

**Relevanz des Angiotensin II Typ
1a-Rezeptors und der
NADPH-Oxidase für die Entstehung
Angiotensin II-vermittelter DNA-Schäden**

*Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg*

vorgelegt von
Anna Zimmol

aus Würzburg
geboren in Schwientochlowitz, Polen

Würzburg 2016



Eingereicht bei der Fakultät für Biologie am: 14.01.2016

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

1. Gutachter: Frau PD Dr. Nicole Schupp
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Georg Krohne

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer:.....
2. Prüfer:.....

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

INHALT

1. EINLEITUNG	- 7 -
1.1 Erhöhte Nierenkrebsinzidenz bei hypertensiven Patienten	- 7 -
1.2 Das klassische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	- 8 -
1.2.1 Angiotensin II-Rezeptoren.....	- 10 -
1.2.2 Signalwege des AT1-Rezeptors	- 11 -
1.3 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies.....	- 13 -
1.3.1 Oxidativer Stress im Zusammenhang mit Hypertonie	- 14 -
1.3.1.1 NADPH-Oxidase	- 14 -
1.3.2 Oxidativer Stress und DNA-Schäden	- 16 -
1.4 Antioxidative Abwehrmechanismen.....	- 17 -
1.4.1 Der Transkriptionsfaktor Nrf2	- 17 -
1.4.2 Nrf2-abhängige Transkription von antioxidativen Enzymen.....	- 19 -
1.5 DNA-Reparatur-Mechanismen	- 20 -
1.5.1 Basenexzisionsreparatur	- 20 -
1.5.2 Poly-(ADP)-Ribosylierung und ihre Rolle bei der BER	- 21 -
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	- 23 -
3. MATERIALIEN UND METHODEN	- 25 -
3.1 Materialien.....	- 25 -
3.1.1 Versuchstiere	- 25 -
3.1.2 Zelllinie und Zellkulturmedien	- 25 -
3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	- 25 -
3.1.4 Blutdruckmessgerät	- 26 -
3.1.5 Oligonukleotide.....	- 26 -
3.2 Methoden	- 29 -
3.2.1 Zellkultur	- 29 -
3.2.2 Versuch zur Überprüfung der Abhängigkeit AngII-induzierter Schäden vom Blutdruck	- 29 -
3.2.3 Versuche zur Identifikation der möglichen Beteiligung von NADPH-Oxidase-Untereinheiten an der Entstehung AngII-vermittelter DNA-Schäden	- 32 -

3.2.3.1 Beteiligung der NADPH-Oxidase 4	- 32 -
3.2.3.2 Beteiligung der NADPH-Oxidase 2	- 33 -
3.2.4 Nachweis des klinischen Parameters Kreatinin in Urin und Serum	- 34 -
3.2.5 Alkalischer Comet Assay	- 34 -
3.2.6 Reparatur-Comet Assay	- 36 -
3.2.6.1 Schädigung der Substratzellen mit dem Photosensibilisator Ro19-8022	- 38 -
3.2.6.2 Proteinisolierung	- 38 -
3.2.6.3 Durchführung des Reparatur-Comet-Assays	- 39 -
3.2.7 Immunhistochemie	- 40 -
3.2.7.1 ABC-DAB-Reaktion	- 40 -
3.2.7.2 Amplifizierung mit Hilfe von TSA	- 42 -
3.2.7.3 Quantifizierung	- 43 -
3.2.8 Immunfluoreszenz.....	- 43 -
3.2.9 ROS-Bestimmung	- 44 -
3.2.10 Semiquantitative Untersuchung der Niere - Histopathologie.....	- 45 -
3.2.10.1 Glomeruloskleroseindex (GSI)/ Mesangiolyseindex (MSI).....	- 45 -
3.2.10.2 Vaskulärer Schädigungsindex (VSI)	- 47 -
3.2.10.3 Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI)	- 48 -
3.2.11 Molekularbiologische Methoden	- 49 -
3.2.11.1 RNA-Extraktion	- 49 -
3.2.11.2 cDNA-Herstellung (RT-PCR)	- 49 -
3.2.11.3 Touchdown- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 51 -
3.2.11.4 Quantitative RT-PCR	- 53 -
3.2.11.5 Quantitativer RT-PCR-Array	- 56 -
3.2.12 Proteinchemie: Western Blot.....	- 56 -
3.2.13 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	- 58 -
3.2.13.1 Sandwich-ELISA.....	- 58 -
3.2.13.2 Kompetitiver ELISA	- 60 -
3.2.14 Statistik.....	- 62 -

4. ERGEBNISSE - 63 -

4.1 Versuch zur Überprüfung der Abhängigkeit AngII-induzierter Schäden vom Blutdruck - 63 -

4.1.1 AngII führt nicht zu einem erhöhten Blutdruck in der AT1a-KO-Maus	- 63 -
4.1.2 Gewichtsparameter	- 64 -
4.1.3 Nierenfunktionsparameter	- 65 -
4.1.4 Histopathologische Veränderungen der Nierenrinde in WT- und AT1a-KO-Mäusen	- 67 -

4.1.4.1 GSI/MSI	- 67 -
4.1.4.2 VSI	- 68 -
4.1.4.3 TSI	- 68 -
4.1.5 Oxidativer Stress-angestößt durch AngII	- 69 -
4.1.5.1 Erhöhte 15-Isoprostan F _{2t} -Ausscheidung durch AngII	- 69 -
4.1.5.2 AngII führt trotz AT1aR-Defizienz zur Bildung von ROS	- 70 -
4.1.5.3 Gesteigerte Nox2- und Nox4-Expression in AT1a-KO-Mäusen	- 72 -
4.1.6 AngII führt zur Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern	- 72 -
4.1.7 Geringe Beeinflussung des antioxidativen Abwehrsystems durch AngII	- 73 -
4.1.8 Entstehung von DNA-Schäden	- 75 -
4.1.8.1 AngII-induzierte DNA-Schäden können in isolierten Nierenzellen von WT-Mäusen nachgewiesen werden	- 76 -
4.1.8.2 AngII führt zur Induktion von Doppelstrangbrüchen in Niere und Herz von WT- und AT1a-KO-Mäusen	- 76 -
4.1.9 Beeinflussung von Reparaturprozessen in der Niere durch AngII	- 78 -
4.1.9.1 AngII erhöht die DNA-Einschnittsaktivität nur in WT-Mäusen	- 79 -
4.1.9.2 AngII vermindert die Entstehung von PADPR-Ketten	- 79 -
4.1.9.3 Screening von Genen, welche die DNA-Reparatur beeinflussen	- 80 -
4.1.10 Expression der Komponenten des RAS in der Niere	- 82 -

4.2 Versuche zur Identifikation der möglichen Beteiligung von NADPH-Oxidase-Untereinheiten an der Entstehung AngII-vermittelter DNA-Schäden - 85 -

4.2.1 Beteiligung der NADPH-Oxidase 4 (Nox4) an genomischen Schäden	- 85 -
4.2.1.1 Das Fehlen von Nox4 hat keinen Einfluss auf den Blutdruck	- 85 -
4.2.1.2 Gewichtsparameter	- 86 -
4.2.1.3 Nierenfunktionsparameter	- 87 -
4.2.1.4 Histopathologische Veränderungen des Gefäßsystems in der WT- und Nox4-KO-Maus ..	- 88 -
4.2.1.5 Oxidativer Stress-angestößt durch AngII	- 89 -
4.2.1.5.1 Erhöhte 15-Isoprostan F _{2t} -Ausscheidung durch AngII	- 89 -
4.2.1.5.2 Trotz Fehlen von Nox4 kommt es zur Bildung von ROS	- 89 -
4.2.1.5.3 Nox2 kompensiert nicht das Fehlen von Nox4	- 91 -
4.2.1.6 Antioxidatives Abwehrsystem in Nox4-KO-Tieren	- 93 -
4.2.1.7 Entstehung von DNA-Schäden	- 94 -
4.2.1.7.1 Erhöhte DNA-Schäden in isolierten Nierenzellen von Nox4-KO-Tieren	- 94 -
4.2.1.7.2 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere von Nox4-KO-Tieren	- 95 -
4.2.2 Beteiligung der NADPH-Oxidase 2 (Nox2) an genomischen Schäden	- 96 -
4.2.2.1 Das Fehlen von Nox2 hat keinen Einfluss auf den Blutdruck	- 96 -
4.2.2.2 Gewichtsparameter	- 97 -

4.2.2.3 Nierenfunktionsparameter	- 97 -
4.2.2.4 Histopathologische Veränderungen des Gefäßsystems in der WT- und Nox2-KO-Maus..	- 99 -
4.2.2.5 Oxidativer Stress – ausgelöst durch AngII.....	- 99 -
4.2.2.5.1 Schutz vor Lipidperoxidation durch Nox2-Defizienz	- 100 -
4.2.2.5.2 Trotz Fehlen von Nox2 kommt es zur Bildung von ROS	- 100 -
4.2.2.5.3 Nox4 kompensiert nicht das Fehlen von Nox2.....	- 102 -
4.2.2.6 Antioxidatives Abwehrsystem in Nox2-KO-Mäusen	- 103 -
4.2.2.7 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere von Nox2-KO-Tieren.....	- 104 -
5. DISKUSSION	- 106 -
5.1 Relevanz des AT1a-Rezeptors für die Entstehung des Blutdruckes, die Bildung von oxidativen DNA-Schäden und Reparaturprozessen in vivo.....	- 106 -
5.1.1 Beteiligung des AT1b-Rezeptors an der Blutdruckregulation in AT1a-Rezeptor-defizienten Mäusen	- 106 -
5.1.2 Ein Fehlen des AT1a-Rezeptors führt zu histopathologischen Schäden in der Niere	- 107 -
5.1.3 AngII-induzierter oxidativer Stress tritt unabhängig von einem erhöhten Blutdruck auf.....	- 110 -
5.1.4 Antioxidatives Abwehrsystem.....	- 114 -
5.1.5 DNA-Schäden und Reparatur in AT1a-KO-Mäusen	- 116 -
5.2 Identifikation der beteiligten NADPH-Oxidase am AngII-induzierten oxidativen Stress	- 119 -
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	- 126 -
7. SUMMARY	- 129 -
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 131 -
9. LITERATURVERZEICHNIS	- 133 -
DANKSAGUNG	- 157 -
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	- 159 -

1. EINLEITUNG

1.1 Erhöhte Nierenkrebsinzidenz bei hypertensiven Patienten

Weltweit werden 16,5 % aller Todesfälle einem erhöhten Blutdruck zugeschrieben [1]. Trotz der erheblichen Fortschritte, die in der antihypertensiven Pharmakotherapie gemacht werden, wird geschätzt, dass es bis zum Jahr 2025 1,5 Milliarden Menschen mit Bluthochdruck weltweit geben wird [2]. In epidemiologischen Studien wird Bluthochdruck mit einem erhöhten Risiko, an Nierenkrebs zu erkranken, in Verbindung gebracht [3]–[5]. Zusätzlich zu dem erhöhten Risiko an Nierenkrebs zu erkranken wurden unter anderem erhöhte Risiken für Brustkrebs [6], Blasenkrebs [7] und Prostatakrebs [8] gefunden. Andere Studien zeigten, dass ein erhöhter Blutdruck das Nierenkrebsrisiko verdoppelt [5], [9] und es sogar ansteigt, je länger die Patienten an Bluthochdruck litten [9]. Im Jahr 2012 gab es weltweit schätzungsweise 338 000 neue Fälle von Nierenkrebs [10]. Diese Erkrankung ist derzeit weltweit die neunt-häufigste Krebserkrankung bei Männern und die vierzehnt-häufigste bei Frauen mit schätzungsweise 143 000 Todesfällen weltweit im Jahr 2012 [11]. Dass Bluthochdruck ein etablierter Risikofaktor für Nierenkrebs ist, ist eindeutig, jedoch ist der zugrundeliegende biologische Mechanismus bis heute noch nicht vollständig geklärt [12]. Es wurde gezeigt, dass Hypertonie und Krebs in gewissem Maße ähnliche zelluläre und molekulare Eigenschaften teilen [13]. Die Expression des spannungsgesteuerten Natriumkanals (VGSC) in humanen metastasierenden Karzinomen ist hochreguliert [14], [15] und dessen Expression möglicherweise durch Steroidhormone und Wachstumsfaktoren kontrolliert [16]. Die Aktivierung des VGSC führt wiederum zu einem Natriumeinstrom in die Krebszellen [17], wobei ein signifikant erhöhter Natriumgehalt in tumorproduzierendem Gewebe vorliegt [18]. Ein erhöhter intrazellulärer Natriumgehalt kann zu Veränderungen der Ca^{2+} und der H^+ -Homöostase führen und auf diesem Wege zu einer Reihe von abweichenden zellulären Verhaltensweisen führen [19]. Darüber hinaus trägt auch Kalium zur Entstehung einer Hypertonie bei wobei eine Vielzahl an Kaliumionenkanälen auch in den Krebsprozess involviert sind [20]. Apoptose scheint ebenfalls ein gemeinsames Charakteristikum von Bluthochdruck und Krebs zu sein. Bei Bluthochdruck kann Apoptose dereguliert sein, was zu ungehindertem Zellwachstum führen und

Einleitung

somit zur Krebsentstehung beitragen kann [21]. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das als hormoneller Mechanismus den Blutdruck reguliert, ist sehr eng mit Hypertonie verbunden, da ein hochreguliertes RAAS die Entstehung einer Hypertonie begünstigt [12]. Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass eine abweichende Regulierung des RAAS ebenfalls zur Krebsentstehung beitragen kann [22] und es somit auch als ein potenzieller Signalweg in die Entstehung von Nierenkrebs eingreift [23]. In der Tat ergab die Analyse von 13 untersuchten Genvarianten von 7 Kandidatengenomen des RAAS eine Assoziation von Varianten des Gens für den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT1R), des Angiotensinogen (AGT)-Gens und des Gens für das Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) mit gesteigertem Nierenzellkrebsrisiko [12]. Vor allem Genpolymorphismen der Gene AGT und AT1R werden mit einem erhöhten Risiko an Nierenkrebs zu erkranken assoziiert. Das Risiko steigt bei Patienten die an Hypertonie leiden, also eine gesteigerte RAAS-Aktivität besitzen, deutlich an [12]. Eine erhöhte Salzzufuhr ist auch eine wesentliche Ursache für Bluthochdruck [24] und könnte auch ein potenzieller Risikofaktor für Nierenkrebs darstellen [25]. Andere Risikofaktoren, wie Rauchen, Alkoholkonsum, Alter oder Übergewicht, stehen ebenfalls mit Hypertonie und Krebs im Zusammenhang [4].

1.2 Das klassische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Die Bedeutung des RAAS bei der Regulation des Blutdrucks sowie des Flüssigkeits,- und Elektrolythaushaltes ist seit Jahrzehnten bekannt und dessen Rolle bei der Pathogenese von Herz-Nieren-Krankheiten, die weitestgehend auf Ergebnisse aus klinischen Studien basieren, wird auch allgemein akzeptiert [26]. Das RAAS ist eine koordinierte hormonelle Kaskade. Es fungiert somit als endokrine Achse bei der das aktive Hormon AngII extrazellulär, durch sequentielle proteolytische Spaltung aus dessen Vorläufermolekülen gebildet wird. Dieser Signalweg beginnt mit der regulierten Ausschüttung von Renin, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym [27]. Renin wird in juxtaglomerulären Zellen der afferenten Nierenarteriolen gebildet [28] und zunächst als Präprorenin synthetisiert [27]. Aktives Renin entsteht durch sequentielle Abspaltung von zwei Peptiden. Über den Vorgang der Exozytose wird es zuerst in den Nierenkreislauf und anschließend in den systemischen Kreislauf abgegeben. Die Reninsekretion ist von mehreren Faktoren abhängig: Ein Blutdruckabfall, Veränderungen im

Einleitung

Elektrolythaushalt, Verringerung des Blutvolumens, eine sympathische Stimulation von β 1-adrenergen Rezeptoren oder Positivfeedback durch AngII auf juxtaglomeruläre Zellen können eine Reninausschüttung bewirken. Des Weiteren wird Renin auch in anderen Geweben wie Gehirn, Nebenniere sowie im Herzen und Gefäßsystem synthetisiert. Freies Renin reguliert den initiierenden und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des RAAS durch Bildung des Dekapeptids Angiotensin I [Ang I/ Ang-(1-10)] aus dem Vorläuferprotein AGT [27]. Hauptquelle des zirkulierenden AGT ist die Leber, jedoch konnte eine AGT mRNA-Expression auch in vielen anderen Geweben, wie Niere, Gehirn, Herz und Ovarien nachgewiesen werden. AGT wird konstitutiv von der Leber sekretiert, so dass Plasma-AGT-Spiegel normalerweise stabil sind [29]. Angiotensin I ist biologisch inaktiv und wird von ACE durch Abspaltung des C-Terminalen Dipeptids in das biologisch aktive Oktapeptid AngII [(Ang-(1-8))] gespalten. ACE ist eine membrangebundene Exopeptidase, die auf der Plasmamembran vieler Zelltypen lokalisiert ist. So findet man das Enzym in vaskulären Endothelzellen, neuroepithelialen Zellen und im Bürstensaum proximaler Tubuluszellen. Ebenso spaltet ACE Bradykinin, einen Vasodilatator, in einen inaktiven Metaboliten. Folglich resultiert die enzymatische Aktivität von ACE in geringerer Vasodilatation und erhöhter Vasokonstriktion, die AngII-vermittelt ist [27]. AngII kann auch über andere, lokale enzymatische Signalwege generiert werden. Diese befinden sich in vielen Geweben und sind unabhängig von Renin und ACE. So gibt es z. B. Chymase und Cathepsin G die für die Abspaltung von AngII aus Ang I verantwortlich sind. Des Weiteren kann AngII auch direkt aus AGT gewonnen werden. Dies geschieht über den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (t-PA), über Tonin, oder über Cathepsin G [30] (Abb. 1). Neben dem systemischen RAS gibt es auch lokale RAS, die im Gehirn, im Herzen, in Blutgefäßen und in der Niere vorhanden sind. Voraussetzung hierfür ist, dass alle Komponenten des RAS in diesen Geweben exprimiert werden [28]. Zirkulierendes AngII hält den systemischen Blutdruck und den Elektrolythaushalt aufrecht und wird demzufolge als Haupteffektor des RAS bezeichnet [27]. Die Mehrzahl an Effekten, die durch AngII vermittelt wird, werden über den AT1R gesteuert, während der AT2R diese Effekte antagonisiert [31].

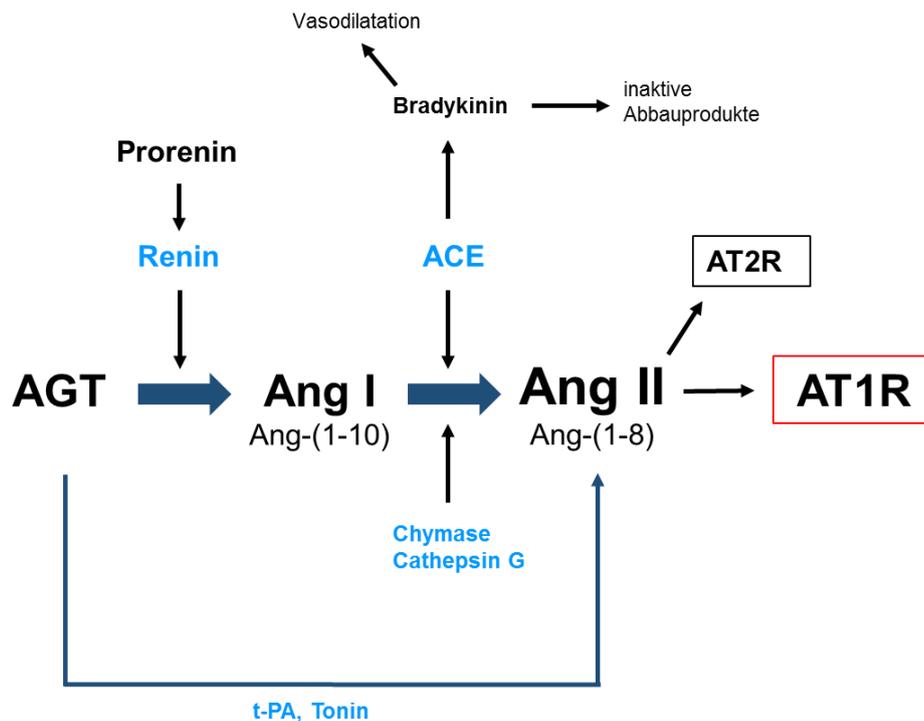


Abb. 1: Übersicht über das klassische Renin-Angiotensin-System.

Enzyme sind in blau dargestellt. Renin spaltet AGT (Angiotensinogen) zu Ang I (Angiotensin I). Ang I wird dann von ACE (Angiotensin-Konversions-Enzym) in Ang II (Angiotensin II) umgewandelt. t-PA: (gewebespezifischer Plasminogenaktivator), AT1R: Angiotensin II Typ 1 Rezeptor, AT2R: Angiotensin II Typ 2 Rezeptor. Modifiziert nach Carey [256]

1.2.1 Angiotensin II-Rezeptoren

Bisher wurden viele AngII-Rezeptor-Subtypen identifiziert. Physiologisch bedeutsam sind wahrscheinlich nur der Angiotensin II Typ 1 (AT1)- und AngII Typ 2 (AT2)-Rezeptor. Beide Rezeptorsubtypen gehören der Superfamilie G-Proteingekoppelter Rezeptoren an, teilen jedoch nur 34 % Sequenzhomologie. Die Rezeptoren unterscheiden sich in anatomischer Verteilung und Expression, sowie in Signalweg und Funktion. Für die wesentlichen Effekte des AngII ist der AT1R verantwortlich [32]. Der AT1R wird nicht nur in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen von Niere und Nebenniere exprimiert, sondern auch in solchen von Gehirn Herz, Leber, Lunge, Ovarien und Hoden. Die Expression des AT2R ist sehr stark in fetalem Gewebe, während seine Ausbildung nach der Geburt stark zurückgeht, so dass er in geringem Ausmaß nur noch in einigen Organen wie Gehirn, Herz, Niere, Nebenniere und Ovarien zu finden ist. [32]. In der Niere wird der AT1R in Glomeruli (Podocyten und Zellen der Macula densa), in Epithelzellen des aufsteigenden Astes der Henle-Schleife, im Bürstensaum proximaler Tubuli, in proximalen Tubuluszellen, im Sammelrohr, in Zellen der

Einleitung

glatten Gefäßmuskulatur [33] und in juxtaglomerulären Zellen [34] exprimiert. Der AT2R ist in der Niere in Tubuli des Kortex, interstitiellen Zellen und in glomerulären Epithelzellen zu finden [35].

Während es beim Menschen nur ein Gen für den AT1R gibt [36], besitzen Mäuse und andere Nagetiere zwei Kopien des Gens [37]. Die Gene für den AT1aR und den AT1bR sind zu 90-95 % sequenzhomolog [38], [39]. AT1aR werden sowohl in glatter Gefäßmuskulatur, in endothelialen Zellen, in der Leber, dem Ovar, Gehirn und Hoden sowie in Lunge und Herz exprimiert. Außerdem sind sie in Nebenniere und Niere vorhanden [32]. In Nieren von Nagetieren ist der AT1aR der vorherrschende Subtyp, jedoch ist die mRNA für den AT1aR und AT1bR im Glomerulum und in sämtlichen Segmenten des Nephrons, zu denen die proximalen und distalen Tubuli gehören sowie das Sammelrohr und der aufsteigender Ast der Henle Schleife, vorhanden [40]–[42]. Der einzige Ort an dem die Expression des AT1bR dem des AT1aR überwiegt ist das Glomerulum [40]. Vorwiegend über den AT1R kann AngII, der Haupteffektor des RAS, physiologische aber auch pathophysiologische Vorgänge vermitteln. Dazu gehören zum einen Vasokonstriktion, Hypertrophie von Gefäß,- und Herzmuskelzellen und die Erhöhung des Blutdruckes. Auch die Freisetzung von Noradrenalin aus der sympathischen Nervenendigung kann eine mögliche Konsequenz darstellen. Dies verstärkt die Vasokonstriktion und erhöht die Geschwindigkeit und Kraft der Kontraktion des Herzens. Zuzüglich dessen kommt es zur Stimulation der Reabsorption von Na⁺-Ionen aus dem proximalen Tubulus, sowie zur Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und zu vermehrtem Zellwachstum im linken Ventrikel und der arteriellen Gefäßwand [27]. Aldosteron fördert ebenfalls die Na⁺-Ionen Reabsorption und führt außerdem zur Sekretion von K⁺-Ionen [34].

1.2.2 Signalwege des AT1-Rezeptors

Wie schon erwähnt, gehören AT1-Rezeptoren zur Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Sobald AngII an den AT1R gebunden hat wird eine Reihe von Signalkaskaden aktiviert, welche die verschiedenen physiologischen Effekte von AngII regulieren [43]. Zunächst kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die innerhalb von Sekunden zur Synthese von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG)

Einleitung

führt. IP₃ bindet einen Rezeptor am sarkoplasmatischen Retikulum und ruft so einen Anstieg an intrazellulärem Ca²⁺ hervor. Dies resultiert in einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur [44]. DAG ist in der Lage Phosphokinase C (PKC) zu aktivieren, was zu einer Phosphorylierung von Proteinen, die eine wichtige Rolle bei Vasokonstriktion und Zellwachstum spielen, führt [43]. Durch Bindung an den AT1R kann AngII über die MAP Kinasen p38MAPK und ERK1/2 sowie über den JAK/STAT-Signalweg zu vermehrtem Zellwachstum und Hypertrophie führen. Dies geschieht beim JAK/STAT-Weg über eine Aktivierung von STAT, das dann in den Zellkern wandert und für die Transkription von *early growth response genes*, wie *c-fos* und *c-myc* sorgt [45]. Außerdem ist die Transkription dieser Gene mit einer erhöhten Genexpression verschiedener Wachstumsfaktoren, wie PDGF, EGF und TGF-β, Adhäsionsmolekülen, Integrinen und dem Tumornekrosefaktor α (TNFα) verbunden. Über diese Wege kontrolliert AngII u.a. Zellwachstum, Adhäsion, Migration, Remodelling und Reparatur [32]. Des Weiteren kann AngII über den AT1R auch die NADPH Oxidase (Nox) aktivieren, die hauptsächlich für die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich ist [46] (Abb. 2).

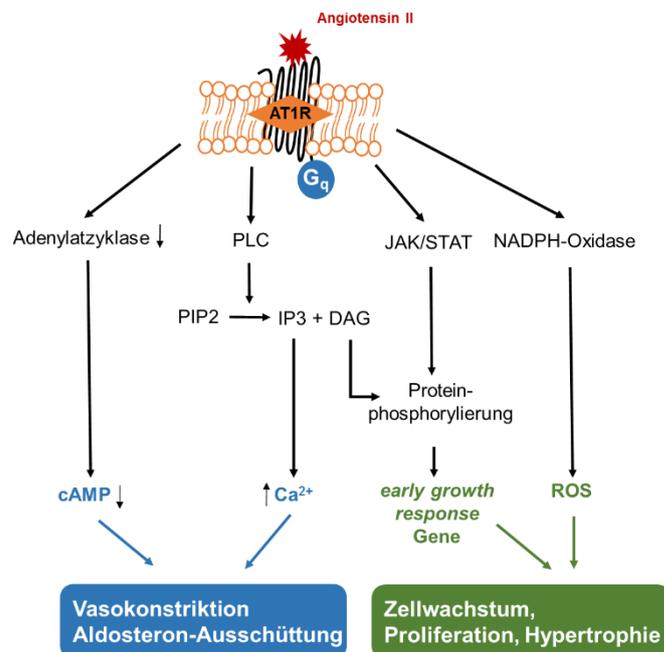


Abb. 2: Übersicht über den AT1-Rezeptor-Signalweg.

Angiotensin II hat G-Protein-gekoppelt (Gq) (blau) Einfluss auf die Enzyme Adenylylcyklase und Phospholipase C (PLC). Über den AT1-Rezeptor kann zusätzlich G-Protein-abhängig (grün) der JAK/STAT Signalweg und die NADPH-Oxidase aktiviert werden. cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), PIP (Phosphatidylinositolbisphosphat), IP3 (Inositoltriphosphat), DAG (Diacylglycerol), PKC (Proteinkinase C), Ca²⁺ (Calcium), ROS (reaktive Sauerstoffspezies). Modifiziert nach Kaschina & Unger [32].

1.3 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

Oxidativer Stress wird als Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und deren Elimination durch protektive Mechanismen oder Antioxidantien definiert [47]. Auch wenn ROS eine wichtige Rolle bei physiologischen und zellulären Prozessen spielen und unter anderem Einfluss auf Signalwege der angeborenen Immunität, des Zell- und Gewebewachstums, der Angiogenese, der Salz- und Flüssigkeitshomöostase, biochemischer Reaktionen und der Apoptose besitzen [48], so kann eine Störung des Redox-Gleichgewichts zu Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA führen, die auch den ganzen Organismus betreffen und das Risiko einer Mutagenese erhöhen können [47]. Diese ROS-vermittelten Effekte haben ebenso Einfluss auf den Alterungsprozess [49] und können auch eine Rolle bei der Krebsentstehung spielen [50]. In vielen Krankheiten, wie Arteriosklerose, Diabetes, Adipositas, Lungenerkrankungen und Hypertonie ist eine erhöhte ROS-Produktion vorzufinden [51]. ROS entstehen als Nebenprodukte des Sauerstoffmetabolismus und werden ständig im menschlichen Körper produziert [52]. Eine Gemeinsamkeit aller ROS besteht im Vorhandensein ungepaarter Valenzelektronen oder instabiler Bindungen [53], sie sind chemisch gesehen also sehr reaktiv [52]. ROS werden in zwei Gruppen eingeteilt: Freie Radikale, zu denen das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), Peroxynitrit ($ONOO^-$) und das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) gehören, und Nicht-Radikale, wie Ozon (O_3), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorsäure ($HClO$) [54]. $O_2^{\cdot-}$ kann nicht ohne weiteres Membranen überqueren, ist ein sehr kurzlebiges Molekül und besitzt nur lokale Effekte. Es wird daher entweder spontan oder über die Superoxiddismutase (SOD) zum stabileren und membrandurchlässigen H_2O_2 umgewandelt [55]. Das hoch reaktive Peroxynitrit entsteht durch Reaktion von $O_2^{\cdot-}$ mit Stickstoffmonoxid (NO). Des Weiteren können $HClO$ und Singulett-Sauerstoff (1O_2) aus Wasserstoffperoxid entstehen. Wenn Wasserstoffperoxid mit $O_2^{\cdot-}$ reagiert kann das zur Generierung von $\cdot OH$ führen [53]. $\cdot OH$ ist das ROS mit dem stärksten Effekt und reagiert daher sehr stark mit DNA, Lipiden und Proteinen. Bislang ist auch noch kein Entgiftungssystem für $\cdot OH$ bekannt, daher ist das Abfangen von $\cdot OH$ ein kritischer antioxidativer Prozess [48].

1.3.1 Oxidativer Stress im Zusammenhang mit Hypertonie

Eine Aktivierung des Nervensystems, Hochregulierung des RAAS, veränderte G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Signalwege und Entzündungen sind alles Faktoren, die an der Pathophysiologie der Hypertonie beteiligt sind [56]. All diesen Gegebenheiten ist oxidativer Stress, aufgrund erhöhter ROS-Produktion und geringerer NO-Spiegel sowie reduzierter antioxidativer Kapazität im reno- und kardiovaskulären System, gemeinsam [57]. Humane Studien, die den Zusammenhang zwischen ROS und Hypertonie untersuchen sind teilweise gegensätzlich, daher gibt es noch keinen endgültigen Beweis, ob oxidativer Stress Ursache einer Hypertonie beim Menschen ist [58]. Allerdings konnten in einigen Patienten-Studien erhöhte Marker oxidativen Stresses in Urin und Plasma [Isoprostane und Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS)] [59] gefunden werden, die zumindest eine Assoziation zwischen ROS und Hypertonie reflektieren [60]. Jedoch konnte im Rahmen einer experimentellen Hypertonie in vielen Tiermodellen, wie genetisch-veränderte Ratten (Spontan hypertensive Ratten), chirurgisch-induzierte Hypertonie, Hormon-induzierte Hypertonie (AngII, Aldosteron) oder Ernährungs-induzierte Hypertonie (Salz, Fett) ein erhöhter Spiegel an oxidativem Stress gezeigt werden [60]. Zudem konnte in Ratten eine Beteiligung der NADPH-Oxidase bei der ROS-Produktion durch eine AngII-Behandlung nachgewiesen werden [61]. Auf diesem Weg wurde die NADPH-Oxidase als das Enzym, welches für AngII-induzierten oxidativen Stress verantwortlich ist, identifiziert.

1.3.1.1 NADPH-Oxidase

NADPH-Oxidasen sind Multi-Enzym-Komplexe, welche die Produktion von O_2^- katalysieren, in dem mit Hilfe von NADPH/NADH Sauerstoff reduziert wird [62]. Das zuerst entdeckte Mitglied der NADPH-Oxidase-Familie gp91^{phox}, welches auch unter Namen Nox2 bekannt ist, ist eine katalytische Untereinheit [63]. Ursprünglich wurde Nox2 in Phagosomen gefunden und ist dort für die Immunabwehr verantwortlich, jedoch wird sie auch in anderen Zelltypen exprimiert [53]. Das Enzym besteht aus membranständigen und zytosolischen Komponenten. Die membranständigen Komponenten p22^{phox} und Nox2 bilden ein heterodimeres Flavoprotein, welches auch als Cytochrom b558 bezeichnet wird [60]. Die anderen Komponenten, p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} befinden sich

Einleitung

im unstimulierten Zustand im Zytoplasma. Sobald die Aktivatoruntereinheit p47^{phox} phosphoryliert wird findet eine Konformationsänderung statt und p47^{phox} bindet daraufhin an p22^{phox}. Der Zusammenbau von p47^{phox} mit Cytochrom b558 führt dann zur Rekrutierung weiterer zytosolischer Aktivatoren, wie p67^{phox} und p40^{phox}, zum Nox2-Komplex [64]. Die kleine GTPase Rac bindet an p67^{phox} und ist ebenfalls ein wichtiger Faktor der zur Aktivierung der Nox beiträgt [65]. Die Familie der NADPH-Oxidasen besteht insgesamt aus den 7 Mitgliedern, Nox1, Nox2, Nox 3, Nox4, Nox 5, Duox 1 und Duox 2 [66]. Sie sind alle transmembrane Proteine und bestehen meistens aus einer katalytischen (Nox) und vielen regulatorischen Untereinheiten.

Nox1, Nox2, Nox4 und Nox 5 wurden bereits in renalem und kardiovaskulärem Gewebe gefunden [60], wobei Nox 5 nicht in Nagetieren vorhanden ist [67]. Nox 5 sowie Duox1 und Duox2 unterscheiden sich von den anderen Noxs, da sie nicht über regulatorische Untereinheiten aktiviert werden, sondern über Ca²⁺ [53]. Für Nox3 wurden bislang nur Funktionen im Innenohr gefunden [68]. Nox1 ist am höchsten in Epithelzellen des Colons exprimiert und bildet, wie Nox2, mit p22^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} einen Komplex. Unter pathophysiologischen Bedingungen führt eine Hochregulierung von Nox1 zu oxidativem Stress, vor allem im kardiovaskulären Bereich [63]. Als einzige der Isoformen ist Nox4 konstitutiv aktiv, produziert also immer basale Mengen an ROS, und ist vor allem in proximalen Tubuluszellen der Niere vorzufinden [64]. Eine weitere Besonderheit der Nox4 ist, dass sie, nicht wie die anderen Isoformen, O₂⁻ bildet, sondern H₂O₂. Möglich ist jedoch auch, dass ihr primäres Produkt O₂⁻ ist, es jedoch sehr schnell in H₂O₂ umgewandelt wird [53]. Zudem benötigt Nox4, bis auf p22^{phox}, auch keine anderen regulatorischen Untereinheiten um aktiviert zu werden. Ferner kann eine Nox4-abhängige ROS Produktion durch Bindung von poldip2 (polymerase delta-interacting protein 2) an das Enzym verstärkt werden, für die basale Aktivität wird es jedoch nicht benötigt [64] (Abb. 3).

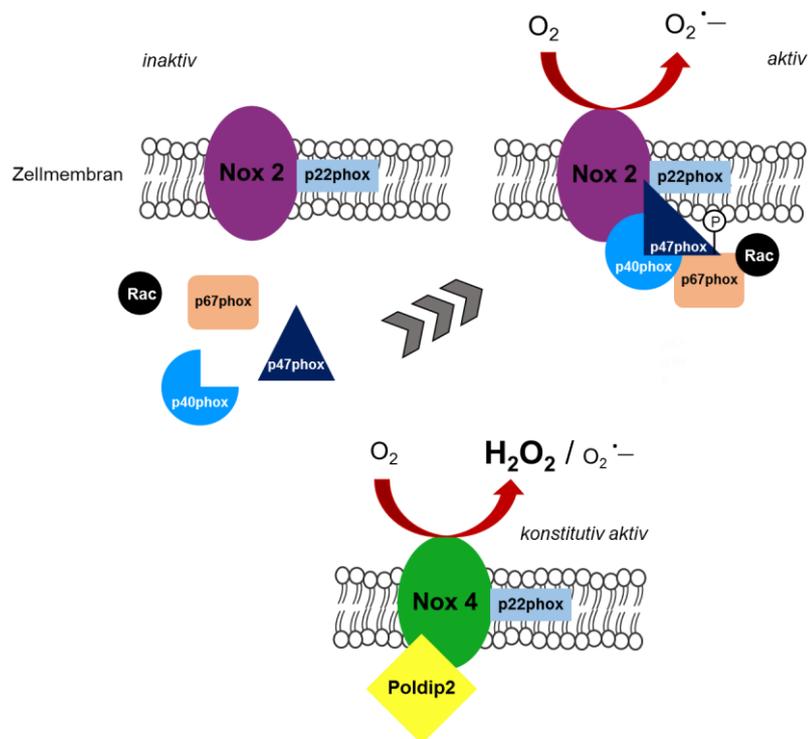


Abb. 3: Schematische Übersicht über die NADPH-Oxidasen 2 und 4

Im Ruhezustand befinden sich Nox2 und p22^{phox} (Cytochrom b558) in der Zellmembran. Nach Phosphorylierung von p47^{phox}, bindet dieses nach Konformationsänderung an p40^{phox} und führt zur Rekrutierung von p67^{phox} zum Cytochrom b588-Komplex, der dann O₂^{•-} produziert. Nox4 ist konstitutiv aktiv und braucht nur p22^{phox} zur Stabilisierung. Poldip2 kann die ROS-Produktion verstärken. Modifiziert nach Holtermann [64].

1.3.2 Oxidativer Stress und DNA-Schäden

Eine Hyperaktivierung von NADPH-Oxidasen, z. B. durch AngII [69], führt zu übermäßiger ROS-Produktion, was in oxidativem Stress resultiert und Schäden in renalem und kardiovaskulärem Gewebe erzeugen kann [60]. Zu diesen Schäden gehören Schäden an Lipiden, Membranen, Proteinen und der DNA [68]. Auf DNA-Basis treten vor allem abasische DNA-Stellen, Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie oxidierte Purine und Pyrimidine auf [70]. Schätzungen zu Folge entstehen am Tag in jeder menschlichen Zelle ca. 10⁴–10⁵ oxidative DNA-Läsionen [71]. Das geringe Redoxpotential von Guanin macht diese Base besonders anfällig und führt zu einer Fülle von oxidierten Guanin-Produkten [72]. Die bekannteste DNA-Modifikation 7,8-Dihydro-8-oxodeoxyguanosin (8-oxodG) wird durch Oxidation des Guanins am Kohlenstoffatom 8 gebildet. Diese Art der Basenmodifikation ist hoch mutagen, da sie zu G:C -> T:A Transversionen führen kann. Diese Transversionen sind in mutierten Onkogenen oder

Tumorsuppressorgenen weit verbreitet [73]. In vielen Studien wurden sogar erhöhte 8-oxodG-Spiegel in verschiedenen Krebsarten gefunden [74], [75].

1.4 Antioxidative Abwehrmechanismen

In vivo sind Zellen ständig reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt [76]. Um sich gegen die schädlichen Auswirkungen von ROS zu verteidigen haben Zellen ein antioxidatives Abwehrsystem entwickelt, um die zelluläre Redox-Homöostase aufrecht zu erhalten und die Zellen vor Schäden zu schützen [77]. Die antioxidative Abwehr kann in ein primäres und in ein sekundäres Abwehrsystem kategorisiert werden. Zum primären Abwehrsystem gehören antioxidative Moleküle und Enzyme, zum sekundären gehören unter anderem DNA-Reparatursysteme [78], auf die in 1.6 näher eingegangen wird. Antioxidative Abwehrsysteme können in zwei Kategorien eingeteilt werden: 1.) Nicht-enzymatische Antioxidantien, wie Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), Karotinoide, Flavonoide, Glutathion (GSH), [79] oder Thioredoxin (Txr) [77], und 2.) Enzymatische Abwehrsysteme, zu denen die Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (Gpx1), Katalase (CAT), Glutathionreduktase (GR), Glutamatcysteinligase (GCL), NAD(P)H:chinon-Oxidoreduktase-1 (NQO1), Hämoxygenase (HO-1), Thioredoxin-Reduktase (Txnrd) und andere Phase II-Enzyme wie Glutathion-S-Transferase (GST), UDP-Glucuronyltransferase (UGT), und Sulfotransferase (SULT) gehören [76]. Die Regulation der Genexpression dieser Enzyme findet über den Transkriptionsfaktor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) statt, der somit als „Masterregulator“ der antioxidativen Abwehr bezeichnet wird [80].

1.4.1 Der Transkriptionsfaktor Nrf2

Nrf2 wird ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen exprimiert [81] und gehört zu einer Untergruppe der „basic leucin zipper Genen (bZIP)“, die eine konservierte, strukturelle Domäne („Cap ‘n` Collar“) gemeinsam haben [82]. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird Nrf2 über einen Inhibitor INrf2, der auch als Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) bezeichnet wird, im Zytoplasma zurückgehalten. Dies geschieht über folgenden Mechanismus:

Einleitung

Keap1 besitzt zum einen eine Domäne die an Nrf2 bindet, zum anderen eine weitere Domäne die an einen Ubiquitin-Ligase-Komplex (Cul3/Rbx1) bindet, der dann wiederum für die Degradierung von Nrf2 zuständig ist. Des Weiteren bindet Keap1 über eine weitere Domäne an das Aktin-Zytoskelett, was ebenfalls eine wichtige Rolle für die Nrf2-Retention im Zytoplasma spielt [82]. Sobald die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt wird, werden Sulfhydrylgruppen des Nrf2-Inhibitors Keap1 modifiziert, sodass er seine Konformation ändert und seine Bindung zu Nrf2 aufhebt. Nrf2 kann somit nicht mehr degradiert werden und transloziert in den Zellkern, wo es dann eine ARE (*antioxidant response element*)-abhängige Genexpression induziert. ARE ist eine spezielle Gensequenz, die in der regulatorischen Region vieler Gene, die vor allem für antioxidative und detoxifizierende Enzyme kodieren, vorhanden ist. [83]. Eine ARE-vermittelte Transkriptionsaktivierung erfordert auch eine Heterodimerisierung mit anderen bZIP-Proteinen, zu denen c-Jun, Jun-D und Jun-B sowie kleine Maf-Proteine (MafG, MafK, MafF) gehören [82]. Zwei voneinander unabhängige Studien konnten eine Beteiligung der PKC an der Dissoziation von Nrf2 von Keap1 verdeutlichen. So kann eine Phosphorylierung von Nrf2 auch zu einer Loslösung von Keap1 führen [84], [85]. Somit induziert oxidativer Stress also eine Nrf2-abhängige zytoprotektive Antwort, die eine erhöhte Produktion antioxidativer Enzyme nach sich zieht. [82]. Die Bedeutsamkeit dieses Transkriptionsfaktors wurde auch schon *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Eine Studie mit Nrf2 knockout Mäusen ergab zwar, dass diese lebensfähig sind, jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress besitzen [86].

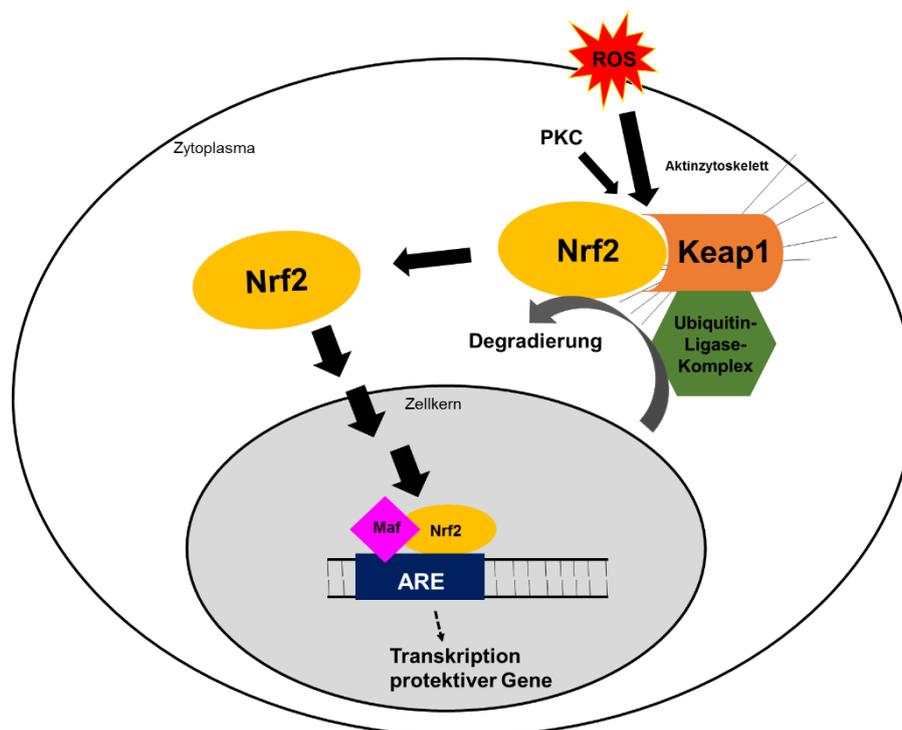


Abb. 4: Übersicht über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2

Im Zytosol wird Nrf2 durch Keap1 zurückgehalten und durch den Ubiquitin-Ligase-Komplex, der u.a. aus Cul3 und Rbx1 besteht, degradiert. ROS oder PKC führen dazu, dass Keap1 seine Konformation ändert und Nrf2 freisetzt. Infolge dessen kann Nrf2 in den Zellkern translozieren, mit Maf-Proteinen heterodimerisieren, an die ARE (Antioxidative Response Element)-Sequenz binden und somit zur Transkription protektiver Gene führen. Modifiziert nach Motohashi & Yamamoto [257] und Hybertsen [83].

1.4.2 Nrf2-abhängige Transkription von antioxidativen Enzymen

Antioxidative Enzyme, die durch Bindung von Nrf2 an ARE exprimiert werden, unterscheiden sich in ihrem Mechanismus der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies. In Säugetierzellen existieren zwei Haupt-Thiol-abhängige antioxidative Systeme, das Thioredoxin (Trx)- und das Glutathionsystem [87]. Thioredoxin-Reduktase (Txnrd) ist ein Flavoprotein, das seine Funktion als Homodimer ausübt. Zusammen mit Trx und NADPH bildet es ein System, das als Hauptfunktion Elektronen auf eine Reihe von Enzymen überträgt, um Proteindisulfide oxidierter Proteine zu reduzieren [88]. Gpx1 verwendet GSH als Cosubstrat, um H_2O_2 zu H_2O zu reduzieren [89]. Außerdem reduziert es Lipidhydroperoxide zu Alkohol [53]. Gleichzeitig wird GSH zu GSSG (Glutathiondisulfid) oxidiert [89]. Schlüsselfaktor für die GSH-Biosynthese ist zudem die Verfügbarkeit von GCL, was gleichzeitig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der GSH-Synthese darstellt [90]. Ein weiteres antioxidatives Enzym, SOD, konvertiert O_2^- in H_2O_2 , welches wiederum entweder durch Gpx oder Katalase in H_2O umgewandelt werden kann [48].

Einleitung

HO1 gehört ebenfalls zur Gruppe antioxidativer Enzyme, dessen Expression durch oxidativen Stress induziert wird. Das Enzym ist für den Abbau von Häm zuständig, was letztendlich zu einer Produktion von Biliverdin führt. Biliverdin kann im weiteren Verlauf durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin umgewandelt werden. Diese beiden Endprodukte wirken dann wiederum zytoprotektiv und antioxidativ [91].

1.5 DNA-Reparatur-Mechanismen

Das Genom eukaryotischer Zellen ist unter ständigem Angriff einer Vielfalt von DNA-schädigender Agenzien (endogene wie z. B. ROS und exogene, wie z. B. UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung), die zu vielen Typen von DNA-Läsionen führen können. Die Hauptreparaturwege in Säugetieren sind NER (Nukleotidexzisionsreparatur), BER (Basenexzisionsreparatur), Mismatch-Reparatur und die DSBR (Doppelstrangbruch-Reparatur) [92].

1.5.1 Basenexzisionsreparatur

Die BER erkennt DNA-Einzelstrangbrüche, abasische Stellen und Basenmodifikationen [93]. Viele dieser Basenmodifikationen entstehen durch ROS, die beispielsweise auch durch AngII hervorgerufen werden können und dann zur oxidativen Basenmodifikation 8-oxodG führen können. In einer normalen menschlichen Zelle entstehen geschätzte 100-500 8-oxodG-Schäden pro Tag [94]. Die Reparatur dieser Läsionen wird durch DNA-Glykosylasen initiiert, welche die N-Glykosidische Bindung zwischen dem Zuckerrest und der Base zerschneiden und eine abasische Stelle hinterlassen. Es existieren zwei Arten von Glykosylasen, die entweder mono- oder bifunktionell sind [92]. Monofunktionelle Glykosylasen, wie z.B. N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) [95], besitzen ausschließlich Glykosylaseaktivität und benötigen für die Lyase-Reaktion ein weiteres Enzym, die AP-Endonuklease (APE1) [92]. MPG, auch bekannt als Alkyladenin-DNA-Glykosylase (AAG), initiiert überwiegend die Reparatur alkylierter Basen [96]. Im Gegensatz zu monofunktionellen Glykosylasen, besitzen bifunktionelle Glykosylasen wie z. B. OGG1 und NEIL1 sowohl Glykosylase,- als auch AP-Lyase-Aktivität [92]. Danach kann die Reparatur entweder über den Short-Patch-Weg (hauptsächlich bei

Einleitung

monofunktionellen Glykosylasen) oder über den Long-Patch-Weg weiter fortgeführt werden [97]. Im Short-Patch-Weg wird nur ein Nukleotid ersetzt. Hierfür werden DNA-Polymerase β , APE1, DNA-Ligase III sowie XRCC1 benötigt. Die Long-Patch-BER hingegen beinhaltet den Austausch von 2–10 Nukleotiden. Hierbei bedarf es der Enzyme APE1, DNA Polymerasen δ/ϵ , PCNA und FEN1, sowie der DNA-Ligase I. Eine Beteiligung der Polymerase β ist ebenfalls nicht ausgeschlossen [98].

