

Oxidativer Stress und DNA-Schäden induziert durch das Peptidhormon Angiotensin II *in vivo*

Identifizierung des AT₁-Rezeptors und reaktiver Sauerstoffspezies als ursächliche Faktoren

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

vorgelegt von
Susanne Brand
aus Schweinfurt

Würzburg 2012

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am: 21.12.2012

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Frau PD Dr. Nicole Schupp
2. Gutacher: Frau Prof. Dr. Leane Lehmann

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer:.....
2. Prüfer:.....
3. Prüfer:.....

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Erhöhtes Nierenzellkarzinomrisiko bei Hypertoniepatienten	6
1.2 Die hormonelle Kaskade zur Regulierung des Blutdrucks: das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	7
1.2.1 Der AT ₁ -Rezeptor und weitere Subtypen der Angiotensin-Rezeptoren	9
1.2.2 Der AT ₁ -Rezeptor-Signalweg	10
1.3 Folgen erhöhter Angiotensin II-Spiegel.....	12
1.4 Oxidativer Stress.....	13
1.4.1 Die NADPH-Oxidase	14
1.4.2 Folgen erhöhter Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies.....	15
1.5 Die Poly-ADP-Ribosylierung als Reparaturmechanismus	16
1.6 ROS-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.....	18
1.6.1 Der Transkriptionsfaktor Nrf2.....	19
1.6.1.1 Hämoxygenase-1	20
1.6.2 Der Transkriptionsfaktor NF-κB	21
2. Zielsetzung der Arbeit	24
3. Material und Methoden	26
3.1 Material	26
3.1.1 Versuchstiere	26
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	26
3.1.3 Blutdruckmessgerät	26
3.2 Methoden	26
3.2.1 Dosisversuch	26
3.2.2 Interventionsversuch.....	28
3.2.3 Comet Assay.....	30
3.2.4 Immunhistochemie.....	31
3.2.4.1 ABC-DAB-Reaktion	32
3.2.4.2 Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	33
3.2.4.3 Amplifizierung mit Hilfe von TSA	34
3.2.4.4 BrdU In-Situ Kit.....	35
3.2.4.5 Quantifizierung	36
3.2.5 Immunfluoreszenz.....	36
3.2.6 Proteinchemie: Western Blot	37
3.2.7 Semiquantitative Untersuchung der Niere / Histopathologie.....	39
3.2.7.1 Mesangiolyseindex (MSI)/ Glomeruloskleroseindex (GSI)	39
3.2.7.2 Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI).....	40
3.2.7.3 Vaskulärer Schädigungsindex.....	41
3.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	42
3.2.8.1 Sandwich-ELISA.....	42
3.2.8.1.1 NGAL ELISA-Kit.....	43
3.2.8.1.2 Albumin Elisa-Kit	43

3.2.8.2 Kompetitiver ELISA	44
3.2.8.2.1 Aldosteron ELISA-Kit	45
3.2.9 Klinische Parameter	46
3.2.10 Quantifizierung von 8-OxodG mittels Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS)	46
3.2.11 Statistik	47
4. Ergebnisse.....	48
4.1 Dosisversuch.....	48
4.1.1 Veränderung des Blutdrucks durch steigende Angiotensin II-Konzentrationen	48
4.1.2 Gewichtsparameter.....	49
4.1.3 Nierenfunktionsparameter	49
4.1.4 Histopathologische Veränderungen durch die Angiotensin II-Behandlung	50
4.1.4.1 GSI/MSI	50
4.1.4.2 TSI	51
4.1.4.3 VSI.....	52
4.1.5 Proliferationsindex	52
4.1.6 Angiotensin II-Behandlung erhöht Angiotensin II-Gehalt in der Niere.....	53
4.1.7 Angiotensin II-Behandlung führt zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) .	53
4.1.8 Angiotensin II-Behandlung führt zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	55
4.1.8.1 γ -H2AX als Marker für Doppelstrangbrüche im Zusammenhang mit Apoptose.....	56
4.1.9 Angiotensin II-Behandlung führt zur Bildung von 8-OxodG in der Niere	58
4.2 Interventionsversuch.....	59
4.2.1 Veränderung des Blutdrucks durch die einzelnen Interventionen	59
4.2.2 Gewichtsparameter.....	60
4.2.3 Nierenfunktionsparameter	61
4.2.3.1 Albuminausscheidung	61
4.2.4 Histopathologische Veränderungen.....	62
4.2.4.1 GSI/MSI	62
4.2.4.2 TSI	62
4.2.4.3 VSI.....	64
4.2.5 Angiotensin II-Behandlung senkt AT ₁ -Rezeptordichte in der Niere.....	64
4.2.6 Verminderung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Interventionen	65
4.2.7 Interventionen reduzieren Angiotensin II-induzierte Bildung struktureller DNA-Schäden ...	68
4.2.7.1 Nachweis von DNA-Schäden im Comet Assay.....	68
4.2.7.2 Immunhistochemischer Nachweis von Doppelstrangbrüchen	69
4.2.7.3 Vergleich Apoptose/Doppelstrangbrüche.....	70
4.2.8 Angiotensin II induziert die DNA-Reparatur-Aktivität in der Niere und im Herzen	71
4.2.9 Angiotensin II induziert die Expression von NOX 4 in Tubuluszellen der Niere	74
4.2.10 Angiotensin II induziert die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.....	75
4.2.10.1 Angiotensin II induziert die Aktivierung von NF- κ B	75
4.2.10.2 Angiotensin II induziert die Aktivierung von Nrf2.....	76

4.2.11 Angiotensin II-induzierte Aktivierung von Nrf2 führt zu einer erhöhten Expression des Nrf2-regulierten Gens Hämoxxygenase-1 (HO-1)	79
5. Diskussion	80
5.1 Dosisversuch	80
5.1.1 Nierenfunktionsparameter	80
5.1.2 Angiotensin II-Behandlung induziert histopathologische Veränderungen der Niere	82
5.1.3 Angiotensin II-Behandlung induziert oxidativen Stress und die Entstehung von Doppelstrangbrüchen.....	83
5.2 Interventionsversuch	86
5.2.1 Angiotensin II-Behandlung induziert erhöhte Albuminausscheidung in hypertensiven Tieren aufgrund histopathologischer Schäden	87
5.2.2 Reduktion der Angiotensin II-induzierten Bildung von oxidativen Schäden durch die Interventionen	88
5.2.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	93
5.2.4 Der Transkriptionsfaktor Nrf2.....	95
6. Zusammenfassung	99
7. Summary	102
8. Abkürzungsverzeichnis	104
9. Literaturverzeichnis	106
Danksagung	115
Eidesstattliche Erklärung	116

1. Einleitung

1.1 Erhöhtes Nierenzellkarzinomrisiko bei Hypertoniepatienten

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen Hypertonie und einem erhöhten Nierenkrebsrisiko besteht [1]. Hypertonie ist eine häufig auftretende Erkrankung, die heute über 25% der Weltbevölkerung betrifft. Das Auftreten chronischer Nierenerkrankungen nimmt ebenfalls zu, wobei über 20 Millionen Menschen allein in den Vereinigten Staaten von Amerika betroffen sind [2]. Eine Metaanalyse von unter anderem 13 Fall-Kontroll-Studien konnte einen Zusammenhang zwischen Hypertonie und einem erhöhten Risiko, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken, nachweisen [1]. Tatsächlich konnten klinische Studien an hypertensiven Patienten eine Verdopplung des Risikos an Nierenzellkarzinom zu erkranken feststellen. Die Studie zeigte auch, dass das Risiko ansteigt, je länger die Patienten an Hypertonie erkrankt waren [3]. Der genaue Zusammenhang zwischen Hypertonie und der Entstehung von Krebs ist allerdings noch nicht geklärt. Mögliche Mechanismen wurden jedoch diskutiert: Erhöhte Spiegel an Inositoltriphosphat (IP_3) und zytosolischem Calcium sind wahrscheinlich involviert in der Pathogenese von Bluthochdruck und ebenso in den ersten Stufen der Zellteilung, welche durch endogene Mitogene und Onkogene aktiviert werden kann. Die Spiegel an IP_3 und zytosolischem Calcium werden durch Peptidhormone reguliert, die zum einen an der Regulierung des Bluthochdrucks beteiligt sind und zum anderen ebenfalls mitogene Effekte besitzen. Zu diesen Peptidhormonen zählen Angiotensin II (Ang II), Catecholamine, Vasopressin, Insulin und Wachstumshormone [4]. Des Weiteren wurden im Zusammenhang mit Hypertonie Veränderungen in der Kontrolle des Zelltodes durch Apoptose festgestellt. Apoptose kann das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen kontrollieren, welche, wenn beeinträchtigt, zu einem übermäßigen Zellwachstum während der Krebsentstehung führen kann [5]. Ein weiterer Aspekt, der darauf hindeutet, dass Hypertonie im Zusammenhang mit einem Nierenzellkarzinom steht, ist die Tatsache, dass bei Hypertoniepatienten eine erhöhte Lipidperoxidation festgestellt wurde, die zumindest zum Teil an der Ausbildung von Krebs beteiligt sein kann [6]. Abschließend könnte auch die Verbindung zwischen Hypertonie und Krebs auf gemeinsame Faktoren wie Alter, Rauchen, Alkoholkonsum und Übergewicht bezogen werden, sowie gemeinsame zelluläre und molekulare Kenngrößen von Hypertonie und Krebs [7, 8].

Einleitung

Eine weitere Möglichkeit, die den Zusammenhang klären möchte, ob Hypertoniepatienten ein erhöhtes Risiko haben, an Nierenzellkarzinom zu erkranken, stellt die Hypothese dar, dass die antihypertensive Medikation zur Krebsentwicklung beitragen könnte. Studien haben gezeigt, dass antihypertensive Medikamente wie Calciumkanalblocker und auch Diuretika mit einem Nierenzellkarzinom assoziiert sind [9, 10]. Weiterführende Studien konnten allerdings auch bei anderen antihypertensiven Therapien diesen Effekt nachweisen [9]. Auf der anderen Seite gab es auch Untersuchungen, die keinen Zusammenhang zwischen verschiedenen antihypertensiven Therapien und dem Nierenzellkarzinom finden konnten [11]. Diese Tatsache und auch, dass verschiedene Therapien mit Nierenzellkarzinom in Verbindung gebracht werden, lässt darauf schließen, dass der Bluthochdruck selbst der auslösende Faktor ist [3, 12]. Diese Schlussfolgerung wird untermauert zum einen durch die Erkenntnis, dass bei Patienten, die nicht unter Bluthochdruck leiden, aus anderen Gründen aber trotzdem antihypertensive Medikamente erhielten, kein erhöhtes Nierenzellkarzinomrisiko vorliegt. Zum anderen zeigen Bluthochdruckpatienten, die sehr schlecht eingestellt sind, das höchste Risiko für ein Nierenzellkarzinom [3].

1.2 Die hormonelle Kaskade zur Regulierung des Blutdrucks: das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das RAAS kontrolliert hauptsächlich die Funktion des Herz-Kreislauf-Systems und hat ebenso Einfluss auf die Funktion der Niere. Das RAAS reguliert den Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt des Körpers und wirkt somit in entscheidender Weise auf den Blutdruck ein [13]. Der geschwindigkeitsbestimmende erste Schritt des RAAS stellt die Synthese von Renin in den juxtaglomerulären Zellen dar [14]. Dabei wird proteolytisch eine Aminosäure vom N-Terminus des Vorläuferproteins Prorenin abgespalten. Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen gespeichert und seine Sekretion von verschiedenen Faktoren bestimmt: Ein Abfall des Blutdrucks, eine Verringerung des Blutvolumens, Veränderungen im Elektrolythaushalt oder sympathische Nervenstimulation über den beta-1 adrenergen Rezeptor können eine Ausschüttung von Renin in den systemischen Kreislauf bewirken [15]. Renin kann so auch zu anderen Organen gelangen und dort lokale RAAS wie zum Beispiel in Niere, Herz oder Gehirn aktivieren [14, 16]. Renin spaltet Angiotensinogen zu dem biologisch inaktiven Dekapeptid Angiotensin I (Ang I oder Ang-(1-10)) (Abb. 1) [17].

Einleitung

Angiotensinogen wird hauptsächlich konstitutiv von der Leber sekretiert, so dass Plasmaspiegel generell stabil bleiben. Das inaktive Dekapeptid Ang I wird durch das Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE), welches das c-terminale Dipeptid entfernt, in das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II oder Ang-(1-8)) umgewandelt. ACE ist eine membrangebundene Exopeptidase, die auf Plasmamembranen von verschiedenen Zelltypen zu finden ist; u.a. auf Gefäßendothelzellen, Neuroepithelzellen und im Besonderen auch auf dem Bürstensaum von proximalen Tubuluszellen der Niere [14, 15]. ACE metabolisiert auch eine Reihe anderer Peptide wie die vasodilatatorisch wirkenden Peptide Bradykinin und Kallidin zu inaktiven Metaboliten. Das Enzym ACE bewirkt somit einerseits eine verminderte gefäßerweiternde Wirkung und andererseits eine erhöhte vasokonstriktorische Wirkung, vermittelt über Ang II [15]. Neben dem ACE-vermittelten Weg der Ang II-Synthese existieren im Herzen, in der Niere, den Nebennieren und dem Gehirn noch andere Möglichkeiten Ang II zu synthetisieren [18]. Lokale Enzymsysteme, wie zum Beispiel Chymase und Cathepsin, können Ang I unabhängig von ACE in Ang II überführen. Ang II kann auch direkt aus Angiotensinogen durch Gewebelasminogenfaktoren (t-PA) oder Tonin gebildet werden [19]. Ang II ist zwar das primär aktive Produkt des RAAS, allerdings gibt es Hinweise auf andere Metabolite, die auch eine biologische Aktivität, vor allem im Gewebe, besitzen. Ang III und Ang IV werden in Geweben synthetisiert, die einen hohen Gehalt an den Aminopeptidasen A und N besitzen, wie zum Beispiel Gehirn und Niere. Ang IV, ein Hexapeptid, das durch enzymatischen Abbau aus Ang III entsteht (Abb. 1), soll einen kooperativen Effekt in Bezug auf den Ang II-Signalweg im Gehirn und somit dort einen Einfluss auf den Blutdruck besitzen [20]. Ein weiteres Peptid, das aus Ang II gebildet werden kann, stellt das Heptapeptid Ang-(1-7) dar. Verantwortlich hierfür ist das Enzym ACE 2, welches allerdings nicht in der Lage ist, Ang I in Ang II umzuwandeln. Ang-(1-7) fördert Vasodilatation und besitzt Wachstumshindernde Eigenschaften. Diese Effekte werden nicht über den AT₁-oder AT₂-Rezeptor, sondern vermutlich über den Mas-Rezeptor vermittelt [21].

Die Effekte aller Angiotensin-Peptide werden über spezifische Rezeptoren vermittelt, die auf der Zelloberfläche sitzen. Der AT₁-Rezeptor in Verbindung mit Ang II vermittelt die meisten der Effekte, während der AT₂-Rezeptor diese Effekte antagonisiert [13].

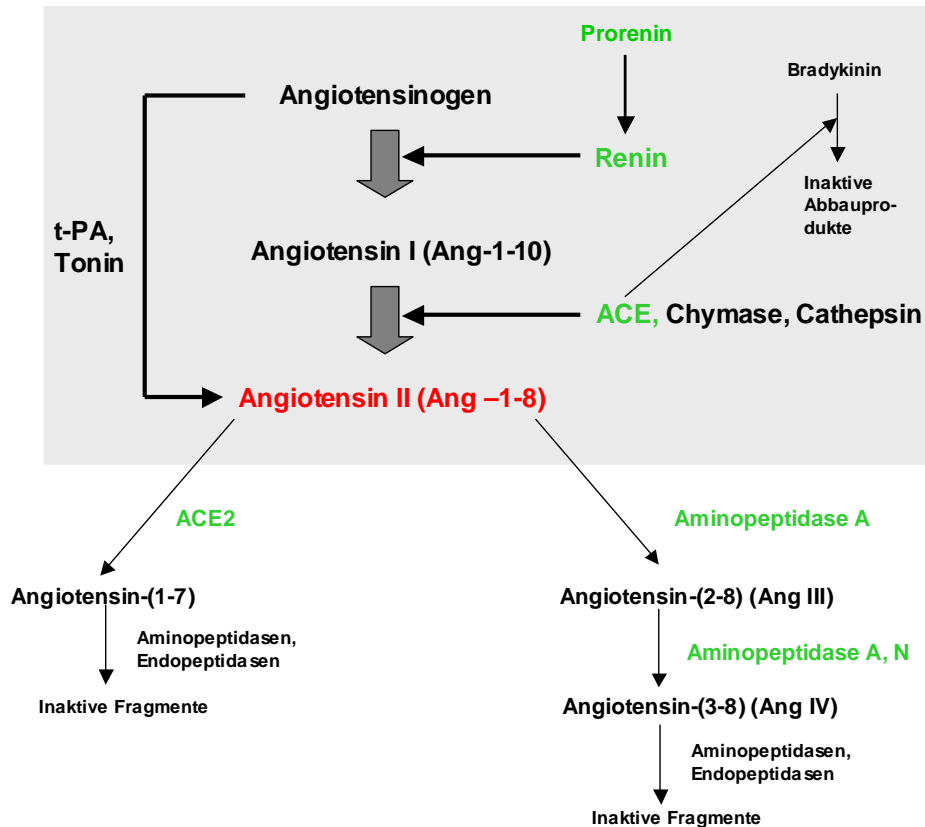


Abb. 1: Übersicht über das Renin-Angiotensin-System.

Der klassische Weg ist grau hinterlegt. Enzyme sind in grün dargestellt. Renin spaltet Angiotensinogen zu Angiotensin I. Angiotensin I wird dann vom Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. t-PA (gewebespezifischer Plasminogenaktivator). © Modifiziert nach Schmieder [13].

1.2.1 Der AT_1 -Rezeptor und weitere Subtypen der Angiotensin-Rezeptoren

Ang II, der Haupteffektor des RAAS, vermittelt seine Effekte über zwei G-Proteingekoppelte Rezeptoren, dem AT_1 - und AT_2 -Rezeptor. Während Menschen nur den AT_1 -Rezeptor besitzen, existieren in Nagetieren zwei Isoformen (AT_{1a} und AT_{1b}) [22]. Exprimiert wird der AT_1 -Rezeptor in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen von Niere, Nebenniere, Herz, Leber, Gehirn, Ovarien, Hoden und Lunge. Der AT_2 -Rezeptor wird in fetalem Gewebe sehr stark exprimiert, während seine Ausbildung nach der Geburt sehr stark zurückgeht. Er ist in geringem Ausmaß nur noch in einigen Organen wie Niere, Nebenniere, Herz, Gehirn und Ovarien zu finden [23]. In der Niere eines Erwachsenen ist ebenfalls eine größere Anzahl an AT_1 -Rezeptoren im Vergleich zu AT_2 -Rezeptoren zu finden. AT_1 -Rezeptoren in der Niere sind u.a. in folgenden Geweben zu finden: auf glatten Gefäßmuskelzellen der Gefäße, einschließlich afferenten und efferenten Arteriolen, auf dem Bürstensaum und

Einleitung

basolateralen Membranen von proximalen Tubuluszellen, in Epithelzellen des aufsteigenden Asts der Henleschleife und im Sammelrohr. In den Glomeruli sitzen sie auf Podozyten, Macula-densa-Zellen und auf Mesangiumzellen. AT_1 und AT_2 -Rezeptoren wurden zudem im juxtaglomerulären Apparat gefunden [14].

Wie bereits erwähnt ist Ang II der Haupteffektor von RAAS-induzierten physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen. Seine Wirkung wird vorwiegend über den AT_1 -Rezeptor vermittelt. Dazu gehören Effekte auf das kardiovaskuläre System wie Vasokonstriktion, Erhöhung des Blutdrucks und Hypertrophie von Gefäß- und Herzmuskelzellen. Auf die Niere wirkt Ang II in Form einer Natriumreabsorption und einer negativen Rückkopplung bezüglich der Renin-Sekretion. Des Weiteren hat Ang II Einfluss auf das sympathische Nervensystem und stimuliert die Nebennierenrinde zur Aldosteronsekretion. Aldosteron wiederum ist ein wichtiger Regulator des Natrium- und Kaliumhaushalts und spielt somit eine wichtige Rolle in der Regulierung des Flüssigkeitshaushalts. Es steigert die Rückresorption von Natriumionen und Wasser in die distalen Tubuli und Sammelrohr und steigert die Ausscheidung von Kaliumionen [15]. Der AT_1 -Rezeptor vermittelt ebenfalls, durch Angriff von Ang II, Zellwachstum, inflammatorische Antworten und oxidativen Stress [24]. Trotz seiner geringen Verbreitung im Erwachsenen werden über den AT_2 -Rezeptor u.a. Vasodilatation, antiproliferative und apoptotische Effekte vermittelt. Neben diesen beiden Rezeptoren existieren noch der AT_3 - und AT_4 -Rezeptor. Die Funktion des AT_3 -Rezeptors ist unbekannt. Der AT_4 -Rezeptor ist wahrscheinlich verantwortlich für die Modulation der Endothelfunktion [25].

1.2.2 Der AT_1 -Rezeptor-Signalweg

Der AT_1 -Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren. Sie vermitteln dem Zellinneren Informationen über verschiedene extrazelluläre Stimuli. Der AT_1 -Rezeptor ist an einer Vielzahl von Signaltransduktionen beteiligt, worüber er verschiedene biologische Reaktionen auslöst [23] (Abb. 2).

Die Bindung von Ang II an den AT_1 -Rezeptor führt zur verminderten Aktivität der Adenylatzyklase, die für die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem Vasodilatator, verantwortlich ist. Der Gefäßtonus wird somit erhöht [26]. Des Weiteren wird durch Ang II G-Protein-vermittelt die Aktivierung der Phospholipase C ausgelöst, die durch Spaltung von Phosphatidylinositol die beiden

Einleitung

second messenger Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) bildet. IP₃ bewirkt einen Anstieg an intrazellulärem Calcium, was zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und zur Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde führt. DAG führt zur Aktivierung der Proteinkinase C, die einige wichtige Schlüsselproteine in Bezug auf Vasokonstriktion und Zellwachstum phosphoryliert und somit aktiviert [23].

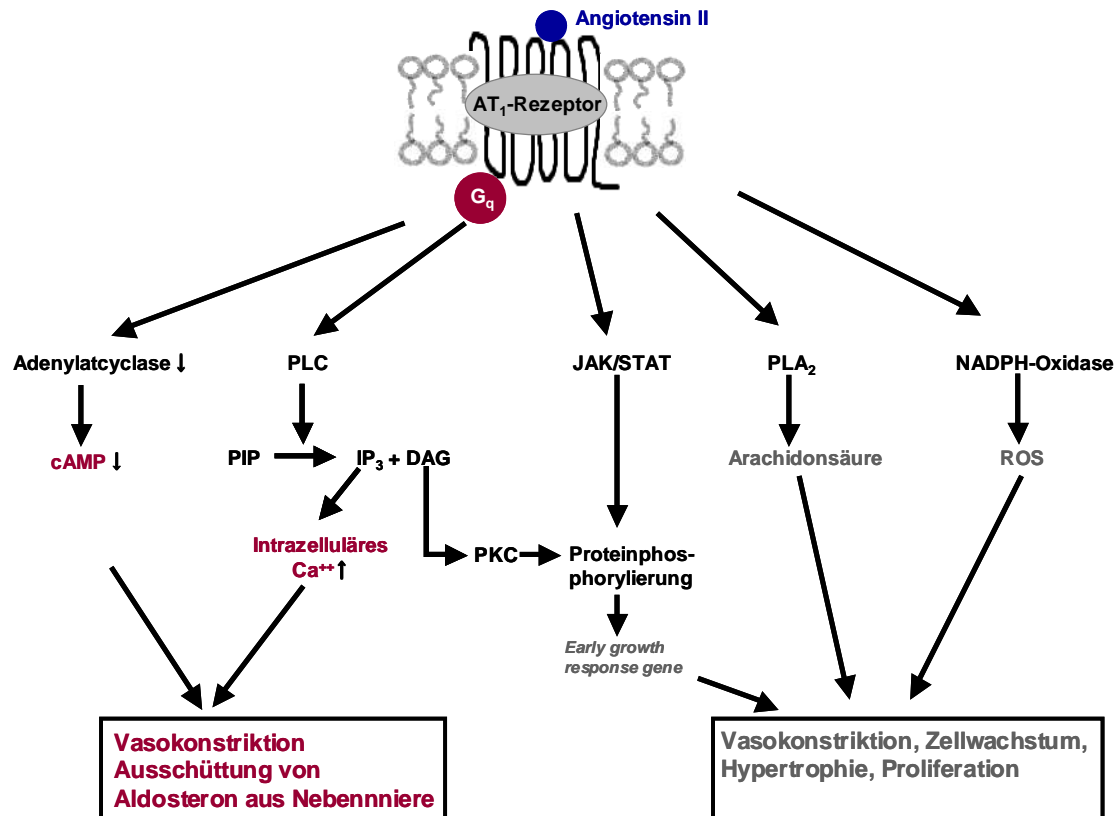


Abb.2: Übersicht über den AT₁-Rezeptor-Signalweg.

Angiotensin II hat G-Protein-gekoppelt (G_q) Einfluss auf die Enzyme Adenylatcyclase und Phospholipase C (PLC). Über den AT₁-Rezeptor kann zusätzlich der JAK/STAT Signalweg, die Phospholipase A₂ (PLA₂) und die NADPH-Oxidase aktiviert werden. cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), PIP (Phosphatidylinositolphosphat), IP₃ (Inositoltriphosphat), DAG (Diacylglycerol), PKC (Proteinkinase C), Ca²⁺ (Calcium), ROS (reaktive Sauerstoffspezies). Rot dargestellt: G-Protein-gekoppelter Weg, schwarz dargestellt: G-Protein-abhängiger Weg. © Modifiziert nach Siragy [26].

Über den AT₁-Rezeptor kann zusätzlich auch der JAK-STAT Signalweg aktiviert werden, welcher Signale an der Zelloberfläche in das Cytoplasma und den Zellkern weitergibt. Der JAK-STAT Signalweg aktiviert durch Phosphorylierung mehrere *early growth response genes*, wie c-fos, c-jun und auch Proto-Onkogene [26]. Die Stimulierung der *early growth response genes* ist verbunden mit einer erhöhten Genexpression und Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF),

Einleitung

vasokonstriktorisches Substanzen (ET-1) und dem Tumornekrosefaktor- α . Über diesen Weg kontrolliert Ang II u.a. Zellwachstum, Adhäsion, Migration und Reparatur. Ang II stimuliert auch die Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂), die für die Abgabe von Arachidonsäure verantwortlich ist. Arachidonsäure wird von Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen oder Cytochrom P450 Oxygenasen zu verschiedenen Eicosanoiden umgesetzt, die in der Niere und in den Gefäßen am Zellwachstum und an der Blutdruckregulierung beteiligt sind.

Darüber hinaus kann Ang II die NADPH-Oxidase aktivieren und damit die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies auslösen. Dies führt u.a. zu Hypertrophie glatter Gefäßmuskelzellen und zur Induktion des Insulin-like-growth-Faktor-1-Rezeptors [23].

1.3 Folgen erhöhter Angiotensin II-Spiegel

Erhöhte Ang II-Spiegel tragen zur Ausbildung von Bluthochdruck bei. Durch eine erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems kommt es des Weiteren zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko bezogen auf einer Hypertrophie des linken Ventrikels [27], da Ang II die Expression der wesentlichen Bestandteile der extrazellulären Matrix der Gefäßwand wie z.B. Fibronectin und Kollagen beeinflusst. Auch Atherosklerose und Typ 2 Diabetes stehen in Verbindung mit erhöhten Ang II-Spiegeln [13]. Studien haben gezeigt, dass eine Renin-Angiotensin-System Blockade den Beginn eines Typ 2 Diabetes verzögert oder verhindert und kardiovaskuläre und renale Komplikationen bei Diabetes-Patienten vermeidet [13]. Experimentelle und klinische Studien haben ebenso gezeigt, dass Ang II eine zentrale Rolle in der Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen spielt. Hypertonie ist eine Begleiterscheinung bei mehr als 80 % der Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung. Verschiedene Medikationen wie ACE-Inhibitoren und AT₁-Rezeptorblocker sollen in der Therapie der Hypertonie und der Prävention chronischer Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle spielen [28]. Betrachtet man das Fortschreiten von Nierenerkrankungen, verbessern diese Behandlungen den Rückgang der Nierenfunktion und auftretende Proteinurien [29]. Diese Verbesserungen stehen im Zusammenhang mit den direkten Effekten von Ang II auf Mesangiumzellen (Mesangiumzellen bilden die Extrazellulärmatrix im Glomerulum aus dem die glomerulären Kapillaren hervorgehen), welche auch den AT₁-Rezeptor

Einleitung

exprimieren und somit eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer Glomerulosklerose besitzen [30].

Bei den molekularen Mechanismen, die in der Entwicklung von kardiovaskulären Veränderungen und Nierenschäden in Zusammenhang mit Bluthochdruck auftreten, spielt oxidativer Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine große Rolle [31].

1.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress beschreibt das Ungleichgewicht zwischen antioxidativen Abwehrmechanismen und der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. ROS spielen eine entscheidende Rolle in menschlichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Alle Arten der ROS, einschließlich Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, besitzen ungepaarte Valenzelektronen oder instabile Bindungen. Normalerweise ist der initiale Schritt der ROS-Produktion der Ein-Elektronen-Transfer auf Sauerstoff, was zur Bildung von Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) führt, welches spontan oder durch die Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird. Superoxid kann nicht ohne weiteres Membranen überqueren und ist deshalb in seiner Wirkung örtlich begrenzt. Zudem ist es kurzlebig. Die Superoxiddismutase allerdings spaltet es in das längerlebige und membrandurchgängige Wasserstoffperoxid. Superoxid kann auch mit Stickstoffmonoxid zum hochreaktiven Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$) reagieren. Des Weiteren kann aus Wasserstoffperoxid hypochlorige Säure (HOCl) und Singulett-Sauerstoff (1O_2) entstehen. Ebenfalls zu den ROS zählt das hochreaktive freie Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), welches aus HOCl oder H_2O_2 plus $O_2^{\cdot-}$ entsteht [32].

Die DNA und auch Zellen des menschlichen Körpers sind ständig Angriffen in Form von oxidativem Stress ausgesetzt. Dieser kann exogener und auch endogener Natur sein: Exogene bzw. Umweltquellen stellen ionisierende Strahlen wie z.B. Röntgen- oder γ -Strahlen, oxidierende Chemikalien und UV-Licht dar. Endogene bzw. intrazelluläre Quellen sind verschiedene Signalwege, metabolische Prozesse oder Entzündungsprozesse [33].

Zu den Faktoren, die in der Pathophysiologie von Bluthochdruck eine Rolle spielen, zählen eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems, eine Hochregulierung des Renin-Angiotensin-Systems, Veränderungen im Signalweg der G-Proteine und Entzündungen. Gemein ist diesen Prozessen der oxidative Stress, bedingt durch

Einleitung

erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, erniedrigte Spiegel an Stickstoffmonoxid (NO) und einer erniedrigten antioxidativen Kapazität im kardiovaskulären und renalen System [31]. In Ratten konnte gezeigt werden, dass durch Ang II-Behandlung ausgelöster Bluthochdruck die ROS-Produktion durch die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) steigert [34]. Somit wurde die NADPH-Oxidase als verantwortliches Enzym für Ang II-induzierten oxidativen Stress identifiziert.

1.4.1 Die NADPH-Oxidase

Die Familie der NADPH-Oxidasen (NOX) sind transmembrane Proteine, die Elektronen über biologische Membranen übertragen. Normalerweise ist der Elektronenakzeptor Sauerstoff und das Produkt des Elektronentransfers ist Superoxid. Somit ist die biologische Funktion der NOX-Enzyme die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. NOX 2 mit der katalytischen Untereinheit gp91phox ist der Prototyp der NADPH-Oxidasen [35].

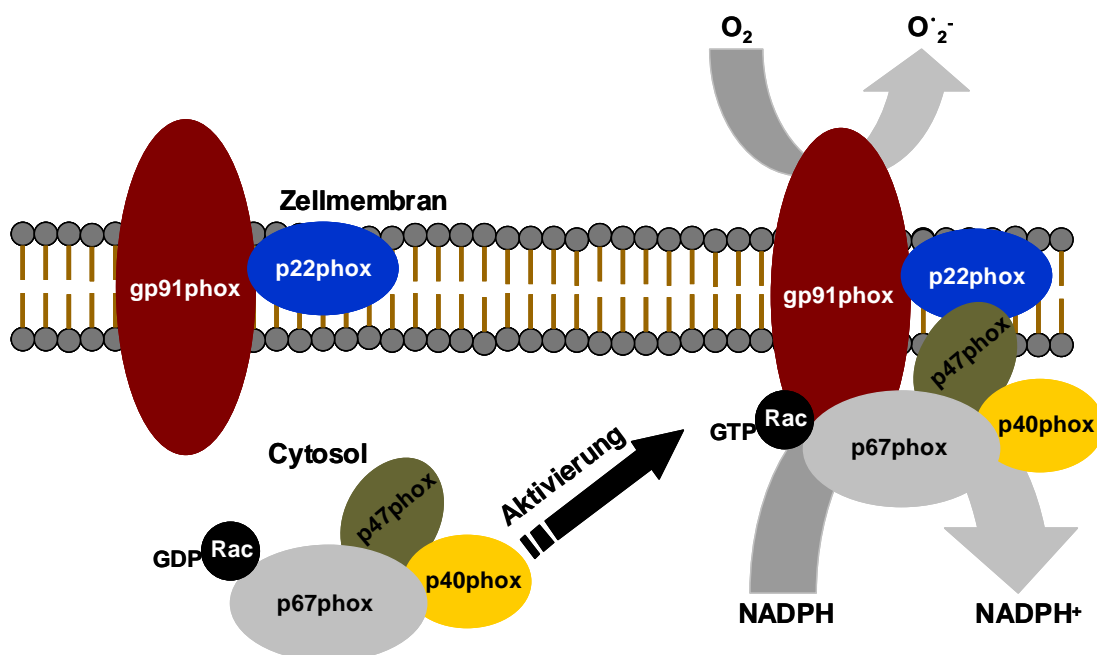


Abb. 3: Schematische Übersicht über die NADPH-Oxidase und ihre Aktivierung.

Im Ruhezustand befinden sich gp91phox und p22phox in der Membran intrazellulärer Vesikel oder auf der Außenmembran, wo sie sich gegenseitig stabilisieren (p22+gp91phox = Flavoprotein Cytochrom b558). Nach Aktivierung wird GDP in GTP umgewandelt, was zur Aktivierung von Rac (GTP-bindendes Protein) führt. Phosphorylierung von p47phox führt anschließend zur Konformationsänderung, was eine Assoziierung mit dem Flavoprotein zur Folge hat. Nun kann die Synthese von Superoxid erfolgen. © Modifiziert nach Bedard [35].

Einleitung

Sie besteht aus 5 Untereinheiten: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox und der katalytischen Untereinheit gp91phox. Unter normalen Bedingungen befinden sich die Untereinheiten p47phox, p67phox und p40phox im Cytosol, während p22phox und gp91phox in der Membran eingelagert sind, wo sie ein heterodimeres Flavoprotein (Cytochrom b558) bilden. Nach Aktivierung durch das GTP-bindende Protein Rac wird die cytosolische Untereinheit p47phox phosphoryliert, was zu einer Konformationsänderung führt, die eine Interaktion mit p22phox ermöglicht. Die anderen beiden cytosolischen Untereinheiten verlagern sich ebenfalls zur Membran hin, um den aktiven NOX 2-Enzymkomplex zu formen, der Elektronen vom Substrat auf Sauerstoff überträgt, um Superoxid zu formen (Abb.3).

Die NOX-Familie besteht aus sieben Mitgliedern, die sich in ihrer katalytischen Untereinheit und ihrer Zusammensetzung unterscheiden: NOX 1, NOX 2, NOX 3, NOX 4, NOX5, Duox 1 und Duox 2. Es sind alles transmembrane Proteine, die eine katalytische Untereinheit (NOX) und mehrere regulatorische Untereinheiten besitzen. Eine erhöhte Aktivität der NOX führt zu einer exzessiven Bildung von ROS, die natürliche Redoxsysteme, reguliert durch Thiol-abhängige antioxidative Systeme, schädigen können. Unkontrollierte Produktion von ROS resultiert in oxidativem Stress, welcher kardiovaskuläre und renale Schädigungen induzieren kann [31].

NOX 1, NOX 2 und NOX 4 wurden in kardiovaskulärem und renalem Gewebe identifiziert. NOX 1 wird in kardiovaskulären Zellen exprimiert und eine erhöhte Aktivität wurde bei kardiovaskulären Erkrankungen einschließlich Bluthochdruck gefunden [36]. NOX 2 wird in Phagozyten zur Immunabwehr und ebenso in kardiovaskulären Zellen exprimiert. NOX 2 scheint allerdings keine Rolle in Bezug auf Hypertrophie des linken Ventrikels bei Ang II-induziertem Bluthochdruck zu haben [37]. NOX 4 wird in Tubuluszellen der Niere sehr stark konstitutiv exprimiert und trägt somit zur basalen, und durch Ang II-stimuliert, zu einer erhöhten ROS-Produktion bei. In Ang II-infundierten Ratten und Mäusen ist die Expression von NOX 1, NOX 2 und NOX 4, die NADPH-Oxidase-Aktivität und die ROS-Produktion erhöht [31].

1.4.2 Folgen erhöhter Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies

Alle NADPH-Oxidasen, außer NOX 4, welches H_2O_2 produziert, produzieren Superoxid $\text{O}_2^{\cdot-}$. Die wichtigsten enzymatischen Antioxidantien sind die Superoxiddismutase (SOD), Katalase, Glutathionperoxidase, Thioredoxin und

Einleitung

Peroxiredoxin. Die Superoxiddismutase katalysiert die Umsetzung von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 und Sauerstoff (O_2) [38]. Nicht-enzymatische Antioxidantien sind Ascorbate, Tocopherole, Glutathion und Bilirubin. Wenn die Balance zwischen ROS-Produktion und antioxidativer Abwehr gestört ist, können ROS mit einer Vielzahl an Molekülen wie Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren interagieren. Durch diese Interaktionen können ROS die Zielmoleküle irreversibel schädigen oder ihre Funktion beeinträchtigen [35]. Auf DNA-Basis können Einzel- und Doppelstrangbrüche, oxidierte Purine/Pyrimidine und abasische DNA-Stellen entstehen. Ebenfalls können oxidative Basenmodifikationen wie 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-OxodG) gebildet werden [33]. 8-OxodG entsteht entweder durch Oxidation einer Guaninbase in der DNA oder durch Eingliederung eines oxidierten dGTP (8-OxodGTP) während der DNA-Synthese. 8-OxodG stellt die bedeutendste oxidative DNA-Läsion mit einem großen mutagenen und kanzerogenen Potential dar [39]. Die durch oxidativen Stress verursachten Schäden können allerdings durch verschiedene Reparaturmechanismen behoben werden.

