellulären Speichern, vor allem mittels Inositoltriphosphat (IP_3), ausgeschüttet werden. Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Reninsekretion zu haben. So steigert 8-N,N-diethylaminodioctyl-3,4,5-trimethoxybenzoate durch eine Hemmung der intrazellulären Ca^{2+} Freisetzung die basale Reninfreisetzung an der isoliert perfundierten Rattenniere. ^(59;86) Des Weiteren bewirkt eine Anschaltung der Phospholipase C mittels Angiotensin II, vermutlich durch das Entstehen von IP_3 als „second messenger“, eine Hemmung der Reninausschüttung. Blockade von intrazellulärer Ca^{2+} Ausschüttung mittels TMB-8 schwächt den Effekt von Angiotensin II merklich ab. ^(50;86)

Unklar ist, in wie weit das ausgeschüttete Ca^{2+} direkt die Reninfreisetzung hemmt oder ob die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} vorwiegend über die Aktivierung Calcium abhängigen Ca^{2+} -Kanälen wirkt.

Die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration ist nicht nur von dem Ca^{2+} Einstrom aus dem Extrazellulärraum oder den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern abhängig sondern auch von der Ca^{2+} Ausschleusung aus dem Zytosol. Normalerweise geschieht diese Ausschleusung mittels der Ca^{2+} -ATPase, die das Calcium aktiv in den Extrazellulärraum oder in die intrazellulären Speicher transportiert und über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher der den Na^+ Gradienten nutzt, um Ca^{2+} in den Extrazellulärraum zu transportieren. Neben den Untersuchungen über die zytoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase mit Thapsigargin, beeinflussen auch unselektive Blocker des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wie Vanadate die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration.

Im Gegensatz zu der klaren Studienlage über die Ca^{2+} -ATPase, gibt es verschiedene Ergebnisse bei den Studien über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Der Austauscher wird maßgeblich durch den Na^+ Gradienten angetrieben. Sowohl eine Blockade der Na^+/K^+ -ATPase, die den Na^+ -Gradienten erniedrigt, als auch eine direkte Erniedrigung der extrazellulären Na^+ Konzentration, vermindert eine Ca^{2+} Elimination und führt zu einem zytosolischen Ca^{2+} Anstieg.⁽⁵⁰⁾ Während eine Blockade der Na^+/K^+ -ATPase die Reninsekretion abschwächt, hat die Erniedrigung des extrazellulären Na^+ Gradienten keinen signifikanten Einfluss auf die Reninausschüttung.⁽⁸⁹⁾ Das spricht gegen eine wichtige Rolle des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers bei der Regulation der Reninsekretion. Da beide oben genannte Methoden sehr unspezifisch sind, wurde ein selektiver Blocker des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (KB-R7943) an der isoliert perfundierten Rattenniere untersucht. Während KB-R7943 den Gefäßwiderstand stark erhöht, hat er keinen entscheidenden Einfluss auf die Reninsekretion.^(89;50) Dies unterstreicht die These der geringen Bedeutung des Tauschers für die Reninsekretion.

Zusammenfassend gibt es keine begründbaren Zweifel an der Hemmung der Reninkonzentration durch den zytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegel. Sowohl der Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum als auch die Ca^{2+} Freisetzung aus den intrazellulären Speichern scheinen die Reninausschüttung zu regulieren. Daneben scheint auch noch der Ca^{2+} -ATPase eine Rolle bei der Regulation der Reninausschüttung zuzukommen.^(96;50)

1.1.4.3 Einfluss von cGMP auf die Reninsekretion

Im Gegensatz zu cAMP, das die Reninausschüttung stimuliert und Ca^{2+} , das die Reninsekretion hemmt, weist cGMP sowohl einen hemmenden als auch einen stimulierenden Effekt auf. Dieser duale Effekt hat zu kontroversen Diskussionen über die Rolle von cGMP bei der Reninsekretion geführt. Wichtige Enzyme über deren Aktivierung cGMP einen Einfluss auf die Reninsekretion auszuüben scheint, sind die PDE-3 und die cGMP abhängige Proteinkinase II.

Wenn man membranpermeable cGMP Analoga einschleust - wie 8-bromo-cGMP oder 8parachlorphenylthio-cGMP - hemmen diese Analoga die Reninausschüttung in verschiedenen Modellen in einer Konzentration höher als $5 \mu\text{M}$.^(50;68)

Allerdings haben natives cGMP und stabile cGMP Derivate nicht den selben Effekt auf die Reninfreisetzung. Natives cGMP hat eine hohe Affinität zu cAMP abbauender Phosphodiesterase PDE-3 und eine niedrigere Affinität zu cGMP aktivierten Kinasen, während stabile cGMP Derivate lediglich eine hohe Affinität zu cGMP aktivierter Kinase haben.^(50;65)

Wie bereits erwähnt, hat PDE-3 eine bedeutende Rolle für den intrazellulären cAMP Spiegel. Natives cGMP hemmt PDE-3, erhöht damit den cAMP Spiegel und führt zu einer Reninausschüttung. Das wird durch die höhere Affinität von PDE-3 zu cGMP als zu cAMP bewirkt.⁽⁶⁸⁾

Dabei ahmt die Blockade von PDE-3 die Effekte von NO nach, für das ein stimulierender Effekt in vitro und in vivo weitgehend akzeptiert ist. NO Donatoren erhöhen genau wie PDE-3 Inhibitoren die intrazelluläre cAMP Konzentration und die Reninfreisetzung in primären JG-Zellkulturen.^(65;66;69)

Für ANP, das ebenfalls die zytoplasmatische cGMP-Konzentration erhöht, wird ein hemmender Effekt weitgehend akzeptiert, auch wenn es in der Vergangenheit differente Studienergebnisse gab.

In den juxtaglomerulären Zellen kommen als Proteinkinasen unter anderem cGMP abhängige Proteinkinase I und cGMP abhängige Proteinkinase II vor. Während die cGMP abhängige Proteinkinase I in JG Zellen keinen erwähnenswerten Effekt auf die Reninsekretion hat, hat cGMP abhängige Proteinkinase II (cGKII), die vor allem in Verbindung mit Reninspeichervesikeln vorkommt, einen wichtigen Einfluss auf die Reninsekretion. Aktivierung von cGKII führt zu einer merklichen Hemmung der Reninsekretion.^(50;110)

Der Effekt wie cGMP über die cGKII die Exozytose von Renin hemmt, ist noch nicht geklärt.

Es ist nicht klar welcher Effekt von cGMP, der Stimulierende oder der Hemmende, in vivo überwiegt. Man könnte auf Grund der Rezeptoraffinitäten von cGMP davon ausgehen, dass die Reninsekretion bei niedrigen Konzentrationen - PDE-3 vermittelt - getriggert wird, bei höheren Konzentrationen - cGKII vermittelt - gehemmt wird. Eine andere Hypothese, die durch die verschiedenen intrazelluläre Verteilung von cGMP Zielmodulen begründet ist, besagt, dass für cGMP in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle unterschiedliche Effekte vorherrschen. ⁽¹¹²⁾

1.1.5 VIP als Aktivator der Adenylatzyklase und Stimulator der Reninsekretion

Bei der Forschung über die Regulationsmechanismen des Gastrointestinaltraktes wurde das heute als klassisches Peptidhormon bekannte Vasoaktive Intestinale Polypeptid gefunden. ^(18;53) VIP („vasoaktive intestinal peptide“) wird vom sogenannten APUD-Zellsystem, dem peripheren endokrinen („amin precursor uptake and decarboxylation“) Zellsystem, gebildet und kommt dabei vor allem in den Nervenendigungen der gastrointestinalen Nervengeflechte in Magen, Dünndarm und Pankreas vor. ^(53;55)

VIP bewirkt dabei eine Motilitätshemmung im Gastrointestinaltrakt und eine Steigerung der intestinalen Sekretion von Pankreas und Galle, sowie eine Hemmung der HCl-Sekretion im Magen. ^(18;53;55)

Daneben kommt VIP in cholinergen Neuronen neben Acetylcholin vor. Dabei hat VIP vor allem Wirkung als erregender Transmitter an Drüsenzellen und vasodilatatorischen Neuronen. Als hemmender Transmitter wirkt es an Motoneuronen. ^(31;32)

Als intrazellulärer Signalweg für die gastrointestinale Wirkung von VIP wurde wie bei ähnlich wirkenden Substanzen, die ebenfalls die Sekretion ins Darmlumen erhöhen und die Motilität hemmen, wie zum Beispiel Sekretin und GIP („gastric inhibitory peptide“), eine Aktivierung der Adenylatzyklase nachgewiesen. ^(18;53) Diese Aktivierung der Adenylatzyklase scheint auch die entscheidende Rolle für die systemische vasoaktive Wirkung von VIP zu sein. ^(10;8)

Da eine Aktivierung der Adenylatzyklase auch zu einer vermehrten Ausschüttung von Renin führt, konnte man annehmen, dass auch VIP die Reninsekretion steigern könnte. Dieser Effekt konnte auch nachgewiesen werden. ^(26;23;21;15;14;11;10;7) Dabei stimuliert VIP bei Hunden ab einer Konzentration von 1 nM konzentrationsabhängig die Reninsekretion. ⁽²³⁾

Weitere Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass VIP keinen humoralen Effekt auf das Renin-Angiotensin-System hat, sondern als Neurotransmitter Einfluss auf die Reninsekretion hat. ^(14;46;10)

1.2 **Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)**

1.2.1 Biochemische und physiologische Grundlagen

Die sekretorische Aktivität der Adenohypophyse wird durch verschiedene Peptidhormone gesteuert. ^(2;3) Anfangs wurden ihrer Wirkung nach fünf verschiedene Hormone unterschieden. Sie wurden in thyreotropin-releasing Hormon, gonadotropin-releasing Hormon, Somatostatin, corticotropin-releasing factor und growth hormone releasing factor eingeteilt. All diese Peptidhormone werden in hypothalamischen Neuronen synthetisiert. Gemeinsam haben diese Hormone, dass sie in im zentralen Nervensystem vorkommen aber auch in peripheren Organen weit verbreitet sind. Später wurden noch zwei weitere Neuropeptide entdeckt und beschrieben, prolactin-releasing peptide und pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). ^(4;17)

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) kommt physiologischerweise als ein aus 27 oder 38 Aminosäuren bestehendes Neurohormon vor. Erstmals wurde 1989 aus dem Hypothalamus von Schafen das 38 Aminosäuren umfassende Peptid isoliert. ^(4;17) Anhand der Aminosäurestruktur wurde vermutet, dass es noch ein weiteres, aus 27 Aminosäuren bestehendes, pituitary adenylat cyclase-activating polypeptide geben müsse, dass 1990 auch tatsächlich gefunden wurde. ⁽¹⁶⁾

Während das N-terminale Ende von PACAP(1-27) und PACAP(1-38) identisch ist, existiert bei PACAP(1-38) am C-terminalen Ende eine zusätzliche kurze bewegliche Helix. ^(35;36) Die Beobachtung, dass das N-terminale Ende gleich ist, deutet darauf hin, dass das N-terminale Ende die bedeutende Rolle für die Aktivität von PACAP hat. ⁽⁹³⁾ Eine Deletion der N-terminalen Aminosäuren vermindert signifikant die Adenylatzyklase stimulierende Wirkung.

So ist auch der potenteste bekannte Blocker der PACAP-Rezeptoren eine 38 Aminosäuren langes PACAP ähnliches Molekül, bei dem die ersten 5 Aminosäuren fehlen. ^(17;92)

Die Sequenz von PACAP wurde während der Evolution bemerkenswert gut erhalten, besser als zum Beispiel die Sequenz von Vasoaktiven Intestinalem Peptid (VIP). ⁽⁵⁸⁾ Das spricht dafür, dass PACAP eine entscheidende Rolle bei wichtigen biologischen Funktionen spielt.

Die primäre Struktur ist - soweit erforscht - bei Säugetierspezies identisch, so auch bei Mensch, Ratte und Maus. ^(4;39;40)

Bei Reptilien sind die ersten 28 Aminosäuren des PACAP(1-38) Peptides die selben wie bei den Säugetieren. ⁽⁴²⁾ Ähnlich ist es bei Amphibien und Fischen, bei denen auch die für die Funktion wichtige Sequenz, bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 27, über die Evolution erhalten blieb. Selbst bei Insekten, so bei Drosophilaarten, wurden PACAP ähnliche Peptide nachgewiesen. ⁽⁷¹⁾

Im Gegensatz zum N-terminalen Ende von PACAP gibt es beim C-terminalen Ende, das für die biologische Aktivität nicht benötigt wird, mehrere verschiedene Varianten. ^(17;63)

1.2.2 Vorkommen und Funktion von PACAP

PACAP gehört zu einer Familie von Hormonen, die auch Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP), Glukagon und Wachstumshormon releasing factor und Sekretin umfasst. ⁽⁷⁴⁾ Die Aminosäuresequenz von PACAP und VIP sind zu 68% identisch. ⁽⁸⁸⁾

In mehreren Geweben gibt es Zellen, die sowohl PACAP als auch VIP synthetisieren und freisetzen. ^(36;37;91) Beispiele sind die Nervenzellen des Ösophagussphinkters, des Darms und des Respirationstraktes sowie Nebenschilddrüsenzellen. ^(36;37;91)

Innerhalb des ZNS ist PACAP im Hypothalamus in der höchsten Konzentration anzutreffen. Dabei sind nur ca. 10% der Peptide PACAP(1-27) der Rest PACAP(1-38). ^(94;95) Neben dem Hypothalamus wurde PACAP in vielen andern Hirnregionen nachgewiesen. ^(97;100;101;102;113)

Ausserhalb des ZNS konnte PACAP in den meisten endokrinen Drüsen nachgewiesen werden. Hohe Konzentrationen wurden in der Hypophyse, in den Gonaden, der Nebenniere und dem endokrinen Pankreas gefunden. Die höchste Konzentration von PACAP wurde bei Ratten jedoch in den Keimzellen der Hoden nachgewiesen. ^(17;94) PACAP kommt auch im

Urogenitaltrakt, im respiratorischen Trakt und Verdauungstrakt vor. Dabei wurde es in erster Linie in Nervenfasern gefunden, es lässt sich aber auch im Organgewebe selbst nachweisen. (47;43;94)

Wie im ZNS kommt auch in peripheren Geweben PACAP(1-38) in höherer Konzentration vor als PACAP(1-27).⁽⁹⁴⁾ In verschiedenen Organen herrscht jedoch eine unterschiedliche Verteilung von PACAP(1-27) und PACAP(1-38). Diese Verteilung wird der unterschiedlichen Verteilung von verschiedenen PC Enzymen („PACAP-Converting“ Enzymen) zugeschrieben.^(94;126)

PACAP hat mannigfaltige Wirkungen auf die verschiedenen Organsysteme. Es beeinflusst unter anderem die Neurotransmitterfreisetzung, bewirkt eine Vasodilatation und eine Bronchodilatation, beeinflusst die intestinale Motilität, erhöht die Insulin- und Histaminsekretion und hat eine Rolle bei der Zellteilung und Differenzierung.^(70;43;94;56)

Interessant ist die Rolle von PACAP bei der Kontrolle von Appetit und Essverhalten.^(114;115) So erniedrigt PACAP bei intrazerebroventrikulären Injektion die Nahrungsaufnahme von Tieren.^(118;119;120) Dagegen stimuliert PACAP die Wasseraufnahme bei einer Injektion in die Nähe des perifornikalen lateralen Hypothalamus.⁽¹¹⁶⁾ Auch ein Flüssigkeitsentzug bedingt einen Anstieg von PACAP in den Zellen des subfornikalen Organs,⁽¹¹⁷⁾ was auf eine Rolle von PACAP bei der Entwicklung des Durstgefühles hindeutet.