1.5.2 Poly-(ADP)-Ribosylierung und ihre Rolle bei der BER

Die Poly(ADP)-Ribosylierung (PAR) ist eine posttranslationale Proteinmodifikation, welche durch die Familie der Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARP) katalysiert wird [99]. Der Mechanismus der Poly(ADP)-Ribosylierung ist wichtig für die Erfassung von DNA-Läsionen sowie für die Erleichterung der DNA-Reparatur und somit ein bedeutender Teil der DNA-Schadensantwort [100]. Zur Familie der PARPs gehören PARP-1, PARP-2, PARP-3 und Vault-PARP sowie die Tankyrasen 1-3 [101]. PARP-1, das bestcharakterisierte der PARP-Enzyme, ist ein hoch konserviertes Enzym, welches konstitutiv exprimiert wird [102] und den größten Beitrag zur Poly(ADP)-Ribosylierung während eines DNA-Schadens stellt [103]. Das Enzym besteht aus drei Domänen, der N-terminalen DNA-Bindedomäne [erkennt mit dem Zinkfinger-Motiv SSB (*single strand breaks*) oder DSB (*double strand breaks*) und bindet an diese], der Automodifikationsdomäne und der C-terminalen katalytischen Domäne [102]. In Anwesenheit von DNA-Strangbrüchen nutzt PARP-1 NAD^+ für das Anfügen von Riboseeinheiten an Proteine und an sich selbst [104]. Sobald ein DNA-Schaden auftritt, bindet PARP-1 an die DNA und es kommt zur Hydrolyse von NAD^+ , welches wiederum zur Produktion von Nicotinamid (Nam) und einem Proton (H^+) führt [105]. Zudem binden PAR-Ketten an Histone und können somit die Chromatin-Struktur beeinflussen. So führen die negativ geladenen Riboseuntereinheiten dazu, dass sich die Histone von der DNA ablösen, was zu einer Chromatinlockerung führt [106]. Die durch DNA-Schäden induzierte PAR-Synthese benötigt eine große Menge an NAD^+ , die jedoch auf Dauer für die Zelle nicht tragbar wäre. Um dem entgegen zu wirken kommt das Enzym Poly (ADP-Ribose)–Glykohydrolase (PARG) zum Tragen. Es besitzt endo- und exoglykosidische Aktivität und generiert dadurch wieder freie

Einleitung

ADP-Ribose-Moleküle. Die dabei entstandene Energie wird dann zur Aufrechterhaltung des NAD⁺-Spiegels benötigt [107]. PARP-1 spielt außerdem eine wesentliche Rolle bei der BER. Obwohl PARP-1-defiziente Mäuse einen normalen Phänotyp besitzen, sind sie dennoch sensitiv gegenüber DNA-schädigenden alkylierenden Agenzien und ionisierender Strahlung, die verschiedenste Läsionen verursachen können, welche auch durch die BER erkannt werden [108]. So wird z. B. das BER-Protein XRCC1 an die Stelle des DNA-Schadens rekrutiert und interagiert mit PARP-1 [106], wobei diese Rekrutierung abhängig von der PARP-1-Aktivität ist [109]. Auch Interaktionen von PARP-1 mit DNA-Ligase III, DNA-Polymerase β und FEN-1 konnten nachgewiesen werden [106].

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert den Blutdruck sowie den Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Das aktive Peptid, Angiotensin II (AngII), führt dabei zur Vasokonstriktion und in höheren Konzentrationen zu Bluthochdruck. In epidemiologischen Studien wurde Bluthochdruck mit einem erhöhten Nierenkrebsrisiko in Verbindung gebracht. Wir konnten bereits zeigen, dass AngII *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* zu DNA-Schäden über den AT1R führt und erste Indizien finden, die für einen vom Blutdruck unabhängigen oxidativen DNA-Schaden sprechen [110]–[112]. In Mäusen und Ratten ist der wahrscheinlichste Rezeptor für die Entstehung oxidativen Stresses und DNA-Schäden *in vivo* der AT1aR [113]. Hauptziel dieser Arbeit war es nun endgültig zu beweisen, dass AngII-vermittelte oxidative DNA-Schäden nicht mit einem erhöhten Blutdruck einhergehen. Dies wurde mit Hilfe von Mäusen, die für den AT1aR defizient sind untersucht. Hierzu wurden diese und wildtypische C57BL/6J-Mäuse mit osmotischen Minipumpen ausgestattet, die AngII über einen Zeitraum von 28 Tagen in einer Konzentration von 600ng/kg*min abgaben. Die Auswirkung des Fehlens von AT1aR wurde dann anhand folgender Parameter untersucht:

- Nierenfunktionsparameter (Albumin, Kreatinin)
- Histopathologische Veränderungen in der Niere
- Reaktive Sauerstoffspezies in der Niere und im Herzen
- Exkretion eines Markers für oxidativen Stress (15-Isoprostan F_{2t})
- DNA-Schäden (Einzel-und Doppelstrangbrüche) in der Niere und im Herzen
- Reparatur-Aktivität in der Niere
- Antioxidatives Abwehrsystem und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 in der Niere
- Expression der Komponenten des RAAS in der Niere

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde untersucht welchen Einfluss NADPH-Oxidasen bei dem durch das stimulierte RAAS ausgelösten oxidativen Stresses in der Niere haben. NADPH-Oxidasen sind Membran-gebundene Enzyme, die höchstwahrscheinlich für AngII-vermittelte oxidative DNA-Schäden

Zielsetzung der Arbeit

verantwortlich sind [114]–[116]. *In vitro*-Studien konnten eine Beteiligung der Nox4 bei AngII-vermittelten DNA-Schäden zeigen [117], daher sollte in diesem Teil der Arbeit geklärt werden, ob auch *in vivo* die Nox4 oder eine andere Untereinheit für die Auslösung der Schäden verantwortlich ist. Es wurde deshalb mit Tieren gearbeitet, die entweder Nox4- oder Nox2-defizient waren. Diese und wildtypische Kontrollmäuse wurden ebenfalls für 28 Tage mit osmotischen Minipumpen, die AngII in einer Konzentration von 600ng/kg*min abgaben, ausgestattet. Wichtige Endpunkte, die bei diesen Experimenten untersucht wurden, waren folgende:

- Nierenfunktionsparameter (Albumin, Kreatinin)
- Reaktive Sauerstoffspezies in der Niere und im Herzen
- Exkretion eines Markers für oxidativen Stress (15-Isoprostan F_{2t})
- DNA-Schäden (Einzel-und Doppelstrangbrüche) in der Niere
- Expression von NADPH-Oxidase-Untereinheiten in der Niere
- Antioxidatives Abwehrsystem

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere

Für die folgenden Versuche wurde mit männlichen wildtypischen C57BL/6J Mäusen von Janvier (Le Genest Sain Isle, France), sowie mit männlichen gentypisch veränderten B6.129P2-Agtr1a^{tm1Unc}/J (AT1a-KO) und B6.129S6-Cybb^{tm1Din}/J (Nox2-Knockout (KO)) von The Jackson Laboratory, (Bar Harbor, Maine, USA), vertrieben durch Charles River (Sulzfeld, Deutschland), gearbeitet. Männliche Nox4^{-/-} (Nox4-KO) Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ralf Brandes und von Frau PD Dr. Katrin Schröder (Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Nox4-KO-Mäuse wurden mittels gezielter Deletion der Translations-Initiationsstelle sowie des ersten und zweiten Exons des Nox4-Gens mit anschließender Rückkreuzung mit C57BL/6J-Tieren für fünf Generationen hergestellt [118].

3.1.2 Zelllinie und Zellkulturmedien

Für den Reparatur-Comet-Assay wurde die humane Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa verwendet, die von American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) erworben wurde.

Zellkulturmedien und Reagenzien wurden von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) und Invitrogen Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland oder St. Louis, USA), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Substanzen für die Tierversuche wurden von folgenden Firmen bezogen: Candesartanxilexetil (Atacand protect) von Astra Zeneca (Wedel, Deutschland); Angiotensin II von Calbiochem/Merck KGaA; osmotische Minipumpen wurden von Alzet, Model 1004 (Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) bezogen. Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%) wurde von Bayer Vital (Leverkusen,

Deutschland) bezogen, Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) von Pfizer (Berlin, Deutschland) und Metamizol-Natrium (Vetalgin®) von MSD Intervet (Köln, Deutschland).

3.1.4 Blutdruckmessgerät

Die Blutdruckmessung fand mit dem Gerät BP-2000 Series II, Blood Pressure Analysis System (Visitech Systems, Apex, USA) statt.

3.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) für CR-Reaktionen wurden mit dem Programm Primer 3 entworfen und von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Oligonukleotide wurden jeweils gegen das Organismusgenom gelastet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und auf die Amplifikation von unspezifischen Fragmenten hin überprüft.

Tab. 1: Übersicht über die für die verschiedenen PCR-Reaktionen verwendeten Primersequenzen.
Gapdh: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; *Rplp0*: Großes Ribosomales Protein (Ribosomal protein, large); *AT1a*: Angiotensin II-Typ 1a-Rezeptor; *AT1b*: Angiotensin II-Typ 1b-Rezeptor; *Nox2*: NADPH-Oxidase 2; *Nox4*: NADPH-Oxidase 4; *Ren*: Renin; *AGT*: Angiotensinogen; *ACE*: Angiotensin-Konversions-Enzym.

Primer	3'-5'-Sequenz	5'-3'-Sequenz
<i>Rplp0</i>	GGGGCTGACTGCTTAACCAG	GAAACTGCTGCCTCACATCCG
<i>GAPDH</i>	TCTCTTGCTCAG GTCCT	TCTCCTGCGACTTCAACA
<i>β-Actin</i>	TACAGCTTCACCACCACAGC	GTGGACAGTGAGGCCAAGAT
<i>AT1a</i>	GCGGTCTCCTTTTGATTTC	CAAAGGGCTCCTGAAACTTG
<i>AT1b</i>	CCAAGAGGCGTGAAAGAAGCC	AAGGATCATGTCTCTTTGTTGGAGG
<i>Nox2</i>	GGTTCAGTGCGTGTGCT	GCGGTGTGCAGTGCTATCAT
<i>Nox4</i>	CCCAAGTTCCAAGCTCATTTC	TGGTGACAGGTTTGTGCTCCT
<i>Ren</i>	TTTGACGGGTTCTAGGCAT	CCTGGGAGAGAATGTGGTCA
<i>AGT</i>	CCACCCCTCCATCTCCTTT	ATTCACAGGGGAGGTCTTGG
<i>ACE</i>	TGAGAAAAGCACGGAGGTATCC	AGAGTTTTGAAAGTTGCTCACATCA
Primer	3'-5'-Sequenz	
<i>Nox2_Common</i>	AAGAGAAACTCCTCTGCTGTGAA	
<i>Nox2_Mutante</i>	CGCACTGGAACCCCTGAGAAAGG	
<i>Nox2_Wildtyp</i>	GTTCTAATTCATCAGAAGCTTATCG	

Tab. 2: Auflistung aller verwendeten Primer für die Endpunkt- und Real-time RT-PCR sowie den PCR-Array

Gen	Bezeichnung	3'-5'-Sequenz	5'-3'-Sequenz
<i>Actb</i>	b-Actin	GCATTGCTGACAGG ATGCAG	CCTGCTTGCTGATCC ACATC
<i>Akt1</i>	Actin, alpha 1, skeletal muscle	GCGCAAGTACTCAG TGTGGA	TCGTCCTGAGGAGA GAGAGC
<i>Apex1</i>	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	AGAAATTGACCTCCG TAACC	CGCCAACCAACATTC TTAGA
<i>Arhgdia</i>	Rho GDP Dissociation Inhibitor (GDI) Alpha	CCCTACCTACCCCAA ACC	TGGACAACCCTGACA GTG
<i>ATF2</i>	Activating transcription factor 2	TATCGTTGTCAGC ATCA	TACTTGAGGTTGGTG AAGGTA
<i>Atg3</i>	Autophagocytosis associated protein Atg3	ACCACCTCCTATGTG TTCA	TGTGTAGTCATATTC TATTGTTGGA
<i>Atg7</i>	Autophagocytosis associated protein Atg7	GCACAACACCAACA CACT	CGAAGGTCAGGAGC AGAA
<i>Atm</i>	Ataxia telangiectasia mutated	ACCAGAGGATGCTG TTCA	ATCATTAAGTCTATG TTGAGTCCAA
<i>Bcl2</i>	B-cell lymphoma 2	GTGTGGTTGCCTTAT GTAT	GTATATCCGCTACAA GTTACA
<i>Becn1</i>	Beclin-1	GATGGGAACTCTGG AGGT	GGCTGTGGTAAGTAA TGGA
<i>Bid</i>	BH3 Interacting Domain Death Agonist	CACCATGTACCTTTG TCCTATC	ACCTCTCCTAATGCT GTTCT
<i>Birc3 (c-IAP1)</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 3	GCTGACACCTTTGA GTTGA	GCAGAAGCACTTGA CCTT
<i>Brca1</i>	Breast cancer 1, early-onset	TTGTGAGCGTTTGAA TGA	ACCTGGCTTAGTTAC TGT
<i>Brca2</i>	Breast cancer 2, early-onset	TAACGCCTGCTGACT CTC	TGCCAGATGAATCTC CTAACA
<i>Casp2</i>	Caspase 2, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase	TACTGCTCACAACCC TCTC	GGACCATCACCATTA TCTAAGG
<i>Ccnb1</i>	Cyclin B1	GGTCACTAGGAACA CGAAA	TTTGGTAGGGCTTTA AACAGT
<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A	ACCTGAATAGCACTT TGGAAA	TCTGAGCAATGTCAA GAGTC
<i>Chek1</i>	Checkpoint Kinase 1	TGAACGCTTACTGAA CAAGAT	CCACAGGACCAAAC ATCAA
<i>Chek2</i>	Checkpoint Kinase 2	TGAGAAGGACGGAC AAGT	TCTACATAGTGAAAG TGCGATTT
<i>Cxcr4</i>	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	ATACCTGACTTCATC TTTGCC	TGGAGTGTGACAGC TTAGA
<i>Cyp1a1</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CCTCCGTTACCTGC CTAA	GTCCTGACAATGCTC AATGA
<i>Ddb2</i>	Damage specific DNA binding protein 2	AGGCAACATTCTCAG AGT	CATTCCGAGGTTCCA AAG
<i>Ddit3 (CHOP)</i>	DNA-Damage-Inducible Transcript 3	GTCAGTTATCTTGAG CCTAA	GTGTGGTGGTGTAT GAAG
<i>Erc1</i>	Excision Repair Cross-Complementation Group 1	AAACAGGAGCAAAG TCTAAT	GGATGTAGTCTGGAT GGA
<i>Fancc</i>	Fanconi Anemia, Complementation Group C	GCTTGTGGAAATCCT CTCAT	CCACGAGTTAAGTCC TGAC
<i>Fas</i>	TNF receptor superfamily, member 6	AGAACCTCCAGTCG TGAA	ATCTATCTTGCCCTC CTTGA
<i>FasL</i>	Fas Ligand	CTGGAATGGGAAGA CACATAT	TGGTCAGCACTGGTA AGA
<i>Fen1</i>	Flap Structure-Specific Endonuclease 1	GGAACGATACTGAA AGAACGG	CGGCGAAGAGGAAT GTTC
<i>Gadd45a</i>	Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible, Alpha	GTCGCTACATGGAT CAGTG	GTGACTGCTTGAGTA ACTACA
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	TCTCCTGCGACTTCA ACA	TCTCTTGCTCAGTGT CCTT
<i>Gpx1</i>	Glutathionperoxidase 1	TTGGTGATTACTGGC TGC	TGATATTCAGCACTT TATTCTTAGTAG

Materialien und Methoden

<i>Gstm1</i>	Glutathione S-Transferase Mu 1	ACACAGCCTTCATTC TCC	AATTCTAGGAAGCGT GAGTT
<i>Hus1</i>	HUS1 Checkpoint Homolog	TGGAAGGAGTCTCT GAAGAA	AGGGAAAGTGTGTTGT TAGTCA
<i>Icam1</i>	Intercellular Adhesion Molecule 1	TGCTCAGGTATCCAT CCAT	GGAAACGAATACAC GGTGAT
<i>Itgb1</i>	Integrin, Beta 1	GCCAGCCAAGTGAC ATAG	ACTTCTGTGGTTCTC CTGAT
<i>Jun</i>	Jun Proto-Oncogene	AACTTTCCTGACCCA GAG	GCGAACTGGTATGA GTATAG
<i>Lamp1</i>	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1	AAGTGGAGAACAAG AACAGAG	TCAGTGAATGGTTGG AGATG
<i>Lig1</i>	DNA-Ligase 1	ATTTTCGGTTTGCCT CTC	ACCACTTGATTCTC TCCTT
<i>Lig4</i>	DNA-Ligase 4	GTGTCCTGATGCTTA GTTGT	CTCCTTGAAGTGCCT GATT
<i>Mdm2</i>	MDM2 Proto-Oncogene, E3 Ubiquitin Protein Ligase	AAGGTGGGAGTGAT CTGAA	TCTGTGTTCTTCTTCT GTCTCA
<i>Mgmt</i>	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase	GCTGCTGAAGGTTG TGAA	TCTCATTGCTCCTCC TACTG
<i>Mmp13</i>	Matrix Metalloproteinase 13	GCCACCTTCTTCTTG TTGA	TAGTATGATTTCAAG TAGTGCTCTG
<i>Mmp3</i>	Matrix Metalloproteinase 3	GCTGTGGGAAAGTC AATGA	GCCATAGTAGTTTTTC TAGGTATT
<i>Mmp7</i>	Matrix Metalloproteinase 7	GAACAGGCTCAGAA TTATCTTAGA	CCACTACGATCCGA GGTAA
<i>Mpg</i>	N-Methylpurine-DNA Glycosylase	CTGTATGTGTACCTC ATCTATGG	CAGAGTTCACGGTC CTTG
<i>Mre11a</i>	MRE11 Meiotic Recombination 11 Homolog A	TACGGCTTAGGCTC CATT	ATGCTTACTCCTGTT CTGATG
<i>Ogg1</i>	8-Oxoguanine DNA Glycosylase	TGAGACTGCTGAGA CAAGA	GGAAGCCATGATAA GTGACA
<i>Pcna</i>	Proliferating Cell Nuclear Antigen	GACTTAGATGTGGA GCAACTT	GGCTAAGGTCTCGG CATA
<i>Pold1</i>	Polymerase (DNA Directed), Delta, Catalytic Subunit	CTCCATTTCTCCGCA TCAC	CAATGTCAGCATCCA CCAT
<i>Pten</i>	Phosphatase And Tensin Homolog	ATCAAGAGATCGTTA GCAGAAA	TTGGCGGTGTCATAA TGTC
<i>Rac1</i>	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1	ACAAAGCCTTCTTAA AGCCTTA	GCGGTCTTCTTAGCA ACA
<i>Rad51</i>	RAD51 Recombinase	CAGCGATGTCCTAG ATAATGTAG	TTACCACTGCGACAC CAA
<i>Rev1</i>	REV1, Polymerase (DNA Directed)	TCTGCGGAGGAATT GAGA	ACACAGGATTGAAGT TGAGAC
<i>Rhoa</i>	Ras Homolog Family Member A	AAGTCTGGGTGCCT CAT	AATAATCGTGGTTGG CTTCTAA
<i>Sele</i>	Selectin E	TGCGAGAAGAACGG ATAGA	CTGAATTGCCACCAG ATGT
<i>Sod1</i>	Superoxide Dismutase 1	ACCAGTTGTGTTGTC AGG	TTTCTTAGAGTGAGG ATAAAATGAG
<i>Timp2</i>	TIMP Metalloproteinase Inhibitor 2	CAAAGCAGTGAGCG AGAA	CATCTTGCCATCTCC TTCTG
<i>Top2a</i>	Topoisomerase (DNA) II Alpha 170kDa	CTTCAGGAGCCGTC ACCAT	GAGCAGTATATGTTT CAGTTGT
<i>Top2b</i>	Topoisomerase (DNA) II Beta 170kDa	TGGGTGAACAATGC TACAAA	TGTATGTATCAGGAC GAAGGA
<i>Trex1</i>	Three Prime Repair Exonuclease 1	GCTACCACTGGAAC AACC	TGCTATGGAAGTCTT TATTCATCA
<i>Trp53</i>	Tumor Protein P53	AAGTTCTGTAGCTTC AGTTCAT	GGCAGTCATCCAGT CTTC
<i>Trp63</i>	Tumor Protein P63	AGCATCAGAAAGCA GCAA	GATCTTCAGCAACAT CTCGTA
<i>Txnrd1</i>	Thioredoxin Reductase 1	CAGTTCGTCCAAC GAAAAT	GCACATTGGTCTGCT CTTCA
<i>Wrn</i>	Werner Syndrome, RecQ Helicase-Like	TGATTGCTCCTTCT GCTT	ACTGCGACTCTGCTT CTT
<i>Wrnip1</i>	Werner Helicase Interacting Protein 1	GCCAATGAGATCCC TTCCG	AACCTTATGCTGTGC TTCTT

Materialien und Methoden

<i>Xpc</i>	Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C	GCGAAAGAACGGGA AAGA	AAGCGAATTGGAATG ATGGA
<i>Xrcc1</i>	X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 1	CCAACCGTGTTCCGC ATTT	GCACTGTCATCCTCC TCTT
<i>Xrcc3</i>	X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 3	GGAGGAAGTCTGAG TTGGT	CTCTTAACCGCAGCA GTAAT
<i>Xrcc4</i>	X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 4	TGCCTGGACACCATT ACA	CTTCTCATTGAGCAC CAAGAT

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

HeLa-Zellen wurden bei 37°C und einem CO₂ (v/v)-Gehalt von 5 % in wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/l) mit Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin (100×), 1% L-Glutamin und 10 % Fötalem Kälberserum (FBS) kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig, zwei Mal pro Woche, passagiert, um ein exponentielles Wachstum zu gewährleisten. Für den Reparatur-Comet-Assay wurden mit Zellen der gleichen Passage benötigt.

3.2.2 Versuch zur Überprüfung der Abhängigkeit AngII-induzierter Schäden vom Blutdruck

Die in 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft zur Handhabung von Versuchstieren und dem deutschen Gesetz zum Schutz von Tieren durchgeführt.

In diesem Versuch wurde mit männlichen C57BL/6J-Mäusen und AT1a-KO-Mäusen gearbeitet. Die Tiere wurden in einer Tierversuchsanlage (22 ± 2°C) mit einem 12-Stunden Licht/Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Im Alter von 15 Wochen wurden 16 AT1a-KO- Tiere zufällig in zwei Gruppen und 24 WT-Tiere in drei Gruppen mit je 8 Tieren pro Gruppe eingeteilt. Jedes Tier wurde mit einer osmotischen Minipumpe ausgestattet. Dazu wurden die Tiere narkotisiert (6 mg/kg KG Xylazin und 90 mg/kg KG Ketamin i.m.) und eine subkutane Tasche am Nacken gebildet, in welche die Minipumpe eingesetzt wurde. Die Tasche wurde danach mit Michel-Klammern (7,5 × 1,75 mm, Gribi, Belp, Schweiz) verschlossen und die Tiere bis zum Aufwachen aus der Narkose überwacht. Ferner wurde jeder Maus 42 mg/kg KG Vetalgin s.c.

Materialien und Methoden

gegen postoperative Schmerzen einmalig verabreicht. Die osmotischen Minipumpen enthielten entweder AngII, das in einer Konzentration von 600 ng/kg × min über einen Zeitraum von 28 Tagen konstant abgegeben wurde, oder das Lösungsmittel PBS als Negativkontrolle. Einer Gruppe wurde zusätzlich zu AngII der Angiotensin II-Typ1-Rezeptor-Blocker Candesartan (Cand) in einer Konzentration von 8 mg/kg × d über das Trinkwasser verabreicht (s. Tab. 3).

Während des Versuchszeitraumes wurden regelmäßig, nicht-invasive Blutdruckmessungen durchgeführt. Die Prozedur wurde mit einem automatisierten System (BP-2000 Series II, Blood Pressure Analysis System) an der wachen Maus durchgeführt, bei dem eine Manschette um den Schwanz der Maus gelegt wurde. Eine Woche vor Implantation der Minipumpen wurden die Mäuse an die bevorstehenden Blutdruckmessungen gewöhnt, in dem diese drei Mal gemessen wurden. Nach der Implantation fanden vormittags, alle zwei bis vier Tage, Blutdruckmessungen statt. Die systolischen Blutdruckwerte ergaben sich jeweils aus fünf bis zehn Einzelmessungen pro Tier. Vor dem Einsetzen der Minipumpe und kurz vor Versuchsende wurden die Tiere für 20 Stunden in Stoffwechsellkäfige gesetzt, um Urinproben zu sammeln (Abb.5). Nach 4-wöchiger Behandlung wurden die Tiere in eine tiefe Narkose versetzt (8 mg/kg KG Xylazin und 120 mg/kg KG Ketamin), die Mäuse wurden in Rückenlage fixiert, der Bauchraum wurde geöffnet und die Aorta abdominalis freigelegt und zur Blutentnahme punktiert. Anschließend wurde auch der Brustraum geöffnet, um die Perfusionskanüle in den linken Herzventrikel zu schieben. Die Aorta abdominalis wurde mit Beginn der Perfusion durchtrennt. Diese erfolgte folgendermaßen: Um eine Weitstellung der Gefäße zu gewährleisten, wurden diese zunächst mit Deltadex 40 (10 % Dextran 40, 0,9 % NaCl +10 % Procainhydrochlorid (AlleMan Pharma Rimbach, Deutschland) für ca. 2 min perfundiert. Anschließend wurden die Gefäße und Organe mit eiskalter 0,9 %-iger Natriumchloridlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gespült. Nach erfolgreicher Perfusion wurden beide Nieren und das Herz entnommen und das jeweilige Gewicht bestimmt. Die Hälfte der rechten Niere und ein Teil des Herzens wurden für 24 Stunden in 4%-iger Formaldehydlösung (Roti-Histofix), fixiert, anschließend in PBS überführt und an das Institut für Nephropathologie, Universitätsklinikum Erlangen, Arbeitskreis von Frau Dr. Amann, geschickt. Dort wurden die Organe entwässert und in Paraffin eingebettet. Die andere Hälfte der

Materialien und Methoden

rechten Niere, wurde nochmals in zwei Teile unterteilt, ein Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, der andere Teil wurde sofort zur Zellextraktion für den Comet Assay (s. 3.2.5) weiterverarbeitet. Das andere Teil des Herzens, sowie die andere Niere, wurden ebenfalls schockgefroren und für weitere Untersuchungen bei -80 °C aufbewahrt. Während des Versuches sind zwei Mäuse aus der WT-AngII-Gruppe aus unersichtlichen Gründen gestorben, so dass diese Gruppe nur aus 6 Tieren bestand.

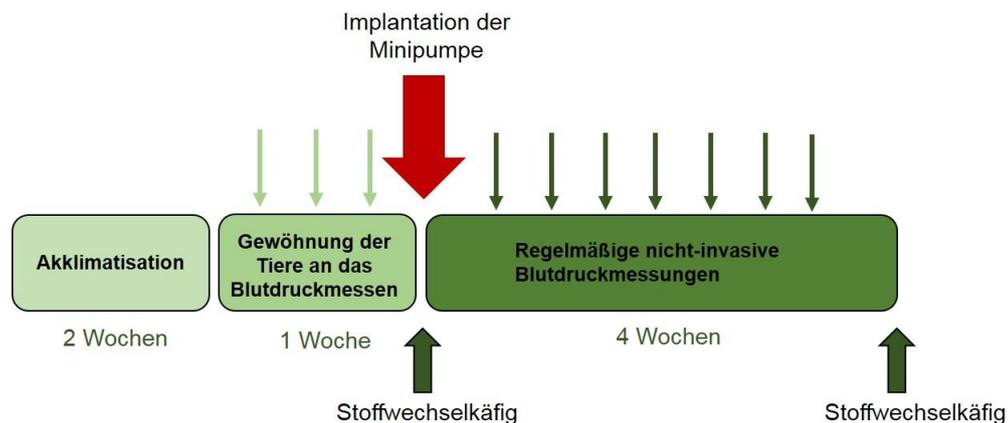


Abb. 5: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der unter 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Tierversuche

Tab. 3: Übersicht über den Blutdruckunabhängigkeitsversuch

Gruppe	Osmotische Pumpe	Intervention	Tierzahl
WT-K	PBS	-	8
WT-AngII	AngII (600ng/kg × min)	-	6
WT-AngII + Cand	AngII (600ng/kg × min)	Candesartan (8 mg/kg*d)	8
AT1a-KO-K	PBS	-	8
AT1a-KO-AngII	AngII (600ng/kg × min)	-	8

3.2.3 Versuche zur Identifikation der möglichen Beteiligung von NADPH-Oxidase-Untereinheiten an der Entstehung AngII-vermittelter DNA-Schäden

Die Versuche entsprachen in Bezug auf Haltung, Implantation der Pumpen, Blutdruckmessungen und Perfusion den Vorgaben des Blutdruckunabhängigkeitsversuches (s. 3.2.1).

3.2.3.1 Beteiligung der NADPH-Oxidase 4

Bei diesem Versuch wurde sowohl mit männlichen C57BL/6J-Mäusen als auch mit männlichen Nox4-KO-Mäusen gearbeitet. Da die Nox4-KO Tiere vom Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt wurden, konnte nicht mit einer entsprechenden Tierzahl gearbeitet werden. Außerdem sind bei der ersten Durchführung des Versuches aus unersichtlichen Gründen zwei Mäuse aus der WT-AngII-Gruppe und eine Maus aus der Nox4-KO-AngII-Gruppe verstorben. Deshalb wurde der Versuch zu einem späteren Zeitpunkt ein weiteres Mal durchgeführt und die Daten beider Tierversuche zusammengefasst.

In beiden Durchführungen wurden 11 Nox4-KO-Mäuse in einem Alter von 14-18 Wochen zufällig in zwei Gruppen mit fünf und sechs Tieren eingeteilt, wildtypische Tiere ebenfalls in zwei Gruppen mit je sechs bzw. vier Tieren pro Gruppe. Jedes Tier wurde mit einer osmotischen Minipumpe ausgestattet, die entweder AngII in einer Konzentration von 600 ng/kg × min, oder PBS als Negativkontrolle, über einen Zeitraum von 28 Tagen abgeben sollte (Tab. 4). Nach den 28 Tagen wurden die Tiere perfundiert, beide Nieren und das Herz wurden entnommen, entweder in 4 %-iger Formaldehydlösung fixiert und am Institut für Nephropathologie, Universitätsklinikum Erlangen, Arbeitskreis von Frau Dr. Amann, in Paraffin eingebettet, oder in unterschiedlich großen Teilen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für weitere Untersuchungen aufbewahrt. Ein Teil der Niere wurde für direkte Zellextraktion für den Comet Assay verwertet (s.3.2.5).

Tab. 4: Übersicht über den Versuch zur Beteiligung der NADPH-Oxidase 4

Gruppe	Osmotische Pumpe	Tierzahl (Tierzahl der ersten und zweiten Durchführung)
WT-K	PBS	10 (6;4)
WT-AngII	AngII (600ng/kg × min)	10 (4;6)
Nox4-KO-K	PBS	10 (5;5)
Nox4-KO-AngII	AngII (600ng/kg × min)	10 (5;5)

3.2.3.2 Beteiligung der NADPH-Oxidase 2

Bei diesem Versuch wurden 10 männliche C57BL/6J-Mäuse in einem Alter von 16 Wochen zufällig in zwei Gruppen mit je 5 Tieren pro Gruppe eingeteilt sowie 18 männliche 16 Wochen alte Nox2-KO-Mäuse in zwei Gruppen mit je 8 bzw. 10 Tieren pro Gruppe. Jedes Tier wurde mit einer osmotischen Minipumpe ausgestattet, die entweder AngII in einer Konzentration von 600 ng/kg × min, oder PBS als Negativkontrolle, über einen Zeitraum von 28 Tagen abgeben sollte (Tab.5). Nach den 28 Tagen wurden die Tiere ebenfalls perfundiert, beide Nieren und das Herz wurden entnommen, entweder in 4 %-iger Formaldehydlösung fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet, oder in unterschiedlich großen Teilen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für weitere Untersuchungen aufbewahrt. Während des Versuchs sind leider zwei Tiere der Nox2-KO-K und 3 Tiere der Nox2-KO-AngII-Gruppe aufgrund von Infektionen vorzeitig verstorben.

Tab. 5: Übersicht über den Versuch zur Beteiligung der NADPH-Oxidase 2

Gruppe	Osmotische Pumpe	Tierzahl
WT-K	PBS	5
WT-AngII	AngII (600ng/kg × min)	5
Nox2-KO-K	PBS	6
Nox2-KO-AngII	AngII (600ng/kg × min)	7

3.2.4 Nachweis des klinischen Parameters Kreatinin in Urin und Serum

Um eine Aussage über die Nierenfunktion zu erhalten, wurde der Marker Kreatinin in Urin und Serum in Anlehnung an die Jaffe-Reaktion [119] mit Hilfe des Creatinin urinary/serum Assay Kit (Item No. 500701/700460, Cayman Cehmical Company, Ann Arbor, MI, USA) gemessen. Die Jaffe-Reaktion basiert auf der Entstehung eines gelben Niederschlages, wenn Kreatinin mit alkalischer Pikrinsäure reagiert.

Zu Beginn des Assays wurden die alkalische Pikrinsäurelösung, sowie der Kreatinin-Standard nach Angaben des Herstellers hergestellt und verdünnt. Der Urin wurde 1:10 in H₂O_{dest.} verdünnt, Serum wurde unverdünnt verwendet. Je 15 µl Urin/Serum-Probe oder Standard wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit alkalischer Pikrinsäurelösung inkubiert. Bei der Bestimmung des Kreatinin-Gehaltes im Urin betrug die Inkubationszeit 10 min bei RT. Nach dieser Zeit wurde die Absorption bei 490 nm am Photospektrometer (EL800, Biotek Instruments, Winooski, USA) gemessen. Nach erfolgter Messung wurde Säuregemisch hinzugegeben, weitere 20 min bei RT inkubiert und nochmals die Absorption bei 490 nm gemessen. Die Differenz der beiden Messungen ist dann proportional zur Kreatinin-Konzentration im Urin. Bei der Bestimmung des Kreatinin-Gehaltes im Serum inkubierte die alkalische Pikrinsäurelösung zunächst 1 min bei der auch die Absorption bei 490 nm gemessen wurde. Nach weiteren 6 min wurde die Absorption ein weiteres Mal gemessen. Die Farbentwicklung innerhalb der 6 min ist dann proportional zur Kreatinin-Konzentration im Serum.

3.2.5 Alkalischer Comet Assay

Der Comet Assay ist eine einfache, sensitive Methode Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche und alkalilabile Stellen der DNA zu detektieren. Hierbei werden entweder kultivierte oder aus Organen isolierte Zellen, in Agarose eingebettet und einer Lyse mit hoher Salzkonzentration unterzogen, bei der die DNA durch Abbau von Membranen und Cytoplasma frei zugänglich wird. Anschließend werden die Zellen einer alkalischen Elektrophorese unterzogen, bei der die geschädigte DNA in Form von DNA-Bruchstücken in Richtung Anode wandert. Während die DNA-Bruchstücke schnell durch die Agarose wandern,

wandert die intakte Kern-DNA viel langsamer und bleibt kompakt. Dadurch ergibt sich die typische Struktur eines Kometen [120], [121] (Abb.6). Die Länge des Kometenschweifs zeigt dabei den Schädigungsgrad jeder einzelnen Zelle an und kann mit Hilfe einer speziellen Software quantifiziert werden.

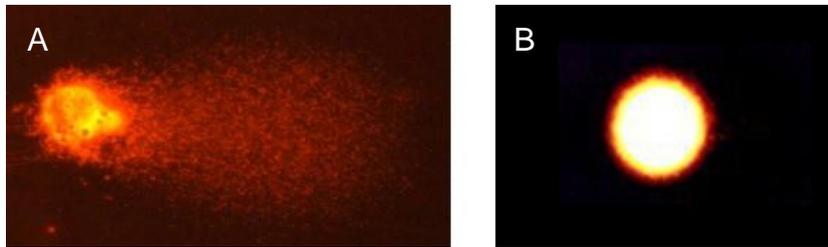


Abb. 6: Repräsentatives Bild von Zellkernen nach alkalischer Elektrophorese. Aus Zellen mit geschädigter DNA (**A**) (Einzelstrang/Doppelstrangbrüche und alkalilabile Stellen) wandern mehr DNA-Fragmente durch das elektrische Feld als aus Zellen mit intakter Kern-DNA (**B**). Ein Kometen-ähnliches Bild wird sichtbar, da kleine DNA-Fragmente schneller wandern als größere Fragmente und intakte Kern-DNA.

Unmittelbar nach Entnahme der perfundierten Niere wurde ein Viertel davon abgeschnitten und in einer Petrischale auf Eis in RPMI 1640 Medium (mit 15% DMSO und 1,8 % NaCl) mit einer Schere möglichst schnell in kleine Stücke zerschnitten. Die somit gewonnen primären Nierenzellen wurden samt Medium in einen Cell Strainer mit 100 µm Durchmesser (BD Biosciences, Bedford, USA) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann für 5 min bei 4°C und 1000 x rpm zentrifugiert. Danach wurde das Medium dekantiert und die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden danach 1:10 mit 37°C-warmer 0,5 % LMP (low melting point)-Agarose gemischt und auf zuvor mit 1,5%-iger HMP (high melting point)-Agarose beschichtete Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nachdem die Agarose fest war, wurde das Deckgläschen abgenommen und die Objektträger in einer abgedunkelte Küvette mit Lyselösung (Lysepuffer: 5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Na-Sarcosinat, pH = 10; Lyselösung: 66,75 ml Lysepuffer, 10 % DMSO, 1% Triton X-100) bei 4°C der Zellyse unterzogen. Nach einer Stunde wurden die Präparate zur partiellen Entspiralisierung der DNA für 20 min in die auf 4°C vortemperierte Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) gelegt. Nach Beendigung der Entwindung wurde die Elektrophorese gestartet. Eine Spannung von 25 V wurde angelegt und die Stromstärke von 300 mA mittels des Puffervolumens eingestellt. Die Elektrophorese dauerte 20 min. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min

in Neutralisationspuffer (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) inkubiert, 5 min in eiskaltem Methanol fixiert und zum Trocknen für 10 min bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Durch Auftragen von 20 µl der Gel Red Gebrauchslösung (Gel Red Nucleic Acid Stain [Biotium, Hayward, Canada]; 1:100 mit H₂O, dann 1:3 mit 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) verdünnt) konnte die DNA sichtbar gemacht werden. Zur Auswertung wurde das Fluoreszenzmikroskop Labophot-2 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) sowie die Software Komet 5 (Komet 5; Kinetic Imaging, Bromborough, UK) verwendet. Betrachtet wurden die Präparate bei einer 20-fachen Vergrößerung. Ausgezählt wurden 50 Zellen pro Tier. Das Ergebnis wurde als Prozentanteil der DNA im Schweif angegeben.

3.2.6 Reparatur-Comet Assay

Collins et al. entwickelte eine Methode, basierend auf den Grundlagen des Comet Assays, mit der es möglich ist, *in vitro* die ersten Schritte der BER eines Lymphozyten-Extrakts messen kann [122]. Um die Aktivität der BER in tierischem Gewebe zu messen, modifizierte Langie et al., Collins *in vitro* Repair Assay [123]. Das Prinzip dieses Assays lässt sich wie folgt beschreiben:

Substrat-Zellen (HeLa) werden dem Photosensitizer [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol (Ro19-8022) (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) und Mischlicht/sichtbarem Licht ausgesetzt und enthalten danach vorwiegend die Basenmodifikation 8-oxodG. Diese Zellen werden in Agarose eingebettet und der Zellyse ausgesetzt. Nach der Lyse werden die eingebetteten Zellen mit einem aus tierischem Gewebe gewonnenen Proteinextrakt inkubiert. Die in diesem Extrakt enthaltenen Enzyme führen die ersten Schritte der BER aus, bei der die Reparatur durch eine DNA-Glykosylase, die spezifisch 8-oxodG-Läsionen erkennt und diese vom Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA entfernt, initiiert wird und dabei abasische Stellen entstehen lässt. Daraufhin folgt ein enzymatischer Einschnitt entweder durch eine AP-Endonuklease oder durch die Glykosylase selbst, woraufhin DNA-Einzelstrangbrüche resultieren, die mit einer anschließenden Gelelektrophorese detektiert werden können. Der Prozentsatz DNA im Schweif ist dabei proportional zur Einschnittsaktivität der BER des Proteinextrakts [123]. Eine Übersicht des Reparatur-Assays gibt Abbildung 7.

Materialien und Methoden

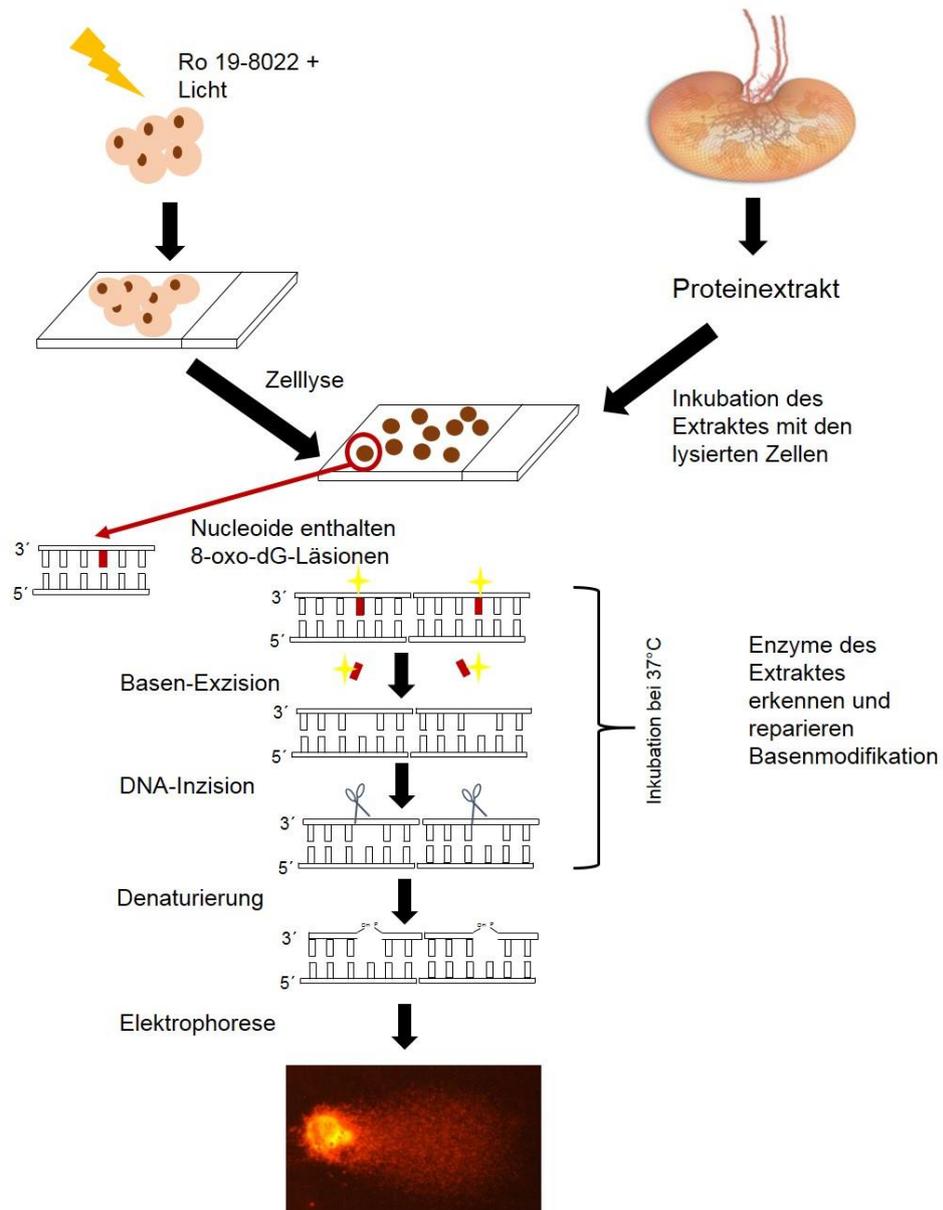


Abb. 7: Übersicht über das Prinzip des Reparatur-Comet-Assays, um die BER-abhängige DNA-Einschnittsaktivität zu messen.

Substratzellen werden dem Photosensitizer Ro 19-8022 und Licht exponiert, um 8-oxodG-Läsionen zu induzieren (rote Base). Nach Lyse werden die in Agarose-Gel eingebetteten Nucleoide mit einem Proteinextrakt aus der Niere inkubiert und anschließend eine Einzelzellgelelektrophorese durchgeführt. Dadurch werden Einzelstrangbrüche, die durch die Enzyme der BER eingebracht wurden, sichtbar. Modifiziert nach Langie et al. [123].

3.2.6.1 Schädigung der Substratzellen mit dem Photosensibilisator Ro19-8022

Um eine 8-oxodG Basenmodifikation in die DNA der HeLa-Zellen einzubringen, wurden diese mit dem Photosensitizer Ro19-8022 behandelt, welcher in Verbindung mit sichtbarem Licht (Absorptionsmaximum bei 427 nm) zu oxidativen DNA-Schäden führt [124]. Über eine Typ I-Reaktion generieren Photosensibilisatoren, meist durch die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), hauptsächlich von Singulett-Sauerstoff, oxidative DNA-Modifikationen [125]. Diese sind im Wesentlichen von Purin-Modifikationen beherrscht [126], wobei 8-oxodG überwiegt [127]. Die Durchführung der Behandlung von Zellen mit Ro19-8022 erfolgte nach dem Protokoll von Langie et al. [123]. HeLa-Zellen wurden in T 75 cm² Zellkulturflasche bis zur Konfluenz kultiviert, das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden diese mit 5 ml 1 µM Ro19-8022 (Ro) versetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit kaltem PBS behandelt wurden (noRo). Unmittelbar nach Behandlung bestrahlte man die Zellen mit sichtbarem Licht (500 Watt Halogenlampe) aus 33 cm Entfernung für 5 min auf Eis. Nach Bestrahlung wurden die Zellen ein weiteres Mal mit kaltem PBS gewaschen, abtrypsiniert, zentrifugiert und in Medium aufgenommen. Die behandelten und nicht behandelten Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10⁶ Zellen/ml mit Einfriermedium eingefroren, aliquotiert und bis zum Experiment bei -80°C aufbewahrt.

3.2.6.2 Proteinisolierung

Um Proteine für den Reparatur-Comet-Assay aus den Nieren zu gewinnen, wurde nach dem Protokoll von Langie et al. vorgegangen. Die Nieren wurden in flüssigem Stickstoff kleingemörsert, in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt, gewogen und anschließend mit 100 µl Puffer A (45 mM Hepes; 0,4 mM KCl; 10 mM EDTA; 0,1 mM DTT; 10% Glycerol, pH 7,5) pro 50 mg Gewebe versetzt. Die Proben wurden gevortext, schockgefroren und aufgetaut. Danach wurden 30 µl 1% Triton-X in Puffer A pro 100 µl eines Aliquots beigefügt, nochmals gut gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation auf Eis wurden die Gewebepartikel mit einem Mikropistill zerrieben. Eine anschließende Zentrifugation bei 10.000 x g für 5 min bei 4°C sorgte dafür, dass sich Zellreste als Pellet absetzen; der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und

bis zur Messung der Proteinkonzentration nach Bradford [128] bei -80 °C eingefroren.

3.2.6.3 Durchführung des Reparatur-Comet-Assays

Die Durchführung des Comet Assays erfolgte zum einen Teil nach der Arbeitsvorschrift von Langie et al. 2011, zum anderen Teil wie in 3.2.4 beschrieben. Am Tag des Experiments wurden je ein Aliquot von Ro und noRo Zellen aufgetaut, mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und bei 1000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde im Restmedium gevortext und im Verhältnis 1:10 mit auf 37°C vortemperierten 0,5 % LMP Agarose vermengt. 45 µl der Suspension wurden auf die mit 1,5 %-iger HMP-Agarose vorbeschichteten Objektträger aufgetragen und mit Deckgläschen abgedeckt. Nach Erstarren der Agarose wurden die Deckgläschen entfernt und die Präparate in einer lichtgeschützten Küvette für 1 Stunde bei 4°C lysiert. Nach der Lyse wurden die Objektträger mit Enzympuffer (40 mM Hepes; 0,1 M KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/ml BSA pH 8) gewaschen. Währenddessen wurden die zuvor isolierten Proteine (s. 3.2.5.2) aufgetaut und mit 0,23% Triton in Puffer A auf 12 mg/ml verdünnt. 50 µl des Proteinextrakts wurden 1:5 mit 6,25 % Aphidicolin (APC) in Enzympuffer versetzt. APC reduziert unspezifische Nuklease-Aktivität und blockiert restliche DNA-Polymerase-Aktivität [129] wodurch die Detektion der DNA-Reparatur-Einschnitts-Aktivität verbessert wird [123]. Als Kontrolllösung wurde statt des Proteinextrakts 50 µl 0,23 % Triton in Puffer A verwendet (noRo/Kontrolle bzw. Ro/Kontrolle). Bis zum Auftragen auf das Gel wurden die verdünnten Proteinextrakte auf Eis gelagert. 50 µl des Proteinextrakts, bzw. der Kontrolllösung wurden nun auf die Gele (jeweils auf Ro bzw. noRo-Objektträger) aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und für 25 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde der Comet Assay wie in 3.2.5 bereits erklärt, fortgeführt.

Materialien und Methoden

Zur Kalkulation der DNA-Reparatur-Aktivität wurde eine Formel nach Langie et al. verwendet:

$$\text{DNA-Einschnittsaktivität} = \frac{[(T_{\text{Ro/Extrakt}} - T_{\text{noRo/Kontrolle}}) - (T_{\text{noRo/Extrakt}} - T_{\text{noRo/Kontrolle}})]}{T_{\text{Ro/Kontrolle}}}$$

TI: Schweifintensität

3.2.7 Immunhistochemie

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbemethoden ist es möglich mit spezifischen Antikörpern, Proteine in einem Gewebeschnitt nachzuweisen. Zunächst bindet ein Primärantikörper an das zu untersuchende Antigen bzw. Protein. An den Primärantikörper bindet wiederum ein Sekundärantikörper, welcher entweder mit einem fluoreszierenden Konjugat gekoppelt ist, oder biotinyliert ist. Der biotinylierten Sekundärantikörper wird mit einer Peroxidase gekoppelt, welche durch Zugabe eines Substrates für die Bildung eines Präzipitats verantwortlich ist, und somit indirekt zur Lokalisation des zu untersuchenden Proteins führt.

3.2.7.1 ABC-DAB-Reaktion

Alle Schritte erfolgten, falls nicht anders angegeben, bei RT.

Zuerst wurden 2 µm dicke Schnitte für 1 Stunde in einem Trockenschrank bei 60 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte wie in Tab. 6 gezeigt, entparaffiniert.

Tab. 6: Entparaffinierungsreihe bei der Immunhistochemischen Färbung

Roti-Histol	3 × 4 min
100 % EtOH	3 × 2 min
70 % EtOH	1 × 2min

Durch die Fixation des Gewebes sind Quervernetzungen von Proteinen aufgetreten. Außerdem sind Antigene nicht mehr so leicht zugänglich. Um diese Quervernetzungen aufzubrechen und die Anzahl an immunreaktiven Epitopen wieder zu erhöhen, und somit auch die Sensitivität der Antikörpererkennung, wurde eine Antigenrückgewinnung durchgeführt. Die Antigendemaskierung erfolgte mit Citratpuffer (10 mM, pH 6) für 15 min bei 95°C. Danach kühlten die

Materialien und Methoden

Schnitte 30 min im Citratpuffer ab und wurden anschließend 10 min in PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, in einer feuchten, dunklen Kammer. Um unspezifische Antikörperbindungen, und somit unerwünschte Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurden mögliche, unspezifische Antikörperbindestellen mit Blockierlösung (5% Esel-Serum in PBS) für 1 Stunde blockiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte das Blockieren von endogener Peroxidase-Aktivität mit einer 3 %-igen H_2O_2 -Lösung für 15 min. Mit 0,001 %-igen Avidin/Biotinlösungen für jeweils 15 min erfolgte eine Absättigung des im Gewebe vorhandenen Avidins. Danach wurde der Primärantikörper (Anti- γ -H2AX, #9718, [Cell Signaling, Herts, UK], 1:200 in Signal Stain ([Cell Signaling, Herts, UK]) aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde, nach Abwaschen des Primärantikörpers mit PBS, der biotinylierte Sekundärantikörper (donkey anti-rabbit IgG-B [sc-2089, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA], 1:200 in PBS) für 45 min aufgetragen. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem ABC-Reagenz (PK-6100, Vectastain Elite ABC Kit, [Burlingame, CA, USA]), welches aus einer Mischung aus Avidin und einer biotinylierten Meerrettichperoxidase besteht. Danach erfolgte die Visualisierung mit Hilfe des 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Reagenz' (SK-4100, DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, [Burlingame, CA, USA]). Dabei wird in Anwesenheit von H_2O_2 DAB von der Meerrettichperoxidase zu einem braunen Chromogen umgesetzt (Abb. 8A). Die Inkubation der DAB-Lösung erfolgte dabei 2 min auf der Niere und 8 min auf dem Herz. Anschließend spülte man die Schnitte zuerst in Leitungswasser, dann 5 min in $H_2O_{dest.}$ Eine Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Hämatoxilin (1 g Hämatoxilin, 48 ml 99,8 % Isopropanol, 51,9 ml $H_2O_{dest.}$ 50 ml Glycerin, 1,5 g Kaliumaluminiumsulfat, 5 ml Essigsäure, 0,2 g Kaliumjodat). Die Schnitte wurden dann 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Eine Entwässerung erfolgte, wie in Tab. 7 angegeben.

