

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. L.C. Rump

**Einfluss der endothelialen und neuronalen NO-Synthase  
auf den renalen Gefäßwiderstand sowie auf die renale  
sympathische Noradrenalinfreisetzung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von

Yvonne Magdalena Kuczka

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Rump

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Willenberg

## **Abstract**

Yvonne Magdalena Kuczka

Einfluss der endothelialen und neuronalen NO-Synthase auf den renalen Gefäßwiderstand sowie auf die renale sympathische Noradrenalinfreisetzung

Zielsetzung: Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) und die dabei verantwortliche NO Synthase Isoform auf Angiotensin (Ang) II induzierte Effekte in der Niere zu untersuchen. Stickstoffmonoxid wird bekanntermaßen von der endothelialen NOS (eNOS) oder der neuronalen NOS (nNOS) gebildet und ist in der Lage Ang II induzierte Effekte auf den renalen Gefäßwiderstand und die renale sympathische Noradrenalin (NA) Freisetzung zu modulieren. Am Modell der isoliert perfundierten Mausniere sollte die in diesem Zusammenhang dominierende NOS Isoform identifiziert und ihre Wirkungen auf die Ang II induzierten Effekte aufgezeigt werden.

Methode: Für die Experimente wurden Nieren von eNOS (-/-) Knockout (KO) oder nNOS (-/-) KO und den entsprechenden (+/+) Wildtyp (WT) Mäusen isoliert und mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Ang II induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven wurden in An- und Abwesenheit von einem unselektiven NOS Inhibitor, N- $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester (L-NAME), und einem selektiven nNOS Inhibitor, 7-Nitroindazole Monosodium Salt (7-NINA), ermittelt. Die endogene NA Freisetzung nach renal nervaler Stimulation (RNS) wurde mittels HPLC gemessen. Die Quantifizierung der eNOS, nNOS und iNOS mRNA in den KO Mausnieren erfolgte mittels Real-Time PCR.

Ergebnis: Es zeigte sich ein erhöhter basaler Nierenperfusionsdruck in den eNOS KO Mausnieren gegenüber allen anderen Mausstämmen. Ang II erhöhte in allen Mausstämmen dosisabhängig den renalen Gefäßwiderstand, wobei die Druckantworten der eNOS KO Mausnieren signifikant stärker waren. Die nNOS KO Tiere zeigten nur für die zwei höchsten Ang II Konzentrationen größere Druckantworten als die WT Kontrollen. L-NAME steigerte die Ang II induzierte Druckantwort in Wildtyp- und nNOS KO Mausnieren, nicht jedoch in den eNOS KO Nieren. Darüber hinaus war 7-NINA in der Lage, die Ang II induzierte Druckantwort in nNOS WT Mausnieren geringfügig zu erhöhen. Des Weiteren führte die Aktivierung von präsynaptischen Ang II-Rezeptoren in allen Mausstämmen zu einer Erhöhung der RNS induzierten NA Freisetzung. L-NAME führte zu einer Senkung der durch Ang II bewirkten NA Freisetzung nach RNS in Wildtyp und nNOS KO, nicht aber in eNOS KO Mausnieren. 7-NINA hingegen war nicht in der Lage die Ang II induzierte NA Freisetzung in nNOS WT zu reduzieren. 8-pCPT-cGMP (8-(4-chlorophenylthio) guanosine 3',5'-cyclicMonophosphate), ein cGMP Analogon, führte zu einem signifikanten Anstieg der RNS induzierten NA Freisetzung. Die relativen mRNA Mengen von eNOS, nNOS und iNOS zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen KO und WT Nieren.

Diskussion: Die Ergebnisse zeigen, dass die eNOS die dominierende Isoform bei der Regulation des renalen Gefäßwiderstandes darstellt, wohingegen die nNOS nur eine geringe Rolle in Bezug auf den renalen Gefäßtonus zu spielen scheint. Der nur geringe Einfluss zeigt sich dadurch, dass man einen zusätzlich vermittelten nNOS-Effekt nicht in der eNOS KO Maus detektieren kann, da L-NAME dort keine zusätzliche Wirkung hat. Des Weiteren wird deutlich, dass in unserem Modell präsynaptisch aktives NO zu einer cGMP vermittelten Steigerung der Ang II induzierten Noradrenalinfreisetzung fähig ist und zudem von der eNOS generiert wird, ohne dass die nNOS daran beteiligt ist. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass NO und Ang II auf post- und präsynaptischer Ebene interagieren und dass dabei die eNOS bei den vorliegenden Regulationsmechanismen als dominierende Isoform in den Vordergrund zu stellen ist. Sie hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die renale sympathische Neurotransmission von Noradrenalin sowie auf den renalen Gefäßwiderstand, wobei letzteres in nur geringem Maße von der nNOS mitbeeinflusst werden kann.

In großer Dankbarkeit Anna Kuczka gewidmet.

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
C57 Bl6	C57 Black <sub>6</sub> Maus Stamm
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclic-Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus"
DHBA	Dihydroxybenzylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurven
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration 50%
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HKG	Housekeeping-Gen
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatographie
Hz	Hertz
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
KCl	Kaliumchlorid

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
L-NAME	N- $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Proben
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaCO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Natriumsulfit
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P <sub>basal</sub>	Basaler Perfusionsdruck
P <sub>max</sub>	Maximaler Perfusionsdruck
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RNS	Renal nervale Stimulation
RT-PCR	Real-Time-Polymerase Chain Reaction
S	Stimulation
SEM	Standart Error of Mean
TGF	Tubuloglomerulärer Feedback Mechanismus
V	Volt
WT	Wildtyp
7-NINA	7-Nitroindazole Monosodium Salt
8-pCPT-cGMP	8-(4-chlorophenylthio) guanosine 3',5'-cyclic monophosphate

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>8</b>
2.1. Versuchstiere und Haltung.....	8
2.2. Isoliert perfundierte Mäusenieren.....	8
2.3. Bestimmung der renalen Druckantwort.....	11
2.3.1. Allgemeiner Versuchsablauf.....	12
2.3.2. Experimente zur Bestimmung der renalen Druckantwortkurven von Ang II mit und ohne L-NAME oder 7-NINA.....	12
2.3.3. Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven.....	13
2.4. Bestimmung des endogenen Neurotransmitters Noradrenalin.....	13
2.4.1. Allgemeiner Versuchsablauf.....	13
2.4.2. Induzierte Noradrenalinfreisetzung durch Ang II mit und ohne L-NAME oder 7-NINA nach RNS.....	14
2.4.3. Probenaufbereitung.....	15
2.4.4. Auswertung der Noradrenalinfreisetzung.....	17
2.5. Genexpressionsanalyse.....	18
2.5.1. RNA Extraktion.....	18
2.5.2. mRNA Quantifizierung.....	18
2.6. Statistik.....	20
2.7. Geräte und Materialien.....	20
2.7.1. Isoliert perfundierte Niere.....	20
2.7.2. Substanzen.....	22
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>23</b>
3.1. Einfluss von Ang II auf den renalen Gefäßwiderstand in An- und Abwesenheit von Agonisten.....	23
3.1.1. Effekte von Ang II in eNOS KO und nNOS KO sowie WT Mäusenieren.....	23
3.1.2. Effekte von L-NAME auf die Ang II induzierte renale Druckantwort in eNOS KO und nNOS KO sowie WT Mäusenieren.....	27
3.1.3. Effekte von 7-NINA auf die Ang II induzierte renale Druckantwort in nNOS WT Mäusenieren.....	30
3.2. Einfluss von Ang II auf die Noradrenalinfreisetzung nach RNS in An- und Abwesenheit von Antagonisten.....	31
3.2.1. Einfluss von Ang II auf die Noradrenalinfreisetzung nach RNS in nNOS WT und KO sowie eNOS WT und KO Mäusenieren.....	31
3.2.2. Effekte von L-NAME und 8-pCPT-cGMP auf die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung in eNOS WT Mäusenieren.....	32
3.2.3. Effekte von L-NAME und 7-NINA auf die Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung nach RNS in nNOS WT und KO Mäusenieren.....	33
3.2.4. Effekte von L-NAME auf die Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung nach RNS in eNOS WT und KO Mäusenieren.....	35
3.3. eNOS, nNOS und iNOS mRNA Expression im Nierengewebe von eNOS und nNOS KO sowie WT Mäusen.....	36

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
4.1. Die Interaktion des RAAS mit NO .....	38
4.2. Die Rolle von NO bei der Ang II induzierten Druckantwort in eNOS und nNOS KO Mäusen .....	40
4.3. Die Effekte von NO auf die Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung in eNOS und nNOS KO Mäusen .....	45
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>54</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>64</b>

## 1. Einleitung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) sowie die Stickstoffmonoxid (NO)/cGMP-Signalkaskade nehmen eine übergeordnete Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie des kardiovaskulären Systems ein und sind essentiell an der Regulation kardiovaskulärer, renaler und endokriner Funktionen beteiligt. Beide Systeme beeinflussen damit entscheidend die Blutdruckregulation und wirken sowohl direkt auf den Gefäßwiderstand als auch auf die Aktivität des sympathischen Nervengewebes. Dabei interagieren Angiotensin II (Ang II), das wichtigste biologisch aktive Peptid des RAAS, und NO auf verschiedenen Ebenen miteinander und haben einen großen Einfluss auf die Entstehung von Hypertonie, Herzinsuffizienz und chronischer Niereninsuffizienz. Es konnte gezeigt werden, dass Ang II zur vermehrten Bildung von NO führt (Ito et al., 1991), die Expression der NO-sensitiven Guanylylcyclase, dem wichtigsten Rezeptor für NO, verändert und somit Einfluss auf die Bildung des second Messengers cGMP (cyclic-Guanosinmonophosphat) ausübt. NO wiederum wirkt als vasodilatative Substanz der Ang II vermittelten Vasokonstriktion entgegen, reguliert dementsprechend die Relaxation der glatten Muskelzellen und moduliert zudem die Ang II vermittelte präsynaptische sympathische Neurotransmitter Freisetzung (Stegbauer et al., 2005). Es wird somit deutlich, dass eine Störung des Gleichgewichts zwischen dem RAAS und der NO/cGMP-Signalkaskade zahlreiche Regulationsmechanismen unterbricht und aus einer gesteigerten RAA Aktivität oder einer reduzierten NO Freisetzung kardiovaskuläre Erkrankungen wie beispielsweise Hypertonie und Arteriosklerose resultieren können.

### *Ang II*

In Folge jeder renalen Durchblutungsminderung wird aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates das proteolytische Enzym Renin freigesetzt. Dieses bildet aus Angiotensinogen (ein zirkulierendes  $\alpha$ -Globulin, das in der Leber gebildet wird) zunächst das Dekapeptid Angiotensin I. Durch Abspaltung zweier Aminosäuren am Carboxyende durch das „Angiotensin Converting Enzyme“ (ACE) entsteht schließlich das aktive Oktapeptid Angiotensin II (Abb. 1).

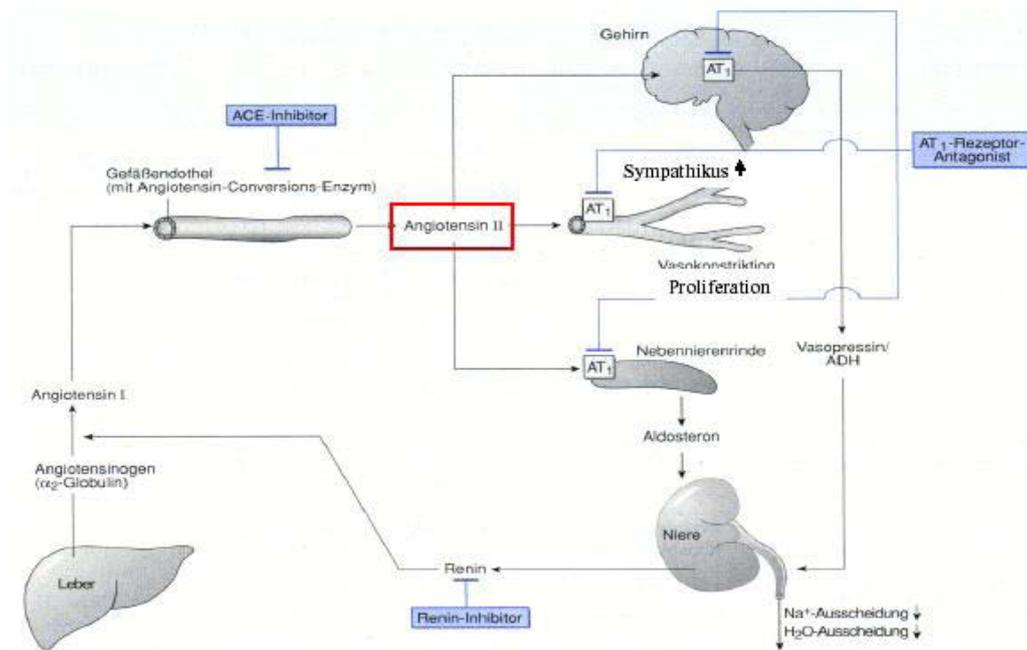


Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Dieses entfaltet seine Wirkung über die Stimulation seiner Rezeptoren, wobei insbesondere  $AT_1$ - und  $AT_2$ -Rezeptoren unterschieden werden können.

Ang II spielt dabei bekanntermaßen eine wesentliche Rolle in der mittel- und langfristigen Regulation des Blutdruckes und vermittelt seine hämodynamischen Effekte  $AT_1$ -Rezeptor-abhängig sowohl als starker Vasokonstriktor direkt an der glatten Gefäßmuskulatur als auch durch Steigerung der Sympathikusaktivität und über die Stimulation der Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde. Aldosteron wiederum fördert die Kalium-Sekretion sowie die tubuläre Rückresorption von Natrium und Wasser, was zur Erhöhung des Blutvolumens führt. Des Weiteren übt Ang II neben einer Steigerung der ADH Ausschüttung und der Stimulation des Durstzentrums vor allem auch entscheidenden Einfluss auf Zellwachstum, Differenzierung und sympathische Neurotransmitter Freisetzung aus. In Nieren von Ratten und Mäusen zeigte sich, dass insbesondere der renale vaskuläre Widerstand und die erhöhte Neurotransmitter Freisetzung über die Aktivierung von post- und präsynaptischen  $AT_1$ -Rezeptoren reguliert werden. Stegbauer et al. konnten

beispielsweise in isoliert perfundierten Rattennieren nachweisen, dass sowohl der renale Gefäßtonus als auch die renale Neurotransmission vornehmlich durch den  $AT_1$ -Rezeptor beeinflusst werden, ohne dass der  $AT_2$ -Rezeptor diesbezüglich modulatorische Wirkungen zeigte (Stegbauer et al., 2005). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit weiteren Studien, in denen man mit Hilfe von renalen Arterien aus Ratten unter  $AT_1$ -Rezeptor Blockade (Thorup et al., 1998) oder anhand von  $AT_2$ -Rezeptor Knockout Mausnieren (Stegbauer et al., 2005) zu denselben Ergebnissen gelangte und die Schlüsselrolle des  $AT_1$ -Rezeptors hinsichtlich dieser Mechanismen bestätigen konnte. Darüber hinaus zeigte sich in unterschiedlichen Tierarten und Geweben, dass ebenfalls die NO-Bildung  $AT_1$ -Rezeptor-abhängig erfolgt und NO dadurch seine entsprechenden Wirkungen auf prä- und postsynaptischer Ebene entfalten kann. So ließ sich in kultivierten glomerulären mesangialen Zellen von Ratten (Schwobel et al., 2000) und in den Macula Densa Zellen von Kaninchen (Liu and Persson, 2004) eine verstärkte NO-Synthese nach der Stimulation von  $AT_1$ -Rezeptoren feststellen. Auch in den Arterien von Ratten und afferenten Arteriolen von Mäusen wurde eine  $AT_1$ -Rezeptor induzierte NO Freisetzung beobachtet, durch welche die Ang II vermittelte Vasokonstriktion reduziert wurde und Ang II somit seine eigene konstriktorische Wirkung ausbalancieren konnte (Boulanger et al., 1995; Patzak et al., 2004).

Daneben spielt auch der  $AT_2$ -Rezeptor, der ebenso pharmakologisch und molekular charakterisiert ist (Ardaillou, 1999; Timmermans et al., 1993), eine wichtige Rolle im RAAS. In der Niere ist er für die Vasokonstriktion der efferenten und afferenten glomerulären Gefäße zuständig, inhibiert die Reninsekretion und beeinflusst die mesangialen Zellen, was zu einem Abfall der Ultrafiltration und der glomerulären Filtrationsrate führt (Ardaillou et al., 1987).

In humanem kardialen Gewebe ließ sich kürzlich auch eine Einwirkung des  $AT_2$ -Rezeptors auf die sympathische Neurotransmission beobachten (El Muayed et al., 2004) und darüber hinaus ein vasodilatatorischer Effekt auf humane koronare Mikroarterien feststellen (Batenburg et al., 2004). Die auch in anderen Geweben darstellbare gefäßerweiternde Wirkung und somit die Inhibition der Ang II induzierten Vasokonstriktion (Carey et al., 2001; Hannan et al., 2003; Siragy and Carey, 1999; Zhang et al., 2003) deutet auf die Funktion als Gegenspieler zum  $AT_1$ -Rezeptor hin (Goodfriend et al., 1996). Der  $AT_2$ -Rezeptor ist dementsprechend in der Lage,  $AT_1$ -Rezeptor induzierten Effekten entgegen zu wirken (Speth et al., 1995; Unger et al.,

1996), einerseits durch eine direkte rezeptorvermittelte Vasodilatation oder andererseits durch eine Steigerung der renalen Bradykinin- und NO-Synthese (Abadir et al., 2003; Gohlke et al., 1998; Hiyoshi et al., 2004). Die Aktivierung des Bradykinin/NO-Systems durch den AT<sub>2</sub>-Rezeptor hat zudem nachweislich einen protektiven Effekt auf die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie, wirkt hemmend auf eine perivaskuläre Fibrosierung im Herzen und verhindert eine vaskuläre und renale Hypersensibilität gegenüber Ang II (Brede et al., 2003; Gross et al., 2004; Kurisu et al., 2003; Siragy et al., 1999).

## NO

Stickstoffmonoxid ist ein labiler endothelialer Faktor, der an der glatten Gefäßmuskulatur als potenter Vasodilatator wirkt und eine wichtige Rolle in der Kontrolle des vaskulären Widerstandes spielt, indem er den hämodynamischen Effekten von Ang II entgegenwirkt (Cervenka et al., 2002). Seit seiner Entdeckung als Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980) und der späteren Identifizierung als NO (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987) konnte eine Vielzahl von Regulationsmechanismen nachgewiesen werden, in die NO involviert ist.

Im kardiovaskulären System reguliert es den Gefäßtonus, die kardiale Kontraktion (Paulus and Shah, 1999), das Zellwachstum (Rikitake et al., 2002), die Thrombozytenaggregation sowie Adhäsion (Azuma et al., 1986) und hat einen schützenden Effekt bei der Entwicklung von Arteriosklerose (Lloyd-Jones and Bloch, 1996).

In der Niere beeinflusst es unter anderem den tubulären Transport (Kovacs et al., 2003; Stoos and Garvin, 1997), den tubuloglomerulären Feedback (TGF) Mechanismus (Ren et al., 2000) und die glomeruläre Mikrozirkulation (Kone and Baylis, 1997). Gebildet wird NO in der Niere bei der Konversion von L-Arginin zu Citrullin durch das Enzym NO-Synthase (NOS), dessen Aktivierung Calcium-abhängig ist und unter dem Einfluss von physikalischen Stimuli wie beispielsweise Scherspannung oder dem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes steht (Moncada et al., 1991; Palmer et al., 1988). Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, führt NO über die Bildung von cGMP zur Aktivierung einer Proteinkinase, wodurch es an der glatten Muskulatur zur Relaxation kommt.