1.5 Die Poly-ADP-Ribosylierung als Reparaturmechanismus

Die Poly-ADP-Ribosylierung ist eine post-translationale Proteinmodifikation, woraufhin DNA-Reparatur, Replikation, Transkription und Zelltod ausgelöst werden können [40]. Durch die Poly-ADP-Ribosylierung werden durch oxidativen Stress entstandene Einzel- und vor allem Doppelstrangbrüche erkannt und repariert [41]. Die Poly-ADP-Ribosylierung erfolgt durch die Enzymfamilie der Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARP). Diese besteht aus verschiedenen nukleären und cytosolischen Polymerasen. Dazu gehören PARP-1, PARP-2, PARP-3, Tankyrase-1 und -2 und VPARP. Das bestcharakterisierte Enzym stellt die PARP-1 dar. Sie ist im Zellkern lokalisiert, wird durch DNA-Strangbrüche aktiviert und besteht aus drei funktionellen Domänen: der N-terminalen DNA-Bindedomäne (46 kDa), der Automodifikationsdomäne (22kDa), welche für die Autophosphorylierung von PARP-1 verantwortlich ist und der C-terminalen katalytischen Domäne (54 kDa) [40]. Der Poly-ADP-Ribose-metabolismus wird durch zwei aufeinander abgestimmte Enzyme, der PARP und der Poly-ADP-Glucohydrolase (PARG) reguliert. In der Anwesenheit von DNA-Strangbrüchen, transferiert PARP-1 mit Hilfe des Substrats NAD^+ ADP-Ribose-Polymere auf sich selbst und auf Akzeptorproteine im Zellkern. Die Polymere werden schnell durch die PARG entfernt, welche die Hydrolyse der Ribosyl-Ribose-

Einleitung

Glucose-Bindungen der linearen und verzweigten Polymere katalysiert. Das Enzym besitzt endo- und exo-glykosidische Aktivitäten, wodurch es kurze Polymere und freie ADP-Ribose produziert [42] (Abb. 4).

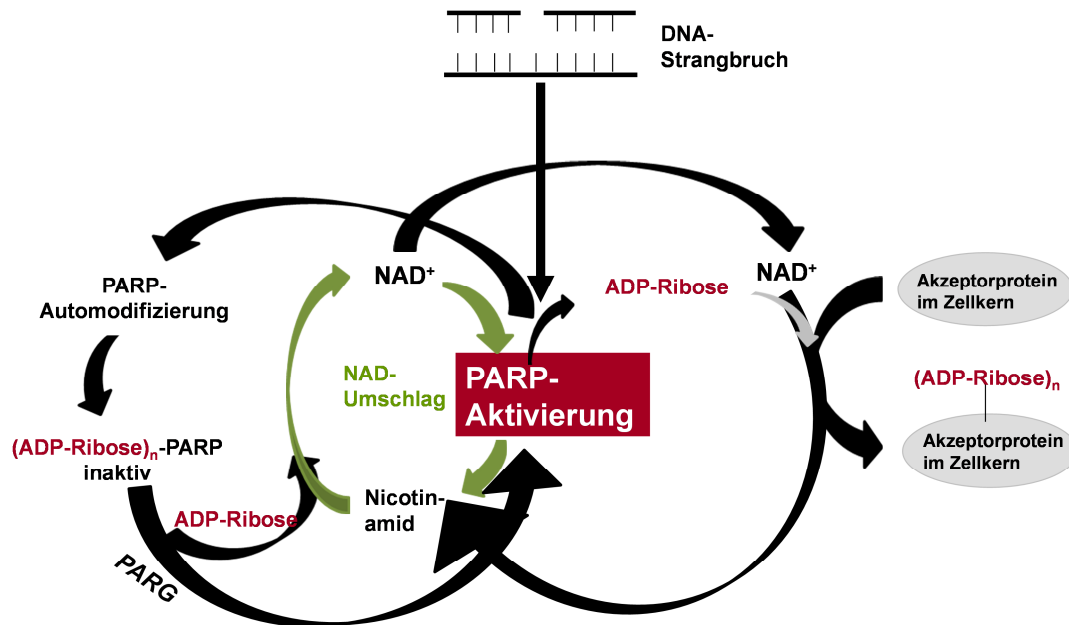


Abb. 4: Schematische Übersicht über den ADP-Ribosekreislauf.

DNA-Strangbrüche aktivieren PARP-Enzyme und die anschließende Spaltung von NAD⁺ in Nicotinamid und ADP-Ribose. ADP-Ribose-Einheiten polymerisieren an Akzeptorproteine. Die PARP-Aktivierung führt ebenso zu Automodifizierung der PARP, was zur PARP-Inhibierung führt. Durch Entfernen der Poly-ADP-Ribose von PARP durch die Poly-ADP-Glucohydrolase wird PARP reaktiviert und neues NAD⁺ gebildet. © Modifiziert nach Nguewa [41].

PARP-1 arbeitet als ein endogenes Detektionssystem für DNA-Strangbrüche, die durch eine Vielzahl an Stimuli, einschließlich freier Radikale und oxidierende Moleküle, entstanden sind. PARP-1 bindet an den Strangbruch und bildet ADP-Ribose-Polymere, die an Akzeptorproteine und an PARP-1 (Automodifizierung) selbst binden. Die negative Ladung der Polymere ermöglicht die Dissoziation der automodifizierten PARP-1 von der DNA, wodurch sie frei zugänglich für andere DNA-Reparaturenzyme wird [40]. Durch die Beobachtung, dass PARP-1-Inhibitoren in Kombination mit DNA-schädigenden Substanzen erhöhte DNA-Schäden auslösen [43], konnte die Beteiligung der PARP-1 an der DNA-Reparatur nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Mausstämme mit einem defekten PARP-1-Gen eine genomische Instabilität nach Behandlung mit ionisierender Bestrahlung und alkylierenden Reagenzien aufwiesen [44].

Einleitung

Neben PARP-1 als Akzeptorprotein treten mehrere andere Proteine als nukleäre Akzeptoren auf. Dazu gehören Histone, p53, Topoisomerase I und II, RNA-Polymerasen, DNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren.

Außerdem bindet PARP direkt an ein Protein des Basen-Exzisions-Reparatur-Weges (BER), welches wiederum mit der DNA Ligase II und der DNA Polymerase β interagiert [41]. In diesem Zusammenhang wurde die Poly-ADP-Ribosylierung auch als Energiequelle für die BER gefunden, da bei der Ribosylierung entstandenes ATP für den letzten Schritt der BER benötigt wird [45]. Neben der DNA-Reparatur und ihrem Beitrag zur Genomstabilität, besitzt die PARP weitere Funktionen. Die Ribosylierung der Histone beeinflusst die Chromatinstruktur, in dem die negative Ladung eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem Histon und der DNA bewirkt. Dadurch werden Gene besser zugänglich für die Transkription gemacht. Des Weiteren spielt PARP auch in der Replikation und der Differenzierung eine Rolle [41].

1.6 ROS-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

Der Körper besitzt natürliche Abwehrmechanismen gegen ROS, um die Entstehung von Schaden, der durch oxidativen Stress verursacht wurde, zu vermeiden. ROS können verschiedene Erkrankungen wie Krebs, kardiovaskuläre Komplikationen, akute und chronische Entzündungen und neurodegenerative Erkrankungen verursachen [46]. Daher ist es notwendig, dass Zellen ständig damit beschäftigt sind, die Spiegel an ROS auf einem niedrigen Niveau zu halten, um eine Ansammlung zu vermeiden [47]. Der natürliche Abwehrmechanismus gegen ROS besteht aus antioxidativen Enzymen und Phase-II-Detoxifizierungs-Enzymen. Dazu gehören Katalase, Superoxiddismutase (SOD), UDP-Glucuronyltransferase, NAD(P)H:chinon-Oxidoreduktase-1 (NQO1), Hämoxygenase-1 (HO-1), Glutamatcysteinylgase (GCL), Glutathion-S-transferase (GST), Glutathionperoxidase (GPx) und Thioredoxin. Der nukleäre Transkriptionsfaktor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) ist der Hauptregulator der Genexpression dieser Enzyme [48].

1.6.1 Der Transkriptionsfaktor Nrf2

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 gehört zur Cap'n'Collar-Familie der „basic-leucine-zipper“-Transkriptionsfaktoren (bZip). Er wird in verschiedensten Geweben exprimiert, aber nur durch oxidative und elektrophile Stimulation, einschließlich ROS, aktiviert [49]. Unter normalen Bedingungen und einem niedrigen oxidativen Milieu wird Nrf2 durch ein Repressorprotein, dem Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1) als inaktiver Komplex im Cytoplasma festgehalten. Keap 1 verfügt über mehrere reaktive Cysteingruppen, die als Sensor für den intrazellulären Redoxstatus wirken. Oxidative oder kovalente Veränderungen von Thiolen dieser Cysteingruppen führen zur Dissoziation von Nrf2 von Keap 1 und zur Translokation von Nrf2 in den Zellkern. Im Zellkern bindet Nrf2 an eine Gensequenz, die als „antioxidant response element (ARE)“ bezeichnet wird und in der Promotorregion mehrerer Gene sitzt, die die antioxidativen Enzyme und Phase-II-Detoxifizierungs-Enzyme beinhalten. Dieser Prozess ist abhängig von der Heterodimerisierung von Nrf2 mit anderen bZip-Proteinen wie Jun (c-Jun, Jun-D und Jun-B) oder Maf-Proteinen [50] (Abb. 5).

Die Translokation von Nrf2 in den Zellkern kann auch durch die Phosphorylierung der Threonin- und Serin-Gruppen von Nrf2 durch verschiedene Kinasen wie z.B. PKC oder mitogen-activated Proteinkinase (MAPK) ausgelöst werden [47]. Die Nrf2-vermittelte Regulierung der zellulären antioxidativen Proteine und anti-inflammatorischen Abwehr spielt eine wichtige Rolle in der Verteidigung gegen oxidativen Stress [51]. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass ein defektes Nrf2-Gen in Mäusen die Induktion dieser Gene verringert oder gar verhindert, was auf eine Nrf2-abhängige Regulierung hinweist. Außerdem verschlimmert ein Nrf2-Gen-Defekt Diabetes-induzierte Entzündung, oxidativen Stress und Nierenschäden in Versuchstieren [52, 53].

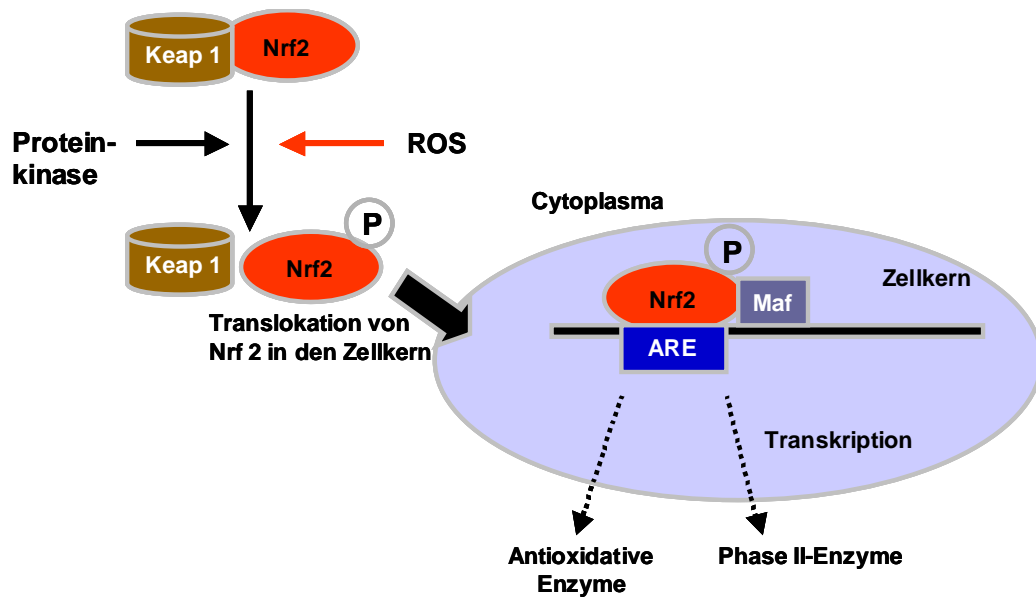


Abb. 5: Schematische Übersicht über die Nrf2-Aktivierung durch ROS.

Unter normalen Bedingungen wird Nrf2 durch Keap 1 als inaktiver Komplex im Cytoplasma gehalten. Oxidativer Stress sowie Phosphorylierung von Nrf2 durch eine Proteinkinase bedingen die Dissoziation von Nrf2 und die Translokation in den Zellkern. Nach Heterodimerisierung mit Maf kommt es durch Bindung an ARE zur Transkription von antioxidativen Enzymen und Phase II-Enzymen. © Modifiziert nach Kim [50].

1.6.1.1 Hämoxygenase-1

Wie bereits erwähnt, gehört die Hämoxygenase (HO) zu den antioxidativen Enzymen im Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress. Im Menschen und in Nagetieren existieren zwei Isoenzyme der Hämoxygenase, die HO-1 und die HO-2. Die HO-1-Expression wird als Antwort auf oxidativen Stress induziert, während HO-2 konstitutiv exprimiert wird und nicht induzierbar ist. HO-1 ist für den Abbau von Häm verantwortlich. Häm ist ein Protoporphyrin IX-Ring, der ein zentrales Fe^{2+} -Atom trägt, welches in einer Fenton-Reaktion aus Wasserstoffperoxid ein reaktives Hydroxylradikal bilden kann. Häm bildet die prosthetische Gruppe von Hämoproteinen wie z.B: Hämoglobin, Cytochrom-c-Oxidase oder Cytochrom P450 [54]. HO-1 spaltet Häm in Kohlenstoffmonoxid (CO), führt zur Freisetzung von komplexiertem Fe^{2+} und bildet Biliverdin, welches durch die Biliverdinreduktase in Bilirubin umgewandelt wird (Abb. 6). Diese Endprodukte besitzen anti-inflammatorische, anti-apoptotische, anti-proliferative und anti-oxidative Effekte [55]. Dadurch spielt HO-1 eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen oxidativen Stress, da dieser zur Häm-Freisetzung führen kann, wodurch freies cytotoxisches Häm gebildet wird [54].

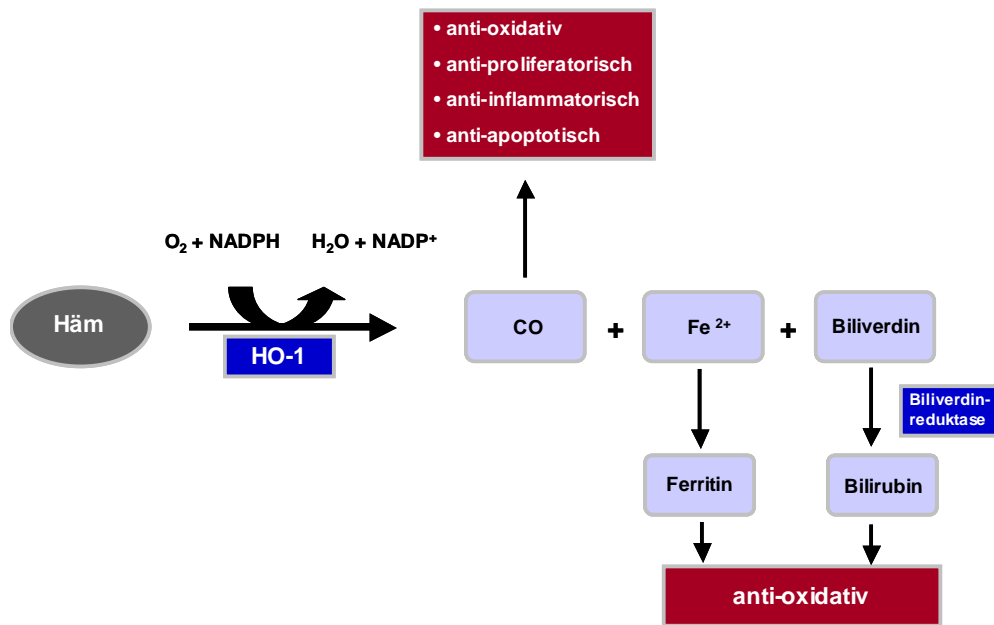


Abb. 6: Katabolismus von Häm durch das Enzym HO-1.

HO-1 katabolisiert freies cytotoxisches Häm in äquimolare Mengen zu CO, Fe²⁺ und Biliverdin.

© Modifiziert nach Babusikova [55].

1.6.2 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist ein zentraler Regulator, der auf verschiedene Stresssituationen reagiert. Er wird u.a. durch die Exposition mit verschiedensten Chemikalien, sowie durch oxidativen und physikalischen Stress aktiviert. NF-κB wird auch in Verbindung mit der Immunantwort erwähnt, da eine Vielzahl an Bakterien und Viren ebenfalls eine Aktivierung von NF-κB auslösen können. Diese Aktivierung führt zur Expression inflammatorischer Cytokine, Chemokine, Immunrezeptoren und Adhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche [56]. NF-κB existiert als Homo- oder Heterodimer. Letzteres setzt sich aus den Untereinheiten zweier verschiedener Gruppen zusammen. Die erste Gruppe besteht aus p50 und p52, welche die „Rel homology domain“ tragen, die ihnen die Möglichkeit zur Bindung an die DNA verleiht. Um als Aktivatoren der Transkription aktiv zu wirken, müssen die Mitglieder der ersten Gruppe mit Mitgliedern der zweiten Gruppe, p65 (RelA), c-Rel oder RelB, Dimere formen. NF-κB bezeichnete ursprünglich das p50-p65-Heterodimer [57]. Die Regulierung von NF-κB in ruhenden Zellen erfolgt durch die inhibierende Proteinfamilie IκB, welchen den Transkriptionsfaktor im Cytoplasma hält. Diese

Einleitung

Interaktion maskiert die nukleäre Lokalisierungssequenz von NF- κ B und stört somit den Transport in den Zellkern [58]. Die Aktivierung von NF- κ B wird durch verschiedene Stimuli ausgelöst. Dazu gehören Bakterien, Viren, zelluläre Rezeptoren und Liganden, Mitogene, Wachstumsfaktoren und physikalische und biochemische Stressauslöser [57]. Diese Stimuli bewirken eine Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK), welche die I κ B-Proteine phosphoryliert, was zur Dissoziation von NF- κ B führt. IKK besteht aus drei Untereinheiten: der katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ . IKK α und IKK β führen als Heterodimer zur Phosphorylierung an den Serinen S32 und S36 von I κ B. Phospho-I κ B wird anschließend durch den Ubiquitin Ligase-Komplex erkannt, was zu seiner Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom führt. Der Abbau von I κ B führt zur Freisetzung von NF- κ B und zu dessen Translokation in den Zellkern. Im Zellkern bindet es an Promotoren der Zielgene und führt zu deren Transkription [59] (Abb. 7).

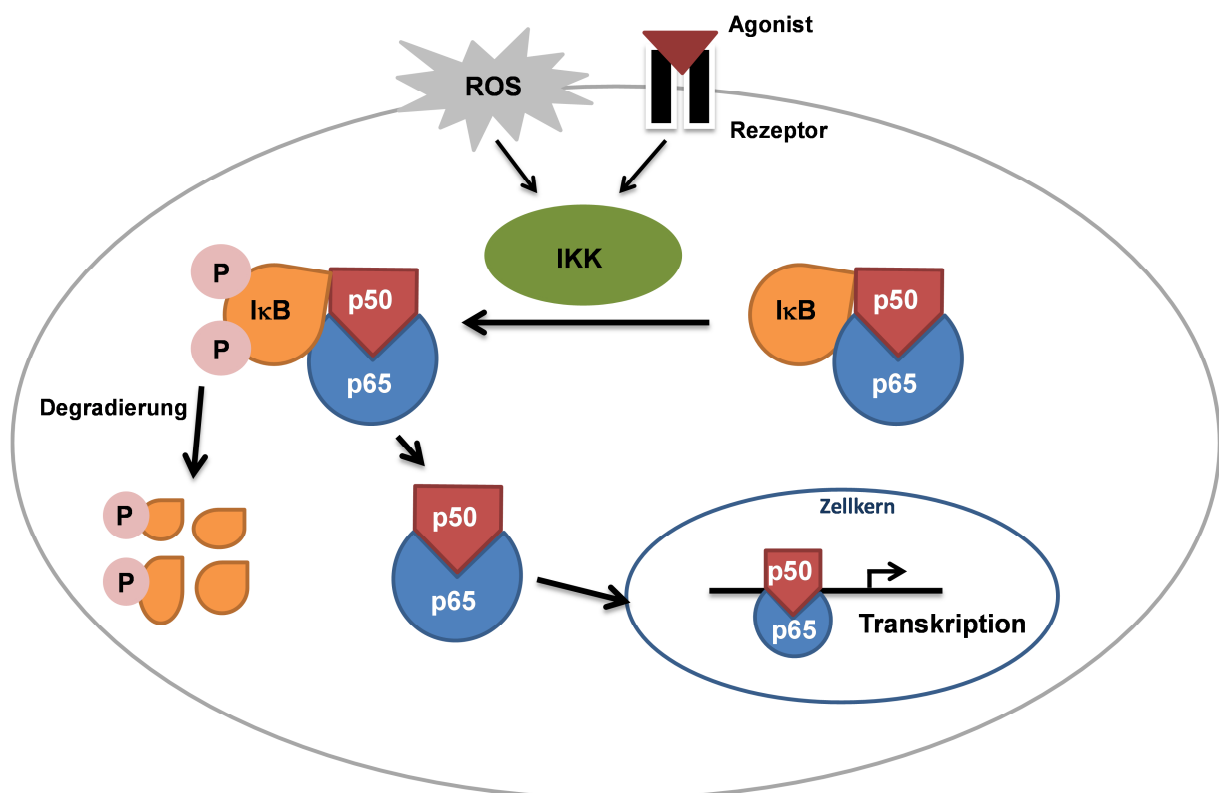


Abb. 7: Signalweg der NF- κ B-Aktivierung.

Agonisten wie zum Beispiel inflammatorische Cytokine (Interleukin-1, Tumornekrosefaktor) oder auch oxidativer Stress lösen die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch Signaltransduktion aus. IKK (I κ B-Kinasekomplex) wird aktiviert, was eine Phosphorylierung des Inhibitorproteins I κ B zur Folge hat. Phospho-I κ B wird durch das Proteasom degradiert und freies NF- κ B kann in den Zellkern wandern und die Transkription verschiedener Zielgene auslösen. © Modifiziert nach <http://www.activemotif.com/nfkb-transcription-factor>.

Einleitung

Zu den wichtigsten Zielgenen von NF- κ B zählen Chemokine, Cytokine, Immunrezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Regulatoren der Apoptose, Wachstumsfaktoren, Enzyme und Regulatoren des Zellzyklus [57]. Die induzierten Gene spielen wichtige Rollen in physiologischen Prozessen während der Entwicklung und auch in Bezug auf Verletzung und Infektionen [60].

2. Zielsetzung der Arbeit

Das Renin-Angiotensin-System reguliert den Blutdruck und das kardiovaskuläre Gleichgewicht. Ang II, das aktive Peptid des Renin-Angiotensin-Systems, verursacht Vasokonstriktion und in erhöhten Spiegeln gesteigerten Bluthochdruck. Bluthochdruck wird mit einem gesteigerten Nierenkrebsrisiko in Verbindung gebracht. *In vitro*-Studien und Studien an der isolierten Niere konnten bereits genotoxische Effekte des blutdruckregulierenden Hormons Ang II nachweisen [61, 62]. Zielsetzung dieser Doktorarbeit war es, zunächst *in vivo* zu prüfen, ob steigende Ang II-Konzentrationen einen Einfluss auf die genomische Stabilität von Nieren- und Herzzellen besitzen. Hierzu wurden männliche C57BL/6-Mäuse mit osmotischen Minipumpen ausgestattet, die Ang II in vier verschiedenen Konzentrationen zwischen 60 ng/kg und 1 µg/kg min während 28 Tage abgeben sollten. In einem Folgeversuch sollte dann zum einen die Frage geklärt werden, ob die entstandenen DNA-Schäden durch den gesteigerten Blutdruck oder die erhöhten Ang II-Konzentrationen verursacht wurden. Zum anderen sollte der Mechanismus der DNA-Schädigung aufgeklärt werden. Für diese Fragestellungen wurde ein Interventionsversuch durchgeführt, in dem die Tiere neben der Ang II-Behandlung zusätzlich über einen Zeitraum von 28 Tagen mit verschiedenen Substanzen behandelt wurden:

Candesartan ist ein Ang II-Rezeptor-Antagonist, der selektiv den AT₁-Rezeptor blockiert. Durch diese Intervention sollte die Beteiligung des AT₁-Rezeptors an der Entstehung von DNA-Schäden geklärt werden.

Ramipril wirkt als ein Hemmer des Angiotensin-Konversions-Enzyms und verhindert damit die Bildung von endogenem Ang II aus Ang I und besitzt zudem antioxidative Eigenschaften.

Hydralazin greift nicht in das Renin-Angiotensin-System ein, sondern wirkt als Vasodilatator. Der genaue Wirkmechanismus ist weitgehend unbekannt. Die Intervention mit Hydralazin sollte zeigen, ob die DNA-Schäden durch den gesteigerten Blutdruck oder die erhöhte Ang II-Konzentration verursacht wurden.

Eplerenon blockiert als selektiver Aldosteronantagonist den Mineralkortikoidrezeptor. Diese Intervention sollte zeigen, welchen Einfluss eine durch Ang II ausgelöste Hochregulierung der Aldosteronkonzentration hat.

Tempol, als Antioxidans, sollte zeigen, inwieweit oxidativer Stress an der Entstehung der DNA-Schäden beteiligt ist.

Zielsetzung der Arbeit

Die Auswirkung der Ang II-Behandlung, auch in Kombination mit den verschiedenen Interventionen, wurde in Niere und Herzen mit Hilfe der folgenden Parameter untersucht:

- Nierenfunktionsparameter
- Histopathologische Veränderungen der Niere
- Reaktive Sauerstoffspezies
- DNA-Schäden in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen
- Oxidative DNA-Schäden in Form der Basenmodifikation 8-OxodG
- DNA-Reparatur-Aktivität
- Expression von NOX 4
- Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und NF- κ B

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurde mit C57BL/6 Mäusen von Janvier (Le Genest Sain Isle, France) gearbeitet.

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Falls nicht anders im Text erwähnt, wurden alle Chemikalien von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland oder St. Louis, USA) bezogen. Die Substanzen für den Tierversuch wurden von folgenden Firmen bezogen: Candesartanxilexetil (Atacand protect[®]) von Astra Zeneca, Wedel, Deutschland; Eplerenon (Inspra[®]) von Pfizer, Berlin, Deutschland; Ramipril (Delix protect[®]) von Sanofi aventis, Frankfurt am Main, Deutschland; Angiotensin II von Calbiochem/Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland. Die im Tierversuch verwendeten osmotischen Minipumpen wurden von der Firma Alzet, Model 1004 (Durect Corporation, Cupertino, Canada) bezogen.

3.1.3 Blutdruckmessgerät

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

3.2 Methoden

3.2.1 Dosisversuch

Im Dosisversuch wurde mit männlichen C57BL/6-Mäusen gearbeitet. Die Tiere wurden im Tierstall in einem ruhigen Raum bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$ in einem 12 Stunden Licht/Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Im Alter von 17 Wochen wurden die Tiere zufällig in 5 Gruppen mit je 8 Tieren eingeteilt und jedes Tier mit einer osmotischen Minipumpe (Alzet; Model 1004) ausgestattet, die Ang II in vier verschiedenen Konzentrationen in einem Zeitraum von 28 Tagen konstant abgeben sollte. Dazu legte man die Tiere in Narkose (Ketamin 90 mg/kg und Xylazin 6 mg/kg i.m.), am Nacken wurde ein Einschnitt vorgenommen und eine subkutane Tasche geformt, in die die osmotische Minipumpe geschoben wurde,

Material und Methoden

welche im Laufe der Zeit mit der Haut verwachsen ist. Der Nacken wurde anschließend mit Michel-Klammern (7,5 x 1,75 mm, Gribi AG, Belp, Schweiz) verschlossen und die Tiere bis zum Aufwachen aus der Narkose überwacht. Die osmotische Minipumpe enthielt Ang II in den folgenden vier verschiedenen Konzentrationen: 60 ng/kg x min (No-Pressor), 200 ng/kg x min (Slow-Pressor 1, SP-1), 400 ng/kg x min (Slow-Pressor 2, SP-2) und 1000 ng/kg x min (Pressor). Die fünfte Gruppe erhielt das Lösungsmittel PBS als Negativkontrolle (Tab. 1). Während der 28 Tage wurden regelmäßig nicht-invasive Blutdruckmessungen an der wachen Maus mit Hilfe eines automatisierten Systems durchgeführt, bei dem die Druckmanschette um den Schwanz der Mäuse gelegt wird. Um die Tiere an die Prozedur der Messung zu gewöhnen, fanden eine Woche vor Implantation der Pumpen täglich Blutdruckmessungen statt. Die Blutdruckmessung wurde nach Implantation der Pumpen jeden zweiten bis vierten Tag zwischen 8 – 11 Uhr durchgeführt. Der systolische Blutdruckwert ergab sich zu jedem Zeitpunkt aus sechs bis zehn Einzelmessungen pro Tier.

An Tag 0, Tag 14 und Tag 28 wurden die Tiere in Stoffwechselkäfige gesetzt und der Urin über 20 Stunden gesammelt, um Aussagen über die Nierenfunktion mittels verschiedener Nierenparameter treffen zu können (Abb. 8).

Zur Detektion proliferierender Zellen erhielt die Hälfte der Tiere jeder Gruppe während der letzten Woche 2,6 mmol/L Bromodesoxyuridin (BrdU) über das Trinkwasser.

Nach 4-wöchiger Behandlung wurden die Tiere anästhesiert (Ketamin 120 mg/kg und Xylazin 8 mg/kg i.m.), der Peritoneal- und Retroperitonealraum eröffnet und die Aorta abdominalis freigelegt, um eine Blutprobe zu gewinnen. Anschließend wurde in das Gefäßsystem des Herzens eine Kanüle eingebracht und zunächst mit Deltadex 40 (10% Dextran 40, 0,9% NaCl, Wasser für Injektionszwecke + 1% Procainhydrochlorid, AlleMan Pharma, Rimbach, Deutschland) für ca. 10 min und anschließend mit eiskalter 0,9 % Natriumchloridlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) für ca. 2 min die Gefäße der Maus perfundiert. Deltadex 40 in Kombination mit Procainhydrochlorid sollte eine Weitstellung der Gefäße bedingen und einem Ödem des Interstitiums vorbeugen. Nach erfolgreicher Spülung der Gefäße wurden beide Nieren, das Herz, der Dünndarm und die Leber entnommen und von Herz und Nieren das Gewicht bestimmt. Eine Niere wurde für 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung (Roti-Histofix, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Material und Methoden

aufbewahrt, anschließend in PBS überführt und so an das Institut für Nephropathologie, Universitätsklinikum Erlangen, Arbeitskreis von Frau Dr. Amann, geschickt, wo sie in Paraffin eingebettet wurde. Die zweite Niere wurde in zwei Teile geteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Herz wurde in zwei Teile geteilt und ein Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren, das andere für 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung (Roti-Histofix, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufbewahrt, bevor es in Paraffin eingebettet wurde. Der Dünndarm und die Leber wurden beide in Paraffin eingebettet. Während des Tierversuchs ist Maus Nr. 29 am 20.04.2010 aus unersichtlichen Gründen verstorben, so dass die Gruppe Slow-Pressor 2 am Ende des Versuchs nur 7 Mäuse enthielt.

Tab. 1: Übersicht über Dosisversuch.

Gruppe	Osmotische Pumpe	Tierzahl
Kontrolle	PBS	8
No-Pressor	Angiotensin II 60 ng/kg * min	8
Slow-Pressor 1	Angiotensin II 200 ng/kg * min	8
Slow-Pressor 2	Angiotensin II 400 ng/kg * min	7
Pressor	Angiotensin II 1000 ng/kg * min	8

3.2.2 Interventionsversuch

Im Interventionsversuch entsprachen die Haltung der Tiere, die Implantation der Pumpen, das Blutdruckmessen und die Perfusion der Tiere den Vorgaben vom Dosisversuch.

Im Gegensatz zum Dosisversuch erhielten die Tiere kein BrdU.

Im Alter von 17 Wochen wurden die Tiere auch hier zufällig in 7 Gruppen mit je 8 Mäusen eingeteilt und jedes Tier mit einer osmotischen Minipumpe (Alzet; Model 1004) ausgestattet, die Ang II in einer Konzentration von 600 ng/kg x min ebenfalls über einen Zeitraum von 28 Tagen abgeben sollte. Es gab fünf verschiedene Interventionen: Candesartan, ein Angiotensin II-Rezeptor-Antagonist (8-10 mg/kg*d), die Konzentration wurde von 10 mg/kg*d auf 8 mg/kg*d herabgesetzt, da der Blutdruck der Mäuse zu niedrig wurde; Ramipril, ein Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) Blocker (5 mg/kg * d); Hydralazin, ein Vasodilatator (10 –15 mg/kg * d), die

Material und Methoden

Konzentration wurde von 10 mg/kg*d auf 15 mg/kg*d heraufgesetzt, da der Blutdruck der Tiere nicht gesunken ist; Eplerenon, ein Mineralkortikoidrezeptorantagonist (100 mg/kg*d); Tempol, ein Antioxidans (1 mM). Die Tiere erhielten die verschiedenen Interventionen über das Trinkwasser, außer Eplerenon, welches über das Futter verabreicht wurde (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

Nach der vierwöchigen Behandlung wurden die Tiere ebenfalls perfundiert und die Niere und das Herz entnommen und gewogen. Eine halbe Niere und das halbe Herz wurden für 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung (Roti-Histofix, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) fixiert, anschließend in PBS überführt und so an das Institut für Nephropathologie, Universitätsklinikum Erlangen, Arbeitskreis von Frau Dr. Amann, geschickt, wo sie in Paraffin eingebettet wurden. Der Rest der Niere und die Hälfte des Herzens wurden in unterschiedlich große Teile geteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für weitere Untersuchungen bei -80°C aufbewahrt. Ein Teil der Niere wurde sofort zur Zellextraktion für den Comet Assay weiterverarbeitet (siehe 3.2.3). Während der Zeit des vierwöchigen Versuchs sind leider 7 Tiere verstorben, so dass in den unterschiedlichen Gruppen keine einheitliche Tierzahl mehr vorhanden war (Tab. 2).

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

Tab. 2: Übersicht über Interventionsversuch.

Gruppe	Osmotische Pumpe	Intervention	Tierzahl
Kontrolle	PBS	nein	7
Angiotensin II	Angiotensin II	nein	8
Angiotensin II + Candesartan	Angiotensin II	8-10 mg/kg * d	7
Angiotensin II + Ramipril	Angiotensin II	5 mg/kg * d	7
Angiotensin II + Hydralazin	Angiotensin II	10-15 mg/kg * d	5
Angiotensin II + Eplerenon	Angiotensin II	100 mg/kg * d	5
Angiotensin II + Tempol	Angiotensin II	1 mM	6

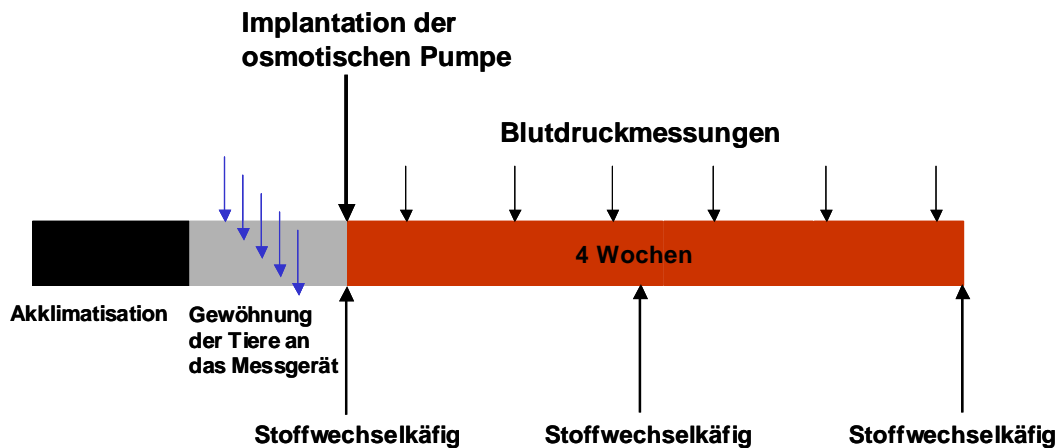


Abb. 8: Übersicht über Zeitverlauf der beiden Tierversuche.

3.2.3 Comet Assay

Mit dem Comet Assay, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, ist es möglich, DNA-Schäden in Form von Einzel- als auch Doppelstrangbrüchen und alkalilabile Stellen nachzuweisen. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen (kultivierte Zellen oder aus Organgewebe isoliert) in Agarose eingebettet und einer Zellyse in einem Puffer mit hoher Salzkonzentration unterworfen. Die Zellyse ermöglicht die freie Zugänglichkeit zur DNA, indem u.a. die Membran und das Cytoplasma abgebaut werden. Anschließend werden die Zellen einer alkalischen Elektrophorese ausgesetzt, bei der geschädigte, bruchstückhafte DNA (Einzel –oder Doppelstrangbrüche) aus dem Zellkern in Richtung Pluspol herauswandert. Die intakte Kern-DNA wandert langsamer, wodurch das Bild eines Kometen entsteht [63]. An der Größe des Kernschweifs kann nun mit Hilfe einer speziellen Software das Maß der Schädigung abgelesen werden.

Von der frisch perfundierten Niere wurde ein Viertel abgetrennt und in eiskaltem RPMI 1640 Medium (mit Zusatz von 1,8% NaCl und 18% DMSO) mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Das Medium mit den Nierenstücken wurde nun durch einen Cell Strainer mit 100 µm Durchmesser (BD Biosciences, Bedford, USA) in ein 50 ml Falcon überführt. Die so gewonnenen primären Nierenzellen wurden dann 5 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet mit dem restlichen Medium gevortext. Die Zellen wurden mit 0,5% LMP (low melting point) Agarose (37°C) in einem Verhältnis von 1:10 gemischt und die so gewonnene Suspension auf einen mit HMP (high melting point) Agarose beschichteten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach Festigung

Material und Methoden

der Agarose wurde das Deckgläschen abgezogen und die Objektträger mit den Zellen lichtgeschützt in einer Küvette mit Lyselösung (Lysepuffer: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Na-Sarcosinat, pH 10; Lyselösung: 66,75 ml Lysepuffer, 7,5 ml DMSO, 0,75 ml Triton X-100) für eine Stunde bei 4°C aufbewahrt. Nach der Lyse wurden die Zellen für 20 min in eiskaltem alkalischen Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) gelegt, um die Entwindung der DNA zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese durch Anlegung eines elektrischen Feldes von 25 V, 300 mA für 20 min. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Objektträger in Neutralisationspuffer (0,4 M Tris, pH 7,5) gewaschen, 5 min in eiskaltem Methanol fixiert und zum Trocknen für 10 min bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Zur Sichtbarmachung wurde die DNA mit Gel Red Nucleic Acid Stain [Biotium, Hayward, Canada; Stammlösung 1:4 mit 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) verdünnt] angefärbt (Abb. 9). Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Labophot-2 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) mit Hilfe des Programmes Komet 5 (Kinetic Imaging LTD, Liverpool, UK) in der 200-fachen Vergrößerung. Dabei wurden pro Tier 50 Zellen zur Auswertung herangezogen und das Ergebnis als Prozentanteil der DNA im Schweif angegeben.

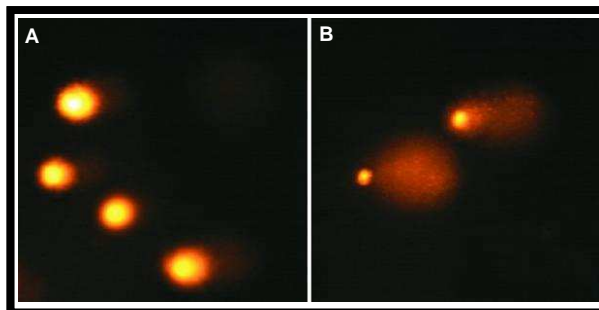


Abb. 9: Repräsentative Abbildung von Zellkernen, die der Elektrophorese unterworfen waren. **A:** ungeschädigte Zellen, **B:** geschädigte Zellen, bei denen bruchstückhafte DNA (Einzel- oder Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen) aus dem Zellkern herauswandert, Quelle: <http://cometassayuoc.blogspot.com>.