Materialien und Methoden

Tab. 7: Entwässerungsreihe bei der immunhistochemischen Färbung

70 % EtOH	1 × 2 min
100 % EtOH	4 × 2 min
Roti-Histol	1 × 1 min
Roti-Histol	2 × 3 min

Zuletzt wurden die Schnitte zur dauerhaften Konservierung mit Eukitt eingedeckt. Die Bilder wurden am Leica Lichtmikroskop DM750 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.2.7.2 Amplifizierung mit Hilfe von TSA

Das TSA-Biotin-Kit (NEL700A001, Perkin Elmer, Watham, USA) wird meist zur Erhöhung der Sensitivität der Färbung verwendet, oder um die Menge an Primärantikörper zu verringern, oder aber auch, um Antikörper mit einem schwachen Signal zu verstärken. Bei dieser Färbung erfolgten alle Schritte bis hin zur Inkubation mit dem Primärantikörper wie in 3.2.7.1 beschrieben. Die Waschschriffe erfolgten in TNT-Puffer (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,2% Tween 20, pH 7,5) und der Primärantikörper wurde in TNB-Puffer (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,5%, im Kit enthalten, pH 7,5) verdünnt [Anti-Nrf2 (1:200, sc-7200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) anti-PADPR (1:200, ab14460, abcam, Cambridge, UK)]. Nach Primärantikörperinkubation erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-rabbit IgG-B oder goat anti-chicken IgY-B (1:200, sc-2089/sc-2430, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 45 min bei RT, gefolgt von der Inkubation mit Streptavidin-HRP 1:100 in TNB für 30 min bei RT. Nach diesem Schritt erfolgte die Inkubation mit dem Tyramid-Amplifizierungsreagenz, welches die Basis der Signalverstärkung bildet. Es wird durch HRP aktiviert und bindet sehr schnell kovalent an Proteine in der Nähe des HRP-Moleküls. Das biotinylierte Tyramid-Reagenz wurde 1:50 mit Amplifikationsverdünnungsmittel (im Kit enthalten) verdünnt und für genau 5 min (anti-PADPR) bzw. 3 min (anti-Nrf2) bei RT inkubiert. Ferner erfolgte, zur weiteren Verstärkung und zur Visualisierung, wieder eine Inkubation mit Streptavidin-HRP 1:100 in TNB für 30 min bei RT. Anschließend erfolgte die Behandlung mit DAB für 10 min (anti-Nrf2) oder mit 1:2 in H₂O_{dest.} verdünntem DAB für 2,5 min (anti-PADPR) (Abb. 8B). Alle nachfolgenden Schritte wurden wieder wie in 3.2.7.1 beschrieben durchgeführt. Die Bilder wurden am Leica

Lichtmikroskop DM750 (Leica Microsystems) in einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen.

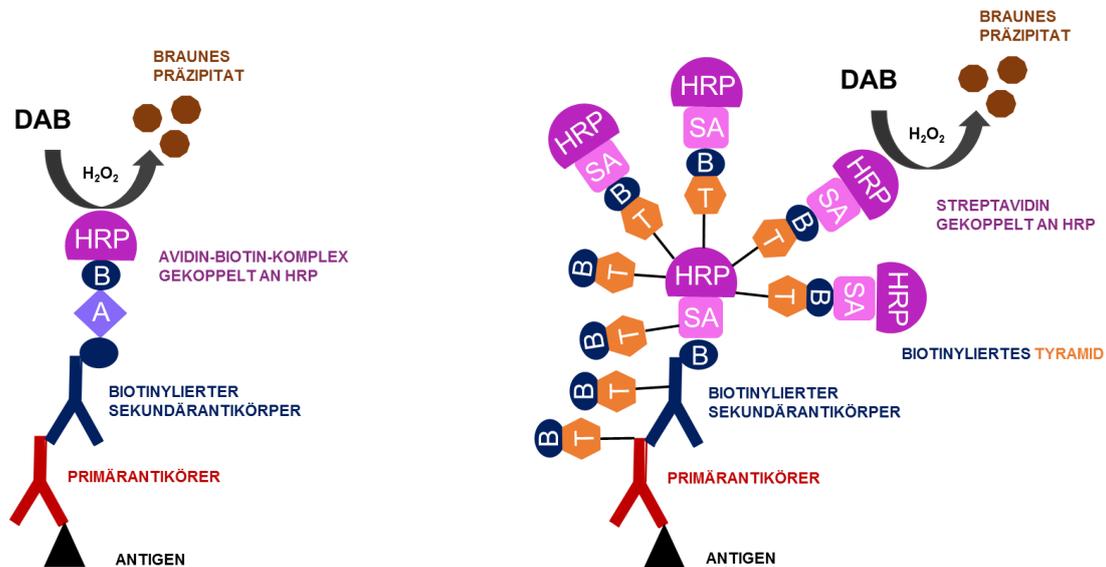


Abb.8: Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen

A: Der primäre Antikörper bindet an das nachzuweisende Antigen. An den primären Antikörper bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper. Der ABC (Avidin-Biotin-HRP)-Komplex bindet wegen der hohen Affinität des Avidins zum Biotin an den biotinylierten Sekundärantikörper. Durch Zugabe von DAB und H_2O_2 setzt das Enzym HRP DAB zu einem braunen Präzipitat um. **B:** An den biotinylierten Sekundärantikörper bindet an HRP gekoppeltes Streptavidin. An dieses Zwischenglied bindet biotinyliertes Tyramid, welches durch HRP aktiviert wird und der Signalverstärkung dient. Daran bindet wieder an HRP gekoppeltes Streptavidin welches über DAB und H_2O_2 indirekt und mit Verstärkung das Antigen nachweisen kann.

3.2.7.3 Quantifizierung

Die Auswertung der Bilder erfolgte entweder durch Bezug der positiven Kerne auf die Gesamtkernzahl pro Bild, welche mit dem Programm Cell Profiler (cell image analysis software) 2.0 (www.cellprofiler.org) [130] ausgewertet wurden. Oder aber, aufgrund eines nur geringen Anteils an positiven Kernen, durch Bezug der positiven Kerne auf die Fläche des Gewebeschnittes.

3.2.8 Immunfluoreszenz

Diese Methode wurde verwendet, um Doppelstrangbrüche in der Niere des in 3.2.3.2. beschriebenen Versuchs fluoreszent zu visualisieren. Hierfür wurden 5 μ m dicke Gefrierschnitte zunächst 15 min bei RT getrocknet und danach in 3,7 %-iger Formaldehydlösung für 15 min fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in 0,2 % Nonidet P40 inkubiert. Dieser Schritt dient der Permeabilisierung der Membran. Nach einstündigem Blocken mit 10 % Ziegen-Serum bei RT wurde der Anti- γ -H2AX-Antikörper 1:200 in Signal Stain

aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Visualisierung des Primärantikörpers wurde ein Cy3-konjugierter goat anti-rabbit Fluoreszenzsekundärantikörper (111-166-045, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) verwendet. Dieser wurde 45 min bei RT inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Schnitte mit Vectashield (H-1200, VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI [Burlingame, CA, USA]) eingedeckt. Das Eindeckmedium enthielt DAPI, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Die Bilder der Färbung wurden am Olympus BX43 Mikroskop (Hamburg, Deutschland) mit einer Olympus XM10 Kamera (Hamburg, Deutschland) mit einem 40er Objektiv aufgenommen. Zur Auswertung wurden 6-8 Bildausschnitte pro Tier mit insgesamt mindestens 2500 Zellkernen ausgewertet. Hierbei wurde der Anteil der positiv für γ -H2AX gefärbten Kerne auf die Gesamtkernzahl bezogen. Zur Bestimmung der Gesamtkernzahl und der positiv-gefärbten Zellkerne wurde das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ verwendet [131].

3.2.9 ROS-Bestimmung

Um Nieren und Herzen auf Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hin zu untersuchen, wurden diese mit dem Farbstoff Dihydroethidium (DHE) behandelt. DHE ist ein Fluorophor, welches, in Anwesenheit von ROS, in seine reduzierte Form Ethidium umgewandelt wird. Ethidium interkaliert mit der DNA und die Fluoreszenz schlägt von blau nach rot um. Für die Färbung wurden zunächst 5 μ m dicke Gefrierschnitte am Gefriermikrotom Leica CM 3050 S angefertigt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Schnitte wurden zunächst kurz angetaut und mit 10 μ M DHE-Lösung für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden diese am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) im Tritic-Filter mit der Kamera Intas MP5000 (Intas, Göttingen, Deutschland) in 20-facher Vergrößerung fotografiert. Ausgewertet wurden jeweils 8 Bilder mit dem Programm Cell Profiler, welches die Fluoreszenzintensität jedes Kerns und somit jedes Bildes automatisch erfasst.

3.2.10 Semiquantitative Untersuchung der Niere - Histopathologie

Zur Beurteilung von histopathologischen Veränderungen der Niere wurde die Hälfte der rechten Niere aus 3.2.2 und 3.2.3.1 am Institut für Nephropathologie, Universitätsklinikum Erlangen, Arbeitskreis von Frau Dr. Amann, in Paraffin eingebettet und dort 2 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden nach einem Standardfärbeprotokoll für HE (Hämatoxylin-Eosin), PAS (Periodic Acid Schiff) und Siriusrot angefärbt. Die Nieren aus 3.2.3.2 wurden am eigenen Institut nach einem Standardfärbeprotokoll für HE, PAS und Siriusrot angefertigt. Anhand der verschieden angefärbten Präparate wurden somit vier verschiedene Parameter zur Beurteilung der histopathologischen Veränderungen herangezogen und ausgewertet: Glomeruloskleroseindex (GSI), Mesangiolyseindex (MSI), Vaskulärer Schädigungsindex (VSI) sowie der Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI).

3.2.10.1 Glomeruloskleroseindex (GSI)/ Mesangiolyseindex (MSI)

Anhand dieser beiden Indices wurde das Ausmaß der Schädigung von Glomeruli in der Nierenrinde untersucht. Der GSI beurteilt die Proliferation von Mesangiumzellen sowie die Zunahme von mesangialer Matrix; mit Hilfe des MSI beurteilt man hingegen den Verlust an Mesangiumzellen und eine daraus folgende Erweiterung von Kapillarschlingen. Da beide Parameter ineinander übergehen und gleichzeitig auftreten, wurden diese auch parallel anhand der PAS-gefärbten Präparate mit einer 20-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop (Leica DM 750) ausgewertet. Pro Tier wurden jeweils 50 Glomeruli bewertet. Die Bewertung jedes einzelnen Glomerulums erfolgte nach einer Methode von El Nahas [132] bei der die Schädigung in fünf verschiedene Stadien unterteilt wird (Tab. 8) und folgendermaßen berechnet wird:

$$\text{GSI/MSI} = \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4)}{50}$$

n = Anzahl an Glomeruli in Stadium 0-4

S = Stadium 0-4

Tab. 8: Stadieneinteilung des GSI/MSI nach El Nahas [132]

Stadium (Score)	Histopathologische Veränderung		Prozentualer Anteil
	GSI	MSI	
0	Normales Glomerulum	Keine Veränderung der Kapillaren	-----
1	Mesangiale Verdickung mit und ohne Proliferation von Mesangiumzellen, keine Kapillarbeteiligung	Erweiterung einzelner Kapillaren	< 25%
2	Mesangiale Proliferation mit partieller Gefäßwandbeteiligung, segmentale Sklerose	Erweiterung von Kapillaren >25% ODER Kapillaraneurysma bis 50%	25-50%
3	Große Teile der Kapillaren mit Obliteration oder Narbenformation, diffuse Sklerose	Kapillaraneurysma	50-75%
4	Totale Obliteration der Kapillaren mit und ohne Kapillarthrombose, globale Sklerose mit Kapillarkollaps	Kapillaraneurysma	>75%

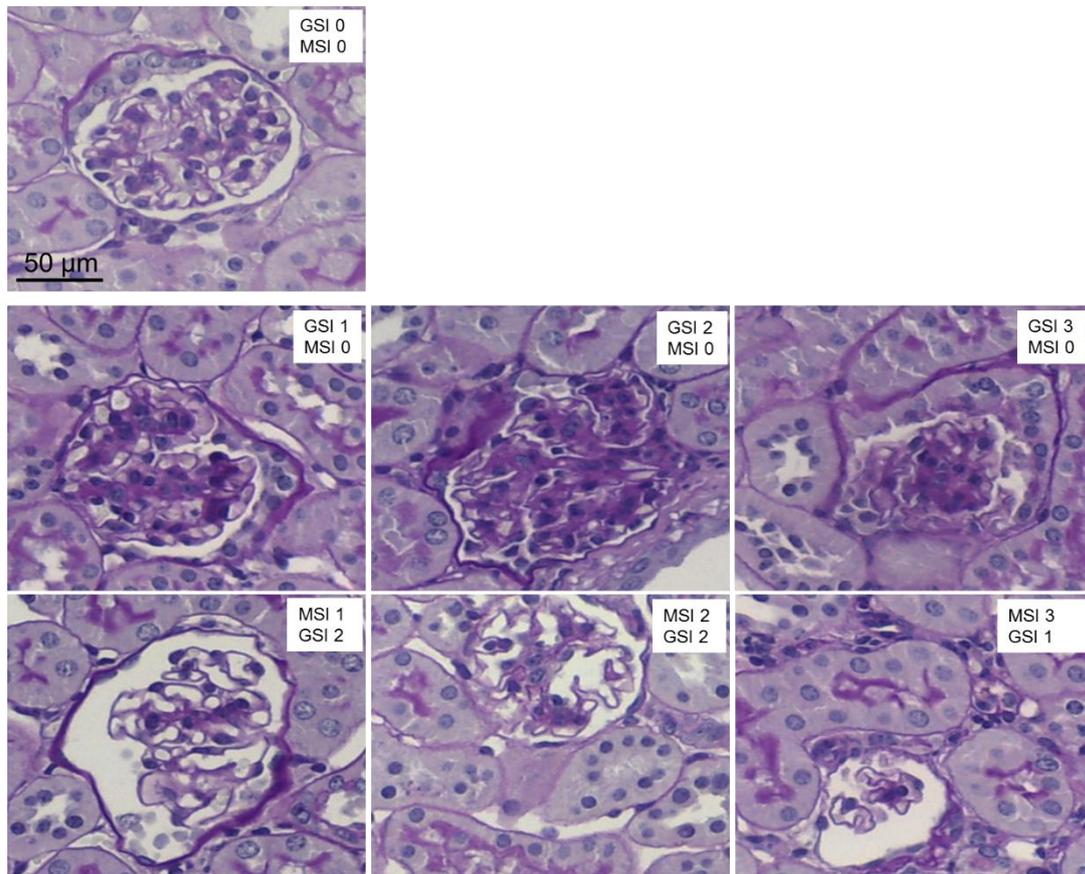


Abb.9: Repräsentative Bilder von Glomeruli mit einem Schädigungsindex von 0-3: PAS-Färbung, Bilder aufgenommen mit einem 20er Objektiv.

3.2.10.2 Vaskulärer Schädigungsindex (VSI)

Zur Einschätzung des Gefäßsystems der Nierenrinde wurden pro Tier je 20 Gefäße in einem HE-gefärbten Schnitt mit einem 40er Objektiv am Lichtmikroskop (Leica DM 750) bewertet. Die Bewertung erfolgte nach einer Stadieneinteilung nach Véniant [133] (Tab. 9). Der VSI beurteilt die Gefäßwandverdickung, sowie das Ausmaß einer fibrinoiden Nekrose und wurde wie folgt berechnet:

$$VSI = \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4)}{20}$$

n = Anzahl an Gefäßen in Stadium 0-4

S = Stadium 0-4

Tab. 9: Stadien vaskulärer Schädigung nach Véniant [133]

Stadium (Score)	Histopathologische Veränderung	Gefäßwandverdickung
	VSI	
0	Normale Gefäße	0%
1	Geringe Gefäßwandverdickung	25%
2	Moderate Gefäßwandverdickung	25-50%
3	Schwere Gefäßwandverdickung	>50%
4	Fibrinoide Gefäßwandverdickung	

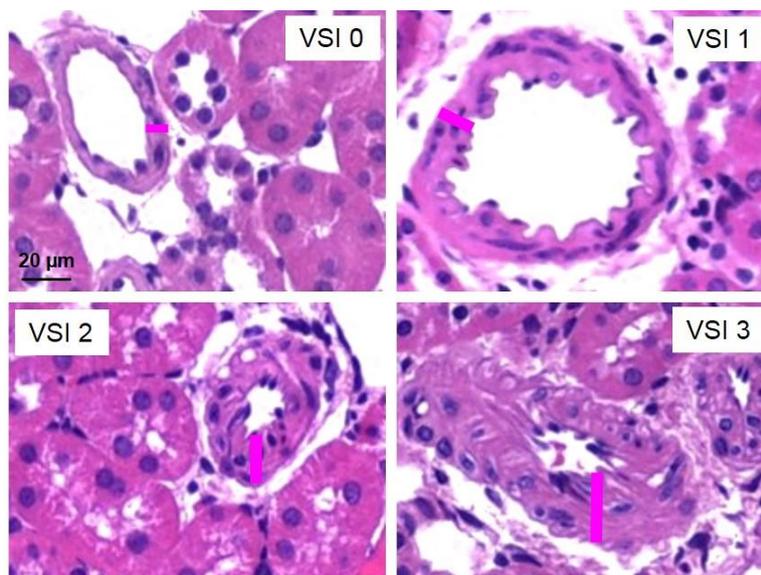


Abb. 10: Repräsentative Aufnahmen des VSI in den Stadien 0-3. HE-Färbung, aufgenommen mit einem 20er-Objektiv.

3.2.10.3 Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI)

Mit Hilfe des TSI werden das Tubulussystem sowie der umliegende interstitielle Raum der Nierenrinde bewertet. Der TSI setzt sich aus der Beurteilung von Entzündung (HE-Färbung), Fibrose (Siriusrot-Färbung), und der Atrophie der Basalmembran von Tubuluszellen (PAS-Färbung) zusammen. Bewertet wurden je 20 Gesichtsfelder in 20 facher Vergrößerung am Lichtmikroskop (Leica DM 750) pro Parameter in Anlehnung an das in Tab. 10 aufgeführte Bewertungssystem der Schädigungsmerkmale, ebenfalls nach Véniant [133]. Abbildung 7 zeigt Beispiele der drei ausgewerteten Parameter, wie sie unter anderem bei den einzelnen Gewebeschnitten vorzufinden waren.

Berechnet wurde der TSI folgendermaßen:

$$\text{TSI} = \left(\frac{(n \times S_0) + (n \times S_1) + (n \times S_2) + (n \times S_3) + (n \times S_4) \text{Entz.}}{20} \right) + \left(\frac{(n \times S_0) + (n \times S_1) + (n \times S_2) + (n \times S_3) + (n \times S_4) \text{Fibrose}}{20} \right) + \left(\frac{(n \times S_0) + (n \times S_1) + (n \times S_2) + (n \times S_3) + (n \times S_4) \text{Atrophie}}{20} \right) / 3$$

n = Anzahl an Gesichtsfeldern in Stadium 0-3

S = Stadium 0-4

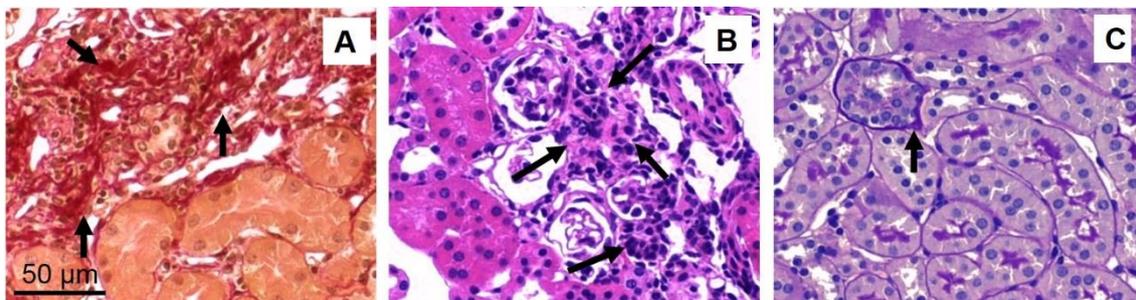


Abb. 11: Beispielbilder der Parameter, welche für die Auswertung des TSI herangezogen wurden. (A) Pfeile deuten auf eine Fibrose-Rotfärbung hin. (B) Pfeile deuten auf Entzündungsherde hin. (C) Pfeil zeigt eine Atrophie der Basalmembran; Sirius, HE und PAS-Färbung, aufgenommen mit einem 20er Objektiv

Tab. 10: Stadien der tubulointerstitiellen Schädigung nach Véniant [133]

Stadium (Score)	Histopathologische Veränderung			Prozentualer Anteil
	TSI			
	Entzündung	Fibrose	Atrophie	
0	0%	0%	0%	
1	<25%	<25%	<25%	
2	25-50%	25-50%	25-50%	
3	>50%	>50%	>50%	

3.2.11 Molekularbiologische Methoden

3.2.11.1 RNA-Extraktion

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Nierengewebe wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) verwendet und nach den Angaben des Herstellers RNA extrahiert. Hierfür wurde 10-30 mg der schockgefrorenen Niere eingesetzt. Das Gewebe wurde zunächst in einem zuvor mit Chloroform ausgespültem Mörser, kleingemörsert und zur Lyse mit 600 µl RLT-Puffer/1% β-Mercaptoethanol versetzt. Das Lysat wurde auf einen QIA-shredder überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 70% EtOH versetzt, auf eine RNeasy Spin Column gegeben und zentrifugiert. Die verbliebene RNA wurde einem DNase I-Verdau unterzogen, um restlich vorhandene genomische DNA zu entfernen. Nach mehreren Waschschrinen wurde die RNA zuletzt mit 30 µl RNase freiem H₂O eluiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.11.2 cDNA-Herstellung (RT-PCR)

Zur Herstellung der cDNA wurden, je nach Verwendung, zwei verschiedene cDNA-Synthese-Kits verwendet. Um cDNA für eine konventionelle PCR einzusetzen wurde das Revert Aid™ Premium First strand c-DNA Synthese Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Hierfür wurde die Konzentration der RNA am Nanodrop 200C UV-Spektrometer (Thermo Scientific, Rockford, USA) bestimmt und jeweils 1000 µg RNA für das Umschreiben zur cDNA verwendet. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 11 zusammengefasst.

Materialien und Methoden

Tab. 11: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese mit dem Revert Aid™ Premium First strand c-DNA Synthese Kit von Fermentas

d-NTP Mix	1 µl
Oligo(dT)-Primer	1 µl
1000 µg RNA in H ₂ O	13 µl
Ansatz bei 65°C 5 min denaturieren	
5 x RT-Puffer	4 µl
Reverse Transkriptase Enzym Mix	1 µl
Gesamtansatz 20 µ	
30 min 50°C 5 min 85°C ∞ 4°C	

Um cDNA für eine qRT-PCR einzusetzen wurde das High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet. Hierfür wurde ebenfalls die Konzentration der RNA am Nanodrop 200C UV-Spektrometer (Thermo Scientific) bestimmt und jeweils 1000 µg RNA eingesetzt. Der Unterschied zu dem o.g. Kit besteht hauptsächlich an der Wahl der Primer. Für die cDNA-Synthese für eine qRT-PCR wurden statt der Oligo-(dT)-Primer Random Hexamer Primer verwendet. Diese bestehen aus zufällig zusammengesetzten Sequenz, die es ermöglichen, an viele Stellen der RNA zu binden und nicht nur an den Poly (A)-Schwanz der RNA. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems

10 x RT-Puffer	2 µl
25 x dNTP-Mix (100mM)	0,8 µl
10 x Random Primers	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Nuclease freies H ₂ O	4,2 µl
1000 µg RNA in H ₂ O	10 µl
Gesamtansatz 20 µl	
10 min 25°C 120 min 60°C 5 min 85°C ∞ 4°C	

3.2.11.3 Touchdown- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um definierte Abschnitte eines Genoms zu amplifizieren, wurde eine Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Hierbei wurde mit Hilfe einer Taq-Polymerase ein Bereich des Genoms exponentiell vermehrt.

Die Touchdown-PCR ist ein Verfahren bei dem es vermieden wird, dass Primer nicht-spezifische Sequenzen amplifizieren. Dabei wird schrittweise für ein Zyklus-Set die Schmelztemperatur herabgesetzt. Die Primer binden dabei bei der höchsten Temperatur und amplifizieren mit größter Wahrscheinlichkeit das Zielgen. Dieser Genabschnitt wird nachfolgend bei geringeren Temperaturen amplifiziert. Die Primer könnten jetzt auch unspezifische Bindungen eingehen, allerdings verhindern die vorher amplifizierten spezifischen Replikat der Reaktion eine größere Amplifikation der unspezifischen Sequenzen. Dieser „touchdown“ erhöht somit die Spezifität der PCR-Reaktion.

Diese Art von PCR wurde verwendet, um nachzuweisen, dass das Nox2-Gen in Nox2-KO-Mäusen funktionsunfähig ist. Dazu wurde in Anlehnung an das von Jackson bereitgestellte PCR-Protokoll eine PCR durchgeführt und zur Auswertung auf ein 3%-iges Agarose-Gel aufgetragen (http://jaxmice.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:0::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:1016,002365). Als Referenzgen wurde β -Actin gewählt, für dessen Nachweis ein Standard-PCR-Protokoll durchgeführt wurde (Tab. 13).

Tab. 13: Reaktionsansatz einer Standard-PCR

Reaktionskomponenten Nox2	Volumen	Reaktionskomponenten β -Actin	Volumen
H ₂ O	7,5 μ l	H ₂ O	8,5 μ l
Nox2_Common-Primer 25 μ M	1 μ l	Primer fwd. (10 μ M)	1 μ l
Nox2_Wildtyp-Primer 25 μ M	1 μ l	Primer rev. (10 μ M)	1 μ l
Nox2_Mutante-Primer 25 μ M	1 μ l		
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	12,5 μ l	REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	12,5 μ l
cDNA (50 ng/ μ l)	2 μ l	cDNA (50 ng/ μ l)	2 μ l
Gesamtansatz 20 μ l			

Materialien und Methoden

Der Reaktionsansatz wurde, wie in Tab.13 gezeigt, zusammen pipettiert und die PCR mit dem Programm, wie in Tab. 14 aufgeführt, am Biometra Thermocycler (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Tab. 14: PCR-Programm für eine Touchdown-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	94°C	3 min	
2	94°C	20 sec.	
3	64°C	30 sec*	* - 0,5°C pro Zyklus
4	72°C	35 sec.	2-4 für 12 Zyklen
5	94°C	20 sec.	
6	58°C	30 sec.	
7	72°C	35 sec.	5-7 für 25 Zyklen
8	72°C	2 min	
9	4°C	∞	

Tab. 15: PCR-Programm für eine Standard PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	94°C	3 min	
2	94°C	20 sec.	
3	54°C	30 sec.	
4	72°C	35 sec.	2-4 für 28 Zyklen
5	72°C	20 sec.	
6	4°C	∞	

Um die PCR-Produkte nachzuweisen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein 3%-iges Agarosegel hergestellt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer (40 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8 mit Eisessig eingestellt) bis zur Auflösung in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, so dass die aufgetrennten PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können. 20 µl je Probe und 2,5 µl eines Längenstandards (250 ng; Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland), wurden auf das Gel aufgetragen. Für 30 min wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Unter einem

UV-Transilluminator (GelDoc 200, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) wurden anschließend Bilder des Gels für die Analyse gemacht.

3.2.11.4 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real-Time PCR basiert auf dem Prinzip einer konventionellen PCR. Die Methode dient der *in vitro* Amplifikation bestimmter Nukleinsäureabschnitte zum diagnostischen Nachweis und zur Analyse [134].

Bei der Real-Time PCR kann die Amplifikation des Ausgangsmaterials in Echtzeit überwacht und die Transkriptmenge eines Gens quantitativ bestimmt werden. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green genutzt, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert und fluoresziert. Mit Zunahme der DNA während der PCR nimmt also auch die Fluoreszenz zu. Als Quantifizierungsstrategie wurde hier die relative Quantifizierung gewählt, bei der die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Referenzgen bezogen wird. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte hierbei über die sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode. Der Ct-Wert entspricht hierbei der Anzahl an PCR-Zyklen die nötig sind um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen (Schwellenwert-Zyklus). Für den ersten Schritt der Auswertung wird für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCt Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCt Wert einer Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Dieser Schritt führt somit zum „delta-delta CT“ Quantifizierungsmodell. Der relative Expressionsunterschied errechnet sich somit aus $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [135]. Zur Normalisierung und Generierung von $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werten wurden *β -Actin*, *Gapdh* und *Rplp0* als Referenzgene verwendet. Für die Auswertung wurden nur die Amplifikate berücksichtigt, welche spezifische Schmelzkurven lieferten und vor 35 Zyklen den Schwellenwert-Zyklus erreichten. Vor Durchführung der qRT-PCR wurden die Primerpaare auf ihre Effizienz hin untersucht, folglich wurden nur Primer-Paare von einer Effizienz von über 90% verwendet. Außerdem wurde nach jedem qRT-PCR-Durchgang eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Mit dieser Technik kann man überprüfen, ob die Primerpaare spezifisch an das Zielgen binden und keine Primerdimere bilden. Dafür wird die DNA am Ende der Zyklen aufgeschmolzen in dem die

Materialien und Methoden

Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird. Das führt dazu, dass das zu amplifizierende PCR-Produkt bei einer speziellen Temperatur denaturiert. Spezifische PCR-Produkte haben eine höhere Schmelztemperatur, als unspezifische Produkte, da sie länger sind. Die Schmelzkurvenanalyse dient somit als Qualitätskontrolle der qRT-PCR. Fehler, angefangen von der Behandlung der Tiere, über RNA-Isolation und cDNA-Synthese bis hin zur qRT-PCR-Analyse, können dazu führen, dass die quantifizierte Menge der Expressionsänderung überschätzt wird. Darum wurden strenge Grenzen definiert, ab denen ein Anstieg oder eine Abnahme des mRNA-Levels im Vergleich zur Kontrolle als signifikant galt. Normalerweise wurde eine Hochregulation als signifikant und biologisch relevant akzeptiert, wenn mindestens das >2 x Produkt im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde, bzw. weniger als die Hälfte (<0,5 x). Die qRT-PCR für den Nachweis der Gene *AT1aR*, *AT1bR*, *Nox2*, *Nox4* und als Referenzgen *Rplp0* wurde am Uniklinikum Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik II, in der Abteilung für Hepatologie bei Prof. Dr. med. Andreas Geier, durchgeführt. Hierbei wurde der SYBR Select Master Mix mit dem ViiA™ 7 Real-time PCR System, beide von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) verwendet. Der Reaktionsansatz pro Well einer 384-Well-Platte (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gestaltete sich folgendermaßen (Tab. 16):

Tab. 16: Reaktionsansatz der qRT-PCR im 384-Well-Format

SYBR Select Master Mix (2x)	5 µl
fwd. Primer (5 µM)	0,5 µl
rev. Primer (5µM)	0,5 µl
H ₂ O	3 µl
cDNA (10 ng/µl)	1 µl
Gesamtansatz 10 µl	

Pro Tier wurden jeweils Triplikate, sowie für jedes Primer-Paar eine Non-Template-Control pipettiert. Da die Primer für die Replikation des AT1a und des AT1b-Rezeptors geringere Schmelztemperaturen besitzen, wurde hierfür ein anderes PCR-Programm verwendet. Die beiden PCR-Programme sind in Tab. 17 aufgeführt.

Tab. 17: Übersicht über die PCR-Programme am ViiA™ 7 Real-time PCR System

Programm für AT1a/AT1b-Primer		Programm für Nox2/4 und Rplp0-Primer	
2 min 50°C			
2 min 95°C			
15 sec. 95°C	40 Zyklen	1 sec. 95°C	40 Zyklen
15 sec. 55°C		30 sec. 60°C	
1 min 72°C			

Die qRT-PCR für den Nachweis der Gene *AGT*, *ACE*, *Ren*, *Mpg*, *Rad51*, *Xrcc3*, *Gpx1-1*, *SOD1*, *Txnrd11* sowie des Referenzgens *Gapdh* wurden am Universitätsklinikum Düsseldorf, am Institut für Toxikologie bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Fritz, durchgeführt. Hierbei wurde die qRT-PCR am CFX96™ Real Time PCR Detection System mit einem C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sowie mit dem SensiMix™ SYBR Hi-ROX (Bioline, Taunton, MA, USA) durchgeführt. Der Reaktionsansatz einer 96-Well-Platte (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gestaltete sich wie folgt (Tab. 18):

Tab. 18: Reaktionsansatz einer qRT-PCR pro Well einer im 96-Well-Platte

SensiMix™ SYBR Hi-ROX (2X)	10 µl
fwd. Primer (10 µM)	0,5 µl
rev. Primer (10 µM)	0,5 µl
H ₂ O	5 µl
cDNA (5 ng/µl)	4 µl
Gesamtansatz 20 µl	

Hierbei wurden für jedes Tier Unikate zur Auswertung herangezogen. Das PCR-Programm ist in Tab. 19 vorzufinden.

Tab. 19: Übersicht über das qRT-PCR-Programm am CFX96™ Real Time PCR Detection System

10 min 95°C	44 Zyklen
15 sec 95°C	
15 sec. 55°C	
17 sec 72°C	

3.2.11.5 Quantitativer RT-PCR-Array

Der PCR-Array wurde in Zusammenarbeit mit Sigma-Aldrich Deutschland erstellt. Dazu wurden der Firma 96 Referenzsequenzen mitgeteilt, für welche dann dazu Primer synthetisiert und auf einer 96-Wellplatte (8 µl, 250 nM Endkonzentration) vorpipettiert wurden. cDNA von 8-10 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und die qRT-PCR wurde dann wie in 3.2.11.4 beschrieben durchgeführt.

3.2.12 Proteinchemie: Western Blot

Mit der Methode des Western Blots, ist es möglich spezifische Proteine in einem Proteingemisch zu detektieren. Dabei wird das Proteingemisch zunächst mittels Gelelektrophorese ihrer Länge nach separiert. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran [normalerweise Polyvinylidenfluorid (PVDF) oder Nitrozellulose] transferiert (=Blotting) auf der sie mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das zu untersuchende Zielprotein gerichtet sind, detektiert werden können.

Zur Proteinisolation wurden ca. 40 mg Nierengewebe in flüssigem Stickstoff kleingemörsert. Das gemörserte Gewebe wurde mit 500 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,025% Natriumdesoxycholat, 1% Nonidet, 1mM NaF) versetzt [zusätzlich enthielt der RIPA-Puffer einen Protease-Inhibitor-Cocktail und einen Phosphataseinhibitor (Thermo Scientific, Rockford, USA) jeweils in einer Konzentration von 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml], 10 mal durch eine 1 ml Spritze mit einer 26 G-Kanüle gezogen und bei 4 °C, 8000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt mittels der Bradford-Methode [128] bestimmt. 75 µg des Proteingemisches wurden mit Roti-Load 1 (8% Natriumdodecylsulfat (SDS), 20 % β-Mercaptoethanol, 40% Glycerin, 0,015% Bromphenolblau; Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, für 5 min bei 95° C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Durch Zugabe

Materialien und Methoden

von SDS in Kombination mit Hitze kommt es durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Des Weiteren überdeckt SDS die Eigenladungen der Proteine, wodurch diese eine konstante negative Ladung aufweisen. Zudem sorgt β -Mercaptoethanol hierbei für die Spaltung von Disulfidbrücken. Das Proteingemisch wurde auf ein 12,5 %-iges Polyacrylamidgel geladen und im Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3 mM SDS) eine elektrische Spannung angelegt (Einlaufphase: 15mA pro Gel, 20 min, danach 30mA pro Gel, 60 min) bei der die negativ geladenen Proteine der Größe nach aufgetrennt wurden. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des Nass-Blott-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) geblottet. Der Nass-Blott erfolgte in der Elektrophoresekammer im Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% MeOH) bei 300 mA, 90 min. Zur Größeneinordnung der zu detektierenden Proteine lief gleichzeitig ein farbige markierte Marker (Page Ruler, Thermo Scientific, Rockford, USA) im Gel. Um ein erfolgreiches Blotten zu bestätigen, erfolgte ein Anfärben der Membran mit Ponceau S (0,375 g Ponceau S, 1,25 ml Essigsäure, 250 ml H₂O) mit anschließendem Entfärben mit H₂O_{dest.}. Nach kurzem Waschen in TBS-T [(Tris-gepufferte Saline) (0,05 M Tris-Base, 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween 20)] wurde die Membran zwei Stunden in Blockierlösung (5% Milchpulver in TBS-T) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde der Primärantikörper jeweils 1:1000 in TBS-T [**HO-1**: # 2322-1, Epitomics, Burlingame, USA; **γ -GCSc**: # sc-22755, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; **p47phox/NCF1**: # LS-B5698, LifeSpan BioSciences, WA, USA; **SOD1**: # GTX100554, GeneTex, CA, USA; **GAPDH**: # 2118, Cell Signaling, Herts, UK] aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 3 x 10 min waschen mit TBST-T, erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper (anti-rabbit IgG HRP, 1:2000 in 5 % Milchpulver/TBS-T, # KCB003, Rockland, PA, USA) für eine Stunde bei RT. Nach 3 x 10 min waschen mit TBS-T wurde die Membran mit Luminol (Supersignal West Dura, Thermo Scientific, Rockford, USA) behandelt. Zur Visualisierung der gebundenen Antikörper wurde das Fusion FX7 Imaging System (Pepulab, Erlangen, Deutschland) benutzt. Eine Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ [131].

3.2.13 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA basiert auf einer enzymatischen Umsetzung eines Substrates und des Nachweises des Produktes über eine Farbreaktion. Dieses Verfahren ist antikörperbasierend, wobei der Antikörper, welcher das nachzuweisende Antigen bindet, fest an eine Mikrotiterplatte gebunden ist und mit einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht werden kann. Über dieses Verfahren kann eine quantitative Aussage über die Antigenkonzentration anhand des umgesetzten Substrates gemacht werden, die entweder fluorimetrisch oder colorimetrisch erfolgt. Am häufigsten werden der Sandwich-ELISA oder der kompetitive Immun Assay eingesetzt.

3.2.13.1 Sandwich-ELISA

Um Albumin-Konzentrationen im Urin zu bestimmen, wurde das Maus-Albumin ELISA-Kit (EMA 3201-1, AssayPro, St. Charles, USA) verwendet. Dieser ELISA ist ein sogenannter Sandwich-ELISA, bei welchem zwei Antikörper an unterschiedliche Stellen des nachzuweisenden Antigens, in diesem Fall Albumin, binden. Albumin bindet somit sowohl an den Erstantikörper, der an die Mikrotiterplatte gebunden (coated antibody) ist, als auch an den biotinylierten Zweitantikörper (detection antibody). Nachfolgend bindet an den detection antibody ein Streptavidin-HRP-Konjugat, welches das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Präzipitat umsetzt. Nach Zugabe von Salzsäure wird die Reaktion gestoppt und das Substrat kann an einem Photometer mit entsprechender Wellenlänge gemessen werden (Abb. 12).

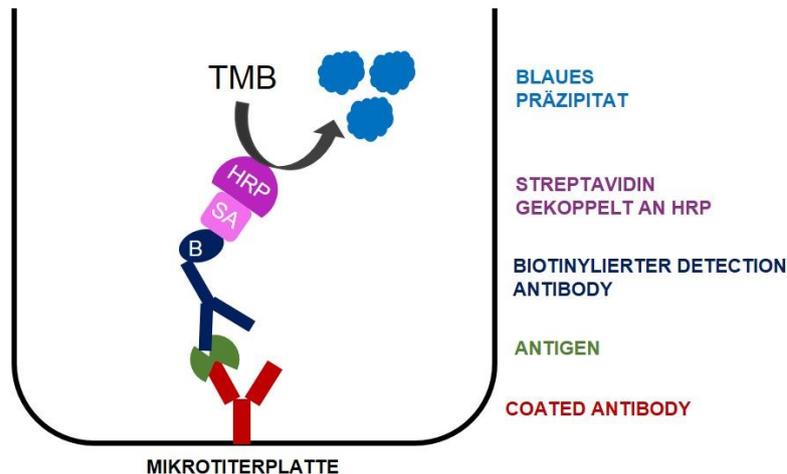


Abb.12: Prinzip des Sandwich-ELISA.

Das zu untersuchende Antigen bindet an einen an einer Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper (coated antibody) sowie an einen weiteren Antikörper (detection antibody). An diesen wird Streptavidin-HRP gekoppelt. Die Peroxidase kann dann das Substrat TMB zu einem blauen Präzipitat umwandeln.

Zu Beginn des Assays wurden Waschkonzentrat, Verdünnungskonzentrat, der biotinylierte Zweitantikörper und das Streptavidin-HRP-Konjugat gemäß der Herstellerangaben verdünnt. Ferner wurde auch ein Albumin-Standard verdünnt und eine Verdünnungsreihe hergestellt (400 ng/ml; 100 ng/ml; 25 ng/ml; 6,25 ng/ml; 1,563 ng/ml; 0 ng/ml). Die Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin erfolgte für den Versuch aus 3.2.2. an Tag 0 und 28 und für die Versuche aus 3.2.3. an Tag 28 des Experiments, welche, wie in Tab. 20 angegeben, verdünnt wurden. Der Assay begann mit der Inkubation von 50 µl der verdünnten Urinprobe (Tab. 20) oder des Albumin-Standards für 2 h bei RT in der mit einem polyklonalen Maus anti-Albumin Antikörper beschichteten 96-Well-Platte. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Inkubation mit 50 µl des biotinylierten *detection antibody* für 1 h bei RT. Nach Abwaschen des überschüssigen bzw. nicht gebundenen Antikörpers wurde die Platte mit 50 µl des Streptavidin-HRP-Konjugats für 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte nach einigen Waschschritten die Inkubation mit 50 µl des TMB-Substrates. Dieses inkubierte ca 5-10 min im Dunkeln bei RT bis eine angemessene Blau-Färbung erfolgte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 0,5 N Salzsäure abgestoppt, was einen Farbumschlag von blau nach gelb zur Folge hatte. Die Absorption bei 450 nm wurde anschließend am Photospektrometer (EL800, Biotek Instruments, Winooski, USA) gemessen.

Materialien und Methoden

Tab. 20: Verdünnungsschema des Urins für den Albumin-ELISA. In der linken Tabelle ist das Verdünnungsschema für den Blutdruckunabhängigkeitsversuch zu sehen, in der rechten Tabelle ist das Verdünnungsschema für die unter 3.2.3 beschriebenen Versuche zu finden.

Blutdruckunabhängigkeitsversuch	
Gruppe	Verdünnung Tag 28
WT-K	1:800
WT-AngII	1:1700
Cand	1:800
AT1a-KO-K	1:700
AT1a-KO-AngII	1:800

NADPH-Oxidase Identifizierungsversuch	
Gruppe	Verdünnung Tag 28
WT-K	1:1000
WT-AngII	1:4000
Nox4-KO-K	1:1000
Nox4-KO-AngII	1:2000
Nox2-KO-K	1:800
Nox2-KO-AngII	1:2500

3.2.13.2 Kompetitiver ELISA

Für die Bestimmung von 15-Isoprostan F_{2t} , auch unter dem Namen 8-epi-PGF_{2 α} bekannt, wurde ein kompetitiver ELISA (Urinary Isoprostane ELISA Kit, EA85, Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA) herangezogen.

Wie beim Sandwich-ELISA ist auch hier Grundlage eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Mikrotiterplatte ist ebenfalls mit spezifischen Antikörpern beschichtet und durch die Zugabe von Standard oder des nachzuweisenden Antigens in einer Probe kommt ein Antigen-Antikörper-Komplex zu Stande. Zusätzlich wird ein HRP-markiertes Antigen (Kompetitor-Antigen) zugegeben. Das freie, in der Probe enthaltene, Antigen und das enzymmarkierte Antigen konkurrieren um den spezifischen Antikörper. Die Zugabe eines Zweitantikörpers ist dabei nicht erforderlich. Der Nachweis erfolgt dann wieder, wie beim Sandwich-ELISA, durch die Zugabe des Substrates TMB, welches von der HRP zu einem blauen Produkt umgesetzt wird. Nach Zugabe einer Säure schlägt bildet sich ein gelbes Präzipitat und kann am Photometer bei 450 nm gemessen werden. Bei diesem ELISA verhält sich jedoch das Signal umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in der Probe, d.h., je mehr Substrat umgesetzt wurde, desto weniger Antigen war in der zu untersuchenden Probe vorhanden (Abb. 13).

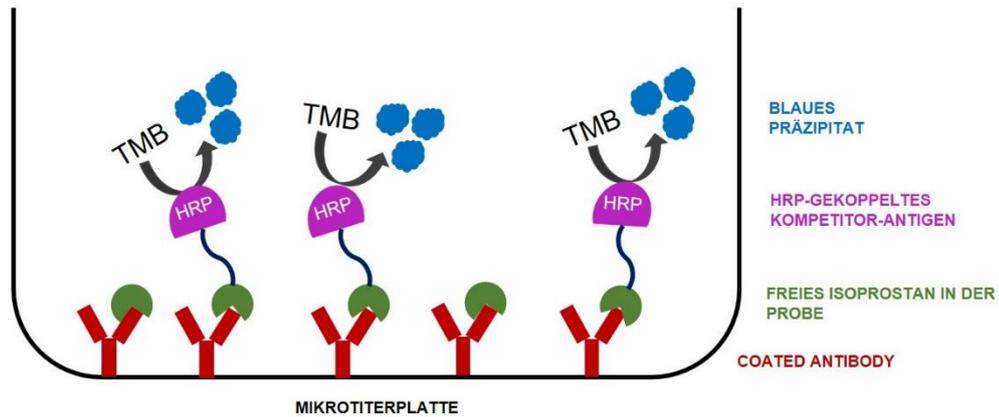


Abb. 13: Prinzip des kompetitiven ELISA. Das zu untersuchende Antigen konkurriert mit einem HRP-gekoppelten HRP-Kompetitor-Antigen um freie Bindungsstellen des an der Mikrotiterplatte haftenden coated antibody. Je weniger Substrat umgesetzt wird, desto mehr Antigen befindet sich in der zu untersuchenden Probe.

Zu Beginn wurden Waschkonzentrat und das 15-Isoprostan F_{2t} HRP-Konjugat entsprechend der Herstellerangaben verdünnt. Außerdem wurde eine Standardreihe des mitgelieferten 15-Isoprostan F_{2t}-Standards erstellt (100, 50, 10, 5, 1, 0,1, 0,005, 0 ng/ml). Die Bestimmung von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin erfolgte für die in 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Experimente jeweils an Tag 28. Bevor der Urin für den ELISA verdünnt wurde, wurde dieser zunächst mit β -Glucuronidase (im Kit enthalten) behandelt. Dies wurde vom Hersteller empfohlen, da ca. 50% des ausgeschiedenen Isoprostans an Glucuronsäure gebunden ist. Somit ist es möglich, nicht nur das freie Isoprostan zu messen und ferner eine genauere Bestimmung des oxidativen Stressmarkers zu erhalten. Nach β -Glucuronidase-Behandlung wurde der Urin 1:4 mit Verdünnungs-Puffer verdünnt und zusammen mit dem 15-Isoprostan F_{2t} HRP-Konjugat für 2 h bei RT in der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde danach das TMB-Substrat für 20-40 min bei RT inkubiert bis eine wahrnehmbare Blaufärbung beobachtet wurde. Mit Zugabe von 3 M Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt, die Farbe schlug von blau nach gelb um und die Absorption im Anschluss bei 450 nm am Photospektrometer (EL800, Biotek Instruments, Winooski, USA) gemessen.

3.2.14 Statistik

Die Daten von 5-10 Tieren sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Zur Statistikauswertung wurde das Programm SPSS 22 (IBM, Somers, USA) verwendet. Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte nach Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov) entweder mittels der Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Vergleich gegen die Kontrolle durch Bonferroni (Normalverteilung). Nicht normalverteilte Werte wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests auf eine Signifikanz innerhalb der Gruppen überprüft und mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde die Signifikanz zwischen zwei Gruppen überprüft. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant anerkannt und markiert (* vs. WT-K; ° vs. WT-AngII;).

4. ERGEBNISSE

4.1 Versuch zur Überprüfung der Abhängigkeit AngII-induzierter Schäden vom Blutdruck

Generell gibt es zwei Typen von ATR, den AT1R und den AT2R. Vom AT1R existieren in Maus und Ratte zwei pharmakologische Subtypen, AT1aR und AT1bR, deren Gene zu 90-95 % sequenzhomolog sind [38], [39]. Aus vorherigen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Experimenten geht hervor, dass AngII zu DNA-Schäden über den AT1R führt [110]–[112]. Dieser Rezeptor ist außerdem hauptverantwortlich für die Regulierung des Blutdruckes [136]. Der wahrscheinlichste Rezeptorkandidat für die Entstehung oxidativen Stresses und DNA-Schäden *in vivo* ist der AT1aR [113].

Mit Hilfe von Mäusen, die defizient für diesen Rezeptor sind, soll untersucht werden, ob die Bildung von ROS, sowie die Bildung von DNA-Schäden in der Niere und im Herzen unabhängig von einem erhöhten Blutdruck auftreten. Außerdem soll dessen Beitrag zum AngII-induziertem Genomschaden überprüft werden.

4.1.1 AngII führt nicht zu einem erhöhten Blutdruck in der AT1a-KO-Maus

In der WT-Gruppe führte AngII, wie erwartet, bereits fünf Tage nach Implantation der osmotischen Minipumpe zu einem signifikanten Blutdruckanstieg (163 +/- 10 mmHg). Mit Ausnahme des zehnten Messtages blieb das Niveau auch während der 28 Tage konstant signifikant gegenüber der WT-K-Gruppe erhöht (Abb.14). Eine Intervention mit Cand senkte den Blutdruck konstant signifikant während des gesamten Zeitraumes sogar unter Kontrollniveau. AngII führte, wie erwartet, in der AT1a-KO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe nicht zu einem Blutdruckanstieg. Der Blutdruck der AT1a-KO-K-Gruppe war sogar über einen Großteil der Behandlungszeit gegenüber der WT-K-Gruppe signifikant niedriger. Durchschnittlich hatten die Tiere der AT1a-KO-Gruppen während des gesamten Zeitraumes einen systolischen Blutdruck von 106 +/- 8 mmHg.