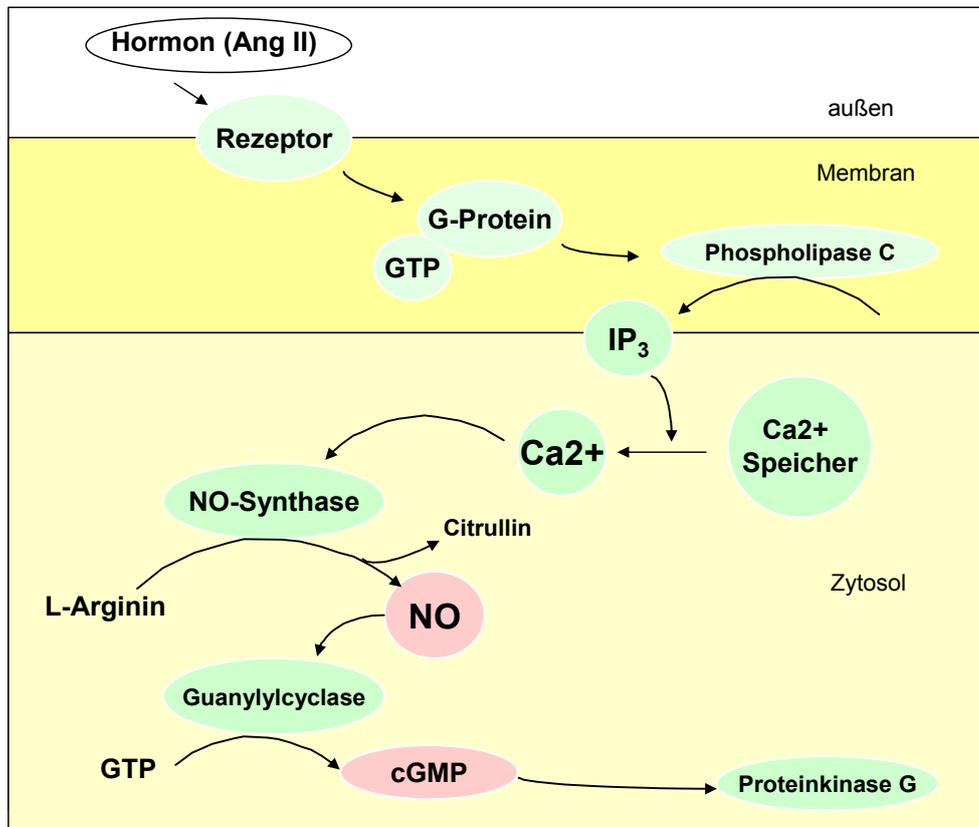


Abb. 2: Dargestellt ist die Signalkaskade zur Stickstoffmonoxid-(NO)-Bildung am Beispiel einer Endothelzelle. Die Rezeptoraktivierung, beispielsweise durch Ang II, löst über die Bindung von GTP die Aktivierung eines G-Proteins aus, welches seinerseits die Phospholipase C aktiviert, durch die Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) gebildet wird. IP<sub>3</sub> setzt Ca<sup>2+</sup> aus seinen intrazellulären Speichern frei. Ca<sup>2+</sup> kann sowohl indirekt über die Bindung an Calmodulin als Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Komplex Proteinkinasen aktivieren als auch direkt die NO-Synthase aktivieren, die in der Folge aus L-Arginin NO freisetzt. NO aktiviert die Guanylylcyclase, die aus GTP zyklisches GMP (cGMP) produziert. cGMP aktiviert Proteinkinasen vom G-Typ (PKG), durch die es an der glatten Gefäßmuskulatur zur Relaxation kommt (Klinke, 1996).

Es können drei Isoformen der NOS unterschieden werden (Bachmann et al., 1995; Mattson and Wu, 2000; Weiss et al., 2001): die endotheliale NOS (eNOS), welche in den Endothelzellen der glatten Gefäßmuskulatur lokalisiert ist, die neuronale NOS (nNOS) in den Macula Densa Zellen und den sympathischen Neuronen sowie die induzierbare NOS (iNOS), wobei letztere keine Rolle in der Niere zu spielen scheint (Ortiz and Garvin, 2003; Thorup et al., 1996).

Der Einfluss von NO auf den Gefäßtonus konnte wie bereits oben erwähnt in isoliert perfundierten Nieren und afferenten Arteriolen von Mäusen und Ratten demonstriert werden, wo lokal produziertes NO der Ang II induzierten erhöhten Vasokonstriktion entgegenwirkt (Ichihara et al., 1998; Patzak et al., 2004; Stegbauer et al., 2005). Des Weiteren zeigte sich anhand von eNOS Knockout Mäusen, dass insbesondere die endotheliale NOS eine überragende Rolle bei der NO-Bildung in afferenten Arteriolen von Mausnieren zu spielen scheint (Patzak et al., 2001), wohingegen Untersuchungen in der Niere fehlen. Des Weiteren ist ebenfalls nicht viel über die Wirkung der neuronalen NOS, die in den Macula Densa Zellen lokalisiert ist, hinsichtlich des renalen Blutflusses bekannt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass auch die nNOS an der Regulation des renalen vaskulären Widerstandes beteiligt ist, indem sie die TGF Sensibilität beeinflusst (Blantz et al., 2002) und der prä- und postglomerulären Vasokonstriktion entgegenwirkt (Cervenka et al., 2001; Cervenka et al., 2002; Ichihara et al., 1998). Darüber hinaus führte die chronische Infusion eines selektiven nNOS Inhibitors zu einem signifikanten Blutdruckanstieg in Ratten (Ollerstam et al., 1997) und erhärtet damit den Verdacht, dass auch die nNOS eine wichtige Stellung bei der Blutdruckregulation einnehmen könnte.

Im Unterschied zu der klaren Erkenntnis, dass NO eine entscheidende Rolle in der Regulation des renalen Blutflusses spielt, gibt es nur unzureichende Informationen über seine Wirkungen bezüglich der Modulation der präsynaptischen Neurotransmitter Freisetzung. Neue experimentelle Daten weisen darauf hin, dass NO auch präsynaptisch modulierende Wirkungen entfalten kann, indem Ang II-induziertes NO die Noradrenalinfreisetzung in Nieren und anderen kardiovaskulären Geweben von Mäusen und Ratten erhöht. Die Studie von Gironacci et al. konnte im Herzvorhof von Ratten verdeutlichen, dass NO in die neuromodulatorische Funktion von Ang II involviert zu sein scheint (Gironacci et al., 1997) und stimmt auf Grund dessen mit der Arbeit von Stegbauer et al. überein, in welcher der fördernde Effekt von NO auf die Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung in isoliert perfundierten Mausnieren nachgewiesen werden konnte (Stegbauer et al., 2005). Des Weiteren gibt es sogar Hinweise darauf, dass möglicherweise insbesondere die eNOS im Gegensatz zu der nNOS für die Erhöhung der Neurotransmitter Freisetzung verantwortlich ist. Diese Beobachtung wurde kürzlich von Tanioka et al. bei Versuchen mit isolierten Rattennieren gemacht (Tanioka et al., 2002), bei denen ein unselektiver NOS Inhibitor, jedoch nicht ein selektiver nNOS Inhibitor die

Noradrenalinfreisetzung unterdrücken konnte. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die neuronale NOS gegebenenfalls nur eine untergeordnete Rolle bei der Bereitstellung von präsynaptisch aktivem NO spielt und unterstreicht als offene Fragestellung die Zielsetzung dieser Arbeit, die hauptverantwortliche Isoform in diesem Zusammenhang zu identifizieren. Weiterhin konnte interessanterweise hingegen in Mesenterialarterien von Ratten ein inhibitorischer Effekt von NO auf die adrenerge Neurotransmission gezeigt werden (Hatanaka et al., 2006), so dass einerseits kontrovers der fördernde beziehungsweise hemmende Einfluss von NO auf die Neurotransmitter Freisetzung diskutiert wird und andererseits insbesondere die Frage nach der verantwortlichen NOS ungeklärt bleibt.

### *Ziele*

Das Ziel dieser Arbeit ist es, am Modell der isoliert perfundierten Mausniere zunächst die vorherrschende NOS, welche von Ang II induziert wird und modulierend auf den Ang II abhängigen renalen vaskulären Widerstand wirkt, festzustellen. Obwohl bei der renalen Blutdruckregulation die eNOS als die dominierende Isoform auf Grund unterschiedlicher Untersuchungen in verschiedenen Organen und Geweben vermutet wird, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, welche Rolle sie speziell in der Niere spielt und inwiefern insbesondere auch die nNOS daran beteiligt ist.

Auch bei der Modulation der sympathischen Neurotransmission gibt es keine einheitliche Meinung über den Einfluss von NO, und es ist nicht bekannt, welche NOS für die Bildung von präsynaptisch aktivem NO verantwortlich ist. Aus diesem Grund soll in dieser Studie weiterhin aufgezeigt werden, ob NO die Fähigkeit besitzt die neuronale Noradrenalinfreisetzung in der Niere zu modulieren, wobei insbesondere die Identifikation der dafür verantwortlichen NOS Gegenstand der Untersuchung ist.

Um die Effekte von eNOS und nNOS näher definieren und differenzieren zu können, wurden die Experimente an Nieren von eNOS (-/-) Knockout (KO) oder nNOS (-/-) KO und den entsprechenden (+/+) Wildtyp (WT) Mäusen durchgeführt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere und Haltung**

Die Versuche wurden mit insgesamt 128 männlichen Mäusen mit einem Körpergewicht von 20 bis 30 g und einem Alter zwischen 8 bis 16 Wochen von vier unterschiedlichen Mausstämmen durchgeführt.

Es wurden einerseits nNOS WT (+/+) sowie nNOS KO (-/-) Mäuse vom Institut für Medizinische Neurobiologie der Otto-von-Guericke Universität in Magdeburg verwendet. Die ursprünglichen Zuchttiere, deren genetischer Hintergrund auf multiplen Rückkreuzungen mit C57BL/6J Mäusen basiert, stammen aus Massachusetts („Cardiovascular Research Center“, General Hospital, Boston, USA). Andererseits wurden eNOS KO (-/-) und eNOS WT (+/+) Mäuse vom „Jackson Laboratory“ aus Bar Harbor (Maine, USA) bezogen. Die Mäuse wurden mittels Genotypisierung kontinuierlich auf ihren genetischen Status überprüft.

Futter (Altromin Standarddiät Maus; Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Die Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend artgerechter, gesundheitlicher und qualitativer Kriterien bezüglich der Richtlinien für die Haltung und Aufzucht von Labortieren (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Institutes of Health, NIH Publikation No. 85-23, 1996).

### **2.2. Isoliert perfundierte Mäusenieren**

Für die Experimente wurden sowohl eNOS KO (-/-) als auch nNOS KO (-/-) und die entsprechenden WT (+/+) Tiere verwendet.

#### *Präparation der Nieren*

Die Mäuse wurden intraperitoneal mit 0,168 mg/g Mausgewicht Ketamin (10%) und 8 µg/g Mausgewicht Xylazin (10%) anästhesiert. Es wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und anschließend mikroskopisch im cranialen Bereich der abdominalen

Aorta eine Schlinge zur späteren Ligatur der Aorta bereit gelegt. Um den venösen Rückfluss von caudal zu unterbinden, wurden der caudale Bereich der abdominalen Aorta sowie die Vena Cava inferior proximal der iliacalen Gefäßbifurkation abgeklemmt. Des Weiteren wurde distal des Abgangs der Arteria (A.) renalis sinister ein Mini-Gefäßclip zur kurzfristigen Unterbrechung des Blutstromes gesetzt. Nun konnte der abdominale Teil der Aorta proximal der Bifurkation mit einem Polyethylenschlauch (Portex, Kent, UK; Innendurchmesser 0,40 mm, Außendurchmesser 0,80 mm) kanüliert werden. Nach Befestigung des Schlauches mit einer Ligatur konnten die Nieren über diesen arteriellen Zugang zur Ausschwemmung des Blutes mit 37°C warmer und mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung in situ perfundiert werden. Diese modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung passierte einen 0,45 µm Filter, bevor sie die Nieren erreichte. Die Perfusion wurde durch eine Pumpe mit einer Perfusionsrate von 7,25 ml/min pro Gramm Niere konstant gehalten, um die Mäusenieren vergleichen zu können. Das Nierengewicht konnte über eine lineare Regression aus dem Verhältnis des Körpergewichtes zum Nierengewicht bestimmt werden.

Die Aorta wurde im Folgenden cranial des Abgangs der rechten A. renalis unterbunden und die linke Vena renalis eröffnet, um einen Abfluss zu schaffen. Nun wurde die Maus unter Eröffnung beider Jugularvenen und Exartikulation im Occipitalgelenk mit Durchtrennung des Rückenmarks euthanasiert. Mit anatomischen Pinzetten konnten dann die Nierenkapseln entfernt und die Nieren von Fettgewebe und Venen befreit werden. Um eine Dichtigkeit der Arteriae renales gewährleisten zu können, mussten die Arteriae suprarenales sowie die A. spermatica sinistra unterbunden und durchtrennt werden. Nach Entfernung der Ureteren und dem Setzen einer Ligatur zwischen den Abgängen der rechten und linken Nierenarterie wurde die rechte Nierenarterie über die Aorta mit einem Polyethylenschlauch (Portex, Kent, UK; Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm) kanüliert und mit einer Ligatur befestigt (Abb. 3). Unter Inzision des Restgewebes konnte somit die rechte Niere aus dem Situs entnommen und in eine beheizte Glaskammer (37°C) gehängt werden.

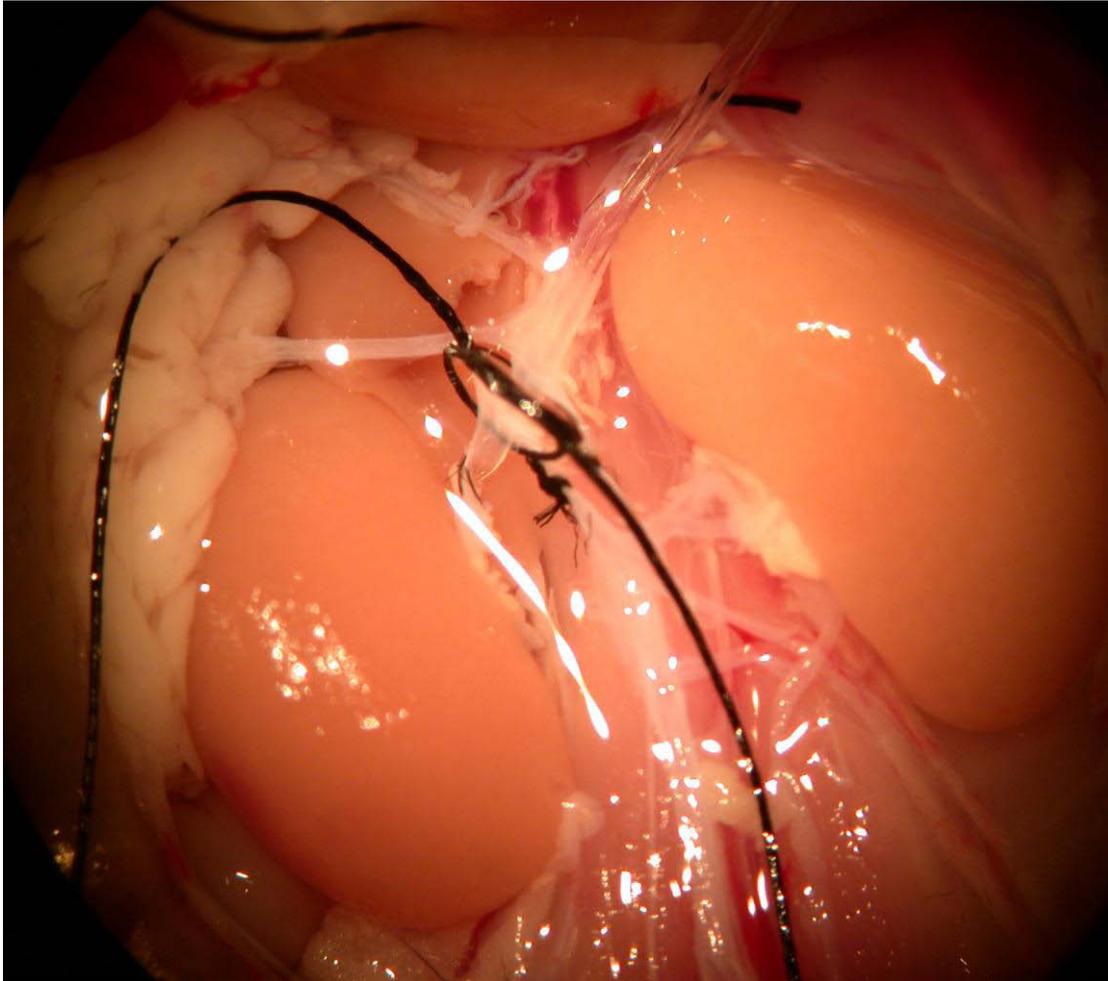


Abb. 3: Kanülierung der A. renalis dexter via Aorta.

Anschließend wurde die linke Nierenarterie über den caudalen Teil der Aorta kanüliert und ebenfalls mit einer Ligatur an dem Polyethylenschlauch fixiert, so dass auch die linke Niere isoliert und in der zweiten Glaskammer platziert werden konnte. Bipolare Platinelektroden wurden zur elektrischen Reizung, die durch einen Stimulator ausgeführt werden konnte, um die Nierenarterien platziert.

Der Perfusionsdruck wurde während des gesamten Experiments mit einem Statham P23 Db Druckaufnehmer, der an einen Watanabe Schreiber angeschlossen war, aufgezeichnet. Dieser Druckaufnehmer wurde in regelmäßigen Abständen mit einem Kalibriergerät geeicht.

Der Versuchsaufbau ist in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt (Abb. 4).

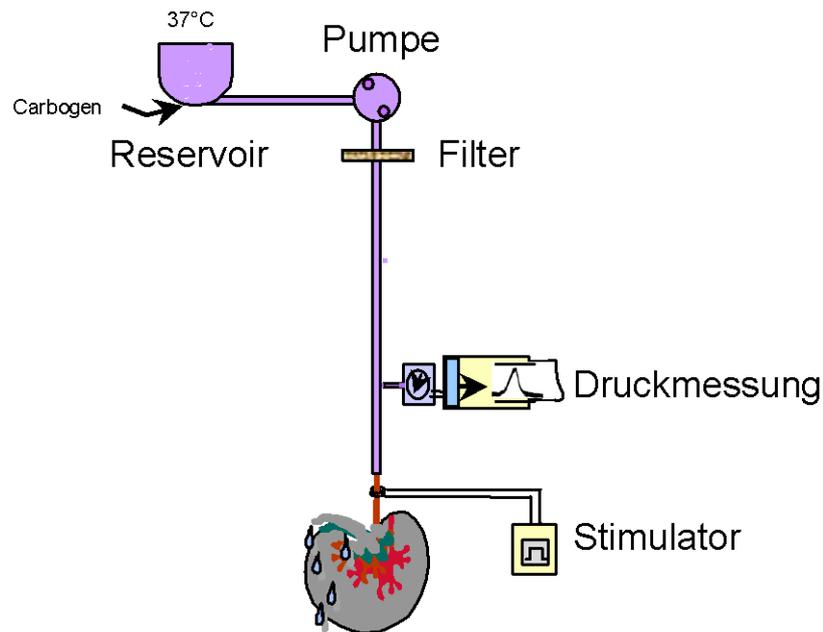


Abb. 4: Versuchsaufbau der isoliert perfundierten Mausniere. Zur elektrischen Stimulation der Nierennerven wurden bipolare Platinelektroden um die Nierenarterien platziert. Die Nieren befanden sich in gewärmten Doppelwandgefäßen und wurden mit einer Rollenpumpe mit erwärmter modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Sie passierte einen 0,45  $\mu\text{m}$  Filter, bevor sie die Niere erreichte. Sowohl Agonisten als auch Antagonisten konnten entweder direkt dem Reservoir zugesetzt oder über eine Pumpe zusätzlich von außen zugeführt werden. Der Perfusionsdruck wurde von einem Schreiber aufgezeichnet. Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau für eine Niere.

### 2.3. Bestimmung der renalen Druckantwort

Am Modell der isoliert perfundierten Mausniere wurde die renale Druckantwort, die durch die Gabe von Angiotensin II in An- und Abwesenheit von dem unselektiven NOS Inhibitor N- $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester (L-NAME) und dem selektiven nNOS Inhibitor 7-Nitroindazole Monosodium Salt (7-NINA) erzeugt wurde, bestimmt. Zur Aufzeichnung wurde ein Statham P23 Db Druckaufnehmer, der an einen Watanabe Schreiber angeschlossen war, verwendet.

### 2.3.1. Allgemeiner Versuchsablauf

Direkt nach Präparation der Nieren wurde zunächst die regelrechte Funktion der Nieren getestet, indem eine Stimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA) durchgeführt wurde. Nach einer Stabilisierungsphase von 10 Minuten wurde dann über eine Perfusionspumpe eine Bolusinjektion von 60 mM Kaliumchlorid (KCl) hinzugefügt, um die maximal mögliche Druckantwort der beiden Nieren zu überprüfen. Anschließend wurde eine Pause von 30 Minuten eingelegt, in denen sich die Nieren stabilisieren konnten, bevor das eigentliche Experiment und die Aufzeichnung der Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) erfolgten.

### 2.3.2. Experimente zur Bestimmung der renalen Druckantwortkurven von Ang II mit und ohne L-NAME oder 7-NINA

Der Agonist Ang II wurde in aufsteigender Konzentration (3 pM – 10 nM) über einen Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) der Perfusionslösung in einer konstanten Rate von 0,158 µl/min beigefügt. Alle 3 Minuten wurde die Dosis erhöht, so dass auf diese Weise eine DWK erstellt werden konnte, die auf dem Schreiber aufgezeichnet wurde. Die Agonistengabe wurde beendet, wenn entweder das Maximum der Druckantwort oder kein Effekt zu sehen war. Nach der DWK folgte eine 30-minütige Erholungs- und Auswaschphase, an die sich eine weitere Ang II DWK anschloss, die nach demselben Prinzip erfasst wurde.

Wenn die DWK's für Ang II in der Anwesenheit von dem unselektiven NOS Inhibitor L-NAME (0,3 mM) oder dem selektiven nNOS Inhibitor 7-NINA (0,3 mM) bestimmt werden sollten, wurden beide Pharmaka jeweils 20 Minuten vor Beginn der folgenden DWK über das Reservoir in die Perfusionslösung hinzugegeben. Die reine Ang II DWK ohne simultanen Einfluss anderer Pharmaka diente als Kontrolle des Experiments und als Referenzwert für die DWK's mit L-NAME beziehungsweise 7-NINA.

