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

**Effekte von Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)
auf Angiotensin II - induzierte Hypertonie**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Yuriko Mori
2014

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

gez.:

Dekan	Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Erster Gutachter	Priv.-Doz. Dr. med. Ivo Quack
Zweiter Gutachter	Priv.-Doz. Dr. med. Christian Heiß

Jahr der Promotion 2014

Zusammenfassung

Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), ein Zytokin der Interleukin 6-Familie, ist bekannt für seine potentiell überlebensfördernden Effekte auf Neurone und Gliazellen. Seine Auswirkung außerhalb des zentralen und peripheren Nervensystems ist jedoch bislang kaum untersucht.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von CNTF in der Angiotensin II-vermittelten Hypertonie zu untersuchen. Für die Experimente wurden Wildtypmäuse mit CNTF-defizienten Tieren auf C57/Bl6-Hintergrund verglichen. Die Hypertonie wurde durch Abgabe von Angiotensin II aus subkutan implantierten osmotischen Minipumpen induziert. Unter Therapie entwickelten die Wildtypmäuse einen ausgeprägten Hypertonus, wohingegen der Blutdruck bei den CNTF-defizienten Tieren signifikant niedriger war. Der geringere Blutdruck führte zu einer signifikant besseren Überlebensrate bei den CNTF-defizienten Tieren. Nach der Angiotensin II-Infusion über 14 Tage fand sich bei den Wildtypmäusen ein deutlich hypertrophiertes Myokard, verstärkte renale Inflammation sowie Zeichen einer tubulären Schädigung in der Niere, während die genannten Größen bei den CNTF-KO-Mäusen kaum erhöht waren. Mit dem Ziel den Pathomechanismus der Blutdrucksteigerung durch CNTF herauszuarbeiten, wurde die Vasomotorik des renalen Gefäßbettes im Modell der isoliert perfundierten Niere untersucht. Hier war die Vasokonstriktion der CNTF-defizienten Nieren unter Angiotensin II-Infusion signifikant geringer ausgeprägt, als die der Wildtypen. Durch Versuchen mit pharmakologischen Inhibitoren konnte schließlich die Januskinase 2 (JAK2) als ein Schlüsselmolekül für die Regulation der CNTF-vermittelten vasokonstriktorischen Signalkaskade identifiziert werden. Zur weiteren Differenzierung der intrazellulären Signaltransduktionsvorgänge wurde eine *in vitro* Analyse in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) aus Mauseaorten angeschlossen. Die Stimulation von VSMC mit CNTF zeigte, dass der Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), welcher durch JAK2 aktiviert wird, nach der Gabe von CNTF stärker phosphoryliert wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Angiotensin II und CNTF in VSMC möglicherweise eine synergistische Rolle spielen, die gemeinsam über den JAK2-STAT3-Signalweg vermittelt wird. Der pharmakologische Eingriff in diese Signalkaskade, die mit der Angiotensin II-induzierten Endotheldysfunktion im engen Zusammenhang zu stehen scheint, könnte daher in Zukunft bei der Entwicklung neuer Strategien in der Therapie eines Bluthochdrucks von Bedeutung sein.

Abkürzungsverzeichnis

Ang II	Angiotensin II
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arhgef1	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 1
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1
bpm	beat per minute
BCA	Bicichoninic Acid
BSA	Bovine Serum Albumin
CD2AP	CD2-Associated Protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CKD	Chronic Kidney Disease
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTFR α	Ciliary Neurotrophic Factor Receptor α
CT1	Cardiotrophin 1
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol
DBH	Dopamine Beta Hydroxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase ½
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FP	Forward Primer

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine Exchange Factor
gp130	Glycoprotein 130
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosine Triphosphate
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney-Zellen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
hsp	Heat Shock Protein
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin-6
IP ₃	Inositoltriphosphat
JAK2	Janus Kinase 2
KO	Knockout
l	Liter
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR β	Leukemia Inhibitory Factor Receptor β
Log	Logarithmus
M	Molar (mol/l)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mRNA	Messenger RNA (Ribonukleinsäure)
min	Minute
MYPT	Myosin Phosphatase Target Subunit
NA	Noradrenalin
NDS	Normal Donkey Serum
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
OSM	Onkostatin M
p	Phospho
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor Type 1

PCR	Polymerase Chain Reaktion
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaktion (= Real Time PCR)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pyk2	Protein-tyrosine kinase 2-beta
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted, auch bekannt als CCL5 (CC-chemokine ligand 5)
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Renal Nerve Stimulation
ROS	Reactive Oxygen Species
RP	Rückwärtsprimer
rpm	Revolutions per Minute
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SEM	Standard Error of the Mean
SM	Smooth Muscle
SOCS	Suppressor of Cytokine-Signaling
Src	Sarcoma / Proto-Oncogenic Tyrosine Kinase
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TAE-Puffer	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TH	Tyrosine Hydroxylase
Two-way ANOVA	Two-way Analysis of Variance
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
VLE	Very Low Endotoxin
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells

WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Abkürzungsverzeichnis	ii
1 Einleitung	1
1.1 Angiotensin II.....	1
1.2 Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)	4
1.3 Vorarbeiten zur Rolle von CNTF in der Niere.....	6
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	7
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Material	8
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	8
2.1.2.Chemikalien und Reagenzien.....	10
2.1.3 Puffer und Lösungen	12
2.1.4 Primer	13
2.1.5 Antikörper	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Versuchstiere	17
2.2.2 Das Modell der Ang II-induzierten Hypertonie <i>in vivo</i>	17
2.2.2.1 Allgemeiner Versuchsablauf.....	17
2.2.2.2 Anästhesie der Mäuse.....	18
2.2.2.3 Uninephrektomie der Mäuse	18
2.2.2.4 Implantation der Ang II-Pumpe	18
2.2.2.5 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung.....	19

2.2.2.6 Sammlung der Urine	19
2.2.2.7 Bestimmung der Albumin- und Kreatininwerte aus den Urinen.....	19
2.2.2.8 Organentnahme	19
2.2.3 Das Modell der Ang II-induzierten Hypertonie <i>ex vivo</i> (Isoliert perfundierte Mausniere).....	20
2.2.3.1 Präparation der Niere	20
2.2.3.2 Bestimmung der Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurve.....	20
2.2.3.3 Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurve.....	21
2.2.4 Bestimmung des Neurotransmitters Noradrenalin	21
2.2.4.1 Probenaufbereitung für HPLC	21
2.2.4.2 Auswertung	22
2.2.5 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.5.1 Genexpressionsanalyse.....	22
2.2.5.1.1 RNA-Isolierung aus dem Gewebe.....	22
2.2.5.1.2 Reverse Transkription.....	23
2.2.5.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung	23
2.2.5.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.5.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.5.1.6 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)	24
2.2.5.2 Proteinanalyse	25
2.2.5.2.1 Proteinextraktion aus Nieren	25
2.2.5.2.2 Proteinextraktion aus Aorta	25
2.2.5.2.3 Messung der Proteinkonzentration (BCA-Assay)	26
2.2.5.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.2.5.2.5 Western Blot.....	27
2.2.5.2.6 Bildgebung und Auswertung (Densitometrie).....	27
2.2.6 Histologie und Immunhistologie.....	28
2.2.6.1 Herstellung der Paraffinschnitte.....	28

2.2.6.2	Masson-Trichrom-Färbung	28
2.2.6.3	Herstellung der Kryoschnitte	29
2.2.6.4	Immunfluoreszenzfärbung auf Kryoschnitten.....	29
2.2.6.5	Immunfluoreszenzfärbung der vaskulären glatten Muskelzellen.....	30
2.2.7	Zellkultur	30
2.2.7.1	Isolation der vaskulären glatten Muskelzellen	30
2.2.7.2	A7r5 Zellen	30
2.2.7.3	Zellkultur der vaskulären glatten Muskelzellen	31
2.2.7.4	Stimulationsversuch mit vaskulären glatten Muskelzellen	31
2.2.8	Statistik.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Genotypisierung der CNTF-Knockout-Mäuse.....	33
3.2	Das Ergebnis aus dem Modell der Ang II-induzierten Hypertonie <i>in vivo</i>	33
3.2.1	Kaplan-Meier-Überlebenskurve.....	33
3.2.2	Blutdruck.....	34
3.2.3	Herzfrequenz	35
3.2.4	Herzhypertrophie.....	36
3.2.5	Proteinurie	36
3.2.5.1	Albuminmessung im Urin	36
3.2.5.2	Analyse der Genexpression von Proteinen der glomerulären Schlitzmembran	37
3.2.5.3	Immunfluoreszenzfärbung der Schlitzmembranproteine	39
3.2.6	Histologie	40
3.2.7	Genexpression in der Niere	43
3.3	Potentielle Mechanismen der Resistenz von CNTF-defizienten Tieren gegenüber der Induktion eines Hypertonus durch Angiotensin II	47
3.3.1	Sympathikus	48

3.3.1.1 Noradrenalingehalt im Urin	48
3.3.1.2 Noradrenalingehalt in der Niere	49
3.3.1.3 Dopamin- β -Hydroxylase	49
3.3.2 Effekte von CNTF auf die renale Vasokonstriktion : Isoliert perfundierte Niere (ex-vivo-Versuch)	50
3.3.2.1 Effekt des CNTF-Knockouts auf die Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurve	51
3.3.2.2 Effekt von JAK2- Inhibitor auf die Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurve	51
3.3.2.3 Effekt von exogen appliziertem CNTF auf die Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurve	53
3.4 Versuche mit vaskulären glatten Muskelzellen (<i>in-vitro</i> -Versuche) und Aorten	54
3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung nach α -Aktin (glattmuskulzell-spezifisch)	54
3.4.2 Immunoblot nach α -Aktin (glattmuskulzell-spezifisch)	55
3.4.3 Nachweis der Genexpression von Rezeptorkomponenten in VSMC	55
3.4.4 Nachweis der Aktivierung der STAT3-Signalwege auf Stimulation mit CNTF in VSMC	57
4 Diskussion	59
4.1 Blutdruck bei Wildtyp- und CNTF-Knockout-Mäusen	59
4.2 Hypertensive Endorganschäden	60
4.3 Unterschiede der Blutdruckregulation bei Wildtyp- und CNTF-Knockout-Mäusen	62
4.3.1 Sympathikus	62
4.3.2 Vasokonstriktion	63
4.3.3 Vaskuläre glatte Muskelzellen	65
Literaturverzeichnis	68

1 Einleitung

Die arterielle Hypertonie wird, als systolischer Druck höher als 140 mmHg und/oder diastolischer Druck höher als 90 mmHg definiert (Whitworth 2003). In den Industrieländern hat sie eine sehr hohe Prävalenz. In Deutschland leiden 42,1 Prozent der Frauen und 50,3 Prozent der Männer im Alter von 18 bis 79 Jahren unter einer arteriellen Hypertonie (Wolf-Maier et al. 2003; Steckelings et al. 2004). Die Prävalenz nimmt mit dem Lebensalter weiter zu. Die arterielle Hypertonie ist ein Hauptrisikofaktor für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit, dem Schlaganfall oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) stellt einen Schlüsselmechanismus in der Regulation des Blutdrucks sowie des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes des Organismus dar. Durch seine Rolle in der Vasokonstriktion sowie in der strukturellen Änderung der Blutgefäße trägt das RAAS wesentlich zur Entstehung und Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie bei. Daher ist es ein Angriffspunkt wichtiger antihypertensiver Medikamente wie ACE-Hemmer, AT₁-Blocker, Renininhibitoren oder Aldosteronantagonisten.

1.1 Angiotensin II

Angiotensin II (Ang II) nimmt eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation des RAAS als biologisch aktives Peptid ein. Angiotensin II ist ein Oktapeptid, das durch enzymatische Spaltung durch das Angiotensin Converting Enzym (ACE) am Carboxylende aus dem Dekapeptid Angiotensin I entsteht. Angiotensin I entsteht durch enzymatische Spaltung von Angiotensinogen (ein α 2-Globulin, das in der Leber synthetisiert wird) durch Renin (eine Endopeptidase, die in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet wird). Der primäre Stimulus der Renin-Freisetzung (und damit letztlich auch der Bildung von Ang II) ist ein erniedrigter Blutdruck in der afferenten Arteriole oder eine niedrige Natriumkonzentration im distalen Tubulus.

Ang II wirkt nicht nur durch den unten beschriebenen Mechanismus in den vaskulären glatten

Muskelzellen (VSMC) direkt vasokonstriktorisch, sondern reguliert auch durch die Synthese von Aldosteron die Natriumexkretion und somit das Plasmavolumen und beeinflusst die Sympathikusaktivität. Darüber hinaus spielt Ang II eine fundamentale Rolle in der pathologischen Adaptation der Gefäßwand und der verschiedenen anderen Organe, wie z.B. im Myokard nach dem Myokardinfarkt. Diese sogenannte Remodeling des Gewebes geschieht durch aktive Beteiligung von Ang II an den verschiedenen zellulären Mechanismen wie Zellwachstum und Differenzierung, Apoptose, Zellmigration und Deposition von extrazellulärer Matrix (Ruiz-Ortega et al. 2002; Touyz et al. 2005; Abb. 1).

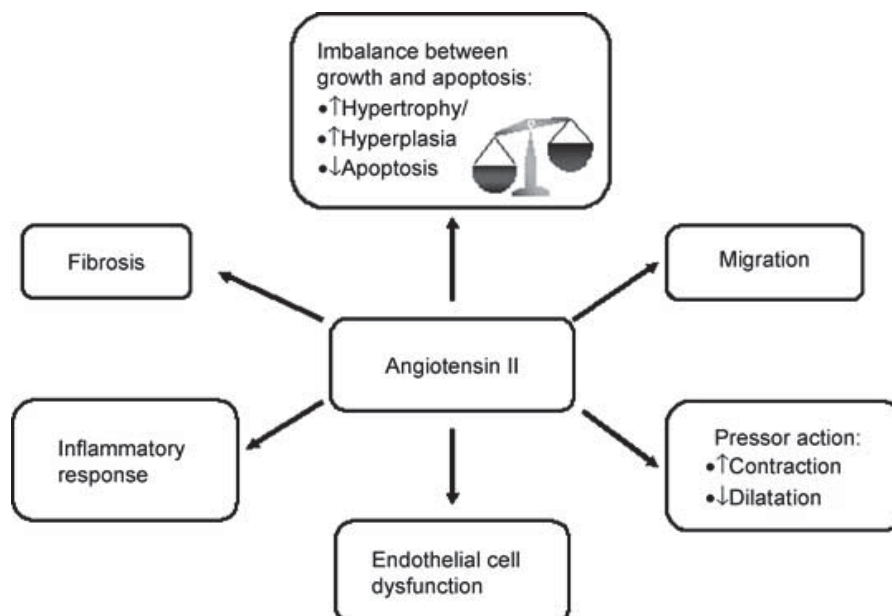


Abbildung 1: Überblick des zellulären Mechanismus von Angiotensin II (Touyz et al. 2005)

Die genannten Effekte von Ang II werden über den AT₁-Rezeptor vermittelt. Der AT₁-Rezeptor ist ein aus sieben Helices bestehender transmembranöser Rezeptor, der an dem G-Protein (ein heterotrimetrisches Protein, das aus α -, β - und γ -Untereinheiten besteht) gekoppelt ist. Die Bindung von Ang II an den AT₁-Rezeptor löst mehrere intrazelluläre Signalkaskaden aus, die je nach Geschwindigkeit der Aktivierung in eine schnelle, mittelschnelle und langsame Signalaktion zu unterscheiden sind (Touyz et al. 1995). Zu den schnell aktivierten Signalaktionen

zählen die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und Sarcoma / proto-oncogenic tyrosine kinase (Src), die innerhalb von Sekunden geschehen. Die Phosphorylierung von Phospholipase A₂ (PLA₂), Phospholipase D (PLD), Tyrosinkinase und Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) geschieht innerhalb von Minuten und zählt zu den mittelschnellen Signalaktionen. Die Generierung des oxidativen Stress, Expression der Protoonkogene oder Signal für die Proteinsynthese geschieht innerhalb von Stunden und zählt zu den langsamen Signalaktionen.

Trotz intensiver Forschung ist bisher nur unvollständig geklärt, über welche intrazellulären Signalwege Ang II seine vielfältigen Effekte vermittelt. Insbesondere der Mechanismus, wie Ang II in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) die Signale zur Vasokonstriktion vermittelt, blieb bislang unklar. Erst neulich wurde von Guilluy et al. postuliert, dass Ang II in VSMC über Janus Kinase 2 (JAK2)-Signalwege die Signale für die Vasokonstriktion zu vermitteln scheint. Demnach geht die Signaltransduktion in folgender Reihenfolge: Die Bindung von Ang II an den AT₁-Rezeptor führt zur Konzentrationszunahme des intrazellulären Kalziums durch die Aktivierung von Phospholipase C (PLC)-Inositoltriphosphat (IP₃)-Kaskade. Die Kalziumionen führen in höherer Konzentration möglicherweise über die Aktivierung von Protein-tyrosine kinase 2-beta (Pyk2) und Src zur Phosphorylierung von JAK2. Die phosphorylierte JAK2 kann die membranständige Guanine nucleotide exchange factor (Arhgef1) aktivieren, die wie eine Art molekularer Schalter funktionieren kann, die zwischen einer unphosphorylierten, inaktiven Form (RhoA-GDP) und einer phosphorylierten, aktiven Form (RhoA-GTP) pendeln kann. Als phosphorylierte Form kann er die RhoA-Kinase aktivieren. Die aktivierte RhoA-Kinase wiederum phosphoryliert Myosin Phosphatase Target Subunit (MYPT), der die Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP) hemmt. Bei gehemmten MLCP kann die phosphorylierte Myosin Light Chain (MLC) nicht mehr dephosphoryliert werden, so dass die VSMC im Zustand der Kontraktion aufrechterhalten wird.

Denn die MLC, im Myosinköpfchen an beiden Enden eines Myosinfilamentes befindend, löst durch die Phosphorylierung eine Kopfrotation des Myosinköpfchens aus, wodurch die Filamentverschiebung der Aktin- und Myosinfilamente stattfindet (Guilley et al. 2010; Abb. 2).

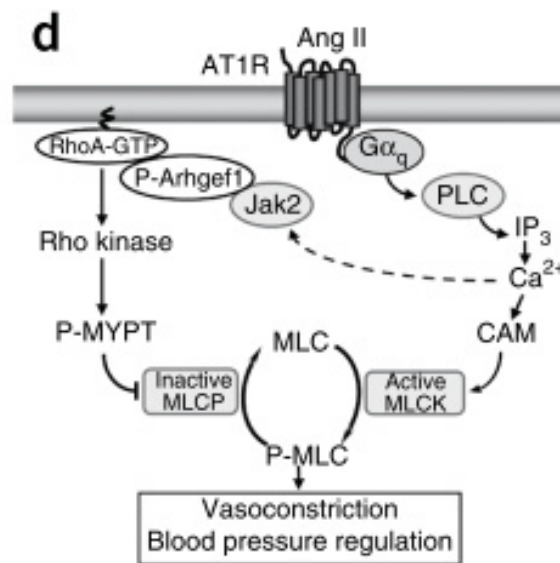


Abbildung 2: Überblick der intrazellulären Signalwege, durch die Ang II in VSMC eine Kontraktion auslöst (Guilluy et al. 2010).

1.2 Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)

Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) wurde 1979 erstmalig aus dem Ganglion Ciliare eines Hühnerembryos isoliert und nach seiner Fähigkeit, das Überleben von parasymphatischen Neuronen des Ganglions zu fördern, benannt (Adler et al. 1979). Zunehmend wurde bekannt, dass CNTF nicht nur bei den embryonalen parasymphatischen Neuronen, sondern auch bei verschiedenen anderen embryonalen und nicht-embryonalen Neuronen neurotrophische und gleichzeitig überlebensfördernde Wirkung ausübt. Zu solchen Neuronen gehören periphere sensorische Neurone (Barbin et al. 1984), sympathische Neurone (Barbin et al. 1984; Ernsberger et al. 1989), hippocampale Neurone (Ip et al. 1991) sowie kraniale und spinale Motoneurone (Sendtner et al. 1990). Es wurde bereits gezeigt, dass CNTF nicht nur in den Neuronen und Gliazellen im zentralen und peripheren Nervensystem, sondern auch in anderen extraneuronalen Organen wie Herz, Lunge, Leber, Niere oder Hoden exprimiert ist (Ohta et al. 1995).

Aus klinisch therapeutischer Hinsicht ist die Tatsache von Interesse, dass CNTF nicht nur überlebens- und differenzierungsfördernde Effekte auf kultivierte Motoneurone *in vitro* aufweist, sondern auch, wenn exogen appliziert, die Progression von einigen Motoneuronenerkrankungen *in*

vivo zu hemmen scheint. Sendtner et al. haben im Rattenmodell gezeigt, dass exogen appliziertes CNTF die Degeneration der Motoneurone des Nucleus facialis nach Axotomie hemmt (Sendtner et al. 1990). Die gleichen Autoren zeigten im Mausmodell der humanen spinalen Motoneuronenerkrankung, dass die CNTF behandelte Gruppe signifikant weniger degenerierende Motoneurone aufweist (Sendtner et al. 1992). Im Mausmodell der Multiplen Sklerose (EAE; Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) ist die Rolle von CNTF ausgiebig erforscht worden. Hier wurde gezeigt, dass in der Gruppe von CNTF-Knockout-Mäusen die klinischen Symptome der Multiplen Sklerose nicht nur früher einsetzen, sondern auch schwerer verlaufen (Linker et al. 2002). Im Tiermodell der Chorea Huntington wurde ebenfalls ein Therapieerfolg berichtet (Bloch et al. 2004), während der klinische Versuch, CNTF systemisch bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) einzusetzen, keine positive Effekte erbrachte. Hierbei wurde die Wirksamkeit der subkutan injizierten rekombinanten CNTF gegen Placebo bei 1300 Patienten mit ALS über den Zeitraum von 6 Monaten geprüft. Das Ergebnis zeigte kein Unterschied am Überleben. Stattdessen wurden vermehrt unerwünschte schwere Nebenwirkungen wie Kachexie und gastrointestinale Symptome beobachtet (Miller et al. 1996).

Molekularbiologisch wird CNTF (ein aus vier α -Helices bestehendes Peptid von 22 kDa) als ein Zytokin der Interleukin-6 (IL-6)-Rezeptorfamilie klassifiziert. Zu dieser Rezeptorfamilie gehören IL-6, IL-11, Leukemia inhibitory factor (LIF), Oncostatin M (OSM) und Cardiotrophin-1. CNTF löst eine Signaltransduktion in die Zelle durch die Bindung an einen Rezeptor aus, welcher aus drei Teilen besteht: CNTF-Rezeptor α (CNTFR α) und zwei signalleitende Einheiten LIF-Rezeptor β (LIFR β) und Glykoprotein 130 (gp130), wobei CNTFR α sich als ein nicht an Signalsendung beteiligtes, GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-geankertes Peptid darstellt (Davis et al. 1993; Suzuki et al. 2009; Abb. 3).

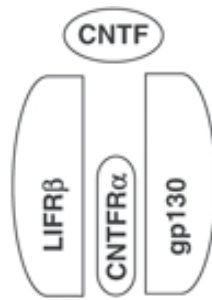


Abbildung 3: Struktur des CNTF Rezeptorkomplexes bestehend aus dem CNTF-Rezeptor α (CNTFR α), dem LIF-Rezeptor β (LIFR β) und Glykoprotein 130 (gp130) (Suzuki et al. 2009).

Es ist bekannt, dass CNTF intrazellulär eine Signalkaskade über JAK2/STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) auslöst. Die Aktivierung von STAT3 steigert bekannterweise die Transkription von neuroprotektiven Molekülen wie Fibroblast Growth Factor (FGF), Epidermal Growth Factor (EGF) und Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) (Heinrich et al. 2003). Es ist jedoch noch weitgehend unklar, durch welchen molekularen Mechanismus CNTF die neuroprotektive bzw. antiapoptotische Wirkung entfaltet.