Ergebnisse

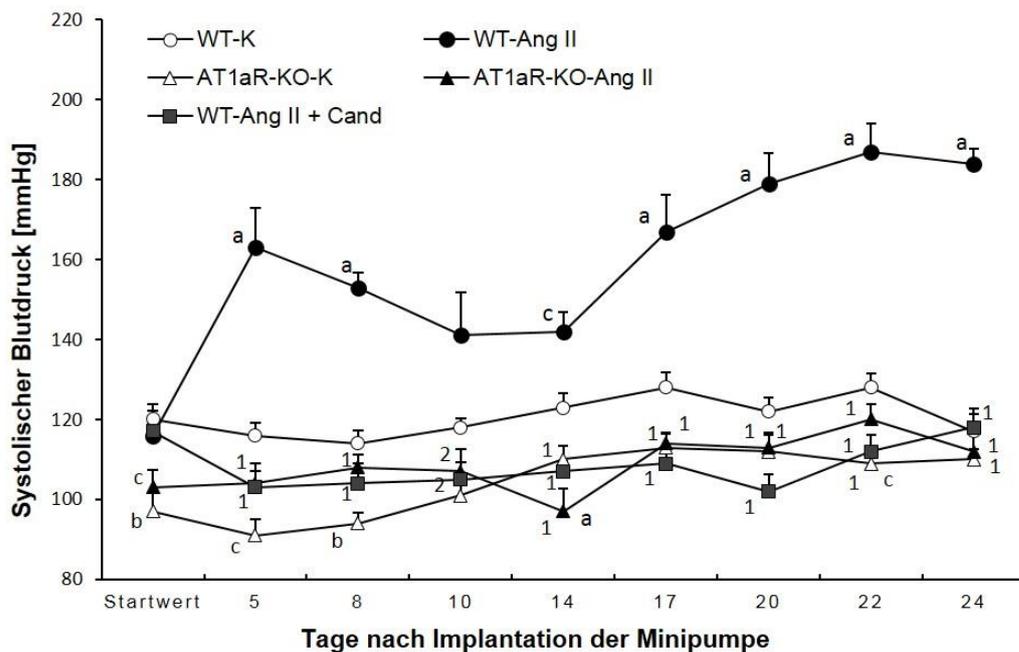


Abb. 14: Entwicklung des systolischen Blutdrucks [mmHg] in AngII-infundierten Mäusen über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Blutdruckwerte wurden nicht-invasiv ermittelt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT-K: Wildtyp-Kontrolle, WT-AngII: Wildtyp-Angiotensin II, WT-AngII + Cand: Wildtyp-Angiotensin II + Candesartan, AT1aR-KO-K: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout-Kontrolle, AT1aR-KO-AngII: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout-Angiotensin II. ^ap < 0,001, ^bp ≤ 0,01, ^cp ≤ 0,05, vs. WT-K; ¹p < 0,001, ²p ≤ 0,01, vs. WT-AngII; WT-AngII: n=6, andere Gruppen n=8.

4.1.2 Gewichtsparameter

Die Auswertung der klinischen Parameter, wie Körpergewicht sowie Nieren- und Herzgewicht, zeigten zum einen, dass die mit AngII behandelten Mäuse im Vergleich zu WT-K-Mäusen ein signifikant niedrigeres Körpergewicht hatten, zum anderen, hatte AngII in AT1a-KO-Mäusen keinen Einfluss auf das Körpergewicht. Das Nierengewicht war in der AT1a-KO-Gruppe niedriger im Vergleich zur WT-K-Gruppe, sogar signifikant niedriger als in den AngII-behandelten Tieren. In WT-Mäusen stieg das Herzgewicht durch AngII signifikant an, welches durch gleichzeitige Intervention mit Cand auf Kontrollniveau gebracht werden konnte. AT1a-KO-Mäuse hatten im Vergleich zu WT-K-Gruppe ein signifikant geringeres Herzgewicht und AngII bewirkte keine Veränderung (Tab. 21).

Ergebnisse

Tab. 21: Übersicht über klinische Parameter in AngII-infundierten Mäusen nach 28-tägiger Behandlung der Tiere. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K:Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. *** $p < 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; °° $p \leq 0,01$ vs. WT-AngII. WT-AngII: n=6, andere Gruppen n=8.

	WT			AT1a-KO	
	K	AngII	Cand	K	AngII
Körpergewicht [g]	31,0 ± 0,5	27,7 ± 0,4**	30,1 ± 0,4	29,4 ± 0,6	28,5 ± 0,8*
Relatives Nierengewicht [‰]	6,3 ± 0,2	6,6 ± 0,3	6,4 ± 0,3	5,1 ± 0,3*/°°	5,0 ± 0,2*/°°
Relatives Herzgewicht [‰]	5,4 ± 0,2	7,0 ± 0,5*	4,7 ± 0,1**/°°	4,3 ± 0,1***/°°	4,6 ± 0,1**/°°

4.1.3 Nierenfunktionsparameter

Als Nierenfunktionsparameter wurden die beiden Biomarker Albumin und Kreatinin herangezogen. Albumin wurde vor dem Einsetzen der osmotischen Minipumpen und am Ende des Versuchs im Urin bestimmt. Kreatinin wurde am Ende des Versuchs sowohl im Urin als auch im Serum gemessen, um mögliche Anzeichen einer Nierenschädigung anzuzeigen.

Weder die Kreatinin-Ausscheidung, noch die Kreatinin-Clearance zeigten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen und somit auch keinen Hinweis auf eine abnormale Nierenfunktion (Tab. 22).

In Abb. 15A ist die Albumin/Kreatinin-Ratio (ACR) dargestellt. Diese Darstellungsweise hat den Vorteil, dass das Gesamtharnvolumen des Sammelurins vernachlässigt werden kann. Durch AngII-Behandlung stieg die ACR signifikant in WT-Mäusen an. Eine Intervention mit Cand verhinderte einen Anstieg der ACR durch AngII. Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die mit AngII behandelte Gruppe der AT1a-KO-Mäuse zeigten keinen erhöhten ACR-Wert. Abb. 15B zeigt den Vergleich der Albuminausscheidung zu Beginn und am Ende des Versuches. Eine erhöhte Albuminexkretion ist dann zu erwarten wenn Teile des Nephrons in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Nach vierwöchiger AngII-Behandlung war die Albuminausscheidung in WT-Mäusen stark erhöht. Durch Cand konnte eine erhöhte Albuminexkretion unterbunden werden. AT1a-KO-Mäuse zeigten keine Veränderung der Albuminausscheidung.

Ergebnisse

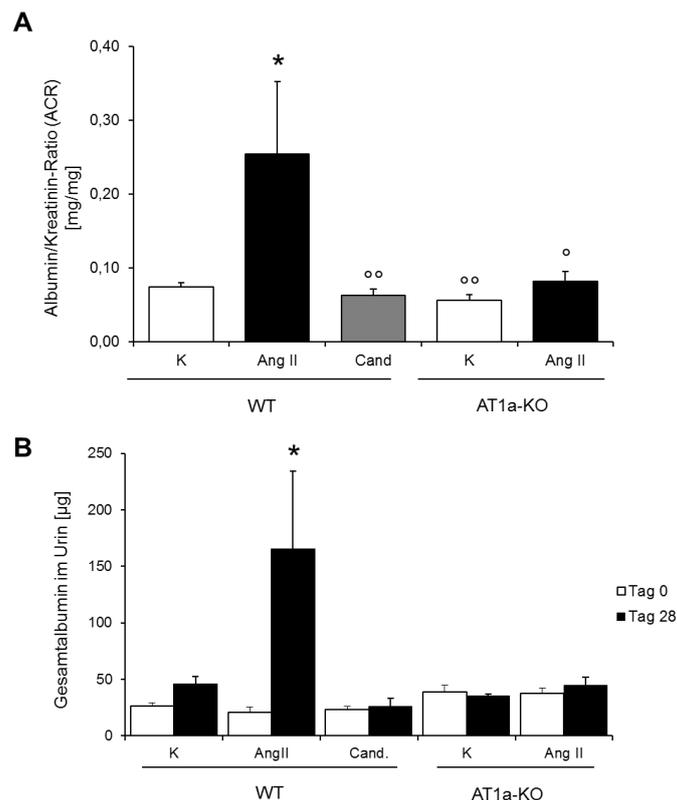


Abb. 15: Bestimmung von Albumin und Kreatinin im Urin mittels ELISA.

(A) Albumin/Kreatinin-Ratio (ACR) im Urin von AngII-infundierten Mäusen am Ende des Versuches.

* $p \leq 0,05$ vs. WT-K; ^{oo} $p \leq 0,01$, ^o $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII. **(B)** Veränderte Albuminausscheidung während des Versuchszeitraumes von 28 Tagen. * $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII an Tag 0. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8.

Tab. 22: Übersicht über Parameter der Nierenfunktion. Diese wurden im Urin und Serum nach 28-tägiger Behandlung der Tiere bestimmt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; ^{oo} $p < 0,01$, ^o $p < 0,05$ vs. WT-AngII. WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8.

	WT			AT1a-KO	
	K	AngII	Cand	K	AngII
Körpergewicht [g]	31,0 ± 0,5	27,7 ± 0,4**	30,1 ± 0,4	29,4 ± 0,6	28,5 ± 0,8*
Harnvolumen [ml]	1,3 ± 0,2	2,6 ± 0,5	1,0 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,4 ± 0,5
Kreatinin-Clearance [ml/min]	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,9	3,2 ± 0,8	4,3 ± 1,8	2,8 ± 0,5
Kreatininausscheidung [mg/20h]	0,6 ± 0,08	0,84 ± 0,25	0,43 ± 0,09	0,74 ± 0,13	0,59 ± 0,08
Albuminausscheidung [μg/20h]	42 ± 6	158 ± 67*	24 ± 6 ^{oo}	36 ± 4	42 ± 7 ^o

4.1.4 Histopathologische Veränderungen der Nierenrinde in WT- und AT1a-KO-Mäusen

Zur Auswertung der histopathologischen Veränderungen der Nierenrinde wurden drei verschiedene Parameter ausgewertet. Der GSI/MSI beschreibt die Veränderung der Glomeruli hinsichtlich der Proliferation und Verdickung von Mesangiumzellen sowie der Erweiterung von Kapillaren. Mit Hilfe des TSI kann man vor allem interstitielle Entzündung, Fibrose und tubuläre Atrophie bewerten. Anhand des VSI wird die Beschaffenheit von Gefäßen innerhalb der Nierenrinde eingeschätzt.

4.1.4.1 GSI/MSI

Eine Behandlung mit AngII führte in WT-Mäusen zu geringen histopathologischen Veränderungen in der Niere hinsichtlich des GSI. Nur der MSI war signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Eine Intervention mit Cand verschlechterte nicht nur den GSI sondern auch den MSI. AT1aR-defiziente Mäuse zeigten ebenfalls signifikant erhöhte histopathologische Veränderungen des GSI und MSI gegenüber wildtypischen Kontrollmäusen. Durch AngII-Infusion verschlechterten sich der GSI- und MSI-Score nicht weiter im Vergleich zur AT1a-KO-K-Gruppe.

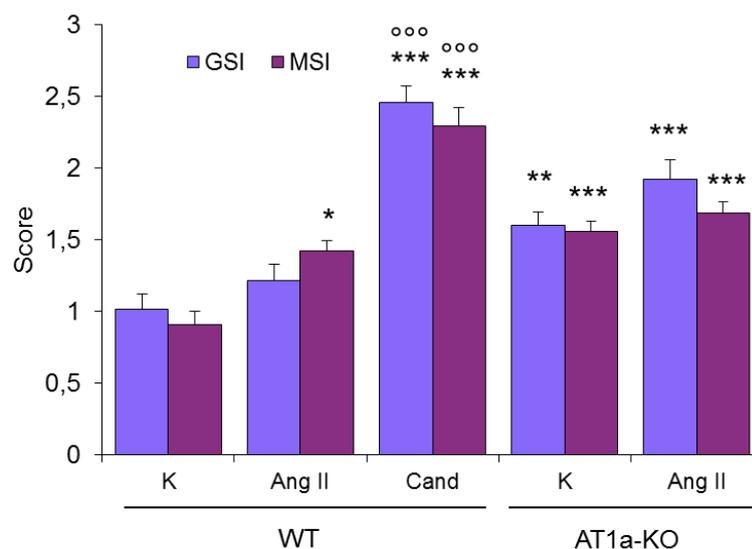


Abb. 16: Semiquantitative Auswertung des GSI/MSI. Auswertung mit Hilfe der verschiedenen Schädigungsscores (3.2.10.1). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. ***p < 0,001, **p ≤ 0,01, *p ≤ 0,05 vs. WT-K; °°°p < 0,001 vs. WT-AngII. WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8.

Ergebnisse

4.1.4.2 VSI

Die vaskuläre Schädigung war durch AngII-Behandlung in der WT-Gruppe zwar nicht signifikant erhöht, jedoch ist eine Tendenz zu einer Gefäßwandverdickung sichtbar. Eine Intervention mit Cand konnte eine Gefäßwandverdickung im Vergleich zur WT-AngII-Gruppe signifikant verhindern. In AT1a-KO-Kontrollmäusen war die Gefäßschädigung prägnanter als in KO-Tieren, die mit AngII behandelt wurden, zudem auch signifikant erhöht gegenüber der WT-K und der Cand-Gruppe.

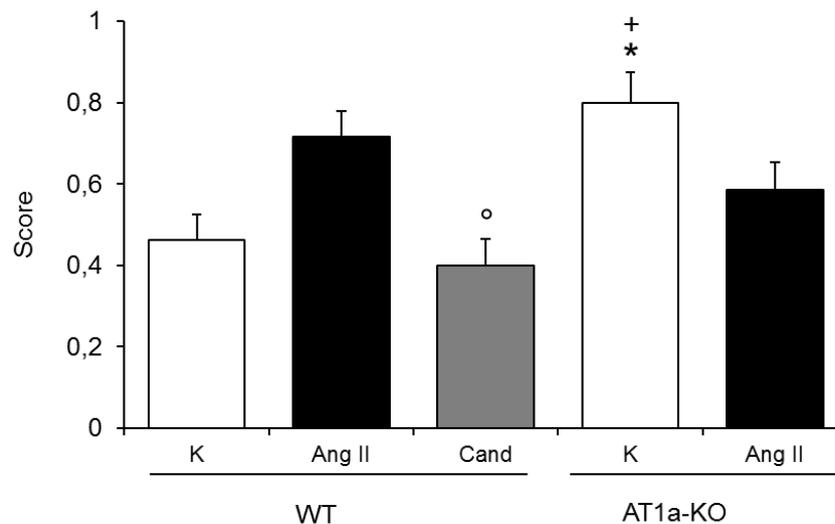


Abb. 17: Semiquantitative Auswertung des VSI. Auswertung mit Hilfe der verschiedenen Schädigungsscores (3.2.10.2). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. *p ≤ 0,05 vs. WT-K; °p ≤ 0,05 vs. WT-AngII; †p ≤ 0,05 vs. Cand. WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8.

4.1.4.3 TSI

Die Schädigungen des Tubulussystems bestanden hauptsächlich aus Entzündung, Fibrose und Atrophie der Basalmembran. Durch Behandlung mit AngII wurde das Tubulussystem in wildtypischen Mäusen kaum geschädigt, auch eine Intervention mit Cand führte kaum zu histopathologischen Veränderungen des TSI. Jedoch war das Tubulussystem sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der mit AngII behandelten Gruppe in AT1a-KO-Mäusen stark geschädigt (Abb. 18).

Ergebnisse

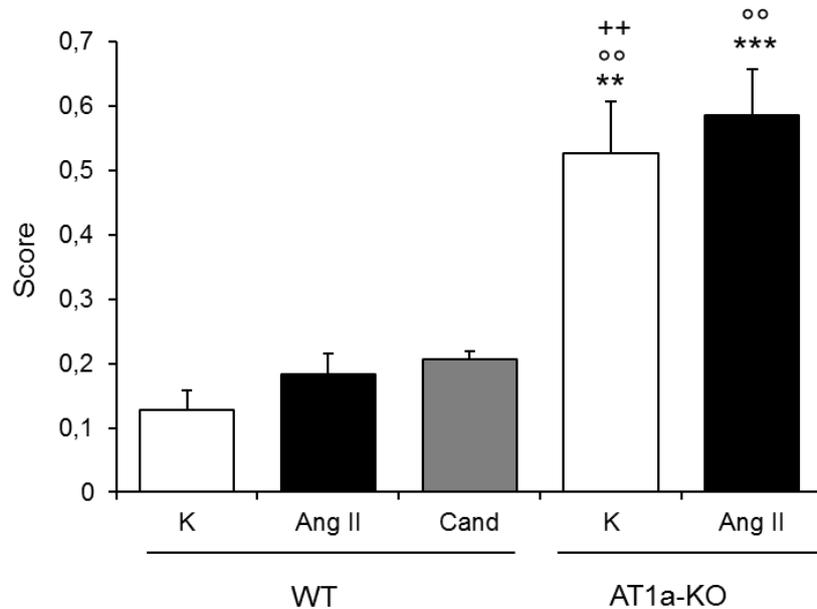


Abb. 18: Semiquantitative Auswertung des TSI. Auswertung mit Hilfe der verschiedenen Schädigungsscores (3.2.10.3). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. ***p < 0,001, **p ≤ 0,01 vs. WT-K; °p ≤ 0,01 vs. WT-AngII; **p ≤ 0,05 vs. Cand. WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8.

4.1.5 Oxidativer Stress-angestößt durch AngII

Brand et al. [137] konnten bereits zeigen, dass AngII *in vivo* über den AT1R zur Bildung von ROS führt. Wie schon erwähnt ist der wahrscheinlichste Rezeptor für die Auslösung von ROS in Ratten und Mäusen der AT1aR. Allerdings gibt es bislang uneinheitliche Studien darüber, ob durch einen Verlust des AT1aR weiterhin eine erhöhte AngII-induzierte Superoxidproduktion stattfindet [138] oder nicht [139]. Aus diesem Grund wurde zum einen ein Marker oxidativen Stresses, 15-Isoprostan F_{2t} , im Urin, sowie die Bildung von ROS in der Niere und im Herzen mit dem ROS-sensitiven Fluorophor DHE untersucht.

4.1.5.1 Erhöhte 15-Isoprostan F_{2t} -Ausscheidung durch AngII

F_2 -Isoprostane sind verlässliche Biomarker zur Beurteilung oxidativen Stresses *in vivo*, da sie zum einen spezifisch bei der Lipid-Peroxydation entstehen und zum anderen auch sehr stabile Produkte sind. Sie können außerdem in ausreichender Menge in Gewebe und Körperflüssigkeiten, z.B. im Urin nachgewiesen werden [140]. Dabei wird 15-Isoprostan F_{2t} am häufigsten zur Bewertung von oxidativem Stress durch Lipidperoxydation herangezogen [141].

Ergebnisse

Die gemessenen 15-Isoprostan F_{2t} Konzentrationen im Urin wurden auf die ebenfalls im Urin bestimmten Kreatinin-Konzentrationen normalisiert und sind in Abb. 20 dargestellt. Eine tendenziell erhöhte 15-Isoprostan F_{2t} -Konzentration war vor allem in WT und AT1a-KO-Mäusen, welche mit AngII behandelt wurden, zu finden. Durch eine Intervention mit Cand stieg die 15-Isoprostan F_{2t} -Konzentration ebenfalls an. AT1a-KO-K-Mäuse zeigten kaum erhöhte 15-Isoprostan F_{2t} -Konzentrationen gegenüber der WT-Kontroll-Gruppe.

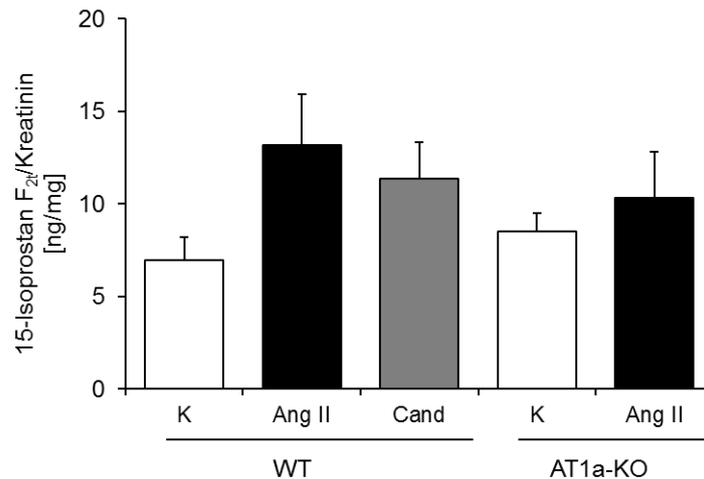


Abb. 19: Bestimmung von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin nach 28-tägiger Behandlung der Tiere. Dargestellt sind 15-Isoprostan F_{2t} -Konzentrationen, normalisiert auf die Kreatinin-Konzentration im Urin. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. WT-K: n=7, WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8.

4.1.5.2 AngII führt trotz AT1aR-Defizienz zur Bildung von ROS

Auf Gefrierschnitten der Niere und des Herzens wurde mit Hilfe des ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes DHE die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen. Wie in Abb. 20 A zu sehen, war die Fluoreszenzintensität, also auch die Menge an ROS in der Niere durch eine AngII-Behandlung in WT und AT1a-KO-Mäusen gegenüber der WT-K erhöht, was auch die quantitative Auswertung in Abb. 20 B verifizieren konnte. Eine Intervention mit Cand konnte die Entstehung von ROS signifikant gegenüber der WT-AngII-Gruppe verhindern. Im Herzen führte AngII ebenfalls zur vermehrten Produktion von ROS, tendenziell in der WT-Gruppe und signifikant erhöht in der AT1a-KO-Gruppe. Ferner konnte die vermehrte Produktion von ROS durch Cand unterbunden werden. Eine leichte ROS-Zunahme fand man weiterhin in der AT1a-KO Kontrollgruppe (Abb. 20 C, D).

Ergebnisse

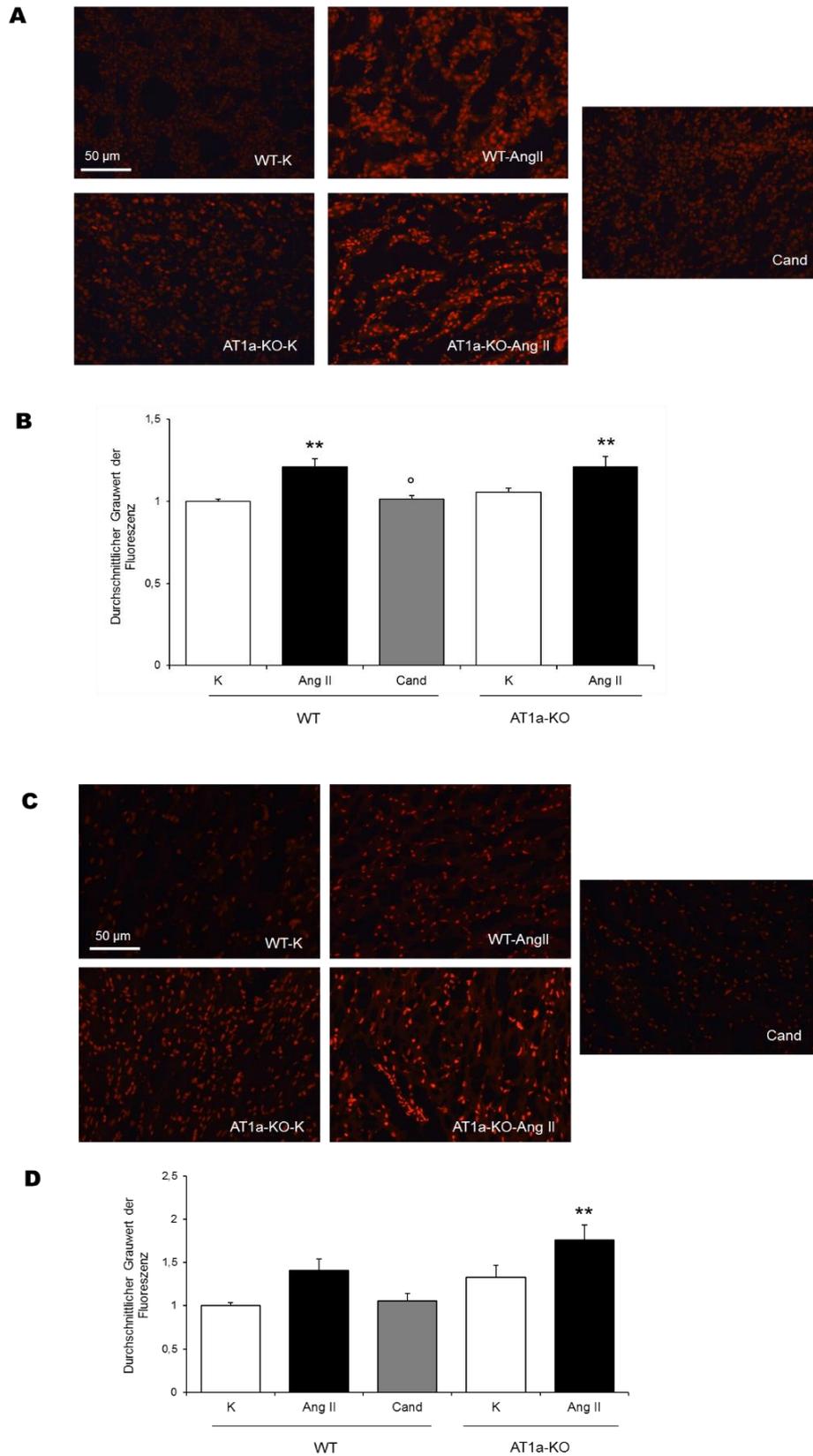


Abb. 20: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Visualisierung erfolgte auf Gefrierschnitten der Niere (A) und des Herzens (C) mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffes DHE, 200-fache Vergrößerung. (B, D) Quantifizierung der Fluoreszenz durch Messung des Grauwertes von 7 Gesichtsfeldern mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes Cell Profiler [130]. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. ** $p \leq 0,01$ vs. WT-K; $^{\circ} p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; WT-AngII: $n=6$, andere Gruppen: $n=8$.

Ergebnisse

4.1.5.3 Gesteigerte Nox2- und Nox4-Expression in AT1a-KO-Mäusen

Aufgrund der vermehrten Produktion von ROS in der Niere wurde als nächstes untersucht, ob eine bestimmte, und wenn ja, welche Nox-Isoform an deren Bildung beteiligt ist. Hierfür wurde die Expression der Nox2 und Nox4 auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Es wurde ebenfalls versucht die Expression von Nox1 nachzuprüfen, jedoch war diese in der Niere kaum exprimiert, so dass keine Daten dazu erfasst werden konnten.

Die Nox2- und Nox4-Expression in der Niere war in WT-Mäusen, welche mit AngII behandelt wurden kaum erhöht. Eine Intervention mit Cand hingegen erhöhte die Expression von Nox2 leicht, während die Nox4-Expression in dieser Gruppe signifikant gegenüber WT-K und WT-AngII-Mäusen erhöht war. AT1a-KO-Mäuse hatten eine 2,5-fach höhere Menge der Nox2-mRNA, so wie eine 2-fach höhere Menge der Nox4-mRNA im Vergleich zu WT-K-Mäusen (Abb. 21 A und B).

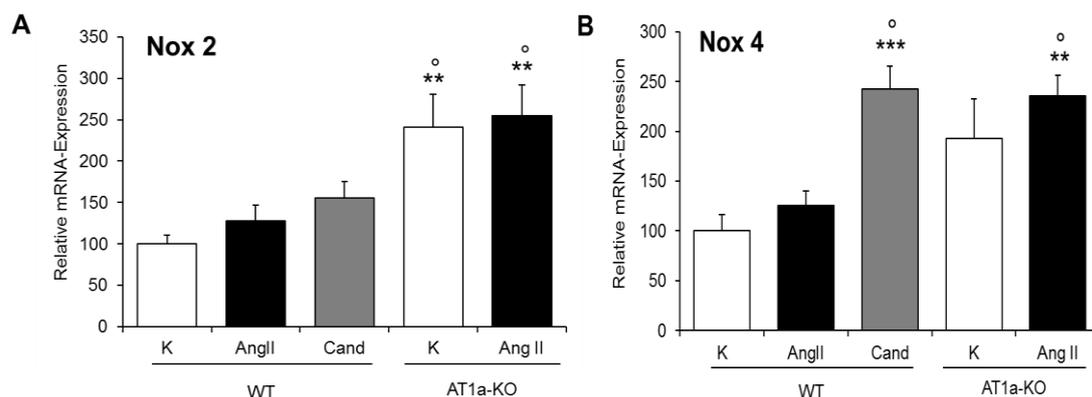


Abb. 21: Relative Quantifizierung der Transkripte von (A) Nox2 und (B) Nox4 im Nierengewebe von WT- und AT1a-KO-Mäusen. Die Daten sind auf das Referenzgen *Rplp0* normalisiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. *** $p < 0,001$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT-K; ° $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; WT-AngII: $n=6$, andere Gruppen: $n=8$

4.1.6 AngII führt zur Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern

Da AngII zur Bildung von ROS geführt hat, wurde im Weiteren das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors Nrf2 in der Niere untersucht. Eine Translokation von Nrf2 aus dem Zytosol in den Zellkern wird durch oxidativen Stress ausgelöst und führt zur Transkription von antioxidativen Enzymen und Proteinen [142], [143]. AngII verursachte in WT und AT1a-KO-Mäusen eine Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern. Das Ausmaß der

Ergebnisse

Translokation war zwar nicht signifikant, jedoch ist eine Tendenz zu erhöhter Anwesenheit von Nrf2 im Zellkern zu erkennen. Cand war in der Lage, eine Nrf2-Aktivierung signifikant zu verhindern (Abb. 22).

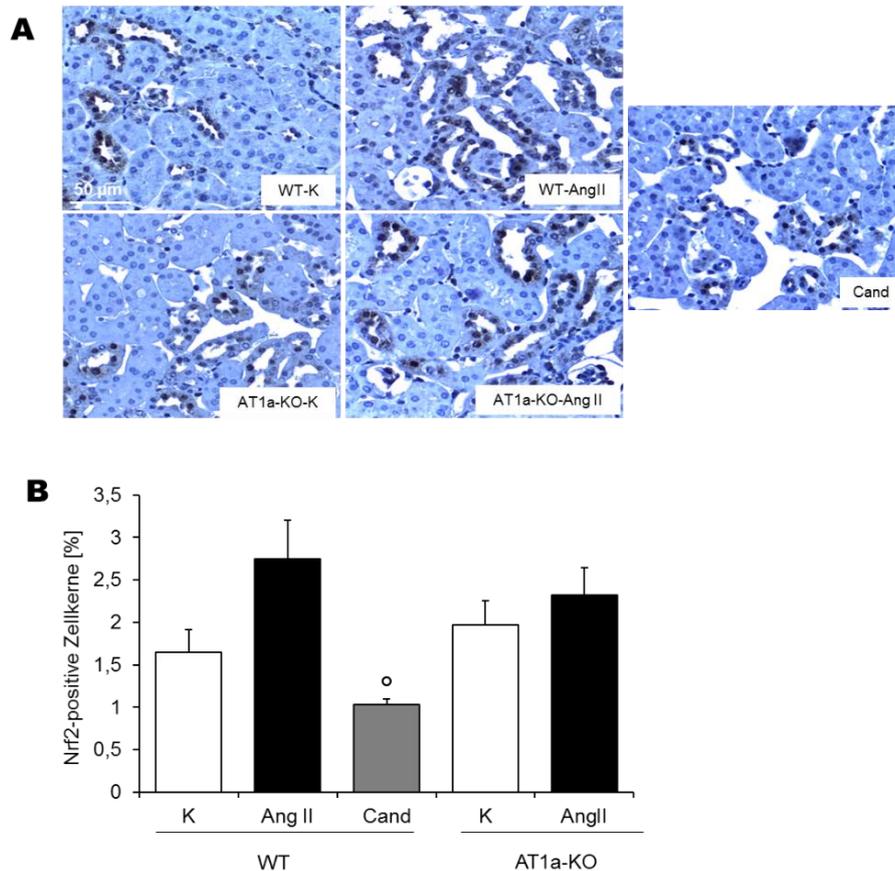


Abb. 22: Nachweise des Transkriptionsfaktors Nrf2. (A) Immunhistochemischer Nachweis auf Paraffinschnitten der Niere. **(B)** Quantifizierung erfolgte durch Auswertung von 8 Gesichtsfeldern mittels Bestimmung der Gesamtkernanzahl über das Auswertungsprogramm CellProfiler [130] und der Bestimmung der Anzahl an Nrf2-positiven Zellkernen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. *p < 0,05 vs. WT-AngII; WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8

4.1.7 Geringe Beeinflussung des antioxidativen Abwehrsystems durch AngII

Da immunhistochemisch bei WT- und AT1a-KO-Tieren, die mit AngII behandelt wurden, eine Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern nachgewiesen werden konnte, wurde nun überprüft, ob die Expression antioxidativer durch Nrf2 regulierter Enzyme, verändert wird.

Mit Hilfe eines PCR-Arrays konnte eine Regulierung von einigen Genen, die für antioxidative Enzyme codieren, in der WT-AngII- und AT1a-KO-Kontroll-Gruppe gefunden werden (4.1.9.3). Aus diesem Grund wurde die Expression der Gene *Gpx11*, *Sod1* und *Txnrd11* zusätzlich auch in den anderen Gruppen untersucht.

Ergebnisse

In wildtypischen Tieren führte AngII kaum zu einer Veränderung der mRNA-Expression der drei Gene, während es in Tieren, die mit Cand behandelt wurden tendenziell zu einer Herabregulation der Gene kam. Für *Gpx11* war dies signifikant. Die Expression der drei untersuchten Gene war in AT1a-KO-Tieren eher niedriger gegenüber der WT-K-Gruppe (Abb. 23).

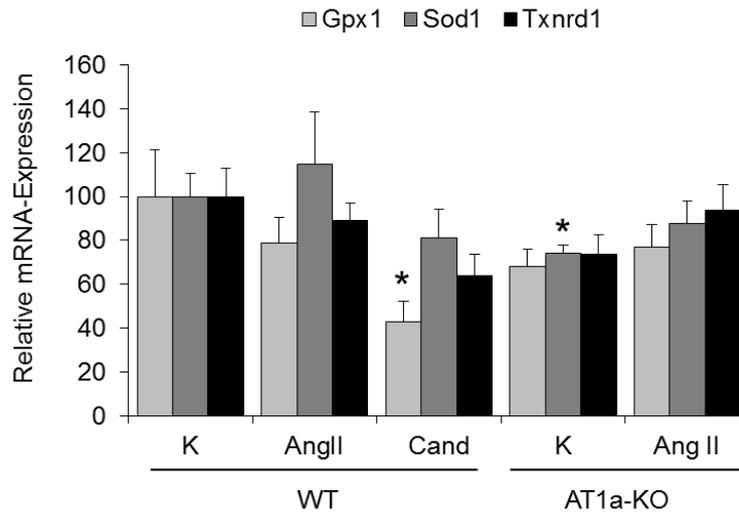


Abb. 23: Relative Quantifizierung der Transkripte von *Gpx11*, *Sod1* und *Txnrd11* im Nierengewebe von WT- und AT1a-KO-Mäusen. Die Daten sind auf das Referenzgen *Gapdh* normalisiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; WT-AngII: $n=6$, andere Gruppen: $n=8$

Des Weiteren wurde die Expression der antioxidativen Enzyme γ -GCLC, HO1 und SOD1 auf Proteinebene untersucht. γ -GCLC ist die katalytische Untereinheit der GCL (Glutamat-Cystein-Ligase). Zusammen mit der modifizierenden Untereinheit GCLM katalysiert sie die Synthese von GSH [90]. Es zeigte sich weder im WT noch in AT1a-KO-Mäusen eine veränderte Expression des γ -GCLC-Proteins (Abb. 24A). In WT-Mäusen konnte durch AngII eine erhöhte Induktion des HO1-Proteins nachgewiesen werden, während die Expression der SOD1 keine Veränderungen zeigte (Abb. 24C).

Ergebnisse

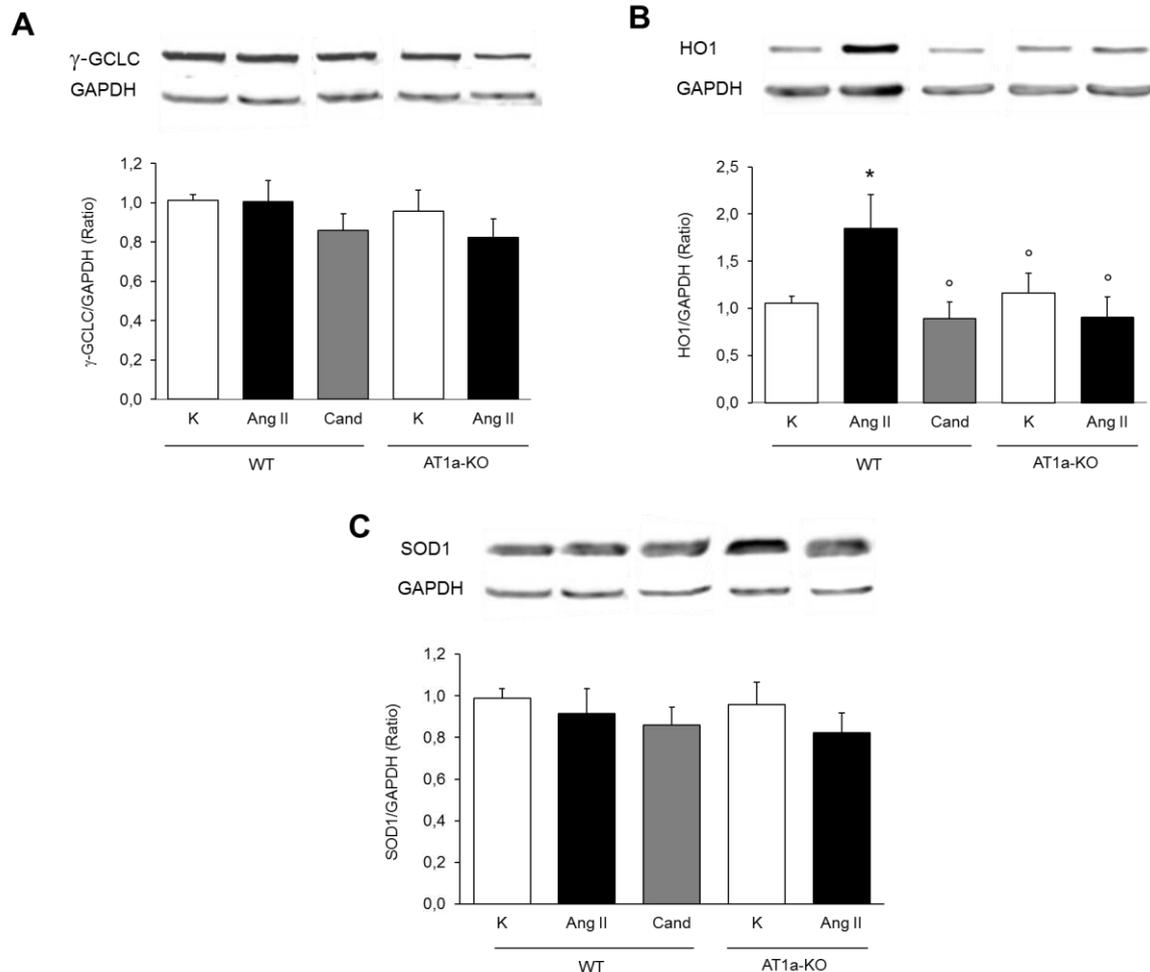


Abb. 3: Repräsentative Western Blots, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots, zur Expression antioxidativer Enzyme, jeweils auf das Referenzprotein GAPDH normiert. (A) γ -GCLC, (B) HO1, (C) SOD1. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ [131]. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K, ^o $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; WT-K, WT-AngII: n=10, andere Gruppen: n=8

4.1.8 Entstehung von DNA-Schäden

Schäden, welche durch oxidativen Stress überwiegend entstehen sind oxidierte DNA-Basen (Purin/Pyrimidinbasen), alkalilabile Stellen, sowie DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche [70], [144]. Ob Einzel- und Doppelstrangbrüche in der Niere und im Herzen durch oxidativen Stress entstanden sind, wurde sowohl mittels Comet Assay als auch mit dem Nachweis eines Doppelstrangbruchmarkers untersucht.

Ergebnisse

4.1.8.1 AngII-induzierte DNA-Schäden können in isolierten Nierenzellen von WT-Mäusen nachgewiesen werden

In isolierten Nierenzellen aus WT- und AT1a-KO-Mäusen wurden DNA-Schäden mit dem Comet Assay identifiziert (3.2.5). Durch die Behandlung mit AngII kam es zu einer signifikanten Erhöhung von DNA-Strangbrüchen in WT-Mäusen, jedoch nicht in AT1a-KO-Mäusen. Durch eine Intervention mit Cand konnte das Ausmaß an geschädigter DNA signifikant verhindert werden (Abb. 25).

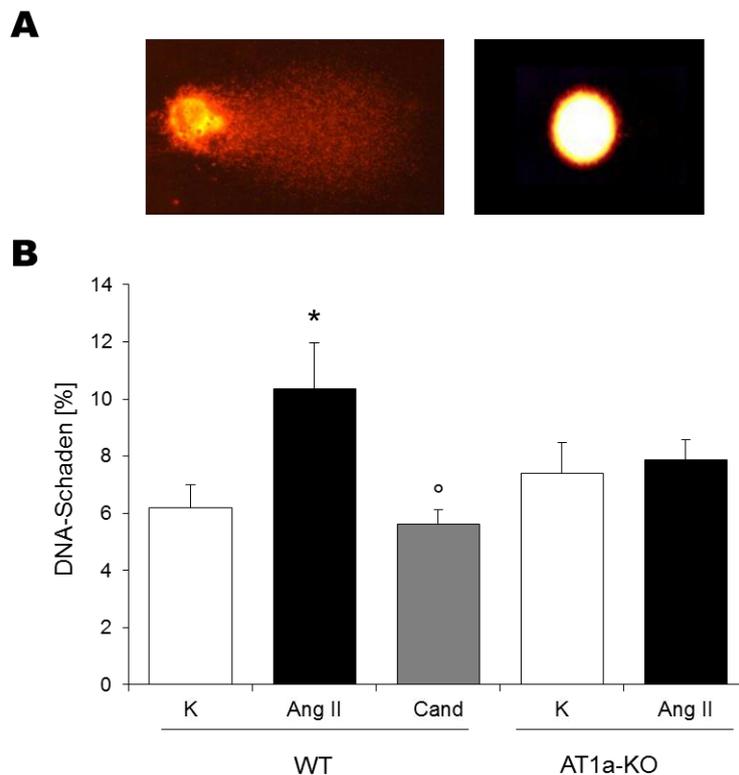


Abb. 25: DNA-Schäden in isolierten Nierenzellen von WT- und AT1a-KO-Mäusen am Ende des Versuches, quantifiziert mit dem Comet Assay. (A) Repräsentative Bilder eines geschädigten (links) und eines nicht geschädigten (rechts) Kerns. **(B)** Quantifizierung des Comet Assays. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; ° $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; WT-AngII: $n=6$, andere Gruppen: $n=8$

4.1.8.2 AngII führt zur Induktion von Doppelstrangbrüchen in Niere und Herz von WT- und AT1a-KO-Mäusen

Um Doppelstrangbrüche in der Niere und im Herzen zu detektieren wurden Paraffinschnitte immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen DNA-Doppelstrangbrüche untersucht. Nachgewiesen wurde hierbei γ -H2AX, die phosphorylierte Form des Histons H2AX. Als Antwort auf DNA-

Ergebnisse

Doppelstrangbrüche wird das Histon H2AX an der Aminosäure Serin 139 phosphoryliert, woraufhin es als γ -H2AX bezeichnet wird. Die Phosphorylierung dient dann der DNA-Schadenserkennung und Rekrutierung von Reparaturenzymen [145].

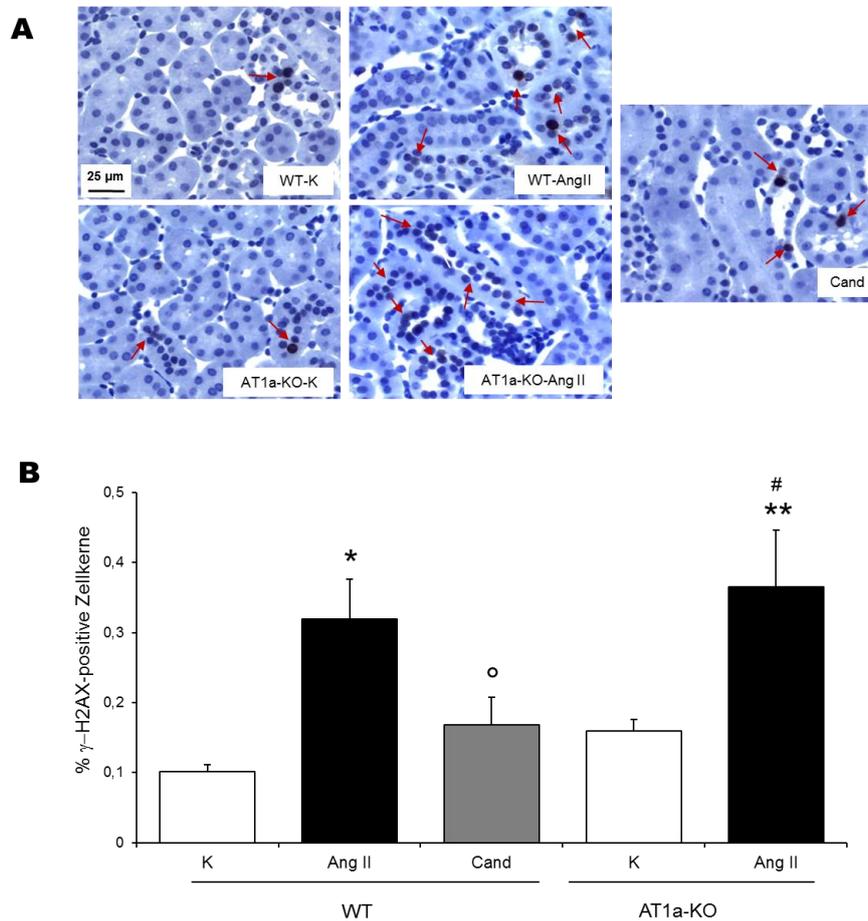


Abb. 26: Nachweis des DNA-Doppelstrangbruchmarkers γ -H2AX. (A) Immunhistochemischer Nachweis auf Paraffinschnitten der Niere. **(B)** Quantifizierung erfolgte durch Auswertung von 8 Gesichtsfeldern mittels Bestimmung der Gesamtkernanzahl über das Auswertungsprogramm CellProfiler [130] und der Bestimmung der Anzahl an positiven Zellkernen (Pfeile). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT-K; ^o $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII, # $p \leq 0,05$ vs. AT1a-KO-K; WT-AngII: $n=6$, andere Gruppen: $n=8$

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies unter AngII-Behandlung führte nicht nur zu DNA-Schäden, die mit dem Comet Assay nachgewiesen werden konnten, sondern auch zu DNA-Doppelstrangbrüchen. In der Niere konnte so in WT und AT1a-KO-Mäusen eine signifikante Induktion von Doppelstrangbrüchen gefunden werden. Die Anzahl an γ -H2AX-positiven Zellkernen in AngII-behandelten AT1a-KO-Tieren war nicht nur signifikant gegenüber WT-Kontroll-Tieren erhöht sondern auch gegenüber AT1a-KO-Kontrolltieren.

Ergebnisse

Durch die Medikation mit Cand konnte die Induktion von Doppelstrangbrüchen in der Niere verhindert werden (Abb. 26).

In den Herzen von WT- und AT1a-KO-Mäusen führte AngII nur tendenziell zu einer gesteigerten Menge von γ -H2AX-positiven Zellkernen. Auch in diesem Gewebe konnte die Bildung von Doppelstrangbrüchen durch die Intervention mit Cand weitestgehend verhindert werden. Im Gegensatz zu der Situation in der Niere wurde im Herzen auch eine leicht erhöhte Anzahl an γ -H2AX-positiven Zellkernen in AT1a-KO-Kontrollmäusen vorgefunden (Abb. 27).

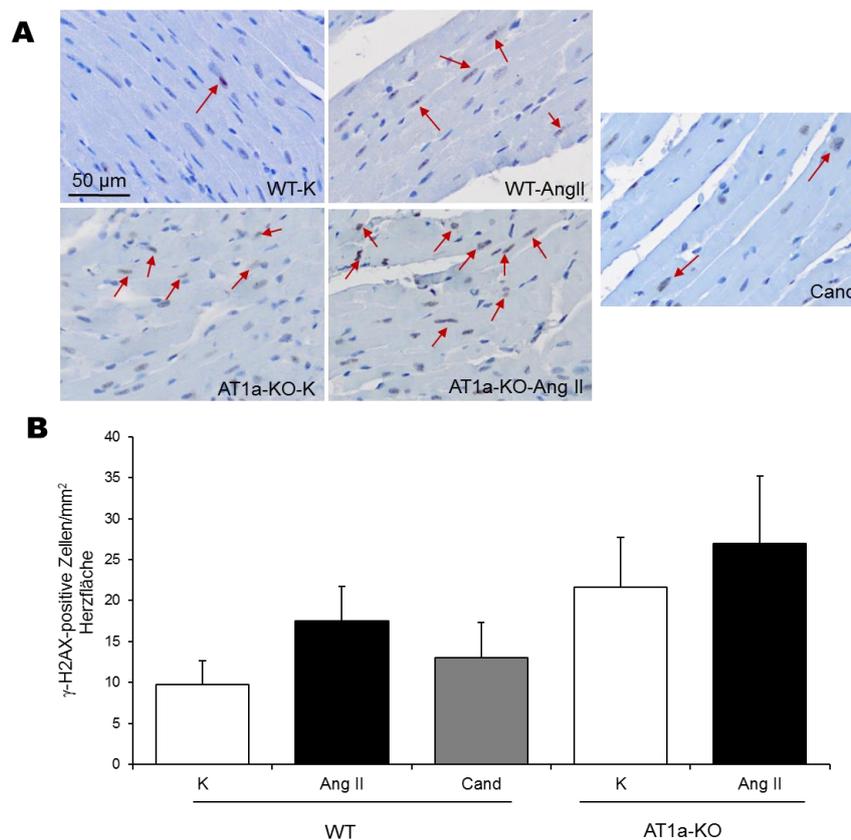


Abb. 27: Nachweise des DNA-Doppelstrangbruchmarkers γ -H2AX. (A) Immunhistochemischer Nachweis auf Paraffinschnitten des Herzens. **(B)** Quantifizierung erfolgte durch Auswertung von 8 Gesichtsfeldern mittels Bestimmung der Anzahl an positiven Zellkernen und Beziehen dieser auf die Herzfläche. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8

4.1.9 Beeinflussung von Reparaturprozessen in der Niere durch AngII

Um zu überprüfen in wie weit eine AngII-Behandlung und die Abwesenheit des AT1a-Rezeptors Einfluss auf die Reparaturkapazität in der Niere besitzen, wurde zum einen ein Reparatur-Comet-Assay durchgeführt (3.2.6), mit welchem die DNA-Einschrittsaktivität während der BER gemessen werden kann. Zum anderen wurden Poly(ADP)-Ribose-Ketten, die als Reaktion auf DNA-Strangbrüche an

Ergebnisse

DNA und Proteine geheftet werden, mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung nachgewiesen. Außerdem wurde die Expression von Genen auf mRNA-Ebene untersucht, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen.

4.1.9.1 AngII erhöht die DNA-Einschnittsaktivität nur in WT-Mäusen

Aus den Daten des Reparatur-Comet-Assays geht hervor, dass die DNA-Einschnittsaktivität während der BER durch die AngII-Behandlung zwar nicht signifikant anstieg, jedoch tendenziell eine Erhöhung sichtbar war. Durch die Intervention mit Cand wurde eine gesteigerte DNA-Einschnittsaktivität nahezu verhindert. Im Gegensatz zu WT-Mäusen zeigten AT1a-KO-Mäuse keine erhöhte DNA-Einschnittsaktivität, auch nicht unter AngII-Behandlung (Abb. 28).