### 2.3.3. Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven

Die renale Druckantwort auf exogenes Ang II und andere Wirkstoffe errechnete sich aus dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdruckes über den basalen Perfusionsdruck ( $\Delta P_{\max} = P_{\max} - P_{\text{basal}}$ ). Diese Drücke wurden als Absolutwerte in mmHg angegeben. Der basale Nierenperfusionsdruck entspricht dabei dem Druck, der durch die Perfusion der isolierten Nieren zustande kommt und unter normalen Bedingungen, das heisst ohne das Zutun von Agonisten, in den Nieren vorherrscht. Bei den Experimenten, bei denen die Effekte von Ang II in Anwesenheit von L-NAME oder 7-NINA untersucht wurden, erfolgte die Angabe des maximalen Druckanstiegs des Perfusionsdruckes über den basalen Perfusionsdruck ebenfalls in mmHg. Über die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve für den Agonisten bei An- oder Abwesenheit anderer Pharmaka wurden die jeweiligen  $EC_{50}$ -Werte ermittelt. Der  $EC_{50}$ -Wert entspricht der Konzentration eines Agonisten, bei der eine halbmaximale Wirkung erreicht wird.

## **2.4. Bestimmung des endogenen Neurotransmitters Noradrenalin**

Am Modell der isoliert perfundierten Mausniere wurde die Noradrenalin (NA)-Freisetzung, die durch eine renal nervale elektrische Stimulation (RNS) induziert wurde, bestimmt. Dabei wurde der Einfluss auf die NA Freisetzung von Ang II allein oder unter Mitwirkung von L-NAME oder 7-NINA und von 8-pCPT-cGMP untersucht. Zur Quantifizierung von NA wurde die High-Pressure-Liquid-Chromatographie (HPLC)-ECD verwendet.

### 2.4.1. Allgemeiner Versuchsablauf

Um die regelrechte Funktion der präparierten Nieren zu testen, wurde nach jeder Präparation sofort eine Probestimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA) durchgeführt. Nach einer Pause von 10 Minuten, in der sich die Nieren stabilisieren konnten, wurde hier ebenfalls über einen Perfusor eine Bolusinjektion von 60 mM KCl zur Prüfung der maximalen Druckantwort der Nieren hinzugefügt. Anschließend

wurde 30 Minuten gewartet, damit sich das System stabilisieren konnte. Daraufhin wurden Kokain (10  $\mu$ M) und Kortikosteron (20  $\mu$ M) als Reuptake-Hemmer in die Perfusionslösung hinzugegeben, um die neuronale und extraneuronale Wiederaufnahme von freigesetztem NA zu verhindern. Wenn der Versuch in Anwesenheit von dem unselektiven NOS Inhibitor L-NAME (0,3 mM) oder dem selektiven nNOS Inhibitor 7-NINA (0,3 mM) durchgeführt werden sollte, wurde das entsprechende Pharmakon jeweils 20 Minuten vor Beginn der folgenden DWK über das Reservoir der Perfusionslösung beigelegt. Zu Beginn jedes Versuches wurde eine 3 Minuten Fraktion, der 1000 pg NA zur späteren Kontrolle der Effizienz der Probenaufbereitung zugesetzt wurden, als sogenannte Recovery gesammelt. Anschließend wurde eine 3 Minuten Fraktion als Blank-Wert gesammelt, deren NA Gehalt der spontanen NA Freisetzung entspricht und dem Ausschluss einer erhöhten basalen NA Freisetzung vor RNS dient. Nun wurde damit begonnen das Eluat nach jeder Stimulation zwei mal 3-minütig mit einem Probesammler in Probenkontainern zu sammeln. Insgesamt wurden bei jedem Versuch 5 elektrische Stimulationen ( $S_0 - S_4$ ) mit je 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA) durchgeführt, und zwar 6, 22, 38, 54 und 70 Minuten nach Start der Eluatsammlung.

#### 2.4.2. Induzierte Noradrenalinfreisetzung durch Ang II mit und ohne L-NAME oder 7-NINA nach RNS

Nach der ersten Kontroll-Stimulation  $S_0$  begann man jeweils 5 Minuten vor der nächsten Stimulation ( $S_1, S_2, S_3$  und  $S_4$ ) Ang II in aufsteigender Konzentration (10 pM – 10nM) über einen Perfusor mit einer konstanten Rate von 0,158  $\mu$ l/min direkt in die Perfusionslösung zuzugeben. Auf diese Weise konnten wiederum DWK's erstellt werden, die miteinander verglichen werden konnten. Bei Experimenten, in denen der Einfluss des unselektiven NOS Inhibitors L-NAME (0,3 mM) oder des selektiven nNOS Inhibitors 7-NINA (0,3 mM) auf die Ang II induzierte NA-Freisetzung nach RNS untersucht werden sollte, wurden die Pharmaka jeweils 20 Minuten vor Beginn des Versuches direkt in die Perfusionslösung appliziert. Diese Konzentration blieb für die gesamte Dauer des Experimentes konstant. Das gewonnene NA der Stimulationen  $S_1 - S_4$  wurde als Prozentsatz von  $S_0$  ( $S_n$  als % von  $S_0$ ;  $S_0 = 100\%$ ) errechnet und angegeben. Um einen Effekt der Substanzen selbst ausschließen zu können und

eine Bezugsgröße zu gewinnen, wurden zusätzlich Kontrollversuche ( $S_{\text{Kontrolle}}$ ) mit L-NAME oder 7-NINA sowie eine Kontrollreihe ohne jegliche Pharmaka durchgeführt. Dazu wurden L-NAME beziehungsweise 7-NINA nach der Kontroll-Stimulation  $S_0$  und 20 Minuten vor der Stimulation  $S_1$  zur Perfusionslösung hinzu gegeben. Des Weiteren wurde die Wirkung des cGMP Analogons 8-(4-chlorophenylthio) guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-pCPT-cGMP) in Abwesenheit von Ang II getestet, indem es nach der Kontrollstimulation 16 Minuten vor der zweiten Stimulation über das Reservoir in die Perfusionslösung hinzugegeben wurde. Anschließend konnte die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung unter 8-pCPT-cGMP (0,1 mM) bestimmt werden.

#### 2.4.3. Probenaufbereitung

Um sowohl Reinheit als auch Effizienz der Probenaufbereitung überprüfen zu können, wurden für jedes Experiment zusätzlich zu den gesammelten Fraktionen je eine Probe aufbereitet, die nur Krebs-Henseleit-Lösung (Blank-Wert) beziehungsweise zusätzlich 1000 pg Noradrenalin-HCl (Recovery, Sigma, Germany) enthielt. Außerdem wurde jeder Probencontainer mit 600 pg DHBA (Chromsystems, DHBA, 12 pg/ $\mu\text{l}$ ) als Internen Standard versehen. Zur Noradrenalin Stabilisierung wurde jeder Probenkontainer mit 167  $\mu\text{l}$  HCl (1 M; Merk), 13,3  $\mu\text{l}$  EDTA (0,067 M; Sigma) und 3,3  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (1 M; J.T.Baker, Holland) versetzt und nach dem Aufsammeln des Eluats mit einem Tris-Puffer (1 M, pH 10) auf pH 8,4 eingestellt. Nach Zugabe von 50 mg  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (ClinRep, Recipe, München, Germany) wurden die Proben zur quantitativen Adsorption des Noradrenalins 45 Minuten lang umgeschüttelt und im Anschluss daran bei 4°C und 2000 Umdrehungen/min 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, konnte das an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  adsorbierte Noradrenalin mit 1ml  $\text{H}_2\text{O}$  in mit Mikrofiltern (Glasfaser, Whatman, Maidstone, GB) vorbereitete Glasröhrchen überführt werden. Das  $\text{Al}_2\text{O}_3$  wurde noch zweimal mit jeweils 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend zentrifugiert (bei 4°C jeweils 5 Minuten bei 2450 Umdrehungen/min). Das Noradrenalin wurde letztlich mit zunächst 100  $\mu\text{l}$  und schließlich 150  $\mu\text{l}$  Perchlorsäure (0,1 M) aus dem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gelöst. Von diesen 250  $\mu\text{l}$  wurde ein 125 $\mu\text{l}$  Aliquot auf eine HPLC-Säule computergesteuert injiziert und das darin enthaltene Noradrenalin detektiert. Das HPLC-System besteht

aus einer Pumpe (Waters 600 Controller), einem automatischen Injektor (Waters 717 plus Autosampler), einer Vorsäule (Waters Guard-Pack, Reslove™ C18), einer Säule (WiCom, Prontosil, 120-5-C18 AQ 5,0 µm) und einem Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector). Die mobile Phase wurde vor jedem Probendurchlauf entgast, filtriert und anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min durch das HPLC-System befördert. Sie enthielt NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15 mM; J.T. Baker), Citronensäure (30 mM; Merk), Na<sub>2</sub>EDTA (2 mM; J.T. Baker), (-)Natriumoctylsulfonat (2,77 mM; MP Biomedicals, LLC, Ohio) und Methanol 12% (V/V, J.T.Baker). Der pH-Wert der mobilen Phase wurde mit NaOH (10 M; Merk) auf pH 6,5 eingestellt. Der Noradrenalingehalt des Eluats wurde mit einem Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector) bei einem Arbeitspotential von 0,4 V bestimmt (Abb. 5).

### Prinzipieller Aufbau einer HPLC

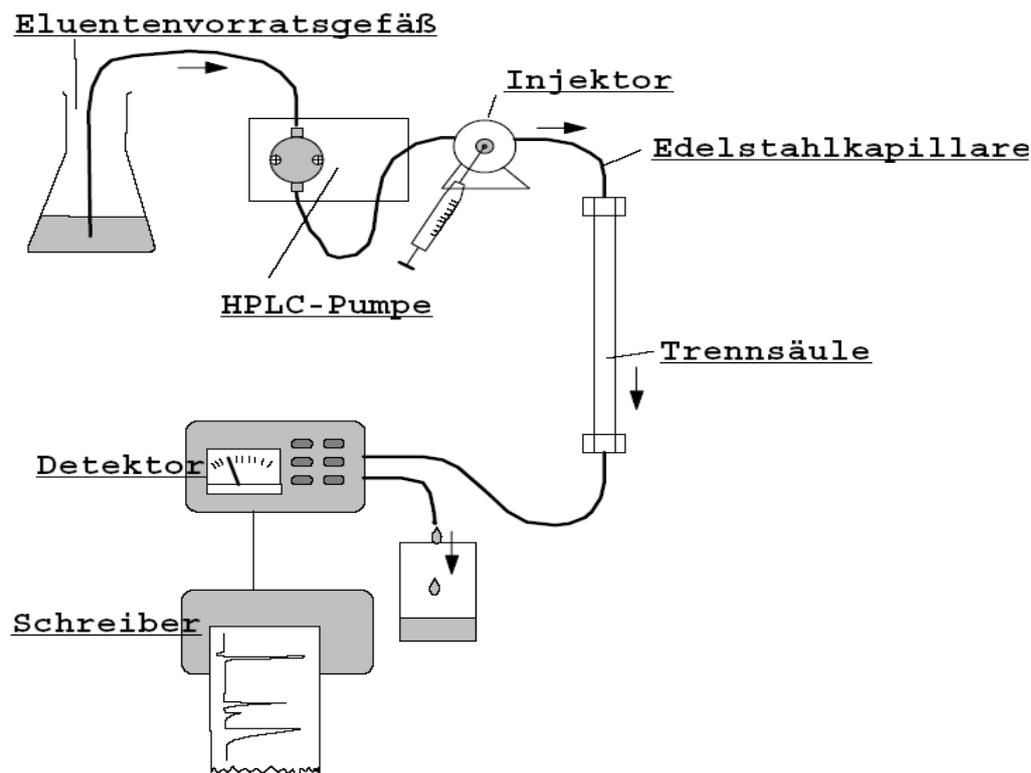


Abb. 5: Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau einer HPLC. Die Mobile Phase wird aus dem Vorratsgefäß über eine Pumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min zu einem Injektor befördert, welcher 125 µl des NA-Aliquots über eine Trennsäule leitet. Die mit einem Detektor gemessene NA Konzentration wird dann mittels eines Schreibers dargestellt.

#### 2.4.4. Auswertung der Noradrenalinfreisetzung

Der Noradrenalingehalt der Proben wurde anhand von Noradrenalin Eichgeraden (0-50-100-250-500-1000 pg NA / 125 µl Perchlorsäure und jeweils 600 pg DHBA / 125 µl Perchlorsäure), die für jeden Probendurchlauf neu erstellt wurden, berechnet und mit den Wiederfindungsraten (Recoveries) des entsprechenden Experiments korrigiert. Die durchschnittliche Recovery von NA betrug 52.6 % ± 9.1 (n=63). Um mögliche Schwankungen durch die Probenaufbereitung auszugleichen, wurde die stimulationsinduzierte NA Freisetzung zusätzlich unter Einbeziehung des Internen Standards pro Probe errechnet.

Die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung errechnete sich aus der Differenz der in den zwei 3-minütigen Fraktionen nach jeder Stimulation gesammelten Menge und der spontanen NA Freisetzung, welche durch den Blank-Wert vor der ersten Stimulation repräsentiert wurde. Diese Differenz stellte einen Index der RNS induzierten NA Freisetzung aus den renalen sympathischen Nervenendigungen dar.

Es kam auf Grund der unterschiedlich großen, tierindividuellen Freisetzung von NA zu erheblichen Schwankungen bei den Noradrenalinabsolutwerten. Um die Werte miteinander vergleichen zu können, mussten sie auf eine interne Kontrolle bezogen werden.  $S_0$  diente deshalb als Kontrollstimulation, wobei die stimulationsinduzierte Noradrenalinfreisetzung in  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  und  $S_4$  auf  $S_0$  bezogen und in Prozent angegeben wurde ( $S_n/S_0 \cdot 100$ ).

Bei den Experimenten, bei denen die Effekte von Ang II in Ab- oder Anwesenheit eines Antagonisten untersucht wurden, wurde die  $S_n/S_0$  Ratio als Prozentangabe von den Werten angegeben, die in den jeweiligen Kontrollversuchen ( $S_{\text{Kontrolle}}$ ) ohne Ang II bestimmt wurden ( $(S_n/S_0) / S_{\text{Kontrolle}} \cdot 100$ ). Diese Kontrollversuche schlossen den unselektiven NOS Inhibitor L-NAME, den selektiven nNOS Inhibitor 7-NINA sowie eine Kontrollreihe ohne jegliche Pharmaka ein. Auf diese Weise konnten substanzabhängige Dosis-Wirkungs-Kurven für die NA Freisetzung nach RNS mit und ohne Ang II ermittelt und miteinander verglichen werden.

## 2.5. Genexpressionsanalyse

### 2.5.1. RNA Extraktion

Zur Gewinnung der RNA wurden Nieren aller Mausgruppen, eNOS WT (n=6), eNOS KO (n=6), nNOS WT (n=6) und nNOS KO (n=5), nach Tötung der Tiere frei präpariert, entfernt und unverzüglich in flüssigem Stickstoff homogenisiert und tiefgefroren. Um die Expression der endothelialen (eNOS), neuronalen (nNOS) und induzierbaren (iNOS) NO-Synthase im Nierenkortex untersuchen zu können, wurde die gesamte RNA der Nieren mit Hilfe eines Extraktions-Kits (Peqlab, Erlangen, Deutschland) isoliert. Für die Isolation der totalen RNA wurden 20 mg des homogenisierten Nierengewebes entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.5.2. mRNA Quantifizierung

Zur quantitativen Auswertung der eNOS, nNOS und iNOS mRNA Mengen wurde die Real-Time PCR Analysemethode durchgeführt. Dabei erfolgt die mRNA-Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Diese Quantifizierung anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen wird am Ende eines Laufs, der aus mehreren Zyklen besteht, in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und übersteigt am sogenannten CT-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") beziehungsweise dem CP-Wert (Crossing Point) erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz.

Für die relative Quantifizierung wurde die RNA des Nierengewebes zunächst mit Trizol-Reagenz isoliert und anschließend mit einem Superscript sowie mit den unspezifischen Primern „Random Hexamers“ (Invitrogen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers revers transkribiert. Diese zur RNA komplementär synthetisierte cDNA diente anschließend als Ausgangsmatrize für die Amplifikation mittels PCR. Die quantitative PCR Analyse wurde dabei mit Hilfe von GeneAmp 5700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zur

Detektion der während der PCR generierten DNA wurde SYBR Green eingesetzt. Die PCR wurde in einem Volumen von insgesamt 25 µl mit 0,4 pmol/µl von jedem Primer und 2 x SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) vollzogen, wobei 2 µl cDNA entsprechend 20 ng RNA als Vorlage genutzt wurden. Die Primer, die mindestens ein Intron überbrücken, wurden für die PCR Amplifikation auf der Basis von bekannten Sequenzen für die NOS in Mäusen designed: eNOS (NM\_008713), eNOSfw: 5'- GTT TGT CTG CGG CGA TGT C -3', eNOSrv: 5'- CAT GCC GCC CTC TGT TG -3', iNOS (NM\_010927), iNOSfw: 5'- GGC AGC CTG TGA GAC CTT TG -3', iNOSrv: 5'- CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG -3', nNOS (NM\_008712), nNOSfw: 5'- TCG GCT GTG CTT TGAT GGA -3', nNOSrv: 5'- TTG AAT CGG ACC TTG TAG CTC TTC -3'. Die Experimente wurden in dreifachem Ansatz durchgeführt.

Um Fehler zu verhindern, die zum Beispiel auf Grund von individuellen Probeneffekten, unterschiedlichen RNA Extraktionseffizienzen oder verschiedenen Ausgangskonzentrationen entstehen können, wurde  $\beta$ -Actin als endogene Kontrolle eingesetzt, da Fehler innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Ziel-Gen und das Kontroll-Gen betreffen. Dieses sogenannte Housekeeping-Gen (HKG) wird ubiquitär und unter verschiedensten experimentellen Bedingungen konstant exprimiert und ermöglicht im Rahmen der *delta*-CT Methode die „Normalisierung“ der Expressionsergebnisse. Dabei wurden für jede untersuchte Probe der CT-Wert des HKG vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ( $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{HKG}}$ ) und die Mittelwerte und Standardabweichungen der  $\Delta\text{CT}$ -Werte einer Versuchsreihe berechnet. Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta\text{CT}$ -Wert der experimentell behandelten Proben der mittlere  $\Delta\text{CT}$ -Wert einer Kontrolle abgezogen ( $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode). Geht man von einer Verdopplung der Kopienzahl pro Zyklus aus, so gilt für den relativen Expressionsunterschied (Ratio=R) einer Probe und der Kontrolle die Formel  $R = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . Bei der graphischen Wiedergabe der Ergebnisse wurde zur Vereinfachung der Darstellung der Kehrwert verwendet, so dass die relative mRNA Menge als  $1/\Delta\text{CT}$  auf der Ordinate aufgetragen wurde. Die Überprüfung der Signifikanz erfolgte anhand des ungepaarten t-Tests, wobei das Signifikanzniveau auf  $p < 0.05$  festgelegt wurde.

## 2.6. Statistik

Alle Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel mit Standardfehler ( $\pm$  Standard Error of Mean, SEM) angegeben. Die Anzahl der Experimente pro Gruppe wurde mit n aufgeführt, wobei jede Zahl für eine einzelne Niere steht. Die Effekte der Pharmaka wurden gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen mit Hilfe des ungepaarten t-Tests nach Student auf Signifikanz geprüft. Bei ungleichen Kontrollen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei beiden Testverfahren auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 2.7. Geräte und Materialien

### 2.7.1. Isoliert perfundierte Niere

#### *Operationsbesteck:*

Mosquitoklemme (Martin, gebogen und gerade, 12,5cm)

Mini-Gefässclip (nach Biemer, 9mm, Martin)

Feine Schere (gerade, 11,5 cm, Martin)

Strabismus-Federschere (gerade und gebogen, 11,5 und 11 cm, Martin)

Anatomische Pinzette, Mini-Adson, (12 cm, Martin)

Anatomische Pinzette (fein, gebogen, 10,5 cm, Martin)

Nahtmaterial (Seide, 1 EP, Serag Wiessner)

Mikroskop (Olympus SD 30, Japan)

#### *Anlage der isoliert perfundierten Niere:*

Doppelwand-Glasbehälter als Reservoir

(Reservoir Jacketed for Buffer, HSE)

Doppelwand-Glasbehälter zur Erwärmung der Nieren

(Schuler Tissue Vessel jacketed, HSE)

Wärmebad mit Pumpe

(Umwälzthermostat DC10-P5/U, Roth)

Perfusionspumpen

(Harvard Pump 11Plus Dual Syringe, HSE und Braun, Melsungen, BRD)  
Statham P23 Db Druckaufnehmer  
(Gould Inc., Oxnard, Kalifornien, USA)  
Planetengetriebenen Pumpe  
(Abimed, Gilson, Minipuls2, Langenfeld, BRD)  
Bipolare Platinelektrode  
(Eigenanfertigung der Feinmechanischen Werkstatt der Ruhr-Universität-  
Bochum)  
Stimulator  
(Typ 21512, HSE, Electronics, March, BRD)  
Watanabe Schreiber  
(Graphtec Corp., Tokyo, Japan)  
Kalibriergerät  
(KAL84, Erwin Halstrup Multur GmbH, Kirchzarten, BRD)  
Filter  
(0,45 µm, Millex-AA, Millipore, F)  
Probensammler  
(LKB, Bromma, Schweden)

*Krebs-Henseleit-Lösung:*

NaCl (Merck, Darmstadt, BRD) 118;  
KCl (Merck) 4,7;  
CaCl<sub>2</sub> (Merck) 2,5;  
MgSO<sub>4</sub> (Merck) 0,45;  
NaCO<sub>3</sub> (Merck) 25;  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) 1,03;  
D (+) Glucose (Merck) 11,1;  
L(+) Ascorbinsäure (Riedel-de-Haen, Selze, BRD)  
Na<sub>2</sub>EDTA (Merck) 0,067.