In der Neurohypophyse stimuliert PACAP die Freisetzung von Vasopressin und Oxytocin und in der Adenohypophyse bewirkt es eine Ca^{2+} -Mobilisation bei allen Typen von endokrinen Zellen und führt zu einer Steigerung der Hormonausschüttungen.^(121;122;123)

Sowohl der Einfluss von PACAP auf das Durstgefühl als auch die vermehrte Ausschüttung von Vasopressin deuten auf eine Rolle von PACAP bei der Regulation des Körperwasserhaushaltes hin. Diese Entdeckungen könnten darauf hinweisen, dass PACAP auch an anderer Stelle im Körper zu einer vermehrten Wasseraufnahme oder Wasserretention führt. Dabei könnte der Niere, als dem zentralen Regulationsorgan des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes, eine entscheidende Rolle zukommen.^(124;125)

PACAP wirkt in verschiedenen organspezifischen Gefäßsystemen als Vasodilatator. So zum Beispiel an den Koronar-, den Zerebral- und den Pulmonararterien sowie an Arterien der Haut und dem uteroplazentaren arteriellen System.⁽⁴⁷⁾ Dabei wird durch PACAP der lokale Perfusionsdruck gesenkt.^(47;70) Bei systemischer Gabe von PACAP bei Ratten lässt sich auch der Blutdruck in vivo senken.^(52;70) Der hypotone Effekt von PACAP scheint nicht über eine

Beeinflussung der Katecholaminausschüttung, sondern über direkte Wirkung am Kapillarbett ausgelöst zu sein. ⁽⁵²⁾ Zudem hat PACAP in einigen Studien einen direkt tachykardieinduzierenden Effekt. ⁽⁵²⁾

1.2.3 PACAP-Rezeptoren

Zwei Typen von PACAP Bindungsstellen werden nach ihrer Affinität zu VIP und PACAP unterschieden. Die Bindungsstelle Typ I hat eine hohe Affinität zu PACAP und eine viel niedrigere Affinität zu VIP, Typ II hat eine nahezu gleich hohe Affinität zu PACAP und VIP. ^(127;128;130;131;132)

Bei dem Typ I hat PACAP eine IC_{50} von 1 nM und VIP eine IC_{50} von 1000nM, beim Typ II haben PACAP und VIP je eine IC_{50} von 1 nM. ⁽¹²⁹⁾ Molekularbiologische Nachweisverfahren haben bisher drei spezifische Rezeptoren nachgewiesen. Den PACAP spezifischen PAC1 Rezeptor, der der Bindungsstelle Typ I entspricht, und zwei PACAP und VIP spezifische Rezeptoren, VPAC1 und VPAC2, die vermutlich der Bindungsstelle Typ II entsprechen. ^(133;134;135)

Dabei gibt es bei Ratten nach dem momentanen Stand der Wissenschaft fünf Untergruppen von PAC1 Rezeptoren. ^(134;129) Diese unterscheiden sich durch unterschiedliche Aminosäuresträngen an einer intrazellulären Loop-Region. ⁽¹³⁶⁾ Die Präsenz dieser Stränge beeinflusst die Adenylatzyklase stimulierende Wirkung und die Phospholipase C stimulierende Wirkung. Das weist darauf hin, dass verschiedenen Stränge mit verschiedene intrazellulären Signalkaskaden gekoppelt sind. ^(136;137)

Interessant ist dabei eine TM4 genannte Variante des PAC1 Rezeptors, die keinen Einfluss auf die Adenylatzyklase und die Phospholipase C hat, dafür über spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} Kanäle einen Ca^{2+} Einstrom in die Zelle bewirkt. ^(5;138;139;140)

Der PAC1 Rezeptor ist strukturell mit Glukagon, Calcitonin und Sekretin Rezeptoren verwandt.

Im Gegensatz zum PAC1 Rezeptor, der wie erwähnt mit verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden gekoppelt sein kann, sind die VPAC Rezeptoren primär an Adenylatzyklase gekoppelt. ^(133;136;17)

Der VPAC1 Rezeptor hat neben der Affinität zu PACAP und VIP auch eine schwächere Bindungskapazität für Sekretin. Daneben ist die Affinität von PACAP(1-38) zu dem VPAC1

Rezeptor höher als die von PACAP(1-27), die wiederum höher ist als die von VIP.
(133;134;108;107)

Der VPAC2 Rezeptor hat keine Affinität zu Sekretin, dafür eine hohe Affinität zu Helodermin. Seine Affinitäten zu beiden PACAP Molekülen sowie zu VIP sind identisch. (98;105)

VPAC Rezeptoren dominieren in peripheren Geweben. Sie kommen vorwiegend in Lunge, Leber und Hoden vor. (128;130;84;41;144;143;142;109;17;106) Dagegen sind PAC1 Rezeptoren hauptsächlich im zentralen Nervensystem, Hypophyse und Nebenniere vorhanden. (109;104;103;90)

Zu der Frage, ob PAC1 Rezeptoren in der Niere vorkommen gibt es eine uneinheitliche Studienlage. Viele Untersuchungen zeigten keinen entscheidenden Hinweis für das Vorhandensein von PAC1 Rezeptoren in der Niere. (84;109;139) In anderen Studien konnten sie beim Menschen neben VPAC1-Rezeptoren nachgewiesen werden. (56)

Dagegen kommen beide VPAC Rezeptortypen zu ungefähr gleichen Teilen in mittlerer Dichte an den Oberflächenstruktur der Nierenepithelien und Gefäße vor. (109;85;79;77) Der VPAC2 Rezeptor wurde vor allem an der Oberfläche der Blutgefäße der Nierenrinde gefunden. (44;111)

Es gibt allerdings Untersuchungen die keine VPAC2-Rezeptoren in den Nieren nachweisen konnten. (56)

1.2.4 PACAP als direkter Stimulator der Reninsekretion ?

Obwohl PACAP eine Rolle in der Regulation der Funktion zahlreicher Organe zugeschrieben wird, gibt es bisher kaum Untersuchungen zur Bedeutung von PACAP auf die Nierenfunktion. Da allerdings sowohl PACAP (17;111) als auch PACAP-Rezeptoren (77;85;109;139;84) in der Niere beschrieben wurden, liegt es nahe eine biologische Funktion von PACAP in der Niere anzunehmen. In der vorliegenden Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob PACAP möglicherweise eine Bedeutung für die Freisetzung von Renin haben könnte. Hintergrund dieser Überlegung ist die Beobachtung, dass vasoaktive Hormone den Blutdruck häufig nicht nur direkt über ihre Effekte an den Widerstandsgefäßen sondern auch indirekt über eine Beeinflussung der Reninfreisetzung regulieren. (50;54;57;23)

In der Regel inhibieren vasokonstriktorische Substanzen die Reninsekretion während vasodilatative Substanzen die Reninausschüttung steigern. (50;111)

PACAP wirkt an vielen peripheren Arterien und Arteriolen wie Koronararterien, pulmonale Arterien und Arterien der Haut als Vasodilatator. ^(47;70) Bei Ratten konnte durch PACAP eine erhöhte Nierendurchblutung erreicht werden, was für eine Dilatation der Arteriolen der Niere spricht. ⁽⁸⁷⁾

PACAP greift zudem auch über die Regulation des Durstgefühls in den Wasserhaushalt des Körpers ein, so dass eine Verbindung zum RAA-System bestehen könnte. ⁽¹¹⁶⁾

Schließlich aktiviert PACAP sehr potent die Adenylatzyklaseaktivität und erhöht damit die cAMP-Konzentration intrazellulär. Da cAMP den wichtigsten bekannten Stimulus der Reninfreisetzung darstellt, könnte PACAP, bei Expression von PACAP-Rezeptoren auf juxtaglomerulären Zellen, die Reninsekretion stimulieren. ^(4;17;111)

Ein direkt stimulierender Effekt von Hormone, die strukturell mit PACAP verwandt sind, wie zum Beispiel VIP, auf die Reninsekretion der Niere ist bekannt. ^(7;10;11;14;23;26)

Um den Einfluss von PACAP auf die Reninfreisetzung zu untersuchen, wurden hauptsächlich Versuche an der isoliert perfundierten Rattenniere durchgeführt. Der Vorteil dieses Modells gegenüber in vivo Experimenten besteht darin, dass die Reninfreisetzung unter kontrollierten Bedingungen, beispielsweise einem konstanten Perfusionsdruck, untersucht werden kann. Wie erwähnt ist PACAP ein Vasodilatator. Eine Infusion von PACAP in vivo führt also zu Veränderungen des Blutdrucks, die indirekt das Reninsystem beeinflussen könnten. Bei einem in vivo Effekt von PACAP auf das Reninsystem ließe sich also kaum unterscheiden, ob es sich um einen blutdruckabhängigen oder -unabhängigen Effekt handelt.

2 Material und Methoden

2.1 Isoliert perfundierte Rattenniere

2.1.1 Vorbereitung und Isolierung der Rattenniere

Für die isoliert perfundierte Rattenniere wurden männliche Sprague-Darley-Ratten mit einem Körpergewicht von 230 g bis 350 g verwendet. Die Ratten wurden von der Firma Charles River bezogen und im Tierstall der Universität Regensburg gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standardrattenfutter und Wasser.

Die Narkose der Ratten erfolgte mit 150 mg Trapanal pro kg Körpergewicht. Das Narkotikum wurde intraperitoneal injiziert. Auf einer Wärmeplatte (37°C) wurden die Tiere in Rückenlage platziert. Sobald keine Schmerzreflexe mehr auslösbar waren, wurde durch einen queren Schnitt supraclavikulär rechtsseitig die rechte Vena jugularis aufgesucht und kranial unterbunden. Nach kaudal wurde ein zentraler Venenkatheter gelegt und fixiert. Über diesen wurden im Laufe der Operation 5 mg Heparin injiziert, um eine Thrombose der Gefäße der Niere zu verhindern.

Durch eine mediane Laparotomie vom Xyphoid bis ins Becken wurde das Abdomen eröffnet. Um eine Austrocknung der Baueingeweide zu verhindern wurden diese mehrmals während der Operation mit 0,9% Kochsalzlösung befeuchtet. Nach Darstellung des Retroperitonealraumes, durch Retraktion der intraperitonealen Baueingeweide, wurde die Aorta aufgesucht. Sie wurde aus dem paraaortalen Bindegewebe freipräpariert und mobilisiert.

Die Mesenterialarterien, die rechte Arteria suprarenalis inferior, die aus der rechten Nierenarterie entspringt, sowie die linke Nierenarterie und die Aorta kranial des Abganges der rechten Nierenarterie wurden aufgesucht, mobilisiert und für Ligaturen vorbereitet. Die Vena cava inferior wurde kaudal des Abganges der rechten Nierenvene ebenfalls für eine Ligatur vorbereitet. Die Niere wurde aus Ihrem Bett mobilisiert, dabei der Ureter mit den begleitenden Strukturen kurzstielig durchtrennt.

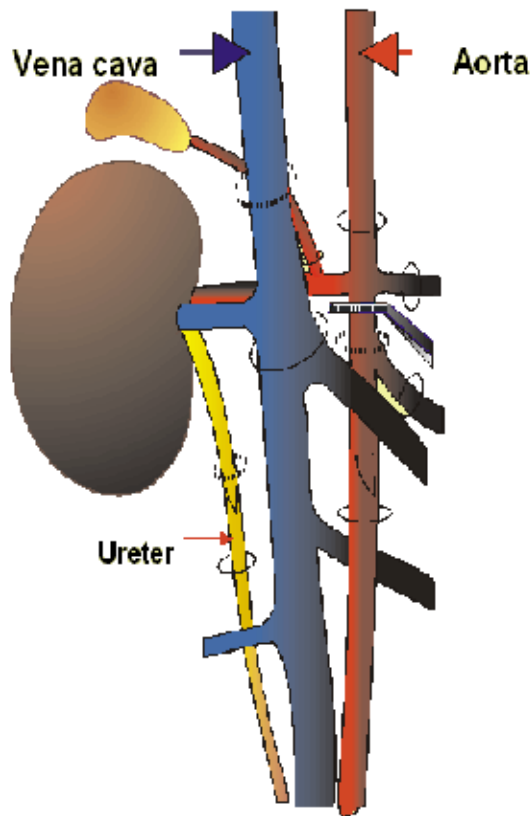


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Operationssitus. Die durchgezogenen Kreise stellen Abbindligaturen, die gestrichelten Einbindeligaturen dar.

Nach der Infusion der Heparinlösung über den vorbereiteten zentralen Venenzugang wurden die aortalen Seitenäste ligiert. Die Aorta abdominalis wurde kaudal des Abganges der rechten Nierenarterie abgeklemmt. Kaudal der Abklemmung wurde die Aorta durch eine feine Inzision eröffnet und katheterisiert. Der Katheter wurde fixiert, die Aorta kranial des Abganges der rechten Nierenarterie ligiert und die Klemme gelöst.

Die rechte Nierenarterie wurde mit einem initialen Fluss von ca. 15 ml/min in situ perfundiert. Durch den sofortigen Beginn der Perfusion konnte eine Ischämie der rechten Niere verhindert werden.

Zuletzt wurde die untere Hohlvene kranial der Anheftung an die Leber durchtrennt, um einen venösen Rückstau in der Niere zu verhindern.

Die Niere wurde entnommen und in einer speziellen Wärmeschale fixiert. Schließlich wurde die Vena cava von kranial kanuliert, um eine separate Ableitung des venösen Blutes zu gewährleisten. War dieser Katheter fixiert wurde die Vena cava kaudal der Einmündung der rechten Nierenvene ligiert. Schließlich wurden eventuell verbliebene venöse oder arterielle Lecks verschlossen. Die Gesamtzeit dieser Operation betrug ca. 45 Minuten.

2.1.2 Perfusion der isolierten Rattenniere

Als Basislösung für die Perfusion der Niere sowie als Dialyselösung wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet.

Zur originalen Krebs-Henseleit Lösung wurden alle physiologischen Aminosäuren in einer Konzentration von 0,2 bis 2,0 mM, 8,7 mM Glukose, 0,3 mM Na⁺ Pyruvat, 2,0 mM Na⁺ L-Laktat sowie 1,0 mM α -Ketoglutarat und 1,0 mM L-Malat gegeben. Dazu wurde noch 1 mU/100ml Vasopressin 8-Lysine gegeben. Die Zugabe von Flucloxacillin und Ampicillin, mit einer Konzentration von je 3 mg/100ml, verhinderte ein Bakterienwachstum in der Lösung.

Der pH Wert dieser Lösung wurde durch Titrieren mit NaOH-Lösung in einem Bereich zwischen 7,73 und 7,77 eingestellt. Durch das Begasen mit CO₂ in einem offenen System, und die dadurch stattfindende Reaktion von CO₂ und H₂O zu H⁺HCO₃⁻ stellte sich ein physiologischer pH Wert von 7,4 ein.

Für die Perfusionslösung wurde die oben genannte Lösung noch mit 6 g/100ml Rinderserumalbumin versetzt und es wurden mit Dialysat gewaschene menschliche Erythrozyten (aus Erythrozytenkonzentraten) bis zu einem Haematokritwert von 15% zugegeben.

Als Dialyselösung wurde die modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, bei der die Zusätze von Albumin und Humanerythrozyten fehlten.

Die Perfusionslösung von 250 ml wurde in einem Kreislauf durch einen Dialysator gepumpt, dort mit einem Dialysat von 5 l dialysiert, um die Elektrolytkonzentrationen und die Stoffkonzentrationen konstant zu halten sowie um Stoffwechselprodukte ab zu dialysieren und den pH-Wert der Lösung konstant zu halten. Dabei wurden die Perfusionslösung und die Dialyselösung durch mehrere Einrichtungen auf einer konstante Temperatur von 37°C gehalten.

Die Dialyselösung wurde in einem Wasserbad bei 37°C temperiert und mit einem Gemisch von 94% O₂ und 6% CO₂ begast. Durch die Begasung mit CO₂ stellte sich hier ein physiologischer pH Wert ein.

Die Perfusion der Niere erfolgte in der Regel mit einem konstanten Perfusionsdruck von 100 mmHg. Der Druck wurde über eine spezielle doppellumige Perfusionskanüle im Bereich der Nierenarterie gemessen und als Regelsignal für die elektrische Steuereinheit der Perfusionspumpe genutzt. Bei einem Abfall des Perfusionsdruckes im Bereich der

Nierenarterie wurde durch den elektrischen Regelkreis die Pumprate der Perfusionspumpe erhöht, dass der eingestellte Druck von 100 mmHg wieder erzielt werden konnte. Bei einem Anstieg des Drucks über 100 mmHg trat eine gegenläufige Regulation ein.

Die venös aus der Niere austretende Lösung wurde über einen Katheter separat abgeleitet und wieder dem Kreislauf der Perfusionslösung zugeführt. Dabei bestand die Möglichkeit Proben zur Bestimmung der Reninkonzentration zu entnehmen.