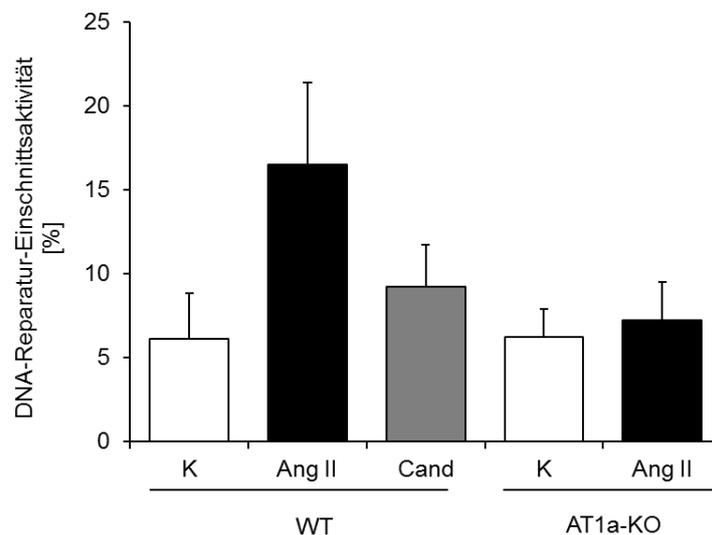


Abb. 28: Bestimmung der DNA-Einschnittsaktivität. Mit einem, auf der Methode des Comet Assays basierenden, Reparatur-Assay wurde die DNA-Einschnittsaktivität des Proteinextrakts von Nieren der WT und AT1-KO-Mäusen bestimmt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. WT: n=5, AT1a-KO: n=6.

4.1.9.2 AngII vermindert die Entstehung von PADPR-Ketten

Als weiterer Marker zur Untersuchung der Reparaturkapazität in der Niere dient der Nachweis von Poly-(ADP)-Ribose (PADPR). PADPR-Polymere werden von einer Klasse von Enzymen (PARP-Enzyme) im Falle eines Strangbruchs in der DNA synthetisiert. Tritt ein DNA-Schaden auf, wird PARP aktiviert, bindet an die DNA und beginnt mit der Synthese der PADPR-Ketten. Diese dienen dann zur Rekrutierung weiterer, an der Reparatur des DNA-Schadens beteiligter Enzyme und Proteine, wie z.B. DNA-Polymerase β oder DNA-Ligase III [105].

Ergebnisse

Die Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung von PADPR auf Paraffinschnitten der Niere deutete auf eine verminderte Häufigkeit von PADPR-positiven Zellkernen in WT-Mäusen, welche mit AngII behandelt wurden, hin, wohingegen eine Reduktion der PADPR-positiven Zellkernen in AngII-behandelten AT1a-KO-Tieren deutlicher ist. AT1a-KO-Mäuse und WT-Mäuse weisen ein ähnliches Vorhandensein von PADPR-Ketten auf (Abb. 29).

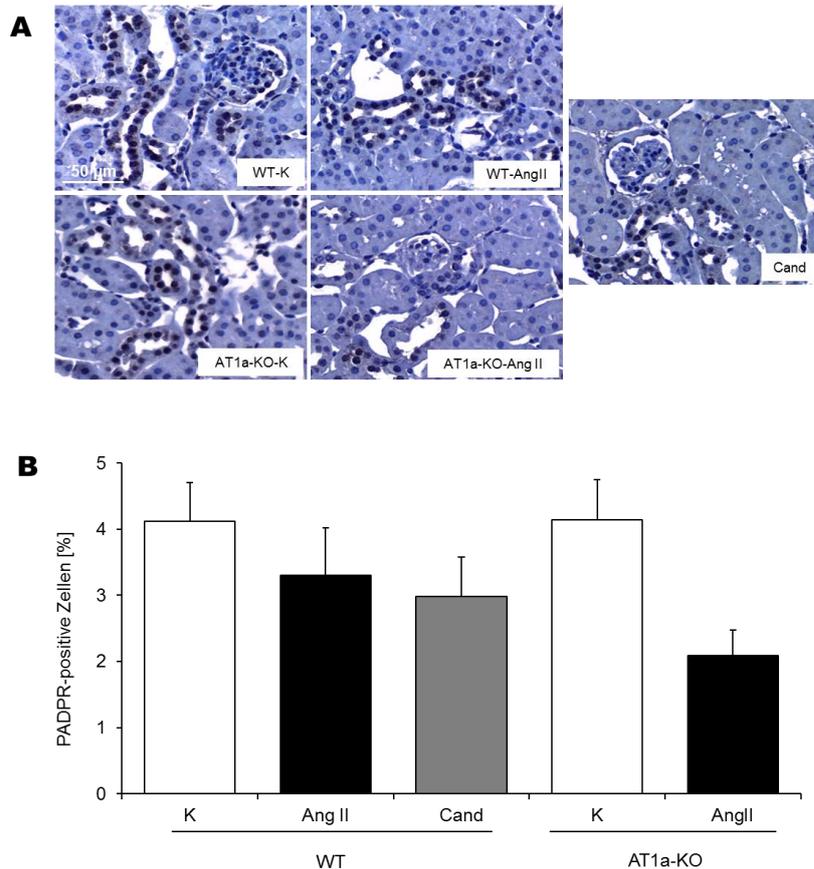


Abb. 29: Nachweis des DNA-Reparaturmarkers PADPR. (A) Immunhistochemischer Nachweis auf Paraffinschnitten der Niere. **(B)** Quantifizierung erfolgte durch Auswertung von 8 Gesichtsfeldern mittels Bestimmung der Gesamtkernanzahl über das Auswertungsprogramm CellProfiler [130] und der Bestimmung der Anzahl an positiven Zellkernen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. WT-AngII: n=6, andere Gruppen: n=8

4.1.9.3 Screening von Genen, welche die DNA-Reparatur beeinflussen

Mittels eines qRT-PCR-Arrays (3.2.11.5) wurde anschließend mit aus der Niere isolierter RNA ein breites Screening nach veränderter Expression von solchen Genen durchgeführt, die mit DNA-Reparaturprozessen und oxidativem Stress in Zusammenhang stehen. Die PCR-Analyse zeigte, dass von den 96 Genen nur 69 den Qualitätskriterien entsprachen. Somit wurden nur die Amplifikate berücksichtigt, die den Schwellenwertzyklus vor dem 35. Zyklus erreichten und eine spezifische

Ergebnisse

Schmelzkurve lieferten. Von diesen 69 Genen konnte AngII in wildtypischen Mäusen 7 % der Gene hochregulieren und 2 % der Gene herunter regulieren. 91% der Gene zeigten keine oder nur eine schwache Regulierung.

Vergleicht man WT-Kontrollmäuse mit Kontrollmäusen der AT1a-KO-Gruppe, zeigten hierbei ebenfalls 8 % der Gene eine höhere Expression, 2 % eine geringere, und 90 % der Gene waren nur schwach oder gar nicht verändert. Von den 96 untersuchten Genen sind in Abb. 31 und im Anhang nur diejenigen gezeigt, deren Amplifikate die Qualitätskriterien erfüllten. Die Expression von einigen stark regulierten Genen wurde anschließend in qRT-PCR-Analysen verifiziert. Es wurden Gene untersucht, die bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, bei der BER oder NER eine Rolle spielen.

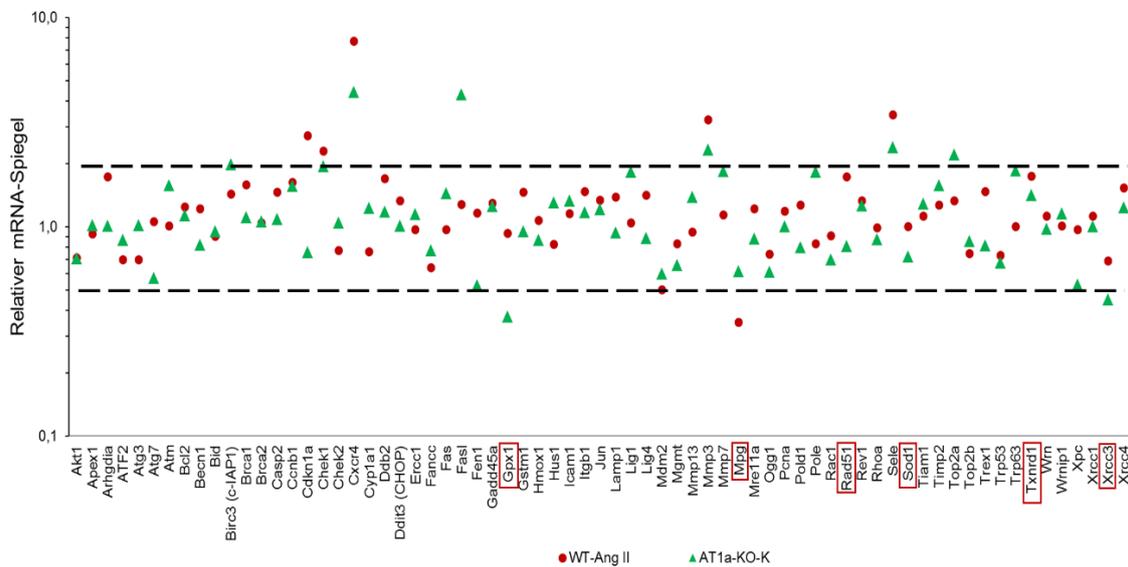


Abb. 30: 96-Gen qRT-PCR-Array-Screening von RNA, die aus Nieren isoliert wurde. Die cDNA von jeweils 8-10 Tieren wurde zu gleichen Anteilen gemischt und anschließend mittels Real-Time-RT-PCR analysiert (n=1). Dargestellt sind die WT- AngII sowie die AT1a-KO-K-Gruppen relativ zur WT-Kontrollgruppe. Es sind ausschließlich die relativen mRNA-Spiegel derjenigen Gene dargestellt, die die Qualitätskriterien erfüllten. WT-AngII: Wildtyp-Angiotensin II, AT1a-KO-K: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout-Kontrolle

Die Überprüfung der veränderte mRNA-Expression gefunden im PCR-Array konnte nur teilweise verifiziert werden. Während AngII in wildtypischen Mäusen keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der drei untersuchten Reparatur-Gene besitzt, führte ein Fehlen des AT1a-Rezeptors zu einer tendenziellen Verminderung der mRNA-Menge von *RAD51*, *Mpg* und *Xrcc3*. Wird diesen Tieren AngII verabreicht, stieg die Expression dieser mRNAs wieder tendenziell an. Durch Behandlung von AngII-infundierten Mäusen mit Cand waren die

Ergebnisse

mRNAs für *RAD51* und *Mpg* leicht unterexprimiert, es gab jedoch keine Veränderung hinsichtlich des *Xrcc3*-mRNA-Gehaltes (Abb. 31).

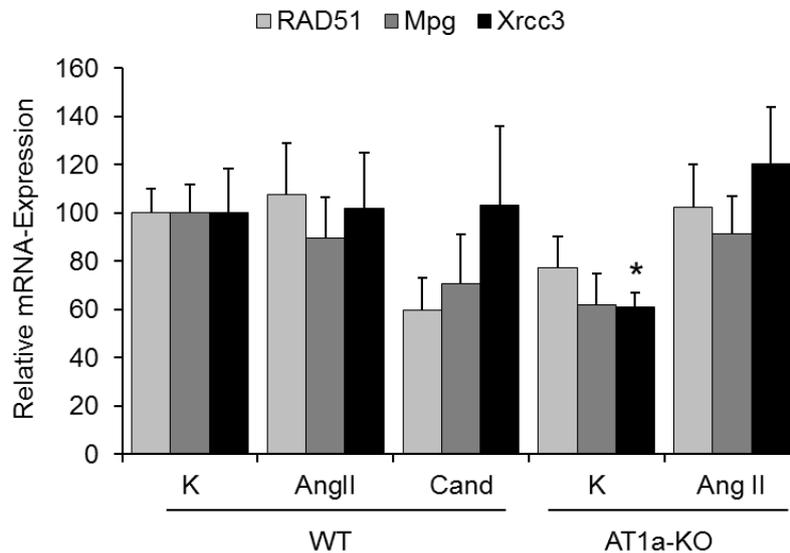


Abb. 31: Verifizierung der mRNA-Expressionen des PCR-Array-Screenings. Relative Quantifizierung der Expression von *RAD51*, *Mpg* und *Xrcc3* im Nierengewebe, normalisiert auf das Referenzgen *Gapdh*. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; WT-AngII: $n=6$, andere Gruppen: $n=8$.

4.1.10 Expression der Komponenten des RAS in der Niere

Ob ein erhöhter AngII-Spiegel bzw. das Fehlen des AT1aR Einfluss auf die Komponenten des intrarenalen RAS hat, wurde die Expression von Angiotensinogen (AGT), Renin (Ren), dem Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) und der beiden AT1-Rezeptoren, AT1aR und AT1bR, mit Hilfe der qRT-PCR überprüft.

In WT-AngII-Mäusen wurde die AGT-Expression nicht beeinflusst, jedoch führte eine Blockade des AT1R mit Cand zwar zu einer signifikanten Herabregulierung des AGT-Gens, jedoch aufgrund der Qualitätskriterien (biologisch relevante Hochregulierung wenn mindestens das >2 x Produkt im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde, bzw. weniger als die Hälfte (<0,5 x)) nur tendenziell. Ebenso führte ein Fehlen des AT1aR zu einer eher verminderten AGT-Expression (Abb. 32 A). Durch AngII wurde die Ren-Expression in der WT-Gruppe im Vergleich zur WT-Kontroll-Gruppe signifikant reduziert. Eine Intervention mit Cand führte zu einer 4-fach höheren Expression des Ren-Gens. AT1a-KO-Kontrollmäuse wiesen ebenfalls gegenüber der WT-K-Gruppe eine fast 5-fach höhere Ren-Expression auf, welche durch AngII-Infusion in der KO-Gruppe signifikant

Ergebnisse

reduziert wurde (Abb. 32 B). Eine AngII-Infusion führte sowohl in WT-Mäusen, als auch in AT1a-KO-Mäusen zu einer signifikant verminderten ACE-Expression gegenüber der WT-Kontrolle. AT1a-Kontroll-Mäuse sowie Tiere der Cand-Gruppe zeigten keine Regulierung des ACE-Gens (Abb. 32 C).

Der AT1aR war eindeutig in Nieren von WT-Mäusen exprimiert, während der Verlust des Rezeptors in AT1a-KO-Mäusen bestätigt werden konnte. Allerdings konnte durch eine AngII-Behandlung keine verstärkte Expression des Rezeptors in WT-Mäusen beobachtet werden. Auch die Blockade des AT1R mit Cand zeigte kein verändertes Expressionsmuster des AT1aR im Vergleich zur WT-K-Gruppe (Abb. 32 D). Ein Verlust des AT1aR hatte jedoch eine, gegenüber der WT-K-Gruppe, signifikante, 2,5-3-fach höhere Expression des AT1b-R zur Folge (Abb. 32 E).

Ergebnisse

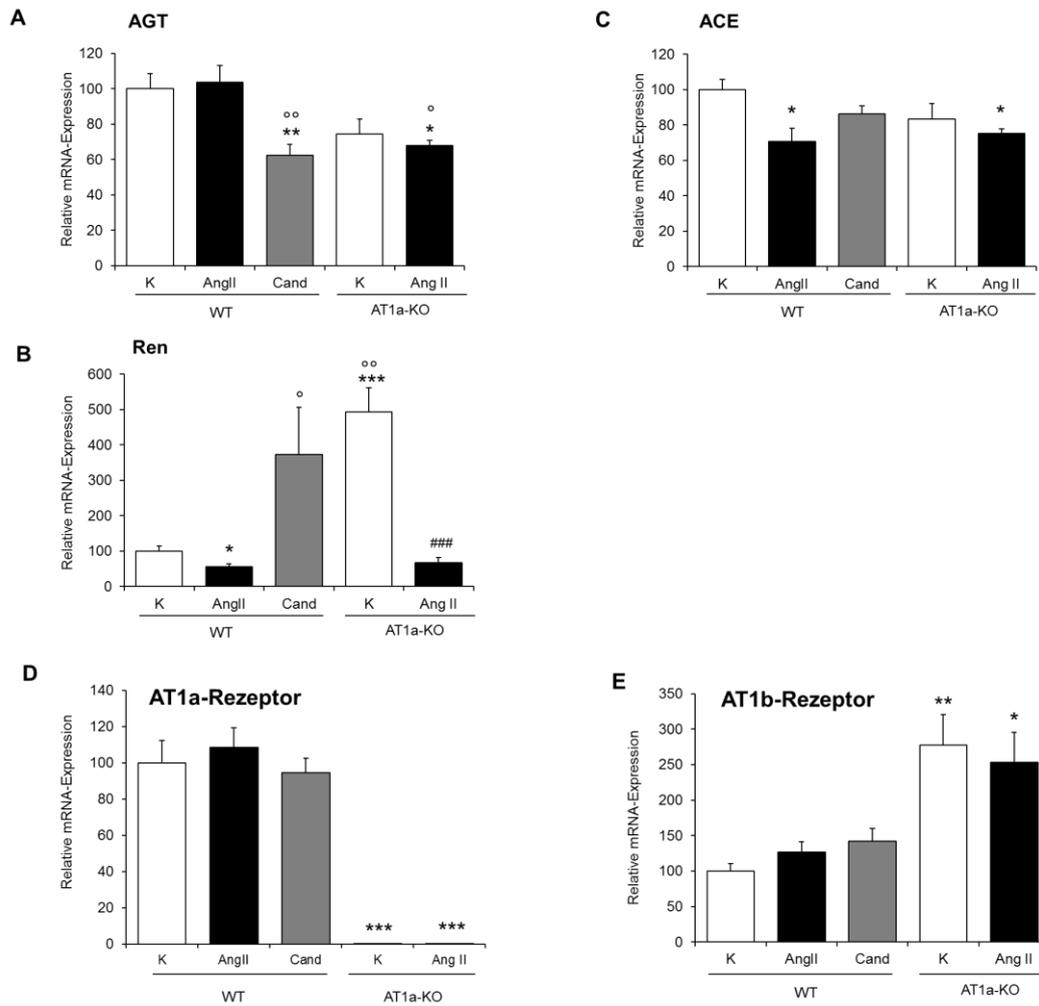


Abb. 32: Relative Quantifizierung der Transkripte von (A) Angiotensinogen (AGT), (B) Renin (Ren), (C) Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE), (D) AT1a-Rezeptor und (E) AT1b-Rezeptor im Nierengewebe von WT- und AT1a-KO-Mäusen. Die Daten sind entweder auf das Referenzgen *Gapdh* (A)-(C) oder auf das Referenzgen *Rplp0* (D)-(E) normalisiert. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, AT1a-KO: Angiotensin II Typ 1a-Rezeptor-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II, Cand: Candesartan. *** $p < 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; ° $p \leq 0,01$, ° $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; ### $p < 0,001$ vs. AT1a-KO-K; WT-AngII: $n=6$, andere Gruppen: $n=8$.

4.2 Versuche zur Identifikation der möglichen Beteiligung von NADPH-Oxidase-Untereinheiten an der Entstehung AngII-vermittelter DNA-Schäden

Das Enzym, welches für AngII-vermittelte oxidative DNA-Schäden höchstwahrscheinlich verantwortlich ist, ist die NADPH-Oxidase [114]–[116]. Um zu klären, ob eine bestimmte Untereinheit für die Auslösung dieser Schäden verantwortlich ist, wurde mit Tieren gearbeitet, die entweder Nox4- oder Nox2-defizient waren (s. 3.2.3).

4.2.1 Beteiligung der NADPH-Oxidase 4 (Nox4) an genomischen Schäden

Aus *in vitro*-Studien war bekannt, dass Nox4 in der Entstehung von AngII-induziertem DNA-Schaden eine große Rolle spielt [117]. Außerdem ist Nox4 eine überwiegend in der Niere vorkommende Isoform und ist, im Gegensatz zu anderen Isoformen, konstitutiv exprimiert [146]. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob auch *in vivo* ein Fehlen der Nox4 eine AngII-vermittelte ROS-Produktion und DNA-Schäden in Niere und im kardiovaskulärem Gewebe verhindern kann.

4.2.1.1 Das Fehlen von Nox4 hat keinen Einfluss auf den Blutdruck

AngII führte sehr rasch, und zwar ab dem dritten Tag nach Implantation der osmotischen Minipumpe, sowohl in der WT-Gruppe, als auch in der Nox4-KO-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg des Blutdruckes im Vergleich zur jeweiligen Kontroll-Gruppe. Bis auf den 13. Messtag lag der Blutdruck in der Nox4-KO-AngII-Gruppe immer leicht unter dem der WT-AngII-Gruppe. Innerhalb der vier Gruppen lag der höchste Wert am Ende des Versuchs bei 194 +/- 4 mmHg in der WT-AngII-Gruppe (Abb. 33).

Ergebnisse

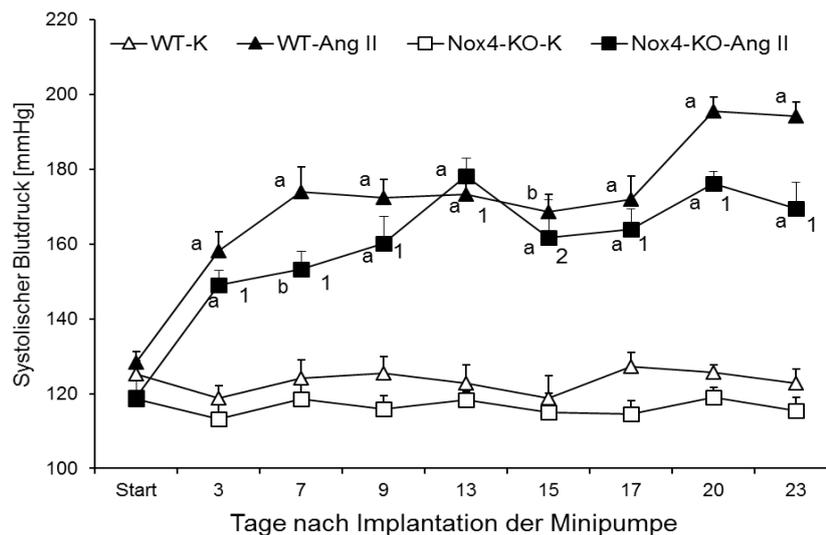


Abb. 33: Entwicklung des systolischen Blutdruckes [mmHg] in AngII-infundierten Mäusen über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Blutdruckwerte wurden nicht-invasiv ermittelt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT-K: Wildtyp-Kontrolle, WT-AngII: Wildtyp-Angiotensin II, Nox4-KO-K: NADPH-Oxidase 4-Knockout-Kontrolle, Nox4-KO-AngII: NADPH-Oxidase 4-Knockout-Angiotensin II. ^ap < 0,001, ^bp ≤ 0,01, vs. WT-K; ¹p < 0,001 vs. Nox4-KO-K. n=10.

4.2.1.2 Gewichtsparameter

Die Auswertung der klinischen Parameter, wie Körpergewicht, sowie Nieren- und Herzgewicht, zeigt, wie auch schon im vorherigen Versuch, dass die mit AngII behandelte Mäuse im Vergleich zu WT-K-Mäusen ein signifikant niedrigeres Körpergewicht besaßen. Das relative Nierengewicht war in allen Gruppen etwa gleich. In WT-Mäusen stieg das Herzgewicht durch AngII wieder signifikant an während Nox4-KO-Mäuse trotz AngII-Infusion ein mit WT-Kontrolltieren vergleichbares relatives Herzgewicht besaßen (Tab. 23).

Tab. 23: Übersicht über klinische Parameter in AngII-infundierten Mäusen nach 28-tägiger Behandlung der Tiere. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. ***p < 0,01, **p ≤ 0,01 vs. WT-K; ###p < 0,001, ##p ≤ 0,01 vs. Nox4-KO-K; n=10

	WT		Nox4-KO	
	K	AngII	K	AngII
Körpergewicht [g]	31,1 ± 0,2	28,6 ± 0,3**/###	31,1 ± 0,5	27,7 ± 0,6***/###
Relatives Nierengewicht [%]	6,6 ± 0,3	6,8 ± 0,4	6,1 ± 0,2	6,0 ± 0,2
Relatives Herzgewicht [%]	6,9 ± 0,2	8,7 ± 0,3**	6,5 ± 0,4	7,0 ± 0,5

Ergebnisse

4.2.1.3 Nierenfunktionsparameter

Als Nierenfunktionsparameter wurden die beiden Biomarker Albumin und Kreatinin herangezogen. Diese wurden beide nur am Ende des Versuchs im Urin und im Serum bestimmt, da der vorherige Versuch zeigte, dass vor Beginn des Versuches keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar waren und die Kontrollen der WT- und Nox4-KO-Tiere außerdem nicht signifikant unterschiedlich waren. Die Kreatinin-Ausscheidung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen, jedoch war die Kreatinin-Clearance in beiden Nox4-KO-Gruppen leicht verschlechtert (s. Tab. 24).

In Abb. 34 ist die Albumin/Kreatinin-Ratio (ACR) dargestellt. Durch AngII-Behandlung stieg die ACR signifikant sowohl in WT-Mäusen, als auch in Nox4-KO-Mäusen an. In der Nox4-KO-Gruppe war die ACR jedoch signifikant niedriger als in der WT-AngII-Gruppe.

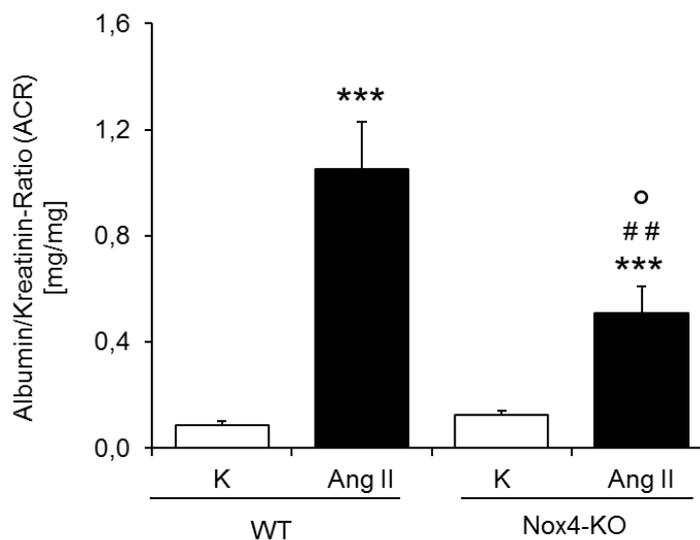


Abb. 34: Bestimmung von Albumin und Kreatinin im Urin mittels ELISA. Albumin/Kreatinin-Ratio (ACR) im Urin von AngII-infundierten Mäusen nach 28-tägiger Behandlung. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. *** $p < 0,001$ vs. WT-K; ° $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; ## $p \leq 0,01$ vs. Nox4-KO-K. $n=10$.

Ergebnisse

Tab. 24: Übersicht über Parameter der Nierenfunktion. Diese wurden im Urin und Serum nach 28-tägiger Behandlung bestimmt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. *** $p < 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; °°° $p < 0,001$, ° $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; ### $p < 0,001$, ## $p \leq 0,01$ vs. Nox4-KO-K. n=10.

	WT		Nox4-KO	
	K	AngII	K	AngII
Körpergewicht [g]	31,1 ± 0,2	28,6 ± 0,5**/###	31,1 ± 0,5	27,7 ± 0,6***/###
Harnvolumen [ml]	1,8 ± 0,5	3,4 ± 0,6*	1,6 ± 0,3	4,0 ± 0,6 **
Kreatinin-Clearance [ml/min]	5,0 ± 1,0	5,0 ± 1,3	3,2 ± 0,7	3,1 ± 0,3
Kreatininausscheidung [mg/20h]	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,08	0,7 ± 0,09
Albuminausscheidung [µg/20h]	64 ± 16	827 ± 159***	78 ± 15°°°	363 ± 73**/##/°

4.2.1.4 Histopathologische Veränderungen des Gefäßsystems in der WT- und Nox4-KO-Maus

AngII führte in der WT- und in der Nox4-KO-Gruppe zu einer morphologischen Veränderung der Gefäße. Außerdem konnte durch AngII eine Verdickung der Gefäße signifikant gegenüber der WT-K-Gruppe beobachtet werden. Wie erwartet, war die Beschaffenheit der Gefäße von Kontrolltieren, die nicht mit AngII behandelt wurden, unverändert. Die histopathologische Untersuchung hinsichtlich des GSI/MSI und des TSI konnte aufgrund von unerklärbar hohen Werten der WT-Kontrollen nicht durchgeführt werden.

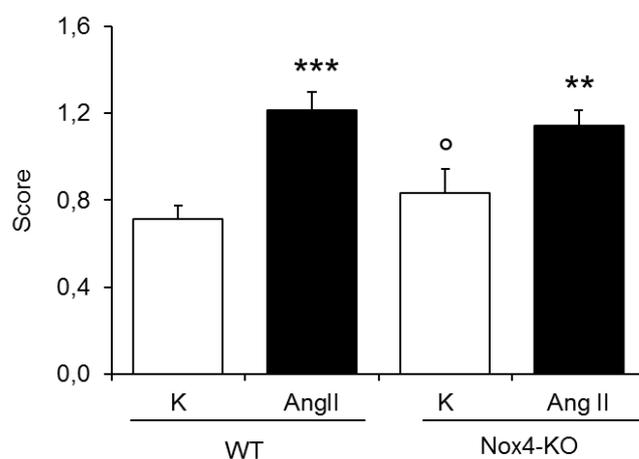


Abb. 35: Semiquantitative Auswertung des VSI. Auswertung mit Hilfe der verschiedenen Schädigungsscores (3.2.10.2). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. *** $p < 0,001$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT-K; ° $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; n=10.

Ergebnisse

4.2.1.5 Oxidativer Stress-angestoßt durch AngII

Da ein *in vitro*-Knockout der Nox4 zu einer verminderten Stressantwort auf AngII führte, sollte dies auch *in vivo* überprüft werden. Deshalb wurden der oxidative Stressmarker 15-Isoprostan F_{2t} im Urin untersucht, die Bildung von ROS in der Niere und im Herzen überprüft, sowie die Expression der Nox2 auf mRNA-Ebene im Nierengewebe.

4.2.1.5.1 Erhöhte 15-Isoprostan F_{2t}-Ausscheidung durch AngII

Zunächst wurde der Biomarker 15- Isoprostan F_{2t} für Lipidperoxidation im Urin bestimmt und auf die im Urin gemessenen Kreatinin-Werte normalisiert. AngII führte in WT und Nox4-KO-Mäusen jeweils zu einer signifikant erhöhten 15-Isoprostan F_{2t}-Ausscheidung im Urin.

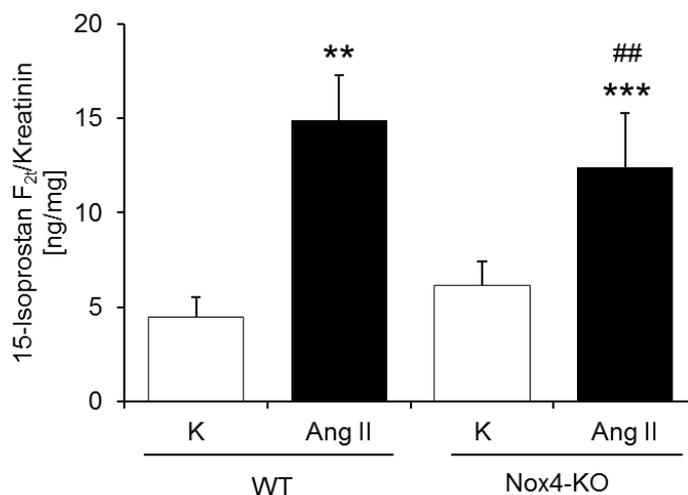


Abb. 36: Bestimmung von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin am Ende des Versuches. Gezeigt sind 15-Isoprostan F_{2t}-Konzentrationen, normalisiert auf Kreatinin. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. ***p < 0,001, **p ≤ 0,01 vs. WT-K; ###p ≤ 0,01 vs. Nox4-KO-K; n=10

4.2.1.5.2 Trotz Fehlen von Nox4 kommt es zur Bildung von ROS

Auf Gefrierschnitten der Niere und des Herzens wurde mit dem ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff DHE die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies untersucht. Wie in Abb. 37 A zu sehen, war die Fluoreszenzintensität, also auch die Produktion von ROS in der Niere durch eine AngII-Behandlung in WT und Nox4-KO-Mäusen signifikant gegenüber der WT-K erhöht, was auch die quantitative Auswertung in Abb. 37 B verifizieren konnte. In der Niere zeigten

Ergebnisse

Nox4-KO-K-Mäuse keine erhöhte ROS-Bildung, was im Herzen jedoch anders aussah. Hier war die Menge an ROS auch schon basal in den KO-Tieren erhöht. Eine AngII-Behandlung führte, wie erwartet, in WT-Mäusen zu einer gesteigerten ROS-Produktion. Allerdings war AngII in Nox4-KO-Mäusen nicht in der Lage die Menge an basal schon gebildetem ROS noch weiter zu erhöhen (Abb. 38 A, B).

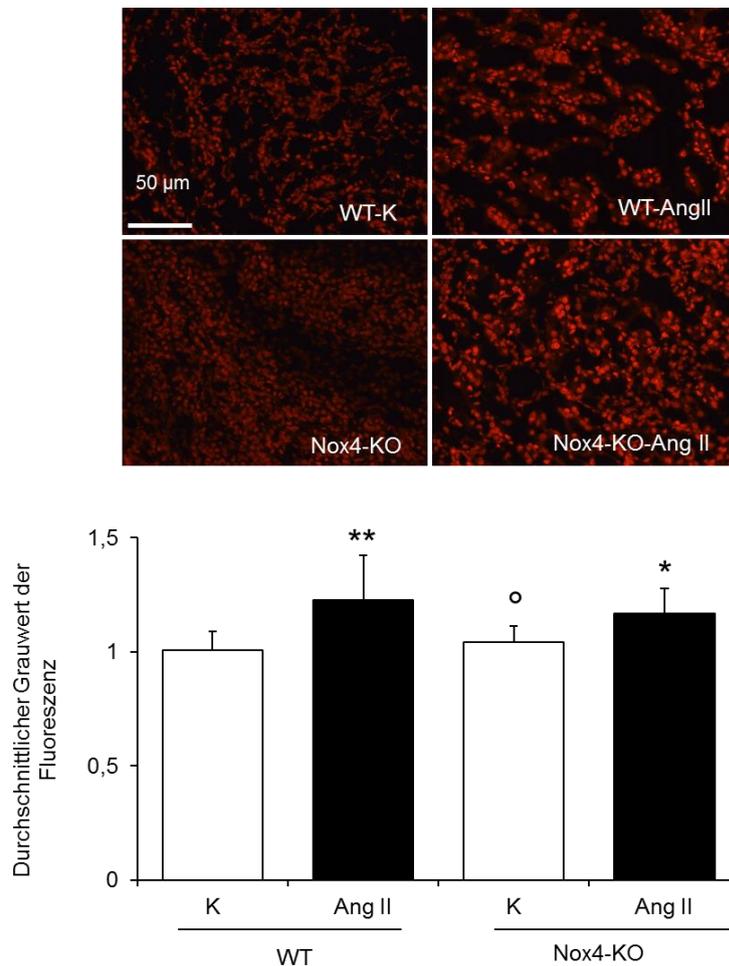


Abb. 37: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. (A) Visualisierung erfolgte auf Gefrierschnitten der Niere mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffes DHE, 200-fache Vergrößerung. **(B)** Quantifizierung der Fluoreszenz durch Messung des Grauwertes von 7 Gesichtsfeldern mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes Cell Profiler [130]. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; ° $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; n=10.

Ergebnisse

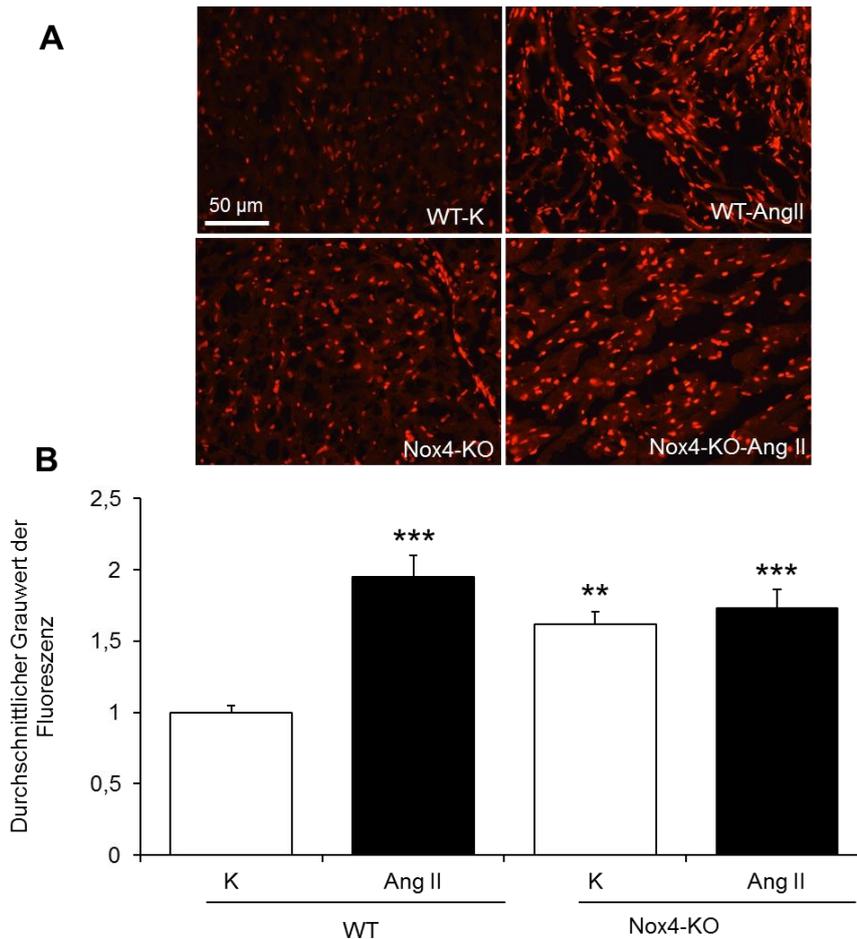


Abb. 38: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. (A) Visualisierung erfolgte auf Gefrierschnitten des Herzens mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffes DHE, 200-fache Vergrößerung. **(B)** Quantifizierung der Fluoreszenz durch Messung des Grauwertes von 7 Gesichtsfeldern mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes Cell Profiler [130]. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. *** $p < 0,001$, ** $p \leq 0,01$, vs. WT-K; $n=10$.

4.2.1.5.3 Nox2 kompensiert nicht das Fehlen von Nox4

Aufgrund der vermehrten Produktion von ROS in der Niere in der Nox4-KO-AngII-Maus wurde als nächstes untersucht ob die Isoform der Nox2 möglicherweise eine Rolle für den erhöhten Spiegel an ROS spielt. Hierfür wurden zum einen die Expression der Nox2 und der Nox4 auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR untersucht (Abb. 39 A,B), zum anderen aber auch die Expression der p47^{phox} auf Proteinebene (Abb. 39 C). Es wurde ebenfalls versucht die Expression von Nox1 nachzuprüfen, jedoch war diese in der Niere kaum exprimiert, so dass keine Daten dazu erfasst werden konnten. Nox2 und Nox4 mRNA waren in Nieren von AngII-behandelten WT-Mäusen nicht verändert. Die Nox2-Expression in Nox4-KO-K-Mäusen war zwar signifikant verringert und AngII führte zu einer signifikanten Erhöhung dieser Isoform in Nox4-KO-Tieren,

Ergebnisse

jedoch kann hierbei aufgrund der Ausschlusskriterien für eine qPCR eine biologische Relevanz ausgeschlossen werden (biologisch relevante Hochregulierung gilt nur, wenn mindestens das >2 x Produkt im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde, bzw. weniger als die Hälfte (<0,5 x)). Die Expression der p47^{phox}-Untereinheit war im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen in beiden mit AngII behandelten Gruppen leicht verringert.

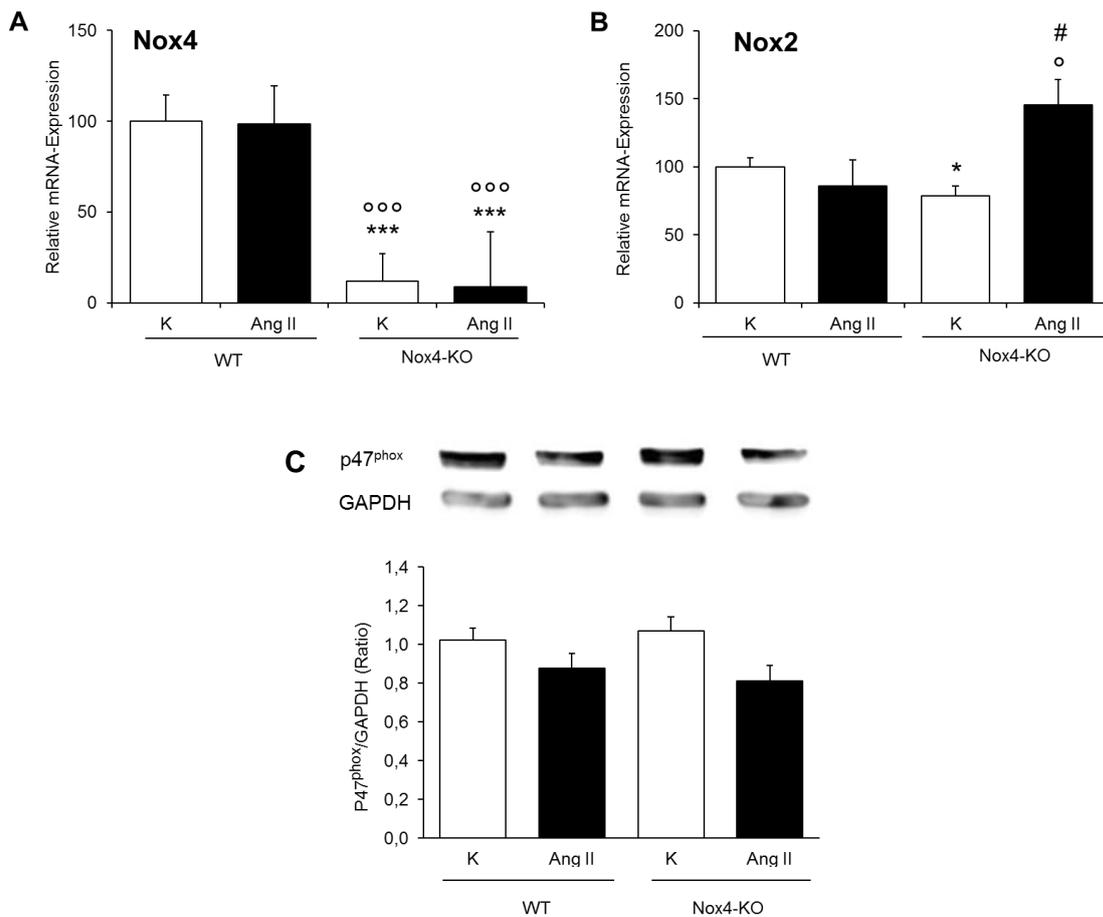


Abb. 39: Relative Quantifizierung der Transkripte von (A) Nox4 und (B) Nox2 im Nierengewebe. Die Daten sind auf das Housekeeping-Gen *Rplp0* normalisiert. **(C) Repräsentativer Western Blot, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots, zur Expression der Nox-Isoform p47^{phox}, normiert auf das Referenzprotein GAPDH.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. ***p < 0,001, *p ≤ 0,05 vs. WT-K; °°°p < 0,001 vs. WT-AngII, #p ≤ 0,05 vs. Nox4-KO-K

Ergebnisse

4.2.1.6 Antioxidatives Abwehrsystem in Nox4-KO-Tieren

Da die Untersuchungen der Nox4-KO-Tiere auf die Entstehung oxidativen Stresses während einer AngII-Behandlung positiv waren, wurde im nächsten Schritt überprüft wie sich das Fehlen dieser Isoform auf das antioxidative Abwehrsystem in der Niere auswirkt. Dazu wurde die Expression der Enzyme γ -GCLC, HO1 und SOD1 auf Proteinebene untersucht. Es zeigte sich, dass in Nox4-KO-Mäusen nur eine veränderte Expression des HO1-Proteins nachgewiesen werden konnte, während die Expression der γ -GCLC und der SOD1 keine bzw. nur minimale Veränderungen zeigte (Abb. 40).

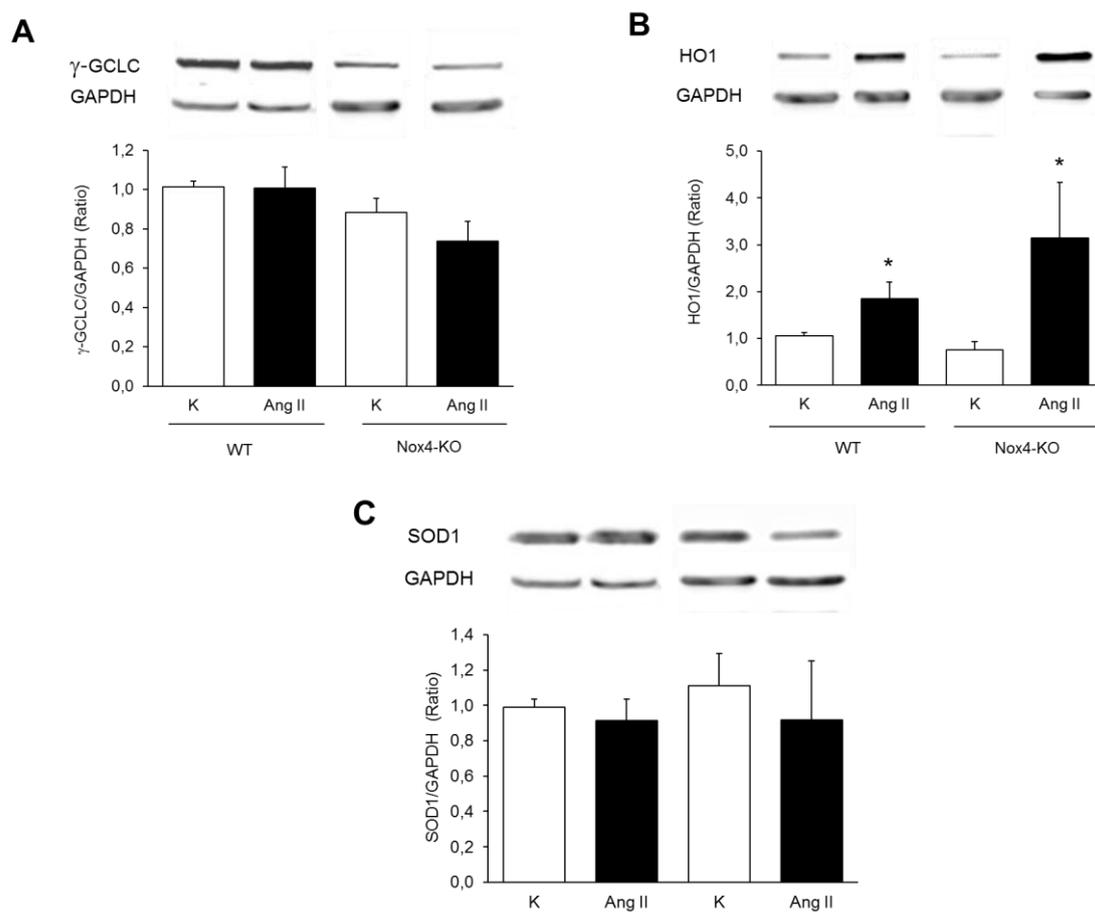


Abb. 40: Repräsentative Western Blots, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots, zur Expression antioxidativer Enzyme, jeweils auf das Referenzprotein GAPDH normiert. (A) γ -GCLC, (B) HO1, (C) SOD1. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ [131]. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; $n=10$.

Ergebnisse

4.2.1.7 Entstehung von DNA-Schäden

Ob Einzel- und Doppelstrangbrüche in der Niere durch oxidativen Stress entstanden sind, wurde sowohl mittels Comet Assay als auch mit dem Nachweis des Doppelstrangbruchmarkers γ -H2AX, untersucht.

4.2.1.7.1 Erhöhte DNA-Schäden in isolierten Nierenzellen von Nox4-KO-Tieren

In isolierten Nierenzellen von WT und Nox4-KO-Mäusen wurden DNA-Schäden mit dem Comet Assay nachgewiesen (3.2.5). Obwohl es basal in Nieren von Nox4-KO-Tieren nicht zu einer gesteigerten ROS-Produktion kam, konnte dennoch ein signifikant erhöhter DNA-Schaden in Nieren dieser Tiere gefunden werden. Eine Behandlung mit AngII vermochte das Ausmaß der DNA-Schädigung allerdings nicht weiter zu steigern. Selbst wenn in diesen Tieren signifikant höhere Mengen an DNA-Schäden vorgefunden wurden, so waren diese jedoch insgesamt signifikant niedriger als die DNA-Schäden in Nierenzellen in mit AngII behandelten Mäusen (Abb. 41).

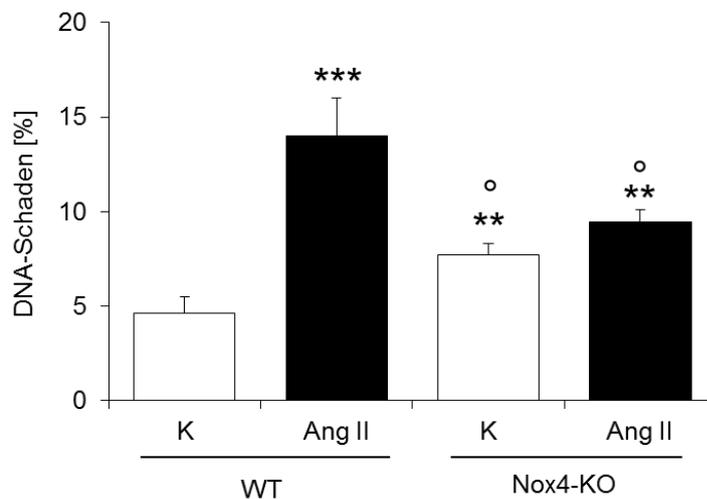


Abb. 41: DNA-Schäden in isolierten Nierenzellen von WT- und Nox4-KO-Mäusen nach 28-tägiger Behandlung, quantifiziert mit dem Comet Assay. Quantifizierung des Comet Assays erfolgte mit dem Programm Comet 5. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. *** $p < 0,001$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT-K; ° $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; $n=10$.

Ergebnisse

4.2.1.7.2 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere von Nox4-KO-Tieren

Die Ergebnisse des Comet Assays wurden mit dem Nachweis des Doppelstrangbruchmarkers γ -H2AX bestätigt. In Nox4-KO-Kontroll-Mäusen konnten wir nicht nur erhöhte DNA-Schäden im Comet Assay zeigen, sondern auch eine signifikant höhere Menge an γ -H2AX-positiven Zellkernen, wobei auch hier das Ausmaß der Anzahl an positiven Zellkernen durch AngII nicht mehr weiter gesteigert wurde. Im Gegensatz zu den Daten im Comet Assay war die Menge des Schadens in beiden Gruppen der Nox4-KO-Tiere nicht signifikant unterschiedlich von dem in AngII-behandelten WT-Tieren (Abb. 42 A, B).

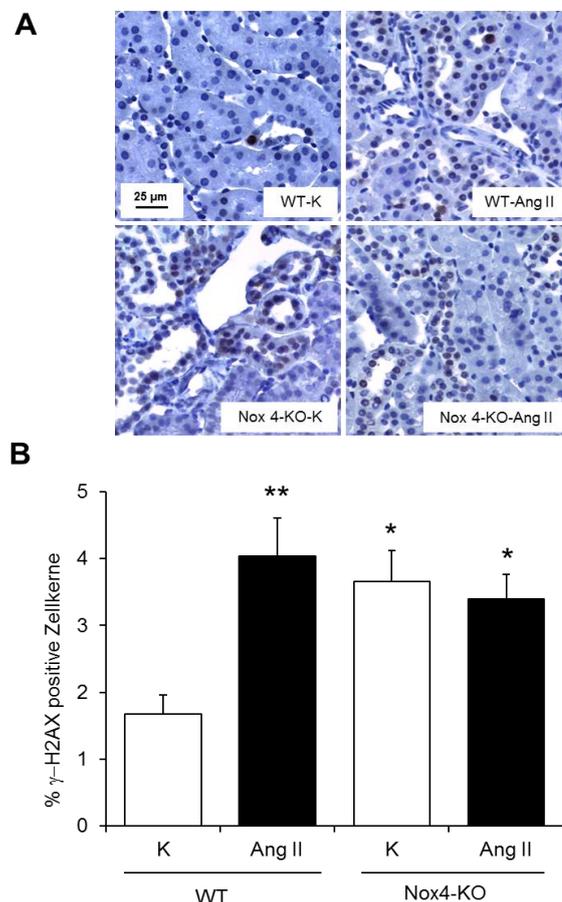


Abb. 42: Nachweis des DNA-Doppelstrangbruchmarkers γ -H2AX. (A) Immunhistochemischer Nachweis auf Paraffinschnitten der Niere. **(B)** Quantifizierung erfolgte durch Auswertung von 8 Gesichtsfeldern mittels Bestimmung der Gesamtkernanzahl über das Auswertungsprogramm CellProfiler [130] und der Bestimmung der Anzahl an positiven Zellkernen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox4-KO: NADPH-Oxidase 4-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; n=10.