Die Lösungen hatten einen pH zwischen 7,38 und 7,41 und wurden bei einer Temperatur von 37°C mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) kontinuierlich begast.

### 2.7.2. Substanzen

Angiotensin II (Sigma-Aldrich)

Ethanol (Riedel-de-Haen, Selze, BRD)

Ketamin (10%, cp-Pharma)

Kokain HCl (Merk, Darmstadt, Deutschland)

Kortikosteron (Sigma-Aldrich)

L-NAME (Sigma-Aldrich)

Xylazin (10%, Ceva)

7-NINA (BioTrend)

8-pCPT-cGMP (BioLog)

Ketamin und Xylazin dienten als intraperitoneales Anästhetikum.

Alle anderen Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und anschließend mit Krebs-Henseleit-Lösung verdünnt, ausgenommen Kortikosteron (in Ethanol 100%), 7-NINA (in DMSO) und 8-pCPT-cGMP (in DMSO).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einfluss von Ang II auf den renalen Gefäßwiderstand in An- und Abwesenheit von Agonisten

##### 3.1.1. Effekte von Ang II in eNOS KO und nNOS KO sowie WT Mäusen

Die Effekte von Ang II auf die renale vaskuläre Druckantwort wurden am Modell der isoliert perfundierten Mausnieren untersucht. In allen Experimenten wurde der Agonist Ang II in aufsteigender Konzentration (3 pM – 10 nM) der Perfusionslösung zugegeben, so dass vergleichbare Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) bestimmt wurden, aus denen die jeweiligen  $EC_{50}$ -Werte errechnet werden konnten. Zu Beginn jedes Experimentes wurde zudem eine Kontrollstimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA) durchgeführt und die maximal mögliche Druckantwort der Nieren durch eine Bolusinjektion von 60 mM Kaliumchlorid getestet. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied der maximalen Druckantworten der eNOS KO (eNOS KO:  $168,09 \pm 25$  mmHg) gegenüber denen der nNOS KO (nNOS KO:  $132,7 \pm 19$  mmHg) sowie der WT Mäusen (eNOS WT:  $142,05 \pm 24$  mmHg; nNOS WT:  $140,42 \pm 23$  mmHg), (Abb. 6).

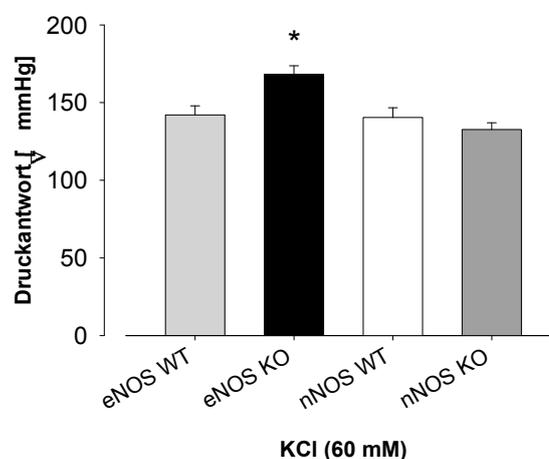


Abb. 6: Die Abbildung zeigt die renale Druckantwort nach Gabe von KCl (60 mM) in den isoliert perfundierten Mausnieren von eNOS WT (n=17), eNOS KO (n=21), nNOS WT (n=13) und nNOS KO (n=20) Mäusen. Die Druckantworten errechneten sich aus dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdruckes über den basalen Perfusionsdruck ( $\Delta P_{\max} = P_{\max} - P_{\text{basal}}$ ) und werden hier als Absolutwerte in mmHg angegeben. \* Zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den maximalen Druckantworten der eNOS KO Mausnieren im Vergleich zu den nNOS KO sowie WT Mausnieren (ungepaarter t-Test nach Student,  $P < 0,05$ ).

Auch die Messung des basalen Nierendruckes, welcher durch die Perfusion der isolierten Nieren zustande kam, zeigte bereits ohne Zugabe eines Agonisten einen signifikanten Unterschied zwischen den eNOS KO Mausnieren und den nNOS KO sowie Kontroll Mäusen. Die durchschnittlich ermittelten basalen Nierendruckwerte lagen für die eNOS KO Mäuse bei  $77,4 \pm 18$  mmHg und waren damit signifikant höher als die der anderen Mausstämme (eNOS WT:  $34,23 \pm 16$  mmHg; nNOS WT:  $29,38 \pm 9$  mmHg; nNOS KO:  $42,5 \pm 19$  mmHg). Der basale Nierenperfusionsdruck der nNOS KO Mäuse zeigte dabei auch eine Signifikanz gegenüber dem nNOS Wildtyp (Abb. 7).

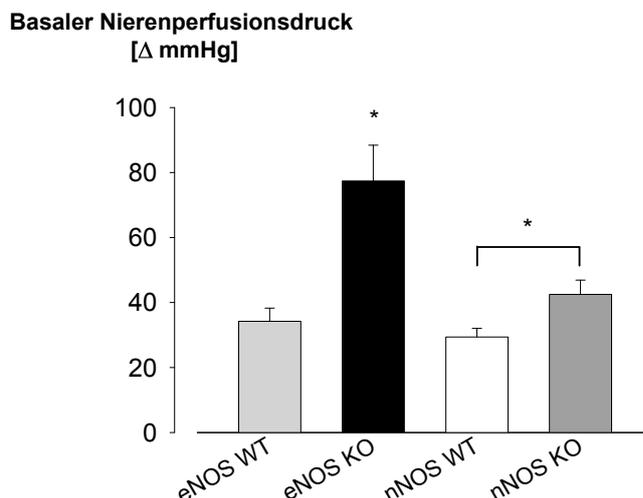


Abb. 7: Aufgeführt ist der durchschnittliche basale Nierendruck ( $\Delta P_{\text{basal}}$ ), der durch die Perfusion der isolierten Nieren zustande kommt und in den Nieren unter einem konstanten Perfusionsfluss von 7,25 ml/min pro Gramm Niere vorherrscht. Er errechnet sich aus dem gemessenen Druckabfall des Perfusionsdruckes ( $P_{\min}$ ) unter den basalen Perfusionsdruck ( $P_{\text{basal}}$ ) bei Abkopplung der Nieren ( $\Delta P_{\text{basal}} = P_{\text{basal}} - P_{\min}$ ) und wird in mmHg angegeben. \* Zeigt einen signifikanten Unterschied des

basalen Nierenperfusionen zwischen den eNOS KO Mäusen (n=21) in Bezug auf die eNOS WT (n=17), nNOS WT (n=13) sowie nNOS KO (n=20) Nieren (ungepaarter t-Test nach Student,  $P < 0,05$ ).

Bei der Erstellung der DWK's mit Ang II entsprechend der Versuchsanordnung konnte festgestellt werden, dass Ang II dosisabhängig (3 pM – 10 nM) den renalen vaskulären Widerstand sowohl in den eNOS und nNOS KO als auch in den WT Mäusen signifikant erhöhte. Um die unterschiedliche Beeinflussung des renalen Gefäßwiderstandes durch den Agonisten ermitteln zu können, wurden die Absolutwerte in mmHg zwischen den unterschiedlichen Mausstämmen verglichen.

Bei Betrachtung der DWK's der eNOS KO und WT Mäusen ließ sich deutlich eine signifikante Linksverschiebung der DWK der eNOS KO Nieren gegenüber der DWK der eNOS WT Nieren feststellen (Abb. 8). Die Ang II induzierten maximalen Druckantworten waren bei den eNOS KO Mäusen signifikant größer als die der eNOS WT Nieren (Maximale Ang II induzierte Druckantwort: eNOS KO:  $176 \pm 10$  mmHg; eNOS WT:  $116 \pm 7$  mmHg), und die aus den DWK's ermittelten  $EC_{50}$ -Werte für die eNOS KO Mäusen dementsprechend kleiner ( $EC_{50}$ -Werte: eNOS KO:  $0,5 \pm 0,1$  nM; eNOS WT:  $5 \pm 0,3$  nM).

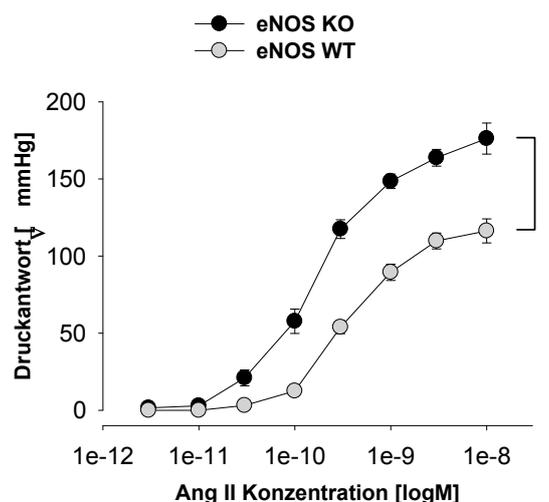


Abb. 8: Die Abbildung zeigt den Unterschied der DWK's von Ang II bezüglich der Auswirkung auf den renalen Gefäßwiderstand in der isoliert perfundierten Mausniere zwischen eNOS KO (n=21) und eNOS WT (n=25) Mäusen auf. Ang II wurde in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung zugegeben, bis ein Maximum der Druckantwort oder keine Wirkung zu sehen war. Die Effekte von

Ang II wurden als Absolutwerte in mmHg gemessen. \* Zeigt eine signifikant größere maximale Druckantwort der eNOS KO Nieren gegenüber der Kontrolle (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

Im Gegensatz dazu ließ sich zwischen den  $EC_{50}$ -Werten der nNOS KO und nNOS WT Mauseieren kein Unterschied nachweisen ( $EC_{50}$ -Werte: nNOS KO:  $5 \pm 0,1$  nM; nNOS WT:  $6 \pm 0,2$  nM). Allerdings waren die Druckantworten für die zwei höchsten Ang II Konzentrationen (3 nM und 10 nM) signifikant größer in den nNOS KO Mauseieren (Ang II: 3 nM,  $124 \pm 9$  mmHg; 10 nM,  $138 \pm 5$  mmHg) als in den nNOS WT Nieren (Ang II: 3 nM,  $105 \pm 6$  mmHg; 10 nM,  $111 \pm 6$  mmHg) (Abb. 9).

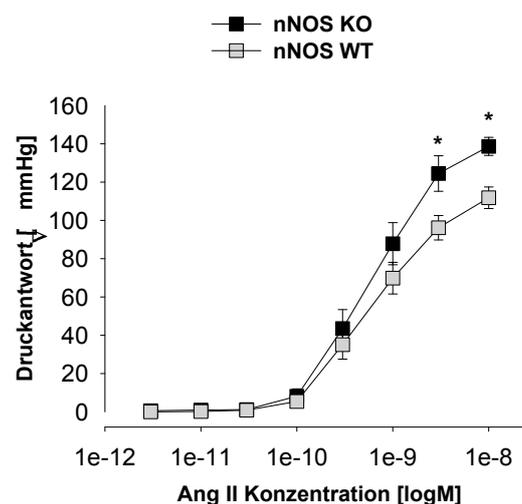


Abb. 9: Die Abbildung zeigt die von Ang II induzierten DWK's in isoliert perfundierten Mauseieren von nNOS KO (n=12) und nNOS WT (n=12) Mäusen. Die Effekte von Ang II wurden als Absolutwerte in mmHg gemessen. Nur die zwei höchsten Ang II Konzentrationen (3 nM und 10 nM) führten zu signifikant höheren Druckantworten (\*) in den nNOS KO Mauseieren gegenüber denen der nNOS WT Nieren (ungepaarter t-Test nach Student,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

Beim Vergleich aller Mausstämmen miteinander zeigte sich anhand der Absolutwerte in mmHg, dass sich beide WT Kontrollstämmen in ihren Druckantworten nicht signifikant unterscheiden. Die Ang II induzierte DWK der eNOS KO Mauseieren war deutlich nach links verschoben gegenüber allen anderen DWK's, und Ang II zeigte

auch bei den höchsten Ang II Konzentrationen (3 nM und 10 nM) noch eine höhere Potenz von Ang II in den eNOS KO im Vergleich zu den nNOS KO Nieren (Abb. 10).

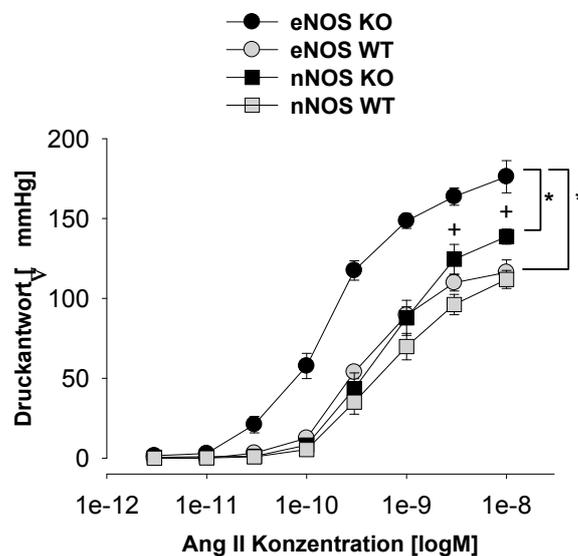


Abb. 10: Die Abbildung zeigt den Einfluss von Ang II auf den renalen Gefäßwiderstand in isoliert perfundierten Mausnieren von eNOS KO (n=21), eNOS WT (n=25), nNOS KO (n=12) und nNOS WT (n=12) Mäusen auf. Die Ang II induzierten Druckantworten wurden als Absolutwerte in mmHg gemessen. Die DWK's beider WT Mausstämmen zeigen keinen signifikanten Unterschied. Die Druckantworten der nNOS KO Nieren sind nur für die zwei höchsten Ang II Konzentrationen (3 nM und 10 nM) signifikant höher (+) als die der nNOS WT Nieren. \* Zeigt eine Signifikanz der DWK der eNOS KO Mausnieren gegenüber allen anderen Mausstämmen (ungepaarter t-Test nach Student,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 3.1.2. Effekte von L-NAME auf die Ang II induzierte renale Druckantwort in eNOS KO und nNOS KO sowie WT Mausnieren

Um zu untersuchen, welchen Effekt die Hemmung aller NOS Isoformen auf den renalen Gefäßwiderstand hat, wurde N- $\omega$ -Nitro-L-Arginin Methyl Ester (L-NAME), ein in der Literatur beschriebener unselektiver NOS Inhibitor, eingesetzt. Zunächst wurden die vasoaktiven Eigenschaften von L-NAME alleine überprüft und schließlich die Interaktion mit Ang II getestet. Dabei wurde L-NAME in einer Konzentration von 0,3 mM 20 Minuten vor Beginn einer folgenden DWK über die Dauer des gesamten Versuches der Perfusionslösung hinzugegeben. Es zeigte sich in allen Mausstämmen, dass L-NAME alleine keine Veränderung der Druckantwort bewirkt.

Daraufhin wurde der Effekt von L-NAME in Anwesenheit von Ang II untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Ang II induzierte Druckantwort in Anwesenheit von L-NAME (0,3 mM) in den eNOS WT, nNOS WT und nNOS KO Mäusen (Abb. 11 A-C).

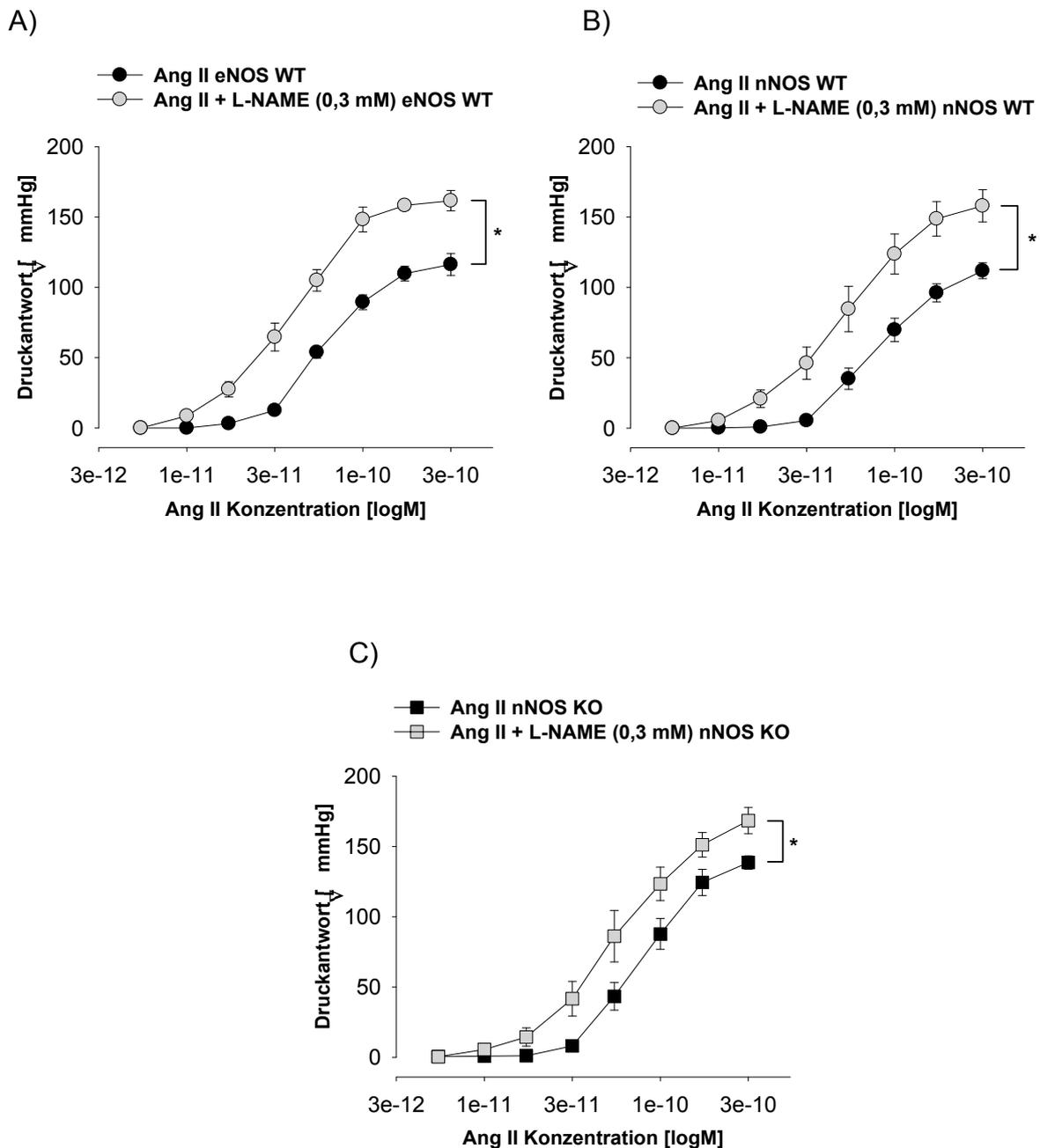


Abb. 11 A-C: Die Abbildungen zeigen den Einfluss von L-NAME (0,3 mM) auf die von Ang II induzierten renalen Druckantworten in isoliert perfundierten Mäusen von eNOS WT (A; Ang II n=25; Ang II + L-NAME n=7), nNOS WT (B; Ang II n=12; Ang II + L-NAME n=11) und nNOS KO (C; Ang II n=12; Ang II + L-NAME n=8) Mäusen auf. L-NAME wurde jeweils 20 Minuten vor Beginn der

Messung einer Ang II DWK über das Reservoir in die Perfusionslösung hinzugegeben. L-NAME alleine zeigte keinen Effekt auf den renalen Gefäßwiderstand. \* Zeigt eine signifikante Linksverschiebung der DWK's von Ang II in den eNOS WT sowie nNOS WT und nNOS KO Mäusen durch L-NAME (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

Demgegenüber zeigte L-NAME in den Nieren von eNOS KO Mäusen keinen Effekt auf die Ang II induzierte renale Druckantwort (Abb. 12).