Auch an dem Schenkel zur Perfusion der Niere gab es verschiedene Mechanismen, um die Temperatur des Perfusates konstant bei 37°C zu halten.

An dem der Niere zuführenden Schenkel konnte eine zusätzliche Pumpe angeschlossen werden, mit der bis zu fünf verschiedene Substanzen in einem genauen Mischverhältnis zuzuführt werden konnten. Dieses Mischverhältnis wurde durch Abstimmung der Pumpen konstant gehalten.

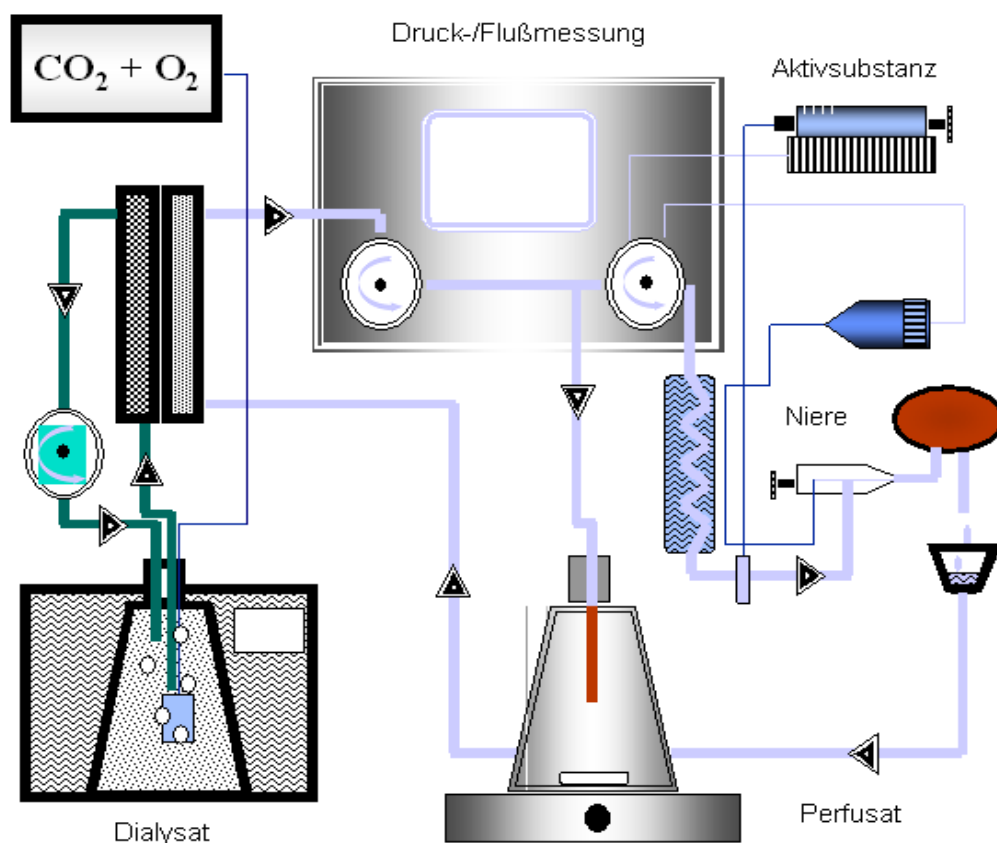


Abbildung 5: Darstellung des Perfusionsvorganges der isolierten Rattenniere.

Vor Beginn der Experimente wurde die Niere zuerst ca. 15 min mit diesem konstanten Druck perfundiert, damit sich die verschiedenen physiologischen Parameter einregulieren konnten.

Die Abnahme der Proben begann mit der Abnahme der Basalwerte. Die Probe bestanden aus der Abnahme von jeweils einem Wert direkt vom venösen Katheter, sowie jeweils einem Leerwert aus dem Perfusatkreislauf.

Die Zeit zwischen der Abnahme der einzelnen Proben beträgt 3 Minuten.

Zuzusetzende Substanzen wurden entweder in den zuführenden Schenkel des Perfusionskreislaufes über die oben beschriebene Pumpe mit genau 3% des Perfusionsflusses infundiert. Eine andere Möglichkeit bestand darin, eine Substanz direkt in die Dialysatflüssigkeit zu geben. Diese Substanz musste allerdings gut dialysierbar sein und konnte nicht mehr abgesetzt werden.

2.2 Messung der PACAP-Plasmakonzentration in vivo

2.2.1 Versuchsdurchführung

Für den Versuch kamen insgesamt 12 S-D-Ratten zum Einsatz, die in vier Gruppen eingeteilt wurden. Die Tiere wurden in den Tierställen der Universität Regensburg gehalten.

In der ersten Gruppe hatten die Tiere freien Zugang zu Standardfutter mit 0,6% NaCl-Gehalt und Wasser und hatten keine zusätzliche Behandlung. Diese Gruppe wurde als Kontrollgruppe verwendet.

In der zweiten Gruppe hatten die Tiere ebenfalls freien Zugang zu Standardfutter und Wasser. Den Ratten wurde bei einer Operation in tiefer Sevofluran-Narkose die linke Nierenarterie mittels eines Silberclips mit 0,2 mm Öffnung eingeengt.

In der dritten Gruppe hatten die Tiere ebenfalls freien Zugang zu Standardfutter und Wasser. Den Tieren wurde in Allgemeinanästhesie mit Sevofluran eine Osmotische Minipumpe der Firma Alzet subkutan implantiert. Über die Pumpe wurde Furosemid mit 12mg pro Tag abgegeben.

In der vierten Gruppe wurden die Tiere mit salzarmen Futter ernährt. Das Futter hatte eine Konzentration von 0,02% NaCl. Zusätzlich wurden die Ratten mit 10mg Ramipril pro kg Körpergewicht über das Trinkwasser behandelt.

2.2.2 Probengewinnung und Messung der PACAP-Plasmakonzentration

Die Tiere wurden eine Woche nach Behandlungsbeginn in tiefer Narkose mit Sevofluran mittels Dekapitation getötet und das Blut in mit EDTA beschichteten Röhrchen aufgefangen.

Nach Zentrifugation des in EDTA beschichteten Röhrchen aufgefangenen Blutes wurde das Plasma separiert und die Peptide mittels „solid phase extraction“ extrahiert (C18-SepPac-Cartiges, Walus, USA) Anschließend wurde die PACAP-Konzentration mittels eines kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays (Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, USA) gemessen.

2.3 Renin RIA

Die Proben wurden sofort nach der Abnahme auf Eis heruntergekühlt um die Enzymaktivität zu minimieren. Die Erythrozyten wurden von den Proben abzentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und vor der weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

Die Renin-Aktivität wurde mittels Angiotensin I-Radioimmunoassay bestimmt. Gemessen wurde dabei die Angiotensin I Konzentration. Das Angiotensin I-RIA-Set wurde über die Firma DiaSorin GmbH Deutschland bezogen.

Der Test beruht auf der Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen unter optimalen Bedingungen. Dafür wurde ausreichend Angiotensinogen zugesetzt und durch eine selektive Enzymblockade der Abbau von Angiotensin I verhindert. Die Bildung von Angiotensin I ist in weit überwiegenden Maß durch Renin enzymkatalysiert. Dabei ist die pro definierter Zeiteinheit gebildete Menge an Angiotensin I bei konstanten Reaktionsbedingungen proportional der Plasmareninkonzentration.

Das Prinzip des RIA basiert auf der Competition zwischen einer definierten Menge radioaktiv markierten Angiotensin I und Angiotensin I aus Probenansätzen um eine begrenzte Zahl an einer Röhrchenwand gebundener Antikörperbindungsstellen. Nach einer Inkubation ist die Menge des wandgebundenen markierten Angiotensin I reziprok proportional zu der Menge des freien Angiotensin I in dem Probenansatz.

Zur Angiotensin I-Erzeugung wurden in einem Eppendorf-Cup 10 µl der Probeflüssigkeit mit 1 µl Enzyminhibitor und 10 µl Reninsubstrat-Pufferlösung versetzt.

Bei dem Enzyminhibitor handelte es sich um Phenylmethylsulfonylflourid-Lösung. Das Reninsubstrat war eine Angiotensinogen-Lösung, die aus dem Plasma von nephrektomierten Ratten gewonnen wurde. Dieses Reninsubstrat wurde im Verhältnis vier Teile Reninsubstrat zu fünf Teilen Reaktionspuffer versetzt. Bei dem Reaktionspuffer handelte es sich um EDTA-Kalium-Phosphatpuffer-Lösung.

Die Lösungen in dem Eppendorf-Cup wurden mittels eines Vortex-Mischers gemischt und zur Reaktion 90 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 90 Minuten im Wasserbad wurden die Probenansätze auf Eis heruntergekühlt.

Sie wurden in die mit Angiotensin I Antikörper beschichteten Reagenzgläsern überführt und mit 500 µl der radioaktiven Tracerlösung versetzt. Bei der Tracerlösung handelte es sich um ¹²⁵J-markiertes Ileu-5-Angiotensin I. Dieser Ansatz wurde gut durchmischt und bei Raumtemperatur 3 bis 24 Stunden inkubiert.

Die Inkubationsmischung wurde vorsichtig vollständig abgesaugt. Die Radioaktivität wurde mittels eines Gammazählers gemessen.

2.4 Auswertung

2.4.1 Berechnung der Reninaktivität

Zur Berechnung der Reninaktivität in den Proben wurde zuerst eine Standardkurve mit definierten Konzentrationen an Angiotensin I Konzentrationen erstellt. Anhand derer bestimmte der Gammazähler bereits die Konzentration von Angiotensin I in der Probe.

Die Plasmareninaktivität (PRA) wurde als ng gebildetes Angiotensin I/h*min*g berechnet.

$$PRA = c(\text{Angiotensin I}) * 2,1 / t(\text{Inkubation}) \text{ [ng/h*min*g]}$$

Von jeder Probe musste noch der zugehörige Leerwert abgezogen werden. Aussagekräftig ist die Sekretion von Renin, so dass die Plasmareninaktivität mit dem Fluss zur Zeit der Probenabnahme multipliziert werden musste.

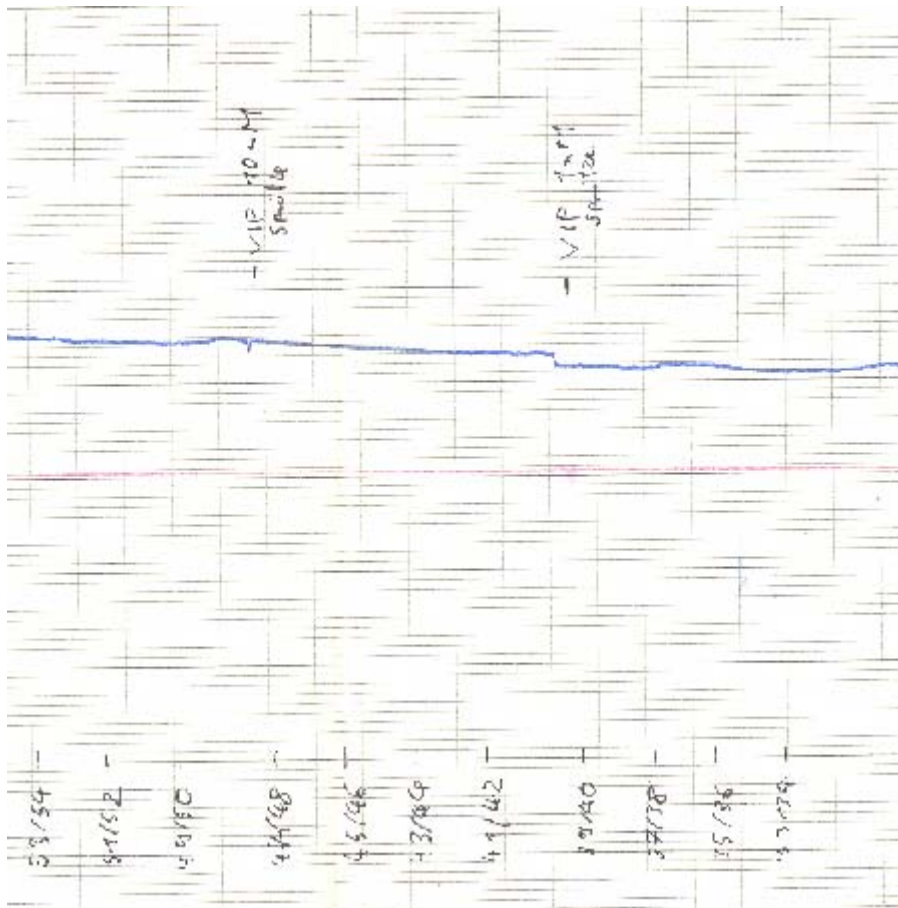


Abbildung 6: Fluß-Diagramm einer isoliert perfundierten Rattenniere bei konstantem Druck von 100 mmHg.

2.4.2 Statistische Berechnung

Die Daten wurden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. In der statistischen Auswertung wurden die Messwerte einer Versuchsperiode gemittelt. Prüfungen auf Signifikanz wurden mit dem t test je nach Art der Daten gepaart oder ungepaart durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von PACAP auf die Reninsekretion der Niere

3.1.1 Stimulation der Reninsekretion durch PACAP

Da aus den in der Einleitung beschriebenen Erkenntnissen die Vermutung nahe lag, dass PACAP einen Einfluss auf die Reninsekretion haben könnte, wurde der Effekt von PACAP auf die Reninsekretionsrate isoliert perfundierter Rattennieren untersucht. Dabei wurde zunächst eine Konzentration von 10 nM PACAP(1-27) gewählt. Diese Konzentration kommt *in vivo* vor^(37;94;121;122) und vermittelt in anderen Organsystemen biologische Effekte.^(117;123;125) So liegt die EC₅₀ bezogen auf die Adenylatzyklase stimulierende Wirksamkeit für PACAP(1-27) bei 0,3 nM.

Wie in Abbildung 7 gezeigt, lag nach einer Einregulierungszeit die Reninsekretionsrate auf einem konstanten Niveau von $27,0 \pm 3,6$ ng Angiotensin I/h*min*g. Die Zuinfusion von PACAP(1-27) 10 nM stimulierte die Reninsekretionsrate sehr schnell auf $171,1 \pm 15,7$ ng Angiotensin I/h*min*g (n=5 Versuche, p<0,01).

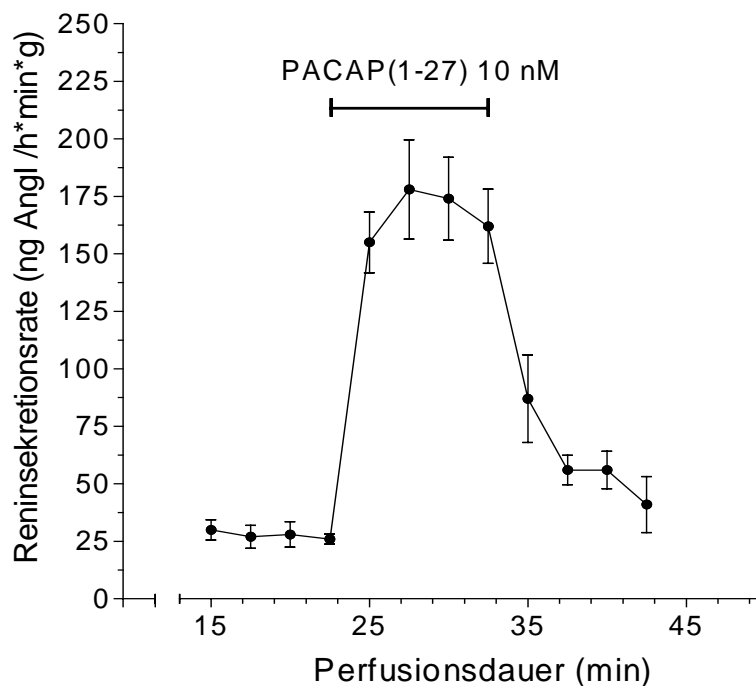


Abbildung 7: Wirkung von PACAP(1-27) 10 nM auf die Reninsekretionsrate.

Der Stop der PACAP-Infusion resultierte in einer ebenfalls schnellen Abnahme der Reninsekretionsrate auf $56,2 \pm 6,4$ ng Angiotensin I/h*min*g ($p < 0,05$). Der stimulierende Effekt von PACAP(1-27) auf die Reninsekretion war reversibel.