1.3 Vorarbeiten zur Rolle von CNTF in der Niere

Es gibt wenige Vorarbeiten zur Rolle von CNTF in der Niere. Yang et al. untersuchten im Ischämie-Reperusionsmodell bei Ratten die Genexpression von CNTF. Hier zeigte sich, dass nach einem ischämischen Ereignis die Genexpression von CNTF in regenerierenden proximalen Tubuluszellen hoch reguliert wird (Yang et al. 2001). Diese Tatsache spricht dafür, dass CNTF möglicherweise für regenerierende zelluläre Prozesse von Bedeutung ist. Eine andere Vorarbeit über die renale Wirkung von CNTF ist von Ransom et al., die bei murinen Podozyten eine Proteomanalyse durchgeführten. Hier wurden die kultivierten differenzierten murinen Podozyten mit Dexamethason in Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ für 30 Minuten behandelt. Die daraufhin durchgeführte Proteomanalyse zeigte, dass die Expression von drei Proteinen nach Behandlung mit Dexamethason zunimmt: CNTF, αB -Crystallin und Heat shock protein 27 (hsp27) (Ransom et al. 2005). Dieses Ergebnis legt nahe, dass CNTF eine Rolle als Mediator für die Wirkung von Steroiden zukommen könnte.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit geklärt werden:

- 1) Welche Rolle spielt CNTF bei der Angiotensin II vermittelten Hypertonie?
- 2) Wie beeinflusst CNTF das Ausmaß der Endorganschäden?
- 3) Über welchen Mechanismus werden die Effekte vermittelt?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Osmotische Pumpe

Micro-osmotic pump Model 1004; 0,11 µl per hour, 28 days (Alzet, CA, U.S.A)

Micro-osmotic pump Model 1002; 0,25 µl per hour, 14 days (Alzet, CA, U.S.A)

Materialien für die Mausoperation

Olympus SD 30 Mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D)

Augensalbe (Polyspectran HC, Alcon)

Feine Schere (gerade, 11.5 cm, Martin)

Strabismus-Federschere (gerade/gebogen, 11.5 cm, Martin)

Mosquitoklemmen (gebogen, 12.5 cm, Martin)

Anatomischen Pinzetten (fein, gebogen, 10.5 cm, Martin)

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

Ligaturfaden (Seraflex USP 5/0, EP1, nicht-resorbierbare Seide, Serag-Wiessner)

Ligaturfaden (Miralene, USP 4/0, metric 1.5, nichtresorbierbar, Braun)

Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0.61 mm, Innen-Ø 0.28 mm, neoLab, Heidelberg)

Polyethylenschlauch (Portex, Kent, UK; Innendurchmesser 0.75 mm,

Außendurchmesser 1.22 mm)

Filter 0.45 µm (Millex-AA, Millipore)

Anlage für die isoliert perfundierte Niere

Umwälzthermostaten DC10-P5/U (Roth)

Statham P23 Db Druckaufnehmer (Gould Inc., Oxnard, Kalifornien, USA)

Planetengetriebene Pumpe (Abimed, Gilson, Minipuls 2, Langenfeld, D)

Perfusor (Harvard Pump 11 Plus Dual Syringe, Harvard Apparatus, MA, USA)

Watanabe Schreiber (Graphtec Corp., Tokyo, Japan)

MLT844 Physiological Pressure Transducer (ADInstruments)

Blutdruckmessgerät

BP98A (Softron, Tokyo, Japan)

Anlage für die Sammlung von Urinen

Metabolische Käfige (Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg, D)

Geräte für die RNA- und Proteinaufarbeitung

Mastercycler (Eppendorf, D)

7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, D)

Thermomixer (Eppendorf)

Centrifuge 5417R (Eppendorf)

BioPhotometer (Eppendorf)

Tissue Ruptor (Qiagen, Valencia, CA, USA)

Elektrophoresegerät: PowerPac Universal (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

Potter S Tissue Homogenisator (Sartorius)

ELISA Platten Reader: MTX Spectramax 250 (MTX, USA)

Geräte und Materialien für die Histologie/Immunhistochemie

Schlittenmikrotom (zur Herstellung von Paraffinpräparate): Jung Histoslide 2000 (Leica Microsystems, Nussloch, D)

Gefriermikrotom (zur Herstellung von Kryopräparate): Kryostat (Leica Microsystems)

Paraffingießstation EG1120 (Leica Microsystems)

Objektträger: Superfrost Plus (ThermoScientific, Braunschweig, D)

Geräte und Materialien für die HPLC

Pumpe; 600 Controller (Waters GmbH, Eschborn, D)

Injektor: Waters 717 plus Autosampler

Detektor: Waters 460 Electrochemical Detector

Vorsäule: Waters Guard-Pack, ResloveTM C18

Säule: ProntoSil, 120-5- C18 AQ 5,0 µm (WiCom, Heppenheim, D)

Materialien für die Zellkultur

Kulturflaschen: Nunclon T25 #15636 bzw. T75 #156499 (Nunc, Roskilde, Dänemark)

Kulturplatten: 6 Well Platten #3506 (Corning Incorporated, NY, USA)

Chamber Slide (für Immunfluoreszenz): 4 Well Permanox Slide #422361V (Lab-Tek/Nunc)

Mikroskop HBO 50 (Zeiss, Köln, D)

Fotoapparate

Nikon Coolpix E995 (Nikon, Japan)

Imager (Alpha Innotech GmbH, Kasendorf, D)

Software

Isoliert perfundierte Niere: LabChart 7,3 für Windows (ADInstruments, Spechbach, D)

Statistische Auswertung: GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, CA, USA)

Imager: FluorChem FC2 (Alpha Innotech GmbH, Kasendorf, D)

Auswertung von Western Blot: AlphaView (Alpha Innotech GmbH)

HPLC: Millenium (Waters Performance PerSPECTives)

BCA Assay: Multimode Analysis Software (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)

qPCR: 7300 System Software (Applied Biosystems)

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien**Anästhetikum**

Ketavet® 100 mg/ml (Ketaminhydrochlorid; Pfizer GmbH)

Xylazin 2%® 20 mg/ml (AniMedica GmbH)

Anwendung: 1 ml Ketavet® + 1 ml Xylazin 2%® + 8 ml NaCl 0,9 % (Braun, Melsungen, D)

Inhibitoren

SB203580 (p38-Inhibitor; Carbiochem, Darmstadt, D; #559389; Mw 377,4) 5µM in DMSO

PD98059 (MEK1-Inhibitor; Carbiochem #513000; Mw 267,3) 5µM in DMSO

AG490 (JAK2-Inhibitor; Carbiochem #658401; Mw 294,3) 5µM in DMSO

Sonstige Chemikalien für die isoliert perfundierte Niere

Triethanolamine hydrochloride (Sigma-Aldrich Chemie, München; #T1502; Mw 185,65)

Recombinant Rat CNTF (R&D Systems #557-NT/CF; Mw 22,8 kDa) 100 ng/ml in PBS

Angiotensin II (Sigma #A9525; Mw 1046,18) 10 pM-100 nM in H₂O

(R-) Phenylephrine hydrochloride (Sigma #P6126)

Chemikalien und Reagenzien für SDS-PAGE und Western Blot

Prestained Protein Marker (BioLabs #P7708S; 6-175 kDa)

Rotiphorese (Roth, Karlsruhe, D; #3029.2)

TEMED (Roth #2367.2)

PMSF (Sigma #P-7626) 10mM in 100 % Isopropanol

Coumarinsäure (Sigma #C-9008)

Luminol (Fluka #09253) 250mM in DMSO

BSA (Bovine serum albumin): VWR International, Darmstadt, D

Chemikalien für die PCR und Agarosegel-Elektrophorese

SYBR Green (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Agarose (Roth) 1,5 % (w/v) in TAE-Puffer

Chemikalien für die Immunhistochemie

Normal Donkey Serum (Dianova, Hamburg, D; #017-000-001)

IS Mounting Medium DAPI (Dianova #AKS-38448)

Einbettmedium: Tissue Freezing Medium (Leica, Nussloch, Deutschland)

Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur

Kulturmedium: VLE Dulbecco's MEM mit stabilem Glutamin, mit 3,7 g/l NaHCO₃, mit 4,5 g/l D-Glukose (Biochrom, Berlin, D) mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

Enzym Mix: VLE Dulbecco's MEM Low Glukose 1,0 g/l D-Glukose (Biochrom) mit 1 % P/S (v/v), 0,2 % BSA (w/v), 0,1 % Kollagenase Typ I (w/v; Sigma), 0,1 % Kollagenase Typ III (w/v; Sigma), 0,0125 % Elastase Typ III (w/v; Sigma)

Trypsin/EDTA Solution 0,05 %/ 0,02 % (w/v) in PBS ohne Ca/Mg (Biochrom #L2143)

PBS (Phosphate buffered saline) Dulbecco w/o Ca, w/o Mg (Biochrom #L1825)

FCS (Fetal calf serum: Biochrom #S0115)

P/S (Penicillin/Streptomycin: 10,000 U/ml/10,000 µg/ml Biochrom #A2213)

Kits

RNeasy-Plus-Mini-Kit (Qiagen) für die RNA-Isolierung

QuantiTect-Kit (Qiagen) für Reverse Transkription

BCA Protein Essay-Kit (Pierce, Rockford, USA) für die Proteinbestimmung

2.1.3 Puffer und Lösungen

Krebs-Henseleit-Lösung	NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO ₄ 0,45 mM, NaHCO ₃ 25 mM, KH ₂ PO ₄ 1,03 mM, Glukose 11,1 mM, CaCl ₂ 2,5 mM, EDTA 0,067 mM, Ascorbinsäure 0,07 mM (Merck, Darmstadt, D)
1% Triton Lysispuffer	1 % Triton X-100, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM KCl, 1,25 mM EDTA, Na ₃ VO ₄ (Sodium Orthovanadate) 1 mM + Proteaseninhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim, D)
Lysispuffer (für MYPT)	50 mM Triethanolamin/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, Proteaseninhibitor-Cocktail (Roche)
Lämmli-Puffer	62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenol Blau + 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol bzw. + 50 mM DTT
Proteinwaschpuffer	323 mM Tris pH 7,5, 3,23 M NaCl, 3,23 % (v/v) Tween 20

Transferpuffer	2,48 mM Tris Base, 19,2 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
Laufpuffer	23,9 mM Tris Base, 574 mM Glycin, 3,47 mM SDS
Trenngel 7,5 %	180 mM Tris HCl, 590 mM Tris Base, 0,2 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) Rotiphorese (Acrylamid/Bisacrylamid), 0,1 % APS, 1,67 % (v/v) TEMED
Sammelgel	242 mM Tris HCl, 8 mM Tris Base, 0,2 % (w/v) SDS, 15,8 % (v/v) Rotiphorese (Acrylamid/Bisacrylamid), 0,1 % APS, 0,15 % (v/v) TEMED
TAE Puffer	40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA
ECL	0,1 M Tris pH 8,5, Coumarinsäure 88 µl, 2,5 mM Luminol (Gesamt 20 ml), 3,6 % (v/v) H ₂ O ₂
Mobile Phase (für HPLC)	NaH ₂ PO ₄ (15 mM), Citronensäure (30 mM), Na ₂ EDTA (2 mM), (-)Natriumoctylsulfonat (2.77 mM), Methanol 12% (V/V) (pH mit NaOH (10 M) auf pH 6.5 eingestellt)

2.1.4 Primer

Primer (M:Maus, R: Ratte)	Sequenz (oben FP, unten RP)	Produktgröße (bp)
Nephrin (M)	TCT TCA AAT GCA CAG CCA CCA AAA GCC AGG TTT CCA CTC CAG TC	152

Podocin (M)	GTA GTG GAC GTG GAC GAG GT CCT AAT CCA GAG GGC TTG ATG	107
CD2AP (M)	ACC TGT CAG CTG CAG AGA AGA GAC TTG AGG AGC AGC TGG TTT	104
Synaptopodin (M)	TGA AGC CCA CAT CTC CAT CA CTT CCT CTG AGT ACC CCT CCA	105
NGAL (M)	GCCCAGGACTCAACTCAGAAC CAGGCCCAACAACGTACCAC	111
MCP-1 (M)	CTT CTG GGC CTG CTG TTC A CCA GCC TAC TCA TTG GGA TC	127
RANTES (M)	CTGCTGCTTTGCCTACCTCTC CGGTTTCCTTCGAGTGACAAAC	114
TNF α (M)	ATG TCT CAG CCT CTT CTC ATT C GTC TGG GCC ATA GAA CTG ATG A	138
Kollagen 1 (M)	ATC TCC TGG TGC TGA TGG AC ACC TTG TTT GCC AGG TTC AC	154
IL-6 (M)	CAG AGG ATA CCA CTC CCA ACA GCC ATT GCA CAA CTC TTT TCT C	111
LIF (M)	CGG CAA CCT CAT GAA CCA GAT TAG GCG CAC ATA GCT TTT CC	131
CNTF (M)	CAG ACC TGA CTG CTC TTA TGG A GGT AAG CCT GGA GGT TCT CTT G	156

CNTF (R)	GGG ACC TCT GTA GCC GTT CT TCA CTC CAA CGA TCA GTG CTT	157
CNTFR α (M)	ACC CAC CAC GAA GAT CTG TGA GCA GCC AGG ACC AGA GTG AC	99
CNTFR α (R)	GCT GTG ACC TGG AGG GTA AA GTG ATA GCC GTG GTG TTG TG	425
LIFR β (M)	GGA AGT CCG TGC TCC ATC AA AAA GGA CCA CCC TCC TCC ATT A	90
LIFR β (R)	ATG ACA AAG GGT CTG CTC TCC GGC AGT TCT GAG GTC CAG TTC	157
gp130 (M)	CAC CCA GCC CCT GCT AGA CT TCT CAT CCC CAC CGT CTA CAC T	77
DBH (M)	GGG GAC GTA CTC ATC ACT TCA ACA CAT CTC CTC CAA GAT TCC A	90
AT ₁ R (M)	GCT TGG TGG TGA TCG TCA CC GGG CGA GAT TTA GAA GAA CG	75
AT ₁ R (R)	TGA TCC CTA CCC TCT ACA GCA T CAA GGC GAG ATT GAG AAG AAA GAC	128

Qiagen Primer

18S (M)	Mm_Rps18_1_SG_10x	QT00324940
18S (R)	Rn_Rnr1_1_SG	QT00199374

Gapdh (M)	Mm_Gapdh_3_SG_10x	QT01658692
-----------	-------------------	------------

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Alpha Aktin-2 (Smooth Muscle specific) (Acris Antibodies, San Diego, CA, USA; #SP6341P; 50 kDa; Rabbit) 1:2000 für WB, 1:75 für IHC

STAT3 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; 80 kDa, Rabbit) 1:1000 für WB

Phospho STAT3 (Cell Signaling #9145; Tyr705; 80 kDa, Rabbit) 1:2000 für WB

MYPT1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; #sc-25618; 130 kDa; Rabbit) 1:500 für WB

Phospho MYPT1 (Santa Cruz #sc-17556; Thr696; 130 kDa; Rabbit) 1:500 für WB

Phospho MYPT1 (Millipore, Billerica, MA, USA; #04-773; Thr 850; 130 kDa; Rabbit) 1:1000 für WB

Nephrin (Progen, Heidelberg; #GP-N2; 185 kDa; Guinea pig) 1:200 für WB, 1:50 für IHC

Podocin (Sigma-Aldrich, München, D; Rabbit) 1:500 für IHC

Sekundäre Antikörper

DyLight 488-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L) (Dianova, Hamburg; #706-486-148) 1:800 für IHC

Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit (Life Technologies, Darmstadt, D) 1:750 für IHC

Anti-Guinea Pig IgG FITC (Sigma #F7762) 1:800 für IHC

Anti-Rabbit IgG (GE Healthcare, München, D) 1:10000 für WB

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden die CNTF-Knockout (KO)-Mäuse auf dem C57BL/6-Hintergrund verwendet, die ursprünglich von Dr. R. Linker, Abteilung für Neurologie, Ruhr-Universität Bochum, bezogen wurden und in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf als Inzuchtlinie verpaart werden. Als Vergleichsgruppe wurde der entsprechende C57BL/6-Wildtyp (Harlan, Holland) verwendet. Alle Tiere waren männlichen Geschlechts und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.2.2 Das Modell der Ang II-induzierten Hypertonie *in vivo*

2.2.2.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Hier wurden zwei Gruppen von Mäusen, C57BL/6-WT und CNTF-KO, von gleichem Alter, Geschlecht und genetischem Hintergrund mit jeweils gleicher Stückzahl gebildet. Bei allen Tieren wurden zunächst eine Uninephrektomie durchgeführt. Sieben Tage später wurden die osmotischen Minipumpen (Alzet, CA, USA., Pumprate 0,25 µl/h) mit Ang II (1000 ng/kg/min; Sigma, MO, USA) für 14 Tage implantiert. Während dieses Zeitraums wurde der Blutdruck täglich durch Schwanzmanschettenplethysmographie gemessen (BP98A; Softron, Tokyo, Japan). Die Urine wurden am Tag 0, Tag 7 und Tag 13 nach der Pumpenimplantation gesammelt. Am Tag 14 wurden die Tiere getötet und die Organe entnommen. Aus den entnommenen Organen wurden die Protein- und die Genexpressionsanalyse, histologische Färbung sowie immunhistochemische Färbung durchgeführt (Abb. 4).

Studiendesign

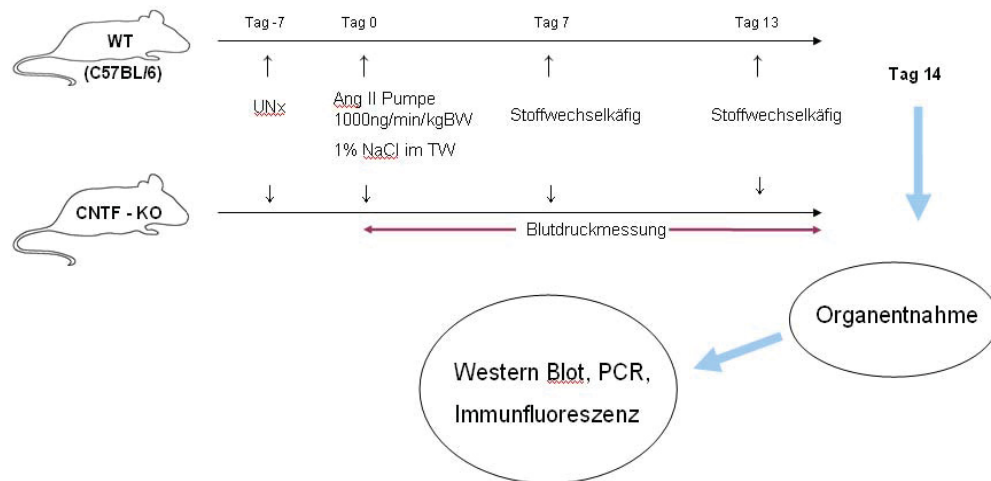


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

2.2.2.2 Anästhesie der Mäuse

Alle invasiven Eingriffe wurden unter Narkose durchgeführt. Als Anästhetikum wurde eine Mischlösung aus Ketamin (10 mg/ml; Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) und Xylazin (2 mg/ml; AniMedica GmbH, Senden-Börsensell, Deutschland) intraperitoneal injiziert.

2.2.2.3 Uninephrektomie der Mäuse

Hierbei wurde nach der Anästhesie der Maus zunächst eine Inzision von ca. 5-7 mm dorsal links lateral zur Wirbelsäule durchgeführt. Nach der Durchtrennung der darunter liegenden Muskelschicht wurde die linke Niere durch sanftes Drücken von ventral nach dorsal aus der Nierenloge und aus dem Körper luxiert. Daraufhin wurde eine hilusnahe Ligatur angelegt und gezogen. Im Anschluss wurde die Niere distal der Ligatur abgetrennt. Anschließend wurde die Muskulatur mit einer U-Naht und die Haut mit 3-4 Einzelknopfnähten wieder verschlossen.

2.2.2.4 Implantation der Ang II-Pumpe

Nach der Anästhesie wurde zunächst eine horizontale Inzision von ca. 5-7 mm am Nacken der Maus durchgeführt. Durch eine lange Pinzette wurde ein Kanal von ca. 4-5 cm dorsal am Rücken

in Längsrichtung gebildet. Daraufhin wurde die osmotische Minipumpe (Alzet, geladen mit Ang II 1000 ng/kg/min) mit der Pinzette entlang des Kanals vorgeschoben und am Ende des Kanals platziert. Anschließend wurde die Bauchmuskulatur mit einer U-Naht und die Haut mit 3-4 Einzelknopfnähten wieder verschlossen.

2.2.2.5 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung

Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden durch Schwanzmanschetten-Plethysmographie (Softron BP-98A, Softron, Tokyo, Japan) ermittelt. Hier wurden die Tiere einzeln in eine Leintasche (Softron, Tokyo, Japan) eingewickelt und in einem Thermorohr (Softron) platziert, das während des Versuchs auf einer konstanten Temperatur von 37 °C gehalten wurde. Der Blutdruck und die Herzfrequenz wurden durch den Sensor (Softron) erfasst, der an der Schwanzwurzel fixiert wurde. Bei jedem Tier wurde die Messung zehn Mal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

2.2.2.6 Sammlung der Urine

Die Uringewinnung erfolgte durch metabolische Käfige (Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg). Die Tiere wurden über Nacht (12h) einzeln in die metabolischen Käfige gesetzt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Urine, durch einen Trichter gesammelt, wurden für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde portioniert und bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.7 Bestimmung der Albumin- und Kreatininwerte aus den Urinen

Die Bestimmung der Albuminwerte erfolgte aus jeweils 100 µl Urin in einem externen Labor (CellTrend, Luckenwalde). Die Bestimmung der Kreatininwerte erfolgte aus 150 µl Urin im Zentrallabor der Uniklinik Düsseldorf (Prof. Dr. med. Boege).

2.2.2.8 Organentnahme

Unter ausreichender Narkose und anschließender Euthanasie wurde bei dem Versuchstier einen kutanen Längsschnitt am Bauch durchgeführt, gefolgt von einem Längsschnitt in die darunter liegende Muskelschicht. Bei nun frei liegendem Bauchsitus wurden die peritonealen Organe wie Magen, Darm, Leber und Milz durch vorsichtige Trennung von Ligamenti zur Seite gelegt. Anschließend wurde die Ligatur um die abdominale Aorta kurz unterhalb des Zwerchfells

vorbereitet (noch nicht zugezogen). Nach den Ligaturen der abdominalen Aorta an der iliakalen Bifurkation und kurz unterhalb des Abgangs der linken Nierenarterie wurde eine kleine Inzision an der aortalen Gefäßwand gelegt. Durch diese Inzision wurde die Aorta von distal in die proximale Richtung durch Polyethylenschlauch (Außen-Ø 0.61 mm, Innen-Ø 0.28 mm, neoLab, Heidelberg) eingeführt. Nach Kanülierung wurde die Niere mit PBS durchspült, bevor sie entnommen wurde. Von der entnommenen Niere wurden der obere und untere Nierenpol für die Protein- und Genexpressionsanalyse in gewebeschützenden Lösungsmitteln (Tissue Protect bzw. RNAlater; Qiagen) bei -20°C konserviert. Das restliche Gewebe wurde horizontal in zwei Hälften geteilt und für die Herstellung der Paraffin- und Kryoblöcke verwendet.

2.2.3 Das Modell der Ang II-induzierten Hypertonie *ex vivo* (Isoliert perfundierte Mausnieren)

2.2.3.1 Präparation der Niere

Unter der ausreichenden Narkose und anschließender Euthanasie wurde die Aorta wie in 2.3.1 beschrieben kanüliert. Durch diese Kanülierung wurde die Aorta und beiden Nieren mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begaster, 37 °C warmer Krebs-Henseleit-Lösung (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 0,45 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,03 mM, Glukose 11,1 mM, CaCl₂ 2,5 mM, EDTA 0,067 mM, Ascorbinsäure 0,07 mM; Merck) perfundiert. Die rechte und die linke Niere wurden in dieser Reihenfolge nacheinander durch das vorsichtige Verschieben eines Polyethylenschlauchs (Außen-Ø 0.61 mm, Innen-Ø 0.28 mm, neoLab) kanüliert und getrennt entnommen.

2.2.3.2 Bestimmung der Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurve

Die Nieren wurden wie in 2.3.1 beschrieben kanüliert und entnommen. Anschließend wurden die Nieren in der Anlage, wie in Abb. 2.2 gezeigt wird, unter der temperaturkonstanten Bedingung (37 °C) mit Carbogengas (95 % O₂ und 5 % CO₂) gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 0,45 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,03 mM, Glukose 11,1 mM, CaCl₂ 2,5 mM, EDTA 0,067 mM, Ascorbinsäure 0,07 mM; Merck) perfundiert. Die Perfusion wurde mit einer planetengetriebenen Pumpe (Abimed, Gilson, Minipuls 2, Langenfeld) mit einer

Perfusionsrate von 7.25 ml/min/g Niere konstant gehalten. Sobald der Nierenperfusionsdruck sich stabilisiert hat, wurde eine 1 M KCl Lösung über einen Perfusor (Harvard Pump 11 Plus Dual Syringe, Harvard Apparatus) appliziert, um die Kontraktionsfähigkeit der renalen Widerstandsgefäße zu prüfen. Angiotensin II (Sigma) wurde über den Perfusor in aufsteigenden Konzentrationsreihen (von 1×10^{-11} bis 3×10^{-8} M) dem System zugeführt. Der JAK2-Inhibitor (AG490 5 μ M; Calbiochem) wurde 15 min vor dem Beginn der Ang II-Gabe in das System gegeben und während der gesamten Ang II-Konzentrationsreihe konstant gehalten. Der Perfusionsdruck wurde durch einen speziellen Drucksensor (Statham P23 Db Druckaufnehmer; Gould Inc., Oxnard, CA, USA) erfasst, durch den Transducer (MLT 844 Physiological Pressure Transducer, ADInstruments) umgewandelt und auf dem PC aufgezeichnet (Software LabChart 7.3 für Windows; ADInstruments) (Abb. 5).