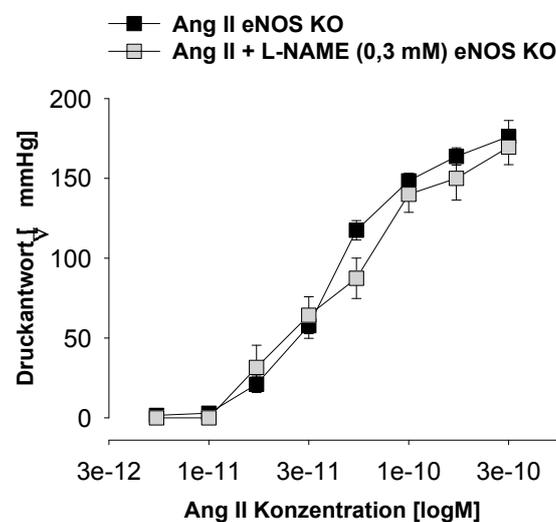


Abb. 12: Die Abbildung zeigt den Einfluss von L-NAME (0,3 mM) auf die DWK von Ang II in isoliert perfundierten Mäusen von eNOS KO Mäusen (Ang II n=21; Ang II + L-NAME n=8). L-NAME wurde 20 Minuten vor Beginn der Messung einer Ang II DWK in die Perfusionslösung hinzugegeben. Es zeigt sich kein signifikanter Effekt von L-NAME gegenüber der DWK von Ang II (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

Beim Vergleich der Absolutzahlen zeigte sich zudem, dass die maximalen Druckantworten auf die Gabe von Ang II in Anwesenheit von L-NAME bei den nNOS WT, nNOS KO sowie eNOS WT Mäusen denen von eNOS KO ohne L-NAME entsprechen (Maximale Ang II induzierte Druckantwort in Anwesenheit von L-NAME: nNOS WT:  $139,5 \pm 26$  mmHg; nNOS KO:  $178,5 \pm 25$  mmHg; eNOS WT:  $161,6 \pm 12$  mmHg; Maximale Ang II induzierte Druckantwort in Abwesenheit von L-NAME: eNOS KO:  $176 \pm 10$  mmHg).

### 3.1.3. Effekte von 7-NINA auf die Ang II induzierte renale Druckantwort in nNOS WT Mäusen

Um zu untersuchen, ob auch die selektive Hemmung der neuronalen NOS einen Effekt auf den renalen Gefäßwiderstand hat, wurde 7-Nitroindazole Monosodium Salt (7-NINA), ein in der Literatur beschriebener selektiver nNOS Inhibitor, eingesetzt. Dazu wurde 7-NINA in einer Konzentration von 0,3 mM 20 Minuten vor Beginn einer folgenden Ang II DWK über die Dauer des gesamten Versuches der Perfusionslösung hinzugegeben. Es zeigte sich anhand von Versuchen mit nNOS WT Mäusen, dass 7-NINA wie L-NAME ohne die Zugabe eines Agonisten keine vasoaktiven Eigenschaften besitzt. In Anwesenheit von Ang II zeigte sich jedoch auch hier eine geringfügige Steigerung der Ang II induzierten renalen Druckantwort in den Nieren von nNOS WT Mäusen. Es kam also zu einem signifikanten Shift der Ang II vermittelten DWK nach links (Abb. 13).

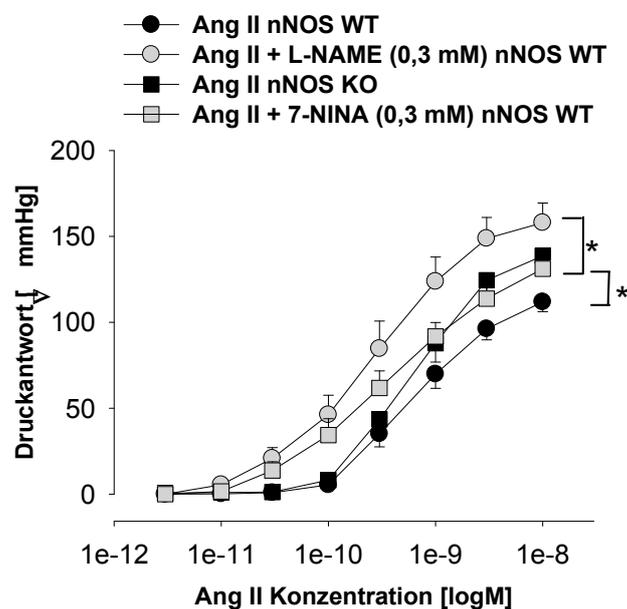


Abb. 13: Die Abbildung zeigt den Einfluss von 7-NINA (0,3 mM) auf die von Ang II induzierte renale Druckantwort in isoliert perfundierten Mäusen von nNOS WT (Ang II n=12; Ang II + 7-NINA n=10) Mäusen. 7-NINA wurde jeweils 20 Minuten vor Beginn der Messung einer Ang II DWK über das Reservoir in die Perfusionslösung hinzugegeben. 7-NINA verschob die DWK von Ang II in den nNOS WT Mäusen signifikant nach links (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM. \* Zeigt eine signifikante Linksverschiebung der DWK's von Ang II in den nNOS WT Mäusen durch 7-NINA und L-NAME (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Bei Betrachtung der Absolutwerte zeigt sich außerdem, dass die Werte für die zwei höchsten Ang II Konzentrationen (3 nM und 10 nM) in den nNOS KO Mäusen (Ang II: 3 nM,  $124 \pm 9$  mmHg; 10 nM,  $138 \pm 5$  mmHg) denen der mit 7-NINA vorbehandelten nNOS WT entsprechen (Ang II: 3 nM,  $114 \pm 10$  mmHg; 10 nM,  $131 \pm 6$  mmHg). Beim Vergleich der maximalen Drucksteigerungen durch L-NAME beziehungsweise 7-NINA in den nNOS WT Mäusen erkennt man weiterhin, dass 7-NINA weniger potent wirkt als L-NAME.

### **3.2. Einfluss von Ang II auf die Noradrenalinfreisetzung nach RNS in An- und Abwesenheit von Antagonisten**

#### 3.2.1. Einfluss von Ang II auf die Noradrenalinfreisetzung nach RNS in nNOS WT und KO sowie eNOS WT und KO Mäusen

Um die präsynaptischen Effekte des endothelial und neuronal produzierten NO zu untersuchen, wurde die Noradrenalinfreisetzung nach renal nervaler Stimulation (RNS) mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA) in Anwesenheit von Kokain (10  $\mu$ M) und Kortikosteron (20  $\mu$ M) gemessen. Dabei wurde zunächst Ang II in aufsteigender Konzentration (10 pM – 10nM) jeweils 5 Minuten vor der nächsten Stimulation in die Perfusionslösung gegeben, so dass wiederum vergleichbare DWK's bestimmt werden konnten. Dabei bezog sich die NA Freisetzung der Stimulationen  $S_1 - S_4$  immer auf die Kontrollstimulation  $S_0$  und wurde als % Kontrolle angegeben. Es zeigte sich, dass Ang II die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung sowohl in den eNOS und nNOS WT als auch in den eNOS und nNOS KO Mäusen erhöhte. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied in der maximalen Noradrenalinfreisetzung nach RNS zwischen den verschiedenen Mausstämmen (Abb. 14).

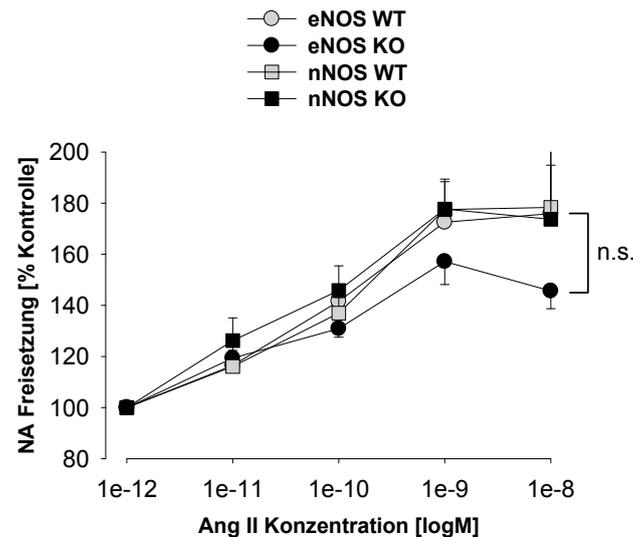


Abb. 14: Die Abbildung zeigt die DWK's der Ang II induzierten Noradrenalinfreisetzung nach renal nervaler Stimulation (RNS) mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40 mA) in isoliert perfundierten Nieren von eNOS WT (n=10), eNOS KO (n=10), nNOS WT (n=7) und nNOS KO (n=7) Mäusen. Ang II wurde in aufsteigender Konzentration 5 Minuten vor der nächsten Stimulation der Perfusionslösung zugegeben. Die Noradrenalinfreisetzung bezieht sich immer auf die Kontrollstimulation und wird in % Kontrolle angegeben. In allen Mausstämmen erhöhte Ang II dosisabhängig die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung, ohne dass dabei ein signifikanter Unterschied zu sehen war (n.s. = nicht signifikant, ANOVA,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 3.2.2. Effekte von L-NAME und 8-pCPT-cGMP auf die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung in eNOS WT Mausnieren

Auf Grund der Annahme, dass die Hemmung der NO Produktion zu einer Reduktion der Ang II induzierten Noradrenalinfreisetzung führt, sollte zunächst überprüft werden, ob es im Gegenzug auch möglich ist, die Noradrenalinfreisetzung in diesem Modell durch die Zugabe eines NO Donors direkt zu stimulieren. Um diesen Effekt zu demonstrieren, wurde das in der Literatur als gut membrangängig beschriebene cGMP Analogon 8-(4-chlorophenylthio) guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-pCPT-cGMP) (0,1 mM) eingesetzt. Es wurde 16 Minuten vor der Stimulation direkt in die Perfusionslösung appliziert und führte in eNOS WT Mausnieren im Vergleich zur Kontrolle zu einem geringen aber signifikanten Anstieg der RNS induzierten Noradrenalinfreisetzung (8-pCPT-cGMP:  $129,3 \pm 37,1$  % Kontrolle), ( $p < 0,045$ ) (Abb. 15).

Um darüber hinaus auszuschließen, dass L-NAME (0,3 mM) selbst einen Einfluss auf die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung hat, wurde die NA Freisetzung nach RNS sowohl mit als auch ohne L-NAME vor der Zugabe von Ang II getestet. In den Nieren von eNOS WT Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll-Stimulation (Kontrolle:  $99,78 \pm 15,04$ ) und der Stimulation in Anwesenheit von L-NAME (Kontrolle mit L-NAME:  $100,04 \pm 20,15$ ) (Abb. 15).

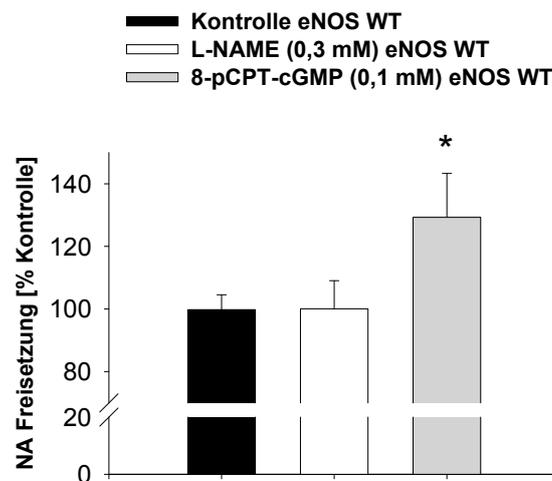


Abb. 15: Die Abbildung zeigt den Einfluss von L-NAME (0,3 mM) und 8-pCPT-cGMP (0,1 mM) auf die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung in isoliert perfundierten Mausnieren von eNOS WT Mäusen. Nach der Kontrollstimulation wurde L-NAME 20 Minuten oder 8-pCPT-cGMP 16 Minuten jeweils vor der zweiten Stimulation über das Reservoir in die Perfusionslösung hinzugegeben. Die RNS induzierte Noradrenalinfreisetzung bezieht sich immer auf die Kontrollstimulation  $S_0$  und wird als % Kontrolle ( $S_n$  als % von  $S_0$ ) angegeben. L-NAME (n=5) zeigte dabei keinen signifikanten Effekt auf die NA Freisetzung, wohingegen 8-pCPT-cGMP (n=7) signifikant die NA Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (n=10) erhöhte (\*ANOVA,  $P < 0,05$ ).

### 3.2.3. Effekte von L-NAME und 7-NINA auf die Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung nach RNS in nNOS WT und KO Mausnieren

Um nun herauszufinden, inwiefern NO die präsynaptische Neurotransmitter Freisetzung moduliert und durch welche NOS dieser Einfluss zustande kommt, wurden auch hier Versuche mit dem unselektiven NOS Inhibitor L-NAME und dem

selektiven nNOS Inhibitor 7-NINA durchgeführt. Die Pharmaka wurden dazu jeweils 20 Minuten vor Messung der DWK direkt in die Perfusionslösung appliziert.

Es zeigte sich, dass die Ang II vermittelte RNS abhängige Noradrenalinfreisetzung durch L-NAME (0,3 mM) in den Nieren von nNOS WT und nNOS KO Mäusen signifikant reduziert war (Abb. 16A, 16B). 7-NINA (0,3 mM) hingegen war durch die selektive Hemmung der neuronalen NOS nicht in der Lage, die Ang II induzierte NA Freisetzung zu beeinflussen, wie sich am Beispiel der nNOS WT Mausnieren feststellen ließ (Abb. 16A).

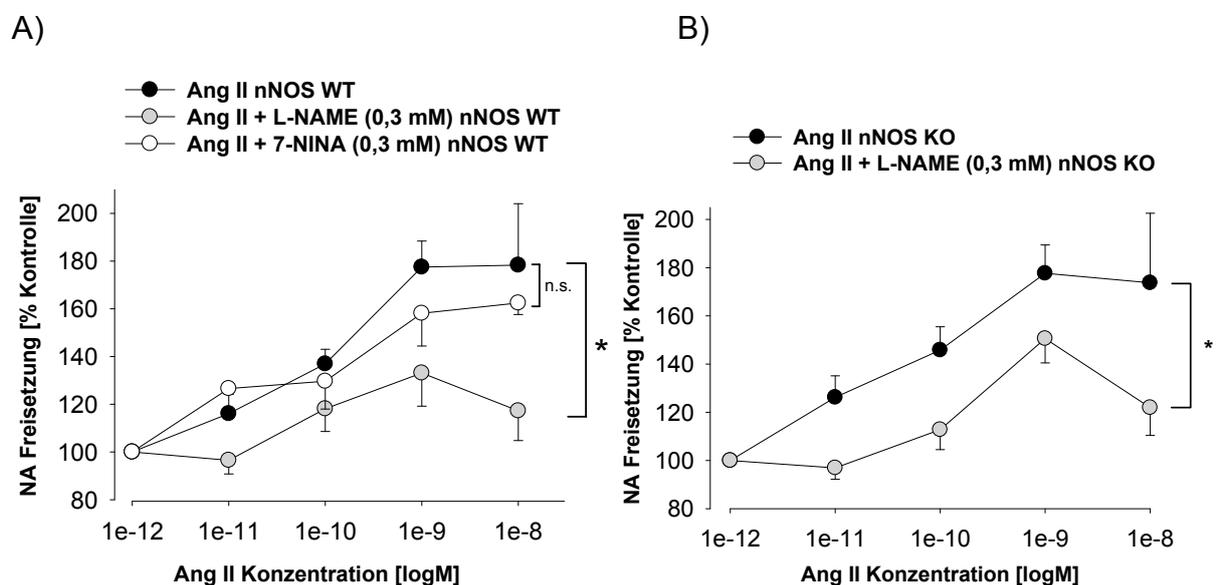
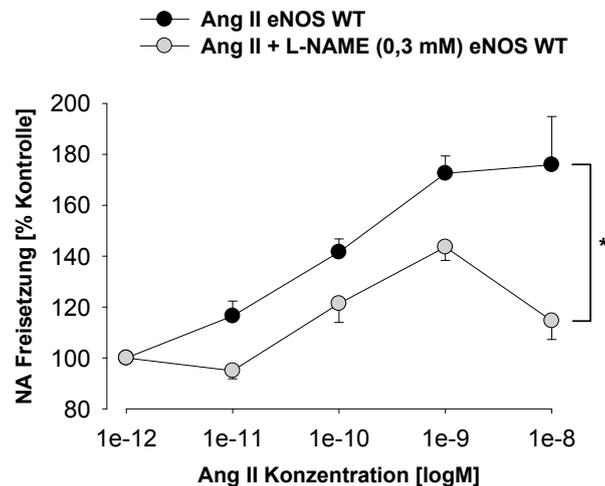


Abb. 16 A, B: Die Abbildungen zeigen den Einfluss von L-NAME (0,3 mM) und 7-NINA (0,3 mM) auf die Ang II induzierten DWK's der RNS vermittelten Noradrenalinfreisetzung in der isoliert perfundierten Mausniere von nNOS WT (A; AngII n=7; AngII + L-NAME n=7; AngII + 7-NINA n=4) und nNOS KO (B; AngII n=7; AngII + L-NAME n=7) Mäusen. L-NAME oder 7-NINA wurden jeweils 20 Minuten vor Beginn der Messung einer Ang II DWK über das Reservoir in die Perfusionslösung hinzugegeben. Ang II wurde in aufsteigender Konzentration je 5 Minuten vor der nächsten Stimulation der Perfusionslösung zugegeben. Die Noradrenalinfreisetzung bezieht sich immer auf die Kontrollstimulation  $S_0$  und wird als % Kontrolle ( $S_n$  als % von  $S_0$ ) angegeben. \* Zeigt einen signifikanten Effekt von L-NAME (0,3 mM) auf die Ang II induzierte NA Freisetzung nach RNS in nNOS WT (A) und nNOS KO (B) Mausnieren (ANOVA,  $P < 0,05$ ). 7-NINA (0,3 mM) hat keinen signifikanten Einfluss auf die Ang II vermittelte Neurotransmitter Freisetzung (A) in nNOS WT Mausnieren (n.s. = nicht signifikant, ANOVA,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 3.2.4. Effekte von L-NAME auf die Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung nach RNS in eNOS WT und KO Mäusen

In den Nieren von eNOS WT und eNOS KO Mäusen zeigte sich in demselben Versuchsaufbau ebenfalls eine Ang II abhängige Steigerung der RNS induzierten NA Freisetzung. Während die unselektive Hemmung aller NOS Isoformen mit Hilfe von L-NAME in den eNOS WT Mausnieren ebenfalls zu einer Reduktion der Ang II vermittelten NA Freisetzung führte, zeigte L-NAME in den eNOS KO Mausnieren keinen signifikanten Effekt (Abb. 17A, 17B).

A)



B)

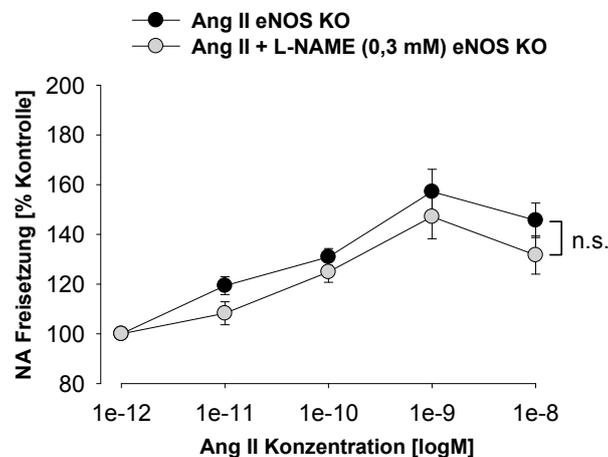


Abb. 17 A, B: Die Abbildungen zeigen den Einfluss von L-NAME (0,3 mM) auf die Ang II induzierten DWK's der RNS vermittelten Noradrenalinfreisetzung in der isoliert perfundierten Mausniere von eNOS WT (A; AngII n=10; AngII + L-NAME n=9) und eNOS KO (B; AngII n=10; AngII + L-NAME n=11) Mäusen. L-NAME wurde 20 Minuten vor Beginn der Messung einer Ang II DWK über das Reservoir in die Perfusionslösung hinzugegeben. Ang II wurde in aufsteigender Konzentration je 5 Minuten vor der nächsten Stimulation der Perfusionslösung zugegeben. Die Noradrenalinfreisetzung bezieht sich immer auf die Kontrollstimulation  $S_0$  und wird als % Kontrolle ( $S_n$  als % von  $S_0$ ) angegeben. \* Zeigt einen signifikanten Effekt von L-NAME (0,3 mM) auf die Ang II induzierte NA Freisetzung nach RNS nur in eNOS WT (A), jedoch nicht in eNOS KO (B) Mausnieren (n.s. = nicht signifikant, ANOVA,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

### **3.3. eNOS, nNOS und iNOS mRNA Expression im Nierengewebe von eNOS und nNOS KO sowie WT Mäusen**

Für die Untersuchung der Expression der einzelnen NOS Isoformen in den unterschiedlichen Mausstämmen wurde die Real-Time PCR Analysemethode eingesetzt. Es sollte überprüft werden, ob das Ausschalten der jeweiligen Isoform in den Knockout Mausnieren zu einer adaptiven Hochregulation der anderen Isoformen führt und dementsprechend Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse haben könnte. Um eine derartige kompensatorische Überexpression eines Gens auszuschließen, wurden die relativen mRNA Mengen von eNOS, nNOS und iNOS im Nierengewebe der KO Mäuse in Relation zum Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin anhand der *delta*-CT Methode bestimmt. Dabei zeigte sich sowohl in den eNOS KO als auch in den nNOS KO Mausnieren kein signifikanter Unterschied der zu testenden relativen mRNA Mengen im Vergleich zu den Wildtypen (Abb. 18A, 18B).