3.1.2 Abhängigkeit der Stimulation von der PACAP-Konzentration

Nach dem Nachweis der Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems durch PACAP, war nun der nächste Schritt die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes zu untersuchen.

Um die Spannbreite der physiologischen PACAP-Konzentrationen sicher mit einzuschließen, ^(37;94;122;123) wurde die Konzentration von PACAP(1-27) im Perfusat angefangen von einer Konzentration von 10 pM in Zehnerpotenzen bis zu einer Konzentration von 100 nM gesteigert.

Wie in Abbildung 8 ersichtlich, zeigte sich ein schneller, konzentrationsabhängiger Anstieg der Reninsekretion mit steigender PACAP-Konzentration (n=5 Versuche).

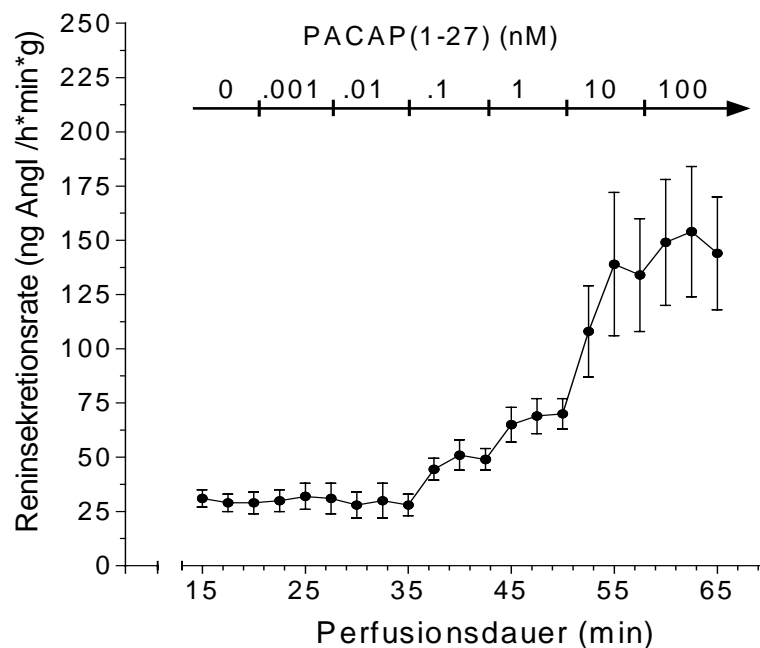
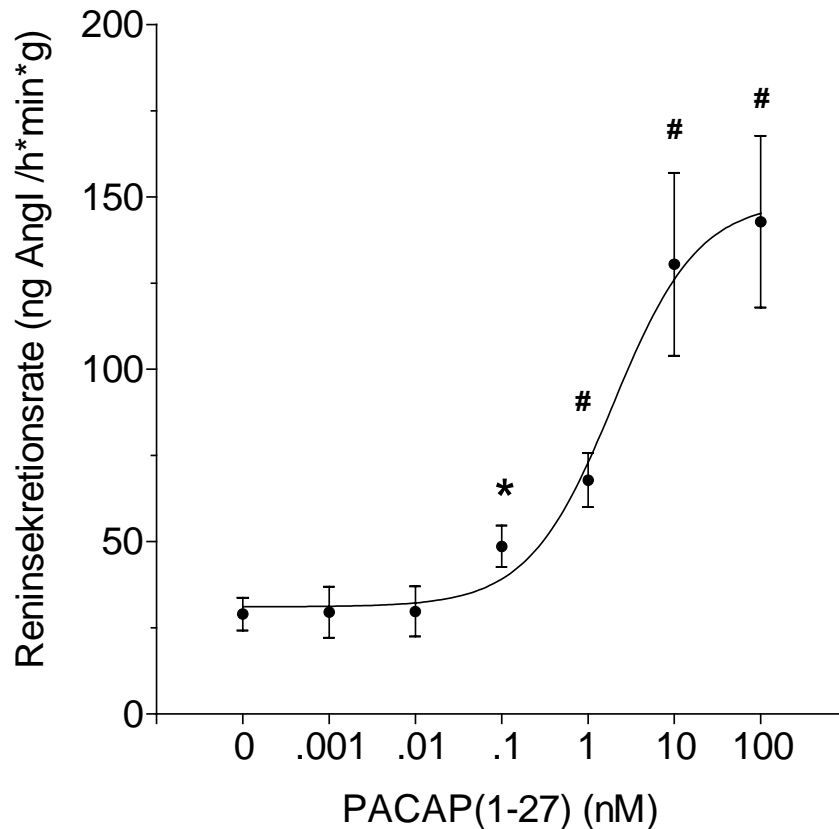


Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Stimulation der Reninsekretionsrate durch PACAP(1-27).

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die drei Werte der Reninsekretionsraten bei jeder PACAP Konzentration gemittelt (n=5 Versuche, Abb. 9).



* $p < 0,05$; # $p < 0,001$

Abbildung 9: Effekte von PACAP(1-27) auf die Reninsekretionsrate. Es sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus Abbildung 8 dargestellt.

Während PACAP(1-27) in Konzentrationen von 1 pM und 10 pM keinen Einfluss auf die Reninsekretion hatte, führte die Applikation von 100 pM PACAP(1-27) zu einer signifikanten Stimulation der Reninsekretionsrate von $29,0 \pm 4,7$ auf $48,6 \pm 6,2$ ng Angiotensin I / h * min * g. Höhere Konzentrationen von PACAP(1-27) stimulierten die Reninsekretionsrate weiter, bis bei einer Konzentration von 100 nM schließlich ein Plateau erreicht wurde ($142,0 \pm 24,9$ ng Angiotensin I / h * min * g ($p < 0,001$ vs. 0 nM PACAP)). Die halbmaximale Konzentration EC50, berechnet aus diesen Daten, betrug 1,9 nM.

3.1.3 Wirkung von PACAP(1-38)

Neben PACAP(1-27) galt es auch die Wirkung von PACAP(1-38) auf die Reninsekretion der Niere zu untersuchen, da auch PACAP(1-38) in physiologisch wirksamen Konzentrationen in vivo vorkommt. ^(4;36)

Dazu wurde ähnlich wie zu den Versuchen mit PACAP(1-27) eine Konzentrationsreihe mit PACAP(1-38) durchgeführt. Es wurden Konzentrationen von 1 nM, 10 nM und 100 nM untersucht (Abb. 10).

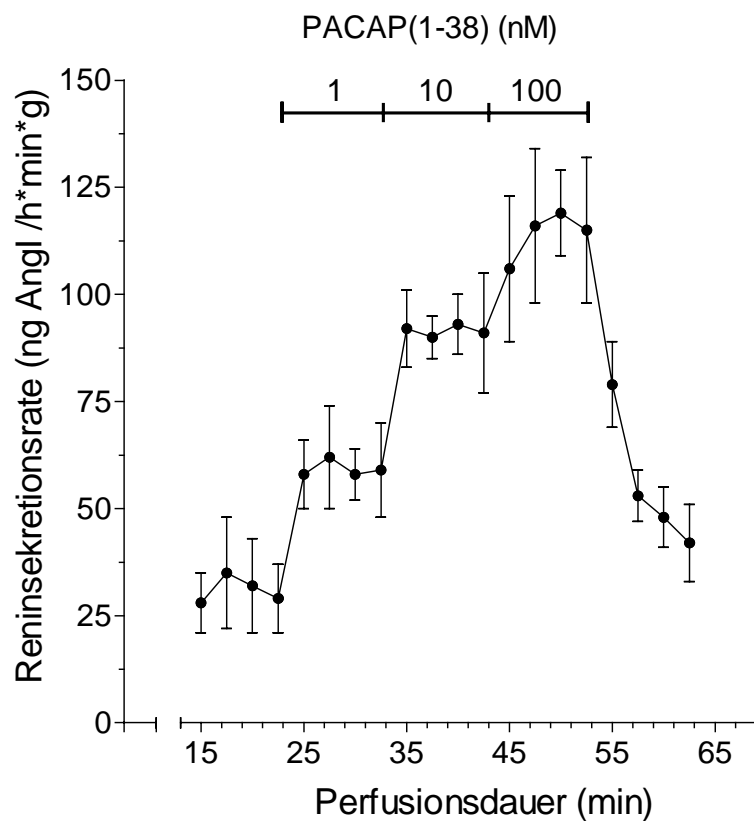


Abbildung 10: Effekt von PACAP(1-38) auf die Reninsekretionsrate isoliert perfundierter Rattennieren.

Ähnlich wie bei PACAP(1-27) stimulierte PACAP(1-38) die Reninsekretionsrate rasch und konzentrationsabhängig. So erhöhte die Zugabe von 1 nM PACAP(1-38) die Reninfreisetzung von $32,1 \pm 12,6$ auf $64,5 \pm 11,1$ ng Angiotensin I/h*min*g ($p < 0,05$; Abb. 10). Zudem stellt sich bei 100 nM PACAP(1-38) ein Plateau der Reninsekretion ein ($116,6 \pm 9,5$ ng Angiotensin I/h*min*g, $p < 0,001$ vs. 0 nM PACAP). Die maximale Stimulierbarkeit der Reninsekretions-

rate durch PACAP(1-38) scheint jedoch gegenüber PACAP(1-27) abgeschwächt zu sein (siehe Abbildungen 8 und 10).

Auch die Wirkung von PACAP(1-38) war reversibel, da nach dem Stop der PACAP Infusion die Reninsekretionsrate rasch auf Kontrollwerte zurückging (Abb. 10).

3.1.4 Hemmung der Effekte von PACAP auf die Reninsekretion durch Angiotensin II

Nachdem, wie oben dargestellt, eine deutliche Stimulation der Reninsekretion durch PACAP(1-27) und PACAP(1-38) nachgewiesen worden war, wurde die Regulierbarkeit dieses Effektes genauer charakterisiert. Da Angiotensin II, im Sinne eines negativen Rückkopplungsregulators, einen starken und physiologisch bedeutenden Regulator der Reninfreisetzung darstellt, wurde überprüft, ob Angiotensin II die Effekte von PACAP auf die Reninsekretion beeinflusst (Abb. 11). Hierzu wurde die Reninsekretionsrate zunächst mit PACAP(1-27) in der Konzentration von 10 nM vorstimuliert und anschließend Angiotensin II in der Konzentration von 1 nM zugegeben.

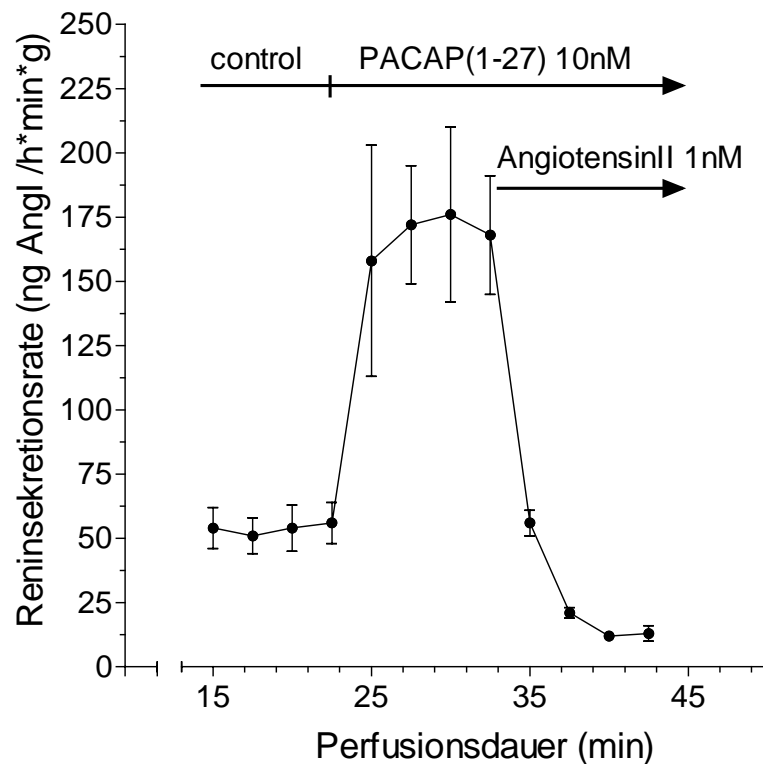


Abbildung 11: Effekt von Angiotensin II 1 nM auf die mit PACAP(1-27) vorstimulierte Reninsekretionsrate.

PACAP(1-27) stimulierte die Reninsekretionsrate von $54,2 \pm 6,7$ auf $172,3 \pm 38,6$ ng Angiotensin I/h*min*g ($p < 0,05$). Die zusätzliche Gabe von 1 nM Angiotensin II hemmte diese stimulierte Reninfreisetzung auf Werte unterhalb der Kontrollwerte ($p < 0,01$).

Es zeigt sich also, dass die stimulatorische Wirkung von PACAP auf die Reninfreisetzung der physiologischen Regulation durch Angiotensin II unterliegt. ^(48;49)

3.2 Wirkungsmechanismus von PACAP

Nachdem nun die Konzentrationsabhängigkeit von PACAP sowie die Reversibilität und die Hemmbarkeit der PACAP Wirkung nachgewiesen war, galt es den Weg der Stimulierung der Reninsekretion durch PACAP herauszufinden.

3.2.1 Wirkung von PACAP in Abhängigkeit von Ca^{2+}

Wie erwähnt vermittelt PACAP seine biologischen Effekte klassischerweise über die Aktivierung von Adenylatzyklasen, also den cAMP Signalweg. Allerdings wurde auch die Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration durch PACAP beschrieben. ⁽⁵⁾ Da die freie zytosolische Kalziumkonzentration einen wesentlichen Regulator der Reninfreisetzung darstellt, wurde in den folgenden Experimenten überprüft, ob die Wirkung von PACAP auf die Reninfreisetzung Ca^{2+} -abhängig ist. Hierzu wurde zunächst von einem Perfusat mit einer Kalziumkonzentration von 2,5 mM (Kontrollperfusat) auf ein kalziumfreies Perfusat gewechselt. Wie in Abbildung 12 dargestellt führte dieses Manöver zu einer deutlichen Steigerung der Reninsekretionsrate von $28,0 \pm 6,5$ auf $92,3 \pm 6,9$ ng Angiotensin I/h*min*g ($p < 0,05$), vereinbar mit der bekannten hemmenden Wirkung von Kalzium auf die Reninfreisetzung. ^(48;75;76;99) Die anschließenden Applikation von 10 nM PACAP(1-27) stimulierte die Reninsekretionsrate weiter bis auf $382,1 \pm 27,0$ ng Angiotensin I/h*min*g ($p < 0,05$). Die Stimulation der Reninfreisetzung durch PACAP ist also nicht kalziumabhängig.

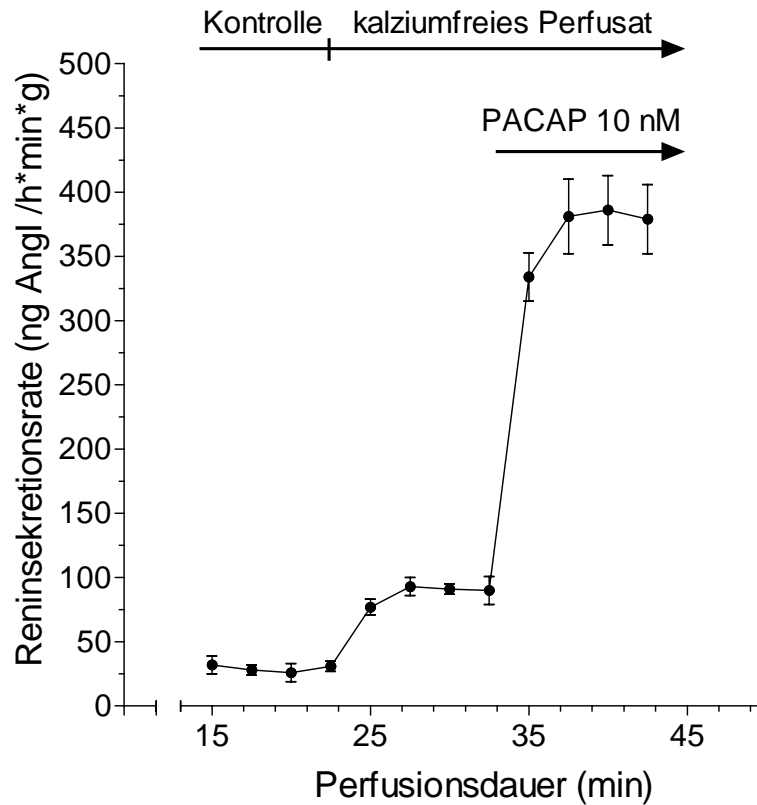


Abbildung 12: Effekt von PACAP(1-27) 10 nM auf die Reninsekretionsrate unter Verwendung eines kalziumfreien Perfusates.