Ergebnisse

4.2.2 Beteiligung der NADPH-Oxidase 2 (Nox2) an genomischen Schäden

Da die Untersuchungen an der Nox4-Knockout-Maus nicht auf eine Schädigung durch die Nox4-Isoform alleine schließen lassen, wurde zuletzt der Beitrag der Nox2-Isoform an AngII-induzierten genomischen Schäden untersucht.

4.2.2.1 Das Fehlen von Nox2 hat keinen Einfluss auf den Blutdruck

AngII führte ab dem zweiten Tag nach Implantation der osmotischen Minipumpe, sowohl in der WT-Gruppe, als auch in der Nox2-KO-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg des Blutdruckes im Vergleich zur jeweiligen Kontroll-Gruppe. Innerhalb der vier Gruppen lag der höchste Wert am Ende des Versuchs bei 183 ± 4 mmHg in der WT-AngII-Gruppe.

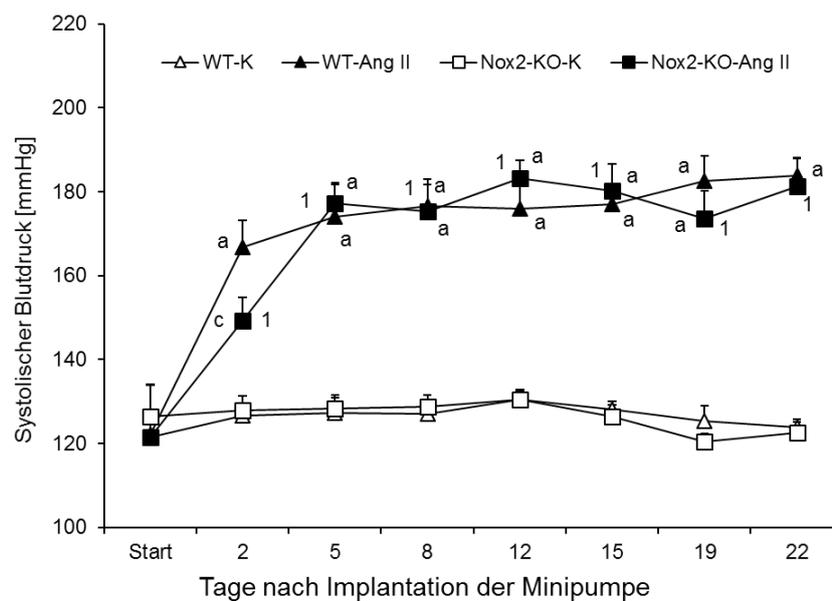


Abb. 43: Entwicklung des systolischen Blutdruckes [mmHg] in AngII-infundierten Mäusen über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Blutdruckwerte wurden nicht-invasiv ermittelt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT-K: Wildtyp-Kontrolle, WT-AngII: Wildtyp-Angiotensin II, Nox2-KO-K: NADPH-Oxidase 2 Knockout-Kontrolle, Nox2-KO-AngII: NADPH-Oxidase 2 Knockout-Angiotensin II. ^a $p < 0,001$, ^c $p \leq 0,05$, vs. WT-K; ¹ $p < 0,001$ vs. Nox2-KO-K; WT: n=5, Nox2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7.

Ergebnisse

4.2.2.2 Gewichtsparemeter

Die Auswertung der klinischen Parameter, wie Körpergewicht sowie Nieren- und Herzgewicht, zeigen, dass sowohl WT-Mäuse, als auch Nox2-KO-Mäuse, die mit AngII behandelt wurden, im Vergleich zu WT-K-Mäusen und letztere auch im Vergleich zu den unbehandelten Nox2-KO-Mäusen ein signifikant niedrigeres Körpergewicht haben. Nox2-KO-Mäuse waren dagegen auch signifikant schwerer als die WT-Kontrollen. Das Nierengewicht war in allen in Gruppen etwa gleich. Das Herzgewicht stieg in WT-Mäusen durch AngII an, in Nox2-KO-Mäusen kam es zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der WT-K- und Nox2-KO-K-Gruppe (Tab. 25).

Tab. 25: Übersicht über klinische Parameter in AngII-infundierten Mäusen nach 28-tägiger Behandlung. *** $p < 0,01$, ** $p \leq 0,01$ vs. WT-K; ## $p \leq 0,01$ vs. Nox2-KO-K; Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox2-KO: NADPH-Oxidase 2 Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. WT: n=5, Nox2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

	WT		Nox2-KO	
	K	AngII	K	AngII
Körpergewicht [g]	28,6 ± 0,4	24,7 ± 0,3***	31,4 ± 0,7**	26,1 ± 0,2**/##
Relatives Nierengewicht [%]	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,2 ± 0,2	6,3 ± 0,2
Relatives Herzgewicht [%]	5,7 ± 0,1	6,9 ± 0,2	5,6 ± 0,2	7,2 ± 0,4**/##

4.2.2.3 Nierenfunktionsparameter

Als Nierenfunktionsparameter wurden die beiden Biomarker Albumin und Kreatinin herangezogen. Diese wurden beide am Ende des Versuchs in Urin und Serum bestimmt. Das über den Urin ausgeschiedene Kreatinin war in Nox2-KO-K-Mäusen leicht gegenüber der WT-K-Gruppe erhöht, gleichzeitig war in der KO-Gruppe auch die Kreatinin-Clearance am höchsten. Durch eine Behandlung mit AngII wurde in der WT- und Nox2-KO-Gruppe ein stark erhöhter Albumingehalt im Urin nachgewiesen (Tab. 26). In Abb. 44 ist die Albumin/Kreatinin-Ratio (ACR) dargestellt. Durch AngII-Behandlung stieg die ACR signifikant in WT- sowie in Nox2-KO-Mäusen an.

Ergebnisse

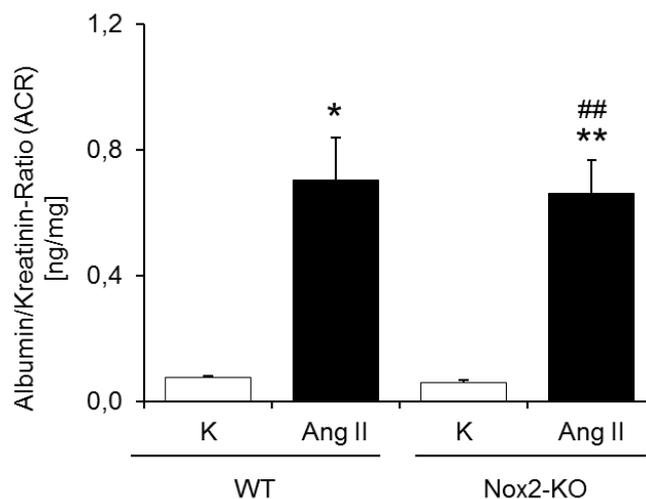


Abb. 44: Bestimmung von Albumin und Kreatinin im Urin mittels ELISA. Albumin/Kreatinin-Ratio (ACR) im Urin von AngII-infundierten Mäusen am Ende des Versuches. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler WT: Wildtyp, Nox2-KO: NADPH-Oxidase 2 Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. **p ≤ 0,01, *p ≤ 0,05 vs. WT-K; ##p ≤ 0,01 vs. Nox2-KO-K;

Tab. 26: Übersicht über Urinparameter der Nierenfunktion in AngII-infundierten Mäusen am Ende des Versuches. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler WT: Wildtyp, Nox2-KO: NADPH-Oxidase 2 Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. **p ≤ 0,01, *p ≤ 0,05 vs. WT-K, °p ≤ 0,05 vs. WT-AngII ##p ≤ 0,01 vs. Nox2-KO-K; WT: n=5, Nox2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

	WT		Nox2-KO	
	K	AngII	K	AngII
Körpergewicht [g]	28,6 ± 0,4	24,7 ± 0,3 ^{***}	31,4 ± 0,7 ^{**}	26,1 ± 0,2 ^{**/##}
Harnvolumen [ml]	1,4 ± 0,6	3,3 ± 1,3 [*]	1,9 ± 0,7	3,4 ± 0,3
Kreatinin-Clearance [ml/min]	2,9 ± 1,0	3,4 ± 0,7	6,3 ± 1,0	4,6 ± 0,4
Kreatininausscheidung [mg/20h]	0,5 ± 0,05	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,06
Albuminausscheidung [mg/20h]	40 ± 7	370 ± 73 ^{**}	47 ± 5	526 ± 85 ^{**/###}

Ergebnisse

4.2.2.4 Histopathologische Veränderungen des Gefäßsystems in der WT- und Nox2-KO-Maus

Wie schon in den vorherigen Experimenten gezeigt, war die Morphologie des Gefäßsystems durch AngII-Behandlung in der WT-Gruppe beeinträchtigt. Auch Nox2-KO-Tiere zeigten durch AngII-Infusion eine signifikante Veränderung hinsichtlich der Gefäßwanddicke gegenüber der WT-K-Gruppe (Abb.45).

Die histopathologische Untersuchung hinsichtlich des GSI/MSI und des TSI konnte aufgrund von unerklärbar hohen Werten der WT-Kontrollen nicht durchgeführt werden.

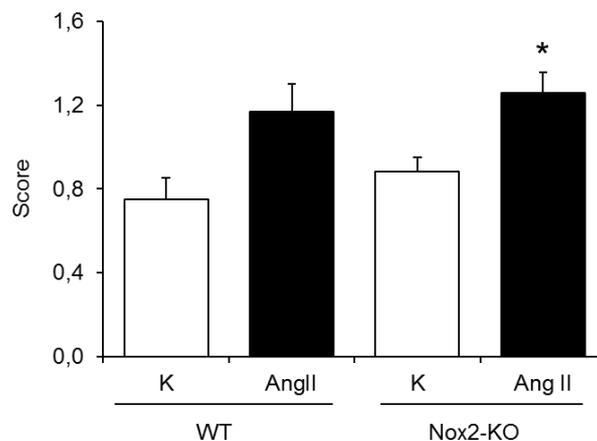


Abb. 45: Semiquantitative Auswertung des VSI. Auswertung mit Hilfe der verschiedenen Schädigungsscores (3.2.10.2). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler WT: Wildtyp, Nox2-KO: NADPH-Oxidase 2 Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; WT: n=5, Nox 2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

4.2.2.5 Oxidativer Stress – ausgelöst durch AngII

Ob ein Fehlen von Nox2 AngII-vermittelte oxidative Schäden verhindern kann, wurde mit Hilfe des im Urin vorhandenen Lipidperoxidationsmarker 15-Isoprostan F_{2t} und des Nachweises von oxidativem Stress auf Gewebeschnitten der Niere und des Herzens überprüft. Außerdem wurde eine Beteiligung der Nox4, Nox2 sowie der zytoplasmatischen Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Komplex, p47, in Nieren von Nox2-defizienten Mäusen untersucht.

Ergebnisse

4.2.2.5.1 Schutz vor Lipidperoxidation durch Nox2-Defizienz

Wie erwartet, führte AngII in WT-Mäusen verglichen mit WT-K-Mäusen zu einer erhöhten 15-Isoprostan F_{2t}-Konzentration im Urin, was einen Hinweis auf ein erhöhtes Level an oxidativem Stress gibt. Im Gegensatz zur WT-Gruppe war das 15-Isoprostan F_{2t}-Level im Urin der Tiere der Nox2-KO-AngII-Gruppe auf WT-Kontrollniveau und somit signifikant niedriger gegenüber der WT-AngII-Gruppe (Abb. 46).

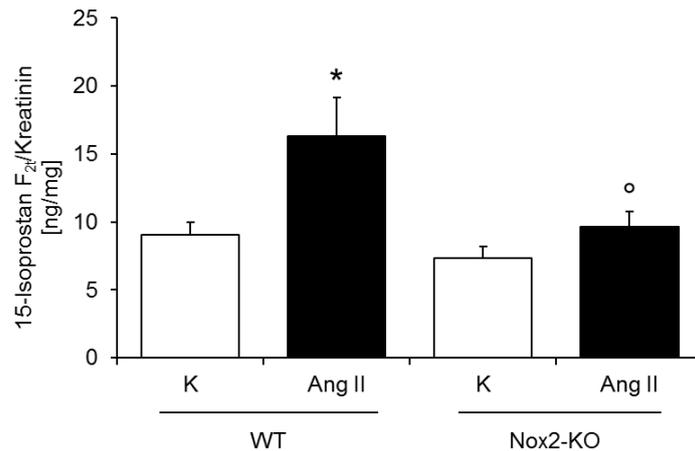


Abb. 46: Bestimmung von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin am Ende des Versuches. Dargestellt sind 15-Isoprostan F_{2t}-Konzentrationen, normalisiert auf Kreatinin. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox2-KO: NADPH-Oxidase 2 Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. *p ≤ 0,05 vs. WT-K; °p ≤ 0,05 vs. WT-AngII; WT: n=5, Nox 2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

4.2.2.5.2 Trotz Fehlen von Nox2 kommt es zur Bildung von ROS

Als nächstes wurde auf Gefrierschnitten der Niere und des Herzens die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies mit dem ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff DHE untersucht. Wie in Abb. 47 A zu sehen, war die Fluoreszenzintensität, also auch die Produktion von ROS in der Niere durch eine AngII-Behandlung in WT- und Nox2-KO-Mäusen signifikant gegenüber der WT-K erhöht, was auch die quantitative Auswertung in Abb. 47 B verifizieren konnte. In der Niere zeigten Nox2-KO-K-Mäuse keine erhöhte ROS-Bildung, was im Herzen jedoch anders aussah. Hier war die Menge an ROS auch schon basal in den KO-Tieren tendenziell erhöht. Eine AngII-Behandlung führte, wie erwartet, in den Herzen von WT-Mäusen zu einer erhöhten ROS-Bildung. In Nox2-KO-Mäusen, die mit AngII behandelt wurden, führte AngII nur noch zu einer leichten Erhöhung oxidativen Stresses im Vergleich zur Nox2-KO-Kontrollgruppe (Abb. 48 A, B).

Ergebnisse

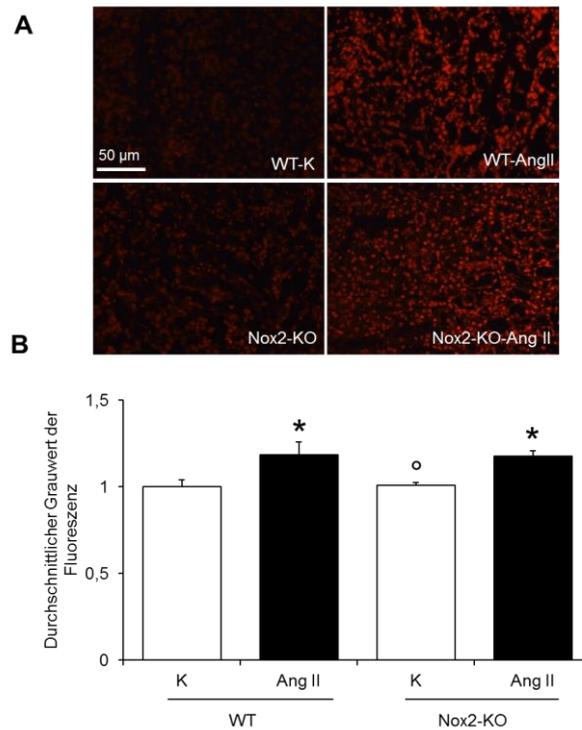


Abb. 47: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. (A) Visualisierung erfolgte auf Gefrierschnitten der Niere mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffes DHE, 200-fache Vergrößerung. **(B)** Quantifizierung der Fluoreszenz durch Messung des Grauwertes von 7 Gesichtsfeldern mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes Cell Profiler [130]. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox2-KO: NADPH-Oxidase 2 Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; $^{\circ}p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; WT: n=5, Nox 2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

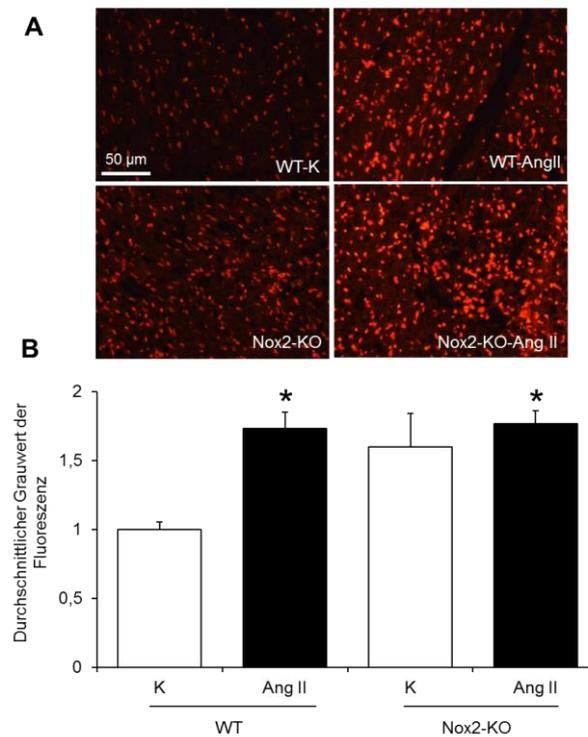


Abb. 48: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. (A) Visualisierung erfolgte auf Gefrierschnitten des Herzens mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffes DHE, 200-fache Vergrößerung. **(B)** Quantifizierung der Fluoreszenz durch Messung des Grauwertes von 7 Gesichtsfeldern mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes Cell Profiler [130]. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox2-KO: NADPH-Oxidase 2 Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; WT: n=5, Nox 2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

Ergebnisse

4.2.2.5.3 Nox4 kompensiert nicht das Fehlen von Nox2

Da ROS in Nieren von Nox2-KO-Mäusen, die mit AngII behandelt wurden, gefunden wurden, wurde überprüft ob eine andere Nox-Isoform hochreguliert ist und möglicherweise für die Auslösung oxidativen Stresses zuständig ist. Dazu wurde die Expression der Nox4-Isoform auf mRNA-Ebene im Nierengewebe überprüft, sowie die p47^{phox}-Untereinheit auf Proteinebene. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der WT-K und den beiden Nox2-KO-Gruppen bezüglich der Nox4-mRNA-Expression (Abb. 49 A). Allerdings zeigten AngII-behandelte Nox2-KO-Tiere eine signifikant niedrigere p47^{phox}-Expression im Vergleich zur WT-K-Gruppe. Aber auch schon die unbehandelten Nox2-KO-Kontrollmäuse zeigten geringere Proteinmengen der Untereinheit im Vergleich zu WT-Kontrolltieren (Abb. 49 B). Es wurde ebenfalls versucht die Expression von Nox1 nachzuprüfen, jedoch war diese in der Niere kaum exprimiert, so dass keine Daten dazu erfasst werden konnten.

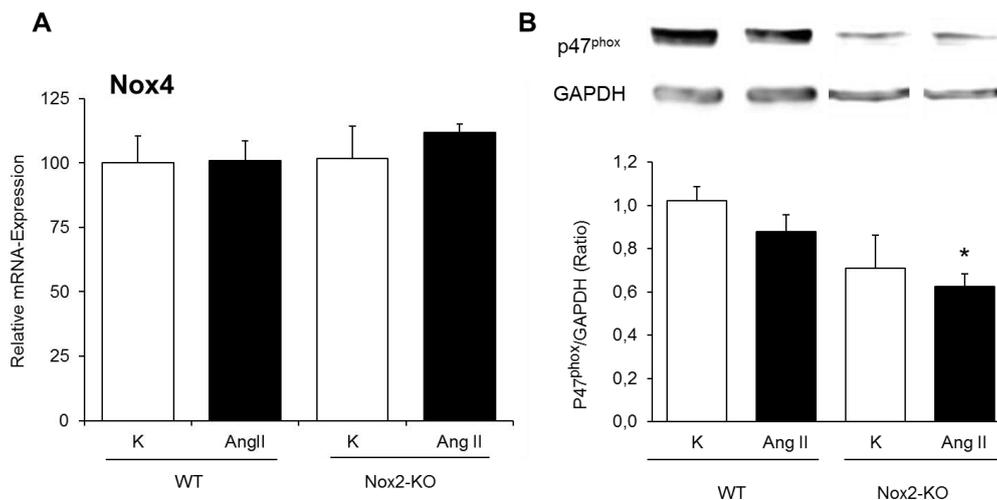


Abb. 49: (A) Relative Quantifizierung des Nox4-Transkripts im Nierengewebe. Die Daten sind auf das Referenzgen Rplp0 normalisiert. **(B) Repräsentativer Western Blot, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots, zur Expression der Nox-Isoform p47^{phox}, normiert auf das Referenzprotein GAPDH.** Gezeigt ist jeweils der Mittelwert +/- Standardfehler WT: Wildtyp, Nox2-KO: NADPH-Oxidase 2 Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. * p ≤ 0,05 vs. WT-K. WT: n=5, Nox 2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

Um den Nox2-Knockout über die gezielte Mutation im Nox2-Gen zu bestätigen, wurde die Expression der Nox2-mRNA in der Niere mit RT-PCR untersucht (3.2.11.3). Die Primer wurden so generiert, dass jeweils cDNA-Sequenzen amplifiziert wurden, die spezifisch für die WT-Maus bzw. für die Nox2-KO-Maus sind, wodurch erfolgreich eine Veränderung im Nox2-Gen gezeigt werden konnte. Hierbei erschien die Bande des intakten Nox2-Gens bei einer Größe von

Ergebnisse

240 bp, ein 195 bp großes DNA-Fragment entstand bei der Amplifikation des veränderten Nox2-Gens in Nox2-KO-Mäusen.

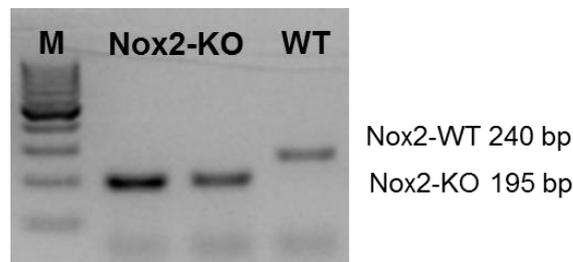


Abb. 50: Genotypisierung der Nox2-KO-Maus. Beispiel einer Genotypisierung von zwei transgenen Mäusen und einer WT-Maus. Inverse Darstellung eines 3 %-igen Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels zur Auftrennung der PCR-Produkte aus cDNA. 1kb-Leiter als Größenstandard (M).

4.2.2.6 Antioxidatives Abwehrsystem in Nox2-KO-Mäusen

Da die Untersuchungen der Nox2-KO-Tiere auf die Entstehung oxidativen Stresses während einer AngII-Behandlung positiv waren, wurde im nächsten Schritt überprüft wie sich das Fehlen dieser Isoform auf das antioxidative Abwehrsystem in der Niere auswirkt. Dazu wurde die Expression der Enzyme γ -GCLC und HO1 auf Proteinebene untersucht. Es zeigte sich, dass Nox2-KO-Mäuse keine Veränderung hinsichtlich der Expression des γ -GCLC-Proteins aufwiesen und die HO-1-Proteinexpression in der Niere beider Nox2-KO-Gruppen im Vergleich zur WT-K-Gruppe leicht reduziert war (Abb. 51).

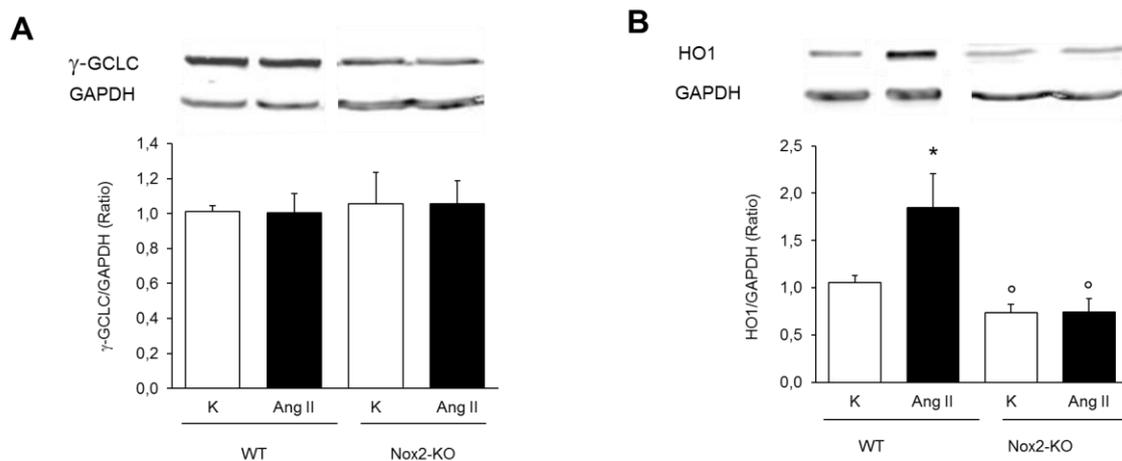


Abb. 51: Repräsentative Western Blots, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots, zur Expression antioxidativer Enzyme, jeweils auf das Referenzprotein GAPDH normiert. (A) γ -GCLC, (B) HO1. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ [131]. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; ^o $p \leq 0,05$ vs. WT-AngII; WT: n=5, Nox 2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

Ergebnisse

4.2.2.7 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere von Nox2-KO-Tieren

Auch wenn in Nieren von Nox2-KO-Kontroll-Mäusen keine gesteigerte Menge reaktiver Sauerstoffspezies gefunden wurde, konnte dennoch eine tendenziell höhere Anzahl an Zellkernen, positiv für den Doppelstrangbruchmarker γ -H2AX nachgewiesen werden. Nieren von AngII-behandelten KO-Tieren zeigten sogar eine signifikant höhere Anzahl an γ -H2AX-positiven Zellkernen. Allerdings konnte AngII das Ausmaß der DNA-Schädigung im Vergleich zur Nox2-KO-Kontrollgruppe nicht signifikant steigern (Abb. 52).

Ergebnisse

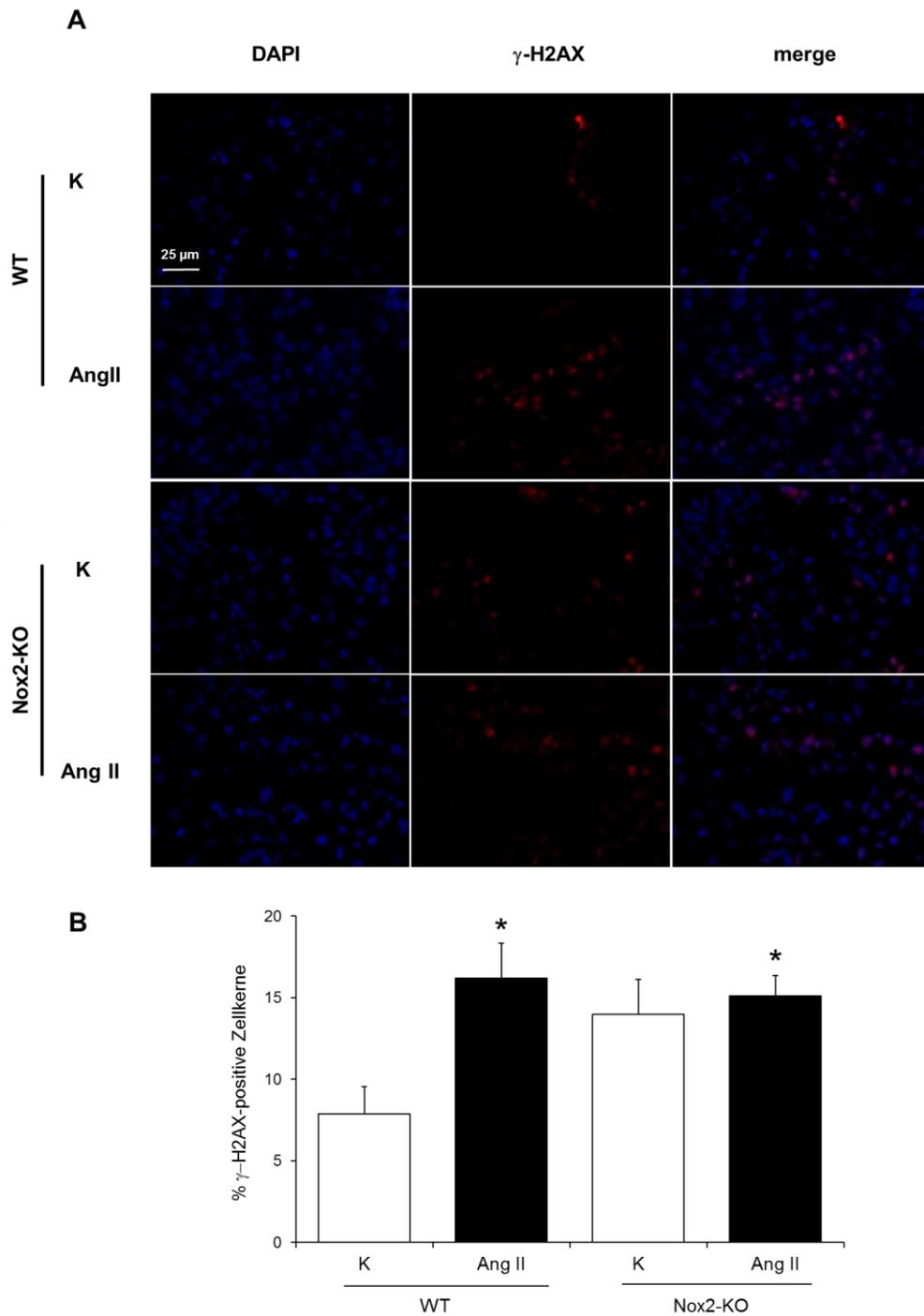


Abb. 53: Nachweise des DNA-Doppelstrangbruchmarkers γ -H2AX. (A) Immunfluoreszenter Nachweis auf Gefrierschnitten der Niere. **(B)** Quantifizierung erfolgte durch Auswertung von 6-8 Gesichtsfeldern mittels Bestimmung der Gesamtkernanzahl über das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ [131] und der Bestimmung der Anzahl an positiven Zellkernen. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K; WT: n=5, Nox 2-KO-K: n=6, Nox2-KO-AngII: n=7

5. DISKUSSION

5.1 Relevanz des AT1a-Rezeptors für die Entstehung des Blutdruckes, die Bildung von oxidativen DNA-Schäden und Reparaturprozessen in vivo

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Relevanz des AT1aR auf die Entstehung des Blutdruckes, von oxidativen DNA-Schäden und Reparaturprozessen *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurden AT1aR-defizienten und WT-Mäusen mit Hilfe osmotischer Minipumpen das Peptidhormon AngII über einen Zeitraum von vier Wochen verabreicht. Außerdem wurde eine Gruppe mit wildtypischen Mäusen, zusätzlich zur AngII-Infusion, mit dem AT1R-Antagonist Candesartan behandelt, welcher beide in Nagetieren vorhandenen Subtypen, des AT1R, AT1aR und AT1bR, blockiert. Die Behandlung mit dem Antagonisten sollte eine mögliche Beteiligung des AT1bR aufdecken, da dieser in AT1a-KO-Mäusen vorhanden und vollständig funktionsfähig ist [38], [39].

5.1.1 Beteiligung des AT1b-Rezeptors an der Blutdruckregulation in AT1a-Rezeptor-defizienten Mäusen

In Nagetieren gibt es zwei Haupttypen des AT1R, den AT1a und den AT1bR, wobei der AT1aR in der Niere der dominierende Subtyp und dem AT1R im Menschen äquivalent ist [147]. Es ist auch bekannt, dass die meisten Effekte des AngII über den AT1aR generiert werden. Dazu gehören unter anderem die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde [148], die Salzretention in renalen proximalen Tubuluszellen [149] sowie der Anstieg des Blutdruckes [113]. Zunächst wurde geklärt, ob durch ein Fehlen des AT1aR eine Reaktion durch AngII auf den systolischen Blutdruck nachgewiesen werden kann. In unserer Studie führte AngII zu einem signifikanten Anstieg des systolischen Blutdruckes in wildtypischen Mäusen, während eine AngII-Infusion in AT1aR-defizienten Mäusen keinen Anstieg des Blutdruckes zur Folge hatte. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen, vorhergehenden Studien [150]–[152]. Dass ein Fehlen des AT1aR außerdem einen geringeren basalen systolischen Blutdruck bewirkt, als in WT-Mäusen beobachtet, wurde auch von anderen Gruppen gezeigt [113] [153]–[155]. In einer früheren Studie wiesen Brand et al. [137] nach, dass eine Intervention mit Candesartan in WT-Tieren einen AngII-abhängigen Blutdruckanstieg verhindern konnte, was in dieser Studie nochmals bestätigt

Diskussion

wurde und somit eine wichtige Beteiligung des AT1aR an der Entwicklung des systolischen Blutdruckes mit Nachdruck bestätigt. Auf die Gruppe von AT1aR-defizienten Mäusen, welche ebenfalls unter AngII-Infusion mit dem AT1R-Antagonisten Candesartan behandelt wurden, wurde verzichtet, da eine Behandlung von AT1a-KO-Mäusen mit einem Sartan den Blutdruck noch weiter senkt [150], [152], [156], es somit zu einer Hypotonie kommt was eine beträchtliche Steigerung des extrazelluläre AngII-Level nach sich zieht [150], [157], [158] und das Ergebnis somit verfälschen würde. Aus diesem Grund konnte eine Beteiligung des AT1bR an der Regulierung des Blutdruckes weder bestätigt noch widerrufen werden. Allerdings konnte mittels qRT-PCR eine starke Hochregulierung des AT1bR im Nierengewebe von AT1a-KO-Mäusen nachgewiesen werden, was auch von Zhu et al. gezeigt wurde [159]. Diese Tatsache würde dann für eine Kompensation des AT1aR durch den AT1bR sprechen. Außerdem konnten Oliverio et al. [152], [156] und Li et al. [150] durch Behandlung von AT1a-KO-Mäusen mit einem AT1R-Blocker zeigen, dass der Blutdruck mit diesem in den Mäusen noch weiter gesenkt wurde und somit eine Beteiligung des AT1bR bei der Blutdruckregulierung eine bedeutende Rolle spielt, wenn der AT1aR nicht vorhanden ist. Unsere und die Daten anderer Gruppen zeigen also deutlich, dass der AT1aR für die Entstehung eines erhöhten Blutdruckes essentiell ist, jedoch eine Beteiligung des AT1bR bei Abwesenheit des AT1aR zur Regulierung des Blutdruckes beiträgt.

5.1.2 Ein Fehlen des AT1a-Rezeptors führt zu histopathologischen Schäden in der Niere

Eine vermehrte Albuminausscheidung im Urin ist bei erhöhtem Blutdruck besonders häufig der Fall und zeigt erste Anzeichen einer Nierenfunktionsstörung an. Zudem deutet das häufig auf einen Filtrationsdefekt im Glomerulum hin oder auf eine beeinträchtigte Reabsorption von Proteinen im Tubulus [160]. In WT-AngII-Mäusen war die Albuminexkretion, verursacht durch den hohen Blutdruck, signifikant gegenüber der WT-Kontrolle erhöht. Histopathologisch wiesen die Nieren dieser Tiere auch leichte Defekte hinsichtlich des Glomerulums auf, was eine vermehrte Albuminausscheidung erklären könnte. Trotz des fehlenden erhöhten Blutdruckes und einer normalen Albuminexkretion wurde sowohl in AT1a-KO-Kontrollmäusen, als auch in KO-

Diskussion

Tieren, die mit AngII behandelt wurden, ein stark erhöhter GSI/MSI-Score vorgefunden. Obwohl zwei Studien keine besonderen Auffälligkeiten bezüglich morphologischer [113] und histopathologischer [161] Veränderungen der Glomeruli in Nieren von AT1a-KO-Tieren fanden, zeigten Oliverio et al. [162], dass in den Nieren dieser Tiere eine Hypertrophie von Zellen des juxtaglomerulären Apparates vorliegt sowie eine Ausweitung von Renin-produzierenden Zellen entlang der Arterien und eine Proliferation von mesangialen Zellen. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der geringe systolische Blutdruck über sympathische Nerven oder über nicht-AT1a-Rezeptoren die Stimulation der Proliferation mesangialer Zellen verursacht [162]. Dass WT-Tiere, die mit dem AT1-Antagonisten Cand behandelt wurden, ebenfalls einen sehr hohen GSI/MSI-Score aufweisen, war in der Tat sehr überraschend, da unsere vorherige Studie zeigte, dass eine strukturelle Veränderung des Glomerulums durch Behandlung mit Candesartan verhindert werden konnte [137]. Bis dato kann dieser Effekt in diesem Experiment noch nicht erklärt werden. Eine Albuminurie, wie sie in WT-AngII-Mäusen vorliegt, konnte jedoch mit einer Cand-Behandlung verhindert werden.

Eine AngII-induzierte Entzündung und Fibrose kann über verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Die meisten, jedoch nicht alle, stimulatorischen Effekte von AngII auf Fibrinogenese sind auf eine Induktion von TGF β zurückzuführen [163]. AngII stimuliert die Synthese von TGF β 1 und führt auch zu einer Hochregulation von spezifischen TGF β -Rezeptoren, welche die profibrinogene Wirkung verstärken [164]. Eine Stimulierung von TGF β 1 löst somit eine Fibroblastenproliferation sowie die Differenzierung zu collagensekretierenden Myofibroblasten aus [165], [166]. Des Weiteren kann AngII zur verstärkten Transkription des Serin-Protease-Inhibitors PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1) führen, was in einer pathologischen Ablagerung von extrazellulärer Matrix resultiert [167]. Außerdem kann AngII über den AT1-Rezeptor proinflammatorische Gene, wie VCAM-1 (Vaskuläres Zelladhäsionsprotein 1), ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) IL-6 (Interleukin 6) und MCP1 (Monocyte chemoattractant protein-1) durch Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Signalwege, beispielsweise über NF- κ B (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells), hochregulieren [168]. In unserem Experiment blieb eine Entzündung und Fibrose

Diskussion

in WT-Mäusen nahezu aus. Eine rein optische Bewertung der Parameter kann jedoch möglicherweise nicht ausgereicht haben, um die Effekte zu beurteilen. Es müssten Entzündungs,- und Fibrose-assoziierte Gene, wie Kollagene, α -SMA oder TGF β 1 untersucht werden, um eine eindeutige Aussage über die Veränderungen im Tubulussystem zu treffen. Eine in der HE- und Siriusfärbung sehr eindeutige Veränderung des Tubulussystems mit interstitieller Entzündung und Fibrose war jedoch in beiden Gruppen der AT1a-KO-Tiere vorzufinden, was zunächst sehr überraschend war, denn AngII ist in AT1a-KO-Mäusen hauptsächlich extrazellulär vorzufinden. In den Nieren dieser Mäuse ist der AngII-Gehalt im Vergleich zum WT zu 50% reduziert [169]. Aus diesem Grund und aus dem, dass Losartan die Aufnahme von AngII in WT- und AT1a-KO-Mäusen größtenteils blockiert wird postuliert, dass AngII zu 80 % über den AT1aR aufgenommen wird und eine Beteiligung des AT1bR zu 20 % wahrscheinlich ist [170]. Somit kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in den AT1a-KO-Tieren vorliegende tubulointerstitielle Schädigung alleine AngII-vermittelt ist. Ein möglicher Ansatzpunkt hierbei wäre eine erhöhte Renin-mRNA-Expression, welche um ein 5-faches gegenüber der WT-Kontrollgruppe erhöht war. Eine erhöhte Renin-mRNA kann demnach auch eine erhöhte Expression des Renin-Proteins zur Folge haben. Ist dies der Fall, kann Renin an den sogenannten (Pro)renin Rezeptor binden, was zu einer Phosphorylierung der MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen ERK 1/2 führt. Dies wiederum sorgt, unabhängig von AngII [171], für eine Hochregulierung von TGF- β , PAI-1, Kollagenen, Fibronektin [172]–[174], und der Cyclooxygenase-2 [175]. In AngII-infundierten KO-Tieren war die Expression der Renin-mRNA reduziert. Dies liegt am Negativfeedback durch AngII [34]. Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein von tubulointerstitiellen Schäden in dieser Gruppe wäre, dass AngII an den überexprimierten AT1b-Rezeptor bindet und somit auf diesem Wege zu diesen Schäden führen könnte.

Durch den hohen Blutdruck kam es in der WT-AngII-Gruppe auch zu einer morphologischen Gefäßwandverdickung. Diese konnte auch in AT1a-KO-Tieren beobachtet werden. In AT1a-KO-Tieren könnte ebenfalls die erhöhte Renin-Expression eine Rolle spielen, da Renin alleine eine Hypertrophie hervorrufen kann [176]. In AT1a-KO-AngII-Tieren könnte die leichte Gefäßwandveränderung AT1bR-vermittelt sein, da dieser bei Fehlen des AT1a-Rezeptors

kompensatorisch und ebenfalls vaskonstriktorisch nach AngII-Infusion wirkt [152].

5.1.3 AngII-induzierter oxidativer Stress tritt unabhängig von einem erhöhten Blutdruck auf

Oxidativer Stress spielt sowohl eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Bluthochdrucks in experimentellen Tiermodellen [177]–[179], als auch in humanen Studien [180]–[182]. In früheren Studien konnten wir zeigen, dass AngII *in vitro* in proximalen Schweinenierenzellen zu oxidativem Stress und DNA-Schäden über den AT1-Rezeptor führt [117]. Unsere Arbeitsgruppe konnte außerdem in einer früheren Studie zum ersten Mal auch einen dosisabhängigen Anstieg von ROS und Doppelstrangbrüchen durch AngII-Infusion in der Niere zeigen. In dieser Studie führten schon geringe AngII-Konzentrationen (200 ng/kg*min) zu einem signifikanten Anstieg an ROS, obwohl kein signifikanter Anstieg des Blutdruckes gegenüber Kontrollmäusen vorzufinden war. Diese Ergebnisse deuten auf ein unabhängiges Auftreten von Blutdruck und AngII-induzierten DNA-Schäden hin. Diese These wird mit der Tatsache unterstützt, dass eine Behandlung mit dem Antioxidans Tempol zu einem signifikanten Blutdruckanstieg führte, jedoch verminderte oxidative Schäden in der Niere vorherrschten [112]. Mit Hilfe der AT1a-KO-Maus konnte in dieser Arbeit nun endgültig bewiesen werden, dass AngII-induzierte oxidative DNA-Schäden unabhängig von einem erhöhten Blutdruck auftreten. Dass AngII keinen Einfluss auf den Blutdruck von AT1a-KO-Mäusen besitzt wurde bereits in 5.1.1 diskutiert. Ob in diesen Tieren AngII auch zu einer erhöhten ROS-Produktion führt war bislang nicht eindeutig geklärt. So wurde in einer Studie eine erhöhte Superoxidproduktion in Aorta und im Herzen in AngII-behandelten AT1a-KO-Mäusen gefunden, die aber dennoch signifikant niedriger war, als die AngII-induzierte Superoxidproduktion in WT-Tieren [138]. In einer anderen Studie wiederum konnte AngII weder in WT- noch in AT1a-KO-Tieren eine erhöhte Superoxidproduktion in der Aorta auslösen [139]. Wir konnten mittels des ROS-sensitiven Fluorophors Dihydroethidium zeigen, dass AngII in Tubuluszellen der Niere sowohl in WT- als auch in AT1a-KO-Mäusen eine signifikant höhere ROS-Produktion auslöste. Die Menge an produziertem ROS war dabei genauso hoch wie im WT. Nicht nur in der Niere konnten wir einen signifikanten Anstieg von

Diskussion

ROS in AngII-behandelten AT1a-KO-Tieren finden, sondern auch im Herzen. Zudem konnte durch eine Medikation mit Candesartan in WT-Mäusen sowohl in der Niere als auch im Herzen eine AngII-vermittelte ROS-Produktion inhibiert werden. Rahman *et al.* wiesen ebenfalls eine durch den AT1-R-Antagonisten Valsartan vollständig gehemmte AngII-induzierte Superoxidproduktion in der Aorta der AT1a-KO-Mäuse nach [138]. Unser Ergebnis bestätigt also eine blutdruckunabhängige ROS-Produktion für die wir schon in früheren Studien an Modellen von AngII- und Aldosteron-induzierter Hypertonie Indizien finden konnten. Bei diesen Studien entstanden die oxidativen DNA-Schäden möglicherweise unabhängig von dem durch Vasokonstriktion hervorgerufenem Druck. So verursachte z.B. AngII in der isoliert perfundierten Niere eine Vasokonstriktion mit gleichzeitig auftretenden DNA-Schäden, während eine Vaskonstriktion mit dem Thromboxan-Mimetikum U46619 keine DNA-Schäden hervorriefte [111]. Weiterhin konnte bei einer Aldosteron-induzierten Hypertonie eine subtherapeutische Rezeptor-Blockade mit Spironolakton oxidative DNA-Schäden in der Niere und der Leber verhindern, ohne den Blutdruck signifikant zu senken [183], [184]. Zuletzt konnten wir zeigen, dass bereits geringe AngII-Konzentrationen, die noch zu keinem signifikanten Blutdruckanstieg führen, schon signifikant erhöhte oxidative Schäden in der Niere auslösten [112].

Eine vermehrte Bildung von freien reaktiven Sauerstoffspezies, vor allem von $\cdot\text{O}_2$ -kann auch zur Peroxidation von Arachidonsäure führen, was eine nichtenzymatischen Bildung von freien Isoprostanen nach sich zieht, die wiederum als Marker für eine gesteigerte endogene- O_2^- -Aktivität gelten [185], [186]. Dabei zählen 8-Isoprostane, bekannt auch unter dem Namen 15-Isoprostan F_{2t} [187], zu den am besten charakterisierten Isoprostanen [188]. In unserer und einer weiteren Studie konnte eine erhöhte 8-Isoprostan-Konzentration im Urin bei AngII-induziertem Bluthochdruck gefunden werden [188], eine andere Studie fand erhöhte 8-Isoprostan-Konzentrationen im Plasma [189]. Gesteigerte 8-Isoprostan-Konzentrationen sind auch bei hypertensiven Patienten vorzufinden [59]. AngII führte auch in AT1a-KO-Mäusen zu einer leicht erhöhten Exkretion von 8-Isoprostan im Urin, was die Generierung von ROS in diesen Tieren verstärkt. Der AT1-Blocker Cand konnte, entgegen unserer Erwartungen, die Reduktion der 8-Isoprostan-Konzentration im Urin nur leicht verhindern. Dies könnte man mit der Tatsache erklären, dass 8-Isoprostane auch

Diskussion

über einen Cyclooxygenase-abhängigen Weg gebildet werden können [190], [191]. Es wurde bereits gezeigt, dass eine AT1-Rezeptorblockade mit Cand zu einer erhöhten COX-2-Expression im Kortex von Ratten-Nieren führt [192], [193]. Eine erhöhte COX-2-Expression könnte in diesem Fall dann auch eine vermehrte Bildung von 8-Isoprostan zur Folge haben, die nicht durch oxidativen Stress hervorgerufen wurde.

Die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies findet über die Aktivierung der NADPH-Oxidase über einen AngII-vermittelten Signalweg des AT1R statt [117], [194]. Zur Klärung, welche NADPH-Oxidase für die AngII-vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der Niere verantwortlich ist, wurde die Expression von Nox2 und Nox4 untersucht. Nox2 und Nox4 sind beide in diversen Zelltypen der Niere lokalisiert. So findet man Nox2 vor allem in proximalen Tubuluszellen, im Bereich der Macula densa distaler Tubuli, im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife sowie in mesangialen Zellen und Podocyten im Glomerulum. Nox4 ist ebenfalls in allen bereits genannten Zelltypen der Niere zu finden, zusätzlich befindet sie sich jedoch auch im Sammelrohr, im Gefäßsystem in VSMCs (Vascular smooth muscle cells) und endothelialen Zellen, der Niere [60]. In VSMCs von transgenen Ratten, welche das Ren2-Gen überexprimieren und an starkem Bluthochdruck leiden, konnte eine erhöhte Nox4-Expression gefunden werden [195]. Ebenso konnte in Zellen der Macula densa, die aus Nieren von AngII-behandelten Mäusen isoliert wurden, eine erhöhte Nox2- und Nox4-Expression vorgefunden werden [196]. Andererseits gibt es auch Studien, die eine Herabregulierung der Nox4 im Nieren-Kortex [197] oder in VSMCs [198] zeigten. In unserem Experiment hatte AngII in WT-Tieren keinen Einfluss auf die Nox4-Expression, jedoch wurde in Cand-behandelten Tieren und in AT1a-KO-AngII-Mäusen eine stark erhöhte Expression gefunden. Auch AT1a-KO-Kontrollmäuse wiesen eine tendenziell erhöhte Nox4-mRNA-Expression auf. *In vitro* konnte eine frühere Studie zeigen, dass Nox4 hauptverantwortlich für die Entstehung von AngII-induziertem oxidativen Stress in humanen kultivierten proximalen Tubuluszellen ist [117]. *In vivo* in unserem Experiment scheint dies nicht der Fall zu sein. Allerdings wurde hier auch nur die mRNA-Expression überprüft und nicht das Vorhandensein des Proteins. Eine erhöhte Nox4 mRNA-Expression im Nieren-Kortex durch eine AT1-Blockade wurde auch schon von Chabrashvili *et al.* [197]. In dieser Arbeit jedoch wurde zum ersten Mal die

Diskussion

Expression von NADPH-Oxidasen in der Niere von AT1a-KO-Tieren untersucht. Warum durch Antagonisierung des AT1R bzw. durch Fehlen des AT1aR eine Hochregulierung vorgefunden wurde, und AngII in WT-Tieren keinen Einfluss hat, ist schwer zu erklären, könnte aber zum einen daran liegen, dass die Nox4 mRNA auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene reguliert werden kann und der mRNA-Spiegel nicht unbedingt den Protein-Spiegel und dessen Funktion reflektieren muss [199]. Zudem kann die Regulierung der Nox4 mRNA abhängig von ihrem Protein selbst sein [63]. In dieser Arbeit konnte der Nachweis der Nox4 auf Proteinebene nicht durchgeführt werden, da keiner der von uns getesteten Antikörper spezifische Banden im Western Blot lieferte. Babelova *et al.* fanden ebenfalls, dass zwei kommerziell erhältliche Antikörper gegen Nox4 nicht in der Lage waren diese Isoform im Western Blot nachzuweisen [200]. Ein weiterer Faktor der bei der Interpretation dieser Ergebnisse beachtet werden muss ist, dass in dieser Arbeit die RNA aus der gesamten Niere isoliert wurde und nicht aus einem spezieller Teil oder Zelltyp. Denn auffällig bei bereits durchgeführten Studien zur Expression von Nox2 und Nox4 ist, dass diese nie in der gesamten Niere untersucht wurden, sondern entweder im Nierenmark oder im Nierenkortex. Aus diesem Grund konnte eine Veränderung in unserem Experiment - zumindest im WT möglicherweise nicht gezeigt werden. Diese These wird z.B. durch eine Studie von Sousa *et al.* unterstützt, bei der Nox4 nur im Nierenmark hochreguliert war, jedoch nicht im Kortex [201]. Ferner zeigte eine *in vivo*-Studie, dass der Nierenkortex eine höhere Beständigkeit gegenüber AngII-induziertem oxidativen Stress besitzt [202], während das Nierenmark eine genetische Anfälligkeit gegenüber den schädlichen Wirkungen von AngII zeigt [203]. Des Weiteren sind die Mechanismen der Nox-Regulierung durch AngII komplex und können zahlreiche Zwischenmoleküle (PKC, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Poldip2) und Gerüstproteine (z.B. Aktin, Caveolin) beinhalten [46]. Die Untersuchung der Expression weiterer NADPH-Oxidase Untereinheiten, wie p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} oder p67^{phox}, oder anderer Aktivatoren wie Rac1, die für eine vollständige Aktivierung von Nox2 und Nox4 nötig sind, wäre hierbei interessant.