2.2.3.3 Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurve

Die renale Druckantwort auf exogen appliziertes Angiotensin und seine Inhibitoren wurde als Differenz zwischen dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdrucks und dem basalen Perfusionsdruck ($\Delta P_{\max} = P_{\max} - P_{\text{basal}}$) angegeben. Diese Drücke wurden sowohl als Absolutwerte in mmHg als auch als Relativwerte in Prozent angegeben ($\Delta P_{\max}$ entspricht 100%).

2.2.4 Bestimmung des Neurotransmitters Noradrenalin

2.2.4.1 Probenaufbereitung für HPLC

Zur Noradrenalindestabilisierung wurde jede Probe mit 125 μ l HCl (1 M), 10 μ l EDTA (0.067 M) und 2.5 μ l Na_2SO_3 versetzt und mit einem Tris-Puffer (1 M, pH 10) auf pH 8.4 eingestellt. Nach Zugabe von 50 mg Al_2O_3 wurden die Proben zur quantitativen Adsorption des Noradrenalins 35 min lang umgeschüttelt. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, konnte das an Al_2O_3 (Recipe, München) absorbierte Noradrenalin mit 1 ml H_2O in mit Mikrofiltern (Glasfaser, Whatman, Maidstone, GB) vorbereitete Glasröhrchen überführt werden. Das Al_2O_3 wurde noch zweimal mit jeweils 1 ml H_2O gewaschen, welches nach weiteren Zentrifugierschritten verworfen wurde. Das Noradrenalin wurde letztlich mit zunächst 150 μ l und anschließend 100 μ l Perchlorsäure (0.1 M) eluiert. Von diesen 250 μ l wurde ein 125 μ l Aliquot auf eine HPLC-Säule computergesteuert

injiziert und das darin enthaltene Noradrenalin detektiert.

Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe (Waters 600 Controller), einem automatischen Injektor (Waters 717 plus Autosampler), einem Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector), einer Vorsäule (Waters Guard-Pack, Reslove™ C18), und einer Säule (WiCom, Prontosil, 120-5- C18 AQ 5,0 µm). Die mobile Phase (15 mM NaH₂PO₄, 30 mM Citronensäure, 2 mM Na₂EDTA, 2,77 mM (-)Natriumoctylsulfonat, 12 % Methanol 12%) wurde vor jedem Probendurchlauf entgast, filtriert und anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min durch das HPLC-System gepumpt. Der pH-Wert der mobilen Phase wurde mit 10 M NaOH (10 M) auf pH 6.5 eingestellt. Der Noradrenalingehalt wurde mit einem Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector) bei einem Arbeitspotential von 0.4 V bestimmt.

2.2.4.2 Auswertung

Die stimulationsinduzierte NA-Freisetzung in jeder Probe wurde anhand einer Noradrenalin Eichgeraden (0-37.5-75-187.5-375-750 pg NA / 125 µl Perchlorsäure (HClO₄) und jeweils 600 pg DHBA / 125 µl Perchlorsäure), die für jeden Probendurchlauf neu erstellt wurde, berechnet. Die Menge von Noradrenalin wurde entweder auf die Proteinkonzentration (Gewebe) oder auf die Kreatininkonzentration (Urin) bezogen angegeben.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Genexpressionsanalyse

2.2.5.1.1 RNA-Isolierung aus dem Gewebe

Zur RNA-Isolierung wurde ein gebrauchsfertiges Kit (RNeasy-Plus-Mini-Kit; Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Gewebe wurde zunächst unter denaturierenden Bedingungen mit einem Tissue Ruptor (Qiagen) homogenisiert. Nachfolgend wurde das Lysat auf eine Säule gegeben, damit die RNA an der Silikon-Gel-Membran der Säule absorbiert wird. Nach zweimaligem Waschen wurden die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.5.1.2 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription wurde ein gebrauchsfertiges System (QuantiTect-Kit ; Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurde die Probe mit 800 ng RNA/Probe (maximal 1 µg RNA; photometrisch gemessen) in ein neues 0,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und durch Zugabe des RNA-freien Wassers auf 12 µl aufgefüllt. Dazu wurde 2 µl gDNA Wipeout Buffer zugegeben und anschließend wurde das Gemisch für 3 min bei 42°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Den Proben wurde nun 6 µl RT-Mastermix zugegeben, der aus 1 µl Reverse Transkriptase, 4 µl RT-Buffer und 1 µl RT-Primer-Mix besteht. Anschließend wurden die Proben für 25 min bei 42°C, danach für 3 min bei 95°C in einem Thermocycler (Eppendorf) belassen. Das Endprodukt Einzelstrang-cDNA, welche frei von genomischer DNA ist.

2.2.5.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure erfolgte photometrisch.. Zugrunde liegt das Lambert-Beersche Gesetz, das besagt, dass sich die Absorption eines Lichtstrahls durch eine Lösung proportional zur molaren Konzentration der absorbierenden Substanz verhält. Hierzu wurde je 1 µl cDNA (enthält 800 ng cDNA) mit 69 µl HPLC-Wasser in einer Messküvette gemischt und das Absorptionsmaximum an der Wellenlänge von 260 nm mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) gemessen.

2.2.5.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente zur Amplifizierung der gewünschten cDNA Bereiche zur Detektion eines Zielgens. Die PCR-Reaktionsansätze setzten sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

2 µl 10-fach Puffer (Qiagen), 0,4 µl dNTP, je 0,1 µl Primer (vorwärts und rückwärts), 0,12 µl Hot Star Taq (Qiagen), 16,78 µl HPLC-Wasser, 0,5 µl Probe (cDNA). Die PCR wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen unter Verwendung eines Thermocyclers (Eppendorf) nach folgendem Programm durchgeführt:

- | | | | |
|-----------|------|---|----------|
| 1) 15 min | 95°C | Initialdenaturierung | 1 Zyklus |
| 2) 30 sec | 95°C | Denaturierung | |
| 3) 30 sec | 58°C | Annealing | |
| 4) 30 sec | 72°C | Elongation (Schritte 2-4 werden für 35 Zyklen wiederholt) | |

5) 5 min 72°C Extension 1 Zyklus

2.2.5.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Hierzu wurden 1,5-2 % Agarosegele (in 1x TAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90 V in 1x TAE als Laufpuffer. Die Bildgebung erfolgte mit einem Imaging System (Alpha Innotech) bei UV-Belichtung.

2.2.5.1.6 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Die Real-Time PCR ist ein Verfahren zur Quantifizierung von cDNA. Die Quantifizierung erfolgt dabei mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green; Applied Biosystems), der mit der doppelsträngigen DNA interkaliert und nach jedem Multiplikationszyklus freigesetzt wird, so dass die Menge der Fluoreszenzsignale proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Hierzu wurde für jedes Zielgen ein Mastermix von 19 µl je Probe angesetzt. Dieser Mix besteht aus 10 µl SYBR Green, 8,5 µl HPLC-Wasser, je 0,25 µl Primer (vorwärts und rückwärts). Der Mastermix sowie 1 µl cDNA je Probe wurde in 96-Well Platten (Biozym) in Doppeltansatz gegeben. Die RT-PCR erfolgte mit dem 7300 System (Applied Biosystems) nach dem folgenden Schema (Abb. 5).

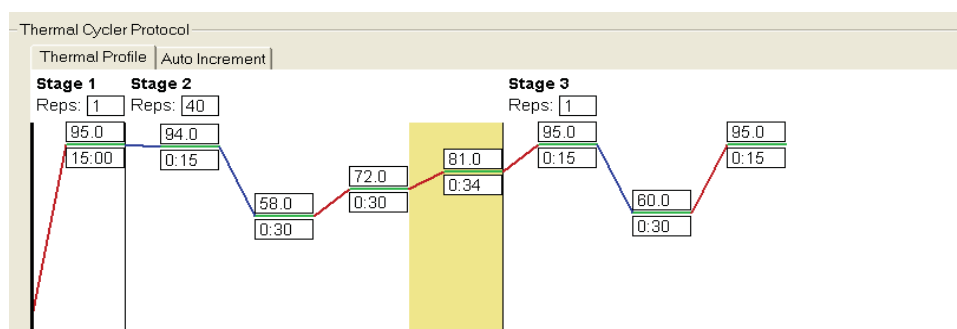


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Multiplikationsvorgänge bei Real-Time-PCR.

Die Thermoprofile wurden zuvor je Ziel-Gen optimiert. Als endogener Standard („Housekeeping Gene“) wurde GAPDH (209 bp) mitgeführt. Die Berechnung der relativen mRNA-Expression erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Log}_2[Y / X] = Z_X - Z_Y$$

X: Menge mRNA der GAPDH

Y: Menge mRNA des Zielgens

Z_X : Ct-Wert der GAPDH

Z_Y : Ct-Wert des Zielgens

(Ct-Wert ist die Zykluszahl, bei der der Maximalwert der Steigungsänderung des Fluoreszenzanstieges erreicht wird.)

2.2.5.2 Proteinanalyse

2.2.5.2.1 Proteinextraktion aus Nieren

Die entnommene Niere wurde in eiskalte 1 % Triton-Lysispuffer 150 µl (1% Triton X-100, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM KCl, 1,25 mM EDTA, Na_3VO_4 1 mM + Proteaseninhibitor-Cocktail) aufgenommen und mit Tissue Ruptor (Qiagen) auf Eis homogenisiert. Nach der 15-minütigen Lyse auf Eis wurde das Homogenisat in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 1 % SDS, 10 % Glycerin, 0,005 % Bromphenol Blau + 50 mM DTT) versetzt und für 5 min bei 95 °C mit einem Thermomixer (Eppendorf) gekocht.

2.2.5.2.2 Proteinextraktion aus Aorta

Die entnommene Aorta wurde in eiskalte 5% Trichloressigsäure aufgenommen und anschließend zweimal kurz mit Aceton gewaschen. Nach der Lufttrocknung wurde das Gewebe in 500 µl Lysispuffer (50 mM Triethanolamin/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, Proteaseninhibitor-Cocktail) aufgenommen und für 10 Sekunden bei 800 rpm mit dem Potter S Tissue Homogenisator (Sartorius) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Auf das Pellet wurde erneut 100 µl Lysispuffer gegeben und mit der Pipettenspitze gut gemischt. Das Gemisch wurde mit Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 1 % SDS, 10 % Glycerin, 0,005 % Bromphenol Blau + 50 mM DTT) versetzt und für 5 min bei 95 °C mit einem Thermomixer (Eppendorf) gekocht.

2.2.5.2.3 Messung der Proteinkonzentration (BCA-Assay)

Zur Proteinbestimmung wurde ein gebrauchsfertiges System (BCA-Assay-Kit; Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Eigenschaft des Proteins, in alkalischen Medium Cu^{2+} zu Cu^{1+} zu reduzieren (Biuret-Reaktion). Das BCA-Reagenz (Bicichoninic Acid) bildet dann mit Cu^{1+} einen violetten Chelatkomplex, in dem zwei Moleküle BCA ein Cu^{1+} -Kation binden. Das Absorptionsmaximums des so gebildeten Komplexes liegt bei einer Wellenlänge von 562nm.

Hierzu wurde nach zu erwartender Proteinkonzentration 5-10 μl des Lysats entnommen, auf 25 μl mit Wasser aufgefüllt, gut gemischt und 10 μl davon mit 200 μl BCA-Reagenz versetzt für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die Messung der Extinktionswerte in einem ELISA Platten Reader (MTX Spectramax 250, MTX, USA) bei 562 nm Wellenlänge. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden BSA-Standards mit Proteinkonzentrationen zwischen 50 und 1500 $\mu\text{g/ml}$ herangezogen.

2.2.5.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Methode, mit der man die Proteine nach ihrer Größe auftrennt. Dafür wurde ein 7,5% Polyacrylamid-Trenngel (180 mM Tris HCl, 590 mM Tris Base, 0,2 % SDS, 25 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 % APS, 1,67 % TEMED) gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde nach Abgießen des Isopropanols das Sammelgel (242 mM Tris HCl, 8 mM Tris Base, 0,2 % SDS, 15,8 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 % APS, 0,15 % TEMED) darüber gegossen. Je 15-30 μg Protein, das nach der im 2.6.2.3. beschriebenen Methode isoliert und mit Lämmili-Puffer (62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 1 % SDS, 10 % Glycerin, 0,005 % Bromphenol Blau + 5 % β -Mercaptoethanol bzw. + 50 mM DTT) versetzt wurde, wird nun auf das Gel aufgetragen. Das im Puffer enthaltene SDS überdeckt die Eigenladung der Aminosäuren und entfaltet die Proteine, so dass eine Auftrennung nach Molekulargewicht ermöglicht wird. 6 μl Größenmarker (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde ohne Kochen und ohne Zugabe von Ladepuffer mit auf das Gel aufgetragen.

Die SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer (23,9 mM Tris Base, 574 mM Glycin, 3,47 mM SDS) zunächst für 30 min bei 70 Volt (Sammelphase), anschließend für 90 min bei 20 mA/Gel (Trennphase) mit dem PowerPac Universal (Biorad). Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront am Gelende angekommen war.

2.2.5.2.5 Western Blot

Hier handelt es sich um eine Methode, mit der man die durch Elektrophorese getrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran überträgt, damit das Protein anschließend mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden kann.

Die durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in der Western Blot Kammer PowerPac Universal (Biorad) bei 200 mV über 2 Stunden in Transferpuffer (2,48 mM Tris Base, 19,2 mM Glycin, 20 % Methanol) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in 5% BSA Lösung (gelöst in Waschpuffer) für 45 min bei 37 °C inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit ersten Antikörpern über Nacht bei 4 °C auf dem Shaker. Danach wurde die Nitrozellulosemembran dreimal in Waschpuffer gewaschen, um den nicht gebundenen ersten Antikörper zu entfernen und anschließend 60 min mit dem gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichteten Zweitantikörper bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Konjugation des Zweitantikörpers mit HRP ermöglichte die im folgenden beschriebene Detektion mit der ECL Lösung.

Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet., Hierfür wurde die selbe Nitrozellulosemembran zuletzt für 30 min mit β -Aktin-Antikörper (Sigma; 1:5000 in Waschpuffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen im Waschpuffer erfolgte die Inkubation über eine Stunde mit dem anti-Maus Sekundärantikörper. Die Visualisierung erfolgte ebenfalls durch ECL.

2.2.5.2.6 Bildgebung und Auswertung (Densitometrie)

Zur Entwicklung der Membran werden ECL Lösung A und B kurz vor der Anwendung im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Durch die Zugabe der ECL-Mischung oxidiert die an die Zweitantikörper konjugierte HRP das in der ECL-Mischung enthaltene Lumigen Substrat. Das Lumineszenzsignal wird durch einen Imager (Alpha Innotech) mit der Software FluorChem (Alpha Innotech) erfasst. Die Belichtungszeit lag zwischen 2 bis 10 min. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ mit Hilfe der Densitometrie. Die Densitometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der Schwärzungsgrade eines Bildes und wurde mit der Software AlphaView (Alpha Innotech) durchgeführt. Der densitometrisch ermittelte Wert einer Bande wurde jeweils auf den densitometrisch ermittelten Wert der β -Aktin-Bande auf der gleichen Membran bezogen dargestellt. Der Phosphorylierungsgrad eines Proteins wurde als Verhältnis dieses korrigierten Wertes zum korrigierten Wert der Gesamtmenge dieses Proteins berechnet

(Formel unten).

$$\text{Phosphorylierungsgrad eines Proteins X} = [x / y] / [X / Y]$$

x: Densitometrisch ermittelter Wert der phosphorylierten Proteins X-Bande auf Membran A

y: Densitometrisch ermittelter Wert der β -Aktin-Bande auf Membran A

X: Densitometrisch ermittelter Wert der Gesamt-Proteins X-Bande auf Membran B

Y: Densitometrisch ermittelter Wert der β -Aktin-Bande auf Membran B

2.2.6 Histologie und Immunhistologie

2.2.6.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Das frisch entnommene Gewebe wurde in 10 % Formalin gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur fixiert. Die Entwässerung des Gewebes erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach dem folgenden Protokoll:

1. 70% Ethanol 1 h
2. 80% Ethanol 1 h
3. 96% Ethanol 1 h
4. 100% Ethanol über Nacht
5. Xylol 2x 1 h
6. Paraffin 2x 1 h

Im Anschluß wurde das Gewebe in eine auf 65°C erwärmte Einbettungsform positioniert und mit Paraffin aufgefüllt. Nach der Aushärtung auf der Kälteplatte bei 4°C wurde der Paraffinblock aus der Form entnommen und bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurde die Paraffinblöcke mit dem fixierten Gewebe in das Mikrotom (Jung Histoslide 2000; Leica) eingespannt. Die Schnittdicke betrug 2 μm . Die auf einem Objektträger (Thermo Scientific) aufgenommenen Schnitte wurden durch eine Inkubation bei 37°C über Nacht getrocknet und fixiert.

2.2.6.2 Masson-Trichrom-Färbung

Bei Paraffinschnitten wurde eine Masson-Trichrom-Färbung durchgeführt. Diese dient zur

Bestimmung des qualitativen Ausmaßes des interstitiellen Bindegewebes in der Niere. Im gefärbten Präparat erscheint Muskelgewebe rot, Bindegewebe blau-violett und Zellkerne braunschwarz. Die Färbung wurde in freundlicher Unterstützung von Dr. rer. nat. J.-K. Park, Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der medizinischen Hochschule Hannover, durchgeführt.

2.2.6.3 Herstellung der Kryoschnitte

Nach der Organentnahme wurden die entnommenen Organe in 4% PFA bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde das Gewebe für 6 Stunden in 30 % Sucrose-Lösung (gelöst in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) bei 4 °C und anschließend für eine Stunde in einer Mischlösung aus Tissue Freezing Medium (Leica) und 30 % Sucrose-Lösung (Mischverhältnis 1:1 im Volumen) bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gewebe in Tissue Freezing Medium (Leica) eingebettet in -80 °C eingefroren.

Zur Anfertigung der Kryoschnitten wurde der eingefrorene Kryoblock mit -20°C gekühltem Mikrotom (Leica) in 4 µm Schichtdicke geschnitten.

2.2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung auf Kryoschnitten

Der Nachweis der Schlitzmembranproteine (Nephrin, Podocin, Synaptopodin) sowie des Oberflächenmarkers der murinen Makrophagen (F4/80) erfolgte über Immunfluoreszenzfärbung auf Kryoschnitten. Hierzu wurden 4 µm dicke Kryoschnitte des Nierengewebes (wie unter 2.6.3 beschrieben angefertigt) zunächst mit 10% Formalin für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigem PBS wurden sie für 12 Minuten mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Nach der Permeabilisation wurden die Präparate erneut mit PBS dreimal gewaschen und anschließend für 75 Minuten mit 1 % NDS (Dianova) geblockt. Danach wurde die NDS-Lösung mit Papiertüchern abgetupft. Die Inkubation mit den ersten Antikörpern in entsprechender Verdünnung (Anti-Nephrin 1:50; Progen, Anti-Podocin 1:500; Sigma, beide in PBS gelöst) erfolgte direkt im Anschluß für 60 min bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden danach 3 x 10 min mit PBS gewaschen und mit einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper (DyLight Anti-Guinea Pig 1:800; Dianova für Nephrin-Färbung, Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit 1:750 für Podocin- und Synaptopodin-Färbung, alles in PBS gelöst) lichtgeschützt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI; Dianova) in 1:75 Verdünnung angefärbt und die Schnitte mit einem Abdeckglas (Thermo Scientific) eingedeckt. Die Auswertung der Präparate erfolgte am

Fluoreszenzmikroskop (HBO 50 Zeiss) mit 100- bzw. 200 facher Vergrößerung.

2.2.6.5 Immunfluoreszenzfärbung der vaskulären glatten Muskelzellen

Der Nachweis des für glatte Muskelzellen spezifischen α -Aktin² erfolgte über Immunfluoreszenzfärbung der VSMC. Hierzu wurden die Zellen auf einem vierkammerigen Objektträger (4 Well Permanox Slide; Lab-Tek) gezüchtet. Nach dem Erreichen von 30-40 % iger Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen wurden kurz mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; Biochrom) gewaschen und anschließend mit eiskaltem Aceton für 1 min fixiert. Das weitere Prozedere erfolgte analog zu der Methode welche unter 2.6.4 beschrieben ist.

2.2.7 Zellkultur

2.2.7.1 Isolation der vaskulären glatten Muskelzellen

Nach der Anästhesie und anschließender Euthanasie wurde die Aorta der C57BL/6-Maus in seiner gesamten Länge (vom Abgang aus dem Herz bis zur iliakalen Bifurkation) entnommen. Daraufhin wurde die Aorta kurz mit Kulturmedium gewaschen und anschließend für 20 min bei 37 °C in 5 ml des Enzymmix (VLE DMEM Low Glucose 1,0 g/l D-Glukose mit 1% P/S, 0,2 % BSA, 0,1 % Kollagenase Typ I, 0,1 % Kollagenase Typ III, 0,0125 % Elastase Typ III) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Tunica adventitia unter dem Lichtmikroskop mit feinen Pinzetten entfernt und das Restgewebe wurde mit der Schere in feine Stücke zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde erneut in 2ml des Enzym Mix für 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Gewebe zusammen mit dem Enzymmix in die Zentrifugenröhrchen aufgenommen und für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml des Kulturmediums (VLE DMEM mit 4,5 g/l D-Glukose + 10% FCS + 1% P/S; Biochrom) resuspendiert und in neue 25-cm²-Zellkulturflaschen (Nunc T25; Nunc, Roskilde, Dänemark) eingebracht. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37 °C mit 5% CO₂ kultiviert. Die Passagezahl der frisch isolierten Zellen galten als Passage 0.

2.2.7.2 A7r5 Zellen

A7r5 Zellen (embryonale VSMC, gewonnen aus Rattenaorta) wurden vom Institut der Physiologie I der Universität Bonn bezogen. Zur Kultivierung wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff im Wasserbad bei 37 °C rasch aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in neue 25-cm²-Zellkulturflaschen eingebracht und im Brutschrank kultiviert.

Zum Einfrieren der Zellen wurden mit dem entsprechenden Einfriermedium Zellsuspensionen mit Zellkonzentrationen von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nach Einbringen von jeweils 1 ml Zellsuspension pro Kryoröhrchen wurden diese in Einfrierboxen zunächst für 24 h bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.2.7.3 Zellkultur der vaskulären glatten Muskelzellen

Die Zellen wurden in 25 cm^2 Zellkulturflaschen (Nunclon T25; Nunc, Roskilde, Dänemark) gezüchtet. Die Inkubation erfolgte im 37°C warmen Brutschrank mit 5% CO_2 . Es wurde VLE-DMEM-Medium (Biochrom) mit Zusatz von 10% FCS (Biochrom) und 1% P/S (Biochrom) verwendet. Das Zellwachstum wurde mikroskopisch kontrolliert. Wenn der Flaschenboden 70-80% konfluent mit Zellen besiedelt war, was nach etwa 3 bis 4 Tagen beobachtet werden konnte, wurden die Zellen passagiert, um durch Reduktion der Zellzahl die Zelldichte in der Zellkulturflasche innerhalb des tolerierten Schwankungsbereichs zu halten. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden kurz mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; Biochrom) gewaschen und anschließend 8 min mit Trypsin-EDTA (Biochrom) bei 37°C inkubiert. Durch diesen Vorgang wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 5 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert in 10 ml des Kulturmediums (für den Fall für 1:2 Verdünnung). Die Zellen wurden anschließend in neue 25-cm^2 -Zellkulturflaschen eingebracht und im Brutschrank kultiviert. Die Passagezahl der Zellen wurde mit jeder Passagierung um 1 erhöht.

2.2.7.4 Stimulationsversuch mit vaskulären glatten Muskelzellen

Für den Stimulationsversuch wurden die Zellen 3-4 Tage vor dem Versuchstag in 6-Well-Zellkulturplatte (Corning Incorporated, NY, USA) ausgesät. Ein Tag vor dem Versuch wurde das Kulturmedium abgesaugt und 1ml pro Well Medium ohne Zusatz von FCS (VLE DMEM + 1% P/S) vorgelegt, um eine unspezifische Aktivierung von Signalkaskaden zu verhindern. Zum Stimulationsversuch wurde jedem Well CNTF (R&D Systems; Endkonzentration 100 ng/ml) mit zeitlichen Abstand (5/15/30/60/120 min) zugegeben. Als Negativkontrolle diente die Zugabe der Trägersubstanz (in diesem Fall PBS). Am Ende der Stimulation wurde das Kulturmedium aus der Platte entfernt. Nach dem kurzen Waschen mit eiskaltem PBS wurde jedem Well 50 μl Lysispuffer (1 % Triton X-100, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM KCl, 1,25 mM EDTA,

Na₃VO₄ 1 mM + Proteaseninhibitor) mit frischem Zusatz vom PMSF (Phosphataseinhibitor) zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber in Lysispuffer mobilisiert und für 15 min auf Eis lysiert. Danach wurden die Zellen bei 14000 rpm für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde dem Lysat Lämmli-Puffer (62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenol Blau, 50 mM DTT) gegeben und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die so gewonnene Lysate dienten anschließend zur Auftrennung und Detektion von Proteinen mittels SDS-PAGE (2.2.5.2.4) und Western Blot (2.2.5.2.5).