3.2.2 Wirkung von PACAP in Abhängigkeit von cAMP

Nachdem nun gezeigt worden war, dass PACAP auch im Ca^{2+} -freiem Medium die Reninausschüttung steigern kann, galt es die Abhängigkeit von cAMP auf die Reninsekretion durch PACAP zu untersuchen.

3.2.2.1 Wirkung von PACAP(1-27) in Kombination mit Isoproterenol

Zuerst wurde untersucht, ob PACAP nach einer Vorstimulation der Reninsekretion durch Isoproterenol noch in der Lage wäre die Reninausschüttung weiter zu stimulieren. Isoproterenol ist ein β -Adrenorezeptoragonist, der über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration der Reninsekretion stimuliert.^(48;49)

Nach Abnahme der Kontrollwerte wurde die Reninsekretion mit 10 nM Isoproterenol von $27,5 \pm 6,1$ auf $586,3 \pm 84,3$ ng Angiotensin I/h*min*g vorstimuliert. Die zusätzliche Gabe von PACAP(1-27) in einer Konzentration von 10 nM hatte keinen weiteren Effekt auf die Reninsekretion (Abb. 13).

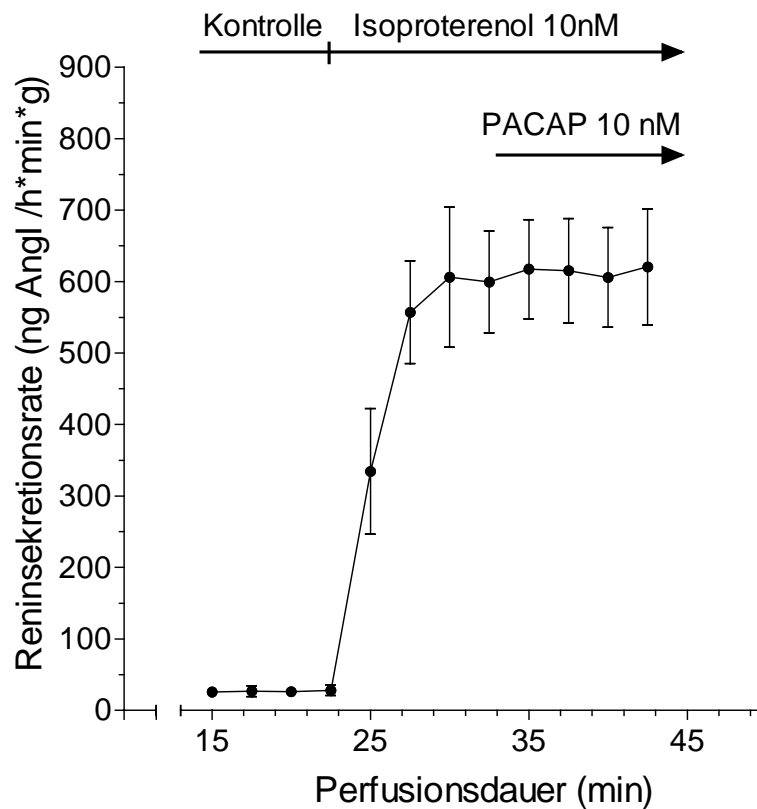


Abbildung 13: Effekte von 10 nM PACAP(1-27) nach Vorstimulation der Reninsekretion über den cAMP Weg mittels Isoproterenol.

Im Gegenzug wurde untersucht, ob unter einer Vorstimulation der Reninsekretionsrate mittels 10 nM PACAP(1-27) die Reninfreisetzung mit Isoproterenol weiter zu stimulieren wäre. PACAP(1-27) in der Konzentration von 10 nM stimulierte die Reninsekretionsrate deutlich von $46,6 \pm 11,7$ auf $198,5 \pm 36,6$ ng Angiotensin I/h*min*g ($p < 0,05$, $n=3$). Die Gabe von 10 nM Isoproterenol stimulierte die Reninfreisetzung allerdings nochmals signifikant auf $470,8 \pm 105,0$ ng Angiotensin I / h*min*g (Abb. 14).

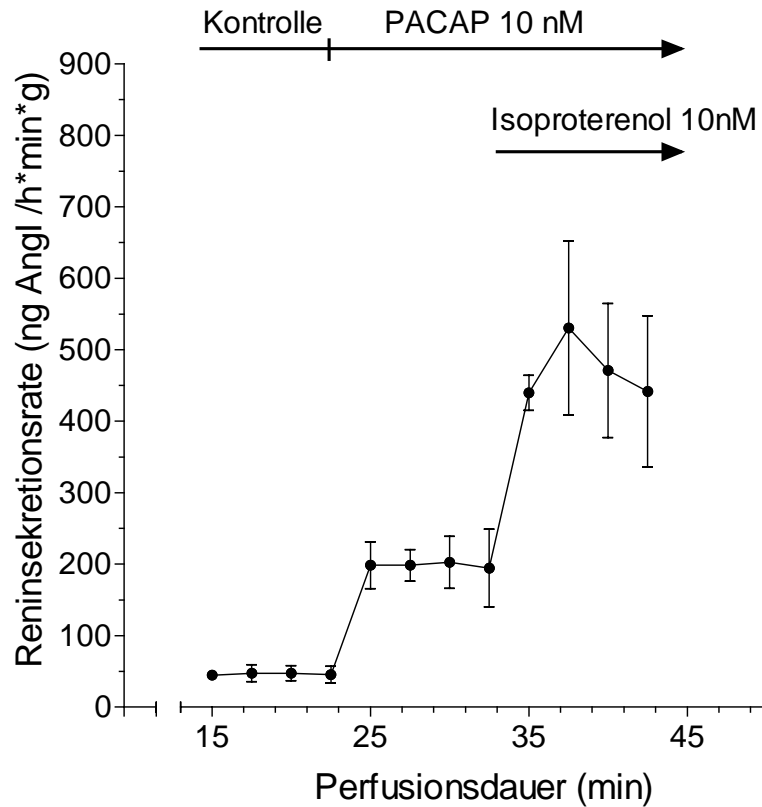


Abbildung 14: Wirkung von 10 nM Isoproterenol auf die Reninsekretion nach Vorstimulation mit PACAP(1-27) 10 nM.

3.3 Wirkung von PACAP in Kombination mit VIP

Es ist schon länger bekannt, dass das vasoaktive intestinale Peptid VIP ein Stimulator der Reninsekretion ist. ^(26;21;7) Da VIP und PACAP in anderen Zelltypen dieselben Rezeptoren aktivieren können, wurde untersucht, ob dieses auch bezüglich der Effekte auf die Reninsekretion zutrifft. Da keine pharmakologischen Blocker der einzelnen VIP/PACAP Rezeptoren verfügbar sind, wurde in einem indirekten Ansatz überprüft, ob sich die Effekte von PACAP und VIP auf die Reninsekretion gegenseitig beeinflussen.

Zuerst wurde untersucht, ob PACAP unter einer Vorstimulation mit VIP noch eine zusätzliche Stimulation der Reninsekretion bewirken kann (Abb. 15).

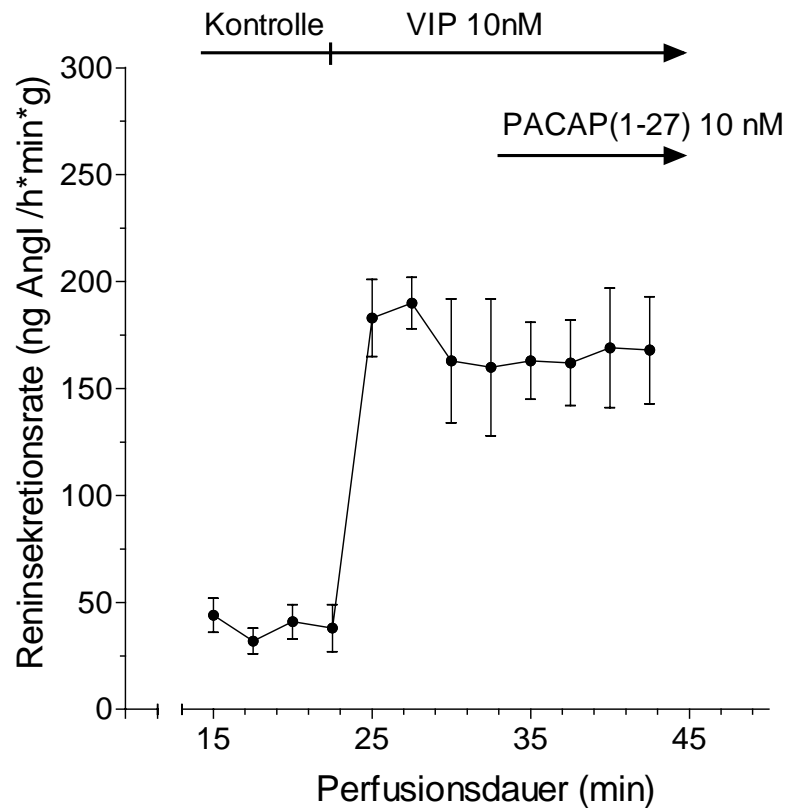


Abbildung 15: Stimulation der Reninsekretion durch PACAP unter Vorstimulation durch VIP.

Bei einer VIP-Konzentration von 10nM ergab sich eine signifikante Steigerung der Reninsekretion von $37,1 \pm 7,3$ auf $171,2 \pm 21,3$ ng Angiotensin I/h*min*g ($n=4$, $p<0,05$, Abb. 15). Die Zugabe von PACAP in einer Konzentration von 10 nM hatte keinen weiteren Effekt auf die Reninsekretion.

Umgekehrt galt es zu klären, ob VIP nach einer Vorstimulation mit PACAP eine weitere Steigerung der Reninsekretion bewirken könnte. Wie in Abbildung 16 gezeigt, war dieses jedoch auch nicht der Fall. Nach der bekannten Vorstimulation der Reninsekretion mit 10 nM PACAP(1-27) hatte die Applikation von 10 nM VIP keinen weiteren Effekt auf die Reninfreisetzung mehr.



Abbildung 16: Stimulation der Reninsekretion durch VIP unter Vorstimulation durch PACAP.

3.4 PACAP Konzentration im Plasma

Um eine mögliche in vivo Relevanz der erhobenen in vitro Befunde zu untersuchen, wurde abschließend die Konzentration von PACAP(1-27) im Plasma von Ratten bestimmt. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Radioimmunoassay verwendet (Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, USA).

Wie in Abbildung 17 gezeigt, betrug die Plasma-PACAP-Konzentration unter Kontrollbedingungen 76.1 ± 18.2 pMol/L. Da es in der isoliert perfundierten Niere bei einer PACAP(1-27) Konzentration von 100 pM zu einer signifikanten Stimulation der Reninsekretionsrate kam (Abb. 17), liegt die in vivo Plasmakonzentration also im wirksamen Bereich.

Um zu überprüfen, ob PACAP im Sinne eines hormonellen Regulators die Reninfreisetzung kontrollieren könnte, wurde untersucht, ob Manöver die bekanntermaßen das Reninsystem regulieren auch zu Veränderungen der PACAP-Plasmakonzentration führen. Dazu wurde bei

den Ratten entweder für eine Woche eine einseitige Nierenarterienstenose angelegt (Abb. 17, Clip, n=4), oder die Ratten wurden für eine Woche mit dem Schleifendiuretikum Furosemid 12 mg/Tag (Abb. 17, Furosemid, n=4) behandelt oder die Tiere wurden auf salzreicher Diät gehalten und zusätzlich mit dem ACE-Hemmer Ramipril 10 mg/kg Körpergewicht versorgt (Abb. 17, salzarme Kost mit zusätzlicher Ramiprilgabe, n=4). Alle Manöver stimulieren bekanntermaßen das Reninsystem ^(10;50), sie hatten allerdings keinen Einfluss auf die PACAP(1-27) Konzentration im Plasma (Abb. 17).

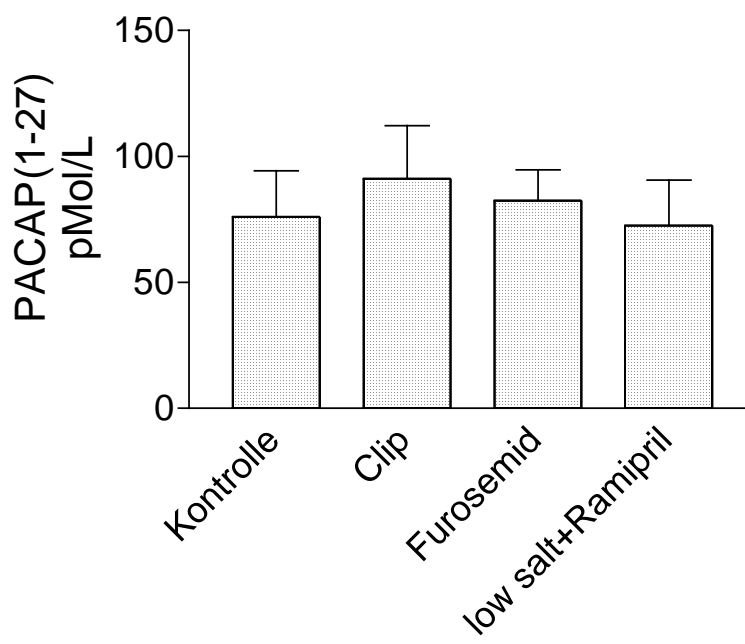


Abbildung 17: In vivo PACAP-Plasmakonzentration unter Bedingungen, die das Renin-Angiotensin-System stimulieren.

4 Diskussion

4.1 Wirkungsweise von PACAP 1-27 auf die Reninsekretion

Es gibt verschiedene Signalkaskaden, die die Reninausschüttung der juxtaglomerulären Zellen steuern. Ein Mechanismus ist dabei die Stimulation der Reninsekretion über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. ^(48;49) Ebenfalls bekannt ist, dass PACAP in verschiedenen Geweben über Stimulation der Adenylatzyklase die cAMP-Konzentration intrazellulär erhöht. ^(17;136;137) Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass PACAP die Reninausschüttung stimulieren könnte.

Neben der Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Aktivierung der Adenylatzyklase bewirkt PACAP sowohl über die VPAC-Rezeptoren als auch über einige Varianten der PAC1-Rezeptoren eine Ca^{2+} -Mobilisation. ⁽¹⁷⁾ Eine besondere Rolle spielt der PAC1 TM4-Rezeptor, der durch ein Öffnen von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen einen Ca^{2+} Einstrom in die Zelle bewirkt. ^(138;139;140) Dieser Rezeptor hat keinen Effekt auf die Adenylatzyklase und damit die cAMP-Konzentration im Zytoplasma. ^(138;139) Dieser Rezeptor müsste, sollte er in der Niere eine Rolle spielen, zu einem Abfall der Reninkonzentration führen. Ob dieser Rezeptor jedoch in der Niere vorkommt, ist bisher nicht untersucht worden. ⁽⁸⁴⁾

4.1.1 Stimulation der Reninsekretion durch PACAP

In den Versuchen mit den Konzentrationsreihen von PACAP zeigte sich eine signifikante Steigerung der Reninsekretion ab einer PACAP-Konzentration von 0,1 nM. Eine weitere Steigerung der PACAP-Konzentration im Perfusat in Zehnerpotenzen zeigte - jeweils zum Vorwert - signifikante Anstiege der Reninausschüttung.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass der PACAP-Effekt konzentrationsabhängig ist. Es handelt sich nicht um einen „Alles-oder-nichts-Effekt“. Es ist eine Regulation der Reninausschüttung durch die PACAP-Konzentration im Plasma möglich.