5.1.4 Antioxidatives Abwehrsystem

ROS können mit DNA, RNA und Proteinen interagieren und diese schädigen. Spontane Mutationen die als Resultat oxidativen Stresses hervorgehen, führen zur Initiation der Krebsentstehung. In vielen Krebsarten wurde zudem ein konstanter Zustand oxidativen Stresses gefunden, der somit eine Rolle bei Krebs und dessen Ausbreitung spielen kann [204]. Um gegen oxidativen Stress anzukämpfen, hat die Zelle einen eigenen Abwehrmechanismus entwickelt, der zum größten Teil über den Transkriptionsfaktor Nrf2 vermittelt wird. Nrf2 ist der Hauptregulator einer Batterie von defensiven und entgiftenden Genen und wird dann aktiviert, wenn z.B. ROS-Spiegel akkumulieren [205]. Diese Gene sind dann für die Entgiftung von ROS und für die Entfernung beschädigter Proteine verantwortlich und fördern somit das Überleben der Zelle [206]. Da erhöhter oxidativer Stress, ausgelöst durch AngII, in Niere von WT und AT1a-KO-Tieren gezeigt werden konnte, wurde die Translokation des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern untersucht. AngII führte in WT und AT1a-KO-Tieren zu einem gehäuftem Auftreten von Nrf2 im Zellkern, wobei der Effekt in WT-Mäusen etwas stärker war. Durch Intervention mit Cand konnten ROS in der Niere signifikant reduziert werden, wie auch die Translokation von Nrf2. Somit konnte eine ROS-abhängige Translokation von Nrf2 nachgewiesen werden. Anschließend wurde untersucht, welche Gene tatsächlich durch Bindung von Nrf2 an das ARE exprimiert wurden. Die Expression der antioxidativen Enzyme SOD1, Gpx1 und Txnrd1 auf mRNA-Ebene zeigte in WT-Tieren, die mit AngII behandelt wurden, keine Veränderung der Expression. Eine Intervention mit Cand führte eher zu einer Herabregulierung der untersuchten Gene, die *Gpx1*-Expression wurde sogar signifikant gesenkt. In AT1a-KO-Tieren war die Expression zwar tendenziell eher niedriger, jedoch aufgrund der qPCR-Ausschlusskriterien (3.2.11.4) von keiner biologischen Relevanz. Zusätzlich wurde das Proteinlevel von SOD1, HO1 und γ -GCLC in der Niere untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche Induktion der HO1 in WT-Tieren, die mit AngII behandelt wurden. Dass trotz einer Translokation von Nrf2 in den Zellkern nur eine Induktion von HO1 stattfand, könnte z. B. damit erklärt werden, dass das *HO1*-Gen von mehreren Transkriptionsfaktoren, also nicht nur von Nrf2, reguliert werden kann. Diese Tatsache scheint im Falle der HO1 einzigartig zu sein. So können auch NF- κ B, Mitglieder des heat shock factor (Hitzeschock-Faktor) und das Aktivator Protein

Diskussion

das HO1-Gen regulieren [207]. Die Induktion von HO1 schützt gegen oxidative Verletzungen indem es durch Häm-Abbau zur Bildung von Kohlenstoffmonoxid, Bilirubin/Bilverdin und Eisen/Ferritin beiträgt. All diese Endprodukte besitzen anti-apoptotische, anti-inflammatorisch, anti-proliferierende und anti-oxidative Eigenschaften [208]. Eine erhöhte HO1-Expression in der Niere konnte ebenfalls in Ratten gefunden werden, die mit AngII behandelt wurden, während eine gleichzeitige Gabe des AT1-Antagonisten Losartan eine Hochregulierung verhinderte [209], wie es auch in unserer Studie mit Cand der Fall war. In der Studie von Aizawa *et al.* [209] konnte außerdem ein HO1-Induktor eine AngII-induzierte Nierenschädigung verbessern, ein HO1-Inhibitor verschlechterte diesen Zustand. Dies deutet darauf hin, dass HO1 während einer AngII-Infusion renoprotektiv wirkt. Eine Induktion weiterer antioxidativer Enzyme blieb in unserer Studie trotz Nrf2-Translokation aus. Dies könnte möglicherweise zum einen daran liegen, dass die Nrf2-Induktion nicht signifikant erhöht war, oder, dass die Expression der Gene bzw. Proteine im ganzen Nierengewebe untersucht wurde und z. B. nicht nach Kortex und Mark unterschieden wurde. So ist im Falle der Gpx1 in einer Studie eine gesteigerte Gpx1-Aktivität nur im Mark vorzufinden, während es im Kortex nur zu einer leichten Erhöhung kam [201]. Weiter wurde in SHR (spontan hypertensive Ratten) weder im Kortex noch im Mark eine erhöhte SOD1-Expression vorgefunden und das trotz erhöhter Level an oxidativem Stress [210]. In einem anderen Modell mit chronischem Nierenversagen wurde in Ratten eine geringere renale SOD1-Expression vorgefunden [211]. Ähnlich sieht es auch bei Untersuchungen des Thioredoxinsystems aus. Obwohl es nur begrenzte Studien zur Txnrd1-Expression im Zusammenhang mit oxidativem Stress gibt, wurden auch hier, je nach Stimulus, Tiermodell und Gewebe entweder eine Hochregulierung [212] oder eine Herabregulierung [213] des Systems gefunden. Aufgrund all dieser und unserer Studien ist somit kein eindeutiges Muster der Expression antioxidativer Enzyme ausgelöst durch AngII vorzufinden. Ein letzter Punkt, der bei Untersuchungen einer Translokation von Nrf2 in den Zellkern beachtet werden muss, ist die endgültige Bindung von Nrf2 an ARE. Nrf2 wird durch oxidativen Stress zwar aktiviert und wandert daraufhin auch in den Zellkern, jedoch befinden sich auch dort Negativfaktoren, wie Bach1, Keap1 und Fyn, die, bevor Nrf2 an ARE binden kann, zunächst phosphoryliert und aus dem Zellkern exportiert werden müssen [206]. Das heißt also, dass nicht

zwingend davon ausgegangen werden kann, dass ein gehäuftes Auftreten von Nrf2 im Zellkern gleichzeitig eine Bindung an ARE und somit eine erhöhte Transkription antioxidativer Enzyme bedeutet.

5.1.5 DNA-Schäden und Reparatur in AT1a-KO-Mäusen

Ob oxidativer Stress in AT1-KO-Mäusen auch zu DNA-Schäden führte, wurde zum einen mit Hilfe des Comet Assays an isolierten Zellen der perfundierten Niere überprüft, zum anderen immunhistochemisch mit Hilfe eines Doppelstrangbruchmarkers. Im Comet Assay konnte eine signifikante Induktion an DNA-Strangbrüchen in AngII-behandelten WT-Mäusen gefunden werden, die durch eine Medikation mit Cand vollständig verhindert werden konnte. Trotz eines erhöhten Levels an oxidativem Stress wurde in AT1a-KO-Mäusen jedoch keine erhöhte Menge an DNA-Schäden beobachtet. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Induktion von Doppelstrangbrüchen untersucht. Doppelstrangbrüche sind die schädlichste Form von DNA-Läsionen, welche, wenn sie unrepariert bleiben, schwerwiegende Konsequenzen für das Überleben der Zelle haben, da sie zu Chromosomenaberrationen, genomischer Instabilität und zum Zelltod führen können [214]. Wenn Chromosomenaberrationen fehlerhaft oder gar nicht repariert werden, ist das einer der Hauptinitiationsschritte der Karzinogenese [215]. Zellen können allerdings als Antwort auf DNA-Schäden die DNA-Schadensantwort aktivieren, welche bei Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen unter anderem die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 beinhaltet, welches dann als γ -H2AX bezeichnet wird. Die phosphorylierte Form des Histons ist wichtig für die Bereitstellung von Reparaturproteinen und für die Aktivierung von „Checkpoint“-Proteinen, die den Zellzyklus zum Zwecke der Reparatur anhalten können. [214]. Die Daten der WT-Tiere bestätigten unsere früheren Ergebnisse, die gezeigt haben, dass AngII zu einer signifikanten Induktion von Doppelstrangbrüchen in der Niere führt, welche durch Behandlung mit Cand vollständig verhindert werden konnte [112], [137]. Trotz nicht nachweisbarer DNA-Schäden im Comet Assay wurde auch in AT1a-KO-Tieren, die mit AngII behandelt wurden, eine signifikant gesteigerte Menge an Doppelstrangbrüchen gefunden. Man könnte vermuten, dass die Tatsache, dass im Comet Assay in der AT1a-KO-Maus kein detektierbarer Schaden nachgewiesen werden konnte, widersprüchlich bzw. nicht ganz schlüssig zu den

Diskussion

Ergebnissen des Nachweises des Doppelstrangbruchmarkers zu sein scheint, allerdings basiert der Nachweis von γ -H2AX auf einer posttranslationalen Modifikation von Histonen in der Nähe von DNA-Läsionen, die im Laufe der Zeit akkumulieren können [216], während der Comet Assay eher akute Schäden detektiert. Daher scheint γ -H2AX als der zuverlässigere Marker hinsichtlich eines AngII-induzierten DNA-Schadens zu sein. Nach aktuellem Wissenstand konnten wir in dieser Studie zum ersten Mal zeigen, dass AngII-behandelte Mäuse, die für den AT1aR defizient sind, nicht nur eine gesteigerte Menge an ROS in Niere und im Herzen produzieren, sondern auch aus den oxidativen Schädigungen, die wahrscheinlich über den AT1bR generiert werden, DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen akkumulieren. Zusätzlich zu einem Anstieg von Doppelstrangbrüchen in AngII-behandelten AT1a-KO-Mäusen konnte im Herzen von AT1a-KO-Kontrollmäusen auch ein leicht erhöhter DNA-Schaden detektiert werden. Dass AT1a-KO-Kontrollmäuse einen etwas höheren oxidativen Stress und eine etwas erhöhte Menge an Doppelstrangbrüchen im Herzen aufweisen, könnte möglicherweise am erhöhten Ca^{2+} -Spiegel im Herzen liegen. Eine Studie konnte z.B. in VSMCs, isoliert aus der Aorta AT1a-defizienter Mäuse einen erhöhten Ca^{2+} -Spiegel gegenüber WT-Kontrollen finden [159]. Die Tatsache, dass in Herzen von WT-Tieren, die mit AngII behandelt wurden, ebenfalls erhöhte Mengen an γ -H2AX gefunden wurden und auch in diesem Gewebe durch Cand verhindert werden konnten, konnte unsere vorherigen Ergebnisse bestätigen [137].

Weiterhin wurde der Einfluss von AngII auf Reparaturprozesse in der Niere von WT und AT1a-KO-Tieren untersucht. Zum einen wurde mit einer modifizierten Variante des Comet Assays, dem Reparatur Comet Assay (3.2.6), die Reparaturaktivität während der BER überprüft. Genauer gesagt kann mit dieser Methode der erste Schritt der BER, die DNA-Inzisionsaktivität, erfasst werden. Hierbei wird die veränderte Base, meistens die hochmutagene Basenmodifikation 8-oxodG [73], durch DNA-Glykosylasen vom Zuckerrest getrennt, woraufhin eine abasische Stelle entsteht [92]. Eine AngII-Behandlung konnte die DNA-Inzisionsaktivität in WT-Tieren gegenüber 8-oxodG-Läsionen erhöhen, während in AT1a-KO-Mäusen, trotz erhöhter Level an oxidativem Stress, keine erhöhte DNA-Inzisionsaktivität detektiert werden konnte. Da es bislang nach aktuellem Wissenstand auch noch keine Daten zur DNA-Reparatur

Diskussion

in AT1a-KO-Tieren gibt ist es schwierig, eine Aussage über einen möglichen Defekt im BER-Reparatursystem durch ein Fehlen des AT1aR zu treffen. Frühere Studien konnten allerdings eine erhöhte Menge an 8-oxodG-Basenmodifikationen in der Niere AngII-behandelter WT-Tiere finden [112], sowie eine gesteigerte Exkretion dieser Base im Urin [137]. Die Untersuchung der Expression der Reparaturproteine Rad51, Mpg und Xrcc3 konnte auch keinen Aufschluss über die Reparaturprozesse liefern. Entgegen unserer Erwartungen aus einer früheren Studie, bei der eine signifikante Induktion von Poly-(ADP)-Riboseketten durch AngII in der Niere von wildtypischen Mäusen gezeigt wurde [137], konnte in diesem Versuch kein gehäuftes Auftreten von Poly-(ADP)-Riboseketten gefunden werden und lässt ebenso eine Aussage über Reparaturprozesse schwierig erscheinen.

Tendenziell zeigte die Expression der Reparaturproteine in WT-Tieren, die mit Cand behandelt wurden, und AT1a-KO-Kontrolltiere eher eine verringerte Expression. Allerdings kann keine klare Aussage getroffen werden, da wegen der qPCR-Ausschlusskriterien (biologisch relevante Hochregulierung wenn mindestens das >2 x Produkt im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde, bzw. weniger als die Hälfte ($<0,5$ x)) keine biologische Relevanz vorliegt. Neuere Erkenntnisse der Poly-(ADP)-Ribosylierung geben Aufschluss darüber, dass das Anknüpfen der Riboseketten nicht nur während eines DNA-Schadens geschieht, sondern auch bei der Transkription, DNA-Methylierung, der Regulation der Chromatinstruktur und der Histonmodifikation stattfinden kann [217]. Außerdem ist eine Poly-(ADP)-Ribosylierung keine manifestierte Modifikation. Die Riboseketten sind einem ständigen Auf- und Wiederabbau u.a. durch das PARG-Enzym ausgesetzt, so dass zu bestimmten Zeiten möglicherweise weniger Ribosketten nachgewiesen werden können [218].

Insgesamt beweisen die Ergebnisse dieses Versuches jedoch ganz eindeutig eine Unabhängigkeit der Entstehung oxidativen Stresses und oxidativer DNA-Schäden vom Blutdruck. Trotz eines unveränderten Blutdruckes und einer funktionellen Niere konnte in AT1a-KO-Mäusen während einer AngII-Infusion sowohl eine gegenüber der WT-Gruppe signifikant erhöhte ROS-Produktion sowie eine auch gegenüber der AT1a-KO-Gruppe signifikant gesteigerte Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen gefunden werden. Der Rezeptor, der für diese Schäden verantwortlich ist scheint AT1bR zu sein, da durch gleichzeitige

Behandlung mit dem AT1R-Antagonisten Cand, der sowohl AT1aR und AT1bR blockiert, oxidative DNA-Schäden vollständig eingedämmt wurden. Eine Überexpression des AT1bR im Nierengewebe von AT1a-defizienten Mäusen bestärkt diese These zusätzlich.

5.2 Identifikation der beteiligten NADPH-Oxidase am AngII-induzierten oxidativen Stress

Dieser Teil der Arbeit sollte nun Aufschluss darüber geben, welche Untereinheit an der Schädigung von Niere und Herz durch AngII beteiligt ist. Momentan wird verstärkt nach NADPH-Oxidase-inhibierenden Medikamenten [219], [220] gesucht, denn von den vielen in der Literatur beschriebenen Nox-Inhibitoren [221]–[224] gibt es zurzeit nur eines (GKT137831), welches Phase II der klinischen Studien erreicht hat [225]. Außerdem scheinen Inhibitoren der NADPH-Oxidase gegenüber Antioxidantien die bessere Wahl zu sein, da sie nicht nur die schädlichen Effekte der schon produzierten ROS vermindern sondern die Bildung derer verhindern [219]. Daher ist die Aufklärung des durch Bluthochdruck vermittelten, zu DNA-Schäden führenden Mechanismus sowie ein umfangreiches Wissen um die Beteiligung der einzelnen Untereinheiten an möglichen schädlichen Effekten nötig.

Es gibt umfangreiche experimentelle Daten, die zeigen, dass ROS eine Rolle in der Entwicklung von Bluthochdruck spielen. Viele Modelle, bei denen Bluthochdruck experimentell herbeigeführt wird, wie z.B. genetische Formen (spontan hypertensive Ratten), chirurgisch-induzierte Formen (2K1C, Aortenbandierung), ernährungsbedingte Hypertonie (Salz, Fett) oder Hormon-induzierte Hypertonie (AngII, Aldosteron), weisen oxidativen Stress auf. Genaue Mechanismen inwieweit ROS den Blutdruck beeinflussen können sind noch immer unklar, jedoch sind viele Systeme, wie das Gehirn, die Nieren und Blutgefäße daran beteiligt. [220]. So zeigen manche Studien, dass Mäuse, die für ROS-produzierende Enzyme, wie Nox1, Nox2 und p47^{phox}, defizient sind, einen geringeren Blutdruck besitzen und AngII nicht in der Lage ist, eine Hypertonie hervorzurufen [226], [227]. In unserer Studie hatten weder das Fehlen von Nox2 noch von Nox4 einen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck. Zum einen war der basale Blutdruck in diesen Mäusen mit dem von WT-Tieren vergleichbar, zum anderen konnte eine durch AngII ausgelöste Hypertonie nicht

Diskussion

verhindert werden. Der systolische Blutdruck stieg in KO-Tieren durch AngII genauso hoch an wie in WT-Tieren. Für den Fall der Nox4 kann dies auch durch eine andere Studie bestätigt werden [118]. Im Gegensatz dazu ist es bislang umstritten, ob Nox2 Einfluss auf den Blutdruck hat oder nicht. Es gibt z.B. zwei Studien [228], [229], die zeigten, dass Nox2-defiziente Mäuse einen geringeren basalen systolischen Blutdruck haben und auch keinen erhöhten Blutdruck während einer AngII-Infusion entwickelten. Gründe für die Abweichungen im basalen Blutdruck sind nicht ganz klar, könnten jedoch an unterschiedlichen experimentellen Bedingungen liegen, wie z. B. der Methode der Ermittlung des Blutdruckes, der eingesetzten AngII-Konzentration und Dauer der Behandlung (2222 ng/kg*min für 6 Tage [228] oder 208 ng/kg*min für 14 Tage [229]) oder an der Tatsache, dass in der Studie von Wang et al. [228] die Mäuse zusätzlich mit dem Antibiotikum Tetrazyklin behandelt wurden. Neben des antibiotischen Effekts sind Tetrazykline auch in der Lage Matrixmetalloproteasen zu inhibieren, was auch Einfluss auf den Blutdruck haben könnte [230]. Andererseits gibt es auch Studien, wie die von Touyz et al. [231] und Johar et al. [232], die mit unseren Daten übereinstimmen.

Abgesehen von einem erhöhten Blutdruck konnte in AngII-behandelten Nox2- und Nox4-KO-Tieren, genauso wie in AngII-behandelten WT-Tieren, eine signifikant erhöhte Albuminausscheidung im Urin gefunden werden. Ursache für die erhöhte Albuminausscheidung ist höchstwahrscheinlich der hohe Blutdruck [160], [233], der durch AngII hervorgerufen wurde und nicht das Fehlen von einer der beiden Nox-Isoformen, denn sowohl Nox2- als auch Nox4-KO-Kontrollmäuse zeigten im Vergleich zu WT-Kontrollen eine normale Albuminausscheidung im Urin. Studien mit Nox4-KO-Mäusen [234] oder Nox2-KO-Mäusen [235] konnten ebenfalls keine Veränderungen bezüglich der ACR (Albumin/Kreatinin-Ratio) in diesen KO-Tieren im Vergleich zu WT-Kontrolltieren beobachten.

Ferner wollten wir mit Hilfe dieser Studie aufklären, ob man eine der beiden oder beide Nox-Isoformen für die AngII-induzierte oxidative Schädigung identifizieren kann. *In vitro* hatten wir in einer Zelllinie menschlicher proximaler Tubuluszellen eine entscheidende Rolle der Nox4 gefunden. Hierbei wurde diese durch siRNA-Technik herabreguliert und AngII konnte in diesen Zellen keine DNA-Schäden mehr auslösen [117]. Überraschenderweise konnten wir jedoch *in vivo* in den beiden untersuchten Nox-defizienten Mausstämmen, die mit AngII behandelt

Diskussion

wurden, erhöhte Level an oxidativem Stress zeigen. Mit Hilfe des ROS-sensitiven Fluorophors DHE fanden wir in Niere und im kardiovaskulären Gewebe eine gegenüber WT-Kontrolltieren signifikant gesteigerte Fluoreszenz. Untersuchungen des Herzens hinsichtlich reaktiver Sauerstoffspezies zeigten außerdem, dass KO-Mäuse basal schon erhöhten oxidativen Stress aufwiesen. Eine andere Studie hingegen, wies eine verminderte ROS-Produktion in Nox2-KO-Mäusen und in KO-Mäusen mit einer chronischen AngII-abhängigen Hypertonie in der Aorta nach. Außerdem wurde in dieser Studie ebenfalls eine verminderte NADPH-Oxidase Aktivität in Aorta, Herz und Niere in beiden Nox2-KO-Gruppen gezeigt. [231]. In einem anderen Modell, der renovaskulären Hypertonie, wurde in Blutgefäßen von Nox2-KO-Mäusen ebenfalls geringere Mengen an produziertem $O_2^{\cdot-}$ gefunden [236]. Eine geringere Superoxidmenge könnte auch Ursache dafür sein, dass AngII-behandelte Nox2-KO-Tiere, im Gegensatz zu AngII-behandelten Nox4-KO-Tieren, keine erhöhte 8-Isoprostan-Exkretion aufweisen. Die Bildung von 8-Isoprostan ist nämlich eher von einer Superoxidproduktion abhängig [185], die in Nox2-KO-Tieren laut der oben genannten Studie [236] und einer weiteren [237] jedoch vermindert ist. Zusätzlich zum oxidativen Stress konnten wir auch DNA-Schäden in der Niere in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in Nox4-KO-Mäusen nachweisen. Schon Nox4-KO-Kontrollmäuse zeigten signifikant mehr DNA-Strangbrüche als WT-Kontrollmäuse. AngII vermochte das Ausmaß der DNA-Schäden in der Nox4-KO-Gruppe allerdings nicht zu steigern. Auch in Nox2-KO-Tieren war die basale DNA-Schädigung in Form von Doppelstrangbrüchen gegenüber WT-Kontrolltieren erhöht. In diesen Tieren war AngII ebenfalls außer Stande DNA-Schäden zu vermehren. Es mag zunächst widersprüchlich zu scheinen, dass in KO-Tieren DNA-Schäden, aber keine erhöhten ROS-Spiegel in der Niere nachgewiesen wurden. Allerdings reflektiert der Nachweis von ROS mit dem Fluoreszenzfarbstoff DHE nur eine Momentaufnahme der produzierten Radikale. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Nachweis von Doppelstrangbrüchen der verlässlichere Marker ist. Auch der Nachweise der hochmutagenen Basenmodifikation 8-oxodG wurde in einer Studie von Khodo et al. [238] im Nierenkortex von Nox4-KO-Mäusen gezeigt. Da wir ROS und DNA-Schäden in der Niere von beiden KO-Stämmen fanden, wollten wir überprüfen, ob im Falle einer Nox2- bzw. einer Nox4-Defizienz die jeweils andere Isoform für

Diskussion

die Generierung der ROS und der DNA-Schäden zuständig ist. Daraufhin untersuchten wir die Expression der Nox2 und Nox4 in der Niere auf mRNA-Ebene. In der Niere AngII-behandelter Nox4-KO Mäuse konnten wir zwar eine signifikant erhöhte Expression der Nox2 finden, welche jedoch aufgrund der PCR-Ausschlusskriterien (biologisch relevante Hochregulierung wenn mindestens das >2 x Produkt im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde, bzw. weniger als die Hälfte (<0,5 x)) zu vernachlässigen ist. In den Nieren von beiden Gruppen Nox2-defizienter Mäuse konnten wir keine im Vergleich zur WT-Kontrolle veränderte mRNA-Expression der Nox4 auffinden. Wir konnten also, zumindest auf mRNA-Ebene, keinen Ausgleich der einen Nox-Isoform durch die jeweils andere nachweisen. Auch die Mehrzahl anderer Studien konnte keine Kompensation einer ausgeschalteten Nox durch andere belegen. Die Gruppe um Kleinschnitz et al. [239] fand beispielsweise keine veränderte Proteinexpression von Nox1 und Nox2 im Gehirn von Nox4-defizienten Mäusen. Kuroda et al. [240] konnten ebenfalls kein verändertes Proteinlevel von Nox1 und Nox2 in Herzen von Tieren, bei denen Nox4 nur im kardiovaskulärem Gewebe ausgeschaltet ist, zeigen. Auch in einem Modell der chronischen Nierenerkrankheit, bei der ein aktiviertes RAS und erhöhte Level an ROS vorliegen [241], war das Expressionslevel der Nox2 mRNA in Nieren von Nox4-defizienten Mäusen unverändert [238]. Was das Fehlen der Nox2 betrifft sieht es ähnlich aus. So fanden Byrne et al. [242] keine veränderten Nox4-mRNA-Level in Herzen von unbehandelten Nox2-KO-Mäusen als auch in Herzen von AngII-behandelten Nox2-KO-Mäusen. Eine andere Gruppe untersuchte die Nox1 und Nox4 Proteinexpression im Nierenkortex von Nox2-KO-Tieren und konnte auch hier keine Veränderungen im Vergleich zu WT-Tieren finden [231]. Unsere, wie auch die Literaturdaten lassen vermuten, dass tatsächlich kein kompensatorischer Mechanismus vorliegt. Allerdings gibt es eine Studie, durchgeführt an Nox2KO-Mäusen, die einerseits keine Veränderung der Nox4-mRNA im Nierenkortex nachweisen konnte, andererseits aber eine signifikante Hochregulierung der Nox4 auf Proteinebene zeigte. Eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Nox4 bestätigte in dieser Studie die erhöhte Expression dieser Isoform im Nierenkortex von Nox2-KO-Mäusen [235]. Aufgrund unserer und der Ergebnisse aus anderen Studien lässt sich trotzdem nur schwer sagen, ob das Fehlen der einen Isoform durch eine andere kompensiert wird. Deutlich wird

Diskussion

jedoch wieder, zumindest im Falle der Nox4, dass der mRNA-Spiegel nicht unbedingt den Proteinspiegel und dessen Funktion reflektieren muss [199]. Weiterhin haben wir die Expression der zytosolischen Untereinheit p47^{phox}, die für die Aktivierung von Nox2 unabdingbar ist, ebenfalls in der Niere, jedoch auf Proteinebene untersucht. In WT- und Nox4-defizienten Mäusen konnten wir kaum eine veränderte Proteinexpression der p47^{phox} finden. In Nox2-KO-Mäusen eine leichte, in AngII-behandelten KO-Mäusen eine signifikant verringerte Expression der Untereinheit. Da p47^{phox} für eine Aktivierung der Nox4 nicht gebraucht wird [64], ist es auch nicht überraschend, dass die Expression in der Niere Nox4-defizienter Mäuse nahezu unverändert ist. Warum die Expression in den Nieren beider Nox2-defizienter Gruppen verringert ist, lässt, aufgrund mangelnder Literaturdaten, nur Vermutungen aufkommen. Ohne Nox2-Protein ist die p47^{phox}-Untereinheit funktionsunfähig. Daher wird möglicherweise deren Expression herabgeregelt. Für die Aktivierung von Nox1, welche in Nox2-defizienten Mäusen funktionsfähig ist, wird p47^{phox} jedoch nicht zwingend benötigt [243]. Wir haben in dieser Studie allerdings nur die Expression der p47^{phox} und nicht deren endgültige Aktivierung überprüft, die durch Phosphorylierung stattfindet [243]. Dies müsste noch untersucht werden, da wir so keine Aussage machen können, ob ein Fehlen von einer der beiden Nox-Isoformen möglicherweise doch die Aktivität von p47^{phox} steigert. Warum in Nox-2/4-defizienten Mäusen manifestierte DNA-Schäden vorherrschen ist genauso überraschend wie die Tatsache der erhöhten ROS-Produktion in Niere und im Herzen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die beiden Nox-Isoformen in diesem Gewebe einen schützenden Effekt haben könnten. Schröder et al. [244] konnten z.B. darlegen, dass Nox4 während eines ischämischen oder entzündlichen Stresses protektiv auf das Gefäßsystem wirkt. Als einzige Nox-Isoform produziert Nox4 konstitutiv hauptsächlich H₂O₂ [245]. Der protektive Effekt wird somit dem H₂O₂ zugeschrieben, da es bekannt ist, dass H₂O₂ in geringen Konzentrationen vasodilatatorisch wirkt, indem es die Proteinkinase G I α [246] und eNOS (endotheliale Stickstoffsynthase) [247] aktiviert. Bei Fehlen dieser Isoform fällt somit diese positive Eigenschaft des H₂O₂ weg. Auch die Gruppe um Ray et al. [248] fand potenziell positive Auswirkungen der endothelialen Nox4 auf die Gefäße, die den Funktionen des H₂O₂ zuzuschreiben sind. Zudem konnten wir eine leichte Herabregulation des HO1-Proteins in

Diskussion

Nieren von Nox4-KO-Kontrolltieren finden. Dies kann mit den basal fehlenden H_2O_2 -Konzentrationen zusammenhängen, denn die Expression des HO1-Gens kann über den H_2O_2 -Spiegel aufrechterhalten werden und trägt über verschiedene Mechanismen ebenfalls zum vaskulären Schutz bei [249]. In der Aorta von Nox4-KO-Mäusen konnten Schröder et al. ebenso eine Herabregulierung der HO1 mRNA nachweisen [244]. Eine Herabregulierung des antioxidativen Abwehrsystems kann somit die Entstehung von Strangbrüchen in der Nox4-KO-Maus begünstigen. In beiden Nox2-KO-Gruppen konnten wir zwar auch eine Herabregulierung des HO1-Proteins nachweisen, die aber wahrscheinlich nicht mit dem H_2O_2 -Spiegel in der Zelle zusammenhängen, da in diesen Mäusen Nox4 konstitutiv aktiv ist. Laut aktuellem Wissenstand wurde das antioxidative Abwehrsystem in Nox2-defizienten Mäusen noch nicht untersucht, jedoch besitzen diese Mäuse aufgrund der fehlenden Superoxidproduktion Beeinträchtigungen im Bereich der Abwehr von Pathogenen. ROS-abhängige Signalwege, die von Nox2 ausgehen, kontrollieren viele Abwehrmechanismen, wie z.B. Autophagie oder die Produktion von Zytokinen [250]. Möglicherweise hat das Fehlen des von Nox2 generierten Superoxids dann auch negative Auswirkungen auf das antioxidative Abwehrsystem.

Die erhöhte Menge an ROS, eine gesteigerte 8-Isoprostan-Konzentration im Urin und die Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in Nox4-KO-Mäusen, die mit AngII behandelt wurden, beweisen eindeutig, entgegen unserer *in vitro*-Beobachtungen, dass Nox4 nicht alleine für AngII-induzierte oxidative DNA-Schäden verantwortlich sein kann. Zusätzlich zeigen die basal erhöhten Einzel- und Doppelstrangbrüche in der Niere von Nox4-KO-Kontrolltieren, dass diese Isoform möglicherweise eher einen schützenden Effekt besitzt. Für Nox2 konnte ein solcher protektiver Effekt bisher noch nicht gezeigt werden, jedoch können wir anhand unserer bisher gefunden Daten, die zeigen, dass auch in diesen Tieren erhöhte basale ROS-Spiegel und DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere vorliegen, diese Tatsache nicht ausschließen. Aufgrund unserer Daten können wir annehmen, dass beide Isoformen wohl eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielen. Untermauert wird die Annahme dadurch, dass systolischer Blutdruck, renale Nox-Aktivität und ROS-Bildung bei Experimenten in denen mittels si-RNA-Technik p22^{phox} ausgeschaltet wurde während einer gleichzeitigen AngII-Infusion, gesenkt werden konnten [251]. p22^{phox} ist dabei als

Diskussion

zytosolische Untereinheit des NADPH-Oxidase-Komplexes für eine vollständige Aktivierung der Nox2 unabdingbar. Zusätzlich führt eine Blockade der Zusammenlagerung von Nox2 und p22phox durch den Nox-Inhibitor gp91ds-tat ebenfalls zu einer verminderten O₂-Produktion im vaskulären System [252]. Ferner scheint es, was AngII-abhängige Schäden betrifft, ein Zusammenspiel der verschiedenen Nox-Isoformen zu sein, welche diese Art von Schäden auslöst. Um diese Tatsache zu bestätigen müssten allerdings noch weitere Untersuchungen erfolgen. So könnten z.B. Untersuchungen an der Nox1-KO-Maus weitere Aufschlüsse geben, ob AngII-abhängige DNA-Schäden durch mehrere Untereinheiten gleichzeitig ausgelöst werden oder nicht. Im Falle der Nox1-KO-Maus ist man sich bislang noch uneinig ob durch AngII eine Hypertonie ausgelöst werden kann oder nicht und ob es dann erhöhte ROS-Spiegel gibt oder nicht. So zeigt eine Studie von Yogi et al. [253], dass Nox1-KO-Mäuse, gekreuzt mit transgenen TTRhRen-Mäusen, welche unter chronischer Hypertonie leiden und erhöhte Plasma-AngII-Level besitzen, ebenfalls einen erhöhten systolischen Blutdruck aufweisen, jedoch keine erhöhten ROS-Level im Plasma detektierbar sind. Zwei weitere Studien wiederum konnten weder eine AngII-abhängige Hypertonie noch erhöhte Mengen an ROS in der Aorta von Nox1-KO-Mäusen während einer AngII-Infusion zeigen [254], [255]. Abgesehen von der Nox1-KO-Maus sollte auch eine induzierbare Nox4-KO-Maus herangezogen werden, bei der der Verlust des Nox4-Proteins zeitlich gesteuert werden kann [118]. Da wir schon in unbehandelten Kontrolltieren DNA-Schäden gefunden haben, die, wie bereits oben beschrieben, auf einen protektiven Effekt der Nox4 hin deuten, macht es dieses Modell möglich einen entwicklungsbedingten Einfluss der Nox4-Defizienz auf AngII-vermittelte Effekte zu minimieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert den Blutdruck sowie den Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Das aktive Peptid, Angiotensin II (AngII), führt dabei zur Vasokonstriktion und in höheren Konzentrationen zu Bluthochdruck. Hypertensive Patienten haben ein erhöhtes Risiko an Krebs zu erkranken, vor allem an Nierenkrebs. Wir konnten bereits *in vivo* zeigen, dass AngII in der Lage ist, den Blutdruck zu steigern und dosisabhängig zu DNA-Schäden über den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT1R) führt. Ein stimuliertes RAAS kann ferner über die Aktivierung der NADPH-Oxidase, einer Hauptquelle der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle, zu oxidativem Stress führen. Zielsetzung dieser Arbeit war es zum einen, mit Hilfe von AT1a-Rezeptor-defizienten Mäusen *in vivo* zu prüfen, ob die Bildung von ROS, sowie die Bildung von DNA-Schäden in der Niere und im Herzen unabhängig von einem erhöhten Blutdruck auftreten. Zum anderen sollte, ebenfalls *in vivo*, untersucht werden, ob eine oder beide von zwei untersuchten Isoformen der NADPH-Oxidase (Nox) für die Auslösung oxidativen Stresses in der Niere verantwortlich ist.

Zunächst wurden für den Versuch zur Überprüfung der Abhängigkeit AngII-induzierter DNA-Schäden vom Blutdruck männliche C57BL/6-Mäuse und AT1a-Knockout (KO)-Mäuse mit osmotischen Minipumpen ausgestattet, die AngII in einer Konzentrationen von 600 ng/kg min über einen Zeitraum von 28 Tagen abgaben. Zusätzlich wurde eine Gruppe von AngII-behandelten Wildtyp (WT)-Mäusen mit dem AT1-Rezeptor-Blocker Candesartan (Cand) behandelt. Während des Versuchszeitraumes fanden regelmäßige, nicht-invasive Blutdruckmessungen an den wachen Mäusen statt. In WT-Mäusen induzierte AngII Bluthochdruck, verursachte erhöhte Albumin-Level im Urin und führte zur Bildung von ROS in Niere und im Herzen. Außerdem traten in dieser Gruppe DNA-Schäden in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen auf. All diese Reaktionen auf AngII konnten jedoch durch gleichzeitige Behandlung mit Cand verhindert werden. AT1a-KO-Mäuse hatten, verglichen mit WT-Kontrollmäusen, einen signifikant niedrigeren Blutdruck und normale Albumin-Level im Urin. In AT1a-KO-Mäusen, die mit AngII behandelt wurden, konnte kein Anstieg des systolischen Blutdrucks sowie kein Einfluss auf die Nierenfunktion gefunden

Zusammenfassung

werden. Jedoch führte AngII in dieser Gruppe zu einer Steigerung von ROS in der Niere und im Herzen. Zusätzlich wurden genomische Schäden, vor allem in Form von Doppelstrangbrüchen signifikant in dieser Gruppe induziert. Auch wenn AT1a-KO-Tiere, unabhängig von einer AngII-Infusion, keine eingeschränkte Nierenfunktion zeigten, so wiesen sie erhebliche histopathologische Schäden im Hinblick auf die Glomeruli und das Tubulussystem auf. Diese Art von Schäden deuten auf eine besondere Bedeutung des AT1aR im Hinblick auf die embryonale Entwicklung der Niere hin. Zusammenfassend beweisen die Ergebnisse dieses Experiments eindeutig, dass eine AngII-induzierte ROS-Produktion und die Induktion von DNA-Schäden unabhängig von einem erhöhten Blutdruck auftreten. Da in der AngII-behandelten AT1a-KO-Gruppe eine signifikant höhere Expression des AT1b-Rezeptors zu finden war und die Blockade von beiden Rezeptorsubtypen mit Cand zu einer Verhinderung der schädlichen Effekte durch AngII führte, scheint der AT1bR im Falle einer AT1aR-Defizienz für die Entstehung der Schäden zuständig zu sein.

Ziel des zweiten Experimentes war es, den Beitrag der Nox2 und Nox4 zum oxidativen DNA-Schaden *in vivo* zu untersuchen. Hierfür wurden männliche C57BL/6-Mäuse und Nox2- oder Nox4-defiziente Mäuse mit osmotischen Minipumpen ausgestattet, die AngII in einer Konzentration von 600 ng/kg min über einen Zeitraum von 28 Tagen abgaben. Im WT-Stamm und in beiden Nox-defizienten Stämmen induzierte AngII Bluthochdruck, verursachte erhöhte Albumin-Level im Urin und führte zur Bildung von ROS in der Niere. Außerdem waren in allen AngII-behandelten Gruppen genomische Schäden, vor allem in Form von Doppelstrangbrüchen, erhöht. Auch in Abwesenheit von AngII wiesen Nox2- und Nox4-defiziente Mäuse mehr Doppelstrangbrüche im Vergleich zu WT-Kontrollmäusen auf. Interessanterweise kompensieren allerdings weder Nox2 noch Nox4 das Fehlen der jeweils anderen Isoform auf RNA-Basis. Aufgrund dieser Ergebnisse schließen wir, dass bislang keine Isoform alleine für die Generierung von oxidativen DNA-Schäden in der Niere verantwortlich gemacht werden kann und dass eine Beteiligung einer weiteren Nox-Isoform sehr wahrscheinlich ist. Möglicherweise könnten aber auch andere ROS-generierende Enzyme, wie Xanthinoxidase oder Stickoxidsynthase involviert sein. Da genomische Schäden in Nieren von Nox2- und Nox4-defizienten Mäusen in Abwesenheit von AngII gegenüber den Schäden in WT-Kontrollmäusen erhöht

Zusammenfassung

waren, könnten die beiden Isoformen auch eine schützende Funktion im Bereich von Nierenkrankheiten übernehmen. Da dies aber bislang nur für Nox4 beschrieben ist, ist es wahrscheinlicher, dass das Fehlen von einer der beiden Isoformen eher einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat. Um dies jedoch abschließend zu klären wäre es sinnvoll mit induzierbaren Knockout-Modellen zu arbeiten, bei denen mögliche entwicklungsbedingte Effekte minimiert werden können.

7. SUMMARY

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) regulates blood pressure, electrolyte metabolism and water balance. The reactive peptide, Angiotensin II (AngII), of the RAAS causes vasoconstriction and, in higher concentrations, increased blood pressure. Hypertensive patients have an increased risk to develop cancer, especially kidney cancer. We have shown *in vivo*, that AngII is capable to cause an elevation of blood pressure, as well as DNA damage dose-dependently via the AngII type 1 receptor (AT1R). A stimulated RAAS can further lead to oxidative stress by activating NADPH oxidases which are major enzymatic sources of reactive oxygen species (ROS) in the cell. On the one hand the aim of this work was to examine *in vivo* with the help of AT1aR-deficient mice whether the formation of ROS and DNA damage in the kidney and the heart occur independently of an increased blood pressure. On the other hand we wanted to investigate whether one or both of the two examined isoforms of the NADPH oxidase (Nox) is responsible for the triggering of oxidative stress in the kidney.

For the purpose of the first experiment which examined the dependency of AngII-induced DNA damage on blood pressure, male C57BL/6-mice and AT1a-knockout (KO)-mice were equipped with osmotic minipumps, delivering AngII in a concentration of 600 ng/kg x min during 28 days. Additionally, wild-type (WT) mice were treated with the AT1R antagonist candesartan (cand). Over the whole time period, frequent non-invasive blood pressure measurements were taken. In WT mice, AngII induced hypertension, an elevated urinary albumin level and formation of ROS in kidney and heart. Furthermore, genomic damage, in form of single- and double strand breaks, was augmented in this group. All these responses to AngII could be attenuated by concurrent administration of candesartan. AT1a-deficient mice had lower basal systolic pressures than WT mice and comparable urinary albumin levels. In AT1a-deficient mice treated with AngII, systolic pressure was not increased, and no effect on renal function could be detected. However, AngII led to an increase of ROS in kidney and heart in this group. In addition, genomic damage, especially in form of double strand breaks was significantly induced. Although AT1a-KO-mice, independent of an AngII-infusion, showed no renal impairment they had significant histopathological changes in glomeruli and tubules. This points to a special importance of AT1aR

Summary

with regard to the embryonic development of the kidney. In summary our results clearly demonstrate that AngII-induced ROS production and DNA damage is independent of blood pressure. Since we found a significantly higher expression of the AT1bR in the AngII-treated AT1aR-KO-group and since blocking of both subtypes with cand resulted in a complete prevention of adverse AngII effects, the receptor responsible for the mediation of these effects seems to be AT1bR. The aim of the second experiment was to examine the contribution of Nox2 and Nox4 to oxidative DNA damage *in vivo*. Therefore male C57BL/6-mice and Nox2- or Nox4-deficient mice were equipped with osmotic minipumps, delivering AngII in a concentration of 600 ng/kg × min during 28 days. In WT and in both strains of Nox-deficient mice, AngII induced hypertension, elevated urinary albumin levels and formation of ROS in the kidney. Furthermore, genomic damage, especially in form of double strand breaks were augmented in all of the AngII-treated groups. Also in the absence of AngII, Nox2- and Nox4-deficient mice exhibited a higher background of double strand breaks. Interestingly neither Nox2 nor Nox4 do not compensate for the deficiency of the other isoform on mRNA level. Due to these results we conclude that there is no isoform so far which is solely responsible for the generation of ROS in the kidney under AngII-treatment. Potentially there might also be a contribution of other enzymes like xanthine oxidase or nitric oxide synthase to the formation of ROS. Since genomic damage in kidneys of Nox2- and Nox4-deficient mice in the absence of AngII was higher as compared to the damages in WT control mice it might be that both isoforms could have a protective role in renal disease. But, since this is so far only described for Nox4 it is likely that the absence of one of the two isoforms rather has an influence on the embryonic development. To finally clarify this hypothesis it would be suggestive to work with inducible knockout mouse models where possible developmental effects can be minimized.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
8-oxodG	8-Oxo-2'-deoxyguanosine
A	Avidin
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
ACE-2	Angiotensin-Konversions-Enzym 2
ACR	Albumin/Kreatinin-Ratio
AGT	Angiotensinogen
AngII	Angiotensin II
AT1a-KO	Angiotensin II-Typ 1a-Rezeptor-Knockout
AT1aR	Angiotensin II-Typ 1a-Rezeptor
AT1b-KO	Angiotensin II-Typ 1b-Rezeptor-Knockout
AT1bR	Angiotensin II-Typ 1b-Rezeptor
AT1R	Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor
AT2R	Angiotensin II-Typ 2 Rezeptor
B	Biotin
BER	Basen-Excisions-Reparatur
BSA	Bovine serum albumin
Cand	Candesartan
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DHE	Dihydroethidium
EGF	epidermal growth factor
EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPX1	Glutathionperoxidase
GSI	Glomeruloskleroseindex
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HClO	Hypochlorige Säure
HKG	House-Keeping-Gen (Haushaltsgen)
HRP	Meerrettichperoxidase
IP_3	Inositoltriphosphat
Mpg	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
MSI	Mesangiolyseindex
NO	Stickstoffmonoxid
Nox1	NADPH-Oxidase 1
Nox2	NADPH-Oxidase 2
Nox4	NADPH-Oxidase 4
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidradikal

Abkürzungsverzeichnis

O ₃	Ozon
·OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
PADPR	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PARP	Poly-ADP-Ribose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PRR	(Pro)renin Rezeptor
qRT-PCR	quantitative real time-PCR
Rad51	RAD51 Recombinase
Ren	Renin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rplp0	Ribosomal Protein, Large, P0
Rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SA	Streptavidin
SOD	Superoxiddismutase
T	Tyramid
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Saline-Tween
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TMB	Tetramethylbenzidin
TNB	Tris-gepuffertes Blockingreagenz
TNF α	Tumornekrosefaktor α
t-PA	Plasminogenaktivator
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TSI	Tubulointerstitieller Schädigungsindex
Txnrd1	Thioredoxinreduktase 1
VGSC	spannungsgesteuerten Natriumkanals
VSI	Vaskulärer Schädigungsindex
Xrcc3	X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 3
γ -H2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX

9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. Santulli, "Epidemiology of Cardiovascular Disease in the 21 st Century : Updated Numbers and Updated Facts," *J. Cardiovasc. Dis.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–2, 2013.
- [2] P. M. Kearney, M. Whelton, K. Reynolds, P. Muntner, P. K. Whelton, and J. He, "Global burden of hypertension: Analysis of worldwide data," *Lancet*, vol. 365, no. 9455, pp. 217–223, 2005.
- [3] W. H. Chow, G. Gridley, J. F. Fraumeni, and B. Järnholm, "Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, no. 18, pp. 1305–1311, 2000.
- [4] E. Grossman, F. H. Messerli, V. Boyko, and U. Goldbourt, "Is there an association between hypertension and cancer mortality?," *American Journal of Medicine*, vol. 112, no. 6. pp. 479–486, 2002.
- [5] S. Weikert, H. Boeing, T. Pischon, C. Weikert, A. Olsen, A. Tjønneland, K. Overvad, N. Becker, J. Linseisen, A. Trichopoulou, T. Mountokalakis, D. Trichopoulos, S. Sieri, D. Palli, P. Vineis, S. Panico, P. H. M. Peeters, H. B. Bueno-De-Mesquita, W. M. M. Verschuren, B. Ljungberg, G. Hallmans, G. Berglund, C. A. González, M. Dorronsoro, A. Barricarte, M. J. Tormo, N. Allen, A. Roddam, S. Bingham, K. T. Khaw, S. Rinaldi, P. Ferrari, T. Norat, and E. Riboli, "Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 167, no. 4, pp. 438–446, 2008.
- [6] G. C. Kabat, M. Kim, R. T. Chlebowski, J. Khandekar, M. G. Ko, A. McTiernan, M. L. Neuhouser, D. R. Parker, J. M. Shikany, M. L. Stefanick, C. A. Thomson, and T. E. Rohan, "A Longitudinal Study of the Metabolic Syndrome and Risk of Postmenopausal Breast Cancer," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 18, no. 7, pp. 2046–2053, 2009.
- [7] C. Haggstrom, T. Stocks, K. Rapp, T. Bjorge, B. Lindkvist, H. Concin, a Engeland, J. Manjer, H. Ulmer, R. Selmer, S. Tretli, G. Hallmans, H. Jonsson, and P. Stattin, "Metabolic syndrome and risk of bladder cancer: prospective cohort study in the metabolic syndrome and cancer project (Me-Can)," *Int. J. cancer. Journal Int. du cancer*, vol. 128, no. 8, pp. 1890–1898, 2011.
- [8] R. M. Martin, L. Vatten, D. Gunnell, and P. Romundstad, "Blood pressure and risk of prostate cancer: Cohort Norway (CONOR).," *Cancer Causes Control*, vol. 21, no. 3, pp. 463–472, 2010.
- [9] J. S. Colt, K. Schwartz, B. I. Graubard, F. Davis, J. Ruterbusch, R. DiGaetano, M. Purdue, N. Rothman, S. Wacholder, and W.-H. Chow, "Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans.," *Epidemiology*, vol. 22, no. 6, pp. 797–804, 2011.

Literaturverzeichnis

- [10] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, and F. Bray, "GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet].," *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.*, 2013. .
- [11] A. Znaor, J. Lortet-Tieulent, M. Laversanne, A. Jemal, and F. Bray, "International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality," *Eur. Urol.*, vol. 67, no. 3, pp. 519–530, 2015.
- [12] I. A. Deckers, P. A. van den Brandt, M. van Engeland, F. J. van Schooten, R. W. Godschalk, A. P. Keszei, and L. J. Schouten, "Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: Interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid," *International Journal of Cancer*, 2014.
- [13] A. D. Hughes, G. F. Clunn, J. Refson, and C. Demoliou-Mason, "Platelet-derived growth factor (PDGF): Actions and mechanisms in vascular smooth muscle," *General Pharmacology*, vol. 27, no. 7, pp. 1079–1089, 1996.
- [14] S. P. Fraser, J. K. J. Diss, A.-M. Chioni, M. E. Mycielska, H. Pan, R. F. Yamaci, F. Pani, Z. Siwy, M. Krasowska, Z. Grzywna, W. J. Brackenbury, D. Theodorou, M. Koyutürk, H. Kaya, E. Battaloglu, M. T. De Bella, M. J. Slade, R. Tolhurst, C. Palmieri, J. Jiang, D. S. Latchman, R. C. Coombes, and M. B. A. Djamgoz, "Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 15, pp. 5381–5389, 2005.
- [15] C. D. House, C. J. Vaske, A. M. Schwartz, V. Obias, B. Frank, T. Luu, N. Sarvazyan, R. Irby, R. L. Strausberg, T. G. Hales, J. M. Stuart, and N. H. Lee, "Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 17, pp. 6957–6967, 2010.
- [16] S. P. Fraser, I. Ozerlat-Gunduz, W. J. Brackenbury, E. M. Fitzgerald, T. M. Campbell, R. C. Coombes, and M. B. a Djamgoz, "Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 369, no. 1638, p. 20130105, 2014.
- [17] M. B. a Djamgoz and R. Onkal, "Persistent current blockers of voltage-gated sodium channels: a clinical opportunity for controlling metastatic disease.," *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, vol. 8, no. 1, pp. 66–84, 2013.
- [18] L. Gillet, S. Roger, P. Besson, F. Lecaille, J. Gore, P. Bougnoux, G. Lalmanach, and J.-Y. Le Guennec, "Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 13, pp. 8680–8691, 2009.