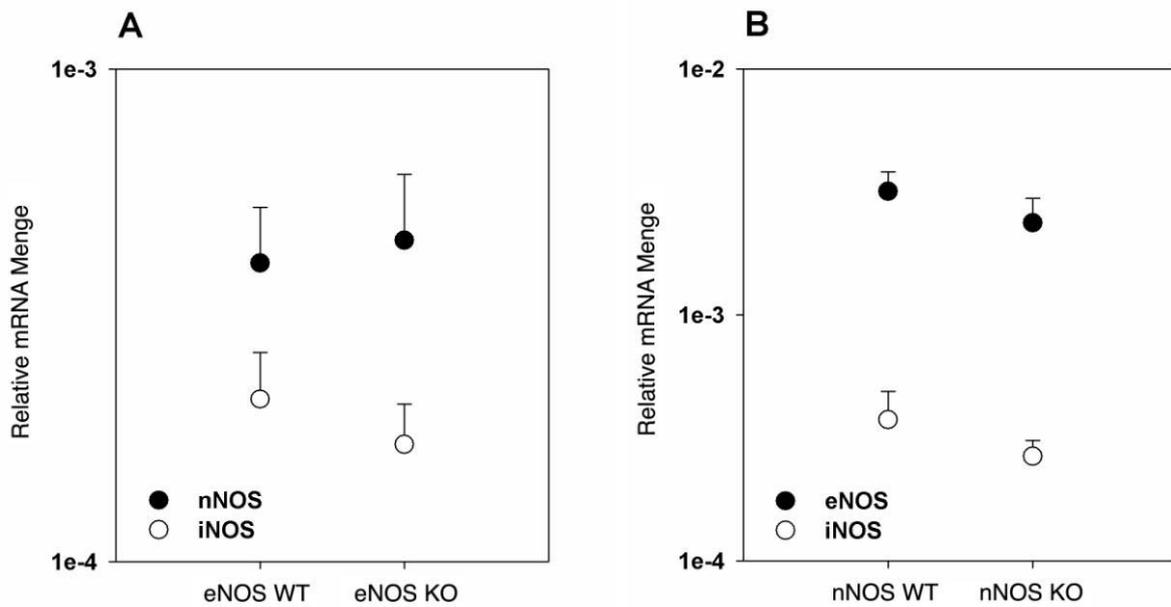


Abb. 18 A, B: Die Abbildungen zeigen die relativen mRNA Mengen von eNOS, nNOS und iNOS im Nierengewebe von eNOS WT (n=6) und eNOS KO (n=6, Abb. 18A) sowie nNOS WT (n=5) und nNOS KO (n=5, Abb. 18B) Mäusen. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der Real-Time PCR. Als endogene Kontrolle wurde das Housekeeping-Gen (HKG)  $\beta$ -Actin eingesetzt. Die Berechnung wurde nach der *delta*-CT Methode durchgeführt, bei der für jede untersuchte Probe der CT-Wert des HKG vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ( $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{HKG}}$ ) und die Mittelwerte und Standardabweichungen der  $\Delta\text{CT}$ -Werte einer Versuchsreihe berechnet wurden. Aufgetragen ist die relative mRNA Menge als  $1/\Delta\text{CT}$ . Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied sowohl der nNOS und iNOS zwischen den eNOS KO und WT Tieren als auch der eNOS und iNOS zwischen den nNOS KO und WT Mäusen (ungepaarter t-Test nach Student,  $P < 0,05$ ). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Interaktion des RAAS mit NO

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell der isoliert perfundierten Mausniere der Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) im Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) auf den renalen Gefäßwiderstand und auf die sympathische Neurotransmitterfreisetzung nach elektrischer Stimulation (RNS) untersucht.

Im kardiovaskulären System interagiert das RAAS auf vielen Ebenen mit NO. Mehrere Studien trugen in den letzten Jahren dazu bei, dass das Zusammenspiel von Angiotensin II (Ang II) mit NO und cGMP (cyclic-Guanosinmonophosphat) sowie der Sympathikusaktivität als ein komplexes System diskutiert wird, dessen Flexibilität auf verschiedenen Mechanismen beruht. Beispielsweise ist bekannt, dass Ang II über seine Rezeptoren (insbesondere AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren) über eine IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-triphosphat) vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Abbildung 2) zu einer direkten Aktivierung der NO-Synthase führt (Berridge, 1986; Saito et al., 1996). Auch physikalische Stimuli wie Schubspannung und Scherstress - zum Beispiel bedingt durch Ang II induzierte Vasokonstriktion - oder ein Abfall des Sauerstoffpartialdrucks (PO<sub>2</sub>) unter 50 mmHg bewirken eine Steigerung der Ca<sup>2+</sup> Konzentration und damit auch der NO Freisetzung (Endlich et al., 1999). Des Weiteren hat Ang II, wie in Abbildung 1 beschrieben wird, als starker Vasokonstriktor direkten und indirekten Einfluss auf die Blutdruck- und Blutvolumenerhöhung, wohingegen NO über die Aktivierung der Guanylylcyclase zur Relaxation der glatten Muskulatur und damit zur Vasodilatation führt. Beide Faktoren sind somit durch ihre funktionelle Wechselwirkung entscheidend an der Blutdruckregulation und Organperfusion beteiligt und beeinflussen darüber hinaus die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen wie Hypertension und Atherosklerose (Yan et al., 2003).

NO wird dabei in der Literatur oftmals als protektiver Faktor hinsichtlich der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen beschrieben, beispielsweise durch die Hemmung der Plättchenaggregation und die Verhinderung von Arteriosklerose (Lloyd-Jones and Bloch, 1996; Radomski et al., 1987). Es wird somit deutlich, dass Ang II und NO in einem balancierten Verhältnis zueinander stehen und eine

Interaktion in verschiedenen Organen und Geweben aufweisen. Ang II vermittelt seine Effekte dabei hauptsächlich über den AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptor, wobei gezeigt werden konnte, dass in der Niere der AT<sub>1</sub>-Rezeptor bei der Regulation des renalen Gefäßwiderstands und der Modulation der Neurotransmission die entscheidende Rolle spielt (Stegbauer et al., 2005). Andererseits gibt es auch Daten, die eine gefäßerweiternde Wirkung und somit die Inhibition der Ang II induzierten Vasokonstriktion über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor zeigen (Batenburg et al., 2004) und dementsprechend auch gegenteilige Effekte bezüglich der Wirkung von NO darstellen (Abadir et al., 2003).

Unbestritten ist die Funktion von NO als endogener Gegenspieler des RAAS (Fernandez-Alfonso and Gonzalez, 1999) beispielsweise durch seine vasodilatatorischen Effekte. Allerdings gibt es noch sehr wenige Studien, die seine Bedeutung in der Niere untersucht haben, so dass ein Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der Funktion der einzelnen Isoformen der NOS in der renalen Gefäßregulation darstellt. Ein weiteres Ziel bezieht sich auf die Fähigkeit der NOS zur Modulation der Neurotransmitterfreisetzung, die erst kürzlich durch den Nachweis eines fördernden Effektes von NO auf die Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung in isoliert perfundierten Mausnieren zur Diskussion gestellt werden konnte (Stegbauer et al., 2005). Dabei zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse (Hatanaka et al., 2006) bei insgesamt spärlicher Datenlage, so dass es in dieser Arbeit die agonistische Funktion von NO bezüglich der Steigerung der Ang II bedingten Noradrenalinfreisetzung mit Identifizierung der hauptverantwortlichen NOS in der Niere zu ermitteln galt.

Die NO-Synthase, welche die Umwandlung von L-Arginin zu NO katalysiert, kommt in der Niere in drei Isoformen vor, zum einen als konstitutives Enzym in Form der endothelialen NOS (eNOS) sowie der neuronalen NOS (nNOS) und zum anderen als induzierbares Enzym (iNOS). Zu erwähnen ist dabei, dass die iNOS in den meisten Geweben nur durch proinflammatorische Faktoren, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide und Zytokine, induziert werden kann und darüber hinaus unter physiologischen Bedingungen konstitutiv nur im Nierenmark und proximalen Tubulus vorkommt (Ahn et al., 1994; Kone and Baylis, 1997). Da die iNOS unter physiologischen Bedingungen keine Rolle zu spielen scheint und hauptsächlich an pathologischen inflammatorischen Prozessen beteiligt ist (Ortiz and Garvin, 2003; Thorup et al., 1996), sollte diese Isoform nicht Gegenstand der Untersuchung sein.

Um die lokale Bedeutung von Ang II und NO im renalen System untersuchen zu können und dabei den Einfluss von systemisch zirkulierenden Substanzen ausschließen zu können, wurde in dieser Arbeit mit dem Modell der isoliert perfundierten Mausnieren gearbeitet. Mit diesem Modell ließ sich unter *in vitro* Bedingungen eine maximal an die physiologischen Gegebenheiten angepasste Versuchssituation herbeiführen. Des Weiteren sollte mit Hilfe von eNOS und nNOS Knockout Mäusen eine komplette Ausschaltung des entsprechenden Enzyms erzielt werden, um anhand des vollständigen Wegfalls einer Isoform der NOS Rückschlüsse auf ihre Wirkung ziehen zu können. Durch den genetischen Knockout ließen sich dabei Ungenauigkeiten der Selektivität oder konzentrationsbedingte Unterschiede pharmakologischer Substrate ausschließen. Zur weiteren Differenzierung und Identifikation der hauptverantwortlichen Isoform bei der Regulation des renalen Gefäßwiderstandes oder der sympathischen Neurotransmitter Freisetzung konnten zusätzlich selektive oder auch unselektive Inhibitoren der NOS hinzugefügt werden. Auf Grund der Tatsache, dass in der Genexpressionsanalyse der eNOS, nNOS und iNOS mRNA kein signifikanter Unterschied der mRNA Mengen zwischen den Knockout und Wildtyp Mausstämmen zu verzeichnen war, kann bei allen Ergebnissen keine kompensatorische Hochregulation einer anderen Isoform für die Erklärung herangezogen werden. Es wird deutlich, dass alle Effekte in den Knockout Mausnieren auf der vollständigen Ausschaltung der eNOS beziehungsweise nNOS beruhen und nicht auf eine adaptive Überexpression einer anderen Isoform zurückzuführen sind.

#### **4.2. Die Rolle von NO bei der Ang II induzierten Druckantwort in eNOS und nNOS KO Mausnieren**

NO gilt bekanntermaßen als potenter Vasodilatator und wirkt der Ang II induzierten renalen Gefäßkonstriktion entgegen, wie in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte (Guan et al., 2003; Ichihara et al., 1998; Matsumura et al., 1995; Parekh et al., 1996; Sanchez-Mendoza et al., 1998). Dabei zeigte sich, dass eNOS KO Mäuse im Gegensatz zu nNOS KO Mäusen einen signifikant höheren Blutdruck im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Shesely et al., 1996). Es liegt daher nahe, dass die im Gefäßendothel lokalisierte eNOS eine wichtige Rolle bei der Regulation des

vaskulären Widerstandes spielt, wie Patzak et al. auch an isoliert perfundierten afferenten und efferenten Arteriolen von Mäusen nachweisen konnten (Patzak et al., 2004; Patzak et al., 2001). In der Niere konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die eNOS an der Regulation des Blutflusses entscheidend beteiligt ist (Mattson and Meister, 2005).

Im Gegensatz dazu ist die Rolle der nNOS bei der Regulation des Gefäßwiderstandes nicht geklärt, da widersprüchliche Daten dazu vorliegen und Untersuchungen in der Niere fehlen, obwohl die nNOS bekanntermaßen in der Macula Densa und den renalen sympathischen Neuronen lokalisiert ist (Bachmann et al., 1995; Mundel et al., 1992). Einerseits konnten bei nNOS KO Mäusen normale Blutdruckwerte nachgewiesen werden (Sallstrom et al., 2008), andererseits zeigte die chronische Infusion eines selektiven nNOS Inhibitors einen signifikanten Blutdruckanstieg in Ratten (Ollerstam et al., 1997), während die Inhibition der nNOS keinen Effekt auf die renale Funktion in Ratten mit einer niedrigen Salzzufuhr (Low-Salt Diet) zeigte (Vaneckova et al., 2002). Einige Studien zeigten des Weiteren eine bedeutende Rolle der nNOS bei der Regulation des renalen Blutflusses durch die Beeinflussung der prä- und postglomerulären Vasokonstriktion (Cervenka et al., 2001).

In unserer Arbeit bestätigte sich die dominierende Rolle der eNOS hinsichtlich der Regulation des renalen Gefäßwiderstandes in isoliert perfundierten Mausnieren. Allerdings konnte ebenso für die nNOS ein gewisses Ausmaß an Einfluss nachgewiesen werden:

### eNOS

Es zeigte sich, dass NO bereits unter basalen Bedingungen produziert wird und somit eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wobei die eNOS dabei einen größeren Einfluss auf die Regulation des Gefäßtonus hat:

Bereits beim Vergleich des durchschnittlichen basalen Nierenperfusionsdrucks zeigte sich in unseren Ergebnissen bei den eNOS KO Mausnieren ein signifikant erhöhter Perfusionsdruck gegenüber den Wildtypen. Dies deutet darauf hin, dass bereits allein durch den Wegfall der endothelialen NO Produktion durch die eNOS der Gefäßtonus erhöht ist, was mit der Studie von Shesely et al. in Einklang zu bringen ist, in der gezeigt werden konnte, dass eNOS KO Mäuse einen signifikant höheren Blutdruck

im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Shesely et al., 1996). Während Kurihara et al. für diesen Blutdruckanstieg in eNOS KO Mäusen das neuronal produzierte NO der nNOS als mögliche Erklärung sehen (Kurihara et al., 1998), lässt sich anhand unserer Ergebnisse stattdessen auch ein vasodilatativer Effekt der nNOS bestätigen: Es zeigte sich, dass der basale Nierenperfusionsdruck auch in den nNOS KO Mausnieren im Vergleich zu den WT signifikant erhöht war. Somit lag die Vermutung nahe, dass auch die nNOS einen möglichen, wenn auch geringeren Einfluss als die eNOS auf den renalen Gefäßwiderstand haben könnte. Die hier indirekt dominierende Wirkung der eNOS bestätigte sich auch in den Druckversuchen mit Ang II: Die Ergebnisse zeigen, dass Ang II in allen Mausstämmen dosisabhängig den renalen Gefäßwiderstand und somit die Druckantwort erhöhte. Bei den eNOS KO Mausnieren waren die Druckantworten signifikant stärker als bei den eNOS WT Mäusen (Maximale Ang II induzierte Druckantwort: eNOS KO:  $176 \pm 10$  mmHg; eNOS WT:  $116 \pm 7$  mmHg), was durch den Wegfall der kompensatorischen Vasodilatation durch endothelial produziertes NO zu erklären ist und somit die Dominanz der eNOS bestätigt. Um die vorherrschende Rolle der eNOS nochmals darzustellen, wurde der unselektive NOS Inhibitor L-NAME eingesetzt: L-NAME war durch die Hemmung aller NOS Isoformen in der Lage, die durch Ang II hervorgerufene Druckantwort in den eNOS WT Mausnieren signifikant zu steigern, wohingegen L-NAME in den eNOS KO Nieren keinen Effekt auf die Ang II induzierte Druckantwort zeigte. Daraus lässt sich schließen, dass die alleinige Inhibition der nNOS in den eNOS KO Mausnieren durch L-NAME keinen wesentlichen Verlust einer NO vermittelten Vasorelaxation nach sich zieht und die nNOS einen dementsprechend geringen Einfluss hat. Des Weiteren ließ sich feststellen, dass die Ang II bedingten Druckantworten in den eNOS KO Mausnieren (Maximale Ang II induzierte Druckantwort, eNOS KO:  $176 \pm 10$  mmHg) quantitativ vergleichbar waren mit denen der eNOS WT Nieren, die mit L-NAME behandelt worden waren (Maximale Ang II induzierte Druckantwort in Anwesenheit von L-NAME, eNOS WT:  $161,6 \pm 12$  mmHg). Dieses Ergebnis impliziert, dass die Hemmung aller Isoformen durch L-NAME im Wildtyp dem alleinigen Wegfall der eNOS in den eNOS KO Mausnieren gleichkommt und beweist dementsprechend nochmals die dominierende Rolle der eNOS als Gegenspieler der Ang II vermittelten Druckantwort. Somit stimmen diese Befunde mit der Studie von Patzak et al. überein (Patzak et al., 2005; Patzak et al., 2001) und unterstützen die These, dass die endotheliale NOS einen

entscheidenden Einfluss auf den renalen Gefäßtonus hat, indem sie der Ang II induzierten Vasokonstriktion durch das endothelial gebildete vasodilatativ wirksame NO entgegenwirkt (Patzak et al., 2008).

### *nNOS*

Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass auch die nNOS an der Regulation des renalen Blutflusses beteiligt ist. Darauf deutet zum Beispiel ebenfalls der oben beschriebene signifikant erhöhte basale Nierenperfusionsdruck der nNOS KO Mausnieren im Vergleich zu den WT hin. Auch verschiedene Studien thematisieren die potentielle Mitwirkung der nNOS an der Regulation des Gefäßtonus: Die Arbeit von Mattson und Meister beschreibt beispielsweise in Mäusen einen Einfluss der nNOS auf den renalen Blutfluss des Nierenmarks im Gegensatz zur eNOS, die zusätzlich auch den Gefäßtonus der Nierenrinde regulieren soll (Mattson and Meister, 2005). Dies steht damit im Einklang mit der Studie von Walkowska et al., die der nNOS eine besondere Bedeutung bei der Perfusion des inneren Nierenmarks in Ratten zuspricht (Walkowska et al., 2005). Es wird allerdings deutlich, dass es noch keine klare Vorstellung davon gibt, auf welchen Ebenen die nNOS im renalen Gefäßsystem regulierende Wirkung zeigen kann. In der isoliert perfundierten Mausnieren bestätigte sich, dass die nNOS an der Regulation der Ang II vermittelten Druckantwort beteiligt ist: Bei den Versuchen zeigte sich auch in den nNOS KO und WT Mausnieren eine dosisabhängige Steigerung der Druckantwort durch Ang II. Diese Druckantworten auf Ang II waren bei den nNOS KO Tieren für die zwei höchsten Ang II Konzentrationen (3 nM und 10 nM) signifikant größer als die der WT Kontrollen (nNOS KO: Ang II: 3 nM,  $124 \pm 9$  mmHg; 10 nM,  $138 \pm 5$  mmHg; nNOS WT: Ang II: 3 nM,  $105 \pm 6$  mmHg; 10 nM,  $111 \pm 6$  mmHg). Dies deutet darauf hin, dass auch die nNOS der Ang II vermittelten Druckantwort entgegenwirken kann. Der unselektive NOS Inhibitor L-NAME führte erstaunlicherweise sowohl in den nNOS WT Mausnieren als auch in den nNOS KO Mausnieren zu einem signifikanten renalen vaskulären Druckanstieg. Bei Betrachtung der Absolutwerte (nNOS WT: zum Beispiel bei 10 nM Ang II:  $103,6 \pm 21$  mmHg; 10 nM Ang II + L-NAME:  $139,5 \pm 26$  mmHg; nNOS KO: 10 nM Ang II:  $150,72 \pm 16$  mmHg; 10 nM Ang II + L-NAME:  $178,5 \pm 25$  mmHg) zeigte sich jedoch eine unterschiedlich starke Wirkung von L-NAME in den beiden Mausstämmen: In den Wildtypen wirkte L-NAME durch die Hemmung

beider NOS Isoformen potenter. Um also tatsächlich eine vasodilatative Wirkung der nNOS in der Niere direkt nachweisen oder ausschließen zu können, wurden Ang II DWK's unter dem Einfluss von dem selektiven nNOS Inhibitor 7-NINA durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass 7-NINA tatsächlich in der Lage ist, die Ang II induzierte Druckantwort in nNOS WT Mausnieren signifikant zu erhöhen. Allerdings zeigte der direkte Vergleich der maximalen Drucksteigerungen in den verschiedenen Gruppen, dass 7-NINA in den Wildtypen weniger potent wirkt als L-NAME. Es bleibt somit festzuhalten, dass sowohl die eNOS als auch die nNOS an der Regulation des renalen Gefäßdrucks beteiligt sind, wobei die eNOS die dominierende Isoform in diesem Zusammenhang darstellt. Die nNOS spielt dabei zwar eine gewisse, wenn auch nur geringe Rolle in Bezug auf den renalen Gefäßtonus und insbesondere nur bei hohen Ang II Konzentrationen. Der nur geringe Einfluss zeigt sich dadurch, dass man einen zusätzlich vermittelten nNOS-Effekt nicht in der eNOS KO Maus detektieren kann, da L-NAME dort keine zusätzliche Wirkung hat. Diese Ergebnisse stimmen mit der erst kürzlich erschienenen Arbeit von Patzak et al. überein, in der man anhand von isolierten afferenten Arteriolen von Mäusen zu demselben Ergebnis bezüglich der Dominanz der eNOS gegenüber der nNOS bei der Regulation des Gefäßwiderstandes kam (Patzak et al., 2008). Unklar ist jedoch bis heute, weshalb beide NOS hinsichtlich der Regulation des Gefäßtonus dieselbe Wirkung zeigen, obwohl sie nach bisherigem Kenntnisstand in der Niere an verschiedenen Orten lokalisiert sind. Zu diskutieren ist dabei anhand oben genannter Studie von Patzak et al. die Möglichkeit des Vorhandenseins der nNOS ebenfalls in Gefäßen, da die dort beschriebenen Effekte an isolierten Arteriolen gezeigt werden konnten. Festzuhalten bleibt, dass beide NOS im Ergebnis in gleicher Weise – und dabei durch die eNOS dominierend – die Ang II induzierte Druckantwort inhibieren.