3.2.4 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie handelt es sich um eine Methode zur Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten. Hierbei werden spezifische Primärantikörper eingesetzt, die gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet sind. An die Primärantikörper wiederum binden Zweitantikörper, die entweder mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind oder es handelt sich um biotinylierte

Zweitantikörper, die über eine Brücke mit einer Peroxidase verbunden werden können, welche für die Umsetzung eines Farbstoffes verantwortlich ist (Abb. 10).

3.2.4.1 ABC-DAB-Reaktion

Die zu untersuchenden 2 µm dicken Paraffinschnitte wurden für eine Stunde bei 60°C im Trockenschrank getrocknet. Die anschließende Entparaffinierung erfolgte 3 x 4 min in Roti Histol, 3 x 2 min in 100% EtOH und 1 x 2 min in 70% EtOH. Durch die intensive Fixierung der Paraffin-eingebetteten Gewebe in Formalin sind viele Antigene quervernetzt und denaturiert und damit für die verwendeten Antikörper nicht mehr detektierbar. Das Erhitzen in Citratpuffer stellt eine gute Methode zur Antigendemaskierung dar. Die Schnitte wurden für 15 min in einer Mikrowelle in Citratpuffer (10 mM Citronensäure, pH 6) auf 95 °C erhitzt. Zum Abkühlen wurden die Paraffinschnitte 30 min im Citratpuffer belassen und anschließend mit PBS gewaschen. Infolge unspezifischer elektrostatischer oder nichteletrostatischer Wechselwirkungen zwischen dem verwendeten Antikörper und Makromolekülen des Gewebeschnittes, kommt es häufig zu hohen Hintergründen. Um diese Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurden die Schnitte eine Stunde mit Blockierlösung (5 % donkey Serum oder 10% goat serum, je nach verwendetem 2. AK) blockiert. Das verwendete Serum lagert sich an die unspezifischen Bindungsstellen an, verhindert aber gleichzeitig eine Interaktion mit dem Zweitantikörper. Nach waschen mit PBS folgte eine Inkubation mit 3% H₂O₂ für 15 min, um endogene Peroxidase-Aktivität abzusättigen. Anschließend wurde mit 0,001% Avidin und 0,001% Biotin für 15 min inkubiert, um im Gewebe sitzendes Avidin abzusättigen. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen, der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurde der Primärantikörper mit PBS abgewaschen und der biotinylierte Zweitantikörper (Verdünnung 1:200) aufgetragen und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden nun mit Hilfe des Avidin-Biotin-Komplex-Reagenzes (ABC-Reagenz) (Vectastain Elite ABC kit: 10 mM Natriumphosphat, 0,9% NaCl, pH 7,5) gemischt mit einem Tropfen Reagenz A und einem Tropfen Reagenz B (PK-6100; Vector Lab) und dem Diaminobenzidin (DAB) Chromogen (Vector Lab, Burlingame, Canada) visualisiert. (Abb. 10 a). Dazu wurden die Schnitte 30 min mit dem angesetzten ABC-Reagenz und anschließend für ein bis zehn min mit dem DAB Reagenz inkubiert. DAB wird in Anwesenheit von H₂O₂ von

Material und Methoden

dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) zu einem braunen Chromogen umgesetzt. Das DAB wurde mit Leitungswasser abgewaschen, mit Hämatoxin die Kerne angefärbt und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte entwässert (1 min in 70% EtOH, 4 x 2 min in 100 % EtOH, 1 min in Roti-Histol, 2 x 3 min in Roti-Histol) und mit Eukitt (Fluka) eingedeckt. Die Bilder der einzelnen Färbungen wurden am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) in einer 200-400 fachen Vergrößerung mit Durchlicht aufgenommen.

Diese Methode fand Anwendung bei folgenden Antikörpern:

Anti- γ -H2AX (1:200, #9718, Cell Signaling, Herts, UK), anti-cleaved Caspase-3 (1:125 Niere, 1:400 Herz; #9661, Cell Signaling, Herts, UK), anti-Ang II (1:400, T-4007, Peninsula Laboratories, San Carlos, Canada), AT₁ (N10) (1:200, sc-1173, Santa Cruz)

Zweitantikörper: donkey anti-rabbit IgG-B (sc-2089, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

3.2.4.2 Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Diese Methode zur Visualisierung wurde zur Detektion von Doppelstrangbrüchen (anti- γ -H2AX; 1:200, Niere) und zur Detektion von Apoptose (anti-cleaved Caspase-3; 1:800, Niere) im Interventionsversuch angewandt. Die Färbung läuft ähnlich ab wie die DAB-Methode. Allerdings fällt hier das Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität sowie das Blocken des endogenen Avidins weg. Zur Visualisierung des Primäantikörpers wurde ein mit Cy3-konjugierter goat anti-rabbit Zweitantikörper verwendet (Abb. 10 b). Nach Inkubation des Primäantikörpers über Nacht wurde der Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 1% goat serum für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem Waschen erfolgte die Zellkernfärbung mit Bisbenzimid für 5 min. Die Paraffinschnitte wurden abschließend mit Confocal Matrix (Micro-Tech-Lab, Graz, Austria) eingedeckt. Die Bilder der Färbung wurden am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) mit einem Tritic-Filter in der 200-fachen Vergrößerung aufgenommen.

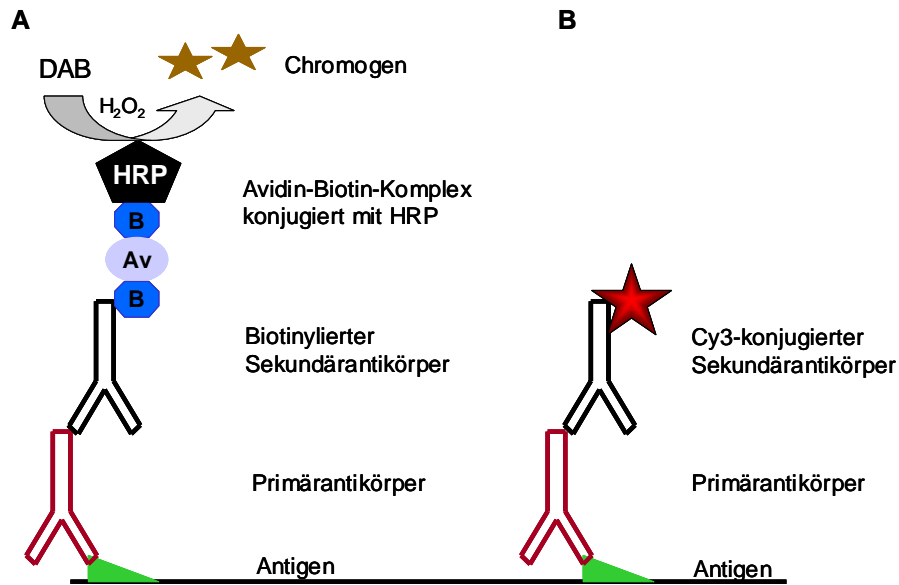


Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten, **A:** ABC-DAB-Reaktion: Der Primärantikörper bindet an das zu bestimmende Antigen und der korrespondierende Zweitantikörper an den Primärantikörper. Der ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex konjugiert mit HRP) bindet an den biotinylierten Zweitantikörper. DAB wird in Anwesenheit von H₂O₂ von dem Enzym HRP zu einem braunen Chromogen umgesetzt. **B:** Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen: Der Primärantikörper bindet an das zu bestimmende Antigen und der korrespondierende Cy3-konjugierte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper.

3.2.4.3 Amplifizierung mit Hilfe von TSA

Bei Antikörpern mit einem sehr schwachen Signal wurde zur Signalverstärkung mit dem TSA-Biotin-System (NEL700A001kit, Perkin Elmer, Watham, USA) gearbeitet. Bei dieser Färbung erfolgte die Entparaffinierung, die Antigendemaskierung, das Blocken der endogenen Peroxidase sowie des endogenen Avidins wie in 3.2.4.1 beschrieben. Nach Einwirkung des Antikörpers über Nacht und nachfolgender Behandlung mit dem biotinylierten Zweitantikörper, erfolgte die Inkubation von Streptavidin-HRP 1:100 verdünnt in TNB-Puffer (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,5% Blocking Reagenz, im Kit enthalten, pH 7,5) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach anschließendem Waschen mit TNT (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,2% Tween 20, pH 7,5) wurde das Tyramid-Amplifizierungs-Reagenz eingesetzt. Dieses ist eine phenolische Verbindung, die, aktiviert durch das Enzym HRP, in ein kurzlebiges, sehr reaktives Zwischenprodukt umgewandelt wird. Dieses reaktive Zwischenprodukt bindet sehr schnell kovalent an elektronenreiche Regionen angrenzender Proteine in der Nähe des HRP-gebundenen Enzyms. Diese Reaktion bildet die Grundlage der Signalverstärkung. Das biotinylierte Tyramid-Reagenz wurde 1:50 mit dem Amplifikationsverdünnungsmittel verdünnt und 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte

zur Visualisierung des gebundenen Antikörpers erneut die Inkubation von Streptavidin-HRP 1:100 verdünnt in TNB-Puffer für 30 min, gefolgt von der Behandlung mit DAB für 1 bis 10 min. DAB wird in Anwesenheit von H_2O_2 von dem Enzym HRP zu einem braunen Chromogen umgesetzt (Abb. 11). Die Schnitte wurden nun wie in Punkt 3.2.4.1 abschließend behandelt. Die Bilder der einzelnen Färbungen wurden am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) in einer 200-400 fachen Vergrößerung mit Durchlicht aufgenommen.

Diese Methode fand Anwendung bei folgenden Antikörpern:

Anti-Nrf2 (1:400 Niere, 1:800 Herz, sc-7200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-NF- κ B p65 (1:800, sc-109, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-PADPR (1:1500, ab14460, abcam, Cambridge, UK)

Zweitantikörper: donkey anti-rabbit IgG-B (sc-2089, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), goat anti-chicken IgY-B (sc-2430, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

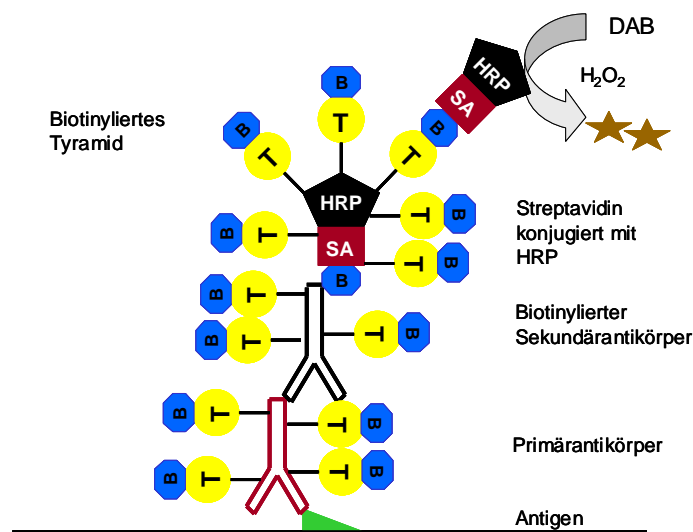


Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen mit Hilfe der TSA-Amplifizierung.

3.2.4.4 BrdU In-Situ Kit

Zur Detektion von proliferierenden Zellen in der Niere wurde die immunhistochemische Färbung auf Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten mit Hilfe des BrdU In-Situ Kits (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zunächst deparaffiniert (2 x 5 min Roti-Histol, 2 x 3 min 100% EtOH, 1 x 3 min 95% EtOH) und anschließend mit 3% H_2O_2 behandelt, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blocken. Nach

Material und Methoden

anschließendem Waschschrift erfolgte die Antigendemaskierung des eingebundenen BrdU in die DNA durch 10-minütiges Erhitzen in der im Kit dazu vorgesehenen Lösung. Nach 20-minütigem Abkühlen wurden die Schnitte mit dem biotinylierten anti-BrdU Antikörper (1:10 verdünnt mit Verdünnungspuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Visualisierung des Primärantikörpers erfolgt in diesem Kit direkt über das Enzym Streptavidin-HRP, welches das zugesetzte DAB in Anwesenheit von H₂O₂ zu einem braunen Chromogen umsetzt. Dazu wurde das im Kit vorhandene ready-to-use Streptavidin-HRP für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Schnitte gewaschen und die DAB-Lösung für 10 min inkubiert. Das DAB wurde mit Leitungswasser abgewaschen, mit Hämatoxilin die Kerne angefärbt und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte entwässert (2 x 5 min mit 95% EtOH, 2 x 5 min mit 100% EtOH, 3 x 5 min mit Roti-Histol) und mit Eukitt (Fluka) eingedeckt. Die Bilder der Färbung wurden am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) in einer 200-fachen Vergrößerung mit Durchlicht aufgenommen.

3.2.4.5 Quantifizierung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte zum einen durch Auszählen der positiven Zellen und Beziehen dieser auf die Herz- bzw. Nierenfläche des jeweiligen Tieres. Dies erfolgte bei Färbungen, die insgesamt nur einen geringen Anteil an positiven Zellen aufwiesen. Zum anderen wurde mit Hilfe des Programmes CellProfiler (cell image analysis software) 2.0 (www.cellprofiler.org) die Gesamtzellzahl und somit die Prozentzahl an positiven Zellen bestimmt.

3.2.5 Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung auf Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Niere und im Herzen, wurde das Fluorophor Dihydroethidium (DHE) verwendet. In Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies wird DHE in seine reduzierte Form Ethidium umgewandelt, wobei sich die Farbe der Fluoreszenz nach Interkalation mit der DNA von blau nach rot umwandelt. Die Färbung wurde auf 5 µm dicken Gefrierschnitten durchgeführt, welche am Gerät Leica CM 3050 S angefertigt wurden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte, bei -80°C gelagert, über Nacht aufbewahrt. Zur Anfärbung der Schnitte wurden die Proben kurz angetaut und

Material und Methoden

anschließend mit 10 μM DHE-Lösung für 30 min (Niere) bzw. 20 min (Herz) im Dunkeln bei Raumtemperatur behandelt. Die gefärbten Schnitte wurden dann direkt am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) im Tritic-Filter mit der Kamera Intas MP5000 (Intas, Göttingen, Deutschland) fotografiert. Die Auswertung erfolgte für den Dosisversuch mittels Quantifizierung der Grauwerte von 500 Zellen mit dem Programm Image J 1.40 (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Im Interventionsversuch erfolgte die Auswertung der Färbung mit dem Programm CellProfiler 2.0 (cell image analysis software) (www.cellprofiler.org). Hier wurden 7 Bilder pro Tier zur Auswertung herangezogen.

3.2.6 Proteinchemie: Western Blot

Der Western Blot stellt ein Verfahren zur Übertragung von Proteinen aus einem Proteingemisch (z. B. Zellysate oder Gewebeprobe) auf eine Trägermembran dar, die anschließend durch spezifische Antikörperreaktionen auf unterschiedlichste Weise detektiert werden können. Der erste Schritt besteht darin, das Proteingemisch mit Hilfe der Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 2D-Gelelektrophorese), der Größe nach in einzelne Proteinbanden aufzutrennen. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran [Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)] übertragen (Blotting), auf welcher sie mit Hilfe von Antikörpern, die speziell gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet sind, detektiert werden können. Die Sichtbarmachung der Antigene kann dabei u.a. durch Farb- oder Chemilumineszenzreaktionen oder durch Autoradiographie erfolgen.

Zur Proteinisolation wurden ca. 25-40 mg Nierengewebe in flüssigem Stickstoff kleingemörsert. Das Gewebe wurde mit 500 μl RIPA-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,025% Natriumdesoxycholat, 1% Nonidet, 1mM NaF), dem ein Protease-Inhibitor-Cocktail und ein Phosphataseinhibitor (Thermo Scientific, Rockford, USA) jeweils in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugesetzt sind, versetzt. Das Gewebe wurde mit einem Mikropistill kleingemörsert, anschließend 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 [64] bestimmt. Zur Probenvorbereitung wurden 50 μg Probe 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

Material und Methoden

abgekühlt. Es handelt sich hierbei um ein denaturierendes und reduzierendes Verfahren. Die Behandlung der Proteine mit SDS und Hitze führt zu ihrem Verlust an Sekundär- und Tertiärstruktur durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen. Zudem überdeckt SDS die Eigenladungen der Proteine, wodurch es eine konstante negative Ladung aufweist. Außerdem sorgt β -Mercaptoethanol durch Reduktion für die Spaltung von Disulfidbrücken. Zur Auftrennung wurden die Proben auf ein 12,5% Polyacrylamidgel geladen, und im Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3 mM SDS) eine elektrische Spannung angelegt (100 V für 30 min, 200 V für eine Stunde), wodurch eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel bewirkt wird, die sich nun nach ihrer Größe auftrennen. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des Nass-Blott-Verfahrens auf die PVDF Membran (Roti-PVDF, 0,45 μ m, Roth, Karlsruhe, Deutschland) geblottet, die aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften bleiben. Der Nass-Blott erfolgte in der Elektrophoresekammer im Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% MeOH) bei 100 V für 60 min. Zur Größeneinordnung der zu detektierenden Proteine liefen gleichzeitig farbige markierte Marker (Page Ruler, Thermo Scientific, Rockford, USA) im Gel. Um zu bestätigen, dass das Blotten erfolgreich war, erfolgte ein Anfärben der Membran mit Ponceau S (1500 mg Ponceau S, 80ml MeOH, 30 ml Essigsäure, 90 ml H₂O) mit anschließendem Entfärben. Die Membranen wurden mindestens 2 Stunden in Blockierlösung [5% Milchpulver oder 1% BSA in TBS-T (Tris-gepufferte Saline) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20)] inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde der Primärantikörper aufgetragen (HO-1, 1:1000, # 2322-1, Epitomics, Burlingame, USA; NOX 4, 1:3000, # 3187-1, Epitomics, Burlingame, USA; GAPDH, 1:2000, # 2118, Cell Signaling, Herts, UK) und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 3 x 10 min waschen mit Blockierlösung, erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper (anti-rabbit IgG HRP, 1:3000-1:7000, # 7074S; Cell Signaling, Herts, UK) für 60 min bei Raumtemperatur. Nach 3 x 10 min waschen mit Blockierlösung, wurde die Membran kurz mit TBS-T gewaschen und für 1 min mit Luminol (Supersignal West Dura, Thermo Scientific, Rockford, USA) behandelt. HRP überführt in Anwesenheit von H₂O₂ Luminol in seine oxidierte Form, die nun auf einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK) detektiert werden kann. Die Auswertung erfolgte am Gel Doc

Material und Methoden

2000 (BioRad, Hercules, Canada) mit Hilfe des Auswertungsprogrammes MultiAnalyst 1.0.2 (BioRad, Hercules, Canada).

3.2.7 Semiquantitative Untersuchung der Niere / Histopathologie

Die Niere wurde auf histopathologische Veränderungen hin untersucht. Dazu wurden im Arbeitskreis von Frau Dr. Amann (Institut für Nephropathologie, Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland) 2 µm dicke Nierenschnitte hergestellt, die mit unterschiedlichen Färbemethoden behandelt wurden. Um histopathologische Veränderungen in der Niere feststellen zu können, wurden 3 verschiedene Schädigungsindices (Scores) ausgewertet: Mesangiolyseindex (MSI), Glomeruloskleroseindex (GSI), Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI) und Vaskulärer Schädigungsindex (VSI).

3.2.7.1 Mesangiolyseindex (MSI)/ Glomeruloskleroseindex (GSI)

Der Mesangiolyseindex und der Glomeruloskleroseindex beurteilen beide die Beschaffenheit der Glomeruli in der Niere und wurden parallel ausgewertet, da beide Parameter ineinander übergehen. Es wurden sowohl das Mesangium als auch die Kapillaren auf histopathologische Veränderungen hin untersucht. Anhand des Glomeruloskleroseindex lässt sich das Ausmaß der Schädigung des Glomerulums in Form von Proliferation der Mesangiumzellen und Vermehrung der mesangialen Matrix quantifizieren. Der Mesangiolyseindex hingegen beurteilt den Verlust an Mesangiumzellen und die damit einhergehende Vergrößerung einzelner Kapillaren. Dazu wurden periodic acid Schiff (PAS)-gefärbte Nierenschnitte mit einer 400-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop (Leica DM 750, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mäanderförmig ausgewertet und pro Maus 50 Glomeruli bewertet. Die Bewertung des Schädigungsgrades erfolgte über sogenannte Scores nach der Methode von El Nahas *et al* [65], die eine Aussage über die Stärke der Schädigung treffen (Tab. 3). Der GSI/MSI Score wurde durch die Bewertung von 50 Glomeruli pro Tier erfasst und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{GSI/MSI} = \frac{(n \times S_0) + (n \times S_1) + (n \times S_2) + (n \times S_3) + (n \times S_4)}{50}$$

S = Stadium 0-4

n = Anzahl der Glomeruli mit Stadium 0 bis 4

Tab. 3: Stadieneinteilung der Glomerulosklerose und Mesangiolyse nach El Nahas [65].

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

3.2.7.2 Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI)

Der tubulointerstitielle Schädigungsindex dient der Beurteilung des Tubulussystems sowie des umgebenden Interstitiums im Rindbereich der Niere. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Beurteilung von Sirius-gefärbten Präparaten und Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Präparaten in Anlehnung an der in Tabelle 4 aufgeführten Schädigungsmerkmale [66] in der 200-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop. Die Siriusfärbung diente der Erfassung von interstitieller Fibrose und Dilatation, während die HE-Färbung Entzündungsfelder hervorhebt. Der TSI Score wurde durch die Bewertung von 20 Gesichtsfeldern pro Tier/Färbung im Dosisversuch und 8 Gesichtsfelder pro Tier/Färbung im Interventionsversuch erfasst und nach folgender Formel berechnet:

$$TSI = \frac{[(nxS_0) + (nxS_1) + (nxS_2) + (nxS_3)]_{\text{Sirius}} + [(nxS_0) + (nxS_1) + (nxS_2) + (nxS_3)]_{\text{HE}}}{40 \text{ bzw. } 16}$$

S = Stadium 0-3

n = Anzahl der Glomeruli mit Stadium 0 bis 3

Tab. 4: Stadien der tubulointerstitiellen Schädigung nach Véniant [66].

Stadium (Score)	Histologische Veränderungen	Prozentualer Anteil
0	Normales Tubulussystem	0%
1	Zeichen einer interstitiellen Entzündung und Fibrose, tubuläre Atrophie	<25%
2	Zeichen einer interstitiellen Entzündung und Fibrose, tubuläre Atrophie und Dilatation	25-50%
3	Zeichen einer interstitiellen Entzündung und Fibrose, tubuläre Atrophie und Dilatation	>50%

3.2.7.3 Vaskulärer Schädigungsindex

Der vaskuläre Schädigungsindex beschreibt die morphologischen Veränderungen der Gefäße in der Nierenrinde, in dem die Gefäßwandverdickung sowie fibronoide Nekrosen beurteilt werden. Die Auswertung erfolgte anhand HE-gefärbter Schnitte im Nierenrindenbereich in der 200-fachen Vergrößerung am Lichtmikroskop (Leica DM 750). Pro Tier wurden 20 Gefäße im Dosisversuch und 10 Gefäße im Interventionsversuch anhand der Stadien nach Véniant *et al* [66] eingeteilt (Tab. 5).

Der vaskuläre Schädigungsindex errechnet sich wie folgt:

$$VSI = \frac{(n \times S_0) + (n \times S_1) + (n \times S_2) + (n \times S_3) + (n \times S_4)}{20 \text{ bzw. } 10}$$

S = Stadium 0-4

n = Anzahl der Glomeruli mit Stadium 0 bis 4

Tab. 5: Stadien der vaskulären Schädigung nach Véniant [66].

Stadium (Score)	Histologische Veränderungen	Gefäßwandverdickung
0	Normale Gefäße	0%
1	Geringe Gefäßwandverdickung	25%
2	Moderate Gefäßwandverdickung	25-50%
3	Schwere Gefäßwandverdickung	50%
4	Fibrinoide Gefäßwandverdickung	

3.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren von Proteinen. Es handelt sich hierbei um ein enzymatisches Immunadsorptionsverfahren, wobei das nachzuweisende Antigen über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden wird. Die Grundlage bildet eine Immunreaktion, die mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht wird. So kann die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes bestimmt werden, die entweder fluorimetrisch oder colorimetrisch nachgewiesen werden kann. Am häufigsten eingesetzt werden der Sandwich-ELISA oder der kompetitive Immunassay.

3.2.8.1 Sandwich-ELISA

Das Prinzip des Sandwich-ELISA wurde zur Messung von Albumin und NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) im Urin herangezogen, die mit Hilfe des entsprechenden Maus-Albumin ELISA-Kit (EMA 3201-1, AssayPro, St. Charles, USA) bzw. mit Hilfe des Maus-NGAL ELISA-Kit (Kit 042, Bio Porto, Gentofte, Denmark) gemessen wurden. Beim Sandwich-ELISA verwendet man zwei Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Dabei ist der erste Antikörper (capture antibody) an eine Mikrotiterplatte gebunden. Die zu untersuchende Probe wird inkubiert und das in der Probe enthaltene Antigen bindet an den capture antibody. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen und die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt. Anschließend wird ein biotinylierter Zweitantikörper der Platte zugegeben, an dem im nächsten Schritt die an Streptavidin gebundene HRP bindet und das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) umsetzt, welches anschließend an einem Photometer mit entsprechender Wellenlänge vermessen werden kann (Abb. 12).

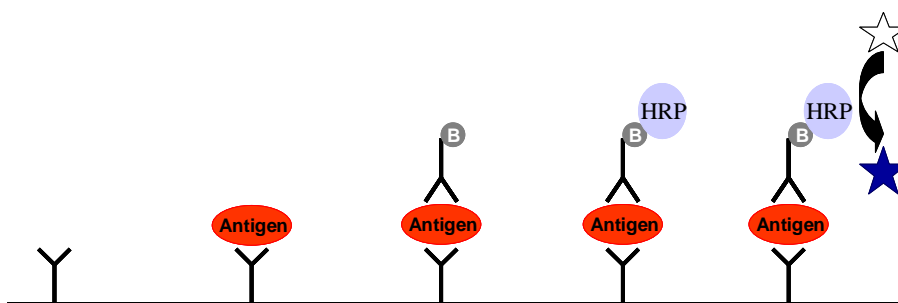


Abb. 12: Verlaufsschema des Sandwich-ELISA.

3.2.8.1.1 NGAL ELISA-Kit

Zu Beginn wurden Waschkonzentrat, Verdünnungskonzentrat und der NGAL-Standard nach Angaben des Herstellers entsprechend verdünnt und aus dem Standard zusätzlich eine Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Urinproben des 28. Tages des Dosisversuchs mit Hilfe der Verdünnungslösung. Alle Proben wurden 1:150 verdünnt mit Ausnahmen der Proben von Maus 5, 19, 39, 40, die 1:300 und Maus 20, die 1:400 verdünnt wurden. Nun wurden je 100 µl Standard bzw. verdünnte Urinprobe auf die mit dem Maus-NGAL-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit der Waschlösung erfolgte die Inkubation mit 100 µl biotinyliertem Maus-NGAL-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der überschüssige Antikörper wurde durch Waschen entfernt und es folgte die Inkubation der Streptavidin-konjugierten HRP für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit der Waschlösung wurde das TMB-Substrat zugegeben und dieses 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich die Lösung blau färbte. Zur Abstopfung der Reaktion wurde 100 µl Stopplösung in jedes Well zugegeben, was einen Farbumschlag von blau nach gelb zur Folge hatte. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm am Photometer Spectra Max 340 (Molecular Devices, Ismaning, Deutschland).

3.2.8.1.2 Albumin Elisa-Kit

Zu Beginn wurden Waschkonzentrat, Verdünnungskonzentrat, die Streptavidin-HRP, der biotinylierte Maus-Albumin-Antikörper und der Albumin-Standard nach Angaben des Herstellers entsprechend verdünnt und aus dem Standard zusätzlich eine Verdünnungsreihe hergestellt. Im Dosisversuch erfolgte die Bestimmung des Albumins im Urin vom 28. Tag. Im Interventionsversuch wurde die Bestimmung des Albumins zu Beginn, in der Mitte und am Ende des Tierversuches durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte nach folgendem Schema:

Material und Methoden

Tab. 6: linke Tab.: Verdünnungsschema des Interventionsversuchs im Albumin ELISA; rechte Tab.: Verdünnungsschema des Dosisversuchs im Albumin ELISA.

Gruppe	Verdünnung		
	Tag 0	Tag 14	Tag 28
Kontrolle	1:600	1:600	1:600
Angiotensin II	1:600	1:800	1:1000
Candesartan	1:600	1:600	1:600
Ramipril	1:600	1:800	1:1000
Hydralazin	1:600	1:400	1:600
Eplerenon	1:600	1:800	1:1000
Tempol	1:600	1:800	1:1000

Gruppe	Verdünnung
Kontrolle	1:600
Nopressor	1:600
Slowpressor 1	1:800
Slowpressor 2	1:1200
Pressor	1:1500

Die Durchführung des ELISA erfolgte wie in 3.2.8.1.1 beschrieben und die Messung der Absorption erfolgte ebenfalls bei 450 nm am Photometer Spectra Max 340 (Molecular Devices, Ismaning, Deutschland).

3.2.8.2 Kompetitiver ELISA

Das Prinzip des kompetitiven ELISA wurde zur Messung von Aldosteron (Aldosteron ELISA-Kit, EMA 3201-1, Assay Pro, St. Charles, USA) herangezogen. Beim kompetitiven ELISA wird zur Detektion kein zweiter, markierter Antikörper verwendet, sondern ein mit HRP markiertes Kompetitor-Antigen eingesetzt. Dieses markierte Antigen und das zu bestimmende Antigen in der Probe konkurrieren dann um einen Bindungsplatz am Antikörper, der an die Mikrotiterplatte gebunden ist. Die HRP setzt dann wiederum ein zugegebenes Substrat um, welches am Photometer vermessen werden kann. Daraus folgt, je mehr Substrat umgesetzt wird, desto weniger Antigen ist in der Probe vorhanden. Das Signal verhält sich umgekehrt proportional zur Analyt-Konzentration (Abb. 13).

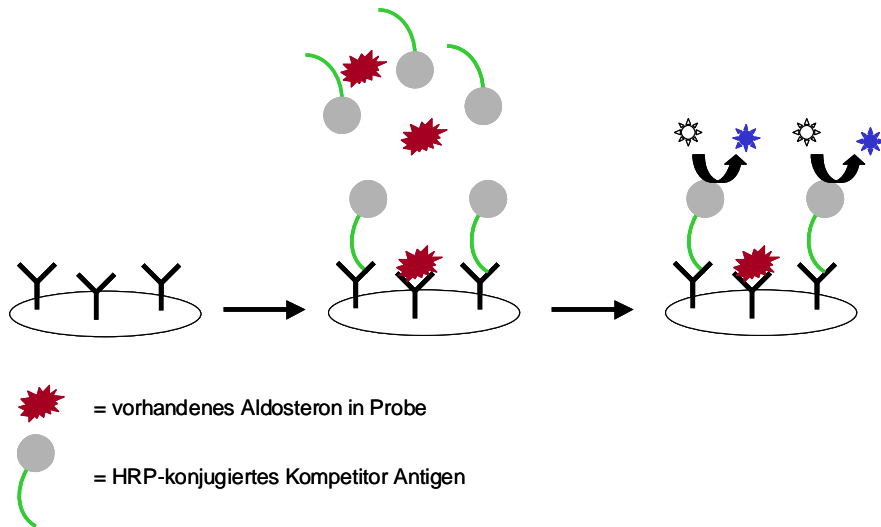


Abb. 13: Verlaufsschema des kompetitiven ELISA.

3.2.8.2.1 Aldosteron ELISA-Kit

Nach Verdünnung des Waschkonzentrats und des Aldosteron-HRP-Konjugates nach Angaben des Herstellers erfolgte die Verdünnung der Urinprobe von Tag 28 des Dosisversuchs und des Interventionsversuchs nach folgendem Schema:

Tab. 8: linke Tab.: Verdünnungsschema des Interventionsversuchs im Aldosteron-ELISA, rechte Tab.: Verdünnungsschema des Dosisversuchs im Aldosteron-ELISA.

Gruppe	Verdünnung
Kontrolle	1:5
Angiotensin II	1:50
Candesartan	1:5
Ramipril	1:25
Hydralazin	1:25
Eplerenon	1:25
Tempol	1:25

Gruppe	Verdünnung
Kontrolle	1:5
Nopressor	1:5
Slowpressor 1	1:5
Slowpressor 2	1:25
Pressor	1:50

Es wurden jeweils 50 µl Standard bzw. verdünnte Urinprobe auf die mit dem Aldosteron-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde 100 µl Aldosteron-HRP-Konjugat aufgetragen und die Lösungen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer erfolgte die Zugabe von 150 µl TMB-Substrat, welches 10 min im Dunkeln bei

Material und Methoden

Raumtemperatur inkubierte, wobei sich die Lösung blau färbte. Zur Abstopfung der Reaktion wurde 50 µl Stopplösung in jedes Well zugegeben, was einen Farbumschlag von blau nach gelb zur Folge hatte. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm am Photometer Spectra Max 340 (Molecular Devices, Ismaning, Deutschland).

3.2.9 Klinische Parameter

Zur Überprüfung der Nierenfunktion wurde im Urin der Kreatinin-, der Natrium- und der Harnstoffwert, im Serum der Kreatinin- und Harnstoffwert bestimmt. Diese Parameter wurden nach Standardprotokoll an den Geräten Cobas C6000/Cobas C8000 und Cobas Integra 800 (Roche, Mannheim, Deutschland) am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie an der Universität Würzburg ermittelt.

3.2.10 Quantifizierung von 8-OxodG mittels Flüssigchromatographie - Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS)

Die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung ist eine analytische Methode, die die Flüssigchromatographie, die der Auftrennung der Probe dient, mit der Massenspektrometrie kombiniert, die zur Identifikation bzw. Quantifizierung der Substanzen herangezogen wird. Der Gehalt an 8-OxodG wurde in isolierter DNA der Niere bestimmt.

Zur Isolierung der Nieren-DNA wurde wie bereits in Schupp *et al* [67] beschrieben vorgegangen: zur Isolierung wurde von jeder Maus eine halbe gefrorene Niere mit 3 ml Puffer A [320 mM Sucrose, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM Deferoxamin (DFO) , 1% Triton X-100] homogenisiert. Nach der Homogenisation erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 4°C, 3500 rpm. Anschließend wurde der Überstand verworfen, mit 1,5 ml Puffer A gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 300 µl Puffer B (10 mM Tris, 5 mM EDTA-Na₂, pH 8, 0,15 mM DFO) und 35 µl 10% Natriumdodecylsulfat zum Pellet zugegeben und vorsichtig gevortext. Nach Zugabe von 30 µl RNase A (1 mg/ml) in RNase Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 2,5 mM DFO, pH 7,4) und 10 µl RNase T1 (1 U/µl) wurden die Proben eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um verunreinigte RNA von der DNA zu trennen. Nach dieser Stunde wurden 30 µl Proteinase K (20mg/ml) zur Lösung dazugegeben und eine weitere Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Material und Methoden

Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch langsame Zugabe einer Natriumiodid (NaI)-Lösung (7,6 M NaI, 40 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA-Na₂, 0,3 mM DFO, pH 8) und 2 ml 2-Propanol. Die Probe wurde in einem Tube vorsichtig bis zur vollständigen Präzipitation der DNA umgeschüttelt und anschließend für 15 min bei 4° C, 5000 g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zunächst mit 1 ml 40% 2-Propanol gewaschen, zentrifugiert und dann mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und wieder zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde gesammelt und über Nacht in 0,1 mM DFO gelöst. Die Reinheit der Probe wurde am Photometer mittels dem Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} ermittelt. Ein Verhältnis von größer 1,6 war akzeptabel und die Proteinkontamination vernachlässigbar. Die Proteinkonzentration wurde dann am Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Hydrolyse und Analyse der DNA wurde wie in Schupp *et al* [67] beschrieben, am Auto Sampler (Agilent 1100 series, Agilent Technologie, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt.

3.2.11 Statistik

Die Daten von 5-8 Tieren sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Zur Statistikauswertung wurde das Programm SPSS 18 (IBM, Somers, USA) herangezogen. Im Dosisversuch erfolgte die Überprüfung auf Signifikanz mittels der Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Vergleich gegen die Kontrolle durch Dunnett. Zur Signifikanzüberprüfung im Fall der BrdU-behandelten Tiere (n=4) wurde der Mann-Whitney-U-test ausgewählt. Im Interventionsversuch erfolgte die Überprüfung auf Signifikanz mittels der Varianzanalyse mit anschließendem post-hoc Vergleich gegen die Kontroll- und Ang II-Gruppe durch Bonferroni. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant anerkannt.

4. Ergebnisse

4.1 Dosisversuch

Der Dosisversuch sollte zunächst prüfen ob steigende Ang II-Konzentrationen einen Einfluss auf die genomische Stabilität von Nieren- und Herzzellen besitzen.

4.1.1 Veränderung des Blutdrucks durch steigende Angiotensin II-Konzentrationen

Wie erwartet, führten die drei höchsten Ang II-Konzentrationen (200, 400 und 1000 ng/kg x min, SP-1, SP-2 und Pressor) zu einem Blutdruckanstieg in der Maus [68]. Die Pressor-Konzentration führte bereits zwei Tage nach Implantation der osmotischen Minipumpe zu einem signifikant erhöhten Blutdruck gegenüber der Kontrolle und blieb bis auf die Messungen an Tag 10 und Tag 14 auf diesem signifikanten Niveau (Abb. 14). Die No-Pressor-Konzentration zeigte wie erwünscht an allen Messtagen keinen Einfluss auf den Blutdruck. Die SP-1-Konzentration ließ den Blutdruck erst zu Ende des Versuchs ansteigen. Die Werte erreichten aber gegenüber der Kontrolle keine Signifikanz. Die SP-2-Konzentration führte zu einem schnelleren Blutdruckanstieg als erwartet und war ab Messtag 10 (ausgenommen Messtag 24) gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Am Ende des Versuchs lag der höchste Blutdruckwert innerhalb der fünf Gruppen bei 162 mmHg in der SP-2-Gruppe.

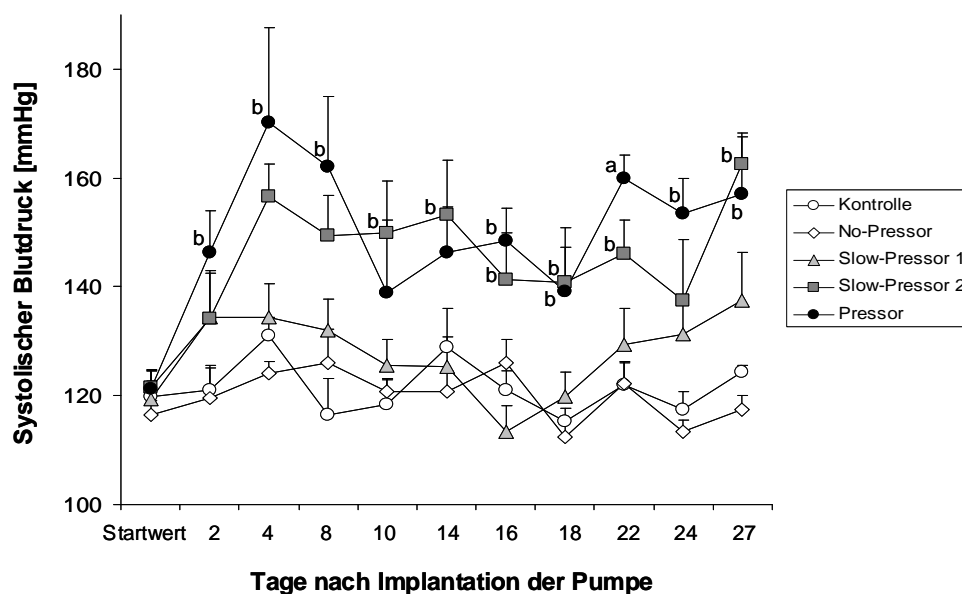


Abb. 14: Systolischer Blutdruck [mmHg] in Angiotensin II-infundierten Mäusen, ermittelt durch nicht-invasive Blutdruckmessung während 28 Tagen, n = 8, (Slow-Pressor 2: n = 7). b: p < 0,01 vs Kontrolle; a: p < 0,001 vs. Kontrolle.