Die direkte Wirkung von PACAP konnte auch durch Experimente an der isoliert perfundierten Mäuseniere nachgewiesen werden. ⁽¹¹¹⁾ Dabei änderte sich, wie bei unseren Experimenten auch, der Perfusatfluß der isolierten Niere nicht. Auch in Zellkulturen

reninproduzierender Zellen konnte die Reninsekretion durch PACAP stimuliert werden.⁽¹¹¹⁾ Die Membrankapazität von JG-Zellen konnte bei „patch-clamp“-Versuchen durch PACAP beeinflusst werden.⁽¹¹¹⁾ Die Zusammenschau dieser Experimente und der eigenen Ergebnisse deutet stark auf eine direkte Beeinflussung der Reninsekretion durch PACAP hin.

4.1.1.1 Reversibilität des PACAP-Effektes

Wichtig war nun nachzuweisen, dass die erhöhte Reninsekretion unter PACAP nicht auf einen toxischen Effekt zurückzuführen ist. Da der PACAP-Effekt reversibel ist, kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Hinweise darauf, dass der Effekt physiologisch ist, zeigten ebenfalls die Versuche mit den PACAP-Konzentrationsreihen. Mit steigender PACAP-Konzentration stieg auch die Reninsekretion der Niere. Diese Steigerung war über einen größeren Bereich proportional zur PACAP-Konzentration im Perfusat, was auf einen physiologischen Regulationsmechanismus hindeutet.

Wichtig ist auch die Tatsache, dass mit Isoproterenol, bei einer Vorstimulation durch PACAP, eine weitere Stimulation der Niere erreicht werden konnte. Diese Stimulation mit Isoproterenol 10 nM ist physiologisch.^(48;49) Das Maximum der Stimulation mit Isoproterenol liegt sogar höher als eine Stimulation durch PACAP 100 nM. Das spricht gegen einen artifiziellen Effekt von PACAP auf die Reninstimulation der Nieren.

Aus den Versuchen über die Reversibilität von PACAP und die Versuche über die Stimulierbarkeit der Reninausschüttung mittels Isoproterenol bei einer durch PACAP vorstimulierten Nieren, zeigte sich, dass PACAP die Reninsekretion zwar steigert, allerdings nicht bis zu einem Maximum. Der Effekt auf das Renin-Angiotensin-System ist durch PACAP regulierbar.

4.1.1.2 Hemmung des PACAP Effektes durch Angiotensin II

Wichtig war nun herauszufinden, ob klassische Hemmer der Reninsekretion wie Angiotensin II die Stimulation der Reninausschüttung mittels PACAP antagonisieren können. ^(48;84;99) Dazu wurde eine Niere mit PACAP stimuliert und überprüft, ob durch Zugabe von Angiotensin II die Reninsekretion gehemmt werden kann. Es zeigt sich eine signifikante Hemmung der Reninsekretion.

Diese Versuche unterstrichen die These, dass PACAP zur Regulation der Reninsekretion in Frage kommt. Neben PACAP, das stimulierend wirkt, können auch noch andere Substanzen in physiologischen Konzentrationen in die Regulation des Renin-Angiotensin-Systems eingreifen. Dabei gibt es Substanzen, die zusätzlich stimulieren können wie z.B. Isoproterenol und Metabolite, die die Reninsekretion hemmen können wie z.B. Angiotensin II. Man kann davon ausgehen, dass PACAP Teil eines komplexen, vielschichtigen Regulationssystems der Reninsekretion ist.

4.1.2 Wirkungsunterschiede zwischen PACAP(1-38) und PACAP(1-27)

Wie beschrieben existiert neben PACAP(1-27) auch die Form PACAP(1-38). ⁽⁴⁾ Das N-terminale Ende beider Aminosäuren ist das für die Funktion entscheidende. ^(35;36;92;93) PACAP(1-38) hat eine höhere Rezeptorbindungsaffinität als PACAP(1-27). ⁽⁹³⁾ So ist die IC_{50} am PAC1-Rezeptor für PACAP(1-27) 0,4 nM, für PACAP(1-38) 0,2 nM. Die stimulierende Potenz ist für PACAP(1-38) mit einer ED_{50} von 0,2 nM ebenfalls höher als PACAP(1-27) mit 0,3 nM. ^(93;78;80) Versuche mit VIP, bei dem das C-terminale Ende verändert wird, unterstreichen die aus den oberen Ergebnisse hergeleitete These, dass das C-terminale Ende von PACAP für die Rezeptoraffinität verantwortlich ist. ⁽⁷⁸⁾

Daraus könnte man ableiten, dass PACAP(1-38) die Reninsekretion stärker stimuliert als PACAP(1-27), vor allem wenn der PAC1-Rezeptor die entscheidende Rolle in der Niere spielen sollte. An den VPAC-Rezeptoren ist die Bindungsaffinität von PACAP(1-27) ähnlich der Bindungsaffinität von PACAP(1-38). ^(127;128;131)

Im Versuch zeigte sich eine signifikante Steigerung der Reninsekretion durch PACAP(1-38). Allerdings war die Steigerung nicht so ausgeprägt wie bei PACAP(1-27).

Das könnte drauf hindeuten, dass der PAC1 Rezeptor nicht der vermittelnde Rezeptor in der Rattenniere ist. Er wurde bisher nicht in der Niere nachgewiesen.^(139;84) Sollten VPAC-Rezeptor die entscheidenden Bindungsstellen in der Niere sein, sollte die Affinität von PACAP(1-27) und PACAP(1-38) nahezu gleich groß sein. Auch damit sollte PACAP(1-38) auf Grund der höheren Potenz mit um ca. 50% niedrigerer ED₅₀ stärker stimulieren.^(93;98;142)

Die geringere Steigerung der Reninausschüttung könnte erklärt werden, wenn man in Betracht zieht, dass PACAP(1-38) eine große Bindungsaffinität zu Plasmaproteinen hat. So bindet z.B. Ceruloplasmin PACAP(1-38) sehr viel stärker als PACAP(1-27).⁽⁶⁴⁾ Auch wenn Ceruloplasmin in der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung allenfalls in Spuren vorkommen dürfte, muss man anhand dieser Ergebnisse davon ausgehen, dass PACAP(1-38) durch andere Proteine, eventuell auch durch Albumin gebunden wird.^(100;101) Damit wäre der freie Anteil des Hormons niedriger als PACAP(1-27), was die schwächere Stimulation erklären könnte.

Wegen der stärkeren Stimulation der Reninsekretion durch PACAP(1-27) wurde in den weiteren Versuchen PACAP(1-27) eingesetzt.

4.1.3 Wirkungsweise von PACAP in Abhängigkeit von Ca²⁺

Neben vier Klassen von PAC1-Rezeptoren, die intrazellulär die Adenylatzyklase aktivieren gibt es den PAC1 TM4-Rezeptor, der durch ein Öffnen von L-Typ-Ca²⁺-Kanälen einen Ca²⁺ Einstrom in die Zelle bewirkt.^(138;139;140) Dieser Rezeptor hat keinen bisher nachgewiesenen Effekt auf die Adenylatzyklase und damit die cAMP-Konzentration im Zytoplasma.^(138;139) Da ein Ca²⁺-Einstrom zu einer Hemmung der Reninsekretion führen würde, PACAP in den Versuchen allerdings die Reninausschüttung steigerte ist eine Rolle des PAC1 TM4-Rezeptors bei der PACAP-vermittelten Reninabgabe unwahrscheinlich.

Um einen eventuellen Einfluss von Ca²⁺ auf den PACAP-Effekt auszuschließen wurde untersucht, ob PACAP auch in Ca²⁺-freiem Medium die Reninsekretion steigern kann.

Sollte Ca²⁺ eine Rolle bei dem Effekt von PACAP auf die Reninsekretion haben, würde sich die Stimulationsleistung von PACAP in Ca²⁺-freiem Medium ändern. So könnte sich

einerseits eine erhöhte Sekretion zeigen, wenn ein gewisser hemmender Effekt, z.B. über PAC1 TM4 fehlen würde. ^(138;139;140) Es könnte sich auch eine fehlende oder erniedrigte Sekretionssteigerung zeigen, falls der PACAP-Effekt teilweise oder ganz durch eine Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bedingt wäre.

Auch im Ca^{2+} -freiem Medium zeigte sich eine Steigerung der Reninsekretion durch PACAP. Die Steigerung war um das circa 3,8-fache des Ausgangswertes, damit ähnlich der Steigerung in physiologischem Medium. Dort zeigte sich eine Steigerung um das circa 4,5-fache des Ausgangswertes. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Damit ist ein Einfluss von Ca^{2+} auf die PACAP-Sekretion unwahrscheinlich. Der Effekt von PACAP auf die Reninausschüttung kann damit nicht hauptsächlich durch eine Senkung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels bedingt sein.

4.1.4 Wirkungsweise von PACAP in Abhängigkeit von cAMP

Die Frage, ob PACAP die Reninsekretion cAMP-vermittelt steigert, wurde weiterhin untersucht, indem nach Vorstimulation einer isolierten Rattenniere mit Isoproterenol versucht wurde, die Reninsekretion mit PACAP weiter zu steigern.

Isoproterenol ist einer der stärksten bekannten Stimulatoren der Reninsekretion. ^(48;49)

Nach einer Vorstimulation der Reninsekretion mit Isoproterenol (ISO) in der Konzentration von 10 nM, ist durch klassische die Adenylatzyklase stimulierende Hormone eine weitere Erhöhung der Reninsekretion kaum mehr möglich. ^(13;12) Eine höhere intrazelluläre Konzentration von cAMP als durch ISO 10 nM hervorgerufen, führt nicht zu einer weiteren Steigerung der Reninausschüttung. ⁽¹³⁾

So war zu erwarten, dass auch durch PACAP keine weitere Steigerung der Reninausschüttung möglich ist, falls der PACAP-Effekt auf die Reninsekretion cAMP vermittelt ist.

Sollte PACAP einen zusätzlich stimulierenden Effekt haben, war von einem anderen Stimulationsweg neben cAMP auszugehen.

Sollte PACAP unter einer Vorstimulation durch Isoproterenol einen hemmenden Effekt auf die Reninsekretion haben, könnte eine unter physiologischen Bedingungen untergeordnete Signalkaskade, z.B. durch einen Ca^{2+} Einstrom mittels PAC1 TM4, dafür verantwortlich sein.

Bei einer Vorstimulation durch Isoproterenol zeigt sich keine signifikante Änderung der Reninsekretion durch eine zusätzliche Zugabe von PACAP. Das spricht für eine cAMP vermittelte Steigerung der Reninsekretion durch PACAP.

Das Ergebnis macht auch einen zusätzlichen, unter physiologischen Bedingungen unterdrückten Signalweg der die Reninausschüttung beeinflussen kann unwahrscheinlich.

Das Ergebnis stützt die bisherigen Erkenntnisse für ein Fehlen von PAC1 TM4 Rezeptoren in der Niere. ⁽⁸⁴⁾

Da PACAP(1-27) nicht in der Lage war bei einer Vorstimulation mit Isoproterenol 10 nM die Reninsekretion weiter zu erhöhen, trat die Frage auf, ob Isoproterenol die Niere weiter stimulieren kann, wenn die Reninausschüttung bereits mit PACAP vorstimuliert ist.

Die Potenz der meisten anderen Peptidhormone, die die Reninsekretion stimulieren ist niedriger als die Potenz von Isoproterenol die Reninsekretion zu stimulieren. ^(54;57;7;26) Daher konnte man annehmen, dass auch bei einer Vorstimulation des Renin-Angiotensin-Systems durch PACAP eine weitere Stimulation durch Isoproterenol möglich sei. Diese These basiert auch auf die Ergebnisse der Stimulation einer isoliert, perfundierten Rattenniere mit PACAP(1-27) in steigenden Konzentrationen. Dabei war die Steigerung bei einer PACAP-Konzentration von 100 nM immer noch niedriger als die Stimulation mit Isoproterenol 10 nM.

Es zeigte sich auch, dass Isoproterenol 10 nM die Reninabgabe weiter stimulieren kann, auch wenn die Niere bereits mit PACAP 10 nM perfundiert ist. Allerdings kann Isoproterenol nur soweit stimulieren, wie bei einer normal perfundierten Niere ohne Vorstimulation. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen, dass PACAP bei einer Vorstimulation mit Isoproterenol keine weiterhin erhöhte Reninsekretion bewirkt und spricht für einen cAMP-vermittelten Effekt von PACAP auf die Reninsekretion der Niere.

4.2 Interaktion von PACAP und VIP

Das Renin-Angiotensin-System ist sowohl durch VIP als auch durch PACAP stimulierbar. ^(26;23;14;8) Beide Substanzen wirken teilweise über die selben, die sogenannten VPAC-Rezeptoren. ^(133;134;108) Dabei hat PACAP(1-27) eine nahezu gleich große Affinität wie VIP.

^(129;107) Daneben wirkt PACAP noch über den PAC1 Rezeptor. ^(127;128) An diesen Rezeptor hat PACAP eine tausendmal höhere Affinität als VIP. ⁽¹²⁹⁾

VIP stimuliert bekanntermaßen das Renin-Angiotensin-System. ^(23;21;14) Dieser Effekt war am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere nachweisbar. VIP stimulierte die Reninsekretion konzentrationsabhängig, der Effekt war reversibel.

Da es keine selektiven Blocker für die einzelnen PACAP-Rezeptoren gab, wurde versucht durch indirekte Versuche mit VIP herauszufinden über welche Rezeptoren PACAP die Reninausschüttung in der Niere stimuliert.

Um weiter zu untersuchen über welche Rezeptoren PACAP auf die Reninsekretion der Niere wirkt, galt es die gegenseitige Beeinflussbarkeit von VIP und PACAP auf die Reninausschüttung der Niere zu untersuchen. Bei einer Stimulation der Reninsekretion mit VIP 10 nM, kann mit der selben Konzentration von PACAP keine weitere signifikante Stimulation ausgelöst werden.

Das spricht dafür, dass die Wirkung beider Substanzen, bei höheren Konzentrationen, wie sie mit 10 nM vorliegen, über den VPAC-Rezeptor vermittelt ist. Eine Verdopplung der VIP oder PACAP Konzentration bei nur einer Substanz im Stimulationsversuch, würde nach bisherigen Forschungsergebnissen ebenfalls keine signifikante Steigerung der Reninsekretion bewirken. Es ist also gut nachvollziehbar, dass PACAP bei einer Vorstimulation durch VIP keine weitere signifikante Steigerung der Reninsekretion bewirkt, da auch eine Verdopplung der VIP-Konzentration nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Reninausschüttung führt.

Das lässt darauf schließen, dass nicht nur beide Substanzen, zumindest im untersuchten Konzentrationsbereich, über die Aktivierung der Adenylatzyklase mittels VPAC-Rezeptor wirken, sondern auch, dass beide Substanzen eine ähnlich hohe stimulierende Potenz besitzen. Dafür spricht auch die entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft von PACAP und VIP, sowie die Versuche zur Bindungsaffinität und Potenz am Rezeptor. ^(74;88;129)

Unwahrscheinlich wird durch diese Versuche eine wesentliche Rolle des PAC1-Rezeptors bei hohen PACAP-Konzentrationen, da PACAP ansonsten entweder eine höhere stimulierende Potenz als VIP haben müsste oder, falls die Reninsekretion über den PAC1-Rezeptor gehemmt würde, zu einem Rückgang der Reninsekretion nach Vorstimulation durch VIP führen würde.

Diese Ergebnisse decken sich mit Erkenntnissen, die bei Versuchen mit isoliert perfundierten Mäusenieren von PAC1 „knockout“-Mäusen gewonnen wurden. Dort konnte durch PACAP

in Konzentrationen zwischen 10 nM und 100 nM die Reninsekretion sowohl bei Wildtypmäusen als auch bei PAC1 „knockout“-Mäusen gesteigert werden. ⁽¹¹¹⁾ Allerdings war hier die Stimulation der Reninfreisetzung im niedrigen Konzentrationsbereich von PACAP durch den PAC1-Rezeptor vermittelt. Zudem war die Stimulation der Reninausschüttung, bei PACAP-Konzentrationen, die im Plasma von Mäusen vorliegen, von PAC1-Rezeptoren abhängig. ⁽¹¹¹⁾

Bei einer Vorstimulation durch PACAP(1-27) 10 nM führt eine weitere Zugabe von VIP 10 nM ebenfalls nicht zu einer weiteren Steigerung der Reninausschüttung. Auch diese Beobachtung spricht für den VPAC-Rezeptor als vermittelnden Rezeptor für die Reninausschüttung in der Niere durch hohe PACAP-Konzentrationen. In Zusammenschau bestätigt dieses Ergebnis das Ergebnis, dass PACAP bei einer Vorstimulation durch VIP keine weitere signifikante Steigerung der Reninabgabe bewirkt.