### *Ang II induzierte NO-Bildung*

Von nicht unerheblicher Bedeutung ist darüber hinaus die Tatsache, dass grundsätzlich Ang II selbst als Induktor der NO-Bildung anzusehen ist und somit selbst die Fähigkeit besitzt einen antagonisierenden Effekt auf den renalen Gefäßtonus in Gang zu setzen (Boulanger et al., 1995). Dies bestätigt sich auch anhand dieser Studie, da die alleinige Applikation von L-NAME ohne die Zugabe von Ang II in allen Experimenten keine Druckveränderungen bewirken konnte.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Ang II induzierte NO-Bildung über die Aktivierung von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt werden kann, beispielsweise in perfundierten Nieren von AT<sub>2</sub>-Rezeptor Knockout Mäusen (Stegbauer et al., 2005), isolierten renalen Arterien von Ratten (Thorup et al., 1998) sowie Macula Densa Zellen von Kaninchen (Liu and Persson, 2004) und Ratten (Schwobel et al., 2000). Ramchandran et al. konnten eindrucksvoll nachweisen, dass ein mutierter und daher permanent aktiver AT<sub>1</sub>-Rezeptor in Mäusen die NOS im Endothel aktiviert und somit langfristig zu Hypotension führt (Ramchandran et al., 2006). Darüber hinaus gibt es allerdings auch *in vivo* wie *in vitro* Beobachtungen, die eine AT<sub>2</sub>-Rezeptor abhängige Bildung von NO beschreiben, wie zum Beispiel in der Aorta von Ratten (Gohlke et al., 1998), in Ratten unter AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade (Savoia et al., 2006; Siragy and Carey, 1999), isolierten Rattenarterien (Hannan et al., 2003) und menschlichen Herzarterien (Batenburg et al., 2004). Dabei kann NO sowohl direkt als auch über Bradykinin mittels AT<sub>2</sub>-Rezeptor aktiviert werden (Abadir et al., 2003). Inwiefern dabei differenziert werden kann, welcher Ang II Rezeptortyp in welchem Maße nun die einzelnen NOS Isoformen beeinflusst, ist derzeit noch unklar. Insgesamt wird jedoch ersichtlich, dass das Zusammenspiel des RAAS mit dem NO/cGMP-System zahlreiche ungeklärte Fragen hinsichtlich des renalen Gefäßwiderstandes und der Interaktion der Ang II Rezeptoren mit den unterschiedlichen NOS Isoformen offen lässt, die es zu entschlüsseln gilt, um das RAAS/NO-System in seiner ganzen Komplexität verstehen zu können.

#### **4.3. Die Effekte von NO auf die Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung in eNOS und nNOS KO Mausnieren**

Ein weiterer Faktor, der die Interaktion des RAAS mit dem NO/cGMP-System beeinflusst und dementsprechend auch eine entscheidende Rolle in der Blutdruckregulation spielt, ist das sympathische Nervensystem. Der Blutdruck wird dabei durch das sympathische Nervensystem beeinflusst, indem es seine Wirkung renal via Neurotransmitter entfaltet. Ang II selbst kann diese Wirkung unterstützen und schließlich zu einer gesteigerten sympathischen Aktivität führen, welche langfristig zu einem Bluthochdruck beitragen kann. Zusätzlich wird diese Interaktion durch NO mitbeeinflusst (Gironacci et al., 1997). Bis heute ist nicht viel über die Rolle

von NO bei der Modulation der sympathischen Neurotransmitter Freisetzung bekannt, und es liegen zudem widersprüchliche Daten dazu vor. Einige Studien demonstrierten, dass endogen produziertes NO die Noradrenalinfreisetzung in kardiovaskulären Geweben erhöht, wie anhand von Herzvorhöfen oder Mesenterialarterien von Ratten gezeigt werden konnte (Gironacci et al., 1997; Yamamoto et al., 1997). Auch McKeogh et al. konnten nachweisen, dass Ang II induziertes NO die renale sympathische Nervenaktivität in Ratten mit niedriger Salzzufuhr, nicht jedoch mit hoher Salzzufuhr, stimuliert (McKeogh et al., 2004). Darüber hinaus konnten Stegbauer et al. 2005 in isoliert perfundierten Nieren von AT<sub>2</sub>-Rezeptor Knockout Mäusen zeigen, dass die erhöhte Noradrenalinfreisetzung durch Ang II via AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt wird und dass NO diesen Effekt moduliert (Stegbauer et al., 2005). Dies konnten wir in unserer Studie bestätigen: Im Modell der isoliert perfundierten Mausniere zeigte sich ebenfalls eine Steigerung der Noradrenalinfreisetzung, die durch NO hervorgerufen wird. Im Gegensatz dazu beschrieben Hirai et al. unterschiedliche Effekte von NO auf die sympathische Aktivität in Barorezeptor-denervierten Ratten, in denen NO lumbal die Neurotransmitter Freisetzung erhöhte und renal stattdessen inhibierte (Hirai et al., 1995). Auch in anderen Studien wurde über einen negativen Effekt von NO auf die NA Freisetzung berichtet, wie zum Beispiel in den kardialen sympathischen Nerven (Schwarz et al., 1995) oder Mesenterialarterien von Ratten (Kolo et al., 2004). Da darüber hinaus völlig ungeklärt ist, welche NOS für die Bildung von präsynaptisch aktivem NO verantwortlich ist, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit nicht nur untersucht werden, inwiefern NO die sympathische Noradrenalinfreisetzung in der Niere modulieren kann, sondern insbesondere auch welche NOS Isoform in diesem Zusammenhang die entscheidende Rolle im Modell der isoliert perfundierten Mausniere spielt.

In unseren Experimenten konnte zunächst gezeigt werden, dass die Aktivierung von präsynaptischen Ang II-Rezeptoren in den eNOS KO, nNOS KO sowie in den WT Mausnieren die RNS induzierte Neurotransmitter Freisetzung erhöhte. Dabei wiesen die eNOS KO Mausnieren gegenüber allen anderen Mausstämmen eine deutlich geringere Noradrenalinfreisetzung für die zwei höchsten Ang II Konzentrationen auf und ließen dementsprechend bereits eine herausragende Rolle der eNOS vermuten (NA Freisetzung [% Kontrolle] bei 10 nM Ang II nach RNS: nNOS WT: 178,33 ± 10 ; nNOS KO: 173,7 ± 8 ; eNOS WT: 175,9 ± 12; eNOS KO: 145,65 ± 9). Zur

Bestimmung des Einflusses von NO wurde L-NAME (0,3 mM) eingesetzt, welches in allen Mausstämmen ohne die Zugabe von Ang II keinen Effekt auf die RNS vermittelte Neurotransmission zeigte (Kontroll-Stimulation:  $99,78 \pm 15,04$  % Kontrolle; Stimulation in Anwesenheit von L-NAME:  $100,04 \pm 20,15$  % Kontrolle). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Studie von Tanioka et al. (Tanioka et al., 2002), in welcher beobachtet werden konnte, dass die alleinige Gabe von L-NAME die RNS induzierte Neurotransmitter Freisetzung in Rattennieren reduzierte. Allerdings stimmt es im Gegensatz dazu mit Studien überein, in denen *in vitro* (zum Beispiel in isolierten Mausnieren) wie *in vivo* (zum Beispiel in lebenden Kaninchen) ebenfalls kein Effekt durch die alleinige Gabe von L-NAME nachgewiesen werden konnte und NO die sympathische Neurotransmission nur in Anwesenheit von Ang II modulierte (Liu et al., 1998; Stegbauer et al., 2005). Diese Tatsache lässt sich möglicherweise auf eine zu geringe Produktion von funktionell aktivem endogenen NO unter basalen Bedingungen in unserem Modell zurückführen. Des Weiteren konnte in den Experimenten zweifelsfrei demonstriert werden, dass L-NAME die durch Ang II bewirkte Noradrenalinfreisetzung nach renal nervaler Stimulation in den WT Mäusen senken konnte. Dies beweist zum einen, dass NO zu einer Steigerung der Noradrenalinfreisetzung führt und zum anderen, dass vermutlich nur Ang II und keine neuronal freigesetzten sympathischen Neurotransmitter wie Noradrenalin oder Adenosintriphosphat (ATP) die NO Bildung in Mausnieren induziert und dadurch die präsynaptische Noradrenalinfreisetzung beeinflusst, da andernfalls ein Effekt durch L-NAME allein zu verzeichnen sein müsste. Erst kürzlich konnten Vonend et al. zeigen, dass in diesem Zusammenhang der  $\text{Alpha}_{2A}$ -Rezeptor entscheidend an der Regulation der sympathischen Transmitter Freisetzung in Mausnieren beteiligt ist und im Rahmen einer präsynaptischen Autoinhibition die NA und ATP Freisetzung hemmt (Vonend et al., 2007). Um außerdem zu gewährleisten, dass alle beobachteten Effekte von Ang II und L-NAME unabhängig von Einflüssen der Synthese, Wiederaufnahme und renaler Clearance von Noradrenalin sind, wurden alle Experimente dieser Versuchsreihe in Anwesenheit von den Wiederaufnahme-Blockern Kokain und Kortikosteron durchgeführt.

Trotzdem blieb weiterhin unklar, welche NOS Isoform von Ang II stimuliert wird. Wie oben bereits beschrieben, zeigte sich, dass die maximale Ang II induzierte Noradrenalinfreisetzung in den eNOS KO Mausnieren im Vergleich zu den WT Kontrollen reduziert war. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass

erstaunlicherweise NO, welches von der eNOS gebildet wird, eine Rolle in der Modulation der Ang II vermittelten Neurotransmitter Freisetzung nach RNS spielen könnte. Übereinstimmend mit dieser Erkenntnis hatte L-NAME keine signifikante Wirkung auf die Ang II induzierte Neurotransmission in den eNOS KO Mäusen, im Gegensatz zu den nNOS KO sowie den WT Mäusen, bei denen L-NAME in gleicher Weise die Ang II vermittelte Noradrenalinfreisetzung erniedrigte. L-NAME führte beispielsweise bei der Gabe der höchsten Ang II Konzentration (10 nM) zu einer Erniedrigung der Noradrenalinfreisetzung um  $34,8 \pm 5 \%$  bei den eNOS WT Mäusen, um  $34,25 \pm 6 \%$  bei den nNOS WT und um  $29,8 \pm 4 \%$  bei den nNOS KO. Damit war bewiesen, dass die eNOS auch in Bezug auf die sympathische Nervenaktivität in der Niere eine herausragende Rolle spielt. Der hier nachgewiesene fördernde Effekt der eNOS auf die Neurotransmission widerspricht somit der Studie von Berg T., in der eine sympathoinhibitorische Komponente der eNOS in Ratten beschrieben wurde (Berg, 2005). Da die unselektive Hemmung aller NOS Isoformen durch L-NAME zudem die Noradrenalinfreisetzung in den nNOS KO Mäusen, nicht aber in den eNOS KO Mäusen antagonisieren konnte, zeichnete sich bereits hier eine nur untergeordnete Rolle der nNOS ab. Um diese Hypothese zu unterstützen, wurde der selektive neuronale NOS-Inhibitor 7-NINA eingesetzt, welcher in den nNOS WT Mäusen nicht in der Lage war, die Ang II induzierte NA Freisetzung zu reduzieren. Somit wurde deutlich, dass die nNOS keinen Effekt auf die sympathische Neurotransmitter Freisetzung hat, was im Gegensatz zu Arbeiten steht, die eine Interaktion der nNOS mit den renalen Nerven aufzeigen konnten (Walkowska et al., 2004). Zusammengefasst lassen unsere Ergebnisse darauf schließen, dass das Ang II induzierte präsynaptisch aktive NO durch die eNOS generiert wird, wobei NO schließlich die renale Noradrenalinfreisetzung in diesem Mausmodell erhöht. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass das gut membrangängige cGMP Analogon 8-pCPT-cGMP (0,1 mM) zu einem signifikanten Anstieg der RNS induzierten Noradrenalinfreisetzung führte (8-pCPT-cGMP:  $129,3 \pm 37,1 \%$  Kontrolle). Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass die NO Induktion durch Ang II über einen cGMP abhängigen Signalweg zu einer Stimulation der Noradrenalinfreisetzung führt, wie beispielsweise auch im ZNS von Kaninchen nachgewiesen werden konnte (Ohia and Jumblatt, 1993). Von Tanioka et al. hingegen wurde ein cGMP unabhängiger Mechanismus beschrieben, was jedoch möglicherweise durch die Verwendung eines

weniger gut membrangängigen cGMP Analogons zu erklären ist. Insgesamt bestätigen unsere Beobachtungen allerdings die Studie von Tanioka et al., in der anhand von isoliert perfundierten Rattennieren ebenfalls eine Steigerung der NA Freisetzung durch die eNOS, nicht aber durch die nNOS beschrieben werden konnte (Tanioka et al., 2002).

Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um den zu Grunde liegenden Mechanismus und die Lokalisation der NO Bildung für die Modulation der Ang II induzierten Neurotransmitter Freisetzung festzustellen. Eine mögliche Erklärung liefert die Studie von Kodama et al., in der kürzlich die Rolle von NO als retrograder Regulator der Noradrenalinfreisetzung im Gehirn von Ratten untersucht wurde (Kodama and Koyama, 2006). Darin wird die Hypothese aufgestellt, dass postsynaptisch gebildetes NO retrograd durch den synaptischen Spalt diffundiert und anschließend präsynaptisches cGMP aktiviert, welches die Noradrenalinfreisetzung moduliert. Bei Anwendung dieser Hypothese auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wäre beispielsweise eine postsynaptische Aktivierung von Ang II Rezeptoren mit Induktion der NO Bildung via eNOS denkbar, die im Folgenden zu einer retrograden Diffusion und Inkorporation von NO in die Synapse führt, wo es über die Aktivierung von cGMP zu einer erhöhten Noradrenalinfreisetzung kommt (Abbildung 19).

Ein derartiger Mechanismus könnte beispielsweise insbesondere zum Teil für die Erklärung des tubuloglomerulären Feedback (TGF) Mechanismus herangezogen werden, dessen Funktion und Regulation bis heute nur unvollständig verstanden wird. Es wird spekuliert, dass die NO induzierte Erhöhung der Neurotransmitter Freisetzung die Ang II vermittelte Vasokonstriktion in efferenten Arteriolen potenziert (Batenburg et al., 2006; Bohmann et al., 1995) und dadurch die TGF Sensibilität erhöht (Patzak and Persson, 2007). Bereits Abadir et al. zeigten, dass es in Mäusen mit niedriger Salzzufuhr Ang II vermittelt zu einer Erhöhung von NO und cGMP kommt (Abadir et al., 2003). Aus diesen Erkenntnissen ließe sich eine Theorie aufstellen, in welcher die Macula Densa als Sensor des TGF im Mittelpunkt steht und von den Ang II – NO Interaktionen beeinflusst wird. So könnte zum Beispiel eine erniedrigte Elektrolytkonzentration bei einer erhöhten Filtrationsrate zu einem Anstieg von Renin und Ang II führen. Die Ang II vermittelte Vasokonstriktion der efferenten Arteriolen im Sinne einer Reduktion der Filtration könnte gleichzeitig einhergehen mit einer Ang II induzierten NO-Bildung. Eine retrograde Diffusion von NO in die

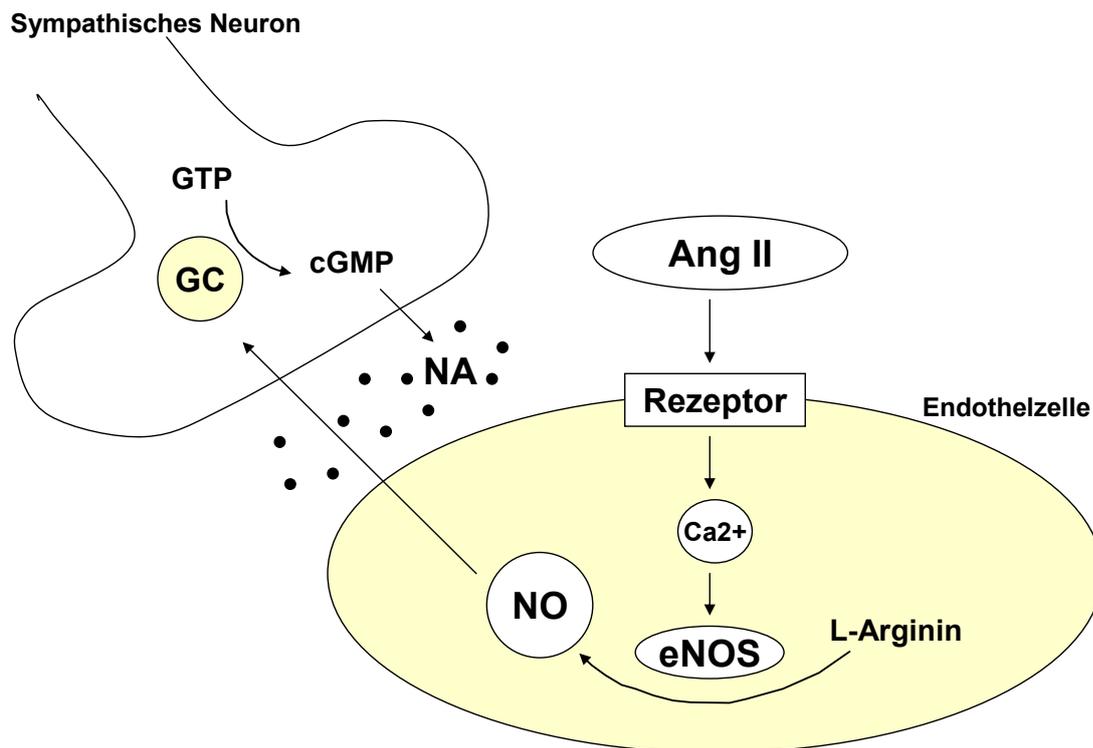


Abbildung 19: Möglicher Mechanismus der NO induzierten Noradrenalinfreisetzung durch Ang II. Ang II führt über die postsynaptische Aktivierung des Ang II-Rezeptors an der Endothelzelle zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration. Dadurch wird die calciumabhängige eNOS aktiviert, welche die Bildung von NO katalysiert. NO diffundiert extrazellulär in den synaptischen Spalt und wird retrograd in die synaptische Endigung des sympathischen Neurons aufgenommen. Die dort enthaltene lösliche Guanylylcyclase produziert NO abhängig aus GTP zyklisches GMP (cGMP), welches an der präsynaptischen Membran die Freisetzung von NA in den synaptischen Spalt vermittelt. Somit kann die direkte Vasokonstriktion durch Ang II und die antagonistische Vasorelaxation durch NO an der Endothelzelle zusätzlich über die NO vermittelte Wirkung von NA moduliert werden.

sympathischen Neurone mit einer präsynaptischen Erhöhung der Noradrenalinfreisetzung könnte eine sympathisch vermittelte Verbesserung der Vasokonstriktion auch der afferenten Arteriolen bewirken und damit den renalen Blutfluss und die Filtrationsrate weiter beeinflussen. Es wird somit deutlich, dass das Zusammenspiel des RAAS mit dem NO/cGMP-System komplex und in seiner Gesamtheit noch nicht vollständig verstanden ist. Festzuhalten bleibt, dass NO prä- und postsynaptisch divergente Effekte hat:

In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante modulierende Wirkung der eNOS als hauptverantwortliche Isoform der NOS auf den renalen vaskulären Widerstand in der isoliert perfundierten Mausniere demonstriert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die derzeitige Datenlage und geht mit zahlreichen Studien einher. Hervorzuheben ist darüber hinaus jedoch zusätzlich, dass auch die nNOS eine gewisse – wenn auch untergeordnete – Rolle spielt, die in diesem Zusammenhang bisher so noch nicht bekannt war.

Des Weiteren kommt man anhand dieses Studienmodells erstmals zu der Erkenntnis, dass präsynaptisch aktives NO in der Mausniere die Ang II induzierte Steigerung der Neurotransmitter Freisetzung moduliert und zudem scheinbar ausschließlich von der eNOS generiert wird. Eine Mitbeteiligung der nNOS an der Stimulation der Noradrenalinfreisetzung konnte erstaunlicherweise nicht nachgewiesen werden. Insgesamt lassen unsere Beobachtungen die Schlussfolgerung zu, dass eine eNOS vermittelte NO Induktion durch Ang II über einen cGMP abhängigen Signalweg zu einer Stimulation der Noradrenalinfreisetzung führt und damit Einfluss auf die sympathische Nervenaktivität, den renalen Blutfluss sowie die Blutdruckregulation nimmt.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) und die dabei verantwortliche NO Synthase Isoform bei Angiotensin II induzierten Effekten in der Niere zu untersuchen. Dabei wurde der Einfluss von NO auf den renalen Gefäßwiderstand und die renale sympathische Neurotransmission in isoliert perfundierten Nieren von eNOS KO, nNOS KO sowie den Wildtyp Mäusen betrachtet.