Ergebnisse

4.1.2 Gewichtsparameter

Die Auswertung der klinischen Parameter zeigten in Bezug auf Körpergewicht und relatives Nierengewicht durch die Ang II-Behandlung keine signifikanten Veränderungen (Tab. 9). Allerdings war das relative Herzgewicht in der Pressor-Gruppe signifikant erhöht.

Tab. 9: Übersicht über klinische Parameter in Angiotensin II-infundierten Mäusen am Ende der Versuchsreihe. *** $p < 0,001$.

	Kontrolle (n=8)	No-Pressor (n=8)	Slow- Pressor 1 (n=8)	Slow- Pressor 2 (n=7)	Pressor (n=8)
Körpergewicht [g]	26,92 ± 1,37	25,23 ± 1,08	29,96 ± 0,46	27,98 ± 1,50	28,53 ± 1,22
Relatives Nierengewicht [‰]	6,80 ± 0,20	7,06 ± 1,39	6,96 ± 0,23	6,84 ± 0,27	6,75 ± 0,19
Relatives Herzgewicht [‰]	6,62 ± 0,34	6,56 ± 0,29	6,98 ± 0,32	8,0 ± 0,48	9,30 ± 0,48***

4.1.3 Nierenfunktionsparameter

Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurden am Ende der Versuchsreihe unterschiedliche Parameter herangezogen. Durch die Albuminausscheidung lässt sich beurteilen, ob eine mögliche Nierenschädigung vorliegt. In der Pressor-Gruppe nahm dieser Wert signifikant um das 7-fache gegenüber der Kontroll-Gruppe zu. NGAL, ein sensitiver Biomarker der akuten Nierenschädigung, stieg in der Pressor-Gruppe um das 3-fache gegenüber der Kontroll-Gruppe an, erreichte aber keine Signifikanz. Des Weiteren wurden die Harnstoffwerte im Serum und Urin zur Bewertung herangezogen. Der Harnstoffwert im Serum war in der Pressor-Gruppe signifikant erhöht. Die gleichmäßige Harnstoffausscheidung im Urin der Gruppen deutet nicht auf Unterschiede in der Futtermenge hin, sondern auf eine Einschränkung der Nierenfunktion. Auch die Kreatininausscheidung nahm innerhalb der fünf Gruppen dosisabhängig leicht ab (Tab. 10).

Die Aldosteronausscheidung war in der Pressor-Gruppe signifikant erhöht, wodurch eine erhöhte Aldosteronfreisetzung durch Ang II gezeigt werden konnte (Tab. 10).

Ergebnisse

Tab. 10: Übersicht über Nierenfunktionsparameter im Urin und Harnstoff im Serum nach 28 Tagen Angiotensin II-Infusion. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	Kontrolle (n=8)	No-Pressor (n=8)	Slow- Pressor 1 (n=8)	Slow- Pressor 2 (n=7)	Pressor (n=8)
Diurese [ml/20h]	1,91 ± 0,19	2,22 ± 0,26	2,11 ± 0,36	1,87 ± 0,28	2,71 ± 0,77
Natrium [mmol/l]	83,73 ± 7,85	84,44 ± 3,94	92,39 ± 7,41 (n=7)	72,18 ± 9,92 (n=6)	50,38 ± 11,64*
Kreatinin- Ausscheidung [mg/20h]	0,32 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,20 ± 0,04
NGAL- Ausscheidung [ng/20h]	52,16 ± 17,47	73,02 ± 17,52	97,29 ± 75,75 (n=7)	122,09 ± 55,15	169,29 ± 83,04 (n=7)
Albumin- Ausscheidung [µg/20h]	32,69 ± 7,62	20,60 ± 4,67	27,33 ± 5,57 (n=7)	75,12 ± 22,07 (n=6)	249,77 ± 106,72** (n=7)
Harnstoff- Ausscheidung [mg/20h]	85,55 ± 13,61	83,48 ± 14,13	66,26 ± 9,39	69,80 ± 13,65	66,59 ± 18,57
Harnstoff im Serum [mmol/l]	76,39 ± 6,10	91,15 ± 19,99	70,25 ± 9,55	106,98 ± 87,91	208,57 ± 45,62*
Aldosteron- Ausscheidung [ng/20h]	5,02 ± 0,42	6,96 ± 1,30	8,12 ± 1,82 (n=7)	8,39 ± 1,5 (n=6)	14,83 ± 2,11*** (n=7)

4.1.4 Histopathologische Veränderungen durch die Angiotensin II-Behandlung

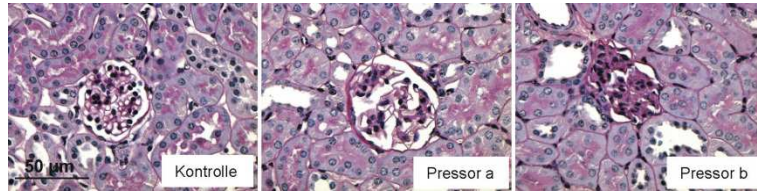
Um histopathologische Veränderungen der Niere feststellen zu können, wurden 3 verschiedene Schädigungsindizes ausgewertet. Die Parameter GSI/MSI beurteilen die Beschaffenheit der Glomeruli anhand des Mesangiums und der Kapillaren in der Niere (siehe 3.2.7.1). Der TSI dient der Beurteilung des Tubulussystems sowie des umgebenden Interstitiums im Rindbereich der Niere (siehe 3.2.7.2). Der VSI beschreibt die morphologischen Veränderungen der Gefäße in der Nierenrinde (siehe 3.2.7.3).

4.1.4.1 GSI/MSI

Die Behandlung mit Ang II führte zu histopathologischen Veränderungen der Glomeruli in der Niere. Die Glomeruli der Kontrolltiere zeigten eine normale Struktur, während Glomeruli der Pressor-Gruppe eine Proliferation der Mesangiumzellen und eine Vergrößerung einzelner Kapillaren zeigten. GSI und MSI stiegen beide dosisabhängig innerhalb der vier Behandlungsgruppen an (Abb. 15).

Ergebnisse

A



B

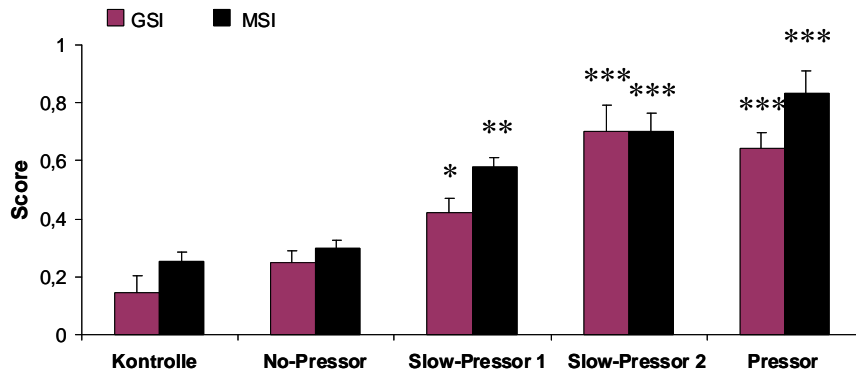
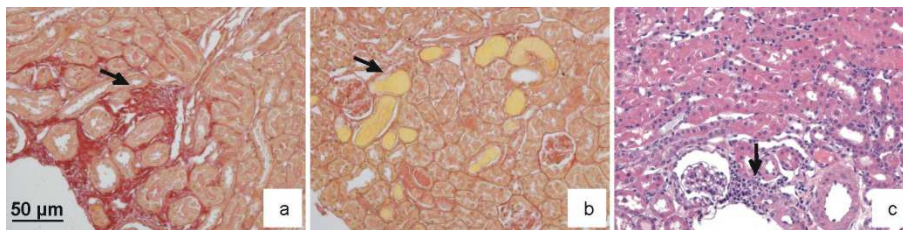


Abb. 15: Semiquantitative Auswertung des GSI/MSI. **A:** Bilder von Glomeruli der Kontroll-Gruppe und der Pressor-Gruppe: a; Vergrößerung der Kapillaren, b; Proliferation von Mesangiumzellen, HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung, **B:** Auswertung mit Hilfe der Scores (3.2.7.1). * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.4.2 TSI

Die Schädigung des Tubulussystems bestand hauptsächlich aus Dilatation und Fibrose, während Entzündung nur sehr selten vorkam. Der TSI war in der Pressor-Gruppe 4-fach erhöht gegenüber der Kontroll-Gruppe (Abb. 16).

A



B

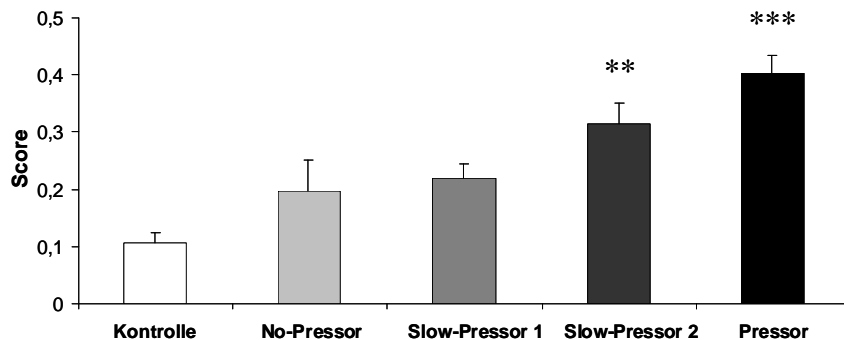


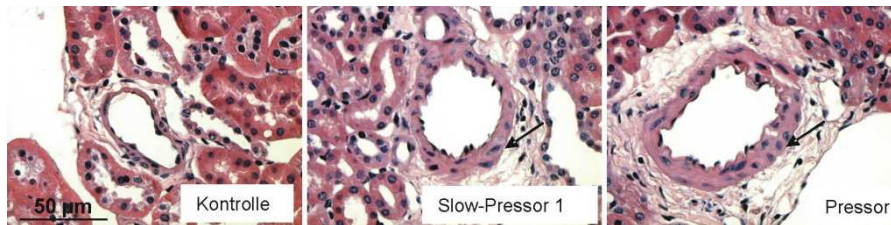
Abb. 16: Semiquantitative Auswertung des TSI. **A:** Die Bilder zeigen Beispiele der Marker, die zur Auswertung herangezogen wurden, wobei die Pfeile die Schädigung verdeutlichen. a=Fibrose, Rotfärbung, b=Dilatation, Gelbfärbung, c=Entzündungsherd. Sirius- und HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung, **B:** Auswertung mit Hilfe der Scores (3.2.7.2). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ergebnisse

4.1.4.3 VSI

Die vaskuläre Schädigung, die morphologische Gefäßwandveränderungen beschreibt, nahm innerhalb der vier Behandlungsgruppen dosisabhängig signifikant zu (Abb.17).

A



B

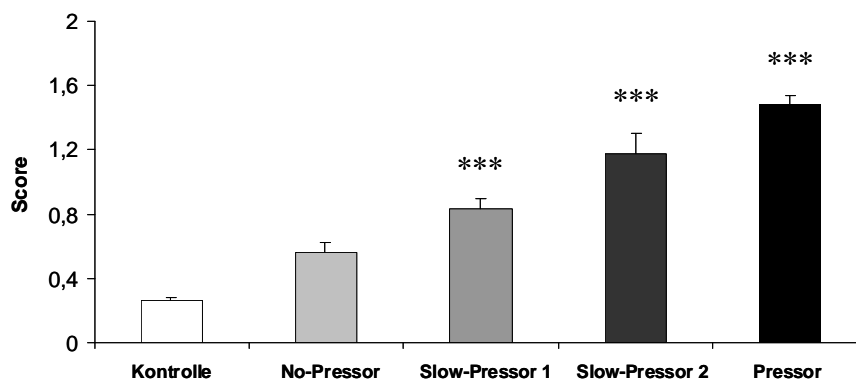


Abb. 17: Semiquantitative Auswertung des VSI. **A:** Die Bilder zeigen Gefäße der Kontroll-, SP-1- und Pressor-Gruppe, wobei die Pfeile die Gefäßwandverdickung aufzeigen. HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung, **B:** Auswertung mit Hilfe der Scores (3.2.7.3). *** $p < 0,001$.

4.1.5 Proliferationsindex

Der Proliferationsindex wurde in den Tieren bestimmt, die eine Woche vor Versuchsende mit BrdU behandelt wurden. BrdU ist ein Pyrimidinanalogon, welches anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Das Analogon kann anschließend mit Hilfe eines Antikörpers gegen BrdU immunhistochemisch nachgewiesen werden. Der Anteil an proliferierenden Tubuluszellen variierte zwischen den Gruppen nicht, während in den Glomeruli in der SP-2 Gruppe und in der Pressor-Gruppe mehr proliferierende Zellen gegenüber der Kontroll-Gruppe ermittelt wurden (Tab. 11).

Ergebnisse

Tab. 11: Übersicht über den Proliferationsindex ermittelt in der Niere, n = 4. * p ≤ 0,05.

	Kontrolle	No-Pressor	Slow-Pressor 1	Slow-Pressor 2	Pressor
% BrdU-positive Tubuluszellen	6,7 ± 0,9	9,4 ± 0,5	7,2 ± 0,6	6,3 ± 0,7	6,8 ± 0,9
BrdU-positive Zellen / Glomerulus	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,2*	1,5 ± 0,1*

4.1.6 Angiotensin II-Behandlung erhöht Angiotensin II-Gehalt in der Niere

Der Gehalt an Ang II in der Niere wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen Ang II mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. Die große Anzahl an Ang II-positiven Kernen (Braunfärbung) in der Pressor-Gruppe verdeutlicht erkennbar einen Anstieg des Gehaltes an Angiotensin II verglichen zur Kontroll-Gruppe (Abb. 18).

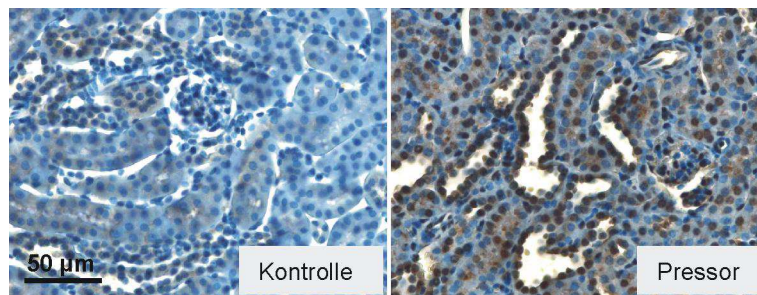


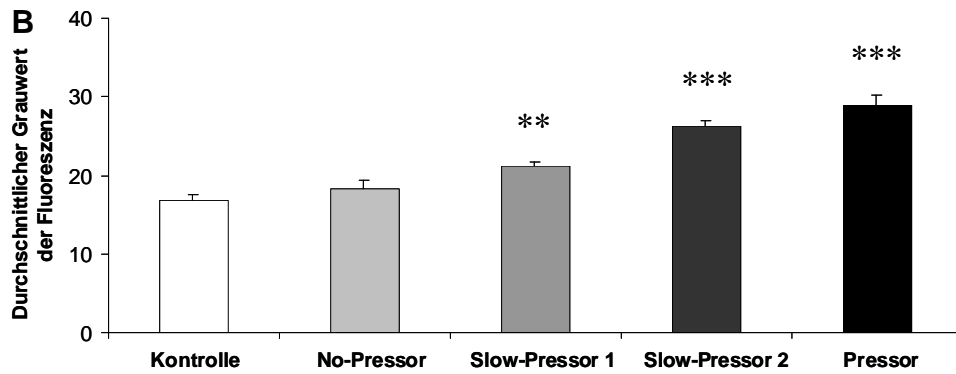
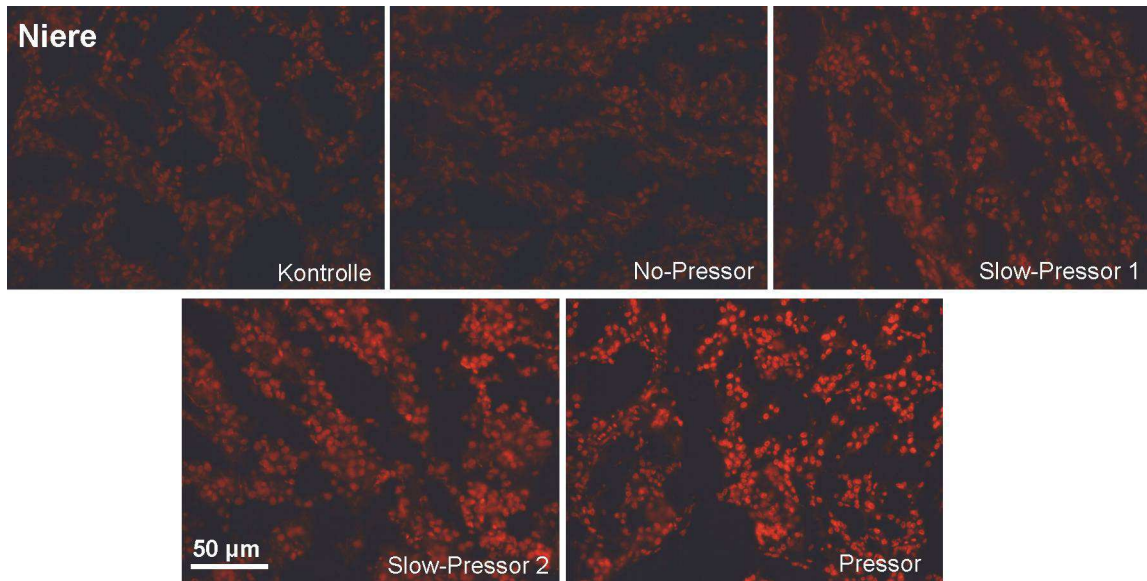
Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis von Angiotensin II auf Paraffinschnitten der Niere. Die Braunfärbung zeigt Angiotensin II-positiven Kern.

4.1.7 Angiotensin II-Behandlung führt zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Die Hypothese, dass Ang II die Bildung von ROS auslöst, wurde durch das Ergebnis der Färbung von Gefrierschnitten der Niere und des Herzens mit dem ROS-sensitiven Fluorophor Dihydroethidium, überprüft. Wie in den in Abb. 19a gezeigten Bildern zu erkennen, nimmt die Stärke der Fluoreszenz in der Niere dosisabhängig zu. Die Auswertung der Bilder ergab eine signifikante Erhöhung in der SP-1-, SP-2- und Pressor-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe (Abb. 19b). Im Herzen war die Stärke der Fluoreszenz nicht so ausgeprägt wie in der Niere. Hier konnte nur in der Pressor-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Bildung an reaktiven Sauerstoffspezies detektiert werden (Abb. 19c+d).

Ergebnisse

A



C

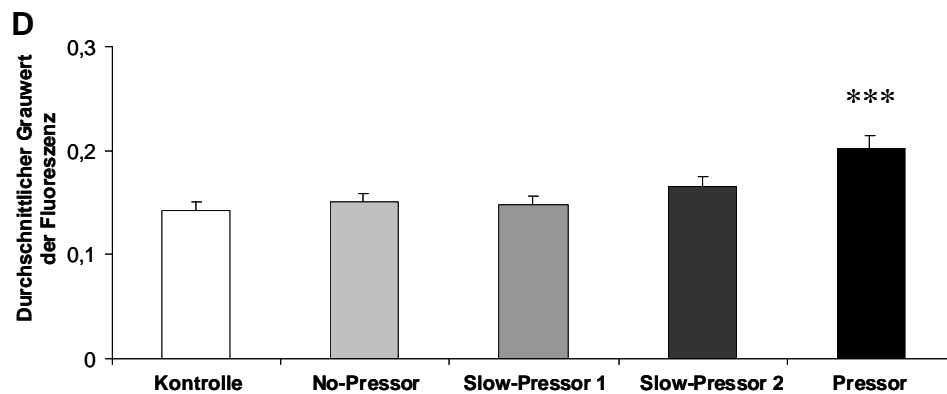
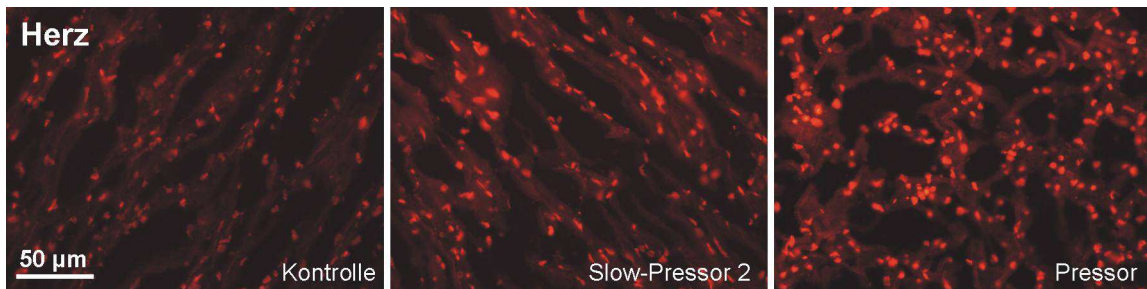


Abb. 19: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, visualisiert auf Gefrierschnitten der Niere (A) und des Herzens (C) mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffes DHE, 200-fache Vergrößerung, Quantifizierung der Fluoreszenz durch Messung des Grauwertes von 7 Gesichtsfeldern (B, D). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

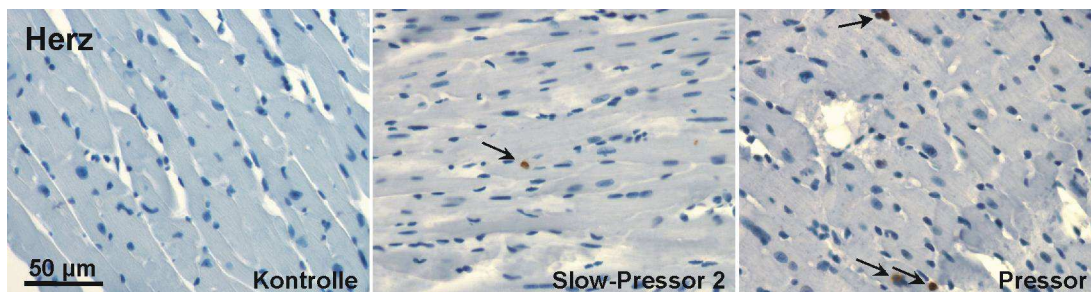
Ergebnisse

4.1.8 Angiotensin II-Behandlung führt zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Zur Detektion von Doppelstrangbrüchen in der DNA wurden Paraffinschnitte der Niere und des Herzens mit einem Antikörper gegen γ -H2AX immunhistochemisch gefärbt. H2AX ist ein Mitglied der H2A-Histon Familie. Die DNA ist um das Histon gewunden und es trägt somit zur Stabilisierung und Strukturformation der DNA bei. Als Reaktion auf Doppelstrangbrüche wird H2AX an der Aminosäure Serin 139 phosphoryliert, worauf es als γ -H2AX bezeichnet wird. Als γ -H2AX trägt es wesentlich zur Erkennung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA bei [69].

Die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies führte zur Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen im Herz und in der Niere. In beiden Organen ist ein signifikanter dosisabhängiger Anstieg an Doppelstrangbrüchen erkennbar. Aufgrund der geringen Anzahl an Doppelstrangbrüchen im Herz wurden hier zur Quantifizierung die positiven Zellen auf die Herzfläche bezogen (Abb. 20). In den Tubuluszellen der Niere konnte bereits in der No-Pressor-Gruppe eine erhöhte Bildung von Doppelstrangbrüchen verglichen mit der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 21). Die SP-1-, SP-2- und Pressor-Gruppen zeigten eine Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe.

A



B

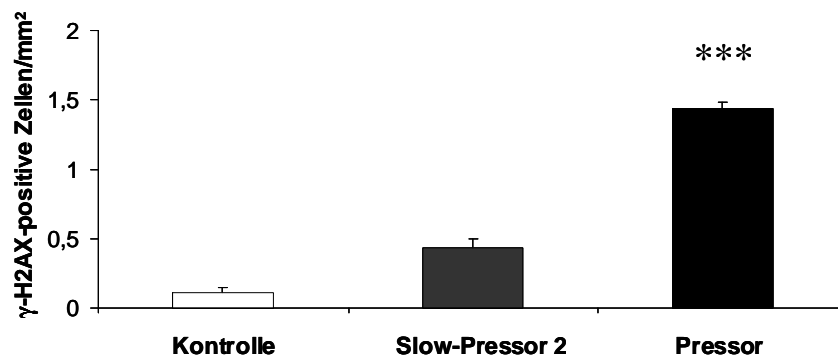
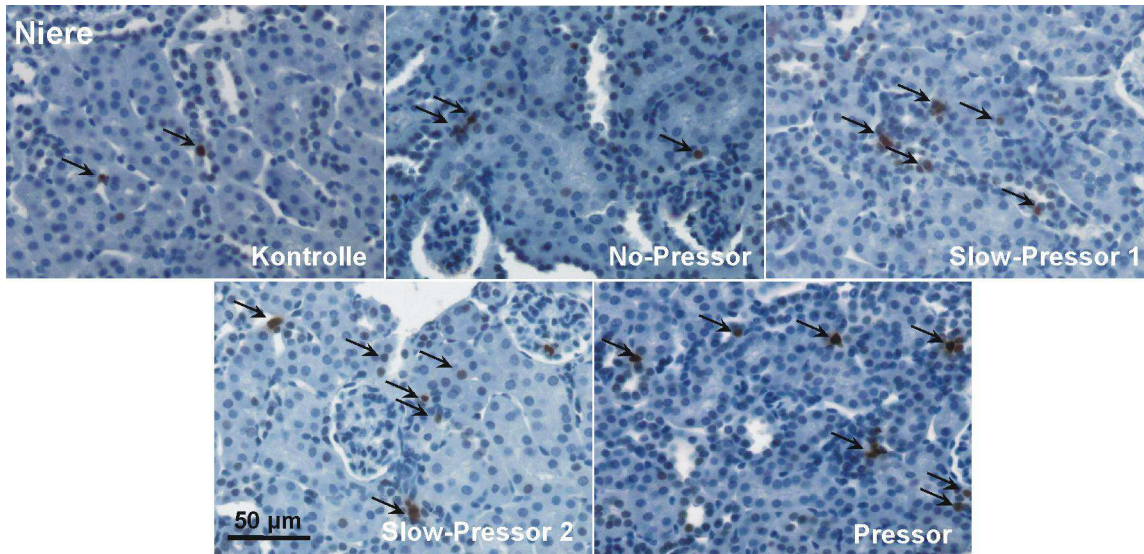


Abb. 20: **A:** Immunhistochemischer Nachweis von γ -H2AX auf Paraffinschnitten des Herzens, Pfeil zeigt Beispiel für γ -H2AX-positiven Kern, **B:** Die Quantifizierung erfolgte durch Beziehen der γ -H2AX-positiven Kerne auf die Herzfläche jedes Tieres. *** $p < 0,001$.

A



B

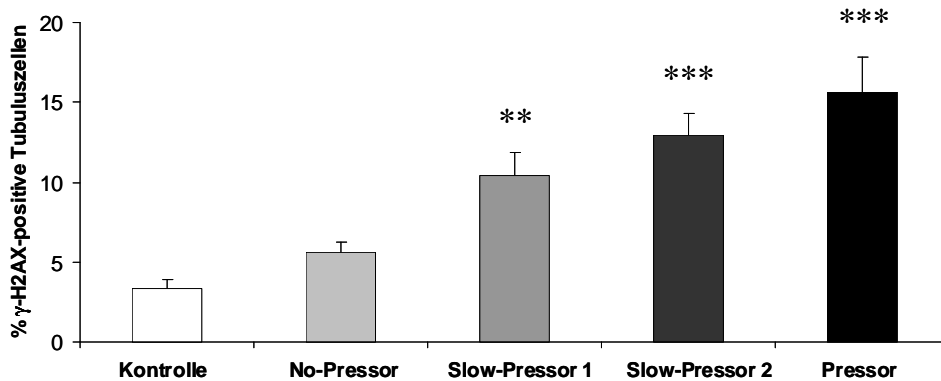


Abb. 21: **A:** Immunhistochemischer Nachweis von γ -H2AX auf Paraffinschnitten der Niere, Pfeil zeigt Beispiel für γ -H2AX-positiven Kern, **B:** Die Quantifizierung erfolgte durch Auswerten von 3000 Kernen / 4 Bilder pro Tier. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.8.1 γ -H2AX als Marker für Doppelstrangbrüche im Zusammenhang mit Apoptose

Die Detektion von γ -H2AX mittels Immunhistochemie ist eine gängige Methode zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen. Allerdings wird phosphoryliertes H2AX ebenfalls während dem Zellzyklus und während der Apoptose gebildet [70]. Deshalb wurden zur Detektion von apoptotischen Zellen im Gewebe von Niere und Herz Paraffinschnitte mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 immunhistochemisch gefärbt. Die Auswertung ergab, dass die Anzahl an aktivierte Caspase-3-positive Zellen mit steigender Ang II-Konzentration in der Niere zunahm. Die SP- und Pressor-Gruppen zeigten eine Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe. Im Herzen dagegen blieb der Anstieg an aktivierte Caspase-3-positive Zellen mit steigender Ang II-Konzentration nur gering (Tab. 12). Um nun eine

Ergebnisse

Aussage treffen zu können, wie hoch der Anteil an apoptotischen Zellen gegenüber Zellen mit DNA-Schäden ist, wurden beide Parameter aufeinander bezogen, das heißt, aktivierte Caspase-3-positive Zellen wurden durch den Anteil an γ -H2AX-positiven Zellen geteilt. Hierfür wurde das Ergebnis an γ -H2AX-positiven Tubuluszellen in Prozent pro Fläche für jedes Tier umgerechnet.

In der Niere ist der Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu γ -H2AX-positiven Zellen sehr gering. Er liegt bei etwa 2–3 pro 1000 γ -H2AX-positiven Zellen und ist in jeder Gruppe etwa gleich (Tab. 12). Somit konnte widerlegt werden, dass mit dem Antikörper gegen γ -H2AX, zusätzlich zu den Zellen mit Doppelstrangbrüchen, auch apoptotische Zellen sichtbar gemacht wurden. Im Herzen der Kontrolltiere wurden sogar mehr apoptotische Zellen als γ -H2AX-positive Zellen gefunden. Der Anteil der apoptotischen Zellen blieb mit steigender Ang II-Konzentration gering, wohingegen der Anteil an γ -H2AX-positiven Zellen signifikant anstieg (Tab. 12).

Tab. 12: Übersicht über den Anteil an aktivierte Caspase-3-positive Zellen/mm², γ -H2AX-positive Zellen/mm² und das Verhältnis zueinander in Niere und Herz, die Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte durch Beziehen der aktivierte Caspase-3-positiven Zellen auf die Gewebefläche des jeweiligen Organes jeden Tieres. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	Kontrolle (n=8)	No-Pressor (n=8)	Slow- Pressor 1 (n=8)	Slow- Pressor 2 (n=7)	Pressor (n=8)
Niere					
Aktivierte Caspase-3-positive Zellen/mm ²	0,24 ± 0,06	0,45 ± 0,08	0,67 ± 0,17	1,08 ± 0,19**	1,41 ± 0,08*** (n=7)
γ -H2AX-positive Zellen/mm ²	112,8 ± 19	196,9 ± 25	380,0 ± 71*	458,9 ± 73** (n=6)	662,1 ± 111***
Aktivierte Caspase-3-positive Zellen/1000 γ -H2AX-positive Zellen	3,29 ± 1,56	2,63 ± 0,65	2,10 ± 0,55	2,25 ± 0,37 (n=6)	2,89 ± 0,63 (n=7)
Herz					
Aktivierte Caspase-3-positive Zellen/mm ²	0,32 ± 0,04 (n=7)			0,32 ± 0,03	0,46 ± 0,11
γ -H2AX-positive Zellen/mm ²	0,11 ± 0,04			0,43 ± 0,07	1,44 ± 0,27***
Aktivierte Caspase-3-positive Zellen/1000 γ -H2AX-positive Zellen	1,63 ± 0,69 (n=7)			0,91 ± 0,16	0,36 ± 0,11

Ergebnisse

4.1.9 Angiotensin II-Behandlung führt zur Bildung von 8-OxodG in der Niere

Mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung wurde die isolierte DNA aus der Niere auf die Basenmodifikation 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-OxodG) untersucht. 8-OxodG wird als oxidative DNA-Läsion bezeichnet und wird hauptsächlich auf zwei Wegen gebildet: 8-OxodG entsteht entweder durch Oxidation einer Guaninbase in der DNA oder durch Eingliederung eines oxidierten dGTP (8-OxodGTP) während der DNA-Synthese. Die 8-OxodG-Läsionen können zwar durch Reparaturmechanismen behoben werden, 8-OxodG stellt aber trotzdem die bedeutendste oxidative DNA-Läsion mit einem großen mutagenen und kanzerogenen Potential dar [39].

Der Anteil an 8-OxodG nahm mit steigender Ang II-Konzentration zu und war in der SP-2- und Pressor-Gruppe signifikant erhöht gegenüber der Kontroll-Gruppe (Abb. 22).

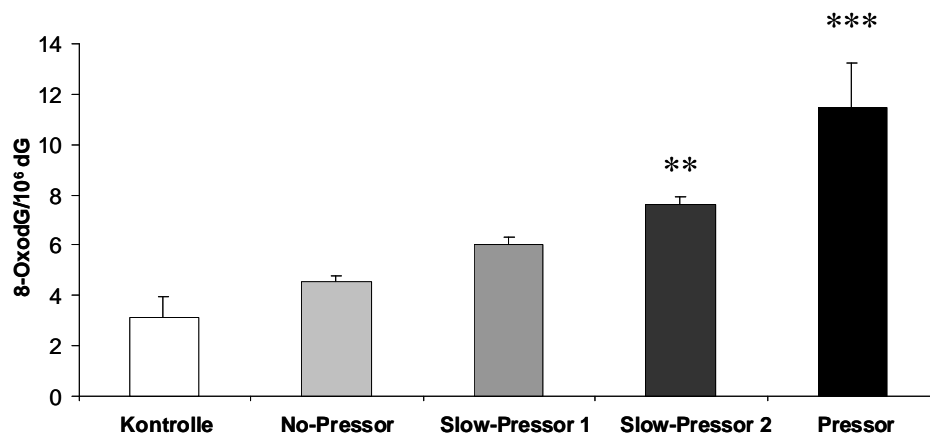


Abb. 22: Quantifizierung von 8-OxodG mittels der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung in isolierter DNA der Niere. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2 Interventionsversuch

Im Interventionsversuch sollte zum einen die Frage geklärt werden, ob die entstandenen DNA-Schäden durch den gesteigerten Blutdruck oder die erhöhten Ang II-Konzentrationen verursacht wurden. Zum anderen sollte der Mechanismus der DNA-Schädigung aufgeklärt werden. Für diese Fragestellungen wurden die Tiere neben der Ang II-Behandlung zusätzlich über einen Zeitraum von 28 Tagen mit verschiedenen Substanzen behandelt. Dazu gehören Candesartan, als Ang II-Rezeptor-Antagonist, Ramipril, als ACE-Hemmer, Hydralazin, als Vasodilatator, Eplerenon, als Mineralkortikoidrezeptorblocker und Tempol, als Antioxidans (siehe 2.).

4.2.1 Veränderung des Blutdrucks durch die einzelnen Interventionen

Im Interventionsversuch wurde eine Ang II-Dosis von 600 ng/kg x min verwendet. Mit dieser Dosisänderung konnten Fluktuationen des Blutdrucks, wie sie im Dosisversuch bei den beiden höchsten Ang II-Dosen auftraten, vermieden werden. Ein ausreichender Blutdruckanstieg wurde dennoch gewährleistet. Die Behandlung mit Ang II in einer Konzentration von 600 ng/kg x min führte wie erwartet zu einem raschen Blutdruckanstieg in der Maus. Bereits 4 Tage nach Implantation der Pumpe erhöhte sich der Blutdruck signifikant gegenüber der Kontrolle und blieb auch über den gesamten Versuchszeitraum auf diesem signifikanten Niveau. Die Intervention mit Candesartan senkte den Blutdruck unter Normalniveau, worauf die Konzentration von 10 auf 8 mg/kg*d gesenkt wurde. Daraufhin pendelte sich der systolische Blutdruck in dieser Gruppe auf ca. 100 mmHg ein. Die Intervention mit Hydralazin hatte eine kurzfristige Senkung des Blutdrucks bis auf 108 mmHg an Messtag 12 zur Folge. Allerdings begann der Blutdruck zwei Tage später wieder anzusteigen. Auch eine Erhöhung der Hydralazinkonzentration von 10 auf 15 mg/kg*d konnte dies nicht verhindern. Die Interventionen mit Ramipril, Eplerenon und Tempol hatten keine Senkung des Blutdrucks zur Folge. In diesen Gruppen blieb der Blutdruck über weite Teile des Versuchszeitraums signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle. Am Ende des Versuchs lag der höchste Blutdruckwert innerhalb der sieben Gruppen bei 164 mmHg in der Tempol-Gruppe (Abb. 23).

Ergebnisse

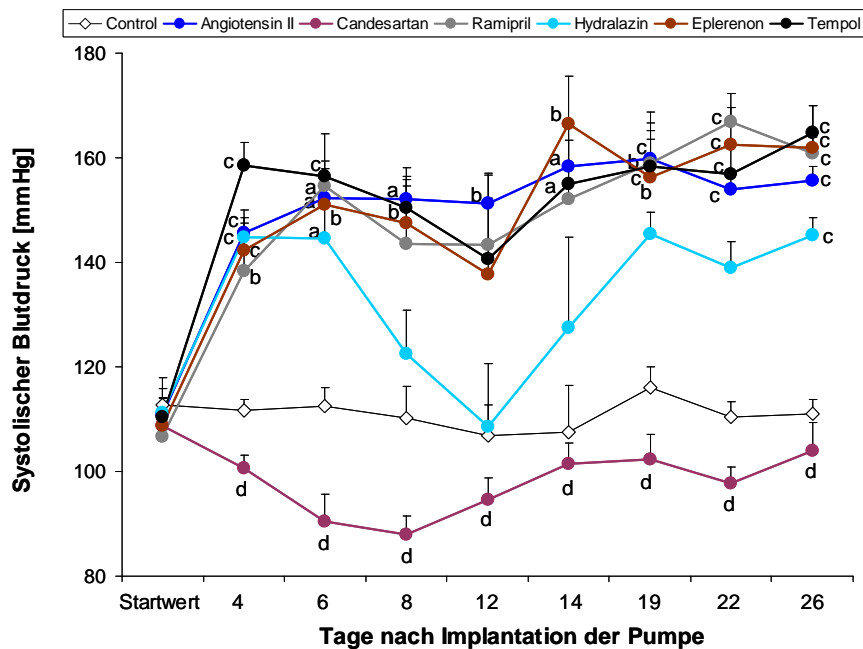


Abb. 23: Systolischer Blutdruck [mmHg] in Angiotensin II-infundierten Mäusen, ermittelt durch nicht-invasive Blutdruckmessung während 27 Tagen des Interventionsversuches, n=7 (Ang II-Gruppe: n=8, H-Gruppe, E-Gruppe: n=5, T-Gruppe: n=6). a: $p \leq 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$ vs. Kontrolle; d: $p < 0,001$ vs. Ang II.