Isoproterenol 10 nM führt bei einer Vorstimulation durch PACAP 10 nM und VIP 10 nM gemeinsam zu einer weiteren Stimulation der Reninsekretion. Das deckt sich mit den Ergebnissen, dass Isoproterenol auch bei einer Stimulation der Reninsekretion nur durch PACAP zu einer weiteren Stimulation führt.

Wie erwähnt handelt es sich bei Konzentrationen von 10 nM oder 100 nM bei PACAP und VIP um relativ hohe Konzentrationen. Die Konzentrationen von PACAP im Plasma von Mäusen liegt im pM-Bereich.

Ob bei niedrigeren Konzentrationen verschiedene Rezeptoren aktiviert werden konnte in den vorliegenden Experimenten nicht geklärt werden. Hierzu sind Versuche erforderlich, die mit niedrigeren Konzentrationen von VIP und PACAP arbeiten. Zudem bieten sich hier Versuche an PAC1-knockout Mäusen an. ⁽¹⁴¹⁾

Mittlerweile sind solche Versuche durchgeführt worden. Sie zeigen, dass die Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems bei PACAP-Konzentrationen von 0,1 nM Abhängig von PAC1-Rezeptoren ist. Die Reninausschüttung wurde bei diesen Konzentration bei Nieren von Wildtypmäusen signifikant gesteigert, während bei PAC1-knockout Mäusen kein Effekt eintrat. Zudem liegt die Plasmaninkonzentration von PAC1-knockout Mäusen signifikant höher als die Plasmaninkonzentration von Wildtypmäusen. ⁽¹¹¹⁾

Diese Daten deuten auf eine wichtige Rolle der PAC1-Rezeptoren bei der physiologischen Regulation der Reninabgabe durch PACAP hin.

4.3 PACAP-Konzentration im Plasma in vivo

Eine PACAP Wirkung auf die Reninsekretion in der Niere wurde ab einer Konzentration von 100 pM PACAP im Plasma nachgewiesen. Bei Versuchen zeigte sich eine durchschnittliche PACAP-Plasmakonzentration von circa 75 pM in einer Kontrollgruppe. Somit liegt die PACAP-Konzentration im Plasma im wirksamen Bereich.

Um zu untersuchen, ob PACAP im Sinne eines hormonellen Regulationssystems die Reninausschüttung der Nieren beeinflusst wurde Manöver veranlasst, die zu einer Steigerung der Reninsekretion in vivo führen.

Es zeigt sich bei all diesen Manövern keine signifikante Steigerung der Plasmakonzentration von PACAP. Das spricht gegen eine Rolle von PACAP als humorales Regulationsinstrument bei der Steigerung der Reninausschüttung durch ACE-Hemmer, Schleifendiuretika und eine Nierenarterienstenose.

Diese Daten werden durch Untersuchungen an PAC1 „knockout“-Mäusen gestützt. Dort hatten PAC1 „knockout“-Mäuse einen niedrigeren Plasmareninspiegel im Vergleich zu Wildtypmäusen. Das RAA-System lässt sich aber bei beiden genetischen Varianten gleichsinnig regulieren.⁽¹¹¹⁾ PACAP scheint systemisch einen tonisch stimulierenden Effekt auf die Reninsekretion zu haben, der Regulationsmechanismus der akuten Reninausschüttung ist nach diesen Untersuchungen humoral ebenfalls nicht oder nur unvollständig von PACAP abhängig.

Allerdings kommt PACAP vor allem in Nervenendigung in der Nierenrinde als Co-Transmitter vor^(17;94;111). Es könnte also durchaus sein, dass PACAP lokal als Co-Transmitter ausgeschüttet wird und somit zu einer Steigerung der Reninsekretion führt. Als Co-Transmitter könnte PACAP auch eine wesentlich höhere Konzentration am juxtaglomerulären Apparat erreichen, als die PACAP-Konzentration im Plasma.⁽⁹⁴⁾

Um das genau herauszufinden müssten noch weitere Versuche durchgeführt werden. Es müsste zum Beispiel die lokale PACAP-Konzentration am juxtaglomerulären Apparat in Ruhe und bei Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems gemessen werden, was technisch schwer realisierbar ist. Zudem könnten Versuche an PACAP-knockout Mäusen hilfreich sein.

5 Zusammenfassung

Es gibt verschiedene Signalkaskaden, die die Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen der Niere steuern. Eine Signalkaskade geht dabei über die Beeinflussung der intrazellulären cAMP-Konzentration. PACAP als Hypophysenhormon erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration.

Es konnte in den Versuchen mit der isoliert perfundierten Rattenniere gezeigt werden, dass PACAP über diese Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Reninsekretion der Niere steigert. Dabei ist dieser Effekt sowohl durch PACAP(1-27) als auch durch PACAP(1-38) auszulösen. Die Sekretionssteigerung ist reversibel und durch Angiotensin II hemmbar.

Durch Simultanversuche mit VIP, das eine ähnlich hohe Affinität zu VPAC-Rezeptoren wie PACAP besitzt, zeigten sich Hinweise auf eine Beteiligung dieser VPAC-Rezeptoren auf die Reninausschüttung durch PACAP, bei den verwendeten hohen Konzentrationen. Allerdings gibt es Untersuchungen an PAC1-knockout Mäusen, die für eine Beteiligung der PAC1-Rezeptoren an der Steigerung der Reninsekretion sprechen. Eventuell waren die relativ hohen Konzentrationen von VIP für die Aktivierung der PAC1-Rezeptoren bei unseren Versuchen ausschlaggebend.

Bei in vivo Versuchen zeigte sich keine Änderung der PACAP-Plasmakonzentration durch Manöver, die die Reninsekretion der Niere erhöhen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Erhöhung der Reninsekretion durch ACE-Hemmer, Schleifendiuretika und Nierenarterienstenose nicht durch PACAP vermittelt ist.

Allerdings stimuliert PACAP bei physiologischen Konzentrationen die Reninsekretion und hat demnach eine systemische Wirkung auf das RAA-System. Zusätzlich könnte PACAP als Co-Transmitter in Nervenendigungen indirekt an der Reninausschüttung der Niere beteiligt sein.

Um die lokale Wirkung von PACAP am juxtaglomerulären Apparat der Niere zu untersuchen sind weitere Versuche notwendig.

Teile der Arbeit wurden bereits im „Journal of the American Society of Nephrology“ publiziert (Hautmann M, Friis U, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schütz G, Schweda F; Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide stimulates Renin secretion via Activation of PAC1 Rezeptors; J Am Soc Nephrol. 2007; 12:1150-6).

6 Literaturverzeichnis

1. Hardman JA, Hort YJ, Catanzaro DF, Tellam JT, Baxter JD, Morris BJ, Shine J. Primary structure of the human renin gene. *DNA* 1984; 3(6):457-468
2. Elde R, Hökfelt T. Localization of hypophysiotropic peptides and other biologically active peptides within the brain. *Ann Rev Physiol* 1979; 41:587-602
3. Stumpf WE, Jennes L. The A-B-C (Allocortex-Brainstem-Core) circuitry of endocrine-autonomic integration and regulation: A proposed hypothesis on the anatomical-functional relationships between estradiol sites of action peptidergic-aminergic neuronal systems. *Peptides* 1984; 5:221-226
4. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164:567-574
5. Chatterjee TK, Sharma RV, Fisher RA. Molecular cloning of a novel variant of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-Type calcium channels. *J Biol Chem.* 1996; 271:32226-32232
6. Sharp MG, Fettes D, Brooker G, Clark AF, Peters J, Fleming S, Mullins JJ. Targeted inactivation of the Ren-2 gene in mice. *Hypertension.* 1996; 28(6):1126-1131.
7. Porter JP, Thrasher TN, Said SI, Ganong WF. Vasoactive intestinal peptide in the regulation of renin secretion. *Am J Physiol.* 1985; 249(1 Pt 2):F84-9
8. Ganong WF. Neuropeptides in cardiovascular control. *J Hypertens Suppl.* 1984; 2(3): S15-23

9. Wang PH, Do YS, Macaulay L, Shinagawa T, Anderson PW, Baxter JD, Hsueh WA. Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J Biol Chem.* 1991; 266(19):12633-12638.
10. Ganong WF, Porter JP, Bahnson TD, Said SI. Peptides and neurotransmitters that effect renin secretion. *J Hypertens Suppl.* 1984; 2(1):75-82
11. Calam J, Dimaline R, Peart WS, Singh J, Unwin RJ. Effects of vasoactive intestinal polypeptide on renal function in man. *J Physiol.* 1983; 345:469-75
12. Viskoper RJ, maxwell MH, Lupu AN, Rosenfeld S. Renin stimulation by isoproterenol and theophylline in isolated perfused kidney. *Am J Physiol.* 1977; 232(3):F248-53
13. Churchill PC, Churchill MC. Isoproterenol-stimulated renin secretion in the rat: second messenger roles of Ca^{2+} and cyclic AMP. *Life sci.* 1982; 30(15):1313-9
14. Porter JP, Ganong WF. Vasoactive intestinal peptide and renin secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; 527:465-77
15. Dimaline R, Peart WS, Unwin RJ. Effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on renal function and plasma renin activity in the conscious rabbit. *J Physiol.* 1983; 344:379-88
16. Miyata A, Jiang L, Dahl RR, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170:643-648
17. Vaudry D, Gonzales B, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: From Structure to functions. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:269-324
18. Rhefeld JF. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol Rev.* 1998; 78:1087-1108

19. Taugner, R., Buhrle, C. P. and Nobiling, R. Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res* 1984; 237: 459-472.
20. Ogawa K, Yamasato M, Taniguchi K. Exocytosis of secretory granules in the juxtaglomerular granular cells of . *Anat Rec.* 1995; 243(3):336-346.
21. Calam J, Dimaline R, Peart WS, Unwin R. Studies on the renin-response to vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the conscious rabbit. *Br J Pharmacol.* 1983; 80(1):13-5
22. Rasch R, Jensen BL, Nyengaard JR, Skott O. Quantitative changes in rat renin secretory granules after acute and chronic stimulation of the renin. *Cell Tissue Res.* 1998; 292(3):563-571.
23. Porter JP, Said SI, Gangong WF. Vasoactive intestinal peptide stimulates renin secretion in vitro: evidence for a direct action of the peptide on the renal juxtaglomerular cells. *Neuroendocrinology.* 1983; 36(4):404-8
24. Friis UG, Jensen BL, Aas JK, Skott O. Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ Res.* 1999; 84(8):929-936.
25. Skott, O. and Taugner, R. Effects of extracellular osmolality on renin release and on the ultrastructure of the juxtaglomerular epithelioid cell granules. *Cell Tissue Res* 1987; 249: 325-329.
26. Porter JP, Reid IA, Said SI, Gangong WF. Stimulation of renin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Am J Physiol.* 1982; 243(3):F306-10
27. Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F. The Calcium Paradoxon of Renin Release: Calcium Suppresses Renin Exocytosis by inhibition of Calcium-Dependent Adenylate Cyclases AC5 and AC6. *Circulation Res.* 2006; 99: 1197-206
28. Sigmon DH, Fray JC. Chemiosmotic control of renin release from isolated renin granules of rat. *J Physiol.* 1991; 436:237-256.

29. King, J. A. and Fray, J. C. Hydrogen and potassium regulation of (pro)renin processing and secretion. *Am. J. Physiol* 1994; 267: 1-12.
30. Taugner, R., Nobiling, R., Metz, R., Taugner, F., Buhrle, C. and Hackenthal, E. Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell Tissue Res* 1988; 252: 687-690.
31. Hakanson R, Thorell J. Biogenetics of neurohormonal peptides. Academic. 1986
32. Rechler MM, Missley SP. The nature and regulation of the receptors for insuline-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 1985; 47: 425-442
33. Kim MH, Kim SH, Kim HS, Chang JW, Hong YS, Kim HW, Park CS. Regulation of renin secretion through reversible phosphorylation of myosin by myosin light chain kinase and protein phosphatase type. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 285(3):968-974.
34. Kurtz, A. and Penner, R. Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 3423-3427.
35. Inooka H, Endo S, Kitada C, Mizuta E, Fujino M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) with 27 residues. Conformation determined by ¹H-NMR and CD spectroscopies and distance geometry in 25% methanol solution. *Int J Pep Protein Res.* 1992; 40:456-464
36. Wray V, Kockoschke C, Nokihara K, Naruse S. Solution structure of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide by nuclear magnet resonance spectroscopy. *Biochemistry.* 1993; 32:5832-5841
37. Braun W, Wider G, Lee KH, Wüthrich K. Confirmation of glucagon in a lipide-water interphase by ¹H nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol.* 1983; 169:921-948
38. Schweda F, Riegger GA, Kurtz A, Kramer BK. Store-operated calcium influx inhibits renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 ;279(1):F170-176.

39. Ohkubo S, Kimura C, Ogi K, Okazaki K, Hosoya M, Onda H, Miyata A, Arimura A, Fujino M. Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA Cell Biol.* 1992; 11:21-30
40. Okazaki K, Itoh Y, Ogi K, Ohkubo S, Onda H. Characterisation of murine PACAP mRNA. *Peptides.* 1995; 16:1295-1299
41. Bitar KG, Coy DH. Interaction of ovine pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP-38) with rat lung membranes. *Peptides.* 1993; 14:621-627
42. Pohl M, Wank SA. Molecular cloning of the helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. Relationship to the vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and glucagon like peptide 1 and evidence against the existence of mammalian homologues. *J Biol Chem.* 1998; 273:9778-9784
43. Bitar K, Coy D. Interaction of ovine pituitary adenylat cyclase-activating Peptide (PACAP-38) with rat lung membranes. *Peptides.* 1993; 14:621-627
44. Harmar A, Sheward J, Morrison C, Waser B, Gugger M, Reubi JC. Distribution of the VPAC2 Receptor in periperal tissues of the mouse. *Endocrinology.* 2004; 145:1203-1210
45. Busse R [Hrsg]. *Kreislaufphysiologie.* Thieme, Stuttgart. 1982
46. Barajas L, Sokolski KN, Lechago J. Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in the kidney. *Neurosci Lett.* 1983; 43(2-3):263-9
47. Steenstrup BR, Joergensen JC, Alm P, Hannibal J, Junge J, Fahrenkrug J, Ottesen B. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Reg Pep.* 1996; 61:197-204
48. Kurtz A, Pfeilschifter J, Bauer C. Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane? *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 124(2):359-366.

49. Keeton TK, Campbell WB. The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev.* 1980; 32(2):81-227. Review
50. Schweda F, Kurtz A. Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand.* 2004; 181(4):383-398
51. Weinberger MH, Aoi W, Henry DP. Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro. *Circ Res.* 1975; 37(3):318-324.
52. Whalen E, Johnson A, Lewis S. Hemodynamic actions of systemically injected pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-27 in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1999 ; 365 :205-15
53. Walsh JH. Gastrointestinal hormones. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 1994; S:1-128
54. Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol.* 1996; 271: F659-669.
55. Walsh JH, Mayer EA. Gastrointestinal hormones. *Gastrointestinal disease.* 1993; S:18-44
56. Arimura A, Li M, Batuman V. Potential protective action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP38) on in vitro and in vivo models of myeloma kidney injury. *Blood.* 2006; 107:661-668
57. Vandongen R. Suppression of renin secretion in the isolated rat kidney by cycloheximide. *Eur J Pharmacol* 1976; 40:179-181.
58. Chartrel N, Wang Y, Fournier A, Vaudry H, Conlon JM. Frog vasoactive intestinal polypeptide and galanin: Primary structures and effects on pituitary adenylate cyclase. *Endocrinology.* 1995; 136:3079-3086
59. Henrich WL, Campbell WB. Importance of calcium in renal renin release. *Am J Physiol.* 1986; 251(1 Pt 1):E98-103.

60. Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skott O, Briggs JP. Effect of adenosine1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest* 1990; 85:1622-1628.
61. Schmidt R, Thews G, Lang F [Hrsg]. *Physiologie des Menschen*. Springer, Berlin. 2000
62. Cowley AW Jr. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev.* 1992; 72:231-300
63. Montéro M, Yon L, Rousseau K, Arimura A, Fournier A, Dufour S, Vaundry H. Distribution, characterization and GH-releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the european eel, *anguilla anguilla*. *Endocrinology.* 1998; 139:4300-4310
64. Tams JW, Johnsen AH, Fahrenkrug J. Identification of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 1-38 binding factor in human plasma, as ceruloplasmin. *Biochem.* 1999; 341:271-276
65. Chiu T, Reid IA. Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278:793-799.
66. Chiu YJ, Hu SH, Reid IA. Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290:16-19.
67. Beavo, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev* 1995; 75: 725-748.
68. Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Kieninger M, Wagner C. Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am J Physiol.* 1998; 274(4 Pt 2):F709-717.

69. Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreasen D, Hansen PB, Skott O. Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ Res.* 2002; 90(9):996-1003.
70. Warren J, Donnelly L, Cullen S, Robertson B, Ghatei M, Bloom S, Mc Dermot. Pituitary adenylat cyclase-activating polypeptide: a novel, long-lasting, endothelium-independent vasorelaxant. *Eur J Pharmacol.* 1991; 197:131-134
71. Feany MB, Quinn WG. A neuropeptide gene defined by drosophila memory mutant amnesiac. *Science.* 1995; 268:869-873
72. McRory JE, Parker RL, Sherwood NM. Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA and Cell Biol.* 1997; 16:95-102
73. Chartrel N, Tonon MC, Vaudry H, Conlon JM. Primary structure of frog pituitray adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology.* 1991; 129:3367-3371
74. Campbell RM, Scanes CG. Evolution of growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regal.* 1992; 2:175-191
75. Kurtz A, Wagner C. Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol.* 1999; 202 (Pt 3):219-225.
76. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 1990; 70(4):1067-1116. Review.
77. Magistratti PJ, Cardinaux JR, Martin JL. VIP and PACAP in the CNS: Regulators of glial energy metabolism and modulators of glutaminergic signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 865:213-225
78. Gourlet P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, De Neef P, Robberecht P. Addition of the (28-38) peptide sequence of PACAP to the VIP sequence modifies peptide selectivity and efficacy. *Int J Pept Prot Res.* 1996; 48:391-396

79. Rawlings SR, Piuz I, Schlegel W, Bockaert J, Journot L. Differential expressions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptor subtypes in clonal pituitary somatotrophs and gonadotrophs. *Endocrinology*. 1995; 136:2088-2098
80. Gourlet P, Vandermeers A, Vertongen P, Rathé J, De Neef P, Gnudde J, Waelbroeck M, Robberecht P. Development of high affinity selective VIP₁ receptor agonists. *Peptides*. 1997; 18:1539-1545
81. Kurtz A, Skott O, Chegini S, Penner R. Lack of direct evidence for a functional role of voltage-operated calcium channels in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch*. 1990; 416:281-287.
82. Scholz H, Kurtz A. Differential regulation of cytosolic calcium between afferent arteriolar smooth muscle cells from mouse. *Pflugers Arch* 1995; 431: 46-51.
83. Wagner C, Kramer BK, Hinder M, Kieninger M, Kurtz A. T-type and L-type calcium channel blockers exert opposite effects on renin secretion and renin gene expression in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 579-585.
84. Shivers BD, Görcs TJ, Gottschall PE, Arimura A. Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distribution. *Endocrinology*. 1991; 128:3055-3065
85. Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Hamar AJ. The VIP 2 receptor: Molecular characterization of the cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett*. 1993; 334:3-8
86. Hackenthal E, Taugner R. Hormonal signals and intracellular messengers for renin secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 1986; 47: 1-12.
87. Gardiner SM, Rakhit T, Kempt PA, March JE, Bennet T. Regional haemodynamic responses to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in conscious rats. *Br J Pharmacol*. 1994; 111:589-597

88. Segre GV, Goldring SR. Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, glucagon-like peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol Metab.* 1993; 4:309-314
89. Schweda F, Kramer BK, Kurtz A. Differential roles of the sodium-calcium exchanger in renin secretion and renal vascular resistance. *Pflugers Arch.* 2001; 442(5):693-699.
90. Shioda S, Shuto Y, Somogyvari-Vigh A, Legradi G, Onda H, Coy DH, Nakajo S, Arimura A. Localization and gene expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rat brain. *Neurosci Res.* 1997; 28:345-354
91. Lamperti ED, Rosen KM, Villa-Komaroff L. Characterization of the gene and messages for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat and mouse. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991; 9:217-231
92. Robberecht P, Gourlet D, De Neef P, Woussan-Colle M-C, vandermeers-Piret M-C, Vandermeers A, Christophe J. Structural requirement for the occupancy of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. Discovery of PACAP (6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem.* 1992; 207:239-246
93. Vandermeers A, Vandenborre S, Hou X, De Neef P, Robberecht P, Vandermeers-Piret M-C, Christophe J. Antagonistic properties are shifted back to agonist properties by further N-terminal shortening of pituitary adenylate cyclase-activating peptides in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *Eur J Biochem.* 1992; 208:815-819
94. Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology.* 1991; 129:2787-2789

95. Dow RC, Bennie J, Fink G. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP 38) is released into hypophysial portal blood in normal male and female rat. *J Endocrine*. 1994; 142:R1-R4
96. Jensen BL, Skott O. Renin release from permeabilized juxtaglomerular cells is stimulated by chloride but not by low calcium. *Am J Physiol* 1994; 266:F604-611.
97. Ghatai MA, Takahashi H, Suzuki J, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR. Distribution, molecular characterisation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissue. *J Endocrinol*. 1993; 136:159-166
98. Robberecht P, Woussen-Colle M-C, De Neef P, Gourlet P, Buscail L, Vandermeers A, Vandermeers-Piret M-C, Christophe J. The two forms of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP (1-27) and PACAP (1-38)) interact with distinct receptors on rat pancreatic AR4-2J cell membranes. *FEBS Lett*. 1991; 286:133-136
99. Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhle C, Nobiling R, Taugner R, Hackenthal E, Bauer C. Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol*. 1986; 250: C563-571.
100. Masuo Y, Suzuki N, Matsumoto H, Tokito F, Matsumoto Y, Tsuda M, Fujino M. Regional distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rat central nervous system as determined by sandwich-enzyme immunoassay. *Brain Res*. 1993; 602:57-63
101. Köves K, Arimura A, Görös TG, Somogyvari-Vigh A. Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology*. 1991; 54:159-169
102. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Satoh F, Sone M, Ohneda M, Sasano H, Mouri T. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) like immunoreactivity

- in human hypothalamus: Co-localization with arginine vasopressine. *Regul Pept.* 1994; 50:267-275
103. Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S, Baba A. Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: An in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 1996; 371 :567-577
104. Hashimoto H, Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Nagata S. Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron.* 1993; 11:333-342
105. Gaudin P, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Maoret JJ, Laburthe M. Stable expression of the recombinant human VIP1 receptor in clonal chinese hamster ovary cells: Pharmacological, functional and molecular properties. *Eur J Pharmacol.* 1996; 302:207-214
106. Pei L. genomic structure and embryonic expression of the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. *Regul Pept.* 1997; 71:153-161
107. Shima K, Sakakibara H, Said SI. Characterization of VIP and helodermin preferring receptors on rat platelets. *Regul Pept.* 1996; 63:99-103
108. Solano RM, Carmena MJ, Carrero I, Cavallaro S, Roman F, Hueso C, Travali S, Lopez-Fraille N, Guijarro LG, Prieto JC. Characterization of vasoactive intestinal peptide/ pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in human benign hyperplastic prostate. *Endocrinology.* 1996; 137:2815-2822
109. Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology.* 1994; 135:2662-2680
110. Gambaryan S, Hausler C, Markert T, Pohler D, Jarchau T, Walter U, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM. Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney

- is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest.* 1996; 98(3):662-670.
111. Hautmann M, Friis U, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schütz G, Schweda F. Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide stimulates Renin secretion via activation of PAC1 Receptors. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 12:1150-6.
112. Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest.* 1998; 102(8):1576-1582.
113. Palkovits M, Somogyvari-Vigh A, Arimura A. Concentrations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in human brain nuclei. *Brain Res.* 1995; 699:116-120
114. Kalra SP, Dube MC, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev.* 1999; 20:68-100
115. Christophe J. Is there appetite after GLP-1 and PACAP?. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 865:253-258
116. Puig de Parada M, Parada MA, Hernández L. Dipsogenic effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP 38) injected into the lateral hypothalamus . *Brain Res.* 1995; 696:254-257
117. Nomura M, Ueta Y, Larson PJ, Hannibal J, Serino R, Kabashima N, Shibuya I, Yamashita H. Water deprivation increases the expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene in subfornical organ. *Endocrinology.* 1997; 138:4096-4100
118. Morley JE, Horowitz M, Morley PMK, Flood JF. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide reduces food intake in mice. *Peptides.* 1997; 13:1133-1135

119. Chance WT, Thompson H, Thomas I, Fischer JE. Anorectic and neurochemical effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides in rats. *Peptides*. 1995; 16:1511-1516
120. Mizuno Y, Kondo K, Terashima Y, Arima H, Murase T, Oiso Y. Anorectic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in rats: lack of evidence for involvement of hypothalamic neuropeptide gene expression. *J Neuroendocrinol*. 1998; 10:611-616
121. Lutz-Bucher B, Monnier D, Koch B. Evidence of the presence of receptors for pituitary adenylat cyclase-activating polypeptide in the neurohypophysis that are positively coupled to cyclic AMP formation and neurohypophyseal hormone secretion. *Neuroendocrinology*. 1996; 64:153-161
122. Li S, Grinevich V, Fournier A, Pelletier G. Effects of pituitary adenylat cyclase-activating polypeptide (PACAP) on gonadatropin-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat brain. *Mol Brain Res*. 1996; 41:157-162
123. Grinevich V, Fournier A, Pelletier G. Effects of pituitray adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*. 1997; 11:2767-2772
124. Anderson ST, Sawangjaroen K, Curlewis JD. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide acts within the medial basal hypothalamus to inhibit prolactin and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*. 1996; 137:3424-3429
125. Anderson ST, Curlewis JD. PACAP stimulates dopamine neuronal activity in the medial basal hypothalamus and inhibits prolactin. *Brain Res*. 1998; 137:3424-3429
126. Seidah NG, Day R, Chretien M. The family of subtilisin/kexin like protein and pro-hormone convertases: Divergent or shared functions. *Biochemie*. 1994; 76:197-209

127. Gaudin P, Maoret JJ, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Laburthe M. Constitutive activation of the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor, a member of the new class II family of G proteine coupled receptors. *J Biol Chem.* 1998; 273:4990-4996
128. Gottschall PE, Tsatsuno I, Miyata A, Arimura A. Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Endocrinology.* 1990; 127:272-277
129. Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sredharan SP, Wank SA, Waschek JA. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Pharmacol Rev.* 1998; 50:265-270
130. Lam HC, Takahashi K, Ghatai MA, Kanze SM, Polak JM, Bloom SR. Binding sites of a novel neuropeptide pituitary-adenylate-cyclase-activating polypeptide in rat brain and lung. *Eur J Biochem.* 1990; 193:725-729
131. Suda K, Smith DM, Ghatai MA, Murphy JK, Bloom SR. Investigation of the interaction of VIP binding sites with VIP and PACAP in human brain. *Neurosci Lett.* 1992; 137:19-23
132. Gaudin P, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Maoret JJ, Laburthe M. The human vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor I (VPAC1): Constitutive activation by mutations at threonine 343. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254:15-20
133. Pisegna JR, Wank SA. Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:6345-6349
134. Ogi K, Miyamoto Y, Masuda Y, Habata Y, Hosoya M, Ohtaki M, Masuyama Y, Onda H, Fujino M. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a

- human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 196:1511-1521
135. Pisegna JR, Wank SA. Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *J Biol Chem.* 1996; 271:17267-17274
136. Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature (Lond).* 1993; 365:170-175
137. Hashimoto H, Yamamoto K, Hagihara N, Ogawa N, Nishino A, Aino H, Nogi H, Imanishi K, Matsuda T, Baba A. cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochem Biophys Acta.* 1996; 1281:129-133
138. Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuise A, Houssamin S, Spengler D, Bockaert J, Journot L. Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptors selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J Biol Chem.* 1996; 271:22146-22151
139. Dautzenberg FM, Mevenkamp G, Wille S, Haugher RL. N-terminal splice variants of type I PACAP receptor. Isolation, Characterisation and ligand binding/selectivity determinants. *J Neuroendocrinol.* 1999; 11:941-949
140. Aino H, Hashimoto H, Ogawa N, Nishino A, Yamamoto K, Nogi H, Nagata S, Baba A. Structure of the gene encoding the mouse pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. *Gene* 1995; 164:301-304
141. Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Grass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A, Schutz G. Impairment of mossy fibre long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate

- cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci.* 2001; 21:5520-7
142. Robberecht P, Gourlet P, Gauvin A, Buscail L, De Neef P, Arimura A, Christophe J. PACAP and VIP receptors in rat liver membranes. *Am J Physiol.* 1991; 260:G97-G102
143. Sakakibara H, Shima K, Said SI. Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors on rat alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1994; 267:L256-262
144. Huang M, Shirahase H, Rohrstad OP. Comparative study of vascular relaxation and receptor binding by PACAP and VIP. *Peptides.* 1993; 14:755-762

7 Danksagung

Ohne die Unterstützung vieler hilfsbereiter Menschen wäre die Durchführung der Versuche und die Erstellung der Arbeit nicht möglich gewesen. Ich möchte mich an dieser Stelle bei Allen bedanken die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn **Prof. Dr. med. Armin Kurtz** als Leiter des Lehrstuhls für Physiologie der Universität Regensburg, für die Möglichkeit am Lehrstuhl für Physiologie promovieren zu dürfen und die Geräte und Räume des Lehrstuhls nutzen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **PD Dr. med. Frank Schweda** für die Überlassung des interessanten Themas, für die hervorragende Betreuung und das in mich gesetzte Vertrauen. Zudem möchte ich mich für das Anlernen zum experimentellen Arbeiten, die Unterstützung bei den Versuchen und die wertvolle Hilfe beim Erstellen der Arbeit bedanken. Ich konnte sowohl fachlich als auch persönlich in hohen Masse von den Erfahrungen, die ich beim Erstellen der Arbeit sammelte, profitieren.

Bei den Mitarbeitern des Labors, namentlich besonders bei **Marlies Hamann** und **Karl-Heinz Götz** möchte ich mich für die Möglichkeit, die Technik der isoliert perfundierten Rattenniere erlernen zu dürfen, sowie für die tatkräftige Unterstützung bei immer wieder aufgetretenen kleineren Problemen bedanken.

Ich möchte zusätzlich von der Möglichkeit Gebrauch machen allen zu danken, die mich während meines Studiums und während meiner bisherigen Tätigkeit als Arzt fachlich unterstützt haben.

Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang **Prof. Dr. Dr. Herbert Hees**, von dem ich fachlich wie auch menschlich während meines Studiums viel profitiert habe und **Mr. NP Ingram**, consultant surgeon, und seinem Team sowie **Mr. N Shah**, consultant ENT-surgeon, für die exzellente Betreuung und die individuelle Förderung während meiner zwei Aufenthalte auf Jersey.

Selbstverständlich gibt es viele weitere Menschen, die mich fachlich und persönlich unterstützt haben, die allerdings nicht alle namentlich nennen kann. Auch diesen gilt mein ausdrücklicher Dank.

Persönliche Daten:

Name: Matthias Günther Hautmann
Geburtsdatum: 07.05.1979
Geburtsort: Regensburg



Schulbildung und Studium:

06/1998 Abitur am Goethe-Gymnasium Regensburg, Note 1,9
1999-2006 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg,
Gesamtnote 1,49
09/2001 Ärztliche Vorprüfung, Note 2,33
09/2002 Erstes Staatsexamen, Note 2,0
04/2005 Zweites Staatsexamen, Note 1,66
04/2006 Drittes Staatsexamen, Note 1,0
2005-2006 Praktisches Jahr am Klinikum der Universität Regensburg, der
Asklepios Klinik Bad Abbach und dem Jersey General Hospital

Berufliche Tätigkeit:

Seit 05/2006 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der
Universität Regensburg bei Prof. Dr. med. O. Kölbl