2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl der Experimente pro Gruppe mit n aufgeführt. Für jede Gruppe wurde ein arithmetischer Mittelwert berechnet und die Ergebnisse wurden als ein Mittelwert mit Standardfehler ($\pm$ Standard Error of Mean; SEM) angegeben. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurden Student's t-Test, Two-way Analysis of Variance (ANOVA) (für die multifaktorielle Analyse) sowie Log-rank Test (für die Überlebensanalyse) verwendet. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ galten als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der CNTF-Knockout-Mäuse

Die CNTF-Knockout (KO)-Mäuse wurden durch die Rückkreuzung von CNTF-KO-Mäusen, die ursprünglich von Dr. R. Linker, Abteilung für Neurologie, Ruhr-Universität-Bochum, bezogen wurden, auf C57BL/6-Wildtyp (WT)-Mäusen der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf über 10 Generationen generiert. Als Kontrolle der Zuchtpaarung wurden Genotypisierungen mittels PCR aus genomischer DNA von Schwanzbiopsien durchgeführt. Abbildung 6 (a) zeigt das Prinzip zur Herstellung eines CNTF-Knockouts sowie die Lokalisation der Primer für die Genotypisierung. Wie es der Abbildung 6 (a) zu entnehmen ist, wird ein CNTF-Knockout durch Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette in den Grenzbereich zwischen Exon 1 und Intron eines Wildtyp-CNTF-Gens hergestellt. Abbildung 6 (b) zeigt die Genotypisierung aus Schwanzzell-DNA mittels Multiplex-PCR. Die untere 321 bp lange Bande entspricht dem Wildtyp-Allel, die obere 383 bp lange Bande dem Knockout-Allel.

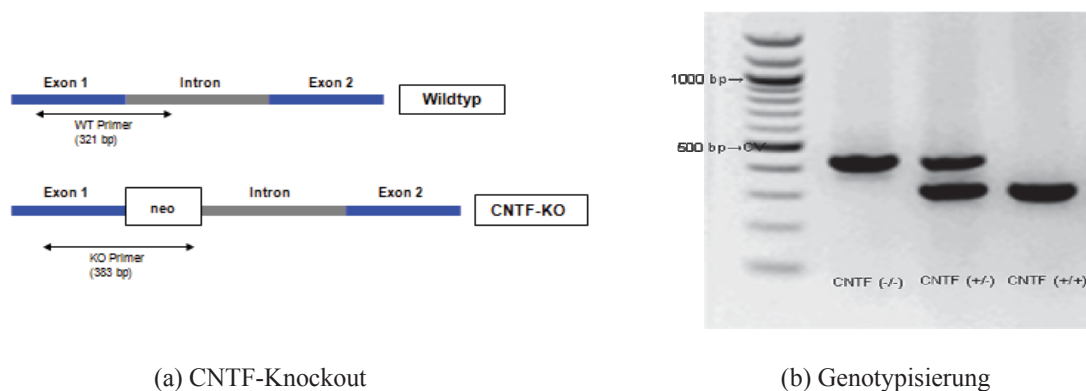


Abbildung 6: (a) Schematische Darstellung der Primärlokalisation bei der Multiplex-PCR (bp = Basenpaare; neo = Neomycin-Resistenzkassette). (b) Genotypisierung aus murinem Gewebe der Schwanzspitze mittels Multiplex-PCR. Die untere 321 bp lange Bande entspricht dem Wildtyp-Allel, die obere 383 bp lange Bande dem Knockout-Allel.

3.2 Das Ergebnis aus dem Modell der Ang II-induzierten Hypertonie *in vivo*

3.2.1 Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Es wurden insgesamt 34 Wildtyp (WT)-Mäuse und 24 CNTF-Knockout (KO) mit dem gleichen

genetischen Hintergrund mit dem Modell der Ang II-induzierten Hypertonie *in vivo* untersucht. Hierbei wurden die Mäuse, wie im Methodenteil beschrieben, zunächst uninephrektomiert, 1% NaCl im Trinkwasser verabreicht und daraufhin für 14 Tage mit subkutan implantierter osmotischer Minipumpe mit Ang II (1000 ng/kg/min) behandelt. Während diesem 14-tägigen Behandlungszeitraum sind 10 WT-Mäuse (29,4%) von 34 Mäusen gestorben. In der KO-Gruppe ist ein Tier von insgesamt 24 Mäusen gestorben (4,2%) ($p < 0,05$) (Abb.7).

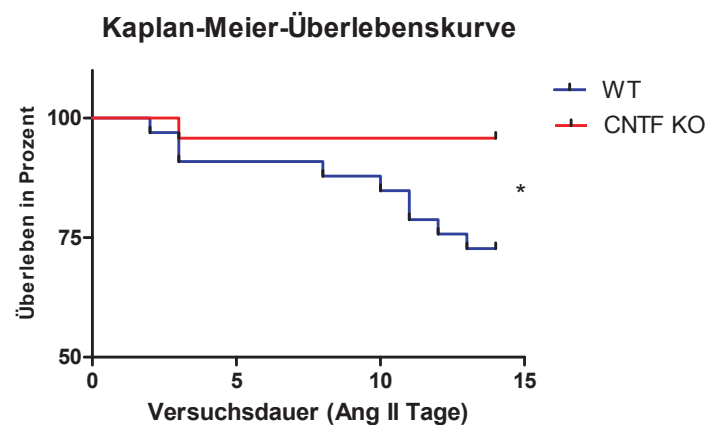


Abbildung 7: Überlebensanalyse der WT- (n=34) und CNTF-KO-Mäuse (n=24) unter chronischer Ang II-Infusion Tag 1-14. WT-Mäuse weisen ein signifikant geringeres Überleben unter Ang II-Infusion (* $p < 0,05$; Log-rank Test).

3.2.2 Blutdruck

Unter Behandlung mit Ang II entwickeln CNTF-WT-Tiere einen signifikant höheren Blutdruck als die KO-Tiere. Der systolische Blutdruck vor der Implantation der Ang II- Pumpe betrug 114 ± 2 mmHg (WT) und 110 ± 2 mmHg (CNTF-KO) ($p > 0,05$). In der ersten Woche nach der Implantation der Ang II-Pumpe betrug der systolische Blutdruck jeweils 154 ± 4 mmHg (WT) und 137 ± 3 mmHg (CNTF-KO) ($p < 0,001$). In der zweiten Woche betrug der systolische Blutdruck 176 ± 3 mmHg (WT) und 151 ± 5 mmHg (CNTF-KO) ($p < 0,001$) (Abb. 8).

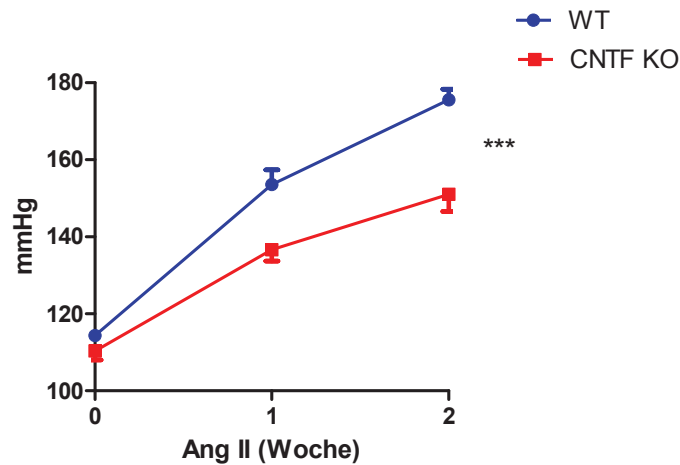


Abbildung 8: Der zeitliche Verlauf des systolischen Blutdrucks während der 14-tägigen Ang II-Infusion (1000 ng/kg/min). WT-Mäuse (n=16) weisen höheren systolischen Blutdruck unter Ang II-Infusion auf als CNTF-KO-Mäuse (n=14) (**p<0,001; Two-way ANOVA).

3.2.3 Herzfrequenz

CNTF-WT-Mäuse hatten niedrigere Herzfrequenz als CNTF-KO-Mäuse. Die Herzfrequenz vor der Implantation der Ang II-Pumpe betrug 676 ± 6 /min (WT) und 670 ± 8 /min (CNTF-KO) ($p>0,05$).

In der ersten Woche nach der Implantation der Ang II-Pumpe betrug die Herzfrequenz jeweils 562 ± 25 /min (WT) und 603 ± 17 /min (CNTF-KO) ($p>0,05$). In der zweiten Woche betrug die Herzfrequenz 554 ± 38 /min (WT) und 623 ± 13 /min (CNTF-KO) ($p<0,05$) (Abb. 9).

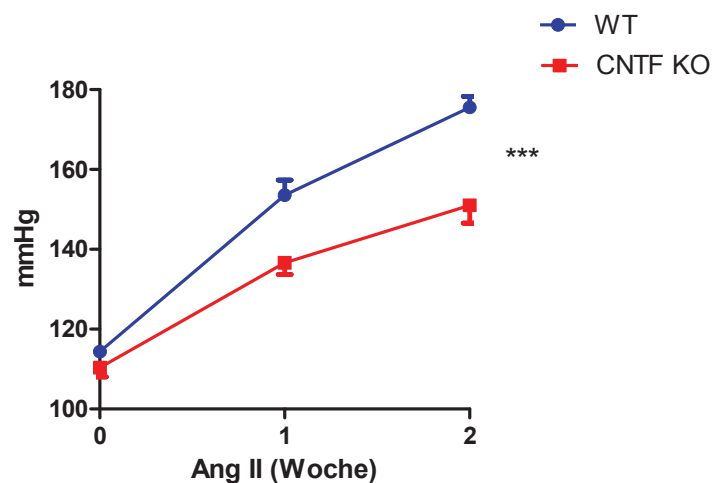


Abbildung 9: Der zeitliche Verlauf der Herzfrequenz während der 14-tägigen Ang II-Infusion (1000 ng/kg/min). WT-Mäuse (n=11) weisen höheren systolischen Blutdruck unter Ang II-Infusion auf als CNTF-KO-Mäuse (n=11) (*p<0,05; Two-way ANOVA).

3.2.4 Herzhypertrophie

Um die Auswirkung des Blutdrucks auf das Myokard zu untersuchen, wurde das Herzgewicht bestimmt. CNTF-KO-Mäuse entwickeln unter Behandlung mit Ang II eine signifikant geringere Hypertrophie des Herzmuskels als CNTF-KO-Mäuse. Das Herzgewicht wurde auf das jeweilige Gesamtkörpergewicht bezogen dargestellt. Die Herz/Körpergewicht-Ratio betrug bei WT-Tieren $8,46 \pm 0,46$ mg/g und bei KO-Tieren $6,47 \pm 0,32$ mg/g; $p < 0,005$) (Abb. 10).

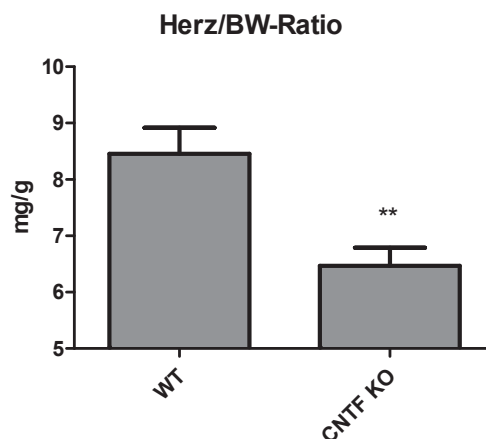


Abbildung 10: Der Grad der Herzhypertrophie nach der 14-tägigen Ang II-Infusion (1000 ng/kg/min). Das Herzgewicht wurde auf das Körpergewicht bezogen dargestellt (Herz/Körpergewicht-Ratio). WT-Mäuse (n=12) weisen höhere Herz/Körpergewicht-Ratio unter Ang II-Infusion auf als CNTF-KO-Mäuse (n=12) (** $p < 0,005$; t-Test).

3.2.5 Proteinurie

3.2.5.1 Albuminmessung im Urin

Um zu überprüfen, ob der Hypertonus zu einer Schädigung des glomerulären Filters führt, wurde bei den Tieren die Albuminurie bestimmt.

Wie im Methodenteil beschrieben, werden die Tiere am Tag 0 (vor der Implantation, am Tag 7 sowie am Tag 13 nach der Implantation der Ang II-Pumpe in metabolischen Käfigen gehalten und der Urin gesammelt. Die Menge des Albumins im 24h-Urin zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und CNTF-KO-Mäusen. Der Ausgangswert am Tag 0 war $22,23 \pm 8,13$ $\mu\text{g}/24\text{h}$ (WT) und $8,61 \pm 2,96$ $\mu\text{g}/24\text{h}$ (CNTF- KO). Am Tag 7 betrug der Wert $155,0 \pm 55,96$ $\mu\text{g}/24\text{h}$ (WT) und $308,3 \pm 92,96$ $\mu\text{g}/24\text{h}$ (CNTF-KO). Am Tag 13 der Ang II-Behandlung

betrug der Wert $815,8 \pm 392,1 \mu\text{g}/24\text{h}$ (WT) und $637,0 \pm 218,3 \mu\text{g}/24\text{h}$ (CNTF-KO) (Abb. 11).

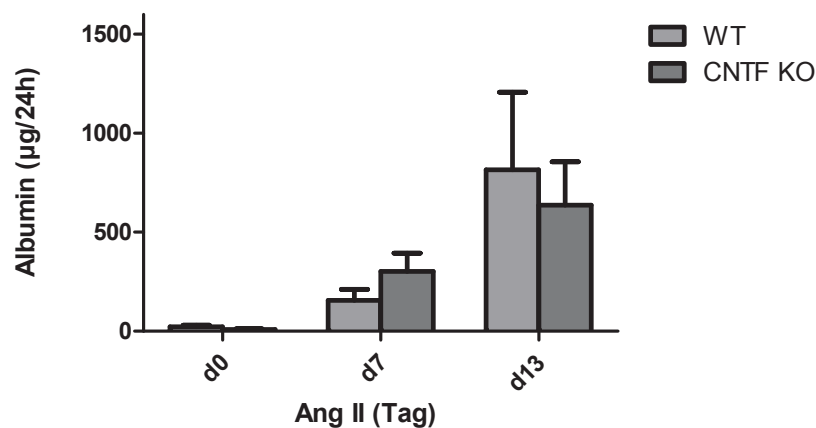


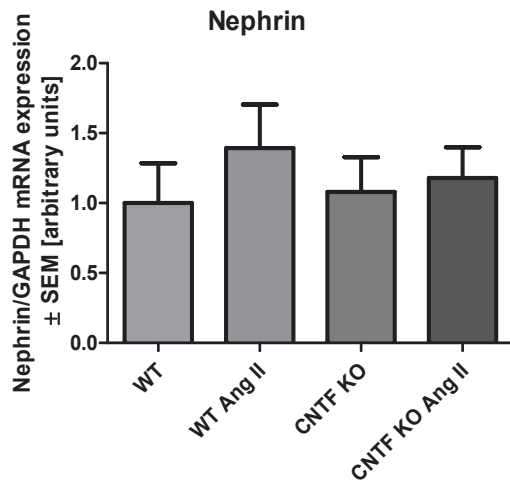
Abbildung 11: Gegenüberstellung der Albuminurie im zeitlichen Verlauf von WT- (n=18) und CNTF-KO-Mäusen (n=21) während der 14-tägigen Ang II-Infusion (1000 ng/kg/min). Es besteht keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Menge der Albuminurie zwischen den beiden Gruppen ($p > 0,05$; t-Test).

3.2.5.2 Analyse der Genexpression von Proteinen der glomerulären Schlitzmembran

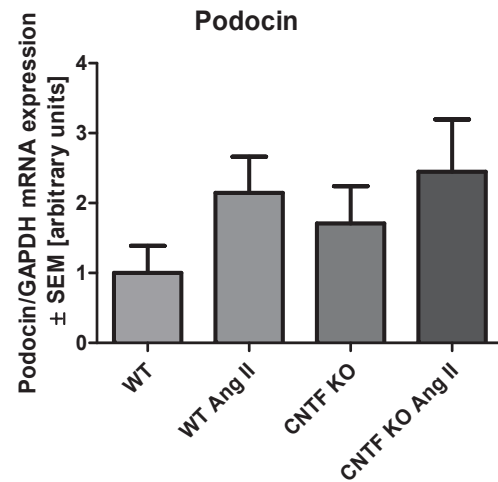
Die glomeruläre Schlitzmembran besteht aus verschiedenen Proteinen und spannt sich zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten aus. Zahlreiche äußere Stimuli, wie zum Beispiel ein unkontrollierter Hypertonus, führen zur Verschiebung der Expression verschiedener Komponenten der Schlitzmembran, was zu Proteinurie führen kann. Im nachfolgenden Experiment wurde die Genexpression der funktionell besonders bedeutsamen Proteine Nephrin, Podocin, CD2AP und Synaptopodin mit quantitativer Real-Time-PCR analysiert.

Eingesetzt sind die Gewebeproben aus dem Nierenkortex von den WT- und CNTF-KO-Mäusen nach 14-tägiger Ang II-Infusion (WT; n=9, CNTF-KO; n=7). Als Kontrolle dienten die Gewebeproben aus dem Nierenkortex von den WT- und CNTF-KO-Mäusen, die nicht mit Ang II behandelt wurden (WT; n=9, CNTF-KO; n=9). Zwischen den Gruppen finden sich hier statistisch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12).

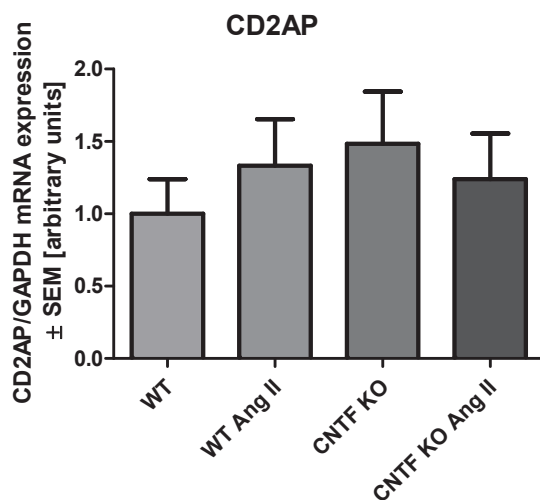
(a)



(b)



(c)



(d)

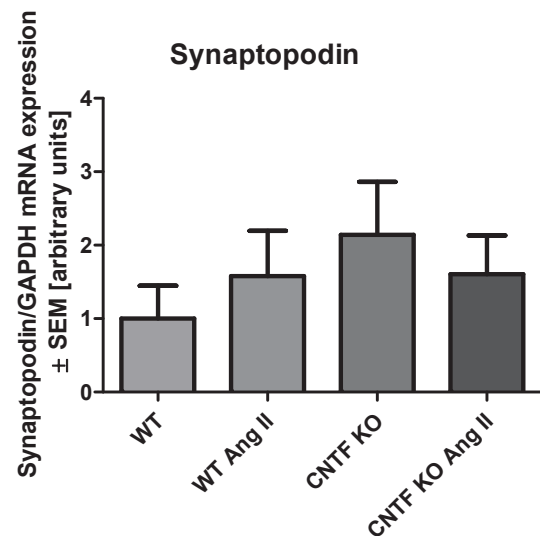
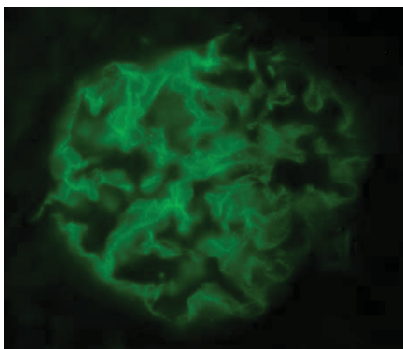


Abbildung 12: Quantifizierung der mRNA-Expression der verschiedenen Schlitzmembranproteine (a)Nephrin (b)Podocin (c)CD2AP (d) Synaptopodin im Nierenkortex. Gegenübergestellt sind die mit Ang II behandelten WT- (n=9) und CNTF-KO-Nieren (n=7) im Vergleich zu jeweiligen Kontrollgruppen (WT-Kontrolle: n=9, CNTF-KO-Kontrolle: n=9). Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0,05$; t-Test).

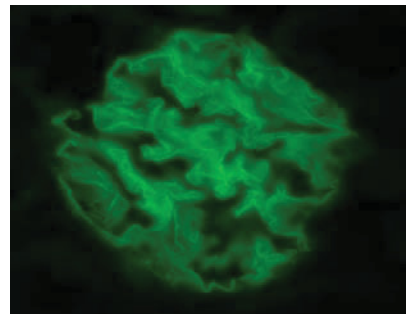
3.2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung der Schlitzmembranproteine

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurden anschließend durch Immunfluoreszenzfärbung verifiziert. Vom kryokonservierte Nierengewebe wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Nephrin, Podocin und Synaptopodin durchgeführt. Im folgenden sind exemplarische Färbungen der Wildtyptiere den Färbungen der KO-Tiere gegenübergestellt (Abb. 13).

Immunfluoreszenzfärbung von Nephrin

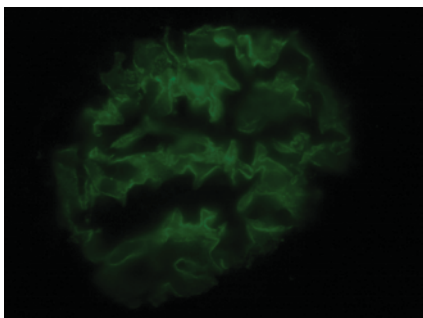


(a) Niere WT Ang II Nephrin

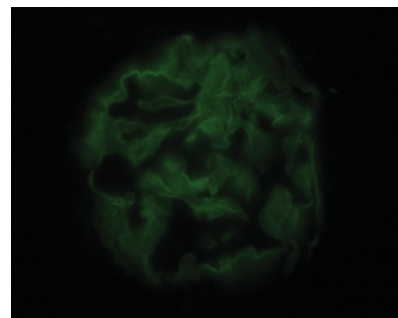


(b) Niere CNTF KO Ang II Nephrin

Immunfluoreszenzfärbung von Podocin

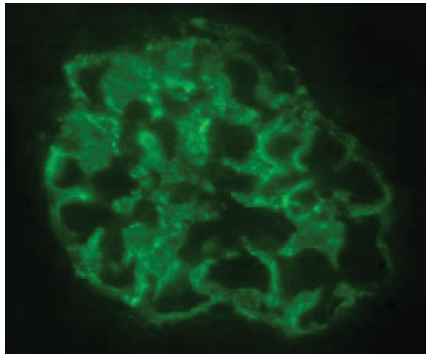


(c) Niere WT Ang II Podocin

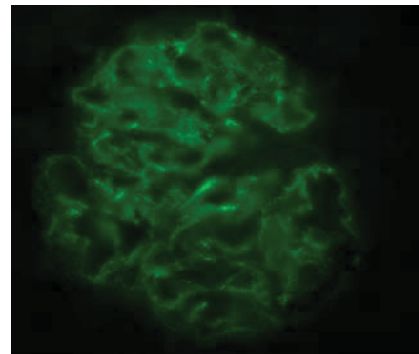


(d) Niere CNTF KO Ang II Podocin

Immunfluoreszenzfärbung von Synaptopodin



(e) Niere WT Ang II Synaptopodin



(f) Niere CNTF KO Ang II Synaptopodin

Abbildung 13: : Immunfluoreszenzfärbung der Glomeruli mit Antikörpern gegen verschiedene Schlitzmembranproteine (a,b)Nephrin (c,d)Podocin (e,f)Synaptopodin in der Niere. Die mit Ang II behandelten WT-Tiere sind den CNTF-KO-Nieren gegenübergestellt.

3.2.6 Histologie

Neben der Analyse der glomerulären Funktion wurde auch die Schädigung des Niereninterstitiums und des tubulären Apparats analysiert.

Aus Paraffinschnitten der Niere nach Ang II-Behandlung wurden Übersichtsfärbungen durchgeführt. Es wurde Masson-Trichrom-Färbung angewandt, bei der die Kollagenfasern typischerweise blau gefärbt werden. Bei WT-Nieren wurden gehäuft hypertrophierte Gefäße, teilweise ausgeprägte tubuläre Schädigungen, Zeichen der Infiltration und mehr perivaskuläre fibrotische Veränderungen als bei KO-Nieren beobachtet.