4.2.2 Gewichtsparameter

Die Auswertung der klinischen Parameter des Interventionsversuchs zeigten in Bezug auf Körpergewicht und relatives Nierengewicht durch die Ang II-Behandlung und die entsprechenden Interventionen keine signifikanten Veränderungen. Das relative Herzgewicht hingegen zeigte eine Tendenz zur Zunahme bei den Tieren, die Bluthochdruck entwickelt hatten (Ang II, Ramipril, Hydralazin, Eplerenon, Tempol), wohingegen in der Candesartan-Gruppe das relative Herzgewicht gegenüber der Ang II-Gruppe signifikant erniedrigt war (Tab. 13).

Tab. 13: Übersicht über klinische Parameter in Angiotensin II-infundierten Mäusen am Ende der Versuchsreihe des Interventionsversuches, C=Candesartan, R=Ramipril, H=Hydralazin, E=Eplerenon, T=Tempol. °° $p < 0,01$ vs. Ang II.

	Kontrolle (n=7)	Ang II (n=8)	C (n=7)	R (n=7)	H (n=5)	E (n=5)	T (n=6)
Körpergewicht [g]	30,7 ± 0,7	28,3 ± 0,6	31,8 ± 0,6	29,2 ± 0,5	27,8 ± 0,6	28,6 ± 0,8	29,1 ± 0,5
Relatives Nierengewicht [%]	6,9 ± 0,2	6,8 ± 0,2	6,4 ± 0,3	6,8 ± 0,3	6,5 ± 0,3	6,1 ± 0,1	6,8 ± 0,2
Relatives Herzgewicht [%]	6,9 ± 0,5	8,2 ± 0,4	5,6 ± 0,3 °°	8,1 ± 0,3	7,8 ± 0,6	8,2 ± 1,0	8,2 ± 0,4

Ergebnisse

4.2.3 Nierenfunktionsparameter

Die Tiere der Ang II-Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine signifikant höhere Diurese, die durch die Intervention mit Candesartan auf einen Normalwert zurückgebracht wurde. Die Kreatininausscheidung war zum Ende des Versuchszeitraums in allen Gruppen auf einem ähnlichen Niveau (Tab. 14).

Die Aldosteronausscheidung war bei den Tieren, die Bluthochdruck entwickelten, erhöht, was auf eine erhöhte Aldosteronfreisetzung durch Ang II schließen lässt (Tab. 14).

Tab. 14: Übersicht über Nierenfunktionsparameter im Urin von Mäusen des Interventionsversuchs nach 27 Tagen Angiotensin II-Infusion, C=Candesartan, R=Ramipril, H=Hydralazin, E=Eplerenon, T=Tempol. ** p < 0,01 vs. Kontrolle; ° p ≤ 0,05 vs. Ang II; °° p < 0,01 vs. Ang II; °°° p < 0,001 vs. Ang II.

	Kontrolle (n=7)	Ang II (n=8)	C (n=7)	R (n=7)	H (n=5)	E (n=5)	T (n=6)
Diurese [ml/20 h]	1,7 ± 0,3	3,9 ± 0,2**	1,3 ± 0,1°°	2,8 ± 0,4	4,0 ± 1,0	2,8 ± 0,4	2,3 ± 0,3
Kalium [mmol/l]	194,0 ± 14	90,7 ± 5	379,07 ± 42°°°	208,8 ± 40°	132,5 ± 21	144,3 ± 18	162,7 ± 22
Kreatinin- Ausscheidung [mg/20h]	0,45 ± 0,05	0,41 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,31 ± 0,04	0,33 ± 0,05
Aldosteron- Ausscheidung [ng/20h]	4,5 ± 0,7	15,4 ± 1,4	3,8 ± 0,3	20,1 ± 4,7	25,7 ± 5,8	17,9 ± 2,3	12,0 ± 2,2

4.2.3.1 Albuminausscheidung

Während des Versuchsverlaufs wurden die Tiere an Tag 0, Tag 14 und zum Ende in Stoffwechselfäße gesetzt, um die Veränderung der Albuminausscheidung während der Behandlung zu beobachten. Erhöhte Albuminspiegel im Urin sind zu finden, wenn Teile des Nephrons nicht richtig arbeiten und ein Filtrationsdefekt im Glomerulum vorliegt. Die Albuminausscheidung war in der Ang II-Gruppe bereits nach zwei Wochen signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht und verschlechterte sich auch in den darauffolgenden zwei Wochen noch. Alle Interventionen erreichten eine Verbesserung dieses Wertes im Vergleich zur Ang II-Gruppe, wobei die Intervention mit Candesartan den Albuminwert auf Kontrollniveau absinken ließ. Die Hydralazin-Intervention erreichte trotz Bluthochdruck eine Absenkung des Albuminwertes auf Kontrollniveau (Abb. 24).

Ergebnisse

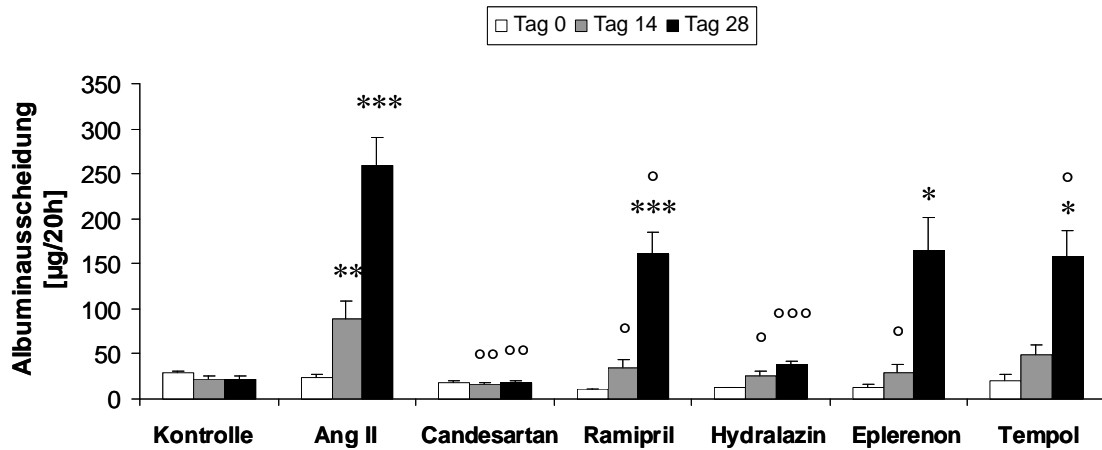


Abb. 24: Veränderung der Albuminausscheidung im Versuchszeitraum von 4 Wochen ermittelt mittels ELISA. ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ang II; °° $p < 0,01$ vs. Ang II; °°° $p < 0,001$ vs. Ang II.

4.2.4 Histopathologische Veränderungen

Im Dosisversuch wurden dosisabhängig histopathologische Veränderungen der Niere festgestellt, die mit zunehmender Ang II-Konzentration verstärkt ausfielen. Im Interventionsversuch sollte nun überprüft werden, welche Auswirkungen die einzelnen Interventionen auf die Histopathologie der Niere hatten.

4.2.4.1 GSI/MSI

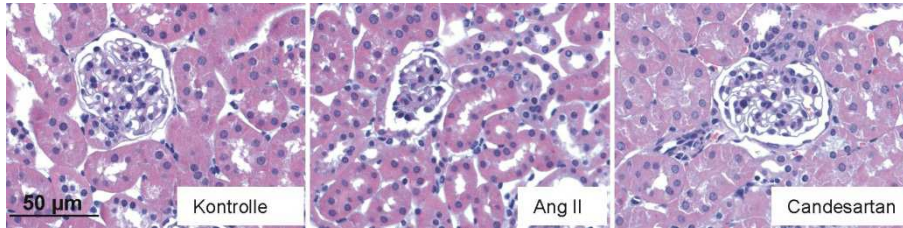
Wie erwartet, wiesen die Glomeruli der Tiere, die nur mit Ang II behandelt wurden, strukturelle Veränderungen in Form von proliferierenden Mesangiumzellen und auch einer Vergrößerung einzelner Kapillaren auf. Alle Interventionen verbesserten die glomeruläre Schädigung; insbesondere Candesartan-Tiere zeigten kaum strukturelle Veränderungen (Abb. 25).

4.2.4.2 TSI

Die Schädigung des Tubulussystems bestand, wie auch schon im Dosisversuch, hauptsächlich aus Dilatation und Fibrose. Entzündungsherde waren im Nierenrindensbereich kaum zu finden. Die tubuläre Schädigung durch die Ang II-Konzentration war vor allem in Tieren, die mit Candesartan, Eplerenon und Tempol behandelt wurden, nur selten zu finden, wohingegen die Interventionen mit Ramipril und Hydralazin Schäden am Tubulussystem nicht vermeiden konnten (Abb. 26).

Ergebnisse

A



B

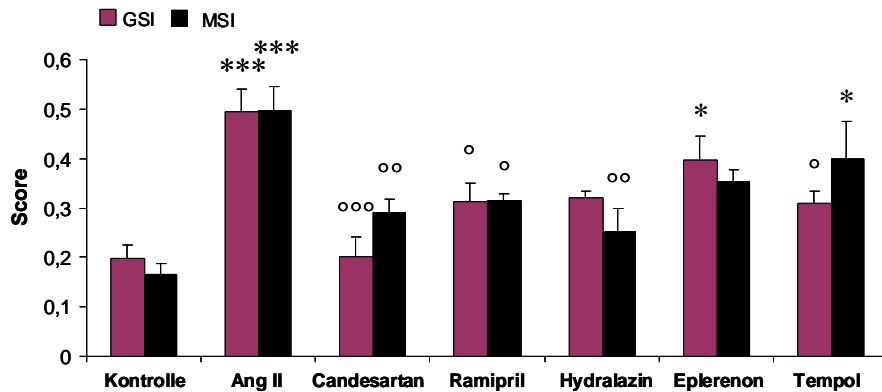
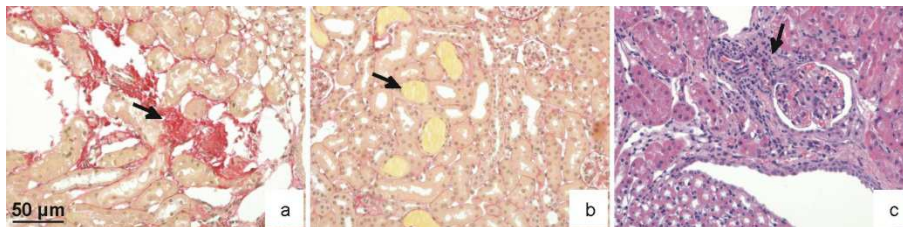


Abb. 25: Semiquantitative Auswertung des GSI/MSI im Interventionsversuch, **A:** Die Bilder zeigen Glomeruli der Kontroll-Gruppe, Ang II-Gruppe und Candesartan-Gruppe, HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung, **B:** Auswertung mit Hilfe der Scores (3.2.7.1). *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ang II; °° $p < 0,01$ vs. Ang II; °°° $p < 0,001$ vs. Ang II.

A



B

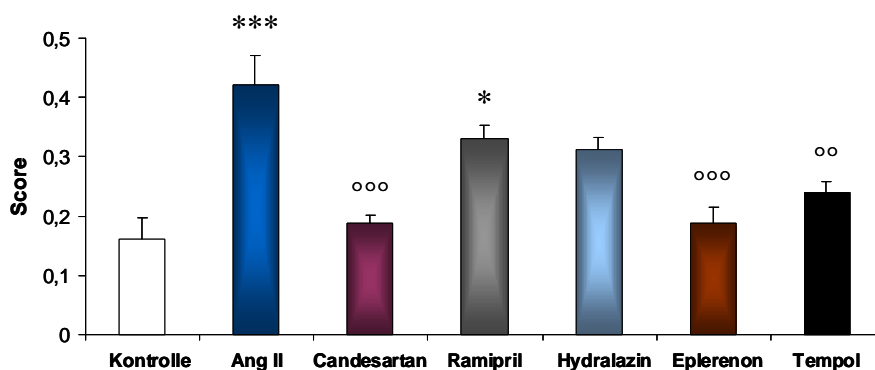


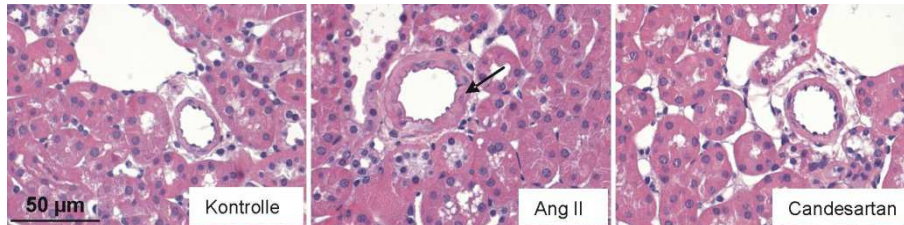
Abb. 26: Semiquantitative Auswertung des TSI im Interventionsversuch, **A:** Die Bilder zeigen Beispiele der Marker, die zur Auswertung herangezogen wurden, wobei die Pfeile die Schädigung verdeutlichen. a=Fibrose, Rotfärbung, b=Dilatation, Gelbfärbung, c=Entzündungsherd. Sirius- und HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung, **B:** Auswertung mit Hilfe der Scores (3.2.7.2). * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; °° $p < 0,01$ vs. Ang II; °°° $p < 0,001$ vs. Ang II.

Ergebnisse

4.2.4.3 VSI

Der vaskuläre Schädigungsindex war in der Ang II-Gruppe signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle. Alle Interventionen konnten die Stärke dieser morphologischen Gefäßwandveränderungen reduzieren (Abb. 27).

A



B

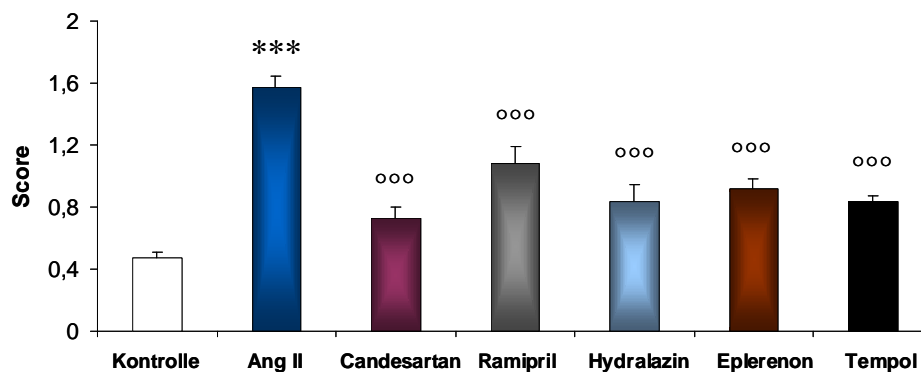


Abb. 27: Semiquantitative Auswertung des VSI im Interventionsversuch, **A:** Bilder zeigen Gefäße der Kontroll-Gruppe, Ang II-Gruppe und Candesartan-Gruppe, wobei der Pfeil die Gefäßwandverdickung aufzeigt. HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung, **B:** Auswertung mit Hilfe der Scores (3.2.7.3). *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; ooo $p < 0,001$ vs. Ang II.

4.2.5 Angiotensin II-Behandlung senkt AT_1 -Rezeptordichte in der Niere

Die Dichte des Rezeptors AT_1 in der Niere wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen den Rezeptor mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. Die Auswertung zeigte vor allem eine Expression des Rezeptors in distalen und proximalen Tubuli, sowie an Blutgefäßen. Die Quantifizierung ergab eine nichtsignifikant verminderte Expression des AT_1 -Rezeptors bei erhöhtem Ang II-Spiegel. Die Blockade des AT_1 -Rezeptors wiederum hatte eine erhöhte Expression des Rezeptors zur Folge. Eine Erhöhung war ebenfalls durch die Intervention mit Ramipril zu beobachten. Die Intervention mit Hydralazin und Tempol sorgte für eine erniedrigte Expression des Rezeptors. Der Aldosteronantagonist Eplerenon hatte keinen Einfluss auf die Expression (Abb. 28). (Ergebnisse aus der Diplomarbeit von Anna Zimnol, Universität Würzburg, 2011).

Ergebnisse

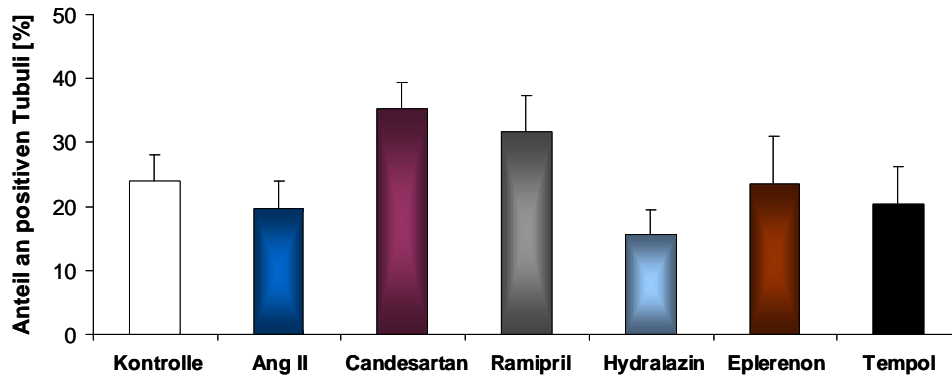


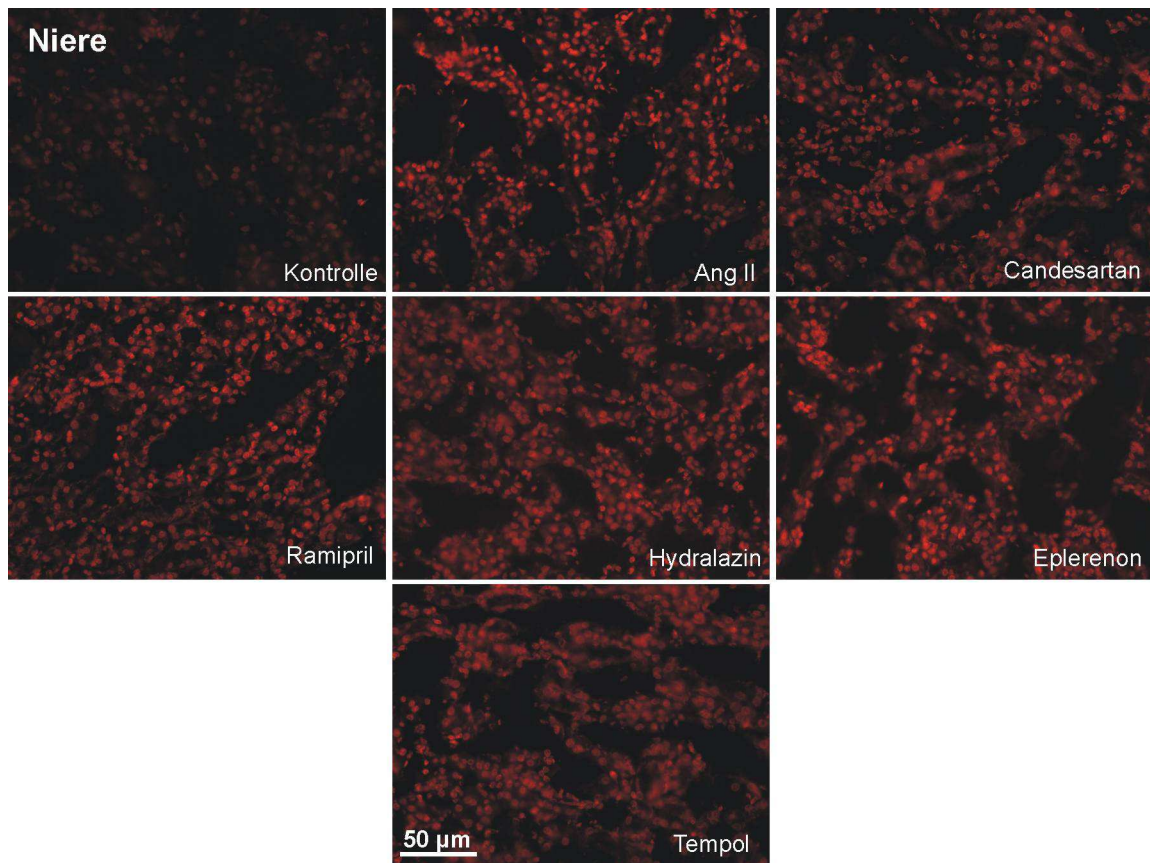
Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis des Rezeptors AT₁ auf Paraffinschnitten der Niere, Quantifizierung erfolgte durch Auszählen der AT₁-positiven Tubuli.

4.2.6 Verminderung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Interventionen

Die Behandlung der Tiere mit Angiotensin II hatte die Entstehung von ROS sowohl in der Niere als auch im Herzen zur Folge. Dies wurde durch Quantifizierung der Färbung von Gefrierschnitten mit dem ROS-sensitiven Fluorophor Dihydroethidium gezeigt. Die Auswertung der Färbung zeigte eine leichte Absenkung der ROS durch die verschiedenen Behandlungen in den Nierentubuli und an den Herzmuskelzellen. Insbesondere die Interventionen mit Candesartan und dem Antioxidans Tempol hatten eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz sowohl in der Niere (Abb. 29) als auch im Herzen (Abb. 30) zur Folge. Die Intervention mit Ramipril und Hydralazin führte ebenfalls in Niere und Herz zu einer Reduktion der Fluoreszenz, jedoch nicht in dem starken Ausmaß wie Candesartan und Tempol. Der Aldosteronantagonist Eplerenon hatte in der Niere keinen Einfluß auf die Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies, zeigte aber im Herzen eine deutliche Erniedrigung.

Ergebnisse

A



B

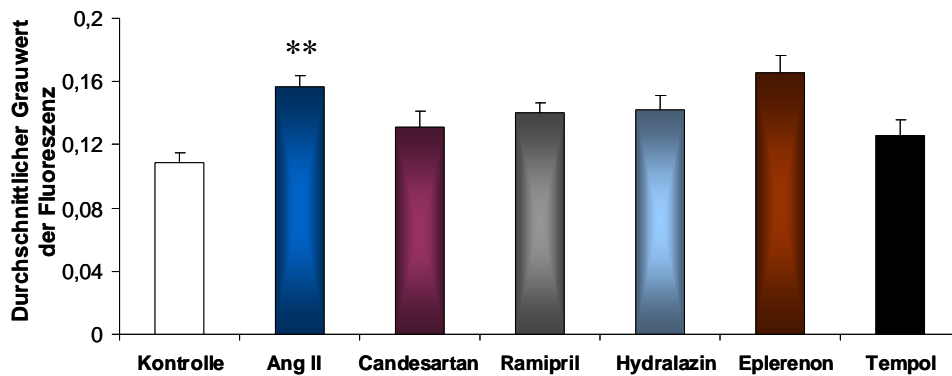
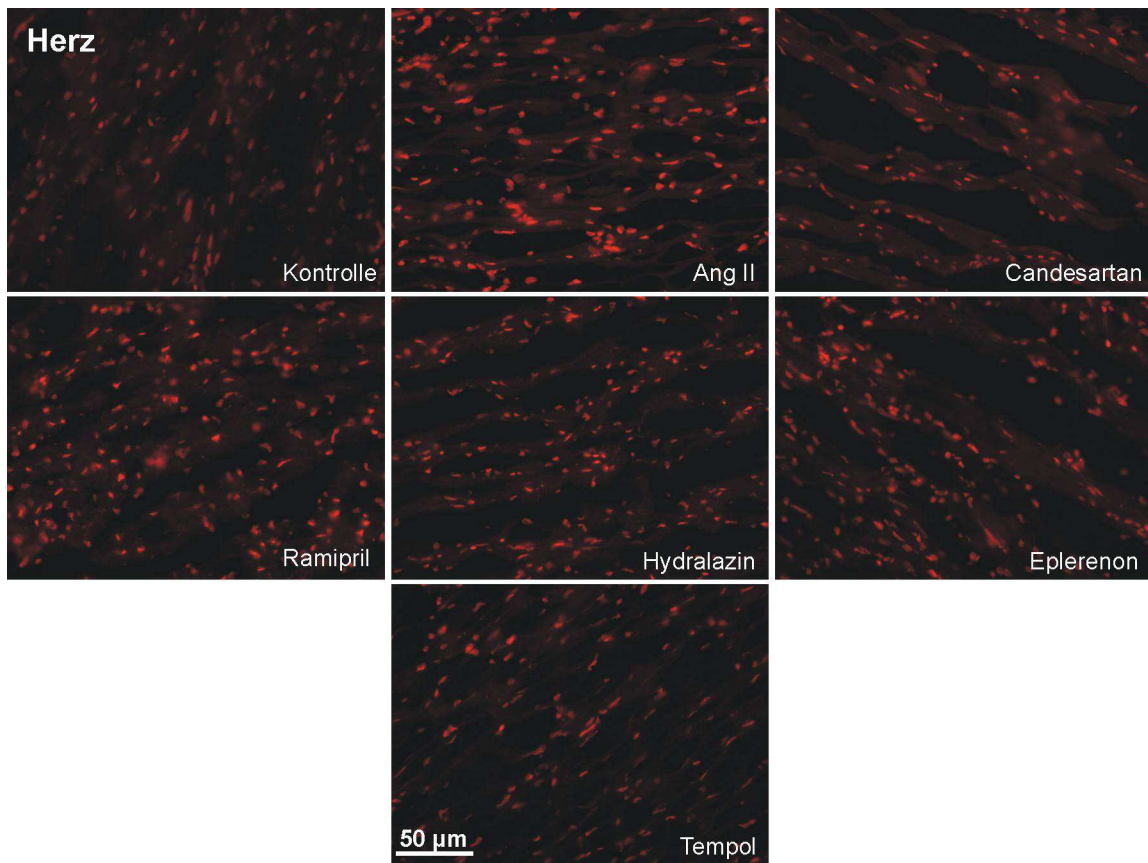


Abb. 29: A: Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, visualisiert auf Gefrierschnitten der Niere mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffes DHE, 200-fache Vergrößerung, **B:** Quantifizierung der Fluoreszenz durch Messung des Grauwertes von 7 Gesichtsfeldern mittels CellProfiler. ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

Ergebnisse

A



B

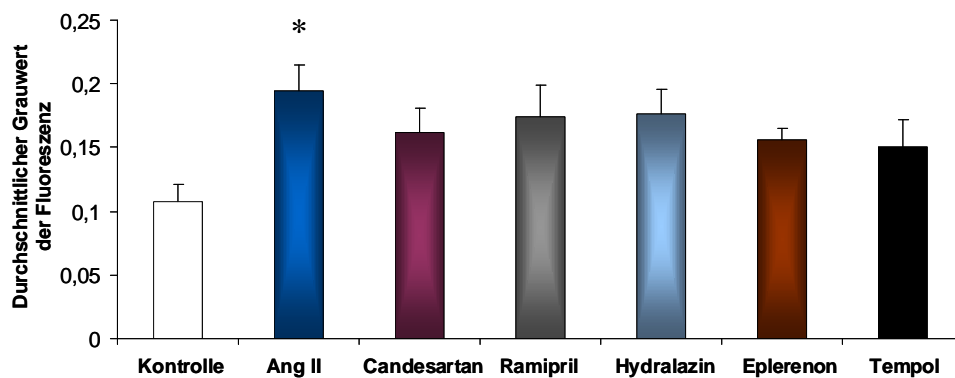


Abb. 30: **A:** Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, visualisiert auf Gefrierschnitten des Herzens mit Hilfe des ROS-sensitiven Farbstoffes DHE, 200-fache Vergrößerung, **B:** Quantifizierung der Fluoreszenz durch Messung des Grauwertes von 7 Gesichtsfeldern mittels CellProfiler. * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle.

Ergebnisse

4.2.7 Interventionen reduzieren Angiotensin II-induzierte Bildung struktureller DNA-Schäden

Bei den durch oxidativen Stress induzierten DNA-Schäden, die mit reaktiven Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht werden, handelt es sich vorwiegend um oxidierte Purine/Pyrimidine, abasische DNA-Stellen, Einzel- und Doppelstrangbrüche [33]. Zum Nachweis dieser Einzel- und Doppelstrangbrüche wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet: der Comet Assay und der immunhistochemische Nachweis von Doppelstrangbrüchen mittels des Antikörpers γ -H2AX.

4.2.7.1 Nachweis von DNA-Schäden im Comet Assay

Das Ausmaß an DNA-Strangbrüchen, verursacht durch die Ang II-Behandlung, wurde mittels Comet Assay an isolierten Zellen der perfundierten Niere gemessen. Die Auswertung ergab eine nichtsignifikante Erhöhung der DNA-Schäden in Tieren, die nur mit Ang II behandelt wurden, gegenüber der Kontrolle. Alle Interventionen erreichten eine Verringerung der DNA-Schäden. Insbesondere das Antioxidans Tempol konnte die Häufigkeit an Einzel- und Doppelstrangbrüchen stark verringern (Abb. 31). (Ergebnisse aus der Diplomarbeit von Anna Zimmol, Universität Würzburg, 2011).

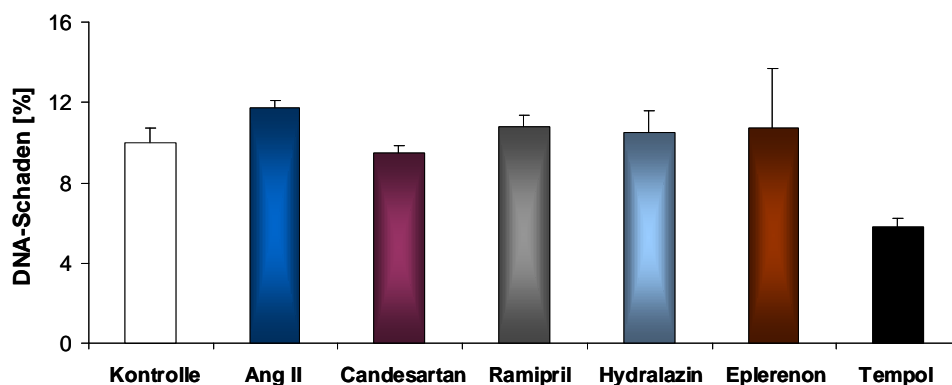


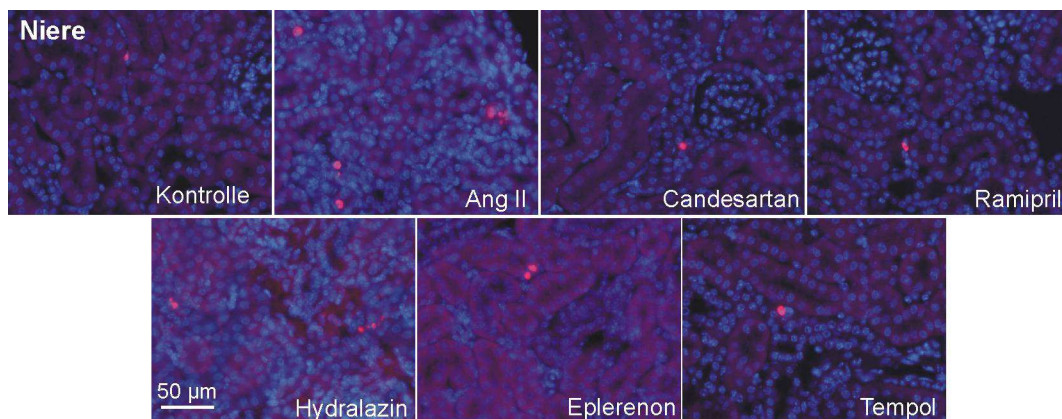
Abb. 31: DNA-Schäden in isolierten Zellen der perfundierten Niere im Interventionsversuch, quantifiziert mit dem Comet Assay nach 4-wöchiger Behandlung.

Ergebnisse

4.2.7.2 Immunhistochemischer Nachweis von Doppelstrangbrüchen

Der Nachweis von Doppelstrangbrüchen erfolgte immunhistochemisch mit Hilfe eines Antikörpers gegen γ -H2AX. In den Nierentubuli wurde dieser Antikörper in Kombination mit einem Fluoreszenzfarbstoff detektiert, im Herzen in Kombination mit einer Farbreaktion. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Erhöhung des Anteils an Doppelstrangbrüchen in der Ang II-Gruppe verglichen zur Kontrolle sowohl in der Niere als auch im Herzen. Die Interventionen zeigten unterschiedliche Effekte in Bezug auf die DNA-Schäden. In der Niere zeigten alle Interventionen eine signifikante Reduktion der DNA-Schäden. Die stärkste Reduktion erfolgte durch die Interventionen mit Candesartan und Tempol (Abb. 32). Im Herzen wurde ebenfalls die Anzahl an Doppelstrangbrüchen durch die Interventionen verringert, ebenfalls besonders durch Candesartan und Tempol, wobei nur Candesartan statistische Signifikanz erreichte (Abb. 33).

A



B

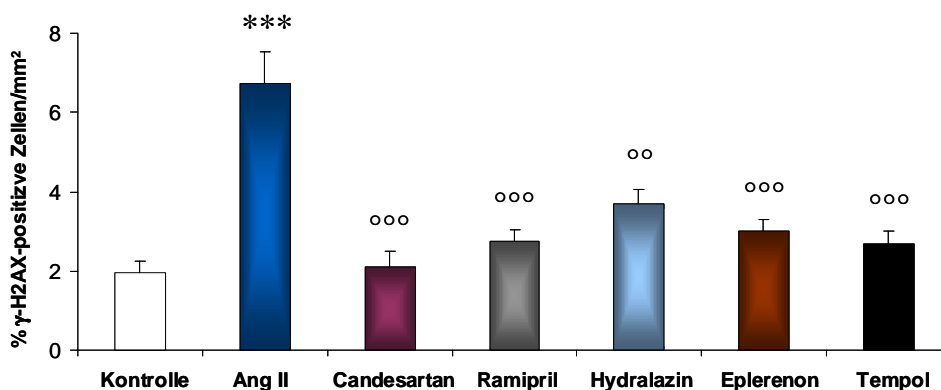
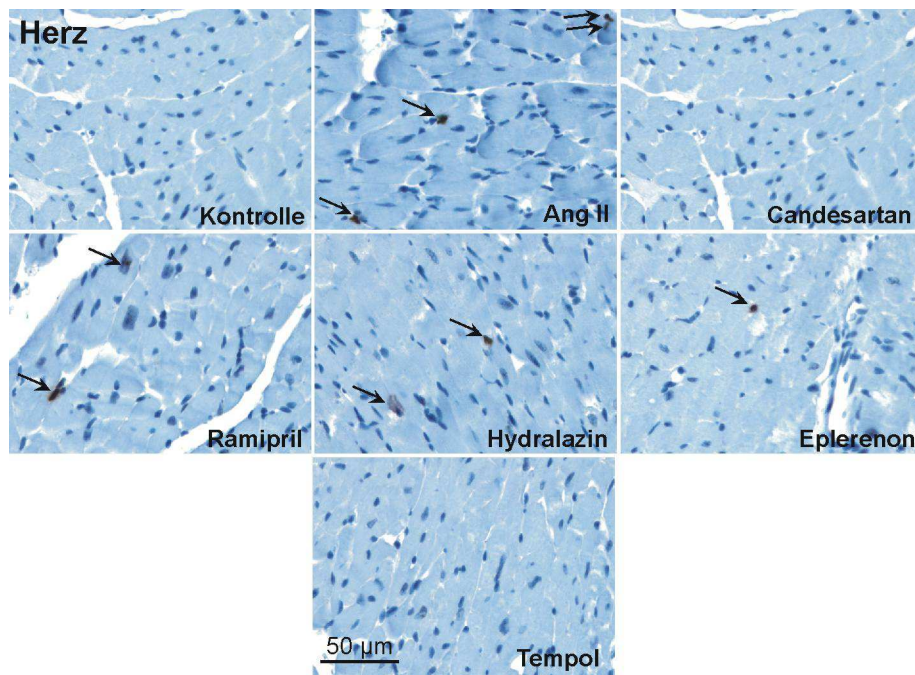


Abb. 32: **A:** Immunhistochemischer Nachweis von γ -H2AX auf Paraffinschnitten der Niere, **B:** Quantifizierung erfolgte durch Beziehen der γ -H2AX-positiven Kerne (rote Fluoreszenz) auf die Nierenfläche jedes Tieres. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; °° $p < 0,01$ vs. Ang II; °°° $p < 0,001$ vs. Ang II.

A



B

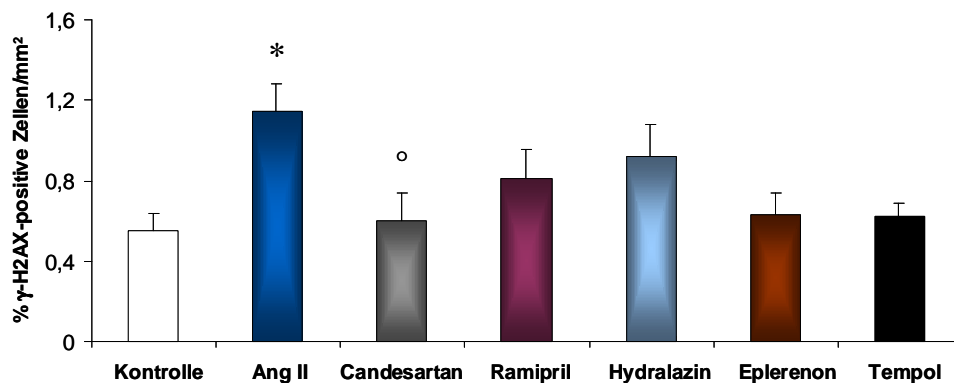


Abb. 33: **A:** Immunhistochemischer Nachweis von γ -H2AX auf Paraffinschnitten des Herzens, Pfeil zeigt Beispiel für γ -H2AX-positiven Kern, **B:** Quantifizierung erfolgte durch Beziehen der γ -H2AX-positiven Kerne auf die Herzfläche jedes Tieres. * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ang II.

4.2.7.3 Vergleich Apoptose/Doppelstrangbrüche

Wie bereits im Dosisversuch durchgeführt, erfolgte auch im Interventionsversuch eine Färbung von Paraffinschnitten auf apoptotische Zellen mit dem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3, um festzustellen, wie hoch der Anteil an apoptotischen Zellen verglichen zu den Doppelstrangbrüchen ist. Die Auswertung ergab, dass durch die Behandlung mit Ang II die Bildung von apoptotischen Zellen in der Niere induziert wurde. Die Interventionen reduzierten diese Bildung. Vor allem die Intervention mit Candesartan und Eplerenon hatte eine signifikante Reduktion an apoptotischen Zellen zur Folge. Dennoch blieb der Anteil an apoptotischen Zellen im

Ergebnisse

Vergleich zu γ -H2AX-positiven Zellen in jeder Gruppe gering. Er liegt bei ca. 0,18 – 0,29 pro positiven γ -H2AX Zellen (Tab. 15). Im Herzen zeigte die Behandlung mit Ang II und den verschiedenen Interventionen auf die Bildung von apoptotischen Zellen keinen Einfluss. Der Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu γ -H2AX-positiven Zellen fiel im Herzen im Vergleich zur Niere etwas höher aus und liegt zwischen 0,33 in Ang II-Tieren und 0,88 in Candesartan-Tieren (Tab. 15).

Tab. 15: Übersicht über Anteil an aktivierte Caspase-3-positive Zellen/mm², γ -H2AX-positive Zellen/mm² und das Verhältnis zueinander in Niere und Herz, die Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte durch Beziehen der aktivierte Caspase-3-positive Zellen auf die Gewebefläche des jeweiligen Organes jeden Tieres, C=Candesartan, R=Ramipril, H=Hydralazin, E=Eplerenon, T=Tempol. * p \leq 0,05 vs. Kontrolle; ** p < 0,01 vs. Kontrolle; *** p < 0,001 vs. Kontrolle; ° p \leq 0,05 vs. Ang II; °° p < 0,01 vs. Ang II; °°° p < 0,001 vs. Ang II.