Es zeigte sich, dass der basale Nierenperfusionsdruck in eNOS KO Mausnieren gegenüber allen anderen Mausstämmen erhöht war. Des Weiteren steigerte Ang II in allen Mausstämmen dosisabhängig den renalen Gefäßwiderstand, wobei die Druckantworten in den eNOS KO Nieren am größten waren. In Nieren von nNOS KO Mäusen ließen sich gegenüber Wildtyp Nieren nur für die zwei höchsten Ang II Konzentrationen stärkere Druckantworten nachweisen. Die durch Ang II induzierte Druckantwort konnte durch L-NAME, einen unselektiven NOS Inhibitor, in Wildtyp- und nNOS KO Mausnieren signifikant gesteigert werden. Interessanterweise hatte L-NAME in eNOS KO Nieren keinen Effekt. Vielmehr waren die Ang II induzierten Druckantworten in eNOS KO Mausnieren quantitativ vergleichbar mit L-NAME behandelten Nieren von Wildtyp- und nNOS KO Mäusen. In nNOS WT Nieren erhöhte 7-NINA, ein spezifischer nNOS Inhibitor, die Ang II induzierte Druckantwort geringfügig. Daraus lässt sich schließen, dass die eNOS die dominierende Isoform bei der Regulation des renalen Gefäßwiderstandes darstellt, wohingegen die nNOS nur eine geringe Rolle zu spielen scheint.

Die Aktivierung von präsynaptischen Ang II-Rezeptoren führte in allen Mausstämmen zu einer Erhöhung der RNS induzierten NA Freisetzung. Die maximale Ang II induzierte NA Freisetzung war in den eNOS KO Nieren im Vergleich zu den WT Kontrollen reduziert. Während L-NAME allein keinen Effekt zeigte, führte es in Anwesenheit von Ang II zu einer Senkung der durch Ang II bewirkten NA Freisetzung nach RNS in den Wildtyp und nNOS KO, nicht aber in den eNOS KO Mausnieren. 7-NINA zeigte keinen Effekt. Die Applikation von 8-pCPT-cGMP, einem cGMP Analogon, führte zu einem signifikanten Anstieg der RNS induzierten NA Freisetzung. Somit wird deutlich, dass NO, welches von der eNOS gebildet wird, die Ang II induzierte Neurotransmission cGMP vermittelt steigern kann und die nNOS

dabei keine Rolle zu spielen scheint. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass es eine Interaktion von NO und Ang II auf post- und präsynaptischer Ebene gibt, wobei die eNOS bei den vorliegenden Regulationsmechanismen als dominierende Isoform in den Vordergrund zu stellen ist. Sie hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die renale sympathische Noradrenalinfreisetzung sowie auf den renalen Gefäßwiderstand, wobei letzteres in nur geringem Maße von der nNOS mitbeeinflusst werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abadir, P. M., Carey, R. M., and Siragy, H. M. (2003). Angiotensin AT<sub>2</sub> receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B<sub>2</sub>-receptor-null mice. *Hypertension* 42, 600-604.
- Ahn, K. Y., Mohaupt, M. G., Madsen, K. M., and Kone, B. C. (1994). In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol* 267, F748-757.
- Ardailou, R. (1999). Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 *Suppl* 11, S30-39.
- Ardailou, R., Sraer, J., Chansel, D., Ardailou, N., and Sraer, J. D. (1987). The effects of angiotensin II on isolated glomeruli and cultured glomerular cells. *Kidney Int Suppl* 20, S74-80.
- Azuma, H., Ishikawa, M., and Sekizaki, S. (1986). Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88, 411-415.
- Bachmann, S., Bosse, H. M., and Mundel, P. (1995). Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 268, F885-898.
- Batenburg, W. W., Garrelds, I. M., Bernasconi, C. C., Juillerat-Jeanneret, L., van Kats, J. P., Saxena, P. R., and Danser, A. H. (2004). Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 109, 2296-2301.
- Batenburg, W. W., van Esch, J. H., Garrelds, I. M., Jorde, U., Lamers, J. M., Dekkers, D. H., Walther, T., Kellett, E., Milligan, G., van Kats, J. P., and Danser, A. H. (2006). Carvedilol-induced antagonism of angiotensin II: a matter of alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor blockade. *J Hypertens* 24, 1355-1363.

- Berg, T. (2005). Increased counteracting effect of eNOS and nNOS on an alpha1-adrenergic rise in total peripheral vascular resistance in spontaneous hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 67, 736-744.
- Berridge, M. J. (1986). Regulation of ion channels by inositol trisphosphate and diacylglycerol. *J Exp Biol* 124, 323-335.
- Blantz, R. C., Deng, A., Lortie, M., Munger, K., Vallon, V., Gabbai, F. B., and Thomson, S. C. (2002). The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int* 61, 782-785.
- Bohmann, C., Rist, W., Schollmeyer, P., and Rump, L. C. (1995). Low concentrations of angiotensin II unmask vasoconstrictory alpha 2-adrenoceptors in isolated perfused kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 30, 857-865.
- Boulanger, C. M., Caputo, L., and Levy, B. I. (1995). Endothelial AT1-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery. *Hypertension* 26, 752-757.
- Brede, M., Roell, W., Ritter, O., Wiesmann, F., Jahns, R., Haase, A., Fleischmann, B. K., and Hein, L. (2003). Cardiac hypertrophy is associated with decreased eNOS expression in angiotensin AT2 receptor-deficient mice. *Hypertension* 42, 1177-1182.
- Carey, R. M., Howell, N. L., Jin, X. H., and Siragy, H. M. (2001). Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats. *Hypertension* 38, 1272-1277.
- Cervenka, L., Horacek, V., Vaneckova, I., Hubacek, J. A., Oliverio, M. I., Coffman, T. M., and Navar, L. G. (2002). Essential role of AT1A receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension* 40, 735-741.
- Cervenka, L., Kramer, H. J., Maly, J., and Heller, J. (2001). Role of nNOS in regulation of renal function in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 38, 280-285.

- Cervenka, L., Kramer, H. J., Maly, J., Vaneckova, I., Backer, A., Bokemeyer, D., Bader, M., Ganten, D., and Mitchell, K. D. (2002). Role of nNOS in regulation of renal function in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res* 51, 571-580.
- El Muayed, M., Stegbauer, J., Oberhauser, V., Vonend, O., and Rump, L. C. (2004). AT1 and AT2-receptor antagonists inhibit Ang II-mediated facilitation of noradrenaline release in human atria. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 318-324.
- Endlich, K., Muller, C., Barthelmebs, M., and Helwig, J. J. (1999). Role of shear stress in nitric oxide-dependent modulation of renal angiotensin II vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 127, 1929-1935.
- Fernandez-Alfonso, M. S., and Gonzalez, C. (1999). Nitric oxide and the renin-angiotensin system. Is there a physiological interplay between the systems? *J Hypertens* 17, 1355-1361.
- Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Gironacci, M. M., Lorenzo, P. S., and Adler-Graschinsky, E. (1997). Possible participation of nitric oxide in the increase of norepinephrine release caused by angiotensin peptides in rat atria. *Hypertension* 29, 1344-1350.
- Gohlke, P., Pees, C., and Unger, T. (1998). AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 31, 349-355.
- Goodfriend, T. L., Elliott, M. E., and Catt, K. J. (1996). Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med* 334, 1649-1654.
- Gross, V., Obst, M., Kiss, E., Janke, J., Mazak, I., Shagdarsuren, E., Muller, D. N., Langenickel, T. H., Grone, H. J., and Luft, F. C. (2004). Cardiac hypertrophy and fibrosis in chronic L-NAME-treated AT2 receptor-deficient mice. *J Hypertens* 22, 997-1005.
- Guan, Z., Willgoss, D. A., Matthias, A., Manley, S. W., Crozier, S., Gobe, G., and Endre, Z. H. (2003). Facilitation of renal autoregulation by angiotensin II is mediated through modulation of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 179, 189-201.

- Hannan, R. E., Davis, E. A., and Widdop, R. E. (2003). Functional role of angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor in modulation of AT<sub>1</sub> receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 140, 987-995.
- Hatanaka, Y., Hobara, N., Honghua, J., Akiyama, S., Nawa, H., Kobayashi, Y., Takayama, F., Gomita, Y., and Kawasaki, H. (2006). Neuronal nitric-oxide synthase inhibition facilitates adrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 490-497.
- Hirai, T., Musch, T. I., Morgan, D. A., Kregel, K. C., Claassen, D. E., Pickar, J. G., Lewis, S. J., and Kenney, M. J. (1995). Differential sympathetic nerve responses to nitric oxide synthase inhibition in anesthetized rats. *Am J Physiol* 269, R807-813.
- Hiyoshi, H., Yayama, K., Takano, M., and Okamoto, H. (2004). Stimulation of cyclic GMP production via AT<sub>2</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the pressure-overloaded aorta after banding. *Hypertension* 43, 1258-1263.
- Ichihara, A., Imig, J. D., Inscho, E. W., and Navar, L. G. (1998). Interactive nitric oxide-angiotensin II influences on renal microcirculation in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 31, 1255-1260.
- Ichihara, A., Inscho, E. W., Imig, J. D., and Navar, L. G. (1998). Neuronal nitric oxide synthase modulates rat renal microvascular function. *Am J Physiol* 274, F516-524.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9265-9269.
- Ito, S., Johnson, C. S., and Carretero, O. A. (1991). Modulation of angiotensin II-induced vasoconstriction by endothelium-derived relaxing factor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 87, 1656-1663.
- Klinke, S. (1996). *Lehrbuch der Physiologie*. 33 ff.

- Kodama, T., and Koyama, Y. (2006). Nitric oxide from the laterodorsal tegmental neurons: its possible retrograde modulation on norepinephrine release from the axon terminal of the locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 138, 245-256.
- Kolo, L. L., Westfall, T. C., and Macarthur, H. (2004). Nitric oxide decreases the biological activity of norepinephrine resulting in altered vascular tone in the rat mesenteric arterial bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H296-303.
- Kone, B. C., and Baylis, C. (1997). Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 272, F561-578.
- Kovacs, G., Komlosi, P., Fuson, A., Peti-Peterdi, J., Rosivall, L., and Bell, P. D. (2003). Neuronal nitric oxide synthase: its role and regulation in macula densa cells. *J Am Soc Nephrol* 14, 2475-2483.
- Kurihara, N., Alfie, M. E., Sigmon, D. H., Rhaleb, N. E., Shesely, E. G., and Carretero, O. A. (1998). Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. *Hypertension* 32, 856-861.
- Kurisu, S., Ozono, R., Oshima, T., Kambe, M., Ishida, T., Sugino, H., Matsuura, H., Chayama, K., Teranishi, Y., Iba, O., *et al.* (2003). Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension* 41, 99-107.
- Liu, J. L., Murakami, H., and Zucker, I. H. (1998). Angiotensin II-nitric oxide interaction on sympathetic outflow in conscious rabbits. *Circ Res* 82, 496-502.
- Liu, R., and Persson, A. E. (2004). Angiotensin II stimulates calcium and nitric oxide release from Macula densa cells through AT1 receptors. *Hypertension* 43, 649-653.
- Lloyd-Jones, D. M., and Bloch, K. D. (1996). The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* 47, 365-375.
- Matsumura, Y., Egi, Y., Maekawa, H., Miura, A., Murata, S., and Morimoto, S. (1995). Enhancement of norepinephrine and angiotensin II-induced renal effects by NG-nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor. *Biol Pharm Bull* 18, 496-500.

- Mattson, D. L., and Meister, C. J. (2005). Renal cortical and medullary blood flow responses to L-NAME and ANG II in wild-type, nNOS null mutant, and eNOS null mutant mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R991-997.
- Mattson, D. L., and Wu, F. (2000). Nitric oxide synthase activity and isoforms in rat renal vasculature. *Hypertension* 35, 337-341.
- McKeogh, D. F., O'Donoghue, T. L., and Brooks, V. L. (2004). NO and endogenous angiotensin II interact in the generation of renal sympathetic nerve activity in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H1258-1265.
- Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.
- Mundel, P., Bachmann, S., Bader, M., Fischer, A., Kummer, W., Mayer, B., and Kriz, W. (1992). Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42, 1017-1019.
- Ohia, S. E., and Jumblatt, J. E. (1993). Prejunctional receptors and second messengers for angiotensin II in the rabbit iris-ciliary body. *Exp Eye Res* 57, 419-425.
- Ollerstam, A., Pittner, J., Persson, A. E., and Thorup, C. (1997). Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 99, 2212-2218.
- Ortiz, P. A., and Garvin, J. L. (2003). Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R628-638.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S., and Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153, 1251-1256.

- Parekh, N., Dobrowolski, L., Zou, A. P., and Steinhausen, M. (1996). Nitric oxide modulates angiotensin II- and norepinephrine-dependent vasoconstriction in rat kidney. *Am J Physiol* 270, R630-635.
- Patzak, A., Kleinmann, F., Lai, E. Y., Kupsch, E., Skelweit, A., and Mrowka, R. (2004). Nitric oxide counteracts angiotensin II induced contraction in efferent arterioles in mice. *Acta Physiol Scand* 181, 439-444.
- Patzak, A., Lai, E., Persson, P. B., and Persson, A. E. (2005). Angiotensin II-nitric oxide interaction in glomerular arterioles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 410-414.
- Patzak, A., Lai, E. Y., Mrowka, R., Steege, A., Persson, P. B., and Persson, A. E. (2004). AT1 receptors mediate angiotensin II-induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney Int* 66, 1949-1958.
- Patzak, A., Mrowka, R., Storch, E., Hocher, B., and Persson, P. B. (2001). Interaction of angiotensin II and nitric oxide in isolated perfused afferent arterioles of mice. *J Am Soc Nephrol* 12, 1122-1127.
- Patzak, A., and Persson, A. E. (2007). Angiotensin II-nitric oxide interaction in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16, 46-51.
- Patzak, A., Steege, A., Lai, E. Y., Brinkmann, J. O., Kupsch, E., Spielmann, N., Gericke, A., Skalweit, A., Stegbauer, J., Persson, P. B., and Seeliger, E. (2008). Angiotensin II response in afferent arterioles of mice lacking either the endothelial or neuronal isoform of nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R429-437.
- Paulus, W. J., and Shah, A. M. (1999). NO and cardiac diastolic function. *Cardiovasc Res* 43, 595-606.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M., and Moncada, S. (1987). The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148, 1482-1489.
- Ramchandran, R., Takezako, T., Saad, Y., Stull, L., Fink, B., Yamada, H., Dikalov, S., Harrison, D. G., Moravec, C., and Karnik, S. S. (2006). Angiotensinergic

- stimulation of vascular endothelium in mice causes hypotension, bradycardia, and attenuated angiotensin response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19087-19092.
- Ren, Y. L., Garvin, J. L., and Carretero, O. A. (2000). Role of macula densa nitric oxide and cGMP in the regulation of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int* 58, 2053-2060.
- Rikitake, Y., Hirata, K., Kawashima, S., Ozaki, M., Takahashi, T., Ogawa, W., Inoue, N., and Yokoyama, M. (2002). Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 108-114.
- Saito, S., Hirata, Y., Emori, T., Imai, T., and Marumo, F. (1996). Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT1 receptors. *Hypertens Res* 19, 201-206.
- Sallstrom, J., Carlstrom, M., Jensen, B. L., Skott, O., Brown, R. D., and Persson, A. E. (2008). Neuronal nitric oxide synthase-deficient mice have impaired renin release but normal blood pressure. *Am J Hypertens* 21, 111-116.
- Sanchez-Mendoza, A., Hong, E., and Escalante, B. (1998). The role of nitric oxide in angiotensin II-induced renal vasoconstriction in renovascular hypertension. *J Hypertens* 16, 697-703.
- Savoia, C., Ebrahimian, T., He, Y., Gratton, J. P., Schiffrin, E. L., and Touyz, R. M. (2006). Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J Hypertens* 24, 2417-2422.
- Schwarz, P., Diem, R., Dun, N. J., and Forstermann, U. (1995). Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. *Circ Res* 77, 841-848.
- Schwobel, J., Fischer, T., Lanz, B., and Mohaupt, M. (2000). Angiotensin II receptor subtypes determine induced NO production in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F1092-1100.

- Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C., and Smithies, O. (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13176-13181.
- Siragy, H. M., and Carey, R. M. (1999). Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 33, 1237-1242.
- Siragy, H. M., Inagami, T., Ichiki, T., and Carey, R. M. (1999). Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT2) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6506-6510.
- Speth, R. C., Thompson, S. M., and Johns, S. J. (1995). Angiotensin II receptors. Structural and functional considerations. *Adv Exp Med Biol* 377, 169-192.
- Stegbauer, J., Vonend, O., Habbel, S., Quack, I., Sellin, L., Gross, V., and Rump, L. C. (2005). Angiotensin II modulates renal sympathetic neurotransmission through nitric oxide in AT2 receptor knockout mice. *J Hypertens* 23, 1691-1698.
- Stegbauer, J., Vonend, O., Oberhauser, V., Sellin, L., and Rump, L. C. (2005). Angiotensin II receptor modulation of renal vascular resistance and neurotransmission in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res* 28, 20-26.
- Stoos, B. A., and Garvin, J. L. (1997). Actions of nitric oxide on renal epithelial transport. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24, 591-594.
- Tanioka, H., Nakamura, K., Fujimura, S., Yoshida, M., Suzuki-Kusaba, M., Hisa, H., and Satoh, S. (2002). Facilitatory role of NO in neural norepinephrine release in the rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R1436-1442.
- Thorup, C., Erik, A., and Persson, G. (1996). Macula densa derived nitric oxide in regulation of glomerular capillary pressure. *Kidney Int* 49, 430-436.
- Thorup, C., Kornfeld, M., Winaver, J. M., Goligorsky, M. S., and Moore, L. C. (1998). Angiotensin-II stimulates nitric oxide release in isolated perfused renal resistance arteries. *Pflugers Arch* 435, 432-434.

- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A., and Smith, R. D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45, 205-251.
- Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Hohle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., and Zhu, Y. Z. (1996). Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 14, S95-103.
- Vaneckova, I., Kramer, H. J., Maly, J., Backer, A., Bokemeyer, D., and Cervenka, L. (2002). Lack of a role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the renal function in rats fed a low-sodium diet. *Kidney Blood Press Res* 25, 224-231.
- Vonend, O., Habbel, S., Stegbauer, J., Roth, J., Hein, L., and Rump, L. C. (2007). Alpha(2A)-adrenoceptors regulate sympathetic transmitter release in mice kidneys. *Br J Pharmacol* 150, 121-127.
- Walkowska, A., Badzyska, B., Kompanowska-Jezierska, E., Johns, E. J., and Sadowski, J. (2005). Effects of renal nerve stimulation on intrarenal blood flow in rats with intact or inactivated NO synthases. *Acta Physiol Scand* 183, 99-105.
- Walkowska, A., Kompanowska-Jezierska, E., and Sadowski, J. (2004). Nitric oxide and renal nerves: comparison of effects on renal circulation and sodium excretion in anesthetized rats. *Kidney Int* 66, 705-712.
- Weiss, M. L., Chowdhury, S. I., Patel, K. P., Kenney, M. J., and Huang, J. (2001). Neural circuitry of the kidney: NO-containing neurons. *Brain Res* 919, 269-282.
- Yamamoto, R., Wada, A., Asada, Y., Yanagita, T., Yuhi, T., Niina, H., Sumiyoshi, A., Kobayashi, H., and Lee, T. J. (1997). Nitric oxide-dependent and -independent norepinephrine release in rat mesenteric arteries. *Am J Physiol* 272, H207-210.
- Yan, C., Kim, D., Aizawa, T., and Berk, B. C. (2003). Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 26-36.
- Zhang, C., Hein, T. W., Wang, W., and Kuo, L. (2003). Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. *Circ Res* 92, 322-329.

## 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. L. C. Rump gilt mein besonderer Dank, für die Überlassung des Themas meiner Dissertation sowie für die großzügige Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen mit der Ermöglichung zur Durchführung dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. J. Stegbauer für sein großes Engagement und die wertvolle geduldige Begleitung meiner Dissertation von der Planung über die Durchführung bis zur Auswertung meiner Experimente. Vielen Dank für die exzellente Betreuung und die stetig kritische und konstruktive wissenschaftliche Unterstützung.

Danken möchte ich ebenfalls Dr. med. vet. Sina Habel für die Einführung in die mikroskopische Operationstechnik und die praktische Durchführung der Versuchsreihen. Ihre stete Hilfsbereitschaft und die gemeinsame freundschaftliche Zusammenarbeit erleichterten mir das Arbeiten immens.

Weiterhin danke ich Bettina Priesch und Blanka Duvnjak, die als hilfsbereite Ansprechpartner eine große Unterstützung in jeder Hinsicht waren.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir auf meinem Weg immer zur Seite stand und mich Zeit meines Lebens beruflich wie auch privat unterstützt und bestärkt hat. Ihr Vertrauen und ihre Fürsorge waren mir eine unvergleichbar große Hilfe, ohne die das alles nie möglich gewesen wäre.

## **Vorabveröffentlichung**

Stegbauer, J., Kuczka, Y., Vonend, O., Quack, I., Sellin, L., Patzak, A., Steege, A., Langnaese, K., and Rump, L.C. (2008).

*Endothelial nitric oxide synthase is predominantly involved in Angiotensin II modulation of renal vascular resistance and norepinephrine release.*

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294, R421-428.