Die Schnitten wurden aus jeweils 12 WT- und CNTF-KO-Nieren nach Ang II-Behandlung angefertigt. Unten gezeigt sind die representative Bilder von der Färbung (Abb. 14). Die Masson-Trichrom-Färbung sowie anschließende Quantifizierung der T-Lymphozyten und Makrophagen aus den Präparaten, die nachfolgend aufgeführt werden, wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. J.-K. Park, Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der medizinischen Hochschule Hannover, durchgeführt.

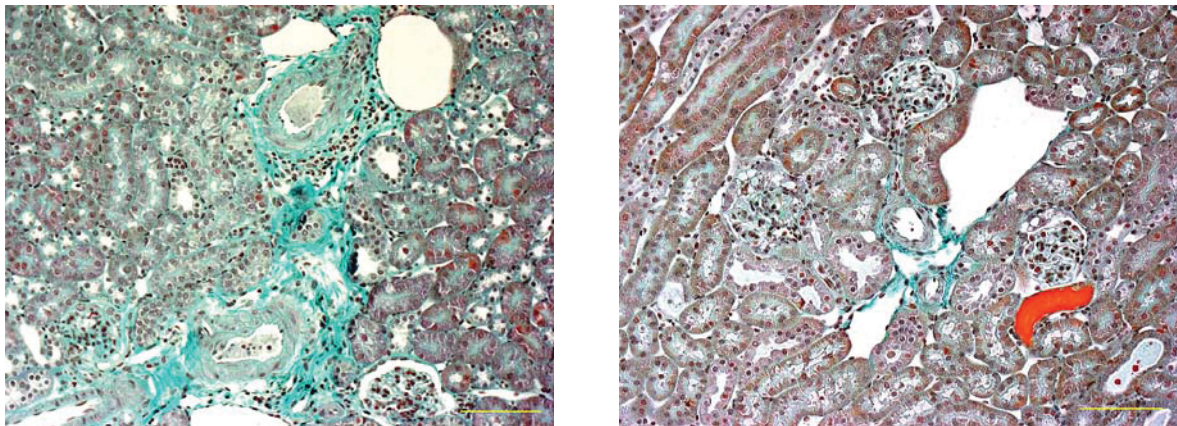
*(a) Niere WT Ang II**(b) Niere CNTF KO Ang II*

Abbildung 14: Masson-Trichrom-Färbung der mit Ang II behandelten WT- und CNTF-KO-Nieren. Die blaue Färbung im Bild zeigt die Kollagenfasern. 200-fach Vergrößerung. Die Färbung wurde von Dr. rer. nat. J.-K. Park (Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der medizinischen Hochschule Hannover) durchgeführt.

Die vermehrte Fibrose bewog uns das Gewebe auf Einwanderung inflammatorischer Zellen zu untersuchen.

Es wurde die Anzahl der T-Lymphozyten in den Paraffinschnitten aus den gleichen Nieren pro Blickfeld bestimmt. Das Ergebnis zeigt, dass sowohl die Anzahl der CD4-positiven als auch der CD8-positiven T-Lymphozyten in den Ang II-behandelten CNTF-KO-Nieren niedriger war als in den Ang II-behandelten WT-Nieren ($CD4^+$; $12 \pm 1,30$ bei WT, $7 \pm 0,68$ bei KO; $p < 0,05$, $CD8^+$; $16 \pm 0,95$ bei WT, $10 \pm 1,46$ bei KO; $p < 0,05$) (Abb. 15). Die CD4-positiven T-Lymphozyten sind sogenannte T-Helferzellen, deren Rezeptor die MHC-Klasse-II-Moleküle erkennt und auf Stimulation die Zytokine wie Interferon- α (IFN- α), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) u.a. freisetzt. Die CD8-positive T-Lymphozyten, auch zytotoxische T-Zellen genannt, erkennen die MHC-Klasse-I-Moleküle und setzen auf entsprechende Stimulation die Zytotoxine frei, die zur Lyse bzw. zur Apoptose der Zielzelle führen.

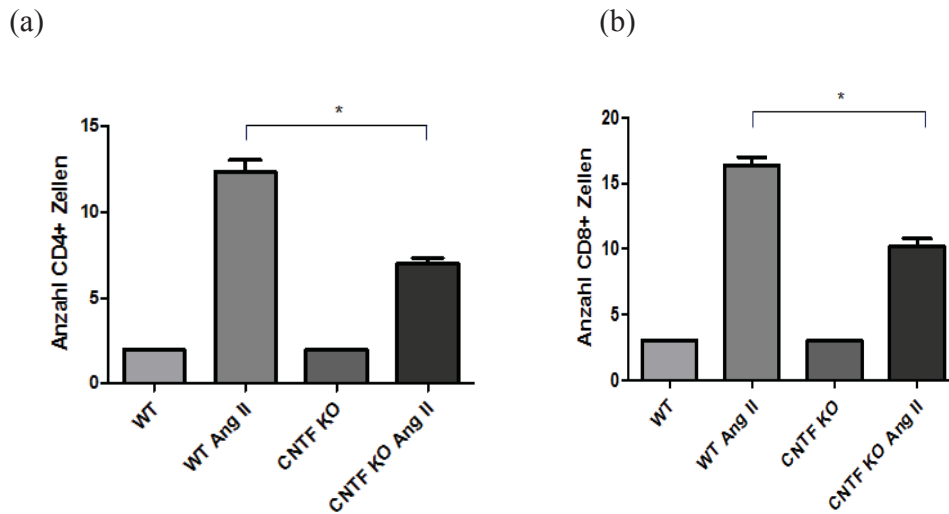


Abbildung 15: Quantitative Auswertung der Anzahl der CD4- und CD8-postiven T-Lymphozyten im Nierenkortex ((a) CD4⁺- (b)CD8⁺-Zellen). Gegenübergestellt sind die mit Ang II behandelten WT- (n=3) und CNTF-KO-Nieren (n=5) im Vergleich zu jeweiligen Kontrollnieren. Zwischen den Ang II-behandelten WT- und CNTF-KO-Nieren besteht sowohl für die Anzahl von CD4- als auch CD8-positiven T-Zellen eine statistische Signifikanz (*p<0,05; t-Test). Diese Untersuchung wurde von Dr. rer. nat. J.-K. Park (Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der medizinischen Hochschule Hannover) durchgeführt

In einem weiteren Experiment wurden mit dem F4/80-Antikörper wurden in den Kryoschnitten der Niere die Makrophagen angefärbt (Abb. 16). F4/80-Antigen ist ein 160 kDa großes Glykoprotein, das bei den murinen Makrophagen exprimiert ist.

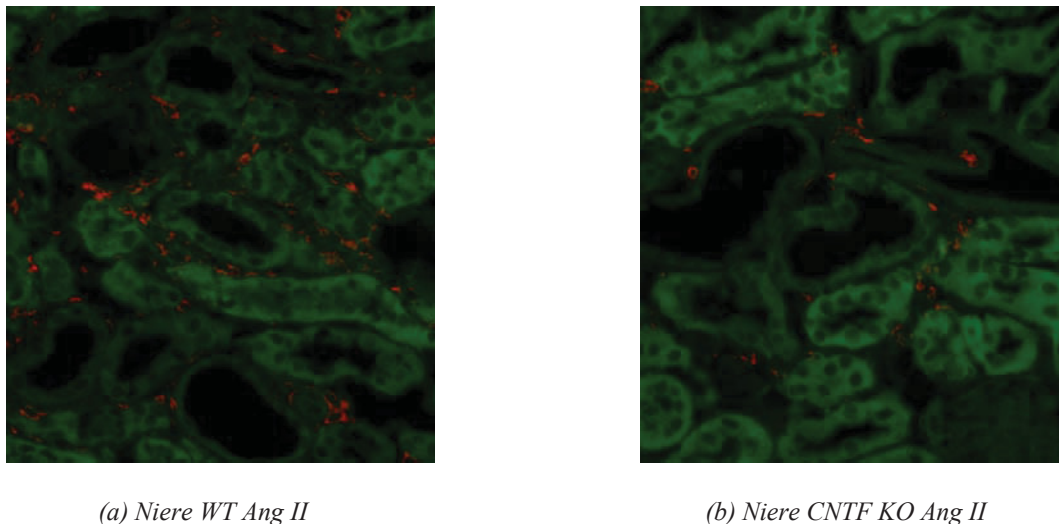


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung nach F4/80 in den mit Ang II behandelten WT- und CNTF-KO-Nieren. F4/80 gilt als Oberflächenmarker der murinen Makrophagen (rot). Diese Untersuchung wurde von Dr. rer. nat. J.-K. Park (Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der medizinischen Hochschule Hannover) durchgeführt.

Aus dieser Färbung wurde die Anzahl der F4/80-positiven Zellen (Makrophagen) pro Blickfeld (von jeder Probe ein Mittelwert aus 20 Blickfeldern) bestimmt. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Makrophagen in WT-Nieren mit Ang II signifikant höher als in CNTF-KO-Geweben, welche mit Ang II behandelt wurden, ist ($22 \pm 2,61$ bei WT, $15 \pm 1,06$ bei KO; $p < 0,05$) (Abb. 17).

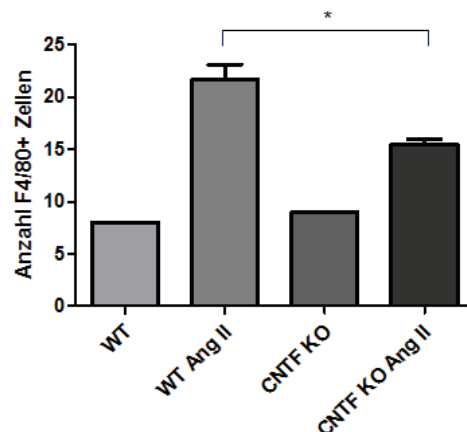


Abbildung 17: Quantifizierung der F4/80 Färbung (Abb. 16). Gegenübergestellt sind die mit Ang II behandelten WT- ($n=3$) und CNTF-KO-Nieren ($n=5$) im Vergleich zu jeweiligen Kontrollnieren. Zwischen den Ang II-behandelten WT- und CNTF-KO-Nieren besteht eine statistische Signifikanz ($*p < 0,05$; t-Test). Diese Untersuchung wurde von Dr. rer. nat. J.-K. Park (Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der medizinischen Hochschule Hannover) durchgeführt.

3.2.7 Genexpression in der Niere

Bei der Organentnahme am Tag 14 der Ang II-Pumpe werden die Organe wie Aorta, Herz und Niere entnommen und im Spezialmedium konserviert (siehe Kapitel Methode). Aus dem konservierten Nierengewebe wird mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und daraufhin Real Time PCR durchgeführt.

NGAL

NGAL gilt als sensitiver Frühmarker für die tubuläre Nierenschädigung. Die Genexpression für NGAL war bei unbehandelten CNTF-WT-Mäusen signifikant höher als bei den KO-Tieren (WT $1,0 \pm 0,18$; KO $0,54 \pm 0,10$; $p < 0,05$). Unter Behandlung zeigten sowohl WT- als auch KO-Tiere einen Anstieg der Expression von NGAL (WT: von $1,0 \pm 0,18$ auf $13,9 \pm 3,64$; $p < 0,0005$, KO: von $0,54 \pm 0,10$ auf $2,51 \pm 0,65$; $p < 0,0005$). Allerdings fiel der Anstieg bei den KO-Tieren

signifikant geringer aus als bei den WT-Tieren (WT $13,9 \pm 3,64$; KO $2,51 \pm 0,65$; $p < 0,005$) (Abb. 18).

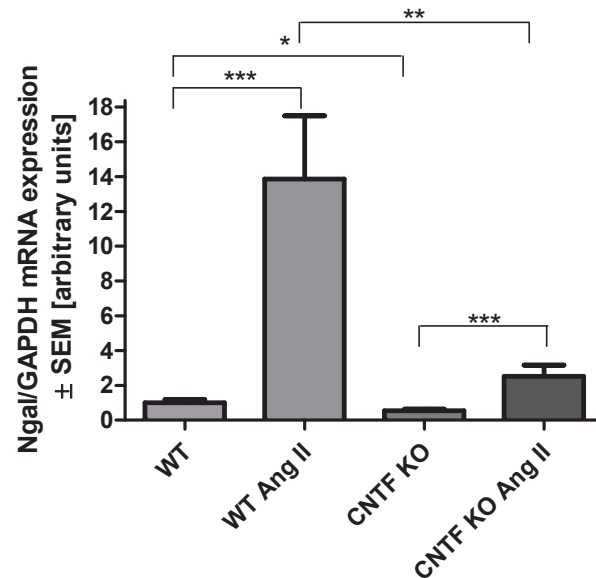


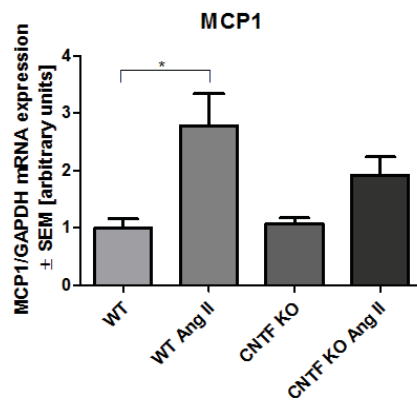
Abbildung 18: Quantifizierung der mRNA-Expression von NGAL in der gesamten Niere. Gegenübergestellt sind die mit Ang II behandelten WT- (n=7) und CNTF-KO-Nieren (n=7) im Vergleich zu jeweiligen Kontrollgruppen (WT-Kontrolle: n=9, CNTF-KO-Kontrolle: n=8). Die NGAL-Expression ist bei der WT-Kontrolle signifikant höher als bei der KO-Kontrolle (* $p < 0,05$; t-Test). Unter Behandlung zeigten sowohl WT- als auch KO-Tiere einen Anstieg der Expression von NGAL (*** $p < 0,0005$; t-Test). Allerdings fiel der Anstieg bei den KO-Tieren signifikant geringer aus als bei den WT-Tieren (** $p < 0,005$; t-Test).

MCP-1, RANTES, TNF α , Kollagen 1, IL-6, LIF

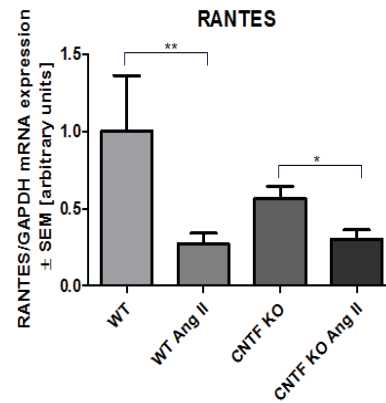
In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Einwanderung von T-Lymphozyten und Makrophagen in das Nierengewebe bei CNTF-KO-Tieren geringer ausgeprägt war. Folglich untersuchten wir die Expression bekannter proinflammatorischer Mediatoren und Chemokine (Abb. 19).

MCP-1 und RANTES wirken als chemotaktische Faktoren und verstärken die Einwanderung inflammatorischer Zellen ins Gewebe. IL-6, LIF und TNF α handelt es sich ebenfalls um Mediatoren der Inflammation. Kollagen 1 ist ein Maß für den Fibrosierungsgrad im Gewebe.

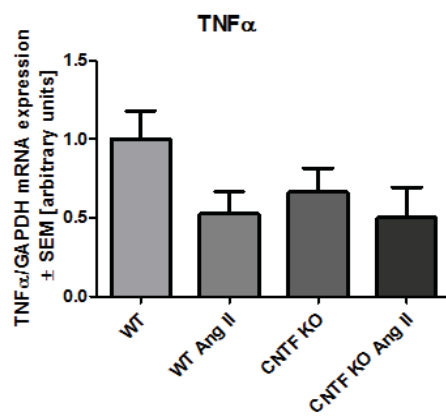
(a)



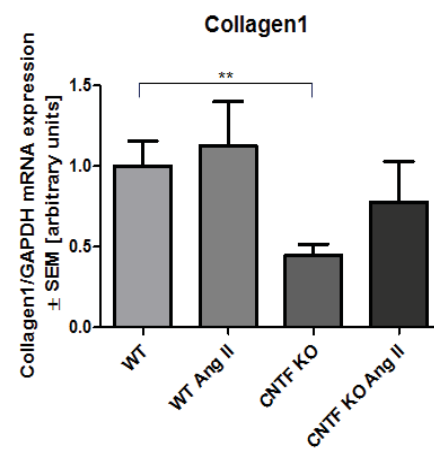
(b)



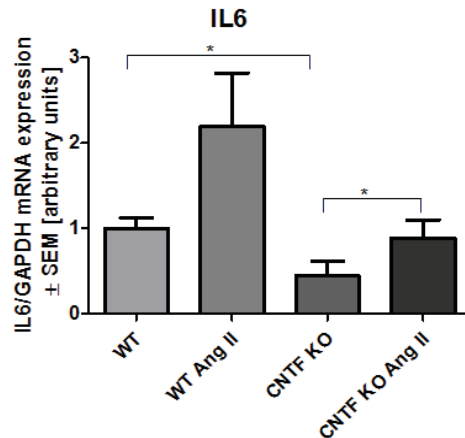
(c)



(d)



(e)



(f)

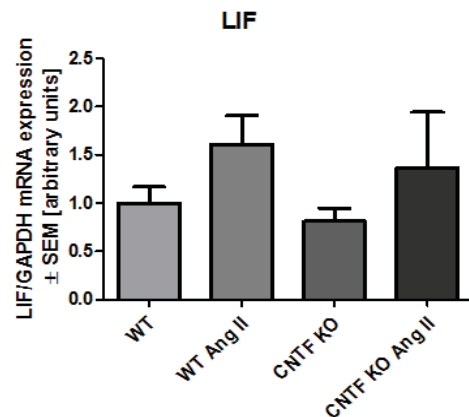
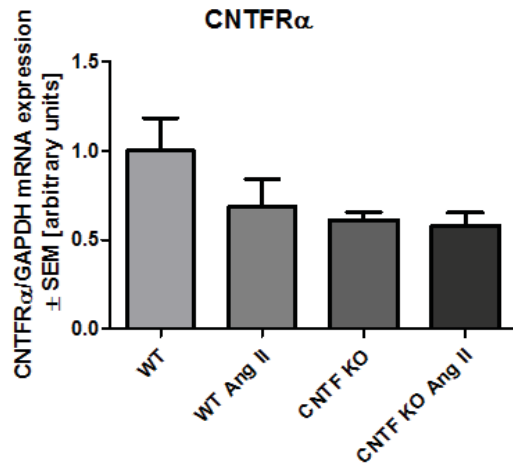


Abbildung 19: Quantifizierung der mRNA-Expression von (a) MCP-1 (b) RANTES (c) TNF α (d) Kollagen1 (e) IL-6 (f) LIF in der Niere. Gegenübergestellt sind die mit Ang II behandelten WT- (n=14) und CNTF-KO-Nieren (n=15) im Vergleich zu jeweiligen Kontrollgruppen (WT Kontrolle: n=9, CNTF-KO Kontrolle: n=8). Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich bei (a) MCP-1 zwischen WT-Kontrolle und WT Ang II (*p<0,05), (b) bei RANTES zwischen WT-Kontrolle und WT Ang II (**p<0,005) sowie zwischen KO-Kontrolle und KO-Ang II (*p<0,05) (d) bei Kollagen 1 zwischen WT- und KO-Kontrolle (**p<0,005) (e) bei IL-6 zwischen WT- und KO-Kontrolle (*p<0,05) sowie zwischen KO-Kontrolle und KO-Ang II (*p<0,05). Zur statistischen Analyse wurde t-Test angewendet.

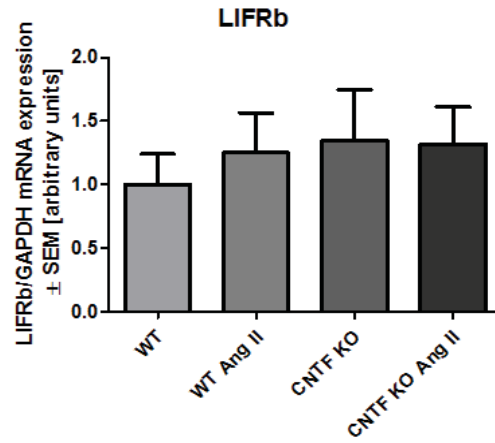
Rezeptorkomponente CNTFR α , LIFR β , gp130

Wie in der Einleitung beschrieben, besteht CNTF Rezeptor aus drei Komponenten: CNTFR α , LIFR β und gp130. Dabei ist CNTFR α für die Ligandenbindung zuständig. LIFR β und gp130 sind die Komponenten, die nach Ligandenbindung Heterodimere bilden und die Signale intrazellulär weitergeben. Hier wurde festgestellt, dass die Genexpression dieser Rezeptorkomponente keine Änderungen nach der Gabe von Ang II zeigt. Zwischen WT- und CNTF-KO-Mäusen besteht auch kein wesentlicher Unterschied im Expressionsniveau (Abb. 20).

(a)



(b)



(c)

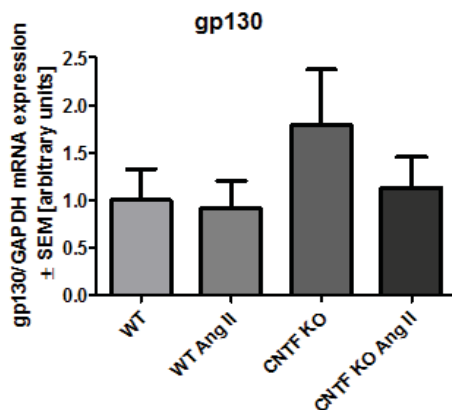


Abbildung 20: Quantifizierung der mRNA-Expression der einzelnen Rezeptorkomponente (a) CNTFR α (b) LIFR β (c) gp130 in der Niere. Gegenübergestellt sind die mit Ang II behandelten WT- (n=9) und CNTF-KO-Nieren (n=7) im Vergleich zu jeweiligen Kontrollgruppen (WT-Kontrolle: n=9, CNTF-KO- Kontrolle: n=9). Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0,05$; t-Test).

3.3 Potentielle Mechanismen der Resistenz von CNTF-defizienten Tieren gegenüber der Induktion eines Hypertonus durch Angiotensin II

Angiotensin II induziert eine Hypertonie über verschiedene Mechanismen: Stimulation der Gefäßkontraktion, Erhöhung der Katecholaminausschüttung über Stimulation des Sympathikotonus und Retention von Natrium und Wasser. Um zu testen, ob die unterschiedliche Empfindlichkeit auf Angiotensin II durch Störung eines der genannten Mechanismen zu erklären ist, wurden diese Systeme einzeln untersucht.

3.3.1 Sympathikus

Aus den entnommenen Nierengeweben sowie aus den Urinen wurde der Noradrenalingehalt bestimmt, um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Sympathikusaktivität bei WT- und CNTF-KO-Mäusen gibt.

3.3.1.1 Noradrenalingehalt im Urin

Die Urine werden mit der im Kapitel 2.3 beschriebenen Methode gesammelt. Die Noradrenalinmenge im Urin wird daraufhin mit HPLC bestimmt und auf Kreatinin bezogen dargestellt. Der Vergleich zwischen WT- und CNTF-KO jeweils am Ang II Tag 0 und am Ang II Tag 14 nach der Pumpenimplantation zeigt, dass es hier kein signifikanter Unterschied besteht (Ang II Tag 0; 18450 ± 1053 bei WT, 26275 ± 2741 bei CNTF-KO; Ang II Tag 14; 43302 ± 10719 bei WT, 33840 ± 1805 bei CNTF-KO) (Abb. 21).

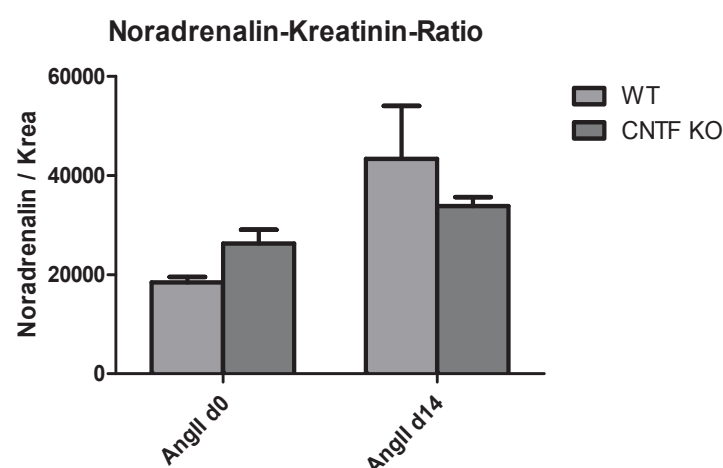


Abbildung 21: Die Noradrenalin Spiegel im Urin wurden mittels HPLC gemessen und auf Kreatinin bezogen dargestellt. Gegenübergestellt sind die Werte der WT- (n=14) und CNTF-KO-Mäuse (n=6) am 14.Tag der Ang II-Infusion (1000 ng/kg/min) zu den entsprechenden Werten vor dem Beginn der Ang II- Infusion. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; t-Test).