	Kontrolle (n=7)	Ang II (n=8)	C (n=7)	R (n=7)	H (n=5)	E (n=5)	T (n=6)
Niere							
Aktivierte Caspase-3	0,44 \pm 0,1	1,12 \pm 0,1**	0,43 \pm 0,1°	0,62 \pm 0,2	0,87 \pm 0,1	0,55 \pm 0,1	0,85 \pm 0,1 (n=5)
γ-H2AX	1,96 \pm 0,3***	6,73 \pm 0,8°°°	2,08 \pm 0,4°°°	2,75 \pm 0,3°°°	3,67 \pm 0,4°°	3,01 \pm 0,3°°°	2,69 \pm 0,3°°
Aktivierte Caspase-3 /γ-H2AX	0,26 \pm 0,07	0,18 \pm 0,02	0,23 \pm 0,07	0,22 \pm 0,06	0,25 \pm 0,05	0,18 \pm 0,02	0,29 \pm 0,02 (n=5)
Herz							
Aktivierte Caspase-3	0,24 \pm 0,04	0,35 \pm 0,05	0,35 \pm 0,02	0,32 \pm 0,05	0,31 \pm 0,04	0,36 \pm 0,05	0,29 \pm 0,03
γ-H2AX	0,55 \pm 0,09	1,14 \pm 0,14*	0,60 \pm 0,14°	0,81 \pm 0,14 (n=6)	0,92 \pm 0,15	0,63 \pm 0,11	0,63 \pm 0,07
Aktivierte Caspase-3 /γ-H2AX	0,49 \pm 0,09	0,33 \pm 0,05	0,88 \pm 0,24	0,39 \pm 0,0 (n=6)	0,37 \pm 0,07	0,62 \pm 0,1	0,47 \pm 0,04

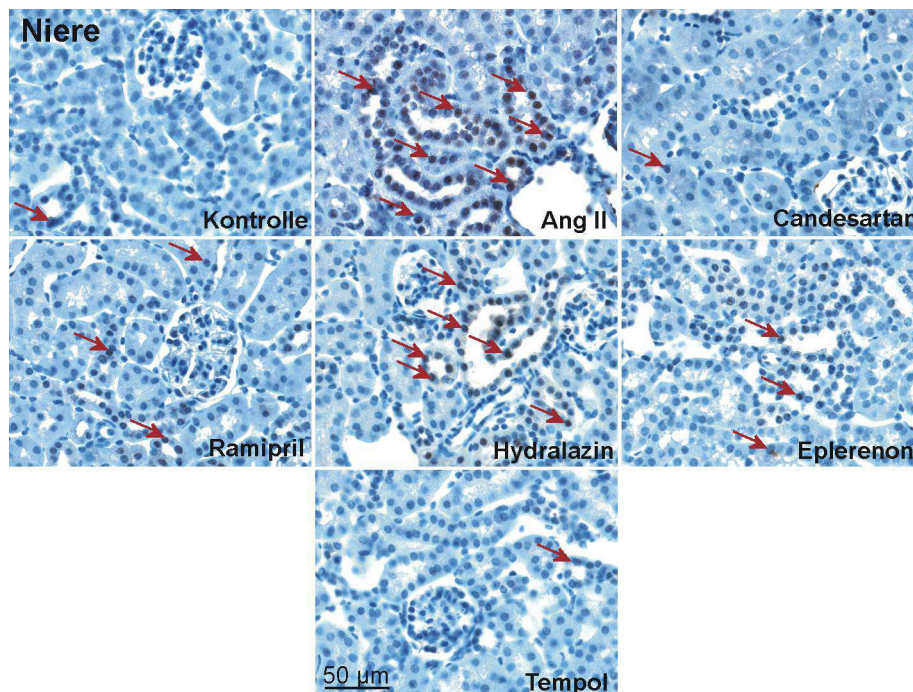
4.2.8 Angiotensin II induziert die DNA-Reparatur-Aktivität in der Niere und im Herzen

Zur Untersuchung inwieweit die Ang II-Behandlung und die Behandlung mit den verschiedenen Interventionen Einfluss auf die DNA-Reparatur-Kapazität der Niere besitzen, wurde die Färbung auf PADPR (Poly-ADP-Ribose) auf Paraffinschnitten der Niere und des Herzens durchgeführt. PADPR ist ein Polymer, das von einer Klasse von Enzymen synthetisiert wird, die PARP genannt werden. Die PARP-Aktivierung ist eine zelluläre Antwort auf DNA-Schäden. Sobald von PARP ein DNA-Strangbruch detektiert wird, bindet es an die DNA und nach einer strukturellen Änderung beginnt es die Synthese einer Poly-ADP-Ribose-Kette, als Signal für

Ergebnisse

andere DNA-Reparatur-Enzyme wie etwa die DNA-Ligase III oder die DNA-Polymerase β . Diese Poly-ADP-Ribose-Kette wurde mit einem speziellen Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen. Die Quantifizierung der Färbung ergab eine signifikante Induktion der Reparatur-Aktivität in der Niere und im Herzen durch Angiotensin II (Abb. 34+35). Die Interventionen mit Candesartan und Tempol hatten sowohl in der Niere als auch im Herzen starken Einfluß auf die gesteigerte Reparatur-Aktivität. Die Interventionen mit Ramipril und Eplerenon reduzierten die Häufigkeit von PADPR-Ketten in der Niere und im Herzen, wohingegen die Intervention mit Hydralazin kaum Einfluss auf die gesteigerte Reparatur-Aktivität durch Ang II hatte (Abb. 34+35).

A



B

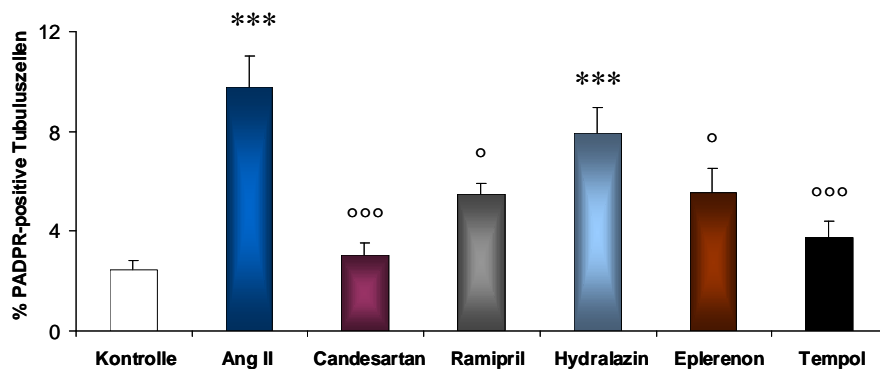
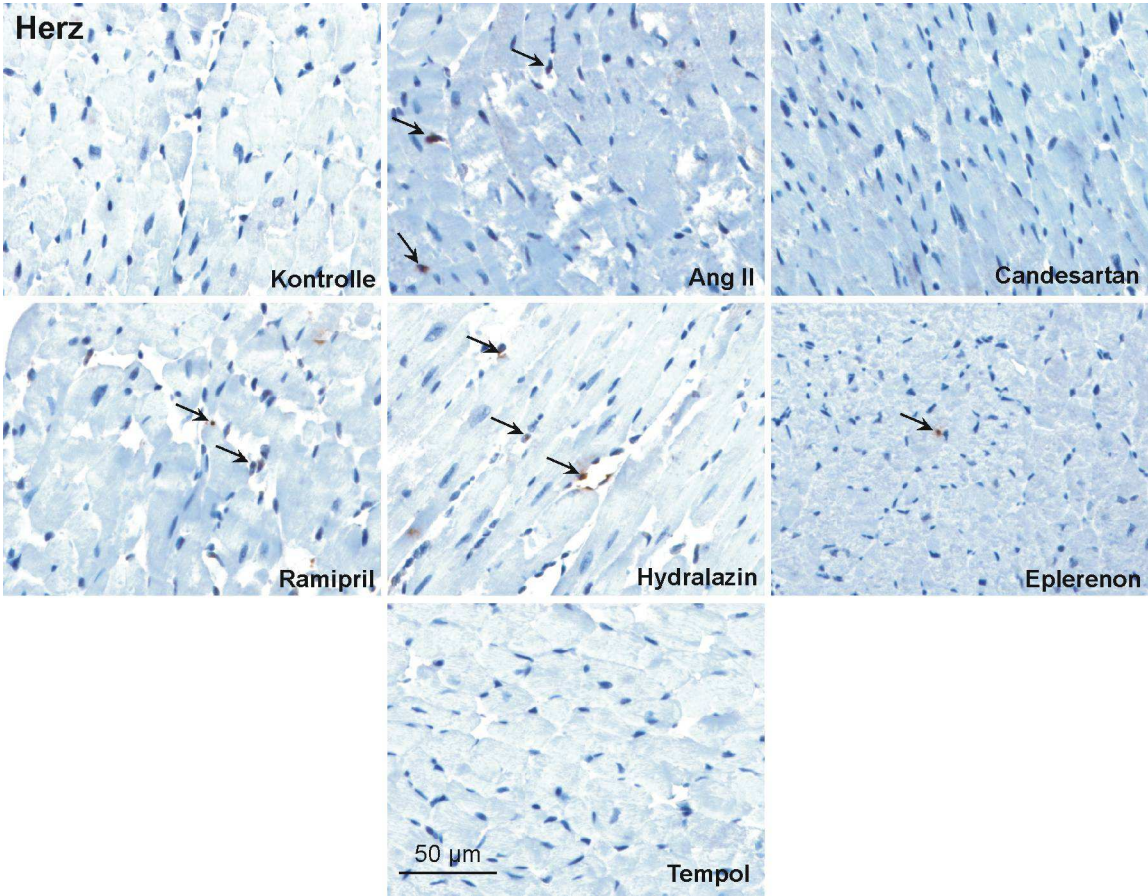


Abb. 34: **A:** Immunhistochemischer Nachweis von PADPR auf Paraffinschnitten der Niere, roter Pfeil zeigt Beispiel für PADPR-positiven Kern, 400-fache Vergrößerung, **B:** Quantifizierung erfolgte durch Auswerten von 7 Gesichtsfeldern pro Tier. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ang II; ooo $p < 0,001$ vs. Ang II.

Ergebnisse

A



B

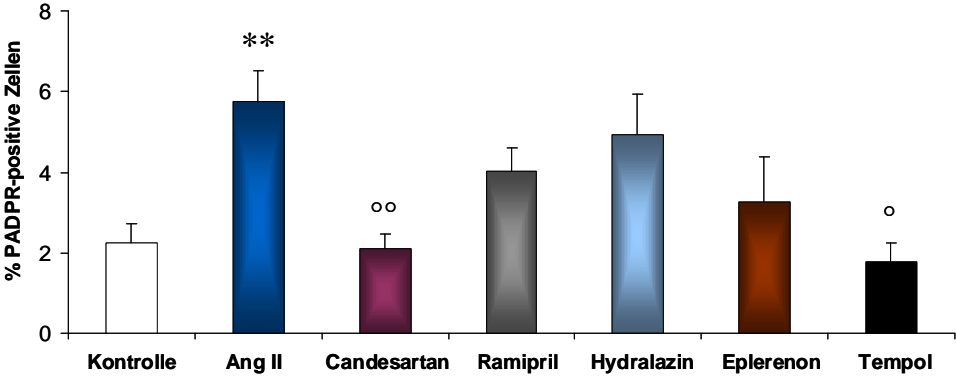


Abb. 35: A: Immunohistochemischer Nachweis von PADPR auf Paraffinschnitten des Herzens, Pfeil zeigt Beispiel für PADPR-positiven Kern B: Quantifizierung erfolgte durch Auswerten von 7 Gesichtsfeldern pro Tier. ** p < 0,01 vs. Kontrolle; ° p ≤ 0,05 vs. Ang II; °° p < 0,01 vs. Ang II.

Ergebnisse

4.2.9 Angiotensin II induziert die Expression von NOX 4 in Tubuluszellen der Niere

Um herauszufinden, ob der oxidative Stress über die NADPH-Oxidase zustande kommt, wurde die Aktivierung von NOX 4 durch Ang II im Western Blot getestet. NOX 4 ist ein Mitglied der NADPH-Oxidase Familie und ist für den Transfer von Elektronen entlang biologischer Membranen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich. NOX 4 wird sehr stark in Tubuluszellen der Nierenrinde ausgebildet. Die Auswertung des Western Blots ergab eine Induktion der Expression von NOX 4 in Tubuluszellen der Niere durch Ang II. Alle Interventionen hatten eine Erniedrigung der Expression zur Folge. Insbesondere Candesartan und Tempol konnten eine erhöhte Expression von NOX 4 verhindern (Abb. 36).

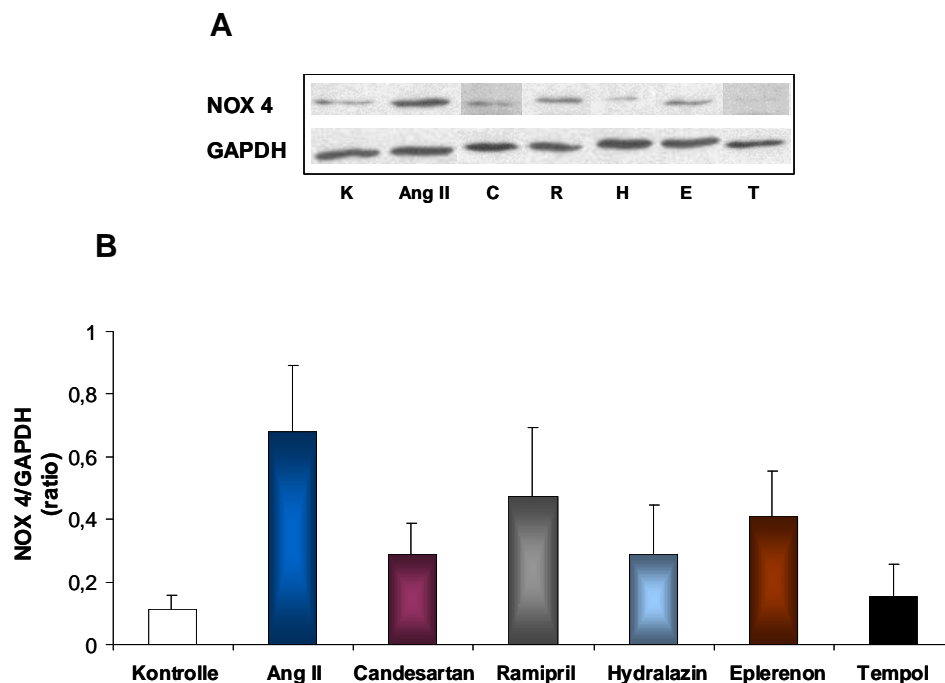


Abb. 36: **A:** Repräsentativer Western Blot, zusammengesetzt aus unterschiedlichen Blots, zur Expression von NOX 4 und dem Referenzprotein GAPDH in der Niere, K=Kontrolle, C=Candesartan, R=Ramipril, H=Hydralazin, E=Eplerenon, T=Tempol, **B:** Quantifizierung erfolgte durch Beziehen von NOX 4 auf GAPDH.

Ergebnisse

4.2.10 Angiotensin II induziert die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren

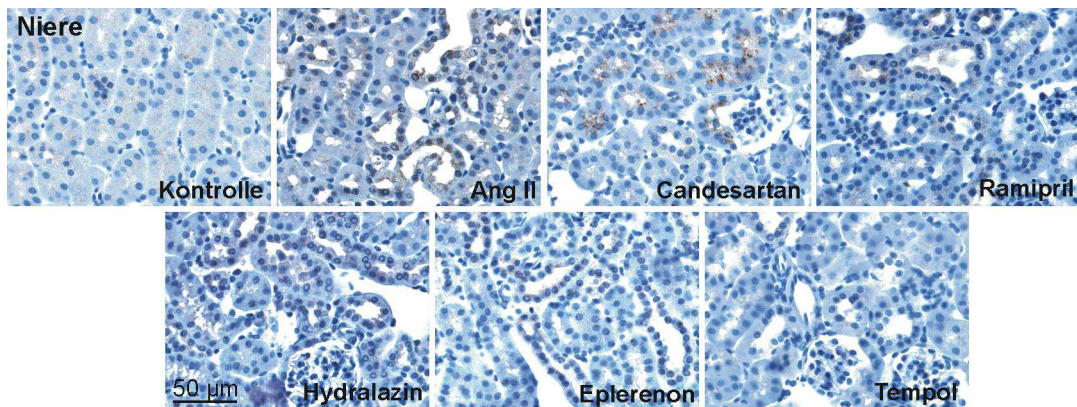
Da nachgewiesen werden konnte, dass durch Ang II die Bildung von oxidativem Stress ausgelöst wird, wurde im nächsten Schritt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells) und Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) untersucht.

4.2.10.1 Angiotensin II induziert die Aktivierung von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird u.a. durch freie Radikale aktiviert. Als eine mögliche Reaktion auf die gesteigerte Bildung von oxidativem Stress durch Angiotensin II wurde nun immunhistochemisch mittels eines Antikörpers gegen NF- κ B auf Paraffinschnitten die Aktivierung von NF- κ B in der Niere untersucht. Als Folge einer NF- κ B-Aktivierung wird NF- κ B von seinen Inhibitoren im Zytoplasma freigesetzt und kann nun in den Zellkern gelangen. Dort kommt es zur Expression und Sekretion von Cytokinen, wodurch eine starke proinflammatorische Immunantwort ausgelöst werden kann [71]. Die Auswertung der Färbung erfolgte durch Zählen der NF- κ B-positiven Zellkerne. Dies ergab eine signifikant erhöhte Translokation von NF- κ B durch Ang II in den Zellkern der Nierentubuli. Candesartan und Tempol reduzierten die hochregulierte Ang II-induzierte Translokation von NF- κ B, wohingegen Ramipril, Hydralazin und Eplerenon nur einen geringen Effekt zeigten (Abb. 37). In Abbildung 37a ist an Beispielbildern von Kontroll- und Candesartan-Tieren gut zu erkennen, dass inaktiviertes NF- κ B im Zytoplasma vorliegt. Vor allem die Reduktion durch das Antioxidans Tempol unterstützt die Hypothese, dass die Ang II-induzierte NF- κ B-Aktivierung durch einen Anstieg an zellulärem ROS ausgelöst wurde.

Ergebnisse

A



B

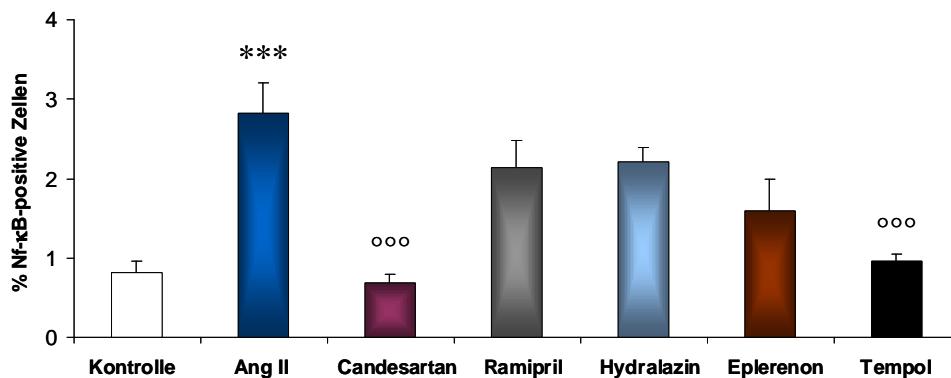


Abb. 37: A: Immunhistochemischer Nachweis von NF-κB auf Paraffinschnitten der Niere, vor allem in Candesartan-Tieren ist der positive Nachweis von NF-κB im Cytosplasma durch Braunfärbung desselben erkennbar, in Ang II-Tieren sind NF-κB-positive Kerne erkennbar, 400-fache Vergrößerung, **B:** Quantifizierung erfolgte durch Auswerten von 7 Gesichtsfeldern pro Tier. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; ooo $p < 0,001$ vs. Ang II.

4.2.10.2 Angiotensin II induziert die Aktivierung von Nrf2

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist, wie der Transkriptionsfaktor Nf-κB auch, ein zellulärer Sensor für oxidativen und elektrophilen Stress. Nrf2 ist verantwortlich für die Expression und kontrollierte Induktion verschiedener Gene, die als Abwehrmechanismus dienen. Dazu gehören unter anderem entgiftende Enzyme und antioxidative Proteine [49]. Nrf2 liegt inaktiviert im Cytoplasma vor. Als Antwort auf oxidativen/elektrophilen Stress wird Nrf2 von seinem Inhibitor freigesetzt, kann dann in den Zellkern wandern und löst dort die Expression antioxidativer Gene aus [47]. Die Aktivierung von Nrf2 durch Ang II in der Niere und im Herzen wurde immunhistochemisch mittels eines Antikörpers gegen Nrf2 untersucht. Die Auswertung der Färbung erfolgte durch Zählen der Nrf2-positiven Zellkerne. Dies

Ergebnisse

ergab eine signifikant erhöhte Translokation von Nrf2 durch Ang II in die Zellkerne der Niere und des Herzens. Candesartan und Tempol reduzierten die hochregulierte Ang II-induzierte Translokation von Nrf2 in beiden Organen. In der Niere zeigten Ramipril und Eplerenon ebenfalls eine signifikante Reduktion der Nrf2 Translokation, wohingegen Hydralazin keinen Einfluss auf die Ang II-induzierte Translokation von Nrf2 hatte (Abb. 38). Im Herzen zeigt sich ein ähnlicher Trend allerdings weniger stark ausgeprägt, da hier für Ramipril, Hydralazin und Eplerenon keine Signifikanz erzielt werden konnte (Abb. 39).

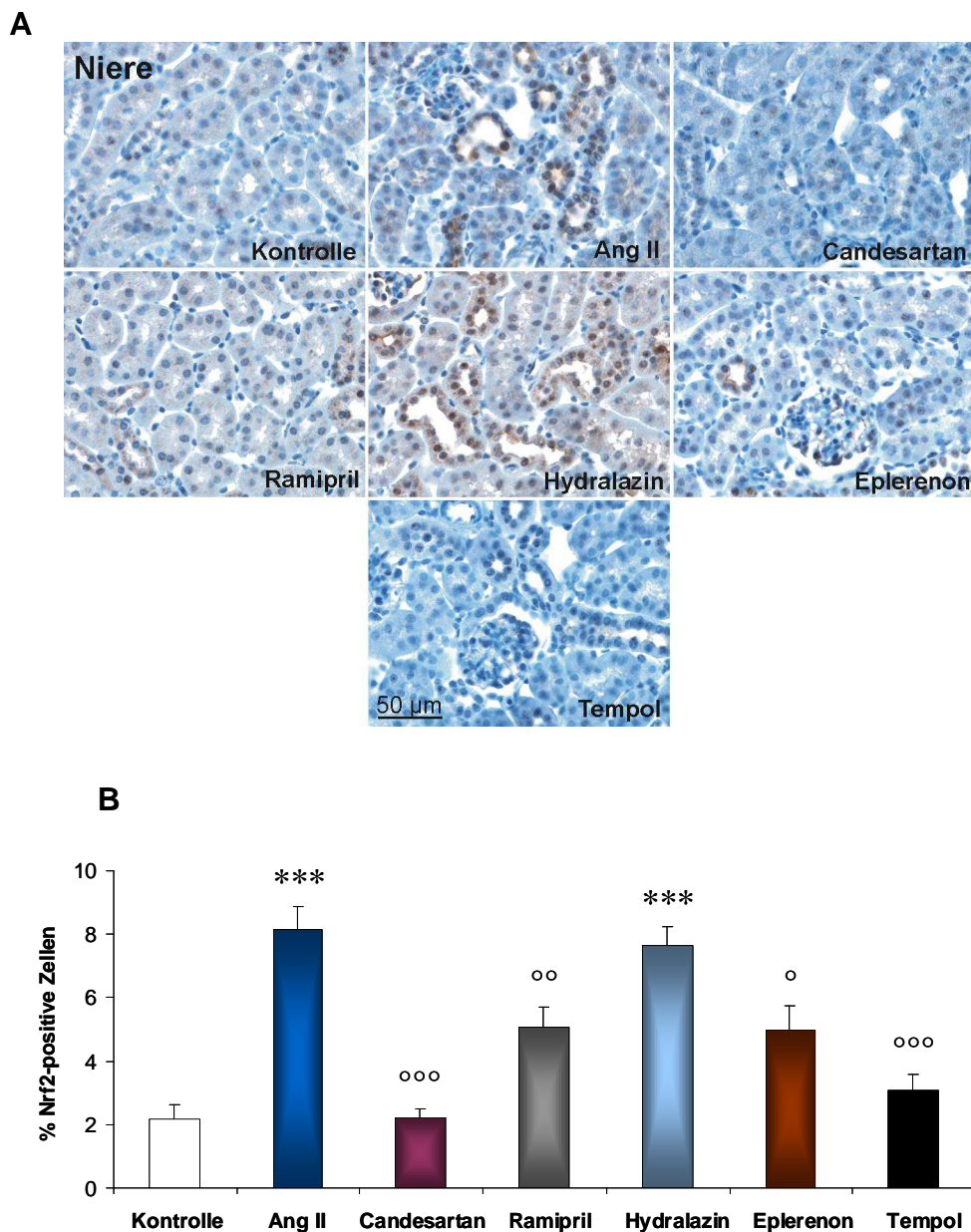
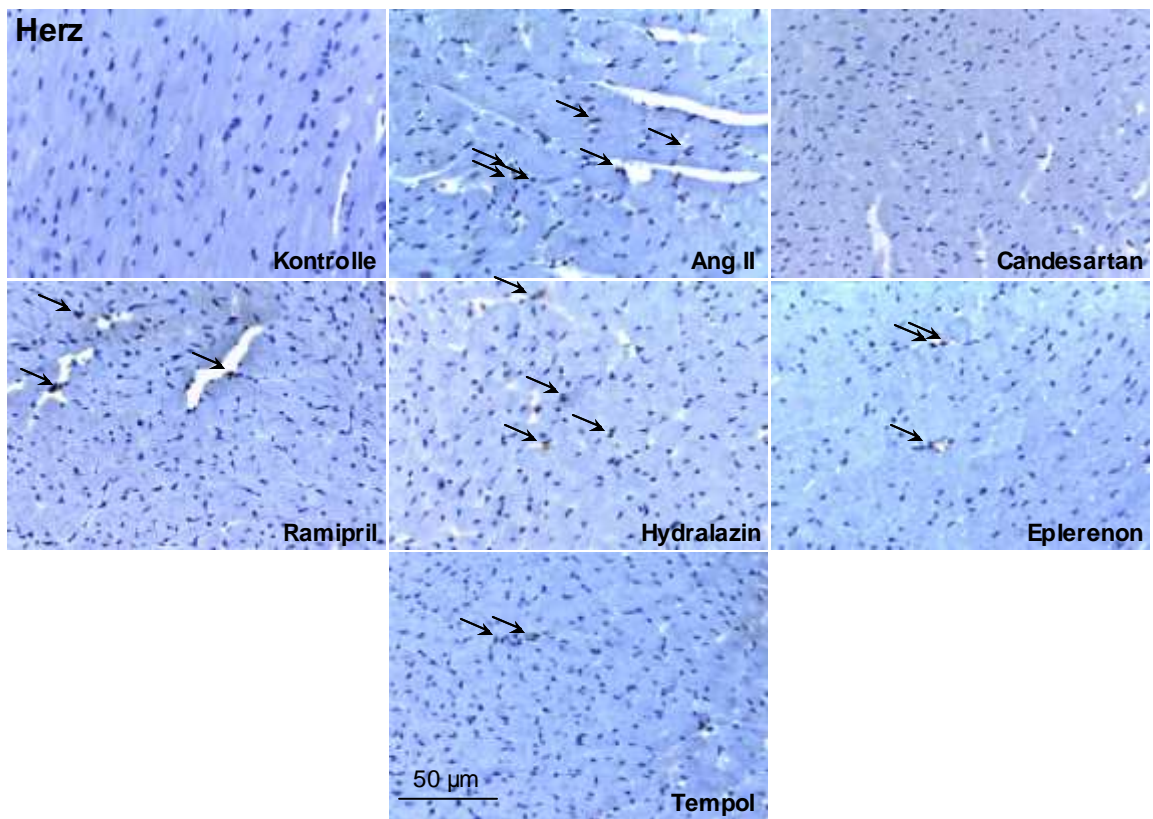


Abb. 38: **A:** Immunhistochemischer Nachweis von Nrf2 auf Paraffinschnitten der Niere, Braunfärbung zeigt Nrf2-positiven Kern oder Nrf2-positives Cytoplasma, 400-fache Vergrößerung, **B:** Quantifizierung erfolgte durch Auswerten von 7 Gesichtsfeldern pro Tier. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ang II; °° $p < 0,01$ vs. Ang II; °°° $p < 0,001$ vs. Ang II.

Ergebnisse

A



B

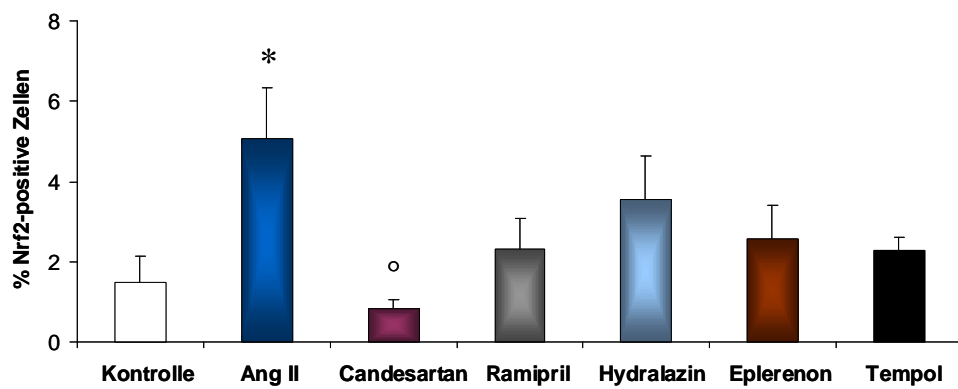


Abb. 39: A: Immunohistochemischer Nachweis von Nrf2 auf Paraffinschnitten des Herzens, B: Quantifizierung erfolgte durch Auswerten von 8 Gesichtsfeldern pro Tier. * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ang II.

Ergebnisse

4.2.11 Angiotensin II-induzierte Aktivierung von Nrf2 führt zu einer erhöhten Expression des Nrf2-regulierten Gens Hämoxxygenase-1 (HO-1)

Das durch Nrf2 regulierte Gen HO-1 wurde im Western Blot auf eine erhöhte Expression durch den Einfluss von Ang II untersucht. HO-1 ist ein Enzym, das Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid oxidiert. Diese Stoffwechselendprodukte besitzen antioxidative Eigenschaften und schützen somit Zellen vor oxidativem Stress [54]. Die Auswertung des Western Blots ergab eine erhöhte Expression des Proteins HO-1 in Tieren, die mit Ang II und Hydralazin behandelt wurden. Wie erwartet, zeigten die Interventionen mit Candesartan, Ramipril, Eplerenon und Tempol keine erhöhte HO-1-Aktivität (Abb. 40).

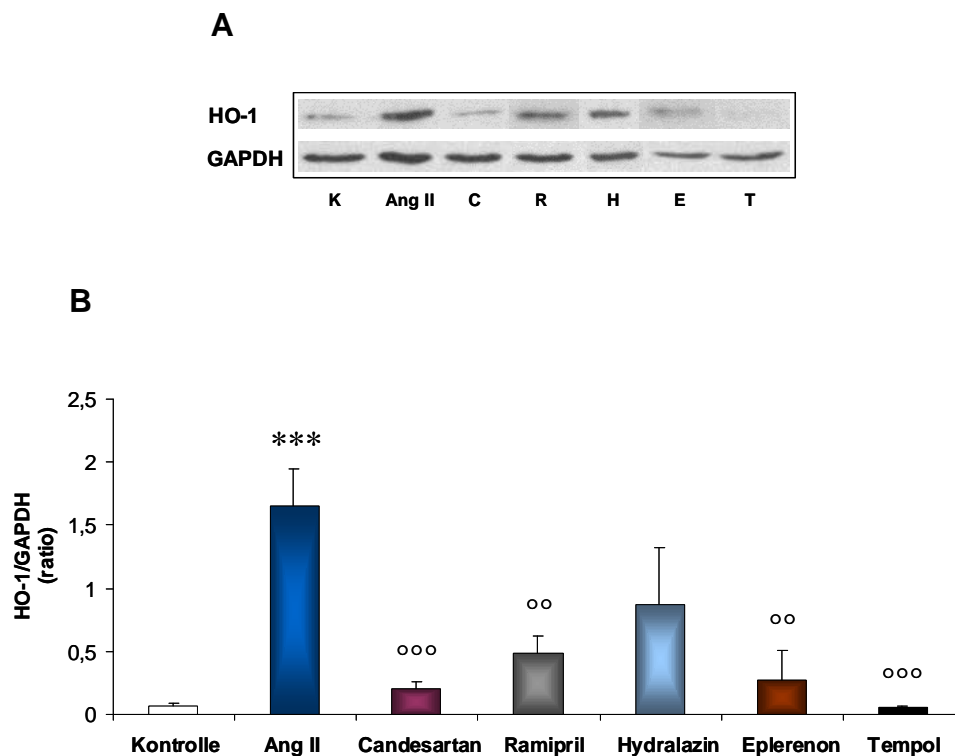


Abb. 40: **A:** Repräsentativer Western Blot, zusammengesetzt aus unterschiedlichen Blots zur Expression von HO-1 und dem Referenzprotein GAPDH in der Niere, K=Kontrolle, C=Candesartan, R=Ramipril, H=Hydralazin, E=Eplerenon, T=Tempol, **B:** Quantifizierung erfolgte durch Beziehen von HO-1 auf GAPDH. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; °° $p < 0,01$ vs. Ang II; °°° $p < 0,001$ vs. Ang II.

5. Diskussion

Das Renin-Angiotensin-System kontrolliert den Blutdruck und das kardiovaskuläre Gleichgewicht, wobei Ang II das regulierende Gewebehormon darstellt. Neben diesen physiologischen Eigenschaften können erhöhte Spiegel an Ang II auch pathophysiologische Konsequenzen in der Niere und im Herzen auslösen. Dies kann zu Bluthochdruck führen und auch eine Entwicklung von Erkrankungen der Niere und des Herzens durch Stimulierung von Wachstum, Entzündung und Fibrose auslösen [72, 73].

Der Dosisversuch sollte zeigen, ob steigende Ang II-Konzentrationen Einfluss auf die Nierenfunktion, histopathologische Veränderungen der Niere und auf die genomische Stabilität von Nieren- und Herzzellen besitzen.

5.1 Dosisversuch

5.1.1 Nierenfunktionsparameter

Die steigenden Ang II-Konzentrationen, die über osmotische Pumpen infundiert wurden, verursachten in unseren Mäusen einen dosisabhängigen Anstieg des Blutdrucks. Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die erhöhten Ang II-Konzentrationen und der erhöhte Blutdruck Einfluss auf die Nierenfunktion hatten, wurde zunächst die Albuminausscheidung betrachtet. Die Höhe der Albuminausscheidung stellt einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten einer Nierenerkrankung dar. Die Albuminausscheidung war in der Pressorgruppe signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle. Um über die Einschränkung der Nierenfunktion eine bessere Aussage machen zu können, wurde neben der Bestimmung der Albuminausscheidung die NGAL-Ausscheidung untersucht. NGAL ist ein sehr früher und sensitiver Biomarker der strukturellen Nierenschädigung [74]. NGAL gehört zur Lipocalin-Superfamilie und wurde ursprünglich in aktivierten Neutrophilen in Zusammenhang mit seiner Rolle als antibakterieller Faktor gefunden. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass andere Zellarten, insbesondere Tubuluszellen der Niere, als Antwort einer Nierenschädigung NGAL produzieren [75]. Zum Beispiel wird NGAL schnell von Tubuluszellen der Niere nach einer intraperitonealen Injektion von Cisplatin, einem bekannten Agens der tubulären Nekrose, abgegeben [76]. Auch nach einer Ischämie der Niere konnte eine Überexpression von NGAL in Tubuluszellen der Niere festgestellt werden [77]. Dies

Diskussion

deutet darauf hin, dass eine Erhöhung der NGAL-Spiegel einen körpereigenen Abwehrmechanismus darstellt [78]. In einem Mausmodell der renalen Ischämie-Reperfusion konnte gezeigt werden, dass die Injektion einer NGAL-Dosis eine signifikante Erniedrigung der histopathologischen Schäden verursachte [78]. Ebenso wurden in Patienten mit einem nephrotischen Syndrom [74] oder Mausmodellen einer diabetischen oder obstruktiven Nephropathie [79, 80] erhöhte NGAL-Spiegel im Urin gefunden. Des Weiteren zeigen Patienten mit einer Proteinurie, einschließlich Albuminurie, eine erhöhte NGAL-Ausscheidung [81, 82]. Im Urin von Mäusen der Pressorgruppe konnte sowohl eine signifikant erhöhte Albuminausscheidung als auch eine nichtsignifikant erhöhte NGAL-Ausscheidung festgestellt werden. Für eine erhöhte NGAL-Ausscheidung im Zusammenhang mit einer Albuminurie können unterschiedliche Ursachen vorliegen. Unter normalen Bedingungen wird NGAL im Glomerulum filtriert und fast vollständig vom proximalen Tubulus über den Multiligand-Protein-Transporter Megalin durch Endocytose reabsorbiert, der im Bürstensaum der Tubuluszellen sitzt, so dass nur ca. 0,1 – 0,2% im Urin verbleiben [83]. Im Fall einer Albuminurie wird eine größere Menge an zirkulierendem NGAL durch das geschädigte Glomerulum verloren. Zusätzlich kann der Megalin-Transporter, der auch für die Endozytose anderer Proteine verantwortlich ist, durch eine Proteinüberladung gesättigt sein, wodurch die NGAL-Reabsorption abnimmt [84]. Ebenso kann die Megalin-Aktivität durch eine Protein-induzierte Schädigung des Bürstensaums der proximalen Tubuluszellen, wo der Transporter sitzt, erniedrigt sein. Die Anwesenheit von Plasmaproteinen im Tubuluslumen kann eine zusätzliche Schadensquelle darstellen, die zunächst Apoptose, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose auslösen und schließlich zu einer chronischen Nierenerkrankung führen kann [75].

Aufgrund des tubulointerstitiellen Schadens mit Dilatation und Fibrose, den wir in Tieren der Pressorgruppe gefunden haben, lässt sich die erhöhte NGAL-Ausscheidung auf einen Reabsorptionsdefekt des Megalinkomplexes in proximalen Tubuluszellen zurückführen. Auch die erhöhte Ausscheidung von Albumin lässt sich damit erklären, da an Megalin-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte, dass keine Aufnahme von Albumin über Endocytose in den Tubulus erfolgen kann [85]. Ebenso kann eine erhöhte Ausscheidung an Albumin und NGAL durch ein geschädigtes Glomerulum erklärt werden, da der Score für GSI/MSI in Pressortieren ebenfalls signifikant erhöht ist. Die NGAL-Ausscheidung erreichte zwar wegen

Diskussion

großen interindividuellen Schwankungen keine Signifikanz, die deutliche Erhöhung des NGAL-Wertes in der Pressorgruppe gegenüber der Kontrolle deutet dennoch auf eine Verschlechterung der Nierenfunktion hin.