Literaturverzeichnis

- [19] N. Prevarskaya, R. Skryma, and Y. Shuba, "Ion channels and the hallmarks of cancer," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 16, no. 3. pp. 107–121, 2010.
- [20] M. B. a. Djamgoz, "Blood pressure and risk of cancer progression – A possible connection with salt and voltage-gated sodium channel," *Med. Hypotheses*, pp. 21–23, 2015.
- [21] P. Hamet, "Cancer and hypertension: a potential for crosstalk?," *J. Hypertens.*, vol. 15, no. 12 Pt 2, pp. 1573–1577, 1997.
- [22] A. J. George, W. G. Thomas, and R. D. Hannan, "The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 11, pp. 745–759, 2010.
- [23] G. Andreotti, P. Boffetta, P. S. Rosenberg, S. I. Berndt, S. Karami, I. Menashe, M. Yeager, S. J. Chanock, D. Zaridze, V. Matveev, V. Janout, H. Kollarova, V. Bencko, M. Navratilova, N. Szeszenia-Dabrowska, D. Mates, N. Rothman, P. Brennan, W. H. Chow, and L. E. Moore, "Variants in blood pressure genes and the risk of renal cell carcinoma," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 4, pp. 614–620, 2010.
- [24] S. Mohan and N. R. C. Campbell, "Salt and high blood pressure," *Clinical Science*, vol. 117, no. 1. pp. 1–11, 2009.
- [25] I. A. G. Deckers, P. A. van den Brandt, M. van Engeland, P. M. M. B. Soetekouw, M. M. L. L. Baldewijns, R. A. Goldbohm, and L. J. Schouten, "Long-term dietary sodium, potassium and fluid intake; exploring potential novel risk factors for renal cell cancer in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer.," *Br. J. Cancer*, vol. 110, no. 3, pp. 797–801, 2014.
- [26] H. M. Siragy and R. M. Carey, "Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease," *American Journal of Nephrology*, vol. 31, no. 6. pp. 541–550, 2010.
- [27] S. A. Atlas, "The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition.," *J. Manag. Care Pharm.*, vol. 13, no. 8 Suppl B, pp. 9–20, 2007.
- [28] R. M. Carey and H. M. Siragy, "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation," *Endocrine Reviews*, vol. 24, no. 3. pp. 261–271, 2003.
- [29] L. Morgan, F. Broughton Pipkin, and N. Kalsheker, "Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1211–1222, 1996.
- [30] L. A. Belova, "Angiotensin II-Generating Enzymes," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 65, no. 12. pp. 1337–1345, 2000.

Literaturverzeichnis

- [31] R. E. Schmieder, K. F. Hilgers, M. P. Schlaich, and B. M. Schmidt, "Renin-angiotensin system and cardiovascular risk," *Lancet*, vol. 369, no. 9568, pp. 1208–1219, 2007.
- [32] E. Kaschina and T. Unger, "Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.," *Blood Press.*, vol. 12, no. 2, pp. 70–88, 2003.
- [33] L. M. Harrison-Bernard, L. G. Navar, M. M. Ho, G. P. Vinson, and S. S. el-Dahr, "Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody," *Am J Physiol*, vol. 273, no. 1 Pt 2, pp. F170–7, 1997.
- [34] H. Kobori, M. Nangaku, L. G. Navar, and A. Nishiyama, "The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 59, no. 3, pp. 251–287, 2007.
- [35] R. Ozono, Z. Q. Wang, A. F. Moore, T. Inagami, H. M. Siragy, and R. M. Carey, "Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney.," *Hypertension*, vol. 30, no. 5, pp. 1238–1246, 1997.
- [36] E. Clauser, K. M. Curnow, E. Davies, S. Conchon, B. Teutsch, B. Vianello, C. Monnot, and P. Corvol, "Angiotensin II receptors: Protein and gene structures, expression and potential pathological involvements," *European Journal of Endocrinology*, vol. 134, no. 4, pp. 403–411, 1996.
- [37] H. Yoshida, J. Kakuchi, D. F. Guo, H. Furuta, N. Iwai, R. van der Meer-de Jong, T. Inagami, and I. Ichikawa, "Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human)," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 186, no. 2, pp. 1042–1049, 1992.
- [38] H. Sasamura, L. Hein, J. E. Krieger, R. E. Pratt, B. K. Kobilka, and V. J. Dzau, "Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 185, no. 1, pp. 253–259, 1992.
- [39] N. Iwai and T. Inagami, "Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor," *FEBS Lett.*, vol. 298, no. 2–3, pp. 257–260, 1992.
- [40] N. Bouby, A. Hus-Citharel, J. Marchetti, L. Bankir, P. Corvol, and C. Llorens-Cortes, "Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron," *J Am Soc Nephrol*, vol. 8, no. 11, pp. 1658–1667, 1997.
- [41] X. Ruan, C. Wagner, C. Chatziantoniou, A. Kurtz, and W. J. Arendshorst, "Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet," *J. Clin. Invest.*, vol. 99, no. 5, pp. 1072–1081, 1997.

Literaturverzeichnis

- [42] N. Miyata, F. Park, X. F. Li, and A. W. Cowley, "Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney.," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 3 Pt 2, pp. F437–F446, 1999.
- [43] P. K. Mehta and K. K. Griendling, "Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 292, no. 1, pp. C82–C97, 2007.
- [44] C. Yan, D. Kim, T. Aizawa, and B. C. Berk, "Functional interplay between Angiotensin II and nitric oxide: Cyclic GMP as a key mediator," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 23, no. 1. pp. 26–36, 2003.
- [45] B. C. Berk and M. A. Corson, "Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases.," *Circ. Res.*, vol. 80, no. 5, pp. 607–616, 1997.
- [46] A. Nguyen Dinh Cat, A. C. Montezano, D. Burger, and R. M. Touyz, "Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature," *Antioxidants & Redox Signaling*. p. 120611083314001, 2012.
- [47] Z. Ďuračková, "Some current insights into oxidative stress," *Physiological Research*, vol. 59, no. 4. pp. 459–469, 2010.
- [48] R. Nistala, A. Whaley-Connell, and J. R. Sowers, "Redox control of renal function and hypertension.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, no. 12, pp. 2047–2089, 2008.
- [49] R. S. Balaban, S. Nemoto, and T. Finkel, "Mitochondria, oxidants, and aging," *Cell*, vol. 120, no. 4. pp. 483–495, 2005.
- [50] V. Nogueira and N. Hay, "Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 16, pp. 4309–14, 2013.
- [51] D. G. Harrison, "Basic science," *J. Am. Soc. Hypertens.*, vol. 8, no. 8, pp. 601–603, 2014.
- [52] S. Kardeh, S. Ashkani-Esfahani, and A. M. Alizadeh, "Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 735, no. 1, pp. 150–168, 2014.
- [53] K. Brieger, S. Schiavone, F. J. Miller, and K.-H. Krause, "Reactive oxygen species: from health to disease.," *Swiss Med. Wkly.*, vol. 142, no. August, p. w13659, 2012.
- [54] B. S. Berlett, "Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 33. pp. 20313–20316, 1997.
- [55] T. J. Guzik, N. E. West, E. Black, D. McDonald, C. Ratnatunga, R. Pillai, and K. M. Channon, "Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase:

- association with endothelial dysfunction and clinical risk factors.," *Circ. Res.*, vol. 86, no. 9, pp. E85–E90, 2000.
- [56] R. M. Touyz, "Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II.," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 14, no. 2, pp. 125–131, 2005.
- [57] N. D. Vaziri and B. Rodríguez-Iturbe, "Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension.," *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, vol. 2, no. 10, pp. 582–593, 2006.
- [58] a. C. Montezano and R. M. Touyz, "Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies," vol. 44, no. December 2011, pp. 2–16, 2012.
- [59] S. Cottone, G. Mulè, M. Guarneri, A. Palermo, M. C. Lorito, R. Riccobene, R. Arsena, F. Vaccaro, A. Vadalà, E. Nardi, P. Cusimano, and G. Cerasola, "Endothelin-1 and F2-isoprostane relate to and predict renal dysfunction in hypertensive patients," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 24, no. 2, pp. 497–503, 2009.
- [60] a. C. Montezano and R. M. Touyz, "Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies," no. August 2015, 2012.
- [61] S. Rajagopalan, S. Kurz, T. Münzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling, and D. G. Harrison, "Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: Contribution to alterations of vasomotor tone," *J. Clin. Invest.*, vol. 97, no. 8, pp. 1916–1923, 1996.
- [62] B. Lassègue and K. K. Griendling, "NADPH oxidases: Functions and pathologies in the vasculature," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no. 4. pp. 653–661, 2010.
- [63] B. Lassègue, A. San Martín, and K. K. Griendling, "Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system," *Circulation Research*, vol. 110, no. 10. pp. 1364–1390, 2012.
- [64] C. E. Holterman, N. C. Read, and C. R. J. Kennedy, "Nox and renal disease," *Clin. Sci.*, vol. 128, no. 8, pp. 465–481, 2015.
- [65] D. Diekmann, A. Abo, C. Johnston, A. W. Segal, and A. Hall, "Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity.," *Science*, vol. 265, no. 5171, pp. 531–533, 1994.
- [66] T. M. Paravicini and R. M. Touyz, "NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities.," *Diabetes care*, vol. 31 Suppl 2. 2008.

Literaturverzeichnis

- [67] H. Sumimoto, "Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species," *FEBS Journal*, vol. 275, no. 13. pp. 3249–3277, 2008.
- [68] K. Bedard and K.-H. Krause, "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.," *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 245–313, 2007.
- [69] N. Queisser, G. Fazeli, and N. Schupp, "Superoxide anion and hydrogen peroxide-induced signaling and damage in angiotensin II and aldosterone action," *Biological Chemistry*, vol. 391, no. 11. pp. 1265–1279, 2010.
- [70] T. B. Kryston, A. B. Georgiev, P. Pissis, and A. G. Georgakilas, "Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis.," *Mutat. Res.*, vol. 711, no. 1–2, pp. 193–201, 2011.
- [71] C. G. Fraga, M. K. Shigenaga, J. W. Park, P. Degan, and B. N. Ames, "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 12, pp. 4533–4537, 1990.
- [72] S. S. David, V. L. O'Shea, and S. Kundu, "Base-excision repair of oxidative DNA damage.," *Nature*, vol. 447, no. 7147, pp. 941–950, 2007.
- [73] S. Shibutani, M. Takeshita, and A. P. Grollman, "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG.," *Nature*, vol. 349, no. 6308, pp. 431–434, 1991.
- [74] H. Miyake, I. Hara, S. Kamidono, and H. Eto, "Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment.," *J. Urol.*, vol. 171, no. 4, pp. 1533–1536, 2004.
- [75] J. M. Weiss, E. L. Goode, W. C. Ladiges, and C. M. Ulrich, "Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: A review of the functional and epidemiologic literature," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 42, no. 3. pp. 127–141, 2005.
- [76] Q. Zhang, J. Pi, C. G. Woods, and M. E. Andersen, "A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 244, no. 1. pp. 84–97, 2010.
- [77] K. A. Jung and M. K. Kwak, "The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants," *Molecules*, vol. 15, no. 10. pp. 7266–7291, 2010.
- [78] E. Cadenas, "Basic mechanisms of antioxidant activity.," *BioFactors*, vol. 6, no. 4, pp. 391–397, 1997.
- [79] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007.

Literaturverzeichnis

- [80] B. M. Hybertson, B. Gao, S. K. Bose, and J. M. McCord, "Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation," *Mol. Aspects Med.*, vol. 32, no. 4–6, pp. 234–246, 2011.
- [81] M. McMahon, K. Itoh, M. Yamamoto, S. A. Chanas, C. J. Henderson, L. I. McLellan, C. R. Wolf, C. Cavin, and J. D. Hayes, "The cap 'n' collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 8, pp. 3299–3307, 2001.
- [82] J. W. Kaspar, S. K. Niture, and A. K. Jaiswal, "Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 9. pp. 1304–1309, 2009.
- [83] B. M. Hybertson and B. Gao, "Role of the Nrf2 signaling system in health and disease.," *Clin. Genet.*, 2014.
- [84] D. a. Bloom and A. K. Jaiswal, "Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by Protein Kinase C in Response to Antioxidants Leads to the Release of Nrf2 from INrf2, but Is Not Required for Nrf2 Stabilization/Accumulation in the Nucleus and Transcriptional Activation of Antioxidant Response Element," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 45, pp. 44675–44682, 2003.
- [85] H. C. Huang, T. Nguyen, and C. B. Pickett, "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 45, pp. 42769–42774, 2002.
- [86] K. Chan, R. Lu, J. C. Chang, and Y. W. Kan, "NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 24, pp. 13943–13948, 1996.
- [87] J. Lu and A. Holmgren, "The thioredoxin antioxidant system," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 66, pp. 75–87, 2014.
- [88] A. Holmgren and J. Lu, "Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 396, no. 1, pp. 120–124, 2010.
- [89] E. Lubos, J. Loscalzo, and D. E. Handy, "Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 15, no. 7, pp. 1957–1997, 2011.
- [90] A. Callegari, Y. Liu, C. C. White, A. Chait, P. Gough, E. W. Raines, D. Cox, T. J. Kavanagh, and M. E. Rosenfeld, "Gain and loss of function for glutathione synthesis: Impact on advanced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 11, pp. 2473–2482, 2011.

Literaturverzeichnis

- [91] R. Gozzelino, V. Jeney, and M. P. Soares, "Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 50, pp. 323–354, 2010.
- [92] S. Maynard, S. H. Schurman, C. Harboe, N. C. de Souza-Pinto, and V. A. Bohr, "Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 1. pp. 2–10, 2009.
- [93] D. M. Wilson and V. A. Bohr, "The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 6, no. 4, pp. 544–559, 2007.
- [94] T. Lindahl, "Instability and decay of the primary structure of DNA.," *Nature*, vol. 362, no. 6422, pp. 709–715, 1993.
- [95] T. Iyama and D. M. Wilson, "DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 12, no. 8, pp. 620–636, 2013.
- [96] R. D. Wood, M. Mitchell, J. Sgouros, and T. Lindahl, "Human DNA repair genes.," *Science*, vol. 291, no. 5507, pp. 1284–1289, 2001.
- [97] D. Sivilar, E. M. Goellner, K. H. Almeida, and R. W. Sobol, "Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 14, no. 12, pp. 2491–2507, 2011.
- [98] A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kaçmaz, and S. Linn, "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 73, pp. 39–85, 2004.
- [99] C. Beck, I. Robert, B. Reina-San-Martin, V. Schreiber, and F. Dantzer, "Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: Focus on PARP1, PARP2 and PARP3," *Exp. Cell Res.*, pp. 1–9, 2014.
- [100] X. Luo and W. Lee Kraus, "On par with PARP: Cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1," *Genes Dev.*, vol. 26, no. 5, pp. 417–432, 2012.
- [101] P. A. Nguewa, M. A. Fuertes, B. Valladares, C. Alonso, and J. M. Pérez, "Poly(ADP-ribose) polymerases: Homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 88, no. 1. pp. 143–172, 2005.
- [102] J. Diefenbach and A. Bürkle, "Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 7–8. pp. 721–730, 2005.
- [103] M. Y. Kim, T. Zhang, and W. L. Kraus, "Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal," *Genes and Development*, vol. 19, no. 17. pp. 1951–1967, 2005.

Literaturverzeichnis

- [104] A. Ivana Scovassi and M. Diederich, "Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells," in *Biochemical Pharmacology*, 2004, vol. 68, no. 6, pp. 1041–1047.
- [105] V. Schreiber, F. Dantzer, J.-C. Ame, and G. de Murcia, "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 7, pp. 517–528, 2006.
- [106] E. Petermann, C. Keil, and S. L. Oei, "Importance of poly(ADP-ribose) polymerases in the regulation of DNA-dependent processes," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 7–8, pp. 731–738, 2005.
- [107] D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva, and G. G. Poirier, "Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions.," *Biochem. J.*, vol. 342 (Pt 2, pp. 249–268, 1999.
- [108] J. M. de Murcia, C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F. J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon, and G. de Murcia, "Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 14, pp. 7303–7307, 1997.
- [109] S. Okano, L. Lan, K. W. Caldecott, T. Mori, and A. Yasui, "Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 11, pp. 3974–3981, 2003.
- [110] N. Schupp, U. Schmid, P. Rutkowski, U. Lakner, N. Kanase, A. Heidland, and H. Stopper, "Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 292, no. 5, pp. F1427–F1434, 2007.
- [111] U. Schmid, H. Stopper, F. Schweda, N. Queisser, and N. Schupp, "Angiotensin II induces DNA damage in the kidney," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 22, pp. 9239–9246, 2008.
- [112] S. Brand, K. Amann, and N. Schupp, "Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts," *J Hypertens*, vol. 31, no. 2, pp. 333–344, 2013.
- [113] M. Ito, M. I. Oliverio, P. J. Mannon, C. F. Best, N. Maeda, O. Smithies, and T. M. Coffman, "Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 8, pp. 3521–5, 1995.
- [114] K. K. Griendling, C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, and R. W. Alexander, "Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells," *Circ Res*, vol. 74, no. 6, pp. 1141–1148, 1994.

Literaturverzeichnis

- [115] M. Ushio-Fukai, A. Maziar Zafari, T. Fukui, N. Ishizaka, and K. K. Griending, "p22(phox) is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 38, pp. 23317–23321, 1996.
- [116] T. Heitzer, U. Wenzel, U. Hink, D. Krollner, M. Skatchkov, R. A. K. Stahl, R. Macharzina, J. H. Bräsen, T. Meinertz, and T. Münzel, "Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: Evidence for an involvement of protein kinase C," *Kidney Int.*, vol. 55, no. 1, pp. 252–260, 1999.
- [117] G. Fazeli, H. Stopper, R. Schinzel, C. W. Ni, H. Jo, and N. Schupp, "Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4," *Mutagenesis*, vol. 27, no. 6, pp. 673–681, 2012.
- [118] K. Schröder, M. Zhang, S. Benkhoff, A. Mieth, R. Pliquett, J. Kosowski, C. Kruse, P. Luedike, U. R. Michaelis, N. Weissmann, S. Dimmeler, A. M. Shah, and R. P. Brandes, "Nox4 Is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 9, pp. 1217–1225, 2012.
- [119] H. Husdan and A. Rapoport, "Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods.," *Clin. Chem.*, vol. 14, no. 3, pp. 222–238, 1968.
- [120] A. R. Collins and A. R. Collins, "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations.," *Mol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 3, pp. 249–61, 2004.
- [121] V. J. McKelvey-Martin, M. H. Green, P. Schmezer, B. L. Pool-Zobel, M. P. De Méo, and A. Collins, "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review.," *Mutat. Res.*, vol. 288, no. 1, pp. 47–63, 1993.
- [122] A. R. Collins, M. Dusinská, E. Horváthová, E. Munro, M. Savio, and R. Stětina, "Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay.," *Mutagenesis*, vol. 16, no. 4, pp. 297–301, 2001.
- [123] S. A. S. Langie, K. M. Cameron, K. J. Waldron, K. P. R. Fletcher, T. Von Zglinicki, and J. C. Mathers, "Measuring DNA repair incision activity of mouse tissue extracts towards singlet oxygen-induced DNA damage: A comet-based in vitro repair assay," *Mutagenesis*, vol. 26, no. 3, pp. 461–471, 2011.
- [124] O. Will, E. Gocke, I. Eckert, I. Schulz, M. Pflaum, H. C. Mahler, and B. Epe, "Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022," *Mutat. Res. - DNA Repair*, vol. 435, no. 1, pp. 89–101, 1999.

Literaturverzeichnis

- [125] B. Epe, M. Pflaum, and S. Boiteux, "DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems.," *Mutat. Res.*, vol. 299, no. 3–4, pp. 135–145, 1993.
- [126] M. Pflaum, S. Boiteux, and B. Epe, "Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells.," *Carcinogenesis*, vol. 15, no. 2, pp. 297–300, 1994.
- [127] J. E. Schneider, S. Price, L. Mardt, J. M. Gutteridge, and R. A. Floyd, "Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 631–635, 1990.
- [128] J. B. Hammond and N. J. Kruger, "The Bradford method for protein quantitation.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 3, pp. 25–32, 1988.
- [129] C. H. Cheng and R. D. Kuchta, "DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity.," *Biochemistry*, vol. 32, no. 33, pp. 8568–8574, 1993.
- [130] T. R. Jones, I. H. Kang, D. B. Wheeler, R. A. Lindquist, A. Papallo, D. M. Sabatini, P. Golland, and A. E. Carpenter, "CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens.," *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 482, 2008.
- [131] M. D. Abramoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram, "Image processing with imageJ," *Biophotonics International*, vol. 11, no. 7, pp. 36–41, 2004.
- [132] A. M. el Nahas, A. H. Bassett, G. H. Cope, and J. E. Le Carpentier, "Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring.," *Kidney Int.*, vol. 40, no. 1, pp. 29–34, 1991.
- [133] M. Véniant, D. Heudes, J. P. Clozel, P. Bruneval, and J. Ménard, "Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats.," *Kidney Int.*, vol. 46, no. 2, pp. 421–429, 1994.
- [134] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.," *Science*, vol. 239, no. 4839, pp. 487–491, 1988.
- [135] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [136] H. Castrop, "A role for AT1 receptor-associated proteins in blood pressure regulation," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 21, pp. 43–47, 2015.
- [137] S. Brand, K. Amann, P. Mandel, A. Zimnol, and N. Schupp, "Oxidative DNA Damage in Kidneys and Heart of Hypertensive Mice Is Prevented by

Literaturverzeichnis

- Blocking Angiotensin II and Aldosterone Receptors," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, p. e115715, 2014.
- [138] M. Rahman, S. Kimura, A. Nishiyama, H. Hitomi, G. Zhang, and Y. Abe, "Angiotensin II stimulates superoxide production via both angiotensin AT1A and AT1B receptors in mouse aorta and heart," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 485, no. 1–3, pp. 243–249, 2004.
- [139] M. J. Ryan, S. P. Didion, S. Mathur, F. M. Faraci, and C. D. Sigmund, "Angiotensin II-induced vascular dysfunction is mediated by the AT1A receptor in mice.," *Hypertension*, vol. 43, no. 5, pp. 1074–1079, 2004.
- [140] L. J. Roberts and J. D. Morrow, "Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo," in *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, vol. 28, no. 4, pp. 505–513.
- [141] J. L. Cracowski, T. Durand, and G. Bessard, "Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: Physiology, pharmacology and clinical implications," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 23, no. 8, pp. 360–366, 2002.
- [142] S. B. Cullinan, J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper, and J. A. Diehl, "The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 19, pp. 8477–8486, 2004.
- [143] K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, and Y. Nabeshima, "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 236, no. 2, pp. 313–322, 1997.
- [144] M. Osterod, S. Hollenbach, J. G. Hengstler, D. E. Barnes, T. Lindahl, and B. Epe, "Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice.," *Carcinogenesis*, vol. 22, no. 9, pp. 1459–1463, 2001.
- [145] W. M. Bonner, C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura, O. A. Sedelnikova, S. Solier, and Y. Pommier, "GammaH2AX and cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 12, pp. 957–967, 2008.
- [146] A. Sachse and G. Wolf, "Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 9, pp. 2439–2446, 2007.
- [147] M. de Gasparo, K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright, and T. Unger, "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 52, no. 3, pp. 415–472, 2000.
- [148] G. Aguilera, "Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 90, no. 1, pp. 53–60, 1992.

Literaturverzeichnis

- [149] S. Masilamani, G. H. Kim, C. Mitchell, J. B. Wade, and M. A. Knepper, "Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney.," *J. Clin. Invest.*, vol. 104, no. 7, pp. R19–R23, 1999.
- [150] X. C. Li, L. G. Navar, Y. Shao, and J. L. Zhuo, "Genetic deletion of AT1a receptors attenuates intracellular accumulation of ANG II in the kidney of AT1a receptor-deficient mice.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 293, no. 2, pp. F586–F593, 2007.
- [151] L. M. Harrison-Bernard, A. K. Cook, M. I. Oliverio, and T. M. Coffman, "Renal segmental microvascular responses to ANG II in AT1A receptor null mice.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 284, no. 3, pp. F538–F545, 2003.
- [152] M. I. Oliverio, C. F. Best, H. S. Kim, W. J. Arendshorst, O. Smithies, and T. M. Coffman, "Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation.," *Am. J. Physiol.*, vol. 272, no. 4 Pt 2, pp. F515–F520, 1997.
- [153] T. Sugaya, S. Nishimatsu, K. Tanimoto, E. Takimoto, T. Yamagishi, K. Imamura, S. Goto, K. Imaizumi, Y. Hisada, A. Otsuka, and et al., "Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia," *J Biol Chem*, vol. 270, no. 32, pp. 18719–18722, 1995.
- [154] S. D. Crowley, S. B. Gurley, M. J. Herrera, P. Ruiz, R. Griffiths, A. P. Kumar, H.-S. Kim, O. Smithies, T. H. Le, and T. M. Coffman, "Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 47, pp. 17985–17990, 2006.
- [155] X. C. Li, Y. Shao, and J. L. Zhuo, "AT1a receptor signaling is required for basal and water deprivation-induced urine concentration in AT1a receptor-deficient mice," *AJP: Renal Physiology*, vol. 303, no. 5. pp. F746–F756, 2012.
- [156] M. I. Oliverio and T. M. Coffman, "Angiotensin II Receptor Physiology Using Gene Targeting," *News Physiol Sci*, vol. 15, pp. 171–175, 2000.
- [157] J. L. Zhuo, J. D. Imig, T. G. Hammond, S. Orengo, E. Benes, and L. G. Navar, "Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT(1) receptor," *Hypertension*, vol. 39, no. 1, pp. 116–121, 2002.
- [158] D. J. Campbell, H. Krum, and M. D. Esler, "Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans," *Circulation*, vol. 111, no. 3, pp. 315–320, 2005.
- [159] Z. Zhu, S. H. Zhang, C. Wagner, a. Kurtz, N. Maeda, T. Coffman, and W. J. Arendshorst, "Angiotensin AT1B Receptor Mediates Calcium Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells of AT1A Receptor Deficient Mice," *Hypertension*, vol. 31, no. 5, pp. 1171–1177, 1998.

Literaturverzeichnis

- [160] T. Fujimoto, S. Takechi, M. Machida, N. Isu, W. Imamura, S. Kakinoki, K. Kanda, T. Kobayashi, and A. Nomura, "Excretions of urinary albumin and various proteins increase in hypertension.," *Blood Press.*, vol. 17, no. 5–6, pp. 270–273, 2008.
- [161] A. Benigni, D. Corna, C. Zoja, A. Sonzogno, R. Latini, M. Salio, S. Conti, D. Rottoli, L. Longaretti, P. Cassis, M. Morigi, T. M. Coffman, and G. Remuzzi, "Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 3, pp. 524–530, 2009.
- [162] M. I. Oliverio, K. Madsen, C. F. Best, M. Ito, N. Maeda, O. Smithies, and T. M. Coffman, "Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II.," *Am. J. Physiol.*, vol. 274, no. 1 Pt 2, pp. F43–F50, 1998.
- [163] C. Rüster and G. Wolf, "Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 22, no. 7, pp. 1189–1199, 2011.
- [164] G. Wolf, F. Ziyadeh, and R. Stahl, "Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells.," *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, vol. 77, no. 7, pp. 556–564, 1999.
- [165] S. Rosenkranz, "TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling," *Cardiovascular Research*, vol. 63, no. 3, pp. 423–432, 2004.
- [166] R. Bataller, R. F. Schwabe, Y. H. Choi, L. Yang, Y. H. Paik, J. Lindquist, T. Qian, R. Schoonhoven, C. H. Hagedorn, J. J. Lemasters, and D. A. Brenner, "NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis.," *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 9, pp. 1383–1394, 2003.
- [167] A. Doller, S. Gauer, E. Sobkowiak, H. Geiger, J. Pfeilschifter, and W. Eberhardt, "Angiotensin II induces renal plasminogen activator inhibitor-1 and cyclooxygenase-2 expression post-transcriptionally via activation of the mRNA-stabilizing factor human-antigen R.," *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 4, pp. 1252–1263, 2009.
- [168] A. B. Sanz, M. D. Sanchez-Niño, A. M. Ramos, J. A. Moreno, B. Santamaria, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, and A. Ortiz, "NF-kappaB in renal inflammation.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1254–1262, 2010.
- [169] J. H. M. Van Esch, F. Gembardt, A. Sterner-Kock, S. Heringer-Walther, T. H. Le, D. Laßner, T. Stijnen, T. M. Coffman, H. P. Schultheiss, A. H. J. Danser, and T. Walther, "Cardiac phenotype and angiotensin II levels in AT1a, AT 1b, and AT2 receptor single, double, and triple knockouts," *Cardiovasc. Res.*, vol. 86, no. 3, pp. 401–409, 2010.
- [170] X. C. Li and J. L. Zhuo, "In vivo regulation of AT1a receptor-mediated intracellular uptake of [125I]Val5-ANG II in the kidneys and adrenals of

- AT1a receptor-deficient mice.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 294, no. 2, pp. F293–302, 2008.
- [171] S. Feldt, W. W. Batenburg, I. Mazak, U. Maschke, M. Wellner, H. Kvakan, R. Dechend, A. Fiebeler, C. Burckle, A. Contrepas, A. H. J. Danser, M. Bader, G. Nguyen, F. C. Luft, and D. N. Muller, "Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide," *Hypertension*, vol. 51, no. 3, pp. 682–688, 2008.
- [172] Y. Huang, S. Wongamorntham, J. Kasting, D. McQuillan, R. T. Owens, L. Yu, N. A. Noble, and W. Border, "Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms.," *Kidney Int.*, vol. 69, no. 1, pp. 105–113, 2006.
- [173] Y. Huang, N. A. Noble, J. Zhang, C. Xu, and W. A. Border, "Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells.," *Kidney Int.*, vol. 72, no. 1, pp. 45–52, 2007.
- [174] M. Sakoda, A. Ichihara, Y. Kaneshiro, T. Takemitsu, Y. Nakazato, A. H. M. N. Nabi, T. Nakagawa, F. Suzuki, T. Inagami, and H. Itoh, "(Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells.," *Hypertens. Res.*, vol. 30, no. 11, pp. 1139–1146, 2007.
- [175] Y. Kaneshiro, A. Ichihara, T. Takemitsu, M. Sakoda, F. Suzuki, T. Nakagawa, M. Hayashi, and T. Inagami, "Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats.," *Kidney Int.*, vol. 70, no. 4, pp. 641–646, 2006.
- [176] T. Matsusaka, Y. Miyazaki, and I. Ichikawa, "The renin angiotensin system and kidney development.," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 64, pp. 551–561, 2002.
- [177] A. Nishiyama, L. Yao, Y. Nagai, K. Miyata, M. Yoshizumi, S. Kagami, S. Kondo, H. Kiyomoto, T. Shokoji, S. Kimura, M. Kohno, and Y. Abe, "Possible Contributions of Reactive Oxygen Species and Mitogen-Activated Protein Kinase to Renal Injury in Aldosterone/Salt-Induced Hypertensive Rats," *Hypertension*, vol. 43, no. 4, pp. 841–848, 2004.
- [178] A. Virdis, M. F. Neves, F. Amiri, E. Viel, R. M. Touyz, and E. L. Schiffrin, "Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress," *Hypertension*, vol. 40, no. 4, pp. 504–510, 2002.
- [179] A. D. Dobrian, S. D. Schriver, A. A. Khraibi, and R. L. Prewitt, "Pioglitazone Prevents Hypertension and Reduces Oxidative Stress in Diet-Induced Obesity," *Hypertension*, vol. 43, no. 1, pp. 48–56, 2004.

Literaturverzeichnis

- [180] Y. Higashi, S. Sasaki, K. Nakagawa, H. Matsuura, T. Oshima, and K. Chayama, "Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 25, pp. 1954–1962, 2002.
- [181] G. Y. H. Lip, E. Edmunds, S. L. Nuttall, M. J. Landray, A. D. Blann, and D. G. Beevers, "Oxidative stress in malignant and non-malignant phase hypertension.," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 16, no. 5, pp. 333–336, 2002.
- [182] V. M. Lee, P. A. Quinn, S. C. Jennings, and L. L. Ng, "Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia.," *J. Hypertens.*, vol. 21, no. 2, pp. 395–402, 2003.
- [183] N. Queisser, K. Amann, V. Hey, S. L. Habib, and N. Schupp, "Blood pressure has only minor influence on aldosterone-induced oxidative stress and DNA damage in vivo.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 54, pp. 17–25, 2013.
- [184] N. Queisser, K. Happ, S. Link, D. Jahn, A. Zimnol, A. Geier, and N. Schupp, "Aldosterone induces fibrosis, oxidative stress and DNA damage in livers of male rats independent of blood pressure changes," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 280, no. 3, pp. 399–407, 2014.
- [185] L. J. Janssen, "Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 280, no. 6, pp. L1067–L1082, 2001.
- [186] S. S. Fam and J. D. Morrow, "The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 10, no. 17, pp. 1723–1740, 2003.
- [187] D. F. Taber, J. D. Morrow, and L. J. Roberts, "A nomenclature system for the isoprostanes," *Prostaglandins*, vol. 53, no. 2, pp. 63–67, 1997.
- [188] L. J. Roberts and J. D. Morrow, "The generation and actions of isoprostanes," *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1345, no. 2, pp. 121–135, 1997.
- [189] J. F. Reckelhoff, H. Zhang, K. Srivastava, L. J. Roberts, J. D. Morrow, and J. C. Romero, "Subpressor doses of angiotensin II increase plasma F(2)-isoprostanes in rats.," *Hypertension*, vol. 35, no. 1 Pt 2, pp. 476–479, 2000.
- [190] D. Pratico, J. A. Lawson, and G. A. Fitzgerald, "Cylooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-Epi prostaglandin F2??," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 17, pp. 9800–9808, 1995.
- [191] T. Klein, K. Neuhaus, F. Reutter, and R. M. Nüsing, "Generation of 8-epi-prostaglandin F(2 α) in isolated rat kidney glomeruli by a radical-independent mechanism.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 133, no. 5, pp. 643–650, 2001.

Literaturverzeichnis

- [192] K. Höcherl, K. Wolf, H. Castrop, K. Ittner, M. Bucher, F. Kees, H. F. Grobecker, and A. Kurtz, "Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 442, no. 6, pp. 821–827, 2001.
- [193] K. Wolf, H. Castrop, A. Hartner, M. Goppelt-Strübe, K. F. Hilgers, and A. Kurtz, "Inhibition of the renin-angiotensin system upregulates cyclooxygenase-2 expression in the macula densa.," *Hypertension*, vol. 34, no. 3, pp. 503–507, 1999.
- [194] P. N. Seshiah, D. S. Weber, P. Rocic, L. Valppu, Y. Taniyama, and K. K. Griendling, "Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: Upstream mediators," *Circ. Res.*, vol. 91, no. 5, pp. 406–413, 2002.
- [195] K. Wingler, S. Wünsch, R. Kreutz, L. Rothermund, M. Paul, and H. H. H. W. Schmidt, "Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 31, no. 11, pp. 1456–1464, 2001.
- [196] J. Zhang, K. Chandrashekar, Y. Lu, Y. Duan, P. Qu, J. Wei, L. a Juncos, and R. Liu, "Enhanced expression and activity of Nox2 and Nox4 in the macula densa in ANG II-induced hypertensive mice.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 306, no. 3, pp. F344–50, 2014.
- [197] T. Chabrashvili, C. Kitiyakara, J. Blau, A. Karber, S. Aslam, W. J. Welch, and C. S. Wilcox, "Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 285, no. 1, pp. R117–R124, 2003.
- [198] B. Lassègue, D. Sorescu, K. Szöcs, Q. Yin, M. Akers, Y. Zhang, S. L. Grant, J. D. Lambeth, and K. K. Griendling, "Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways.," *Circ. Res.*, vol. 88, no. 9, pp. 888–894, 2001.
- [199] H. Peshavariya, F. Jiang, C. J. Taylor, S. Selemidis, C. W. T. Chang, and G. J. Dusting, "Translation-linked mRNA destabilization accompanying serum-induced Nox4 expression in human endothelial cells.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 10, pp. 2399–408, 2009.
- [200] A. Babelova, D. Avaniadi, O. Jung, C. Fork, J. Beckmann, J. Kosowski, N. Weissmann, N. Anilkumar, A. M. Shah, L. Schaefer, K. Schröder, and R. P. Brandes, "Role of Nox4 in murine models of kidney disease," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 53, no. 4, pp. 842–853, 2012.
- [201] T. Sousa, S. Oliveira, J. Afonso, M. Morato, D. Patinha, S. Fraga, F. Carvalho, and a. Albino-Teixeira, "Role of H₂O₂ in hypertension, renin-angiotensin system activation and renal medullary dysfunction caused by angiotensin II," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 166, no. 8, pp. 2386–2401, 2012.

Literaturverzeichnis

- [202] S. Wesseling, D. A. Ishola, J. A. Joles, H. A. Bluysen, H. A. Koomans, and B. Braam, "Resistance to oxidative stress by chronic infusion of angiotensin II in mouse kidney is not mediated by the AT2 receptor.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 288, no. 6, pp. F1191–F1200, 2005.
- [203] B. Yuan, M. Liang, Z. Yang, E. Rute, N. Taylor, M. Olivier, and A. W. Cowley, "Gene expression reveals vulnerability to oxidative stress and interstitial fibrosis of renal outer medulla to nonhypertensive elevations of ANG II.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 284, no. 5, pp. R1219–R1230, 2003.
- [204] J. E. Klaunig, L. M. Kamendulis, and B. A. Hocevar, "Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis.," *Toxicol. Pathol.*, vol. 38, no. 1, pp. 96–109, 2010.
- [205] S. K. Niture, A. K. Jain, and A. K. Jaiswal, "Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance.," *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 24, pp. 4452–4464, 2009.
- [206] P. Shelton and A. K. Jaiswal, "The transcription factor NF-E2-related factor 2 (nrf2): A protooncogene?," *FASEB Journal*, vol. 27, no. 2, pp. 414–423, 2013.
- [207] J. Alam and J. L. Cook, "How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 36, no. 2, pp. 166–174, 2007.
- [208] N. G. Abraham, J. Cao, D. Sacerdoti, X. Li, and G. Drummond, "Heme oxygenase: the key to renal function regulation.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 297, no. 5, pp. F1137–F1152, 2009.
- [209] T. Aizawa, N. Ishizaka, J. i Taguchi, R. Nagai, I. Mori, S. S. Tang, J. R. Ingelfinger, and M. Ohno, "Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats: possible role in renoprotection.," *Hypertension*, vol. 35, no. 3, pp. 800–806, 2000.
- [210] C. D. Zhan, R. K. Sindhu, J. Pang, A. Ehdaie, and N. D. Vaziri, "Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet," *J Hypertens*, vol. 22, no. 10, pp. 2025–2033, 2004.
- [211] N. D. Vaziri, M. Dicus, N. D. Ho, L. Boroujerdi-Rad, and R. K. Sindhu, "Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency," *Kidney Int.*, vol. 63, no. 1, pp. 179–185, 2003.
- [212] T. Ebrahimian, Y. He, E. L. Schiffrin, and R. M. Touyz, "Differential regulation of thioredoxin and NAD(P)H oxidase by angiotensin II in male and female mice," *J Hypertens*, vol. 25, no. 6, pp. 1263–1271, 2007.

Literaturverzeichnis

- [213] M. Tanito, H. Nakamura, Y.-W. Kwon, A. Teratani, H. Masutani, K. Shioji, C. Kishimoto, A. Ohira, R. Horie, and J. Yodoi, "Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats.," *Antioxidants & redox signaling*, vol. 6, no. 1, pp. 89–97, 2004.
- [214] M. Podhorecka, A. Skladanowski, and P. Bozko, "H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy.," *J. Nucleic Acids*, vol. 2010, 2010.
- [215] I. H. Ismail and M. J. Hendzel, "The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more?," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 49, no. 1, pp. 73–82, 2008.
- [216] D. M. Seiler, J. Rouquette, V. J. Schmid, H. Strickfaden, C. Ottmann, G. A. Drexler, B. Mazurek, C. Greubel, V. Hable, G. Dollinger, T. Cremer, and A. A. Friedl, "Double-strand break-induced transcriptional silencing is associated with loss of tri-methylation at H3K4," *Chromosom. Res.*, vol. 19, no. 7, pp. 883–899, 2011.
- [217] R. Krishnakumar and W. L. Kraus, "The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets," *Mol. Cell*, vol. 39, no. 1, pp. 8–24, 2010.
- [218] E. Barkauskaite, G. Jankevicius, A. G. Ladurner, I. Ahel, and G. Timinszky, "The recognition and removal of cellular poly(ADP-ribose) signals," *FEBS Journal*, vol. 280, no. 15, pp. 3491–3507, 2013.
- [219] T. J. Guzik and K. K. Griendling, "NADPH oxidases: molecular understanding finally reaching the clinical level?," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 10, pp. 2365–70, 2009.
- [220] A. C. Montezano and R. M. Touyz, "Reactive Oxygen Species, Vascular Nox, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, no. 1, pp. 164–182, 2014.
- [221] G. R. Drummond, S. Selemidis, K. K. Griendling, and C. G. Sobey, "Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 6, pp. 453–71, 2011.
- [222] S. Altenhöfer, K. a Radermacher, P. W. M. Kleikers, K. Wingler, and H. H. H. W. Schmidt, "Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement.," *Antioxid. Redox Signal.*, pp. 1–64, 2014.
- [223] E. Cifuentes-Pagano, G. Csanyi, and P. J. Pagano, "NADPH oxidase inhibitors: A decade of discovery from Nox2ds to HTS," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 69, no. 14, pp. 2315–2325, 2012.

Literaturverzeichnis

- [224] E. Cifuentes-Pagano, D. N. Meijles, and P. J. Pagano, "The quest for selective nox inhibitors and therapeutics: challenges, triumphs and pitfalls.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, no. 17, pp. 2741–54, 2014.
- [225] A. C. Montezano, M. Dulak-lis, A. Harvey, A. M. Briones, and R. M. Touyz, "Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies," vol. 31, 2015.
- [226] O. Basset, C. Deffert, M. Foti, K. Bedard, V. Jaquet, E. Ogier-Denis, and K. H. Krause, "NADPH oxidase 1 deficiency alters caveolin phosphorylation and angiotensin II-receptor localization in vascular smooth muscle," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 10, pp. 2371–2384, 2009.
- [227] E. Y. Lai, G. Solis, Z. Luo, M. Carlstrom, K. Sandberg, S. Holland, A. Wellstein, W. J. Welch, and C. S. Wilcox, "p47(phox) is required for afferent arteriolar contractile responses to angiotensin II and perfusion pressure in mice," *Hypertension*, vol. 59, no. 2, pp. 415–420, 2012.
- [228] H. D. Wang, S. Xu, D. G. Johns, Y. Du, M. T. Quinn, a J. Cayatte, and R. a Cohen, "Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice.," *Circ. Res.*, vol. 88, no. 9, pp. 947–953, 2001.
- [229] J. K. Bendall, A. C. Cave, C. Heymes, N. Gall, and A. M. Shah, "Pivotal role of a gp91phox-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice," *Circulation*, vol. 105, pp. 293–296, 2002.
- [230] M. W. Manning, L. a Cassis, and A. Daugherty, "Differential effects of doxycycline, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms.," *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 23, no. 3, pp. 483–8, 2003.
- [231] R. M. Touyz, C. Mercure, Y. He, D. Javeshghani, G. Yao, G. E. Callera, A. Yogi, N. Lochard, and T. L. Reudelhuber, "Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase," *Hypertension*, vol. 45, no. 4, pp. 530–537, 2005.
- [232] S. Johar, "Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase," *FASEB J.*, vol. 20, no. 9, pp. 1546–1548, 2006.
- [233] A. Koroshi, "Microalbuminuria, is it so important?," *Hippokratia*, vol. 11, no. 3, pp. 105–7, 2007.
- [234] V. Thallas-Bonke, J. C. Jha, S. P. Gray, D. Barit, H. Haller, H. H. H. W. Schmidt, M. T. Coughlan, M. E. Cooper, J. M. Forbes, and K. a M. Jandeleit-Dahm, "Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- α -associated mechanisms in diabetic nephropathy.," *Physiol. Rep.*, vol. 2, no. 11, pp. 1–13, 2014.

- [235] Y.-H. You, S. Okada, S. Ly, K. Jandeleit-Dahm, D. Barit, T. Namikoshi, and K. Sharma, "Role of Nox2 in diabetic kidney disease.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 304, no. 7, pp. F840–8, 2013.
- [236] O. Jung, J. G. Schreiber, H. Geiger, T. Pedrazzini, R. Busse, and R. P. Brandes, "gp91phox-Containing NADPH Oxidase Mediates Endothelial Dysfunction in Renovascular Hypertension," *Circulation*, vol. 109, pp. 1795–1801, 2004.
- [237] J. D. Pollock, D. A. Williams, M. A. Gifford, L. L. Li, X. Du, J. Fisherman, S. H. Orkin, C. M. Doerschuk, and M. C. Dinauer, "Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production.," *Nat. Genet.*, vol. 9, no. 2, pp. 202–209, 1995.
- [238] S. Nlandu Khodo, E. Dizin, G. Sossauer, I. Szanto, P.-Y. Martin, E. Feraille, K. H. Krause, and S. de Seigneux, "NADPH-Oxidase 4 Protects against Kidney Fibrosis during Chronic Renal Injury," *J. Am. Soc. Nephrol.*, pp. 1967–1976, 2012.
- [239] C. Kleinschnitz, H. Grund, K. Wingler, M. E. Armitage, E. Jones, M. Mittal, D. Barit, T. Schwarz, C. Geis, P. Kraft, K. Barthel, M. K. Schuhmann, A. M. Herrmann, S. G. Meuth, G. Stoll, S. Meurer, A. Schrewe, L. Becker, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, T. Klopstock, M. H. de Angelis, K. Jandeleit-Dahm, A. M. Shah, N. Weissmann, and H. H. H. W. Schmidt, "Post-stroke inhibition of induced NADPH Oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration," *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 9, p. 1000478, 2010.
- [240] J. Kuroda, T. Ago, S. Matsushima, P. Zhai, M. D. Schneider, and J. Sadoshima, "NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 35, pp. 15565–15570, 2010.
- [241] R. L. Chevalier, M. S. Forbes, and B. a Thornhill, "Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy.," *Kidney Int.*, vol. 75, no. 11, pp. 1145–1152, 2009.
- [242] J. a. Byrne,* , "Contrasting Roles of NADPH Oxidase Isoforms in Pressure-Overload Versus Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy," *Circ. Res.*, vol. 93, no. 9, pp. 802–805, 2003.
- [243] J. D. Lambeth, T. Kawahara, and B. Diebold, "Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 3, pp. 319–331, 2007.
- [244] K. Schroder, M. Zhang, S. Benkhoff, a. Mieth, R. Pliquett, J. Kosowski, C. Kruse, P. Luedike, U. R. Michaelis, N. Weissmann, S. Dimmeler, a. M. Shah, and R. P. Brandes, "Nox4 Is a Protective Reactive Oxygen Species Generating Vascular NADPH Oxidase," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 9, pp. 1217–1225, 2012.

Literaturverzeichnis

- [245] S. I. Dikalov, A. E. Dikalova, A. T. Bikineyeva, H. H. H. W. Schmidt, D. G. Harrison, and K. K. Griendling, "Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 45, no. 9, pp. 1340–1351, 2008.
- [246] J. R. Burgoyne, M. Madhani, F. Cuello, R. L. Charles, J. P. Brennan, E. Schröder, D. D. Browning, and P. Eaton, "Cysteine redox sensor in PKG α enables oxidant-induced activation.," *Science (80-.)*, vol. 317, no. 5843, pp. 1393–7, 2007.
- [247] H. Cai, "Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences," *Cardiovasc. Res.*, vol. 68, no. 1, pp. 26–36, 2005.
- [248] R. Ray, C. E. Murdoch, M. Wang, C. X. Santos, M. Zhang, S. Alom-Ruiz, N. Anilkumar, A. Ouattara, A. C. Cave, S. J. Walker, D. J. Grieve, R. L. Charles, P. Eaton, A. C. Brewer, and A. M. Shah, "Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 6, pp. 1368–1376, 2011.
- [249] N. K. Idriss, A. D. Blann, and G. Y. H. Lip, "Hemoxygenase-1 in Cardiovascular Disease," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, no. 12, pp. 971–978, 2008.
- [250] C. Deffert, J. Cachat, and K.-H. Krause, "Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections.," *Cell. Microbiol.*, vol. 16, no. July, pp. 1–27, 2014.
- [251] P. Modlinger, T. Chabrashvili, P. S. Gill, M. Mendonca, D. G. Harrison, K. K. Griendling, M. Li, J. Raggio, A. Wellstein, Y. Chen, W. J. Welch, and C. S. Wilcox, "RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slow pressor response.," *Hypertension*, vol. 47, no. 2, pp. 238–44, 2006.
- [252] F. E. Rey, M. E. Cifuentes, A. Kiarash, M. T. Quinn, and P. J. Pagano, "Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice.," *Circ Res*, vol. 89, no. 5, pp. 408–414, 2001.
- [253] A. Yogi, C. Mercure, J. Touyz, G. E. Callera, A. C. I. Montezano, A. B. Aranha, R. C. Tostes, T. Reudelhuber, and R. M. Touyz, "Renal redox-sensitive signaling, but not blood pressure, is attenuated by Nox1 knockout in angiotensin II-dependent chronic hypertension.," *Hypertension*, vol. 51, no. 2, pp. 500–6, 2008.
- [254] K. Matsuno, "Nox1 Is Involved in Angiotensin II-Mediated Hypertension: A Study in Nox1-Deficient Mice," *Circulation*, vol. 112, no. 17, pp. 2677–2685, 2005.

Literaturverzeichnis

- [255] G. Gavazzi, B. Banfi, C. Deffert, L. Fiette, M. Schappi, F. Herrmann, and K.-H. Krause, "Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice," *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 2, pp. 497–504, 2006.
- [256] R. M. Carey, "The Intrarenal Renin-Angiotensin System in Hypertension," *Adv. Chronic Kidney Dis.*, vol. 22, no. 3, pp. 204–210, 2015.
- [257] H. Motohashi and M. Yamamoto, "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 10, no. 11, pp. 549–557, 2004.

Danksagung

DANKSAGUNG

Zu aller erst geht ein besonderer Dank an Frau PD Dr. Nicole Schupp für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Toxikologie anfertigen zu dürfen. Vielen Dank Nicole, für die tolle Betreuung, dein offenes Ohr und für all deine Hilfestellungen.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Krohne aus der Fakultät für Biologie für die Bereitschaft meine Doktorarbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Dr. Gerhard Fritz und an seine Arbeitsgruppen, die mich so herzlich im Labor am Institut für Toxikologie in Düsseldorf aufgenommen und mich bei allem unterstützt haben.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Ralf Brandes und bei Frau PD Dr. Katrin Schröder für die Bereitstellung der Nox4-Knockout Mäuse.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Kerstin Amann vom Institut für Pathologie aus Erlangen für die Zusammenarbeit im Hinblick auf histopathologische Untersuchungen der Niere.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Andreas Geier vom Uniklinikum Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Abteilung für Hepatologie, für die Zusammenarbeit im Hinblick auf die Durchführung der qPCR-Experimente. Ebenso danke ich Herrn Dr. Daniel Jahn für die kompetente Beratung und Hilfestellung.

Vielen Dank an die DFG und die Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Verena Ziegler und Christina Hartmann, die mich bei der Ausarbeitung und Korrektur meiner Dissertation fachlich und emotional unterstützt und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Danksagung

Nicht zu vergessen sind Miriam Kral, Birgit Opgenoorth, Laura Vogel, Silvana Wunram und Kathrin Happ, die mir bei der Durchführung der Tierversuche und bei vielen Experimenten eine große Hilfe waren. Vielen lieben Dank!

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kollegen und Kolleginnen der AG Schupp und AG Stopper für drei wundervolle Jahre an der Toxikologie in Würzburg. Insbesondere bedanke ich mich bei Miriam, Kathrin, Nina, Susl, Silvi und Laura für die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor und für entspannte und lustige Mittagspausen.

Ein ebenso großes Dankeschön geht auch an alle Kollegen und Kolleginnen vom Institut für Toxikologie in Düsseldorf. Die Zeit war unvergesslich und ging leider viel zu schnell vorbei. Vor allem danke ich Christina, Verena, Nina, Gina, Sarah, Kathrin, Alex und Andy!

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Oma bedanken, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt und motiviert haben. Danke, dass ihr immer für mich da gewesen seid.

Eidesstattliche Erklärung

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Relevanz des Angiotensin II Typ 1a-Rezeptors und der NADPH-Oxidase für die Entstehung Angiotensin II-vermittelter DNA-Schäden“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 14.01.2016

Anna Zimnol