3.3.1.2 Noradrenalingehalt in der Niere

Der Noradrenalingehalt in der Niere wurde mit HPLC bestimmt. Die Nieren wurden hierfür wie im Kapitel 2.2. beschriebenen entnommen. Die Menge an Noradrenalin wurde auf die Proteinmenge bezogen dargestellt. Hier wurde auch festgestellt, dass es keinen signifikanten Unterschied an Noradrenalingehalt zwischen WT- und CNTF-KO-Mäusen jeweils am Ang II Tag 0 und Tag 14 nach der Pumpenimplantation besteht (Ang II Tag 0; $4,33 \pm 0,60$ bei WT, $5,93 \pm 0,98$ bei CNTF-KO; Ang II Tag 14; $8,53 \pm 0,66$ bei WT, $10,43 \pm 2,24$ bei CNTF-KO; Alle Werte mit Einheit; pg Noradrenalin / Gesamtprotein $\mu\text{g/ml}$) (Abb. 22).

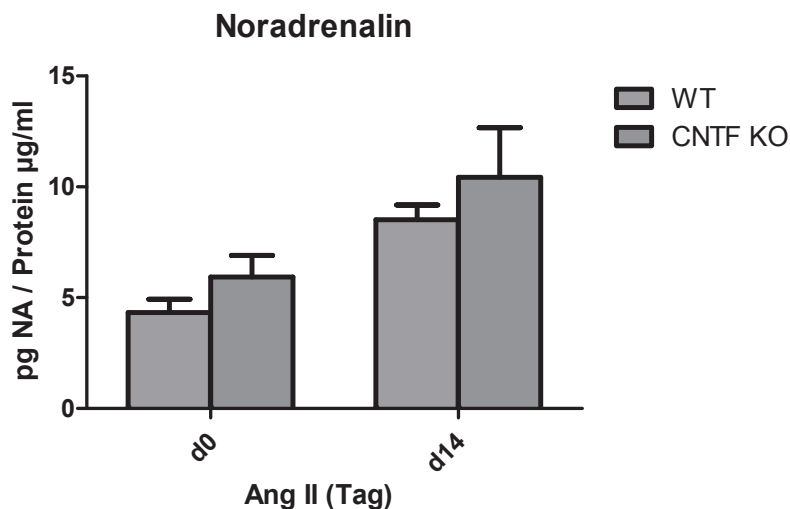


Abbildung 22: Noradrenalin Spiegel im Nierengewebe. NA-Level wurde mittels HPLC gemessen und auf die Proteinmenge bezogen dargestellt. Die Werte der WT- (n=6) und CNTF-KO-Mäuse (n=7) am 14.Tag der Ang II-Infusion (1000 ng/kg/min) sind den entsprechenden Werten vor dem Beginn der Ang II-Infusion gegenübergestellt. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; t-Test).

3.3.1.3 Dopamin- β -Hydroxylase

Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) ist ein Enzym, das im Zytoplasma die Bildung von Noradrenalin aus Dopamin katalysiert. Das Expressionsniveau des DBH-Gens im Nierengewebe wird unter Ang II-Behandlung hochreguliert. Zwischen WT- und CNTF-KO-Gruppe jedoch wurde keine signifikanten Unterschiede an der DBH-Expression nachgewiesen, sowohl in der Kontrollgruppe ohne Ang II als auch in der mit Ang II behandelten Gruppe (WT-Kontrolle ohne Ang II $1,00 \pm$

0,14, KO-Kontrolle ohne Ang II $0,77 \pm 0,17$; WT mit Ang II $1,55 \pm 0,45$, KO mit Ang II $1,42 \pm 0,25$) (Abb. 23).

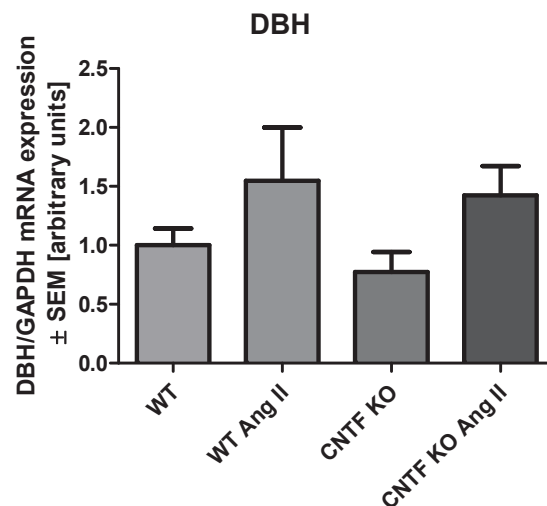


Abbildung 23: Quantifizierung der mRNA-Expression der DBH in der Niere. Gegenübergestellt sind die mit Ang II behandelten WT- (n=16) und CNTF-KO-Nieren (n=15) im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe (WT-Kontrolle: n=8, CNTF-KO-Kontrolle: n=8). Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0,05$; t-Test).

3.3.2 Effekte von CNTF auf die renale Vasokonstriktion : Isoliert perfundierte Niere (ex-vivo-Versuch)

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob das Fehlen von CNTF einen Einfluß auf die Vasokonstriktion ausübt.

Wie es im Kapitel Methoden beschrieben, wird bei der isoliert perfundierten Niere die Mausnieren herauspräpariert und mit Ang II in steigender Konzentration perfundiert. Verschiedene Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion können hier zusätzlich zu Ang II verabreicht werden. Hier wird in *ex vivo* Bedingungen der Druck gemessen, den die renalen Widerstandsgefäße unter Ang II und zusätzlichen intrazellulären Inhibitoren aufbauen.

3.3.2.1 Effekt des CNTF-Knockouts auf die Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurve

Wenn die WT-Nieren mit Ang II in steigender Konzentration perfundiert werden, steigt der Perfusionsdruck. Hier wurde festgestellt, dass der Perfusionsdruck bei CNTF-KO-Nieren unter Ang II-Gabe weniger ansteigt. Dieser Unterschied war signifikant für die Ang II-Konzentration von 3×10^{-10} M (WT $64,6 \pm 9,2$ mmHg; KO $34,0 \pm 7,7$ mmHg; $p < 0,01$) und 3×10^{-9} M (WT $118,9 \pm 7,7$ mmHg; KO $89,9 \pm 7,3$ mmHg; $p < 0,05$) (Abb. 24).

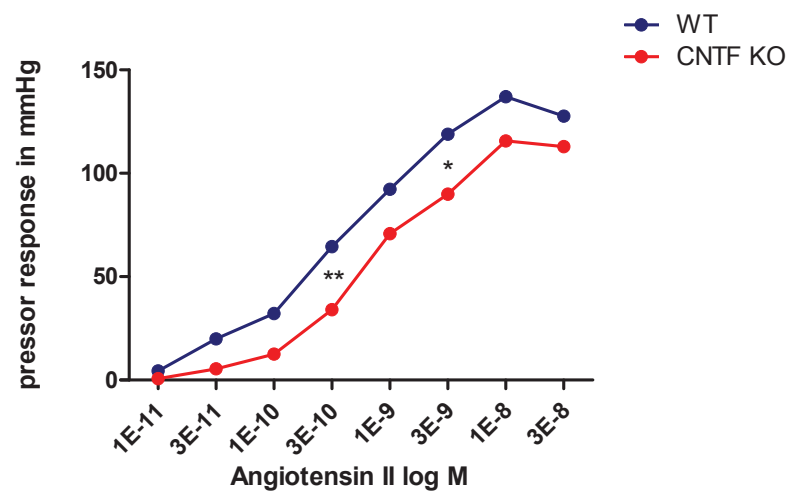


Abbildung 24: Perfusionsdruck der Niere bei WT- (n=12) und CNTF-KO-Mäusen (n=10) unter Gabe von Ang II in steigender Konzentration (1×10^{-11} - 3×10^{-8} mol/l). Der Unterschied ist signifikant bei der Ang II-Konzentration von 3×10^{-10} (WT $64,6 \pm 9,2$ mmHg; KO $34,0 \pm 7,7$ mmHg; $**p < 0,01$) und 3×10^{-9} (WT $118,9 \pm 7,7$ mmHg; KO $89,9 \pm 7,3$ mmHg; $*p < 0,05$; Two-way ANOVA).

3.3.2.2 Effekt von JAK2- Inhibitor auf die Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurve

Hier wurde die Ang II-DWK unter der Gabe von JAK2-Inhibitor AG490 bestimmt. Bei WT-Nieren fiel der Perfusionsdruck unter der Gabe vom JAK2-Inhibitor. Bei CNTF-KO-Nieren wurde kein Unterschied an Perfusionsdruck nach der Gabe vom JAK2-Inhibitor festgestellt (Abb. 25).

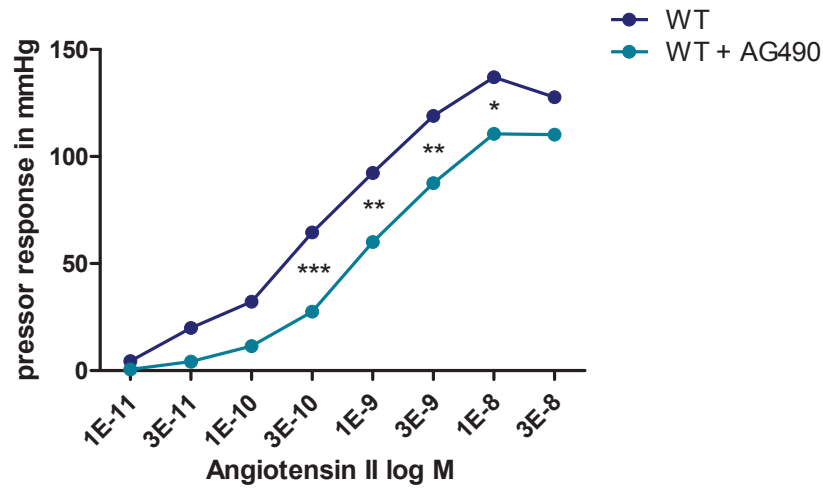
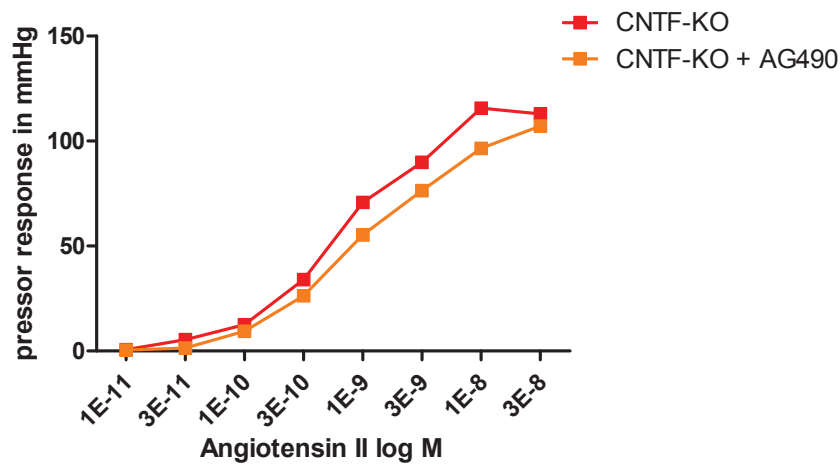
(a) WT $\pm$ JAK2-Inhibitor(b) CNTF-KO $\pm$ JAK2-Inhibitor

Abbildung 25: Einfluss des JAK2-Inhibitors AG490 (5 μ M) auf Perfusionsdruck der Niere bei der Gabe von Ang II in steigender Konzentration (1×10^{-11} - 3×10^{-8} mol/l). Gegenübergestellt sind die bei (a) WT+AG490 (n=12) vs. WT-Kontrolle (n=12) (**p<0,001 bei 3×10^{-10} mol/l, **p<0,01 bei 1×10^{-9} mol/l, **p<0,01 bei 3×10^{-9} mol/l, *p<0,05 bei 1×10^{-8} mol/l; 2way-ANOVA). (b) CNTF-KO+AG490 (n=7) vs. CNTF-KO-Kontrolle (n=10) (p>0,05; Two-way ANOVA).

3.3.2.3 Effekt von exogen appliziertem CNTF auf die Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurve

Hier wurde die Ang II-DWK bei WT-Nieren mit oder ohne CNTF durchgeführt. Eine Niere wurde mit CNTF 100 ng/ml (entspricht $4,386 \times 10^{-9}$ mol/L) perfundiert, die andere ohne CNTF (jedoch mit DMSO als Trägersubstanz des gelösten CNTF). Es zeigte sich, dass die Nieren, die mit CNTF perfundiert wurden, einen signifikant höheren Perfusionsdruck zeigten als die Nieren ohne CNTF (Graphik dargestellt als Druckdifferenz zwischen WT- und CNTF-KO in der jeweiligen Ang II-Konzentration in Bezug auf Druck der WT-Niere bei Ang II 3×10^{-8} mol/L) (Abb. 26).

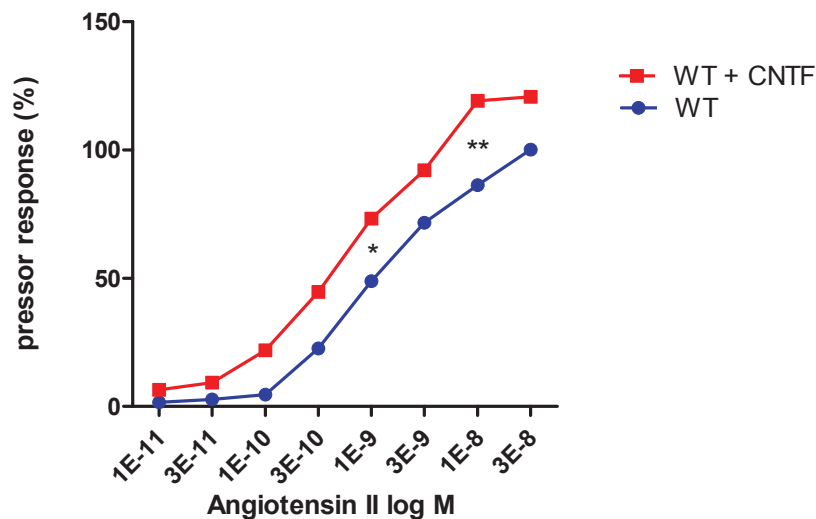


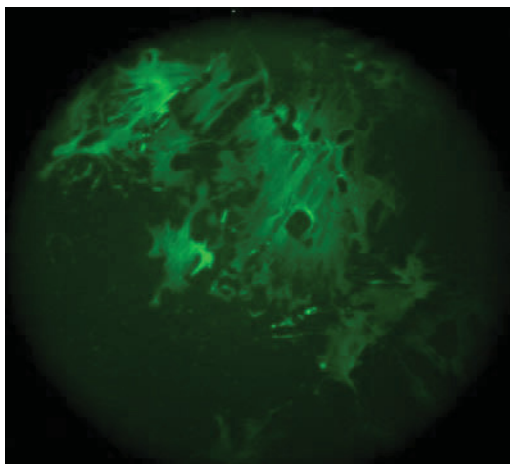
Abbildung 26: Einfluss von CNTF ($4,4 \times 10^{-9}$ mol/l) auf den Perfusionsdruck der WT-Nieren (WT+CNTF; n=5 vs. WT; n=5) bei der Gabe von Ang II in steigender Konzentration (1×10^{-11} - 3×10^{-8} mol/l). Die Messwerte wurden in % von dem jeweiligen Perfusionsdruck der Kontrollniere bei Ang II 30 nM angegeben. Der Unterschied ist signifikant bei der Ang II-Konzentration von 1×10^{-9} (WT $48,8 \pm 3,7$ mmHg; KO $73,2 \pm 6,9$ mmHg; * $p < 0,05$) und 1×10^{-8} (WT $86,3 \pm 3,4$ mmHg; KO $119,1 \pm 10,5$ mmHg; ** $p < 0,01$; Two-way ANOVA).

3.4 Versuche mit vaskulären glatten Muskelzellen (*in-vitro*-Versuche) und Aorten

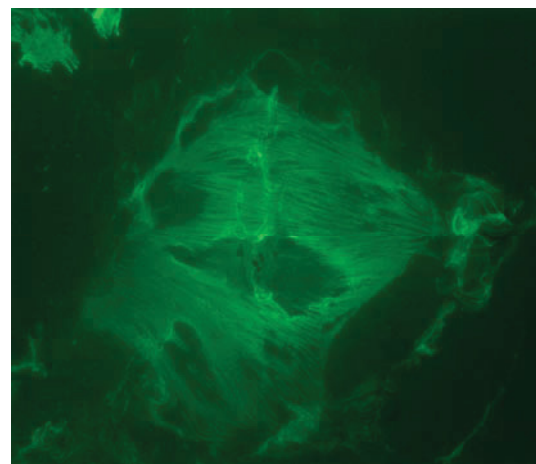
Die Versuche mit der isoliert perfundierten Niere haben gezeigt, dass CNTF die Vasokonstriktion beeinflusst. Der Einsatz von JAK2-Inhibitoren legte nahe, dass der Effekt von CNFT über die JAK2-STAT3-Signalkaskade vermittelt werden könnte. Daher befasst sich der folgende Abschnitt mit der Untersuchung der Signaltransduktion von CNTF in vaskulären glatten Muskelzellen.

3.4.1 Immunfluoreszenzfärbung nach α -Aktin (glattmuskelzell-spezifisch)

Zu diesem Zweck wurden die vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) aus der Aorta von C57BL/6-Mäusen nach der Methode isoliert, die im Kapitel 2.6 beschrieben ist. Nach der Isolierung der Zellen wurde die Kontrollfärbung auf das glattmuskelzell-spezifische α -Aktin2 (Acta) durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um die glatten Muskelzellen handelt. Die Immunfluoreszenzfärbung nach Acta zeigte typische radiär angeordnete Aktinfilamente in den Zellen, die spezifisch gefärbt wurden (im Gegensatz zur Kontrollfärbung, die dunkel erschien) (Abb. 27).



(a) VSMC aus Aorta C57BL/6

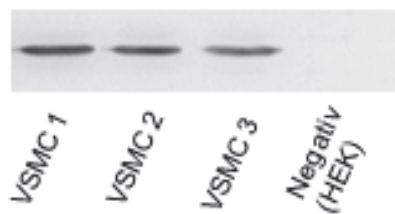


(b) A7r5-Zellen

Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung der VSMC aus (a) Aorta der C57BL/6-WT-Maus und (b) der embryonalen Rattenaorta (A7r5-Zellen) nach der glattmuskelspezifischen α -Aktin2 (Acris 1:75). Immunfluoreszenzmarkiert mit Anti-Rabbit (Alexa Fluor 1:750) für 488 nm. 200-fach Vergrößerung.

3.4.2 Immunoblot nach α -Aktin (glattmuskelzell-spezifisch)

A7r5-Zellen stellen sich etablierte vaskuläre glatte Muskelzelllinien dar, die aus der embryonalen Rattenaorta gewonnen wurden. Bei diesen Zellen wurde ebenfalls die Kontrollfärbung auf das glattmuskelzell-spezifische α -Aktin2 (Acta) durchgeführt. Diese wurde als Immunoblot aus dem Lysat der A7r5-Zellen durchgeführt. Es resultierte Banden bei den Lysaten der A7r5-Zellen, während beim Lysat der Human Embryonic Kidney-Zellen (HEK-Zellen), die als Negativkontrolle diente, keine Bande resultierte (Abb. 28).



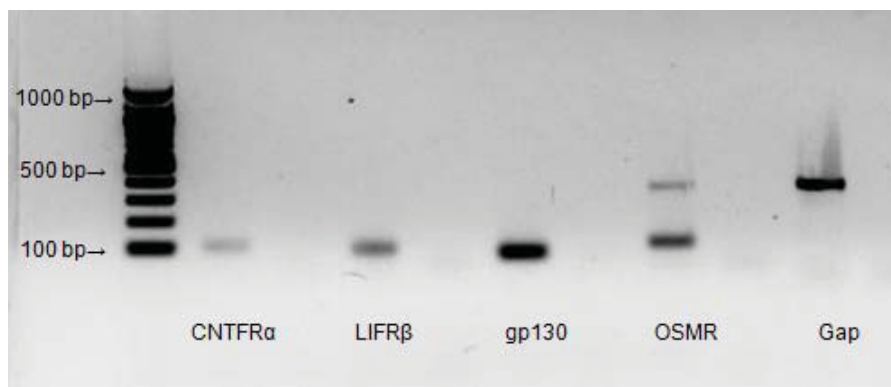
A7r5-Zellen

Abbildung 28: Immunoblot aus dem Lysat der VSMC der embryonalen Rattenaorta (A7r5-Zellen) nach der glattmuskelspezifischen α -Aktin2 (Acris 1:2000). Chemilumineszenz-markiert mit HRP-konjugiertem Anti-Rabbit-Antikörper (1:10000). Belichtungszeit 2 min.

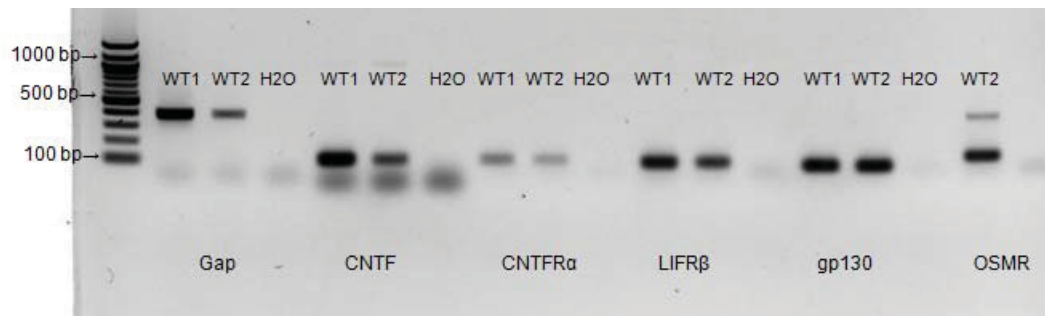
3.4.3 Nachweis der Genexpression von Rezeptorkomponenten in VSMC

Als nächster Schritt wurde die Genexpression der Rezeptorkomponente in VSMC geprüft, um nachzuweisen, dass die Basis für die zellulären Reaktionen auf CNTF Stimuli vorhanden ist. Für diesen Zweck wurde RNA aus den VSMC, die aus der Aorta von C57BL/6-Mäusen gewonnen wurden, in der Passage 2 isoliert und nach der im Kapitel 2.6. beschriebenen Methode die cDNA hergestellt. Die Agarosegelelektrophorese nach der konventionellen qualitativen PCR wird unten gezeigt. Es zeigt sich, dass sowohl CNTF als auch dessen Rezeptorkomponente CNTFR α und LIFR β in VSMC auf Genebene exprimiert sind (Abb. 29)

(a) Aorta der C57BL/6-Mäusen



(b) Präglomeruläre Gefäße der C57BL/6-Mäusen



(c) VSMC aus Aorta der C57BL/6-Mäusen



(d) A7r5-Zellen

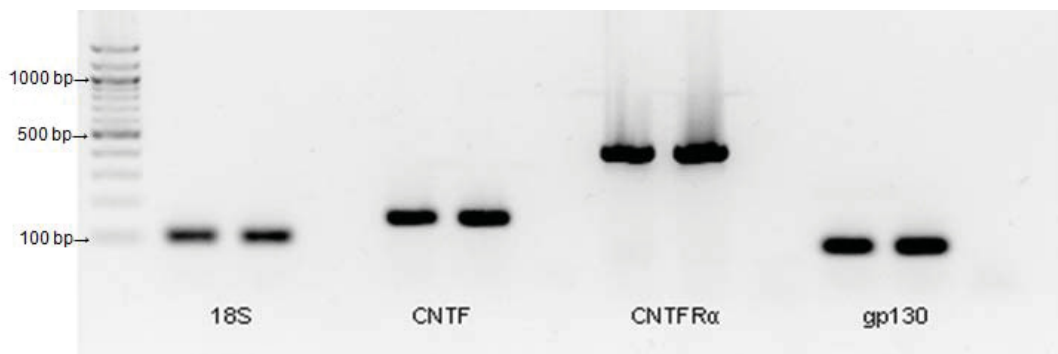


Abbildung 29: Genexpression des CNTF und seiner Rezeptorkomponenten in verschiedenen Gefäßabschnitten der C57BL/6-WT-Maus. PCR Produkte nach 35 Zyklen wurden mit dem Marker für 100 bp auf 1,5% Agarosegel aufgetragen. (a) Aorta von C57BL/6-Mäusen (b) Präglomeruläre Gefäße von C57BL/6-Mäusen (c) VSMC aus Aorta von C57BL/6-Mäusen (d) A7r5-Zellen.