Harnstoff ist der am meisten vorhandene gelöste Stoff im Urin von Menschen und Labortieren. Er ist im Urin viel stärker konzentriert als im Serum. Harnstoff, eine organische Stickstoffverbindung, fällt als Endprodukt des Eiweißstoffwechsels an. Bei diesem werden mehrere Abfallprodukte gebildet, wobei der größte Anteil Stickstoff darstellt, welcher dann in Form von Harnstoff über die Niere ausgeschieden wird. Da der Anteil an Proteinen in der Nahrung, verglichen mit anderen Mineralstoffen, sehr groß ist, repräsentiert Harnstoff ca. 40-50% aller gelösten Stoffe im Urin von Labortieren und auch im Menschen [86]. Um eine Aussage über die Nierenfunktion im Zusammenhang mit Harnstoff treffen zu können, muss neben dem Harnstoffwert im Serum, die Harnstoffausscheidung betrachtet werden da der Harnstoffmetabolismus stark von der Proteinzufuhr abhängig ist. Der Harnstoffwert im Serum war in der Pressorgruppe signifikant erhöht, was durch die gleichmäßige Harnstoffausscheidung zwischen den Gruppen nicht auf Unterschiede in der Futtermenge zurückgeführt werden kann, sondern auf eine eingeschränkte Nierenfunktion.

Die erhöhte Ausscheidung von Albumin und NGAL in Kombination mit erhöhten Harnstoffwerten im Serum lassen auf eine beginnende Einschränkung der Nierenfunktion schließen. Dies wird durch die beobachteten Schädigungen des Tubulussystems und der Glomeruli untermauert, da histopathologische Veränderungen des Tubulussystems gegenwärtig als ausschlaggebend in der Entwicklung von chronischen Nierenerkrankungen gelten [87].

Neben der Niere, die das am meisten betroffene Organ bei Bluthochdruck darstellt, zeigen Studien, dass eine Mikroalbuminurie auch ein Anzeichen für eine beginnende kardiovaskuläre Erkrankung ist [88-90].

5.1.2 Angiotensin II-Behandlung induziert histopathologische Veränderungen der Niere

Die Veränderung des Tubulussystems der Niere, welche überwiegend aus Dilatation, Fibrose und wenig Entzündung bestand, kann auf verschiedene Ang II-vermittelte Effekte zurückgeführt werden. Ang II ist verantwortlich für die Induzierung der Hypertrophie proximaler Tubuluszellen, welche AT₁-Rezeptor-vermittelt abläuft.

Diskussion

Diese Induzierung ist abhängig von einem ROS-vermittelten Anstieg von p27^{Kip1}, einem inhibitorischen Protein, welches den Zellzyklus in der G1-Phase anhält [91, 92]. Des Weiteren vermittelt Ang II die Transkription und Biosynthese des transforming growth factor- β (TGF- β , Transformierender Wachstumsfaktor) in proximalen Tubuluszellen. TGF- β ist ein Cytokin, das eine wichtige Rolle in der Fibrosierung von Gewebe spielt. Ang II stimuliert zusätzlich die Transkription und Oberflächenexpression des TGF- β -Rezeptor-II, was die Effekte der Ang II-induzierten TGF- β -Expression noch verstärkt [93]. So kommt es nach Stimulierung durch Ang II, TGF- β -vermittelt zur Expression und Synthese von extrazellulären Matrixproteinen (ECM) wie Fibronectin [94]. Zudem wird Ang II direkt an der Oberfläche von Tubuluszellen zu Ang IV metabolisiert. Ang IV bindet an seinen eigenen Rezeptor (AT₄), wodurch die Induktion des Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ausgelöst wird. PAI-1 inaktiviert Proteasen der Niere, die normalerweise für den Abbau von Matrixproteinen verantwortlich sind und somit den Matrixumsatz regulieren [95, 96]. Die tubulointerstitielle Fibrose wird somit nicht nur durch eine erhöhte Synthese extrazellulärer Matrixproteine gebildet sondern auch durch die Herunterregulierung von deren Abbau [97]. Demnach kann Ang II viele pathophysiologische Veränderungen vermitteln, die chronische tubulointerstitielle Verletzungen betreffen [98]. Die Behandlung mit Ang II führte ebenfalls zu histopathologischen Veränderungen der Glomeruli, was einen Filtrationsdefekt im Glomerulum, vor allem anhand der erhöhten Albuminausscheidung, widerspiegelt. Die morphologischen Gefäßwandveränderungen lassen sich durch eine Erhöhung des Blutdrucks erklären.

5.1.3 Angiotensin II-Behandlung induziert oxidativen Stress und die Entstehung von Doppelstrangbrüchen

Die meisten der bekannten physiologischen und pathophysiologischen Effekte von Ang II werden über den AT₁-Rezeptor vermittelt. Somit führt auch die Bindung von Ang II an den AT₁-Rezeptor zur Bildung von oxidativem Stress in Form reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche durch die NADPH-Oxidase ausgelöst wird [99, 100]. ROS, induziert durch Ang II, sind wichtige Signalvermittler in verschiedenen Signalwegen, die an pathophysiologischen Veränderungen der Niere beteiligt sind [101]. In dieser Studie wurde die Bildung von ROS mit dem ROS-sensitiven Fluorophor Dihydroethidium in Tubuluszellen der Niere nachgewiesen. Eine ROS-Produktion nach Ang II-Infusion konnte schon in einigen Tierstudien gezeigt werden

Diskussion

[102, 103]. Allerdings konnten wir hier zum ersten Mal einen dosisabhängigen Anstieg der ROS-Produktion in der Niere nachweisen. Im Herzen wurde eine signifikante Bildung von oxidativem Stress nur bei der höchsten Ang II-Konzentration gefunden. Die Beteiligung von oxidativem Stress in der Pathophysiologie einer kongestiven Herzinsuffizienz mit vorausgehender linksventrikulärer Hypertrophie und einem Remodelling nach einem Myokardinfarkt sind belegt [104].

Die DNA und Zellen in Geweben und Organen sind kontinuierlich oxidativem Stress und freien Radikalen ausgesetzt. Die NADPH-Oxidase generiert O_2^- in der Größenordnung von ca. 10 nmol/min pro Zelle [105]. ROS interagieren mit Molekülen und stören die normale Synthese und Reparatur der DNA. Diese Störung ist hauptsächlich verbunden mit einer Inhibierung/Inaktivierung antioxidativer Schlüsselproteine sowie DNA-Reparaturenzyme, die durch oxidative Schäden ausgelöst wird [106]. Zu den im Zusammenhang mit ROS oxidativ induzierten DNA-Schäden gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche, oxidierte Purine/Pyrimidine und abasische DNA-Stellen [33]. Verschiedene Studien, die sich mit unterschiedlichen Krebsarten im Menschen befasst haben, unterstützen die Identifizierung von oxidativ induzierten DNA-Schäden als sicheren Indikator von oxidativem Stress in der Anwesenheit bösartiger Tumore. Diese Studien zeigen, dass in einer Vielzahl von Krebsarten ein permanenter Kampf zwischen dem Auftreten von oxidativem Stress und der Bildung freier Radikale, die die DNA angreifen können, auf der einen Seite und zellulären Abwehrmechanismen auf der anderen Seite besteht [107-109]. Allerdings sind in vielen Fällen die Abwehrmechanismen durch die Fülle der oxidativen Angriffe überfordert, so dass Schäden an der DNA entstehen. Als Reaktion auf Doppelstrangbrüche wird H2AX an der Aminosäure Serin 139 phosphoryliert, worauf es als γ -H2AX bezeichnet wird. Als γ -H2AX trägt es wesentlich zur Erkennung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA bei. Während der ersten 30 Minuten nach einer Doppelstrangbruchformation reichern sich große Mengen an γ -H2AX Molekülen um den Bruch an, um für Reparaturenzyme und den Chromatinumbau benötigte Proteine einen Angriffspunkt zu schaffen [69]. Wir konnten Schäden an der DNA in Form von γ -H2AX-positiven Zellen in der Niere und im Herzen nachweisen. In der Niere konnten wir Doppelstrangbrüche in Tubuluszellen nachweisen, wobei die Stärke der Schädigung mit Erhöhung der infundierten Ang II-Konzentration zunahm. Doppelstrangbrüche in der DNA sind ernstzunehmende Schädigungen, die zu genomischer Instabilität und im weiteren

Diskussion

Verlauf zur Entstehung von Krebs führen können [69]. Die Überwachung dieser Doppelstrangbrüche durch die Detektion von γ -H2AX stellt eine gute Möglichkeit dar, die Krebsentwicklung- und -behandlung zu verfolgen [110], da γ -H2AX-Spiegel die endogene genomische Instabilität widerspiegeln. Zum Beispiel wurde in einer Studie die Möglichkeit diskutiert, die Messung von γ -H2AX in der Differentialdiagnose eines Nierenzellkarzinoms zu nutzen [111].

Da phosphoryliertes H2AX ebenfalls während des Zellzyklus und während der Apoptose gebildet wird [70], wurde die Anzahl apoptotischer Zellen im Gewebe von Niere und Herz mit Hilfe eines Antikörpers gegen cleaved caspase-3 immunhistochemisch detektiert. Da der Anteil an apoptotischen Zellen in der Niere im Vergleich zu γ -H2AX-positiven Zellen sehr gering war und im Herzen sogar mehr apoptotische Zellen als γ -H2AX-positive Zellen gefunden wurden, kann man daraus schließen, dass mit dem Antikörper gegen γ -H2AX nur Zellen quantifiziert wurden, die Doppelstrangbrüche und keine apoptotischen Zellen enthalten.

Als weiteren Marker für DNA-Schäden wurde die Basenmodifikation 8-OxodG untersucht. Sie entsteht durch die Addition eines Hydroxylradikals an die C8-Position des Guaninrings und anschließende Oxidation. Diese Basenmodifikation ist für die Zelle letztendlich nicht tödlich, wird aber als hoch mutagen angesehen [33]. Die Mutagenität von 8-OxodG resultiert aus der Möglichkeit Fehlpaarungen mit Adenin einzugehen, was zu einer GC→TA-Transversion führen kann [39]. Aus diesem Grund spielt 8-OxodG in der Pathogenese von Krebs, im Alterungsprozess und bei degenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle [112]. 8-OxodG wurde zudem als Biomarker für oxidativen Stress und oxidativen Schaden im menschlichen Körper im Zusammenhang mit Krebs eingeführt [113]. Wir konnten eine Erhöhung des Anteils an 8-OxodG mit steigender Ang II-Konzentration in unseren Tieren feststellen. In der Pressorgruppe lag der Wert bei 7,15 8-OxodG/10⁶dG, wobei der erwartete Kontrollwert von 8-OxodG bei ca. 0,1/10⁶dG liegt [114]. Dieser Wert ist allerdings Schwankungen unterworfen, da er sehr stark abhängig von der Messmethode ist. Da die DNA zunächst isoliert werden muss, ist eine Oxidation der DNA während der Extraktion unvermeidlich [115]. Der gemessene Wert für 8-OxodG in unseren Kontrolltieren lag bei 3,15/10⁶dG. Auch andere Studien konnten belegen, dass eine erhöhte Ausscheidung von 8-OxodG im Urin von hypertensiven Patienten und in der DNA von hypertensiven Rattenmodellen vorliegt [112, 116]. Um Mutationen bilden zu können, müssen Zellen, die eine 8-OxodG-Basenmodifikation oder

Diskussion

Doppelstrangbrüche tragen, allerdings proliferieren. In der Niere konnten wir Proliferation feststellen; aber die Entwicklung von Mutationen bleibt weiterhin eine Vermutung.

Wir konnten erstmals im Tierversuch das Auftreten von Doppelstrangbrüchen in der Niere und im Herzen, ausgelöst durch steigende Ang II-Konzentrationen, nachweisen. Da Ang II die Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde auslöst, fanden wir in Pressortieren eine erhöhte Aldosteronausscheidung. Aldosteron zeigt ebenfalls genotoxische Eigenschaften [67]. Daraus, und aus der Tatsache, dass in Slow-Pressortieren keine erhöhte Aldosteronausscheidung gemessen werden konnte, lässt sich schließen, dass der DNA Schaden in der Pressorgruppe ein Effekt von erhöhten Ang II- und Aldosteronspiegeln ist, wobei die DNA-Schäden in Slow-Pressortieren höchstwahrscheinlich allein durch den Effekt von Ang II verursacht wurden. Auch gelang es uns, in der Niere einen Anstieg an 8-OxodG ebenso in Abhängigkeit der zugeführten Ang II-Konzentration zu detektieren. Die Produktion an ROS in der Niere war bereits in der Slow-Pressor 1-Gruppe gegenüber der Kontrolle erhöht und nahm in der Pressorgruppe noch zu, obwohl der Blutdruck hier nicht höher war als in der Slow-Pressor 2-Gruppe. Dieser Trend konnte durch Auswertung der Schädigung des Tubulussystems, die Detektion von Doppelstrangbrüchen und der mutagenen Basenmodifikation 8-OxodG bestätigt werden. Diese Beobachtung deutet auf eine mögliche Unabhängigkeit des entstandenen Schadens vom Bluthochdruck hin und lenkt die Aufmerksamkeit auf Ang II als genom-schädigenden Faktor. Ang II könnte somit eine wichtige Rolle in der beobachteten Häufung von Nierenkrebs bei Bluthochdruckpatienten spielen.

Der nachfolgende Interventionsversuch sollte Aufschluss über die mögliche, blutdruckunabhängige genom-schädigende Wirkung von Ang II geben und den DNA-schädigenden Mechanismus aufklären.

5.2 Interventionsversuch

Im Interventionsversuch führte die gewählte Ang II-Konzentration zu einem signifikanten Blutdruckanstieg in der Maus und Fluktuationen des Blutdrucks, wie sie im Dosisversuch bei den höchsten Ang II-Dosen auftraten, konnten vermieden werden. Der Einsatz der verschiedenen Interventionen verursachte, bis auf Hydralazin, den erwarteten Effekt. Die erhoffte Blutdrucksenkung durch den Einsatz des Vasodilatators Hydralazin konnte nicht über den gesamten Versuchszeitraum

aufrechterhalten werden. Nach einem Blutdruckabfall sieben Tage nach Implantation der Pumpe blieb der Blutdruck ca. eine Woche auf diesem niedrigen Niveau, stieg dann aber wieder an. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Dosis von 10-15 mg/kg*d zu niedrig gewählt wurde. In einer anderen Studie, die dieselbe Hydralazinkonzentration in Ang II-infundierten Mäusen anwendete, konnte zwar eine Blutdrucksenkung erzielt werden, allerdings war der Versuchszeitraum mit sieben Tagen kürzer gewählt [117]. Dies stimmt mit unserem Ergebnis insofern überein, dass wir auch einen Blutdruckabfall nach sieben Tagen beobachten konnten. Um die starke vasokonstriktorische Wirkung von Ang II allerdings über einen längeren Zeitraum zu antagonisieren müsste die Dosis wohl höher gewählt werden. In einer Studie an Dahl-Ratten, in der der Blutdruckanstieg zwar nicht über Ang II sondern über eine erhöhte Salzzufuhr ausgelöst wurde, konnte mit einer Dosis von 50mg/kg*d eine Blutdrucksenkung über 10 Wochen aufrechterhalten werden [118]. Auch die Gabe von Hydralazin bereits 2 Wochen vor Beginn der Salzzufuhr könnte eine Rolle in dem Wirkmechanismus von Hydralazin spielen. Das heißt, bei Interpretation der Hydralazin-Daten, müssen die Schwankungen der Blutdruckwerte beachtet werden.

5.2.1 Angiotensin II-Behandlung induziert erhöhte Albuminausscheidung in hypertensiven Tieren aufgrund histopathologischer Schäden

Bluthochdruck verursacht häufig eine Proteinurie und ist ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Funktionsstörungen in der Niere. Erhöhte Proteinspiegel im Urin sind zu finden, wenn Teile des Nephrons nicht richtig arbeiten. Studien zeigen, dass bei Bluthochdruck sowohl ein Filtrationsdefekt im Glomerulum als auch ein Reabsorptionsdefekt im Tubulus vorliegen kann [119]. In unserer Studie war sowohl in Ang II-behandelten, Ang II/Ramipril-behandelten, Ang II/Eplerenon-behandelten und Ang II/Tempol-behandelten Tieren eine erhöhte Ausscheidung an Albumin nach 4 Wochen Behandlung zu erkennen. Das heißt, alle Tiere, die kontinuierlich unter Bluthochdruck litten, zeigten eine erhöhte Albuminausscheidung. Histopathologische Untersuchungen zeigten, dass sowohl in Ang II/Eplerenon als auch in Ang II/Tempol-behandelten Tieren strukturelle Veränderungen des Glomerulums im Vergleich zur Kontrolle vorlagen, was ein Auslöser des Filtrationsdefektes darstellen kann. In Ang II/Ramipril-behandelten Tieren hingegen war der Schaden allerdings eher im Tubulussystem zu finden, was auf einen Reabsorptionsdefekt hindeutet. Ang II/Tempol-behandelte Tiere wiesen nur einen geringen tubulointerstitiellen

Diskussion

Schaden auf, was darauf zurückgeführt werden kann, dass Tempol den ROS-vermittelten Anstieg des Proteins p27Kip1 verhindert hat, welches den Zellzyklus anhält und somit mitverantwortlich in der Induzierung einer Hypertrophie ist. Ang II/Hydralazin-behandelte Tiere wiesen keine erhöhte Albuminausscheidung auf. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in den unterschiedlichen Blutdruckwerten während der Behandlung. Der Blutdruck war zu Beginn zwar hoch, fiel aber nach sieben Tagen und war somit nur ca. zwölf Tage am Stück auf einem höheren Niveau. Dieser Zeitraum ist möglicherweise zu kurz um eine Schädigung der Niere durch Bluthochdruck auszulösen, da bei den anderen Interventionen nach einem Zeitraum von vierzehn Tagen ebenfalls keine erhöhte Albuminausscheidung festgestellt werden konnte. Eine strukturelle Veränderung des Glomerulum lag ebenfalls nur in geringem Ausmaß vor. Die Intervention mit Candesartan konnte einen Ang II-abhängigen Blutdruckanstieg und somit auch eine Veränderung im Glomerulum und im Tubulus verhindern.

5.2.2 Reduktion der Angiotensin II-induzierten Bildung von oxidativen Schäden durch die Interventionen

Im Dosisversuch konnten wir einen dosisabhängigen Anstieg der ROS-Produktion und ebenfalls einen dosisabhängigen Anstieg der Bildung von Doppelstrangbrüchen nachweisen. Der Interventionsversuch zeigte die Beteiligung des AT₁-Rezeptors an diesen pathophysiologischen Prozessen, da sowohl die Entwicklung von oxidativem Stress als auch die Bildung von Doppelstrangbrüchen durch die Behandlung mit Candesartan verhindert wurde. Die Rolle von oxidativem Stress in der Entstehung von DNA-Schäden wurde durch die Behandlung mit Tempol untersucht.

Die Behandlung mit Ang II führte zur Bildung von oxidativem Stress in Form von ROS. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass die Bildung von Ang II-induziertem oxidativen Stress in Tubuluszellen der Niere abhängig ist von NOX 4 [120]. Diese Beobachtung konnten wir nun *in vivo* bestätigen, wobei die Beteiligung von NOX 2 nicht ausgeschlossen werden kann. Für eine NOX 4-abhängige ROS-Produktion wird p22phox benötigt [121]. Ang II trägt somit zum einen durch eine Hochregulierung der Untereinheit p22phox und zum anderen durch eine erleichterte Zusammensetzung der Untereinheiten, durch eine Aktivierung von Rac, zu einer Hochregulierung von NOX 4 und somit zu einer erhöhten ROS-Produktion bei [122, 123]. Die Intervention mit Candesartan verhinderte durch Blockade des AT₁-Rezeptors eine

Diskussion

Hochregulierung von NOX 4, was sich in einer erniedrigten ROS-Produktion widerspiegelte. Ang II/Ramipril und Ang II/Eplerenon-behandelte Tiere zeigten ebenfalls eine Hochregulierung von NOX 4 und auch eine gesteigerte ROS-Produktion. Eine Hochregulierung von NOX 4 in der Niere trotz einer Intervention mit Eplerenon lässt darauf schließen, dass der Effekt der NOX 4-vermittelten Produktion von ROS in diesen Tieren der Wirkung von Ang II angerechnet werden kann. Die Intervention mit Hydralazin führte tendenziell zu einer leichten Hochregulierung von NOX 4, allerdings gab es große Schwankungen innerhalb dieser Gruppe. Bei Tieren die mit Tempol behandelt wurden, würde man keinen Einfluss der Intervention auf die NOX 4-Expression erwarten, da Tempol, als Antioxidans, erst einen Einfluss auf die durch NOX 4 produzierten ROS ausübt. Allerdings reduzierte die Intervention mit Tempol die hochregulierte Ang II-induzierte Expression von NOX 4 in der Niere und reduzierte somit die Bildung der ROS. Eine mögliche Erklärung dafür, dass Tempol einen Einfluss auf die NADPH-Oxidase besitzt, könnte mit einer erniedrigten Expression von p22phox zusammenhängen. Eine Studie an hypertensiven Dahl-Ratten konnte eine reduzierte Expression an p22phox mRNA durch Intervention mit Tempol im Nierencortex feststellen [124]. An Ang II-infundierten Mäusen, die mit siRNA, gerichtet gegen renales p22phox, behandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass die anschließende erniedrigte NOX-Aktivität verbunden ist mit einer reduzierten ROS-Produktion [125]. Hierbei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob NOX 2 an der Bildung von oxidativem Stress beteiligt ist. Die erniedrigte Bereitstellung dieser Untereinheit und das Abfangen von ROS stellen eine mögliche Erklärung für ein reduziertes Vorliegen an ROS durch die Intervention mit Tempol dar.

Betrachtet man die ROS-Produktion im Herzen, ist ein ähnliches Muster wie in der Niere erkennbar, wobei die ROS-Produktion bei Intervention mit Eplerenon im Vergleich zur Niere erniedrigt ist. Im Herzen kommen vornehmlich NOX 2 und NOX 4 vor und werden in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert [126]. Da andere Studien an Ang II-infundierten Mäusen mit dem Mineralkortikoidrezeptorblocker Spironolacton eine Abnahme der NADPH-Oxidase-Aktivität im Herzen feststellen konnten [127], besteht die Möglichkeit, dass im Herzen die ROS-Produktion zusätzlich abhängig ist von der Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. In dieser Studie bezieht man sich auf eine erhöhte NOX 2-Aktivität, da in NOX 2 knockout Mäusen eine Ang II-Infusion keinen Effekt auf die

Diskussion

durch NOX 2 ausgelösten Effekte im Herzen hatte. Da allerdings in unserer Studie die ROS-Produktion im Herzen durch die Intervention Eplerenon nicht vollständig auf Kontrollniveau gesenkt werden konnte, möglicherweise auch durch eine schwächere Wirkung von Eplerenon im Vergleich zu Spironolacton, lässt darauf schließen, dass Ang II ebenfalls Einfluss auf die ROS-Produktion im Herzen besitzt. Ob hierbei NOX 4 eine Rolle spielt, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die durch oxidativen Stress verursachten DNA-Schäden wurden mit Hilfe des Comet Assays an isolierten Zellen der perfundierten Niere und mit Hilfe der Detektion von Doppelstrangbrüchen auf Paraffinschnitten nachgewiesen. Der Comet Assay zeigte einen ersten Trend im Hinblick auf die verursachten DNA-Schäden in der Niere, wobei die, durch die Behandlung mit Candesartan und Tempol verminderte Bildung von ROS auch zu geringeren DNA-Schäden führte. Betrachtet man nun die Bildung an DNA-Doppelstrangbrüchen wird ein deutlicherer Effekt durch die verschiedenen Interventionen erkennbar. Die Behandlung mit Ang II, auch in Kombination mit der Intervention Hydralazin, induzierte die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen in Folge von oxidativem Stress. Diese konnte zum einen durch die Blockade des AT₁-Rezeptors durch Candesartan und zum anderen durch den Einsatz des Antioxidans Tempol fast vollständig auf Kontrollniveau zurückgebracht werden. Die Intervention sowohl mit Ramipril als auch mit Eplerenon führte zu einer Reduktion der DNA-Schäden, im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Ang II. Die Reduktion der DNA-Schäden durch die Behandlung mit Eplerenon trotz einer gesteigerten ROS-Produktion ist schwer erklärbar. Die vermutete Stärke der Bildung an ROS in Tieren, die mit Eplerenon behandelt wurden, sollte allerdings etwas geringer sein, da die Intervention die Bindung von Aldosteron an den Mineralkortikoidrezeptor verhindert und somit nur Ang II für die Bildung an ROS verantwortlich ist. Jedoch zeigt die Färbung mit dem Fluorophor Dihydroethidium nur eine Momentaufnahme des vorliegenden oxidativen Stresses, so dass die Färbung nur einen Anhaltspunkt der tatsächlich vorliegenden ROS widerspiegelt, während der γ -H2AX-Nachweis eine bessere Aussage über den akkumulierten Schaden während der vierwöchigen Behandlung trifft. In *in vitro*-Studien konnte die Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Behandlung mit Aldosteron ROS-Spiegel erhöht und somit zur Entstehung von DNA-Schäden beiträgt [128]. Da die DNA-Schäden durch die Behandlung mit Eplerenon zurückgegangen sind, kann somit die Beteiligung von Aldosteron an der Entstehung nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Intervention mit Eplerenon führte

Diskussion

aber nicht zu einer vollständigen Senkung auf Kontrollniveau, woraus geschlossen werden kann, dass Ang II auch eine entscheidende Rolle spielt.

Im Herzen stimmen die in der jeweiligen Gruppe verursachten DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen mit der detektierten Menge an oxidativem Stress überein. Die bereits oben erwähnte verminderte ROS-Produktion im Herzen durch Intervention mit Eplerenon, vermutlich durch Hemmung der NOX 2-Aktivität ausgelöst, wird durch eine erniedrigte Bildung von Doppelstrangbrüchen in dieser Gruppe im Herzen wiedergespiegelt.

Die Reparatur-Aktivität, welche durch die Färbung auf PADPR durchgeführt wurde, korreliert mit den gefundenen DNA-Schäden in der Niere als auch im Herz. Die Färbung zeigt dass, je mehr Doppelstrangbrüche vorliegen auch eine erhöhte Reparatur-Aktivität vorhanden ist.

Die Entstehung von oxidativem Stress und die Bildung von Doppelstrangbrüchen, induziert durch Ang II in der Niere und im Herzen, konnten durch die Intervention mit Ramipril zwar nicht ganz verhindert, aber doch reduziert werden. Es gibt verschiedene Hinweise auf eine mögliche intrinsische antioxidative Wirkung von ACE-Hemmern [129]. In Studien an Mäusen konnte die Behandlung mit Enalapril oder Captopril die endogenen antioxidativen Abwehrmechanismen durch eine Erhöhung der enzymatischen und nicht-enzymatischen Aktivitäten beeinflussen [130, 131]. Eine Perfusion mit Captopril erhöhte die Aktivität der Superoxiddismutase im isolierten Ischämie-reperfundierten Herz [132]. Im Menschen konnten an Hämodialysepatienten, die mit Enalapril behandelt wurden, erhöhte Spiegel an antioxidativen Abwehrmechanismen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die nicht mit Enalapril behandelt wurden, festgestellt werden [133]. Mögliche antioxidative Eigenschaften von Ramipril, die zum Teil die Entstehung von oxidativem Stress und die Bildung von Doppelstrangbrüchen vermeiden konnten, sind somit nicht auszuschließen. Auch eine mögliche Blockade des lokalen RAAS in der Niere und im Herzen durch Ramipril könnte eine Erklärung für die verminderten negativen Effekte darstellen. Alle Komponenten des RAAS konnten in der Niere gefunden werden [134-137] und sobald Ang I gebildet wird, wird es durch ACE, welches auf dem Bürstensaum proximaler Tubuluszellen sitzt, in Ang II umgewandelt [138]. Das meiste an intrarenalem Ang II wird innerhalb der Niere produziert, da Ang II-Spiegel im Interstitium 1000-fach höher sind als im Plasma [139]. Der Einsatz von Ramipril könnte somit Einfluss auf die Menge an endogen produziertem Ang II in der Niere

Diskussion

besitzen. Im Herzen wird ca. 90% an Ang II allerdings durch das Enzym Chymase gebildet [140], so dass in diesem Gewebe die Hemmung von ACE durch Ramipril nicht den gewünschten Effekt zeigen kann.

Der AT_1 -Rezeptorblocker Candesartan war in der Lage, die durch Ang II verursachten Schäden vollständig zu verhindern. Diese Schäden können somit der Aktivierung des AT_1 -Rezeptors mit der anschließenden Abgabe von ROS zugeschrieben werden, da auch das Antioxidans Tempol sehr effektiv die negativen Effekte der Ang II-Behandlung reduzierte. Tempol gehört zur Gruppe der Nitroxide (=Nitroxylradikale), die für den Metabolismus vieler reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich sind. Tempol entfaltet seine antioxidative Wirkung in der Umsetzung von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 , wobei Tempol in seiner Effektivität mit der natürlichen SOD verglichen werden kann. Tempol wurden aber auch weitere antioxidative Kapazitäten zugeschrieben, insbesondere die Reduktion des Hydroxylradikals, weshalb es als allgemeines Antioxidans anerkannt wird [141]. Welche Rolle Ang II-induziertes $O_2^{\cdot-}$, gebildet durch die NOX-Isoformen, in der Entwicklung von Ang II-abhängigen Blutdruck spielt ist noch unbekannt [123]. An p47phox-knockout-Mäusen und an gp91phox-knockout-Mäusen konnte eine Ang II-Infusion keinen Bluthochdruck auslösen. Auch zeigten die Tiere nicht den gleichen Anstieg an $O_2^{\cdot-}$ -Produktion und vaskulärer Hypertrophie wie Ang II-infundierte Wildtyp-Mäuse [142]. Umgekehrt löste eine NOX 2-Überexpression in Kombination mit einer akuten oder chronischen Ang II-Infusion einen Anstieg des Bluthochdrucks in transgenen Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, hervor [143]. Auf der anderen Seite konnte eine andere Studie zeigen, dass eine Überexpression von vaskulärem p22phox verbunden war mit einem Anstieg an oxidativem Stress und vaskulärer Dysfunktion, obwohl kein signifikanter Anstieg des Blutdrucks gemessen werden konnte [144]. Tempol, als Superoxid-Radikalfänger, wurde ebenfalls in verschiedenen Tiermodellen der Hypertension auf sein Vermögen getestet, den Blutdruck zu senken. Dies wurde ausführlich durch Wilcox und Pearlman [145] untersucht. In den meisten Studien, die hauptsächlich Studien an Ratten einschlossen, führte die Behandlung mit Tempol zu einer Erniedrigung des Blutdrucks. In Mäusen allerdings variieren die Ergebnisse, die mit einer Tempol-Behandlung erzielt wurden. In manchen Studien zeigte Tempol eine deutliche Verhinderung eines Bluthochdrucks [123, 144], während in anderen Studien wie auch in unserer, Tempol den Blutdruck nicht signifikant senken konnte [146, 147]. Es gibt erste Hinweise darauf, dass Tempol, welches so verändert wurde,

Diskussion

dass es zielgerichtet auf die Mitochondrien (mitoTEMPO) wirkt, einen umfangreicheren Effekt auf die Bildung von oxidativem Stress bei Ang II-induziertem Bluthochdruck besitzt als normales Tempol [148].

5.2.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Bindung an bestimmte regulatorische Abschnitte der DNA die Transkription zahlreicher Zielgene beeinflussen kann. Er ist von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort und spielt ebenso in der Regulierung von Entzündungsprozessen eine große Rolle. NF- κ B kontrolliert darüber hinaus Apoptose, Zellteilung und Zelldifferenzierung. Der Transkriptionsfaktor wird durch die unterschiedlichsten Stimuli aktiviert. Dazu gehören proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β), Bakterien, Lipopolysaccharide und ionisierende Strahlung. Aber auch verschiedene Stresssituationen für die Zelle, wie z.B. physikalischer oder oxidativer Stress können eine Aktivierung von NF- κ B auslösen [56, 149]. Während eine normale Aktivierung von NF- κ B erforderlich für das Überleben der Zelle ist, kann eine abweichende Regulierung zur Entwicklung pathologischer Prozesse führen [150]. Normalerweise ist die Aktivierung ein kurzlebiges Ereignis in der Zelle, so dass eine beeinträchtigte Regulierung der NF- κ B-Aktivierung zum Verlust ihrer transienten Natur führt und NF- κ B somit konstitutiv aktiviert bleibt. Dies kann zu einer deregulierten Expression an NF- κ B-kontrollierten Genen, wie etwa einer unkontrollierten Proliferation, anti-apoptotische Regulierung, Metastasierung und Angiogenese führen, was in der Entstehung von Krebs eine kritische Rolle spielen kann [149, 151].

Der Redoxstatus einer Zelle zeigt ebenfalls einen Einfluss auf die NF- κ B-Regulierung. H₂O₂ wird als second messenger betrachtet, der über TNF- α und IL-1 in die Aktivierung von NF- κ B eingebunden sein soll [152]. Verschiedene Studien, die zeigen, dass Antioxidantien wie z.B. N-Acetylcystein eine NF- κ B-Aktivierung verhindert haben, verdeutlichen den Einfluss von ROS auf NF- κ B [153, 154]. NF- κ B reguliert u.a. die Expression von Bfl-1/A1 und Bcl-XL, zwei anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie. Des Weiteren gibt es NF- κ B-abhängige Gene, die anti-apoptotische Funktionen besitzen, zu denen u.a. die Mangan-Superoxiddismutase gehört. Demzufolge wird der NF- κ B-Aktivierung zwar ein schützender Effekt der

Diskussion

einzelnen Zelle im Hinblick auf Apoptose zugesprochen. Dieser stellt aber kein Schutz für den gesamten Organismus dar. [155]. Jedoch wird die NF- κ B-Aktivierung auch in Zusammenhang mit Apoptose und der Aktivierung Apoptose-assoziiierter Gene wie Fas-Ligand und p53 erwähnt [156, 157]. Im Zusammenhang mit oxidativem Stress geben einige Studien zwar Hinweise darauf, dass NF- κ B einen proapoptotischen Effekt auslöst [158, 159], allerdings konnten andere Studien belegen, dass abhängig von der Menge an produziertem ROS die Aktivierung von NF- κ B eine schützende Funktion übernimmt und somit zu einem Überleben der Zelle beitragen kann [160-162]. In Übereinstimmung mit der Aktivierung von NF- κ B durch oxidativen Stress und DNA-Schäden [152, 163], induzierte die Ang II-Behandlung in unserer Studie die Aktivierung von NF- κ B in der Nierenrinde. Eine Ang II-induzierte Aktivierung von NF- κ B durch intrazellulären oxidativen Stress konnte auch *in vitro* gefunden werden. Pueyo *et al* konnten zeigen, dass Ang II die Degradierung der inhibierenden Proteine I κ B α und I κ B β induziert, was zu einer Aktivierung von NF- κ B führte [164]. Eine NF- κ B-Aktivierung in geringem Umfang konnte in unserer Studie auch an Ang II/Hydralazin und Ang II/Ramipril-behandelten Tieren beobachtet werden, während die Behandlung mit Candesartan und Tempol eine NF- κ B-Aktivierung fast vollständig verhinderte. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Kang *et al* [165] überein, die ebenfalls eine erhöhte NF- κ B-p65 mRNA-Expression in Ang II-behandelten Tieren feststellen konnten. Die Intervention mit einem Sartan oder Tempol milderte jedoch eine erhöhte Expression ab. Diese Studie konnte als Folge der NF- κ B-Aktivierung einen weiteren Anstieg an oxidativen Stress ausgelöst durch erhöhte Expression an NADPH-Oxidase-Untereinheit und proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6, feststellen. Diese Effekte wurden durch die Intervention mit einem Sartan und Tempol abgemildert und in Kombination mit einem NF- κ B-Inhibitor auf Normalniveau gesenkt, woraus sich schließen lässt, dass die Interaktion zwischen dem RAAS, NF- κ B und proinflammatorischen Cytokinen zu einem Anstieg an ROS führt [165]. Die Intervention mit Eplerenon führte ebenfalls zu einer leichten Erniedrigung in der Expression von NF- κ B, wodurch die mögliche Beteiligung von Aldosteron in der Aktivierung von NF- κ B gezeigt werden konnte.

Kurzfristig könnte die Aktivierung von NF- κ B ein schützender Effekt gegen oxidativen Stress und DNA-Schäden darstellen, aber eine längerfristige Hochregulierung von

Diskussion

NF- κ B in Kombination mit erhöhten Ang II-Spiegeln könnte zu einem Anstieg an ROS, unkontrollierter Proliferation und einer anit-apoptotischen Regulierung führen. ROS können die Struktur und Funktion von Zellen schädigen und somatische Mutationen und neoplastische Transformationen induzieren [166]. Da oxidativer Stress durch DNA-Mutationen und induzierten DNA-Schäden zu genomischer Instabilität beitragen kann, wird es ebenfalls mit einer Krebsinitiierung in Verbindung gebracht.

5.2.4 Der Transkriptionsfaktor Nrf2

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist ein zellulärer Sensor für oxidativen und elektrophilen Stress, der entweder durch Chemikalien oder durch Strahlung entstanden ist. Er ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der die Expression und koordinierte Induktion von einer Batterie an Abwehrgenen wie detoxifizierenden Enzymen und antioxidativen Proteinen kodiert. Als Antwort auf oxidativen/elektrophilen Stress, wird Nrf2 angeschaltet und durch frühzeitige oder zeitverzögerte Mechanismen wieder ausgeschaltet. Dieses An- und Ausschalten von Nrf2 schützt die Zelle vor Schaden verursacht durch freie Radikale, verhindert Apoptose und fördert so das Überleben der Zelle [47]. Da wir nachweisen konnten, dass durch Ang II die Bildung von oxidativem Stress ausgelöst wird, wurde die mögliche anschließende Aktivierung von Nrf2 untersucht. Die Ang II und auch die Ang II/Hydralazin-behandelten Tiere in unserer Studie zeigten sowohl in der Niere als auch im Herzen eine Aktivierung von Nrf2. Zudem wurde die Nrf2-Aktivierung fast vollständig durch die Behandlung mit Candesartan und Tempol verhindert, was darauf hinweist, dass die durch Ang II-induzierte Bildung von ROS als Ursache für die Nrf2-Aktivierung angesehen werden kann. Die Intervention mit Eplerenon führte, wie schon bei der Untersuchung von NF- κ B beobachtet, zu einer erniedrigten Expression von Nrf2, wodurch die mögliche Beteiligung von Aldosteron in der Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren nicht ausgeschlossen werden kann.