3.4.4 Nachweis der Aktivierung der STAT3-Signalwege auf Stimulation mit CNTF in VSMC

Wie im Kapitel 2.7. beschrieben, wurden die VSMC zwischen Passage 3 bis 5 mit rekombinantem CNTF in Konzentration von 100 ng/ml stimuliert. In der Zeitkinetik für die darauffolgende Phosphorylierung von STAT3 zeigte sich, dass STAT3 30 min nach der Gabe von CNTF am stärksten phosphoryliert wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass CNTF in VSMC den JAK2-STAT3-Signalweg aktiviert (Negativkontrolle; $1,0 \pm 0,0$, 5 min $3,75 \pm 1,38$, 15 min $7,11 \pm 2,49$, 30 min $10,64 \pm 4,43$, 60 min $5,50 \pm 1,20$, 120 min $2,54 \pm 1,01$) (Abb. 30).

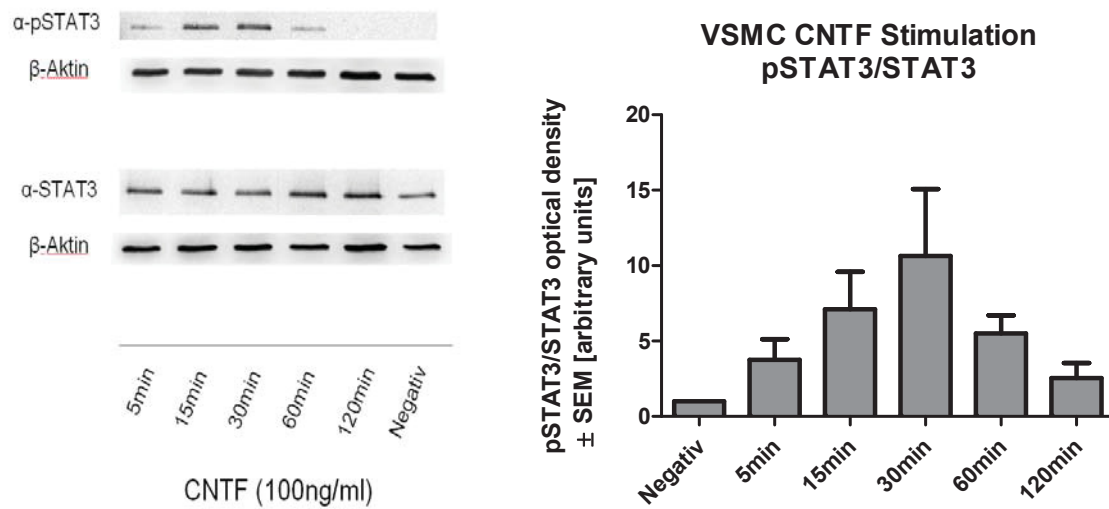


Abbildung 30: Immunoblot der STAT3 (Cell Signaling 1:1000) und phospho-STAT3 (Cell Signaling 1:2000) aus dem Lysat der VSMC aus der Aorta der C57BL/6-WT-Maus nach der Stimulation mit CNTF (100 ng/ml) mit unterschiedlichen Stimulationszeiten. Die Intensität der Banden wurde jeweils auf β -Aktin (Sigma 1:5000) bezogen dargestellt. Belichtungszeit für STAT3 und phospho-STAT3 betrug 10 min, für β -Aktin 2 min. Phospho-STAT3 in VSMC wird nach der Stimulation mit CNTF nach 30 min am stärksten phosphoryliert.

4 Diskussion

4.1 Blutdruck bei Wildtyp- und CNTF-Knockout-Mäusen

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell der CNTF-Knockout-Maus die Rolle von CNTF in der Ang II-induzierten Hypertonie untersucht.

Seit der Entdeckung von Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) im Ganglion Ciliare des Hühnerembryos sind bislang zahlreiche Studien über seine potentiell überlebensfördernden Effekte auf Zellen publiziert worden (reviewed von Sendner et al. 1994). Wie eingangs ausführlich geschildert, ist dabei das Hauptaugenmerk auf seine wachstums- und differenzierungsfördernde Rolle für Neurone und Gliazellen gelegt worden. Aufgrund seiner neuroprotektiven Eigenschaften weckte CNTF Hoffnung auf eine klinische Einsatzmöglichkeit bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. Über seine potentielle Auswirkung außerhalb des zentralen und peripheren Nervensystems existieren jedoch wenige Arbeiten, insbesondere über seine Rolle im kardiovaskulären System liegt unseres Wissen nach bis dato keine Studie vor.

Es gibt viele Hinweise für die Rolle von Zytokinen in der Regulation des Blutdrucks. Ihre Bedeutung ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt worden. Der erhöhte Plasmaspiegel von Interleukin 6 (IL-6) ist bekanntermaßen mit einem erhöhten Risiko einer kardiovaskulären Morbidität (Ridker et al. 2000) und Mortalität (Harris et al. 1999) verbunden. Die positive Korrelation zwischen einem erhöhten Plasma-IL-6-Spiegel und dem Vorliegen einer kardiovaskulären und metabolischen Erkrankung wie beispielweise Diabetes, Herzinsuffizienz oder Adipositas ist nachgewiesen (Ikeda et al. 1992; Pradhan et al. 2001; Schieffer et al. 2000). Aufgrund dieser Erkenntnisse betrachten Stenvinkel et al. IL-6 als einen potentiellen, prognostisch relevanten Marker für kardiovaskuläre Ereignisse (Stenvinkel et al. 2002). Einige Studien haben sich speziell mit dem Bluthochdruck beschäftigt. In einer Querschnittstudie wurde eine signifikante Korrelation zwischen einem erhöhten Plasmaspiegel von IL-6 und den erhöhten systolischen sowie diastolischen Blutdruckwerten nachgewiesen (Chae et al. 2001). Angiotensin II (Ang II) stimuliert bekanntermaßen die Freisetzung von IL-6 (Funakoshi et al. 1999, Han et al. 1999) und die Infusion von IL-6 kann einen Bluthochdruck bei trächtigen Ratten induzieren (Orshal et al. 2004). Die mRNA-Expression sowie der Plasma-Spiegel von IL-6 sind in spontan hypertensiven Ratten erhöht (Sanz-Rosa et al. 2005). In Bezug auf die anderen Zytokine der IL-

6-Familie ist bekannt, dass Leukemia Inhibitory Factor (LIF) sowie Cardiotrophin-1 (CT-1) *in vitro* die Hypertrophie von Kardiomyozyten in hypertensiven Ratten induzieren können (Takimoto et al. 2002).

Die genannten Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit hin, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen IL-6 bzw. Zytokinen der IL-6-Familie und kardialen Ereignissen bestehen könnte.

In unseren Experimenten zeigte sich, dass der Blutdruck unter Ang II-Infusion bei der CNTF-KO-Maus signifikant niedriger als bei der WT-Maus war. Die Herzfrequenz lag bei der CNTF-KO-Maus signifikant höher. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen spiegelte sich ebenfalls in der Überlebensrate nieder. Die CNTF-KO-Mäuse hatten eine signifikant bessere Überlebensrate unter Ang II-Infusion. Während dem 14-tägigen Behandlungszeitraum mit Ang II sind 10 WT-Mäuse (29,4%) von 34 Mäusen gestorben. In der KO-Gruppe ist ein Tier von insgesamt 24 Mäusen gestorben (4,2%) ($p < 0,05$).

Unsere Ergebnisse zeigen Parallelen mit Ergebnissen einiger experimenteller Studien, die mit IL-6-Knockout-Mäusen durchgeführt wurden. Einige Arbeitsgruppen zeigten in einem Knockout-Mausmodell, dass die IL-6-KO-Mäuse unter Ang II-Infusion signifikant niedrigen Blutdruck aufweisen (Brands et al. 2006; Coles et al. 2007; Lee et al. 2010).

Eine Erklärung für die genannte Parallelität zwischen CNTF und IL-6 bietet der Fakt, dass der Rezeptorkomplex für beide Moleküle eine ähnliche Struktur zeigt, so dass die Signaltransduktion bei beiden Molekülen vergleichbar ablaufen kann. Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die funktionelle Parallelität der beiden Moleküle ist, dass CNTF bekanntermaßen ebenfalls über IL-6 Rezeptor sein Signal vermitteln kann (Schuster et al. 2003). Ob diese mögliche Interaktion zwischen CNTF und IL-6-Rezeptor tatsächlich bei der Pathogenese der Ang II-induzierten Hypertonie kausal beteiligt ist, ist Gegenstand anschließender Forschungsprojekte.

4.2 Hypertensive Endorganschäden

Zum Ziel der vorliegenden Arbeit gehört es, zu untersuchen, wie CNTF das Ausmaß hypertensiver Endorganschäden beeinflusst.

Das signifikant unterschiedliche Blutdruckverhältnis unter Ang II-Infusion zwischen CNTF-WT- und KO-Mäusen, legte die Vermutung nahe, dass strukturelle und funktionelle Auswirkung der Hypertonie auf Organebene zu finden sind. Wie erwartet zeigte das Myokard der WT-Mäuse eine deutliche Hypertrophie nach der 14-tägigen Ang II-Infusion, das Myokard der CNTF-KO-Mäuse hingegen nicht.

In der Niere zeigten schwerpunktmäßig tubulo-intestitielle Schäden. Im Einklang zu den Ergebnissen der *in-vivo*-Untersuchung steht die Beobachtung, dass CNTF-WT- und KO-Mäuse keinen signifikanten Unterschied an Proteinurie unter Ang II-Infusion zeigten. Des Weiteren erbrachten die Genexpressionsanalyse sowie die Immunfluoreszenzfärbung der Glomeruli keinen Unterschied der Expression der glomerulären Schlitzmembranproteine sowohl auf der Genexpressions- als auch auf der Proteinebene.

Im Interstitium sowie im Tubulus fanden sich dagegen deutlich erkennbare Unterschiede. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), ein sensitiver Frühmarker für die tubuläre Nierenschädigung, zeigte in der Genexpressionsanalyse ein signifikant höheres Expressionsniveau in WT-Nieren im Vergleich zu CNTF-KO-Nieren nach der Ang II-Infusion. Ein histologisches Korrelat stellten in den WT-Nieren ausgeprägte tubuläre Zellschädigung, Zeichen der Monozyteninfiltration sowie Fibrose dar. Des Weiteren zeigte sich in den histologischen Präparaten deutlich hypertrophierte Gefäßwand. Diese imponiert in der Masson-Trichrom-Färbung als vermehrte Disposition der perivaskulärer Kollagenfasern, welche als unmittelbare Folge des Bluthochdrucks zu werten ist.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Arbeit von Johnson et al., die beobachteten, dass Ang II-Infusion bei Ratten eine fokale tubulointestitielle Schädigung in der Niere verursacht, genauso wie die tubuläre Dilatation und Atrophie, Monozyteninfiltration im Interstitium, interstitielle Fibrose mit vermehrter Deposition von Typ IV Kollagen (Johnson et al. 1991).

Der Mechanismus, wie Ang II die Endorganschäden verursacht, ist wie bereits eingangs dargestellt, ein komplexes Zusammenspiel von Faktoren, die im Einzelnen nicht völlig geklärt worden sind. Zweifelfrei spielen jedoch inflammatorische Prozesse in der Schädigung und Remodeling des Gewebes eine große Rolle.

Zu den histologischen Merkmalen, die durch die Ang II-Infusion hervorgerufen werden, müssten daher nicht nur die Folgen der arteriellen Hypertonie wie Proliferation und Hypertrophie der glatten Muskelzellen an der Gefäßwand, sondern auch die Folgen der inflammatorischen Prozesse und Remodeling im Gewebe gehören.

In unseren histologischen Präparaten stellten sich nach der Ang II-Infusion sowohl die Anzahl der CD4-positiven Zellen (T-Helfer-Zellen) als auch die Anzahl der CD8-positiven Zellen (zytotoxische T-Zellen) in den WT-Nieren signifikant höher dar als in den CNTF-KO-Nieren.

In der immunhistochemischen Färbung von F4/80 (Oberflächenmarker muriner Makrophagen)

zeigt sich ebenfalls, dass F4/80 nach der Ang II-Infusion in den WT-Nieren signifikant mehr als in den CNTF-KO-Nieren vorhanden war. Dies ist ein Indiz für eine vermehrte Monozyten-/Makrophageninfiltration in den WT-Nieren nach Ang II-Infusion.

Des Weiteren zeigte sich in unseren Genexpressionsanalysen, dass das Expressionsniveau von Kollagen und Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) nach Ang II-Infusion in WT-Nieren signifikant höher als in CNTF-KO-Nieren war. MCP-1 ist ein Zytokin, welches von Monozyten, Makrophagen sowie dendritischen Zellen freigesetzt wird und die Rekrutierung von weiteren Monozyten, T-Zellen sowie dendritische Zellen bewirkt. Es ist bekannt, dass Ang II ebenfalls die Synthese von MCP-1 induzieren kann und sich dadurch an den inflammatorischen Prozessen im Gewebe sowie an die fibrotische Umwandlung (Remodeling) des Gewebes beteiligen kann (Ruiz-Ortega et al. 2002).

Die erlangten Ergebnisse darauf hin, dass die Abwesenheit von CNTF nicht nur zu einem niedrigeren Blutdruck, sondern auch zu weniger inflammatorischen und fibrotischen Änderungen unter Ang II führt.

4.3 Unterschiede der Blutdruckregulation bei Wildtyp- und CNTF-Knockout-Mäusen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, über welchen Mechanismus die Blutdruckregulation bei WT- und CNTF-KO-Mäusen vermittelt wird.

4.3.1 Sympathikus

Die Regulation des Blutdrucks unterliegt einem komplexen Regelkreis, der grob in eine kurzfristige, mit Messung und Regulation durch Pressor- sowie kardiale Dehnungsrezeptoren, sowie eine mittel- bis langfristige Steuerung eingeteilt wird. In der mittel- bis langfristigen Blutdruckregulation spielen das sympathische Nervensystem sowie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) genauso wie die Freisetzung von antidiuretischem Hormon (ADH) aus dem Hypophysenhinterlappen eine maßgebende Rolle. Das sympathische Nervensystem und RAAS stellen dabei ein kausal miteinander interagierendes System dar. Beispielsweise ist bekannt, dass in der renovaskulären Hypertonie eine erhöhte Sympathikusaktivität vorhanden ist und dieser erhöhte Aktivitätszustand des Sympathikus durch Inhibition von Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) unterdrückt werden kann (Schwieler et al. 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund als nächster Schritt die Aktivität des sympathischen Nervensystems in WT- sowie in CNTF-KO-Mäusen als mögliche Ursache für den beobachteten Blutdruckunterschied zwischen den beiden Gruppen untersucht. Die Sympathikusaktivität unter dem Einfluss von Ang II läßt sich durch die Messung des Noradrenalingehaltes sowohl im Nierengewebe als auch im Urin mit oder ohne Ang II-Pumpe ermitteln. Diese Untersuchung zeigte keinen Unterschied zwischen WT und CNTF-KO. Des Weiteren zeigte sich in der Genexpression von Dopamin- β -Dehydroxylase (DBH), welcher eine enzymatische Verbindung von Dopamin zu Noradrenalin darstellt, keinen Unterschied zwischen WT- und CNTF-KO-Nieren.

Diese Ergebnisse legen also den Schluß nahe, dass die Sympathikusaktivität zur Entstehung des Blutdruckunterschiedes zwischen WT und CNTF-KO keine wesentliche Rolle spielt.

4.3.2 Vasokonstriktion

Unsere Untersuchung über die Katecholamine zeigten, dass zwischen WT und CNTF-KO keine Unterschiede am Katecholaminspiegel vorliegen. Den beobachteten Blutdruckunterschieden könnte somit vermehrte lokale Vasokonstriktion zugrunde liegen.

Die renalen Widerstandsgefäße unterliegen bekanntermaßen dem vasokonstriktorischen Effekt von Ang II. Das Modell der isoliert perfundierten Mausnieren stellt sich als ein geeignetes Modell dar, um die lokale vasokonstriktorische Wirkung von Ang II im renalen System unabhängig von systemisch zirkulierenden Substanzen untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit als nächster Schritt mit dem Modell der isoliert perfundierten Mausnieren unter *ex-vivo*-Bedingungen gearbeitet.

In isolierten Nieren von WT-Mäusen zeigt sich unter Ang II-Infusion eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion, welche als Druckanstieg zu messen ist. Im Vergleich zu WT-Tieren zeigte sich bei KO-Mäusen ein verminderter Druckanstieg. Die beobachteten Druckunterschiede in der isoliert perfundierten Niere verhalten sich ähnlich wie im chronischen *in-vivo*-Infusionsmodell.

In der Zusammenschau deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der hämodynamisch relevante Effekt von CNTF auf einem lokal-regulatorischen Mechanismus des Vasotonus beruhen könnte. Zur weiteren Differenzierung und Identifikation des verantwortlichen Signalmoleküls bei der Regulation des Gefäßwiderstandes wurden Signalkaskaden, welche in die Hypertonieentstehung durch Ang II involviert sind, blockiert. Der molekulare Mechanismus, wie Ang II den

Gefäßtonus reguliert, ist noch nicht im vollen Detail geklärt worden. Zweifelsfrei befindet sich die Endstrecke der Kaskade jedoch in der Gefäßwand, genauer in den vaskulären glatten Muskelzellen, die ein Widerstandgefäß umgeben und deren Kontraktion zur Lumenengung und somit zur Druckerhöhung des Systemkreislaufes beitragen. Zuletzt gab es mehrfach Hinweise in der Literatur, dass die Januskinase 2 (JAK2) hier eine Rolle spielt. JAK2 ist ein intrazelluläres Signalmolekül, chemisch gesehen eine Tyrosinkinase, die in verschiedenen Zellen vorkommt und unmittelbar nach der Bindung eines Ligandes an den Rezeptor aktiviert werden kann. Es ist bekannt, dass sowohl Ang II als auch Zytokine der IL-6-Familie JAK2 als Signalmolekül nach ihrer Bindung an den Rezeptor benötigen. Dass JAK2 spezifisch in der Vermittlung eines blutdruckrelevanten Signals eine Rolle spielt, zeigten kürzlich Guilley et al., indem sie nachweisen konnten, dass durch die Gabe von JAK2-Inhibitor AG490 die Ang II-induzierte Hypertonie bei Mäusen unterdrückt werden konnte (Guilley et al. 2010). JAK2-KO-Mäuse entwickeln ebenfalls niedrigeren Blutdruck unter Ang II (Kirabo et al. 2011).

In unseren Experimenten setzten wir daher AG490 ein, den wir zusätzlich zu Ang II in der Perfusion hinzufügten. Hier zeigte sich, dass WT-Nieren nach der Gabe von AG490 einen niedrigeren Perfusionsdruck aufwiesen, während der Perfusionsdruck bei CNTF-KO-Nieren, welcher sich in Abwesenheit von AG490 in einem niedrigen Niveau befand, nach der Gabe von AG490 nicht mehr weiter abfiel.

Dieses Ergebnis könnte als ein starkes Indiz für die Rolle von JAK2 als Schlüsselmolekül für die Regulation der vasokonstriktorisches Signalkaskade bewertet werden.

Basierend auf der genannten Arbeit von Guilley et al. zeigten Kirabo et al., dass JAK2 eine Ang II-induzierte Gefäßkontraktion vermittelt, indem die Produktion der Sauerstoffradikale erhöht wird (Kirabo et al. 2011). Interessanterweise kann hier ebenfalls auf einen Zusammenhang zu IL-6 hingewiesen werden. Denn es ist bekannt, dass IL-6 eine Ang II-induzierte Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Endotheldysfunktion vermittelt (Schrader et al. 2007). Kürzlich zeigten Johnson et al., dass der Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), ein unmittelbares Downstream-Protein von JAK2, eine Ang II-induzierte Erhöhung der Sauerstoffradikale vermittelt (Johnson et al. 2013). Dabei applizierten Johnson et al. bei C57BL/6-Mäusen einen STAT3-Inhibitor und zeigten dadurch, dass die Inhibition von STAT3 den Ang II-induzierte oxidative Stress, endotheliale Dysfunktion sowie Hypertension entgegenwirkt. Johnson et al. weisen hier auf die Interaktion von Ang II und IL-6 in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen sowie auf die mögliche Rolle dieses

Signalweges (als gemeinsame Endstrecke von Ang II und IL-6) in der Endotheldysfunktion und Hypertonie hin. Über diesen Aspekt in Hinsicht auf einen molekularen Mechanismus werden wir im Folgenden eingehen.

4.3.3 Vaskuläre glatte Muskelzellen

In unseren bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass 1) es unter Ang II-Infusion ein Blutdruckunterschied zwischen WT- und CNTF-KO-Mäusen besteht sowie 2) dass der beobachtete Blutdruckunterschied vermutlich durch einen lokal vasokonstriktorischen Effekt herbeigeführt wird. Zudem haben wir den Hinweis darauf, dass diesem lokal vasokonstriktorischen Effekt ein JAK2-abhängiger Signalweg in vaskulären glatten Muskelzellen zugrunde liegt. Unser nächstes Ziel ist daher, den molekularen Mechanismus in vaskulären glatten Muskelzellen zu ermitteln, um den genauen Ablauf der vasokonstriktorischen Signale, die möglicherweise gemeinsam durch Ang II und CNTF vermittelt werden, zu beleuchten.

Wie eingangs ausführlich erläutert, spielen vaskuläre glatte Muskelzellen, die die Gefäßwand eines Widerstandsgefäßes umgeben, in der Ang II-induzierten Hypertonie eine zentrale Rolle. Ang II vermittelt bekanntermaßen seine vasokonstriktorischen Signale über Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1 (AT₁-Rezeptor), der sich auf der Oberfläche der vaskulären glatten Muskelzellen befindet. Der AT₁-Rezeptor, der G-Protein gekoppelt ist, aktiviert nach der Bindung von Ang II verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege, die entsprechend der Vielfalt der Wirkung von Ang II auf die Zellen eine dynamische Komplexität darstellen.

Beispielsweise ist bekannt, dass die Bindung von Ang II an den AT₁-Rezeptor die Phospholipase C aktiviert, die über Inositoltriphosphat 3 (IP₃) zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führen, die schließlich zur Kontraktion der VSMC beiträgt. Eine weitere detaillierte Einsicht in diesen Vorgang wurde, wie bereits erwähnt, kürzlich von Guilley et al. gegeben (Guilley et al. 2010). Guilley et al. zeigten, dass JAK2 in diesem Prozess eine wesentliche Rolle spielt, indem JAK2 eine Kaskade von Verbindungsmolekülen wie Rho guanine nucleotide exchange factor 1 (Arhgef1) sowie Ras homolog gene family, member A (RhoA) aktiviert, die unmittelbar die Phosphorylierung von Myosinleichtketten und somit die Kontraktion der VSMC bewirkt. Kirabo et al. bestätigten kurz darauf die Ergebnisse von Guilley et al. und zeigten zudem, dass JAK2 eine Ang II-induzierte Gefäßkontraktion vermittelt, indem er den Spiegel der Sauerstoffradikale in VSMC erhöht (Kirabo et al. 2011). Demnach wurde

deutlich, dass JAK2 sich als ein Schlüsselmolekül darstellt, das die vasokonstriktorisches Signale von Ang II vermutlich durch eine Erhöhung der Sauerstoffradikale in den VSMC zur Gefäßkontraktion vermittelt. Zur weiteren Differenzierung der intrazellulären Signaltransduktionsvorgänge ist es wichtig zu beleuchten, welches Signalmolekül den weiteren Signalweg nach JAK2 übernimmt, das unmittelbar zu einer Erhöhung der Sauerstoffradikale führen kann. Dabei ist bereits bekannt, dass STAT3 sich ein unmittelbares Ziel distal von JAK2 darstellt. Kürzlich zeigten Johnson et al., dass STAT3 eine Ang II-induzierte Erhöhung der Sauerstoffradikale vermittelt (Johnson et al. 2013). Somit stellt sich STAT3 als ein wichtiges Molekül dar, das als Downstream-Protein von JAK2 das Signal von Ang II zur Erhöhung der Sauerstoffradikale vermitteln kann.

Im Bezug auf das Ziel der vorliegenden Arbeit, nämlich die Rolle von CNTF in der Ang II-induzierten Hypertonie zu beleuchten, wäre hier wichtig zu berücksichtigen, dass IL-6 bekannterweise eine Ang II-induzierte Erhöhung der Sauerstoffradikale und Endotheldysfunktion vermittelt (Schrader et al. 2007), so dass wir hier die Hypothese aufgestellt haben, dass IL-6 bzw. die Zytokine, die zur IL-6-Familie gehören, wie z.B. CNTF, über den JAK2-STAT3-Signalweg einen Einfluss auf die Ang II-induzierte Erhöhung der Sauerstoffradikale sowie Blutdruckregulation ausüben könnten.

Aus diesem Grund untersuchten wir in den VSMC den Aktivierungsgrad von STAT3 nach der Behandlung von VSMC mit CNTF (Stimulationsversuch).