Der initiale Effekt von oxidativem Stress führt zur Expression von Abwehrgenen, was zur Detoxifizierung von ROS führt und zum Überleben der Zelle beiträgt. Die koordinierte Antwort auf oxidativen Stress beinhaltet die Aktivierung von Phase II-Enzymen wie NQO1 und antioxidativen Proteinen wie HO-1 [167, 168]. Wir haben untersucht, ob die Ang II-induzierte Aktivierung von Nrf2 zur Expression von HO-1 führt und konnten in der Niere in Ang II und in Ang II/Hydralazin-behandelten Tieren

Diskussion

eine erhöhte Expression dieses antioxidativen Proteins feststellen. Die Interventionen, die eine Aktivierung von Nrf2 verhindern konnten oder zumindest reduzierten, zeigten eine dementsprechend verringerte Bildung von HO-1. Eine Induktion von HO-1 konnte durch eine Vielzahl an schädlichen Stimuli beobachtet werden einschließlich Bluthochdruck und akutem Nierenschaden, wobei der Induktion eine nutzbringende Wirkung zugesprochen wird [169]. Die schützenden Eigenschaften von HO-1 werden durch verschiedene Faktoren vermittelt. Beim Abbau von Häm, welches selbst pro-oxidative Eigenschaften besitzt, entstehen Biliverdin, Bilirubin, Ferritin und CO. Biliverdin und Bilirubin besitzen anti-oxidative Eigenschaften, während CO vasodilatorische, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften zugesprochen werden. In Nagetiermodellen eines akuten Nierenschadens konnte zudem festgestellt werden, dass eine Induktion an HO-1 hauptsächlich in proximalen Tubuluszellen auftritt [169]. Beobachtungen, die zeigten, dass ein HO-1-Gentransfer Gewebeverletzungen, die durch oxidativen Stress entstanden sind, verbesserten [170] und dass durch oxidativen Stress verursachte zelluläre Verletzungen in HO-1-knockout-Mäusen anstiegen [171], geben Hinweise darauf, dass HO-1 vorteilhaft oxidativem Stress entgegenwirkt. Eine andere Studie, die ebenfalls mit einer Ang II-Infusion arbeitete, konnte einen Anstieg des Proteins HO-1 in der Rattenniere feststellen. Die Zugabe eines HO-1-Induktors verbesserte und die Zugabe eines HO-1-Inhibitors verschlechterte die durch Ang II-induzierte Nierenschädigung [172]. Diese Studien deuten darauf hin, dass HO-1 zu einem protektiven Schutz in der Zelle beiträgt, wobei eine erhöhte Expression auch in Nierenzellkarzinomen gefunden wurde, wo das Protein zum Überleben der Tumorzellen beiträgt [173].

Aus der Untersuchung der beiden Transkriptionsfaktoren Nrf2 und NF- κ B geht hervor, dass Ang II zur Aktivierung von Nrf2 durch verstärkte Bildung von ROS führt. Zur Verteidigung gegen diesen oxidativen Stress konnten wir, Nrf2-vermittelt, eine Induktion antioxidativer Gene, welche als eine erste Abwehreinheit zum Schutz der Zelle beitragen, nachweisen. In vielen Fällen ist dieses zelluläre Abwehrnetzwerk durch den oxidativen Angriff schnell überfordert, was zur Bildung von DNA-Schäden führen kann [33]. Dies trifft mit unseren Ergebnissen überein, da wir zeigen konnten, dass eine Nrf2-Aktivierung nicht ausreichend war, um vor Ang II-induzierten ROS und DNA-Schäden zu schützen. Gleichzeitig konnten wir nachweisen, dass durch die unzureichende Nrf2-vermittelte Abwehrreaktion eine ausreichend große Menge an

Diskussion

oxidativem Stress vorhanden war, um die Aktivierung von NF- κ B auszulösen. Im Zusammenhang mit NF- κ B wäre eine weitere Untersuchung auf proinflammatorische Cytokine interessant.

Die Aktivierung des AT₁-Rezeptors durch Angiotensin II führte zur Hochregulierung der NADPH-Oxidase und dadurch zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in der Niere und im kardiovaskulären Gewebe. Der entstandene oxidative Stress wiederum führte zu histopathologischen Veränderungen und DNA-Schäden. Auch in hypertensiven Patienten konnten in peripheren Lymphozyten strukturelle DNA-Schäden in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen nachgewiesen werden [174]. Die Basenmodifikation 8-OxodG konnte ebenfalls in mononukleären Zellen von Hypertoniepatienten gefunden werden [175]. Die Detektion von Genomschäden und der Basenmodifikation 8-OxodG in der Niere durch Ang II könnte im Zusammenhang mit dem gehäuften Auftreten von Nierenkrebs bei einem aktivierten Renin-Angiotensin-System stehen. Des Weiteren konnte unsere Studie zeigen, dass durch Ang II-induzierten oxidativen Stress die Aktivierung von NF- κ B ausgelöst wurde. Die Aktivierung von NF- κ B trägt zur Produktion von Chemokinen und Cytokinen bei, die zu Entzündung führen und wiederum die Bildung von oxidativem Stress auslösen. Eine längerfristige NF- κ B-Aktivierung durch hohe Ang II-Spiegel kann somit das Überleben und die Proliferation von Zellen, die DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen tragen, fördern. Die beschriebenen Auswirkungen erhöhter Ang II-Spiegel konnten durch die Intervention mit dem AT₁-Rezeptorblocker Candesartan verhindert werden, was die Beteiligung des Rezeptors zeigt. Eine blutdruckunabhängige genomschädigende Wirkung von Ang II konnte leider durch die Intervention mit Hydralazin nicht verdeutlicht werden, da die erwünschte langfristige Blutdrucksenkung ausblieb. Allerdings zeigte die Intervention mit Tempol eine Abnahme von oxidativem Stress und DNA-Schäden trotz Entwicklung eines Bluthochdrucks. Die Bedeutung von ROS in der Bildung von DNA-Schäden und die Unabhängigkeit dieses Schadens vom Blutdruck konnten somit hervorgehoben werden. Die Tatsache, dass die Intervention mit Ramipril den Blutdruck nicht senken konnte, der oxidative Stress und die DNA-Schäden durch mögliche antioxidative Eigenschaften aber vermindert wurden, unterstützt diese Beobachtung. Die Intervention mit Eplerenon führte zu einem gewissen Teil zu einer Verminderung an ROS und DNA-Schäden, brachte diese Parameter aber nicht auf Kontrollniveau.

Diskussion

Somit ist eine Beteiligung von Aldosteron nicht auszuschließen. Dies müsste in weiterführenden Studien überprüft werden.

Wir konnten durch unsere Studien zeigen, dass Ang II zu Schäden beiträgt, die in der Niere und im Herzen während eines Bluthochdrucks entstehen und langfristig zur Entstehung von Krebs führen können. Die Blutdruckunabhängigkeit dieser Schäden und die Möglichkeit, dass Ang II als genomschädigender Faktor auftritt konnte durch die Intervention mit Tempol verdeutlicht werden. Die Bedeutung von AT₁-Blockern in der Behandlung von Bluthochdruck rückt somit in den Vordergrund. Im Vergleich zu anderen antihypertensiven Therapien stellt die Behandlung mit einem Sartan die bestmögliche Therapieoption dar. Diese sollte möglichst frühzeitig eingesetzt werden, um langfristige Schäden, verursacht durch Ang II, vermeiden zu können.

6. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert den Blutdruck und den Wasser- und Elektrolythaushalt des Körpers. Angiotensin II (Ang II), das aktive Peptid des RAAS, bewirkt eine Vasokonstriktion und in höheren Konzentrationen Bluthochdruck. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass eine Verbindung zwischen Hypertonie und dem gehäuften Auftreten von Krebs besteht. Eine Metaanalyse von 13 Fall-Kontroll-Studien konnte einen Zusammenhang zwischen Hypertonie und einem erhöhten Risiko, an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken nachweisen. *In vitro*-Studien und Studien an der isolierten Niere konnten bereits genotoxische Effekte des blutdruckregulierenden Hormons Ang II zeigen. Zielsetzung dieser Arbeit war es, zunächst *in vivo* zu prüfen, ob steigende Ang II-Konzentrationen einen Einfluss auf die genomische Stabilität von Nieren- und Herzzellen besitzen. Hierzu wurden im Dosisversuch männliche C57BL/6-Mäuse mit osmotischen Minipumpen ausgestattet, die Ang II in vier verschiedenen Konzentrationen zwischen 60 ng/kg min und 1 µg/kg min über einen Zeitraum von 28 Tagen abgeben sollten. Während des Versuchszeitraums fanden regelmäßige, nicht-invasive Blutdruckmessungen an der Maus statt.

Die Behandlung mit Ang II führte zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks und zu histopathologischen Veränderungen der Glomeruli und des Tubulussystems, was sich in einer verschlechterten Albumin-Ausscheidung widerspiegelte. Außerdem induzierte die Behandlung mit Ang II die dosisabhängige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, DNA-Doppelstrangbrüchen und oxidativer DNA-Schäden. Diese Parameter waren bereits in Tieren erhöht, die keinen Bluthochdruck entwickelten und stiegen mit der höchsten Ang II-Konzentration noch an, obwohl hier im Vergleich zur Vorgängergruppe, die eine geringere Ang II-Konzentration erhielt, kein höherer Blutdruck vorlag. Diese Beobachtung deutet auf eine mögliche Unabhängigkeit des entstandenen Schadens vom Bluthochdruck hin und lenkt die Aufmerksamkeit auf Ang II als genomschädigenden Faktor.

Der folgende Interventionsversuch sollte Aufschluss über die mögliche blutdruckunabhängige genomschädigende Wirkung von Ang II geben. Dazu wurden C57BL/6-Mäuse neben der Ang II-Behandlung in einer Konzentration von 600 ng/kg min zusätzlich über einen Zeitraum von 28 Tagen mit 5 verschiedenen Substanzen behandelt: Candesartan, Ramipril, Hydralazin, Eplerenon und Tempol. Candesartan ist ein Ang II-Rezeptor-Antagonist, der selektiv den AT₁-Rezeptor blockiert. Ramipril

Zusammenfassung

wirkt als Hemmer des Angiotensin-Konversions-Enzyms und verhindert die Bildung von endogenem Ang II aus Ang I. Hydralazin, als Vasodilatator, greift nicht in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ein. Eplerenon blockiert als selektiver Aldosteronantagonist den Mineralkortikoidrezeptor. Tempol wirkt als Antioxidans.

Die Behandlung mit Ang II in einer Konzentration von 600 ng/kg min im Interventionsversuch führte zur Hochregulierung der NADPH-Oxidase 4 und zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der Niere und im kardiovaskulären Gewebe. Der entstandene oxidative Stress führte wiederum zu DNA-Schäden und einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und NF- κ B. Nrf2-vermittelt wurde die Induktion antioxidativer Gene ausgelöst, was allerdings nicht ausreichend war, um vor Ang II-induzierten ROS und DNA-Schäden zu schützen. Eine längerfristige NF- κ B-Aktivierung durch hohe Ang II-Spiegel kann das Überleben und die Proliferation von Zellen, die DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen tragen, fördern, was eine Tumor-initiiierende Wirkung haben könnte.

Die beschriebenen Effekte erhöhter Ang II-Spiegel konnten durch die Intervention mit dem AT₁-Rezeptorblocker Candesartan verhindert werden, was die Beteiligung des Rezeptors nachweist. Eine blutdruckunabhängige, genom-schädigende Wirkung von Ang II konnte leider durch die Intervention mit Hydralazin nicht verdeutlicht werden, da die erwünschte langfristige Blutdrucksenkung ausblieb. Allerdings zeigte die Intervention mit Tempol eine Abnahme an oxidativem Stress und DNA-Schäden trotz ausbleibender Blutdrucksenkung. Die Bedeutung von ROS in der Bildung von DNA-Schäden und die Unabhängigkeit dieser Schäden vom Blutdruck konnten somit hervorgehoben werden. Die Tatsache, dass die Intervention mit Ramipril den Blutdruck nicht senken konnte, der oxidative Stress und die DNA-Schäden durch mögliche antioxidative Eigenschaften aber vermindert wurden, unterstützt diese Beobachtung. Die Intervention mit Eplerenon führte zum Teil zu einer Verminderung an ROS und DNA-Schäden, brachte diese Parameter aber nicht auf Kontrollniveau zurück. Somit ist eine Beteiligung von Aldosteron nicht auszuschließen.

Ang II trägt zu Schäden bei, die in der Niere und im Herzen während eines Bluthochdrucks entstehen und langfristig zur Entstehung von Krebs führen können. Die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an diesem Schaden und die Blutdruckunabhängigkeit dieses Schadens konnten durch die Intervention mit Tempol verdeutlicht werden. Die Bedeutung von AT₁-Blockern in der Behandlung von Bluthochdruck rückt somit in den Vordergrund. Im Vergleich zu anderen

Zusammenfassung

antihypertensiven Therapien stellt die Behandlung mit einem Sartan die bestmögliche Therapieoption dar. Diese sollte möglichst frühzeitig eingesetzt werden, um langfristige Schäden, verursacht durch Ang II, vermeiden zu können.

7. Summary

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) regulates blood pressure, water balance and electrolyte metabolism. Angiotensin II (Ang II), the reactive peptide of RAAS, causes vasoconstriction and, in higher concentrations, increased blood pressure. Epidemiological studies found an increased cancer incidence in hypertensive patients. A meta-analysis of 13 longitudinal studies revealed a connection between hypertension and a higher risk to develop kidney cancer. *In vitro* studies and studies of the isolated mouse kidney already showed genotoxic effects of Ang II. First, the aim of the study was to investigate *in vivo* the effect of increasing concentrations of Ang II on the genomic stability of kidney and heart cells. Therefore, male C57/BL6 mice were equipped with osmotic mini pumps, delivering Ang II in four different concentrations between 60 ng/kg min and 1 µg/kg min during 28 days. During the 4 weeks blood pressure was measured non-invasively.

Treatment with Ang II raised the blood pressure significantly and led to histopathological changes of glomeruli and tubuli, reflecting an impaired albumin-excretion. Furthermore, the formation of reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks and oxidative DNA damage was induced dose-dependently by Ang II. These parameters were already increased in animals with normal blood pressure and were further increased by the highest Ang II concentration, although blood pressure was not higher than in the precursor group, which received less Ang II. These observations might hint to a possible independency of the Ang II-induced damage from the blood pressure, focusing on Ang II as the genotoxic substance. The following intervention experiment was conducted to investigate the possible blood pressure independent genotoxic effects of Ang II. Besides the treatment with Ang II in a concentration of 600 ng/kg min, C57BL/6 mice were additionally treated with 5 different interventions: candesartan, an AT₁ receptor antagonist, ramipril, a angiotensin-converting-enzyme blocker, hydralazine, a vasodilator, eplerenone, a mineralocorticoid receptor blocker and tempol, an antioxidant. In the intervention experiment, Ang II treatment in a concentration of 600 ng/kg min caused an up-regulation of NOX 4 resulting in the production of ROS in the kidney and heart. The oxidative stress led to the formation of DNA damage and to an activation of the transcription factors Nrf2 and NF-κB. The induction of Nrf2 was accompanied by up-regulation of antioxidative enzymes, which, however, were not able to defend against ROS-production and DNA damage. A long-term activation of NF-κB by high Ang II

Summary

levels can promote the survival and proliferation of cells with DNA damage in form of DNA double strand breaks, probably initiating carcinogenesis.

The AT₁ receptor blocker candesartan could prevent the Ang II-induced damage, demonstrating the involvement of the Ang II receptor. The intervention with hydralazine failed to show a genotoxic effect of Ang II independent of the blood pressure, since a long-term decrease of blood pressure was missing. However, despite of the high blood pressure, the intervention with tempol was able to prevent oxidative stress and DNA-damage. The importance of ROS in the formation of DNA damage and an independency of this damage from the increased blood pressure was shown. The fact that, although not lowering blood pressure, ramipril was able to reduce oxidative stress and DNA damage by possible antioxidative properties, supported this observation. Eplerenone led to slight decrease in ROS and DNA damage showing the possible involvement of aldosterone.

Ang II contributes to damage detected in the kidney and in the heart during high blood pressure, probably initiating cancer. The involvement of ROS for the formation of DNA damage and the independency of this damage from the increased blood pressure was shown by the effects of the antioxidant tempol. We could demonstrate that the importance of an AT₁ receptor antagonist in the treatment of high blood pressure plays a leading role. Compared to other antihypertensive therapies, treatment with a sartan is the best option. Starting at an early stage with this therapy, a long-term damage, induced by Ang II, could be avoided.

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	Varianzanalyse
ARE	Antioxidant-response-element
AT1	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor
Av	Avidin
B	Biotin
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
BER	Basen-Excisions-Reparatur
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adeninmonosphosphat
CO	Kohlenmonoxid
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DFO	Deferoxamin
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
Fe ²⁺	Eisen
γ-H2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	Glutamylcysteinligase
GPx	Glutathionperoxidase
GSI	Glomeruloskleroseindex
GST	Glutathion-S-transferase
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxin-Eosin
HO-1	Hämoxygenase-1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IKK	IKB-Kinase
IP ₃	Inositoltriphosphat
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LC/MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LMP	Low-Melting-Point
M	Mol/l
MAPK	Mitogen-activated Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MSI	Mesangiolyseindex
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase
NaF	Natriumfluorid
NaI	Natriumiodid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
NGAL	Neutrophil-gelatinase-associated-lipocalin
nM	Nanometer
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NO	Stickstoffmonoxid
NQO1	NADPH:chinon-Oxidoreduktase-1
8-Oxo-dG	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
O ₂	Sauerstoff
¹ O ₂	Singulett-sauerstoff
[•] O ₂ ⁻	Superoxid
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
[•] OH	Hydroxylradikal
PADPR	Poly-ADP-Ribose
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PAI-1	Plasminogen-activator-inhibitor 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PARG	Poly-(ADP)-Glucohydrolase
PARP	Poly-(ADP)-Polymerase
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SOD	Superoxiddismutase
SP-1	Slow-Pressor 1
SP-2	Slow-Pressor 2
T	Tyramid
TBS-T	Tris-gepufferte Saline-Tween
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TSI	Tubulointerstitieller Schädigungsindex
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
VSI	Vaskulärer Schädigungsindex

9. Literaturverzeichnis

1. Grossman, E., et al., *Is there an association between hypertension and cancer mortality?* American Journal of Medicine, 2002. **112**(6): p. 479-486.
2. Zandi-Nejad, K., V.A. Luyckx, and B.M. Brenner, *Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming.* Hypertension, 2006. **47**(3): p. 502-8.
3. Colt, J.S., et al., *Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans.* Epidemiology, 2011. **22**(6): p. 797-804.
4. Meyer, P., *Increased intracellular calcium: from hypertension to cancer.* J Hypertens Suppl, 1987. **5**(4): p. S3-4.
5. Hamet, P., *Cancer and hypertension. An unresolved issue.* Hypertension, 1996. **28**(3): p. 321-4.
6. Gago-Dominguez, M., et al., *Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States).* Cancer Causes Control, 2002. **13**(3): p. 287-93.
7. Abedi, H. and I. Zachary, *Signaling Mechanisms in the Regulation of Vascular Cell-Migration.* Cardiovascular Research, 1995. **30**(4): p. 544-556.
8. Hughes, A.D., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle.* Gen Pharmacol, 1996. **27**(7): p. 1079-89.
9. Fryzek, J.P., et al., *A cohort study of antihypertensive treatments and risk of renal cell cancer.* British Journal of Cancer, 2005. **92**(7): p. 1302-1306.
10. Kritchevsky, S.B. and M. Pahor, *Calcium-channel blockers and risk of cancer.* Lancet, 1997. **349**(9062): p. 1400.
11. Coleman, C.I., et al., *Antihypertensive medication and their impact on cancer incidence: a mixed treatment comparison meta-analysis of randomized controlled trials.* J Hypertens, 2008. **26**(4): p. 622-9.
12. Corrao, G., et al., *Hypertension, antihypertensive therapy and renal-cell cancer: a meta-analysis.* Curr Drug Saf, 2007. **2**(2): p. 125-33.
13. Schmieder, R.E., et al., *Renin-angiotensin system and cardiovascular risk.* Lancet, 2007. **369**(9568): p. 1208-19.
14. Ichihara, A., et al., *Renal renin-angiotensin system.* Contrib Nephrol, 2004. **143**: p. 117-30.
15. Atlas, S.A., *The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition.* J Manag Care Pharm, 2007. **13**(8 Suppl B): p. 9-20.
16. MacKenzie, S.M., et al., *Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production.* Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 2002. **3**(4): p. 214-221.
17. Castrop, H., *Angiotensin receptor-associated proteins: local modulators of the renin-angiotensin system.* Pflugers Arch, 2012.
18. Navar, L.G., et al., *Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension.* Hypertension, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 316-22.
19. Zitnay, C. and H.M. Siragy, *Action of angiotensin receptor subtypes on the renal tubules and vasculature: implications for volume homeostasis and atherosclerosis.* Miner Electrolyte Metab, 1998. **24**(6): p. 362-70.
20. Reudelhuber, T.L., *The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005. **14**(2): p. 155-9.

21. Ferrario, C.M., *Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation*. Hypertension, 2006. **47**(3): p. 515-21.
22. Conti, S., P. Cassis, and A. Benigni, *Aging and the Renin-Angiotensin system*. Hypertension, 2012. **60**(4): p. 878-83.
23. Kaschina, E. and T. Unger, *Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function*. Blood Press, 2003. **12**(2): p. 70-88.
24. Ferrario, C.M., *Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2006. **7**(1): p. 3-14.
25. Stanton, A., *Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders*. Am J Cardiovasc Drugs, 2003. **3**(6): p. 389-94.
26. Siragy, H.M., *AT(1) and AT(2) receptors in the kidney: Role in disease and treatment*. American Journal of Kidney Diseases, 2000. **36**(3): p. S4-S9.
27. Schmieder, R.E., *The role of non-haemodynamic factors of the genesis of LVH*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(12): p. 2610-2.
28. Siamopoulos, K.C. and R.G. Kalaitzidis, *Inhibition of the renin-angiotensin system and chronic kidney disease*. Int Urol Nephrol, 2008. **40**(4): p. 1015-25.
29. Mancia, G., et al., *2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. J Hypertens, 2007. **25**(6): p. 1105-87.
30. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 11-34.
31. Montezano, A.C. and R.M. Touyz, *Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies*. Ann Med, 2012. **44** Suppl 1: p. S2-16.
32. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. 0.
33. Kryston, T.B., et al., *Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis*. Mutat Res, 2011. **711**(1-2): p. 193-201.
34. Rajagopalan, S., et al., *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, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
35. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
36. Dikalova, A.E., et al., *Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(3): p. H673-9.
37. Chen, H., Y.S. Song, and P.H. Chan, *Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion*. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2009. **29**(7): p. 1262-1272.
38. Welch, W.J., et al., *Role of extracellular superoxide dismutase in the mouse angiotensin slow pressor response*. Hypertension, 2006. **48**(5): p. 934-41.
39. Paz-Elizur, T., et al., *DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: Potential application for cancer risk assessment and prevention*. Cancer Letters, 2008. **266**(1): p. 60-72.

40. Scovassi, A.I. and M. Diederich, *Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells*. Biochemical Pharmacology, 2004. **68**(6): p. 1041-1047.
41. Nguewa, P.A., et al., *Poly(ADP-Ribose) polymerases: Homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications*. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 2005. **88**(1): p. 143-172.
42. D'Amours, D., et al., *Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions*. Biochem J, 1999. **342 (Pt 2)**: p. 249-68.
43. Durkacz, B.W., et al., *(ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair*. Nature, 1980. **283**(5747): p. 593-6.
44. Shall, S. and G. de Murcia, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?* Mutat Res, 2000. **460**(1): p. 1-15.
45. Oei, S.L. and M. Ziegler, *ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose)*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(30): p. 23234-23239.
46. Breimer, L.H., *Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage*. Mol Carcinog, 1990. **3**(4): p. 188-97.
47. Kaspar, J.W., S.K. Niture, and A.K. Jaiswal, *Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(9): p. 1304-9.
48. Hybertson, B.M., et al., *Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation*. Mol Aspects Med, 2011. **32**(4-6): p. 234-46.
49. Li, H., et al., *Modulation of Nrf2 expression alters high glucose-induced oxidative stress and antioxidant gene expression in mouse mesangial cells*. Cell Signal, 2011. **23**(10): p. 1625-32.
50. Kim, H.J. and N.D. Vaziri, *Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F662-71.
51. Li, W., et al., *Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(11): p. 1485-9.
52. Yoh, K., et al., *Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice*. Genes Cells, 2008. **13**(11): p. 1159-70.
53. Yoh, K., et al., *Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis*. Kidney Int, 2001. **60**(4): p. 1343-53.
54. Gozzelino, R., V. Jeney, and M.P. Soares, *Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 323-54.
55. Babusikova, E., et al., *Exhaled Carbon Monoxide as a New Marker of Respiratory Diseases in Children*. Journal of Physiology and Pharmacology, 2008. **59**: p. 9-17.
56. Li, X. and G.R. Stark, *NFkappaB-dependent signaling pathways*. Exp Hematol, 2002. **30**(4): p. 285-96.
57. Tergaonkar, V., *NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(10): p. 1647-53.
58. Chen, F.E., et al., *Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 410-3.
59. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-kappa B activity*. Annual Review of Immunology, 2000. **18**: p. 621-+.

60. Bowie, A. and L.A. O'Neill, *Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **59**(1): p. 13-23.
61. Schmid, U., et al., *Angiotensin II Induces DNA Damage in the Kidney*. *Cancer Research*, 2008. **68**(22): p. 9239-9246.
62. Schupp, N., et al., *Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2007. **292**(5): p. F1427-F1434.
63. Liao, W., M.A. McNutt, and W.G. Zhu, *The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells*. *Methods*, 2009. **48**(1): p. 46-53.
64. Kruger, N.J., *The Bradford method for protein quantitation*. *Methods Mol Biol*, 1994. **32**: p. 9-15.
65. el Nahas, A.M., et al., *Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring*. *Kidney Int*, 1991. **40**(1): p. 29-34.
66. Veniant, M., et al., *Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats*. *Kidney Int*, 1994. **46**(2): p. 421-9.
67. Schupp, N., et al., *Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats*. *FASEB J*, 2011. **25**(3): p. 968-78.
68. Kawada, N., et al., *A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(12): p. 2860-8.
69. Bonner, W.M., et al., *GammaH2AX and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(12): p. 957-67.
70. Huang, X., et al., *Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis*. *Cell Prolif*, 2005. **38**(4): p. 223-43.
71. Roson, M.I., et al., *Different protective actions of losartan and tempol on the renal inflammatory response to acute sodium overload*. *J Cell Physiol*, 2010. **224**(1): p. 41-8.
72. Billet, S., et al., *Role of angiotensin II AT(1) receptor activation in cardiovascular diseases*. *Kidney International*, 2008. **74**(11): p. 1379-1384.
73. Sachse, A. and G. Wolf, *Angiotensin II-Induced reactive oxygen species and the kidney*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007. **18**(9): p. 2439-2446.
74. Kuwabara, T., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons*. *Kidney Int*, 2009. **75**(3): p. 285-94.
75. Bolignano, D., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage*. *American Journal of Kidney Diseases*, 2008. **52**(3): p. 595-605.
76. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity*. *Am J Nephrol*, 2004. **24**(3): p. 307-15.
77. Mishra, J., et al., *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003. **14**(10): p. 2534-2543.
78. Berger, T., *Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury*. *Proc Natl Acad Sci*, 2006. **103**: p. 1834-1839.
79. Ebihara, K., et al., *Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes*. *Diabetes*, 2001. **50**(6): p. 1440-8.

80. Suganami, T., et al., *Prevention and reversal of renal injury by leptin in a new mouse model of diabetic nephropathy*. FASEB J, 2005. **19**(1): p. 127-9.
81. Brunner, H.I., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus*. Arthritis and Rheumatism, 2006. **54**(8): p. 2577-2584.
82. Ding, H.L., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy*. Clinical Immunology, 2007. **123**(2): p. 227-234.
83. Mori, K., et al., *Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 610-21.
84. Christensen, E.I. and J. Gburek, *Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology*. Pediatr Nephrol, 2004. **19**(7): p. 714-21.
85. Storm, T., *Renal phenotypic investigations of megalin-deficient patients: novel insights into tubular proteinuria and albumin filtration*. Nephrol Dial Transplant, 2012. doi: **10.1093/ndt/gfs462**.
86. Yang, B. and L. Bankir, *Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(5): p. F881-96.
87. Strutz, F. and G.A. Muller, *Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage*. Kidney Blood Press Res, 1999. **22**(1-2): p. 71-80.
88. Garg, J.P. and G.L. Bakris, *Microalbuminuria: marker of vascular dysfunction, risk factor for cardiovascular disease*. Vasc Med, 2002. **7**(1): p. 35-43.
89. Jensen, J.S., et al., *Arterial hypertension, microalbuminuria, and risk of ischemic heart disease*. Hypertension, 2000. **35**(4): p. 898-903.
90. Wachtell, K., et al., *Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study*. Ann Intern Med, 2003. **139**(11): p. 901-6.
91. Wolf, G., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells requires p27Kip1*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 71-81.
92. Wolf, G. and F.N. Ziyadeh, *Renal tubular hypertrophy induced by angiotensin II*. Semin Nephrol, 1997. **17**(5): p. 448-54.
93. Wolf, G., F.N. Ziyadeh, and R.A. Stahl, *Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells*. J Mol Med (Berl), 1999. **77**(7): p. 556-64.
94. Ruiz-Ortega, M., et al., *Proinflammatory actions of angiotensins*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(3): p. 321-9.
95. Gesualdo, L., et al., *Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in proximal tubular epithelial cells*. Kidney Int, 1999. **56**(2): p. 461-70.
96. Wolf, G., S. Mentzel, and K.J. Assmann, *Aminopeptidase A: a key enzyme in the intrarenal degradation of angiotensin II*. Exp Nephrol, 1997. **5**(5): p. 364-9.
97. Mezzano, S.A., M. Ruiz-Ortega, and J. Egido, *Angiotensin II and renal fibrosis*. Hypertension, 2001. **38**(3 Pt 2): p. 635-8.
98. Wolf, G., *Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(6): p. 61-63.
99. Ritz, E. and V. Haxsen, *Angiotensin II and oxidative stress: an unholy alliance*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2985-7.
100. Wolf, G., *Free radical production and angiotensin*. Curr Hypertens Rep, 2000. **2**(2): p. 167-73.

101. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *Redox signaling in hypertension*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 247-58.
102. Zhong, J., et al., *Prevention of angiotensin II-mediated renal oxidative stress, inflammation, and fibrosis by angiotensin-converting enzyme 2*. Hypertension, 2011. **57**(2): p. 314-22.
103. Polichnowski, A., *Renal injury in angiotensin II+L-NAME-induced hypertensive rats is independent of elevated blood pressure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(4): p. F1008-16.
104. Seddon, M., Y.H. Looi, and A.M. Shah, *Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure*. Heart, 2007. **93**(8): p. 903-7.
105. Guzik, T., *Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies*. Drug Discov Today, 2006. **11**(11-12): p. 524-33.
106. Eiberger, W., et al., *Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(6): p. 912-21.
107. Curtis, C.D., D.L. Thorngren, and A.M. Nardulli, *Immunohistochemical analysis of oxidative stress and DNA repair proteins in normal mammary and breast cancer tissues*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 9.
108. Nowsheen, S., et al., *Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues*. Mutat Res, 2009. **674**(1-2): p. 131-6.
109. Oka, K., *DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(3): p. 246-52.
110. Sedelnikova, O.A. and W.M. Bonner, *GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence*. Cell Cycle, 2006. **5**(24): p. 2909-13.
111. Wasco, M.J. and R.T. Pu, *Utility of antiphosphorylated H2AX antibody (gamma-H2AX) in diagnosing metastatic renal cell carcinoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008. **16**(4): p. 349-56.
112. Ohtsubo, T., et al., *Accumulation of 8-oxo-deoxyguanosine in cardiovascular tissues with the development of hypertension*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(6): p. 760-9.
113. Altieri, F., et al., *DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(5): p. 891-937.
114. Poulsen, H.E., *Oxidative DNA modifications*. Exp Toxicol Pathol, 2005. **57 Suppl 1**: p. 161-9.
115. Georgakilas, A.G., *Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge*. Mol Biosyst, 2008. **4**(1): p. 30-5.
116. Negishi, H., et al., *Assessment of in vivo oxidative stress in hypertensive rats and hypertensive subjects in Tanzania, Africa*. Hypertens Res, 2000. **23**(3): p. 285-9.
117. Ishizaki, N., *Liver lipid content is reduced in rat given 7-day administration of angiotensin II*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2011. **12**(4): p. 462-8.
118. Kawarazaki, H., *Mineralcorticoid receptor activation contributes to salt-induced hypertension and renal injury in prepubertal Dahl salt-sensitive rats*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**: p. 2879-2889.
119. Fujimoto, T., *Excretions of urinary albumin and various proteins increase in hypertension*. Blood Press, 2008. **17**: p. 270-273.
120. Fazeli, G., et al., *Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4*. Mutagenesis, 2012. **27**(6): p. 673-81.
121. Martyn, K.D., et al., *Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases*. Cell Signal, 2006. **18**(1): p. 69-82.

122. Sachse, A. and G. Wolf, *Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(9): p. 2439-46.
123. Welch, W.J., *Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction*. Hypertension, 2008. **52**(1): p. 51-6.
124. Nishiyama, A., et al., *The SOD mimetic tempol ameliorates glomerular injury and reduces mitogen-activated protein kinase activity in Dahl salt-sensitive rats*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(2): p. 306-15.
125. Gavazzi, G., et al., *Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice*. FEBS Lett, 2006. **580**(2): p. 497-504.
126. Cave, A., et al., *NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1464): p. 2327-34.
127. Johar, S., et al., *Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1546-8.
128. Queisser, N., et al., *Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-kappaB-activation in kidney tubule cells*. Mol Carcinog, 2011. **50**(2): p. 123-35.
129. Chopra, M., et al., *Antioxidant effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: free radical and oxidant scavenging are sulfhydryl dependent, but lipid peroxidation is inhibited by both sulfhydryl- and nonsulfhydryl-containing ACE inhibitors*. J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **19**(3): p. 330-40.
130. de Cavanagh, E.M., et al., *Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues*. Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 2): p. R514-8.
131. de Cavanagh, E.M., et al., *Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver*. FEBS Lett, 1995. **361**(1): p. 22-4.
132. Anderson, B., et al., *Anti-free radical mechanisms in captopril protection against reperfusion injury in isolated rat hearts*. Can J Cardiol, 1996. **12**(10): p. 1099-104.
133. de Cavanagh, E.M., et al., *Higher levels of antioxidant defenses in enalapril-treated versus non-enalapril-treated hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis, 1999. **34**(3): p. 445-55.
134. Bruneval, P., et al., *Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultrastructural immunohistochemical localization*. Histochemistry, 1986. **85**(1): p. 73-80.
135. Gomez, R.A., et al., *Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney*. Am J Physiol, 1988. **254**(4 Pt 2): p. F582-7.
136. Ingelfinger, J.R., et al., *In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system*. J Clin Invest, 1990. **85**(2): p. 417-23.
137. Yanagawa, N., et al., *Production of angiotensinogen and renin-like activity by rabbit proximal tubular cells in culture*. Kidney Int, 1991. **39**(5): p. 938-41.
138. Sibony, M., *Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme*. Hypertension, 1993. **21**: p. 827-835.
139. Nishiyama, A., *Renal interstitial fluid concentrations of angiotensin I and II in anesthetized rats*. Hypertension, 2002(39): p. 129-134.
140. Balcells, E., et al., *Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations*. Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 2): p. H1769-74.

141. Wilcox, C.S., *Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress*. Pharmacol Ther, 2010. **126**(2): p. 119-45.
142. Rey, F.E., et al., *Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice*. Circ Res, 2001. **89**(5): p. 408-14.
143. Bendall, J.K., et al., *Endothelial Nox2 overexpression potentiates vascular oxidative stress and hemodynamic response to angiotensin II: studies in endothelial-targeted Nox2 transgenic mice*. Circ Res, 2007. **100**(7): p. 1016-25.
144. Dikalova, A., et al., *Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2668-76.
145. Wilcox, C.S. and A. Pearlman, *Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(4): p. 418-69.
146. Ohashi, N., et al., *Role of activated intrarenal reactive oxygen species and renin-angiotensin system in IgA nephropathy model mice*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009. **36**(8): p. 750-5.
147. Yagi, S., et al., *Endothelial nitric oxide synthase-independent protective action of statin against angiotensin II-induced atrial remodeling via reduced oxidant injury*. Hypertension, 2010. **55**(4): p. 918-23.
148. Dikalova, A.E., et al., *Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension*. Circ Res, 2010. **107**(1): p. 106-16.
149. Sethi, G., B. Sung, and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(1): p. 21-31.
150. Aggarwal, B.B., et al., *Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine*. Indian J Exp Biol, 2004. **42**(4): p. 341-53.
151. Naugler, W.E. and M. Karin, *NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 19-26.
152. Reuter, S., *Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**: p. 1603-1616.
153. Nomura, M., et al., *Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF-kappaB activation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate and theaflavins*. Carcinogenesis, 2000. **21**(10): p. 1885-90.
154. Schulze-Osthoff, K., et al., *Oxidative stress and signal transduction*. Int J Vitam Nutr Res, 1997. **67**(5): p. 336-42.
155. Martindale, J.L. and N.J. Holbrook, *Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival*. J Cell Physiol, 2002. **192**(1): p. 1-15.
156. Kasibhatla, S., L. Genestier, and D.R. Green, *Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 987-92.
157. Wu, H. and G. Lozano, *NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress*. J Biol Chem, 1994. **269**(31): p. 20067-74.
158. Aoki, M., *Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of nf-kappab: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells*. Hypertension, 2001. **38**: p. 48-55.
159. Shou, Y., et al., *Cyanide-induced apoptosis involves oxidative-stress-activated NF-kappaB in cortical neurons*. Toxicol Appl Pharmacol, 2000. **164**(2): p. 196-205.
160. Kim, D.K., et al., *NF-kappa B mediates the adaptation of human U937 cells to hydrogen peroxide*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(5): p. 563-71.

161. Yu, Z., et al., *Neuroprotective role for the p50 subunit of NF-kappaB in an experimental model of Huntington's disease*. J Mol Neurosci, 2000. **15**(1): p. 31-44.
162. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
163. Habraken, Y. and J. Piette, *NF-kappaB activation by double-strand breaks*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1132-41.
164. Pueyo, M.E., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 645-51.
165. Kang, Y.M., et al., *Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(3): p. 503-12.
166. Fang, J., T. Seki, and H. Maeda, *Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(4): p. 290-302.
167. Jaiswal, A.K., *Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(10): p. 1199-207.
168. Kobayashi, M. and M. Yamamoto, *Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species*. Adv Enzyme Regul, 2006. **46**: p. 113-40.
169. Jarmi, T. and A. Agarwal, *Heme oxygenase and renal disease*. Curr Hypertens Rep, 2009. **11**(1): p. 56-62.
170. Otterbein, L.E., et al., *Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury*. J Clin Invest, 1999. **103**(7): p. 1047-54.
171. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10925-30.
172. Aizawa, T., *Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of Angiotensin II-induced hypertensive rats*. Hypertension, 2000(35): p. 800-806.
173. Dulak, J., et al., *Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis*. Circulation, 2008. **117**(2): p. 231-41.
174. Gur, M., et al., *DNA damage and oxidative status in newly diagnosed, untreated, dipper and non-dipper hypertensive patients*. Hypertens Res, 2012.
175. Redon, J., et al., *Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension*. Hypertension, 2003. **41**(5): p. 1096-101.

Danksagung

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau PD Dr. Nicole Schupp und Frau Prof. Dr. Helga Stopper für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am Institut für Toxikologie anfertigen zu dürfen. Vielen Dank Nicole für die großartige Betreuung, das immer offene Ohr, die Aufmunterungen und die Geduld beim Korrigieren.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Leane Lehmann aus der Fakultät für Chemie und Pharmazie für die Bereitschaft meine Doktorarbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

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.

Ein großer Dank geht auch an Miriam Kral, die mich vor allem bei der Durchführung der Tierversuche sehr unterstützt hat. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit. Ein besonderes Dankeschön geht auch an Anna Zimnol und Alexandra Gazinski, die mich bei der Auswertung der Experimente unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen vom 2. und 4. Stock der Toxikologie für die schöne Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank geht hierbei an Nina Queisser, die mich auch bei der Ausarbeitung der Dissertation unterstützt hat, Kathrin Happ und Anna Zimnol. Vielen Dank für die schöne Zeit im Labor.

Vielen Dank an die DFG und die GlaxoSmithKline Stiftung für die finanzielle Unterstützung.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung und für Korrekturarbeiten. Auch bei meinem Freund Christoph Moritz bedanke ich mich für seine Geduld und Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 21.12.2012

Susanne Brand