Als Grundlage zum Stimulationsversuch konnten wir zunächst in der Expressionsanalyse zeigen, dass AT₁- sowie CNTF-Rezeptoren in den VSMC vorhanden sind. In der daraufhin durchgeführten Stimulation von VSMC mit CNTF zeigte sich, dass STAT3 nach der Gabe von CNTF stärker phosphoryliert und der stärkste Phosphorylierungsgrad nach einer 30-minütigen Stimulation erreicht wurde.

Diese Ergebnisse stützen die oben erstellte Hypothese über eine mögliche Interaktion zwischen Ang II und CNTF, sie legen nahe, dass Ang II und CNTF in VSMC wahrscheinlich eine synergistische Rolle spielen. Der vermutete Synergismus läuft hier über dem JAK2-STAT3-Signalweg, den beide Moleküle zu nutzen scheinen. Ein Hinweis auf die Richtigkeit unserer Hypothese erhielten wir zum Schluss in unseren Experimenten, in dem wir zeigen konnten, dass die gleichzeitige Gabe von Ang II sowie CNTF in der isoliert perfundierten Mausniere zur stärkeren Kontraktion der renalen Widerstandsgefäße als Ang II allein führte.

Die Möglichkeit, dass Ang II und Zytokine eine Art Synergismus bilden kann, zeigen wiederum

einige Studien über IL-6. Es ist nicht nur bekannt, dass Ang II die Expression von IL-6 in VSMC induziert (Funakoshi et al. 1999), sondern aus einigen Studien geht hervor, dass die inflammatorischen und oxidativen Effekte von Ang II auch IL-6 benötigen und daher einige wichtige Wirkungen von Ang II auf die Gefäße, beispielsweise die Induktion von Wachstum und Proliferation von VSMC von der IL6-Expression abhängen (Marrero et al. 1997; Schrader et al. 2007; Recinos et al. 2007).

Schließlich wurden kürzlich von Song et al. gezeigt, dass Angiotensin-Converting-Enzyme 2 (ACE2) den Ang II-induzierten oxidativen Stress sowie die Proliferation der VSMC über JAK2-STAT3-Signalweg hemmt (Song et al. 2013). Mit der Arbeit von Song et al. wurde noch ein Nachweis für die Relevanz des JAK2-STAT3-Signalweges in der Ang II-induzierten Endotheldysfunktion erbracht. Wie die Wirkung von CNTF distal von JAK2 und STAT3 vermittelt wird, wird Gegenstand künftiger Forschung sein.

Literaturverzeichnis

1. Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S. *Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons*. Science. 1979 Jun 29;204(4400):1434-6.
2. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften *Leitlinien für die Prävention, Erkennung, Diagnostik und Therapie der arteriellen Hypertonie der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes e.V.* (Deutsche Hochdruckliga) November. 2003.
3. Azar S, Johnson MA, Hertel B, Tobian L. *Single-nephron pressures, flows, and resistances in hypertensive kidneys with nephrosclerosis*. Kidney Int. 1977 Jul;12(1):28-40.
4. Barbin G, Manthorpe M, Varon S. *Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor*. J Neurochem. 1984 Nov;43(5):1468-78.
5. Bidani AK, Griffin KA. *Pathophysiology of hypertensive renal damage: implications for therapy*. Hypertension. 2004 Nov;44(5):595-601.
6. Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugières P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M. *Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study*. Hum Gene Ther. 2004 Oct;15(10):968-75.
7. Brands MW, Banes-Berceli AK, Inscho EW, Al-Azawi H, Allen AJ, Labazi H. *Interleukin 6 knockout prevents angiotensin II hypertension: role of renal vasoconstriction and janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 activation*. Hypertension. 2010 Nov;56(5):879-84.

8. Campese VM, Park J. *The kidney and hypertension: over 70 years of research*. J Nephrol. 2006 Nov-Dec;19(6):691-8. Review.
9. Carrero JJ, Stenvinkel P. *Inflammation in end-stage renal disease--what have we learned in 10 years?* Semin Dial. 2010 Sep-Oct;23(5):498-509. Review.
10. Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM: *Blood pressure and inflammation in apparently healthy men*. Hypertension 2001, 38:399–403.
11. Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP. *Abnormal coronary function in mice deficient in $\alpha 1H$ T-type Ca^{2+} channels*. Science. 2003 Nov 21;302(5649):1416-8.
12. Coles B, Fielding CA, Rose-John S, Scheller J, Jones SA, O'Donnell VB. *Classic interleukin-6 receptor signaling and interleukin-6 trans-signaling differentially control angiotensin II-dependent hypertension, cardiac signal transducer and activator of transcription-3 activation, and vascular hypertrophy in vivo*. Am J Pathol. 2007 Jul;171(1):315-25. Erratum in: Am J Pathol. 2007 Sep;171(3):1078.
13. Cribbs LL. *T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: multiple functions*. Cell Calcium. 2006 Aug;40(2):221-30. Review.
14. Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, et al. *Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses*. Science. 1993 Mar 19;259(5102):1736-9.
15. Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD. *LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor*. Science. 1993 Jun 18;260(5115):1805-8.
16. Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos

- GD. *The receptor for ciliary neurotrophic factor*. Science. 1991 Jul 5;253(5015):59-63.
17. Davis S, Yancopoulos GD. *The molecular biology of the CNTF receptor*. Curr Opin Cell Biol. 1993 Apr;5(2):281-5. Review.
 18. DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, Ip NY, Yancopoulos GD. *Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth*. Cell. 1995 Oct 20;83(2):313-22.
 19. Deen WM, Maddox DA, Robertson CR, Brenner BM. *Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. VII. Response to reduced renal mass*. Am J Physiol. 1974 Sep;227(3):556-62.
 20. Dey D, Shepherd A, Pachua J, Martin-Caraballo M. *Leukemia inhibitory factor regulates trafficking of T-type Ca²⁺ channels*. Am J Physiol Cell Physiol. 2011 Mar;300(3):C576-87.
 21. Dobrea GM, Unnerstall JR, Rao MS. *The expression of CNTF message and immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of the rat*. Brain Res Dev Brain Res. 1992 Apr 24;66(2):209-19.
 22. Dutta R, McDonough J, Chang A, Swamy L, Siu A, Kidd GJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD. *Activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) signalling pathway in cortical neurons of multiple sclerosis patients*. Brain. 2007 Oct;130(Pt 10):2566-76.
 23. Dziennis S, Habecker BA. *Ciliary neurotrophic factor suppresses Phox2a in sympathetic neurons*. Neuroreport. 2004 Jan 19;15(1):33-6.
 24. Ernsberger U, Sendtner M, Rohrer H. *Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor*. Neuron. 1989 Mar;2(3):1275-84.

25. Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrissey D, McClain J, Wang DY, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM. *Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo*. Neuron. 1992 Aug;9(2):295-305.
26. Funakoshi Y, Ichiki T, Ito K, Takeshita A. *Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells*. Hypertension. 1999;34:118–125.
27. Gross V, Luft FC. *Exercising restraint in measuring blood pressure in conscious mice*. Hypertension 2003;41:879-881.
28. Guilluy C, Brégeon J, Toumaniantz G, Rolli-Derkinderen M, Retailleau K, Loufrani L, Henrion D, Scalbert E, Bril A, Torres RM, Offermanns S, Pacaud P, Loirand G. *The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure*. Nat Med. 2010 Feb;16(2):183-90.
29. Hackam DG, Spence JD, Garg AX, Textor SC. *Role of renin-angiotensin system blockade in atherosclerotic renal artery stenosis and renovascular hypertension*. Hypertension. 2007 Dec;50(6):998-1003. Review.
30. Han Y, Runge MS, Brasier AR. *Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors*. Circ Res. 1999;84: 695–703.
31. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH Jr, Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R. *Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly*. Am J Med. 1999 May;106(5):506-12.
32. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J. 2003 Aug 15;374(Pt 1):1-20. Review.

33. Henderson JT, Seniuk NA, Richardson PM, Gauldie J, Roder JC. *Systemic administration of ciliary neurotrophic factor induces cachexia in rodents*. J Clin Invest. 1994 Jun;93(6):2632-8.
34. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Lindholm B. *Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD*. Am J Kidney Dis. 2006 Jan;47(1):139-48.
35. Hörl WH. *Hypertension in end-stage renal disease: different measures and their prognostic significance*. Nephrol Dial Transplant. 2010 Oct;25(10):3161-6.
36. Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M. *Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture*. Nature. 1988 Sep 1;335(6185):70-3.
37. Ikeda K, Iwasaki Y, Shiojima T, Kinoshita M. *Neuroprotective effect of various cytokines on developing spinal motoneurons following axotomy*. J Neurol Sci. 1996 Feb;135(2):109-13.
38. Ikeda U, Ohkawa F, Seino Y, Yamamoto K, Hidaka Y, Kasahara T, Kawai T, Shimada K. *Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol. 1992;24:579–584.
39. Imlach WL, Finch SC, Miller JH, Meredith AL, Dalziel JE. *A role for BK channels in heart rate regulation in rodents*. PLoS One. 2010 Jan 14;5(1):e8698.
40. Inagami T. *Recent progress in molecular and cell biological studies of angiotensin receptors*. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1995 Jan;4(1):47-54. Review.
41. Ip NY, Nye SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y, Birren SJ, Yasukawa K, Kishimoto T, Anderson DJ, et al. *CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130*. Cell. 1992

- Jun 26;69(7):1121-32.
42. Ishola DA Jr, van der Giezen DM, Hahnel B, Goldschmeding R, Kriz W, Koomans HA, Joles JA. *In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent.* Nephrol Dial Transplant. 2006 Mar;21(3):591-7.
 43. Johnson AW, Kinzenbaw DA, Modrick ML, Faraci FM. *Small-molecule inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 protect against angiotensin II-induced vascular dysfunction and hypertension.* Hypertension 2013 Feb;61(2):437-42.
 44. Khosla N, Kalaitzidis R, Bakris GL. *The kidney, hypertension, and remaining challenges.* Med Clin North Am. 2009 May;93(3):697-715.
 45. Kirabo A, Kearns PN, Jarajapu YP, Sasser JM, Oh SP, Grant MB, Kasahara H, Cardounel AJ, Baylis C, Wagner KU, Sayeski PP. *Vascular smooth muscle Jak2 mediates angiotensin II-induced hypertension via increased levels of reactive oxygen species.* Cardiovasc Res. 2011 Jul 1;91(1):171-9.
 46. Kirchhoff F, Krebs C, Abdulhag UN, Meyer-Schwesinger C, Maas R, Helmchen U, Hilgers KF, Wolf G, Stahl RA, Wenzel U. *Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II.* Kidney Int. 2008 Mar;73(5):643-50.
 47. Klahr S. *Progression of chronic renal disease.* Heart Dis. 2001 May-Jun;3(3):205-9. Review.
 48. Kuhlmann T, Remington L, Cognet I, Bourbonniere L, Zehntner S, Guilhot F, Herman A, Guay-Giroux A, Antel JP, Owens T, Gauchat JF. *Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Am J Pathol. 2006 Aug;169(2):584-98.
 49. Landis, SC; Keefe, D. *Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo: developmental*

- changes in the properties of cholinergic sympathetic neurons.* Dev.Biol. 98: 349-372.
50. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, Osborne JB Jr, Fleming C, Pollock JS, Manhiani M, Imig JD, Brands MW. *Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Mar;290(3):H935-40.
 51. Leoncini G, Viazzi F, Pontremoli R. *Chronic kidney disease and albuminuria in arterial hypertension.* Curr Hypertens Rep. 2010 Oct;12(5):335-41. Review.
 52. Lewis SE, Rao MS, Symes AJ, Dauer WT, Fink JS, Landis SC, Hyman SE. *Coordinate regulation of choline acetyltransferase, tyrosine hydroxylase, and neuropeptide mRNAs by ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor in cultured sympathetic neurons.* J Neurochem. 1994 Aug;63(2):429-38.
 53. Lillien LE, Sendtner M, Rohrer H, Hughes SM, Raff MC. *Type-2 astrocyte development in rat brain cultures is initiated by a CNTF-like protein produced by type-1 astrocytes.* Neuron. 1988 Aug;1(6):485-94.
 54. Linker RA, Mäurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R. *CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation.* Nat Med. 2002 Jun;8(6):620-4.
 55. Ma LJ, Fogo AB. *Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background.* Kidney Int. 2003 Jul;64(1):350-5.
 56. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor.* Nature. 1995 May 18;375(6528):247-50.
 57. Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN. *Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades*

- in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation.* J Biol Chem 1997;272:24684–24690.
58. Martin D, Merkel E, Tucker KK, McManaman JL, Albert D, Relton J, Russell DA. *Cachectic effect of ciliary neurotrophic factor on innervated skeletal muscle.* Am J Physiol. 1996 Nov;271(5 Pt 2):R1422-8.
59. Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. *Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration.* Nature. 1993 Sep 2;365(6441):27-32.
60. Menon, J, Soto-Pantoja, DR, Callahan, MF, Cline, JM, Ferrario, CM, Tallant, EA, Gallagher, PE. *Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2.* Cancer Res. 2007 Mar 15;67(6):2809-15.
61. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. *Angiotensin II and renal fibrosis.* Hypertension. 2001 Sep;38 (3 Pt 2):635-8. Review.
62. Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, Hoagland RJ, Parry GJ, Ross MA, Stromatt SC. *A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group.* Ann Neurol. 1996 Feb;39(2):256-60.
63. Nagy, N, Melchior-Becker, A, Fischer, JW. *Long-term treatment with the AT1-receptor antagonist telmisartan inhibits biglycan accumulation in murine atherosclerosis.* Basic Res Cardiol. 2010 Jan;105(1):29-38.
64. Nai Q, Wang X, Jin Y, Sun D, Li M, Hu B, Zhang X. *Ciliary neurotrophic factor enhances nicotinic synaptic transmission in sympathetic neurons.* J Neurosci Res. 2010 Mar;88(4):887-95.
65. Nangaku M, Fujita T. *Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of*

- the kidney*. Hypertens Res. 2008 Feb;31(2):175-84.
66. Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. *Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms*. Curr Hypertens Rep. 2011 Apr;13(2):122-8. Review.
67. Ohta K, Hara H, Hayashi K, Itoh N, Ohi T, Ohta M. *Tissue expression of rat ciliary neurotrophic factor (CNTF) mRNA and production of the recombinant CNTF*. Biochem Mol Biol Int. 1995 Feb;35(2):283-90.
68. Ohta M, Ohi T, Nishimura M, Itoh N, Hayashi K, Ohta K. *Distribution of and age-related changes in ciliary neurotrophic factor protein in rat tissues*. Biochem Mol Biol Int. 1996 Nov;40(4):671-8.
69. Orshal JM, Khalil RA. *Interleukin-6 impairs endothelium-dependent NO-cGMP-mediated relaxation and enhances contraction in systemic vessels of pregnant rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;286:R1013–R1023.
70. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Axelsson J, Stenvinkel P. *Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure*. Nephrol Dial Transplant. 2003 Jun;18(6):1042-5.
71. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus*. JAMA. 2001;286:327–334.
72. Ransom RF, Vega-Warner V, Smoyer WE, Klein J. *Differential proteomic analysis of proteins induced by glucocorticoids in cultured murine podocytes*. Kidney Int. 2005 Apr;67(4):1275-85.
73. Recinos A, LeJeune WS, Sun H, Lee CY, Tieu BC, Lu M, Hou T, Boldogh I, Tilton RG, Brasier AR. *Angiotensin II induces IL-6 expression and the Jak-STAT3 pathway in aortic adventitia of LDL receptor-deficient mice*. Atherosclerosis. 2007;194:125–133.

74. Rende M, Muir D, Ruoslahti E, Hagg T, Varon S, Manthorpe M. *Immunolocalization of ciliary neuronotrophic factor in adult rat sciatic nerve*. Glia. 1992;5(1):25-32.
75. Rezende LF, Stoppiglia LF, Souza KL, Negro A, Langone F, Boschero AC. *Ciliary neurotrophic factor promotes survival of neonatal rat islets via the BCL-2 anti-apoptotic pathway*. J Endocrinol. 2007 Oct;195(1):157-65.
76. Rezende LF, Vieira AS, Negro A, Langone F, Boschero AC. *Ciliary neurotrophic factor (CNTF) signals through STAT3-SOCS3 pathway and protects rat pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis*. Cytokine. 2009 Apr;46(1):65-71.
77. Richardson PM. *Ciliary neurotrophic factor: a review*. Pharmacol Ther. 1994 Aug;63(2):187-98. Review.
78. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men*. Circulation. 2000;101:1767-72.
79. Ritz E. *Hypertension and kidney disease*. Clin Nephrol. 2010 Nov;74 Suppl 1:S39-43. Review.
80. Rohrer H. *Cholinergic neuronal differentiation factors: evidence for the presence of both CNTF-like and non-CNTF-like factors in developing rat footpad*. Development. 1992 114: 689-698.
81. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J. *Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney*. Kidney Int Suppl. 2002 Dec;(82):S12-22.
82. Saadat S, Sendtner M, Rohrer H. *Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture*. Cell Biol. 1989 May;108(5):1807-16.

83. Sakai N, Wada T, Matsushima K, Bucala R, Iwai M, Horiuchi M, Kaneko S. *The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes*. J Hypertens. 2008 Apr;26(4):780-90.
84. Sanz-Rosa D, Oubiña MP, Cediñ E, de Las Heras N, Vegazo O, Jiménez J, Lahera V, Cachofeiro V. *Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Jan;288(1):H111-5.
85. Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. *Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension*. Expert Rev Mol Med. 2011 Mar 30;13:e11. Review.
86. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. *Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability*. Circulation. 2000;101:1372–1378.
87. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. *Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system*. Circulation. 2007 Jul 3;116(1):85-97. Review.
88. Schrader LI, Kinzenbaw DA, Johnson AW, Faraci FM, Didion SP. *IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:2576–2581.
89. Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhart P, Matthews V, Grötzinger J, Rose-John S, Kallen KJ. *Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF*. J Biol Chem. 2003 Mar 14;278(11):9528-35.
90. Schwieler JH, Kahan T, Nussberger J, Hjelm Dahl P. *Converting enzyme inhibition modulates sympathetic neurotransmission in vivo via multiple mechanisms*. Am J

- Physiol. 1993 Apr;264(4 Pt 1):E631-7.
91. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. *Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy*. Nature. 1990 May 31;345(6274):440-1.
 92. Sendtner M, Schmalbruch H, Stöckli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H. *Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy*. Nature. 1992 Aug 6;358(6386):502-4.
 93. Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes RA, Thoenen H. *Ciliary neurotrophic factor*. J Neurobiol. 1994 Nov;25(11):1436-53. Review.
 94. Shankland SJ. *The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis*. Kidney Int. 2006 Jun;69(12):2131-47. Review.
 95. Sharma P, Blackburn RC, Parke CL, McCullough K, Marks A, Black C. *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers for adults with early (stage 1 to 3) non-diabetic chronic kidney disease*. Cochrane Database Syst Rev. 2011 Oct 5;(10):CD007751. Review.
 96. Shi P, Diez-Freire C, Jun JY, Qi Y, Katovich MJ, Li Q, Sriramula S, Francis J, Sumners C, Raizada MK. *Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension*. Hypertension. 2010 Aug;56(2):297-303.
 97. Shi X, Woodward WR, Habecker BA. *Ciliary neurotrophic factor stimulates tyrosine hydroxylase activity*. J Neurochem. 2012 Jun;121(5):700-4.
 98. Slonimsky JD, Yang B, Hinterneder JM, Nokes EB, Birren SJ. *BDNF and CNTF regulate cholinergic properties of sympathetic neurons through independent mechanisms*. Mol Cell Neurosci. 2003 Aug;23(4):648-60.
 99. Song B, Jin H, Yu X, Zhang Z, Yu H, Ye J, Xu Y, Zhou T, Oudit GY, Ye J, Chen C, Gao

- P, Zhu D, Penninger JM, Zhong JC. *Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates oxidative stress and VSMC proliferation via the JAK2/STAT3/SOCS3 and profilin-1/MAPK signaling pathways*. Regul Pept. 2013 Jun 28;185C:44-51.
100. Steckelings UM, Stoppelhaar M, Sharma AM, Wittchen HU, Krause P, Küpper B, Kirch W, Pittrow D, Ritz E, Göke B, Lehnert H, Tschöpe D, Höfler M, Pfister H, Unger T; HYDRA Study Group. *HYDRA: possible determinants of unsatisfactory hypertension control in German primary care patients*. Blood Press. 2004;13(2):80-8.
101. Stenvinkel P, Barany P, Heimbürger O, Pecoits-Filho R, Lindholm B. *Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6?* Kidney Int Suppl. 2002 May;(80):103-8. Review.
102. Stöckli KA, Lillien LE, Näher-Noé M, Breitfeld G, Hughes RA, Raff MC, Thoenen H, Sendtner M. *Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain*. Cell Biol. 1991 Oct;115(2):447-59.
103. Stöckli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Götz R, Lindholm D, Thoenen H. *Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor*. Nature. 1989 Dec 21-28;342(6252):920-3.
104. Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. *Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects*. J Cereb Blood Flow Metab. 2009 Mar;29(3):464-79. Review.
105. Taft DR. *The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development*. Curr Drug Discov Technol. 2004 Jan;1(1):97-111.
106. Touyz RM, Schiffrin EL. *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. Hypertension. 1995 May;25(5):924-7.

107. Touyz RM. *Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II*. Exp Physiol. 2005 Jul;90(4):449-55. Review.
108. Touyz RM. *Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II*. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2005 Mar;14(2):125-31. Review.
109. Touyz RM. *The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension*. Curr Hypertens Rep. 2003 Apr;5(2):155-64. Review.
110. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. *Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria*. N Engl J Med. 2006 Mar 30;354(13):1387-401. Review.
111. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. *Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2, and S3 segments*. Kidney Int. 1978 Jul;14(1):31-49.
112. Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, Gonzalez-Pacheco FR, Barrios C, Evora K, Schuster M, Loibner H, Brosnihan KB, Ferrario CM, Penninger JM, Batlle D. *Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension*. Hypertension. 2010 Jan;55(1):90-8.
113. Whitworth JA; World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 *World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension*. J Hypertens. 2003 Nov;21(11):1983-92.
114. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, Kastarinen M, Poulter N, Primatesta P, Rodríguez-Artalejo F, Stegmayr B, Thamm M, Tuomilehto J, Vanuzzo D, Vescio F. *Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European Countries, Canada, and the United States*. JAMA. 2003 May

14;289(18):2363-9.

115. Yang CW, Lim SW, Han KW, Ahn HJ, Park JH, Kim YH, Kirsh M, Cha JH, Park JH, Kim YS, Kim J, Bang BK. *Upregulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha in rat kidney with ischemia-reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol. 2001 Apr;12(4):749-57.
116. Zhang W, Wang W, Yu H, Zhang Y, Dai Y, Ning C, Tao L, Sun H, Kellems RE, Blackburn MR, Xia Y. *Interleukin 6 underlies angiotensin II-induced hypertension and chronic renal damage*. Hypertension. 2012 Jan;59(1):136-44.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Lars Christian Rump für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe der Experimentellen Nephrologie bedanken.

Herrn Privatdozent Dr. Christian Heiß gilt mein Dank für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. Ivo Quack für die stets verlässliche, exzellent strukturierte Betreuung und kompetente fachliche Hilfe während der Dissertation.

Besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Johannes Stegbauer für sein großes Engagement und die wertvolle geduldige Begleitung bei der Planung und Durchführung der Versuche. Vielen Dank für die stetig kritische und konstruktive wissenschaftliche Unterstützung mit hervorragenden Ideen, die mich stets motivierten.

Für die Durchführung der Histologie- und Immunfluoreszenzfärbung sowie die quantitative Auswertung aus der Färbung möchte ich Herrn Dr. Joon-Keun Park von der Medizinischen Hochschule Hannover meinen besten Dank aussprechen.

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Henning Hoch für die großzügige Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Tierversuche sowie bei der Untersuchung mit HPLC. Vielen Dank für die stete Hilfsbereitschaft und die gemeinsame freundschaftliche Zusammenarbeit, die mir die Arbeit immens erleichterte.

Zudem geht mein Dank an Herrn Dr. Sebastian Potthoff ebenfalls für die Unterstützung bei den Tierversuchen sowie für die sorgfältige Einführung in die Techniken wie Präparation der Aorta sowie Isolation der vaskulären glatten Muskelzellen.

Weiterhin danke ich Frau Blanka Duvnjak, die als kompetente Ansprechpartnerin eine große Unterstützung in jeder Hinsicht war. Frau Christina Schwandt möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung insbesondere im Bereich der PCR und Genotypisierung danken.

Ich danke Frau Dr. Eva Königshausen, Frau Dr. Magdalena Woznowski, Frau Dr. Sema Sivritas und Herrn Dr. Paul Probst für zahlreiche konstruktive Gespräche und Anregungen.

Ich danke meinen Mitdoktoranden für eine unvergessliche Zeit im Labor.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir auf meinem Weg immer zur Seite stand. Eure geduldige und verständnisvolle Begleitung war mir eine große Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.