

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

**Effekte von Angiotensin II auf die Cyclooxygenase 2 Expression in
renalen Zwischenzellen**

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

vorgelegt von
Asena Uyaner

2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Johannes Stegbauer

Zweitgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Die Niere spielt als Harn bildendes Organ eine übergeordnete Rolle bei der Blutdruckregulation und Entstehung von Hypertonie. Angiotensin II, der wichtigste Metabolit des Renin-Angiotensin-Systems, steuert den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers über den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor, welcher auf den Gefäßen und im gesamten Tubulussystem der Niere exprimiert ist. So führt eine Aktivierung des AT1 Rezeptors zu Natrium- und Wasserrückresorption und somit zu einem Blutdruckanstieg. Andererseits führt der Verlust des AT1-Rezeptors zu Hypotonie. Interessanterweise konnten wir in Mausversuchen feststellen, dass nach Ang II Infusion Prostaglandine im Urin zu finden waren. Genexpressionsanalysen aus Mausnieren zeigten, dass in der *Medulla* von Ang II behandelten Mäusen signifikant hohe COX-2 mRNA vorhanden ist. COX-2 ist das entscheidende Enzym bei der Entstehung der vasodilatatorisch und natriuretisch wirksamen Prostaglandine. Immunhistochemisch konnten wir COX-2 in den Zwischenzellen des Sammelrohrs lokalisieren. Zwischenzellen, deren primäre Aufgabe die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes ist, könnten durch den Einfluss der Prostaglandine als letzte Instanz im Tubulussystem entscheidend die Zusammensetzung des Urins und somit den Blutdruck beeinflussen. Der genaue Signalweg, wie Ang II zu einer COX-2 Expression in Zwischenzellen führt, ist bis heute nicht bekannt. Deswegen führten wir Zellversuche mit Madin Darby Canine Kidney Zellen durch. Diese spiegeln Zwischenzellen wider. Eine Ang II Stimulation der Zellen führte in Western Blot Analysen zu einer signifikant hohen COX-2 Expression. Mittels ELISA sahen wir, dass nach Ang II Stimulation im Zellmedium hohe Prostaglandin E₂ Konzentrationen vorhanden waren. Interessanterweise konnten die COX-2 Expression und die Prostaglandinkonzentration durch den Einsatz eines selektiven MAPK p38 Inhibitor SB 202190 signifikant inhibiert werden. Wir zeigten, dass die Aktivierung des AT1-Rezeptors G-Protein gekoppelt ist. Nach Transfektion eines mutierten AT1-Rezeptors, bei dem wichtige Bindungsstellen für G-Proteine fehlen, erhielten wir dennoch eine COX-2 Antwort, sodass wir daraus schließen, dass es auch eine G-Protein unabhängige Aktivierung des AT1-Rezeptors geben muss. β -Arrestin steht in Zusammenhang mit dem G-protein unabhängigen Signalweg und könnte daher eine Schlüsselrolle spielen. So genannte *biased ligands* aktivieren selektiv den β -Arrestin abhängigen Signalweg, wodurch neue therapeutische Ansätze in der Hypertoniebehandlung entstehen könnten.

Abstract

The kidney plays an important role in the regulation of blood pressure and development of hypertension. Angiotensin II, the main metabolite of the Renin-Angiotensin-system, regulates salt- and water homeostasis through activating Angiotensin II type 1 receptors, which are expressed in the vessels and throughout the whole nephron. Activation of the AT1 receptor leads to sodium and water reabsorption, which promotes hypertension. On the other hand, deletion of the AT1 receptor leads to hypotension. Interestingly, infusion of Ang II in mice led to higher concentration of urinary prostanoids. Moreover, chronic Ang II infusion increased gene expression of mRNA of medulla in mice. COX-2 is the main enzyme in the generation of the vasodilator and natriuretic prostanoids. In that way, the hypertensive effects of Ang II could be modulated by increased generation of vasodilator and natriuretic prostanoids in hypertensive mice. With immunohistochemistry we showed that COX-2 co-localizes with intercalated cells of the collecting duct, which normally regulate the acid-base balance. The exact pathway how Ang II induces COX-2 generation in intercalated cells is not known yet. To examine this pathway, we used Madin Darby Canine Kidney cells to perform our experiments. These cells have characteristics of intercalated cells. Ang II stimulation led to high COX-2 expression in western blot analysis. In line with this observation, prostaglandin E₂ was increased in cell media. Remarkably, COX-2 protein levels and prostanoid E₂ excretion could be inhibited by using a selective MAPK p38 inhibitor SB 202190. We could demonstrate that activation of AT1 receptor was dependent of G-proteins. After transfection of a mutant AT1 receptor, which lacks important binding sites for G-proteins, we still received high amount of COX-2 expression in western blot analysis, suggesting that there is also a G-protein independent way of stimulating COX-2 expression. As β -arrestin is also known to activate the G-protein independent cell signaling, β -Arrestin could play a major role in activating this alternative pathway. So called biased ligands are able to block the G-protein dependent pathway, but induce the β -arrestin dependent pathway. These results could change the treatment of hypertension.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	M	Mol pro Liter
ADH	Antidiuretisches Hormon	mAB	<i>Monoclonal Antibody</i>
AK	Antikörper	MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
ACE	Angiotensin <i>Converting enzyme</i>	MDCK	Madin Darby <i>Canine Kidney</i>
Ang II	Angiotensin II	MEK	MAPK/ERK Kinase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat	mg	Milligramm
AQP2	Aquaporin 2	min	Minute
AS	Aminosäure	ml	Milliliter
AT1-Rezeptor	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor	mM	Millimolar
°C	Grad Celsius	µg	Mikrogramm
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure	µl	Mikroliter
COX	Cyclooxygenase	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
DAG	Diacylglycerin	PAGE	Polyacryamid Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PG	Prostaglandin

EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	PKC	Proteinkinase C
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	RAS	Renin-Angiotensin-System
ENaC	Epithelialer Natriumkanal	RNA	Ribonukleinsäure
ERK	<i>Extracellular-signal regulated Kinases</i>	ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	rpm	<i>Rounds per minute</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>	RT	Raumtemperatur
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure	SDS	Sodiumdodecylsulfat
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	sek	Sekunden
H	Stunde	SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
HEK-Zellen	<i>Human Ebryonic Kidney</i> Zellen	TAE	Tris-Acetat-EDTA
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
HRP	Horseradish Peroxidase	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
IP₃	Inositoltriphosphat	VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen	VSVG	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein g</i>
L	Liter		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Renin-Angiotensin-System	2
1.2	Angiotensin II Signalweg	6
1.2.1	G-Protein gekoppelter Signalweg	6
1.2.2	β -Arrestin	7
1.3	Cyclooxygenasen und Prostaglandine in der Niere	8
1.4	Ziele der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	12
2.1.2	Genexpressionsanalysen	12
2.1.3	Immunfluoreszenz	14
2.1.4	Zellkultur	15
2.1.5	Chemikalien im Labor	18
2.1.6	Proteinanalysen	20
2.1.7	Verbrauchsmaterialien und Geräte	22
2.1.8	Software und Statistik	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Prostaglandinkonzentration in 24h Sammelurin von Mäusen	25
2.2.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	25
2.2.3	RNA-Isolierung aus Nierengewebe	27
2.2.4	Reverse Transkription	28
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	28
2.2.6	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	30
2.2.7	Herstellung der Kryoschnitte aus Nierengewebe	31
2.2.8	Immunfluoreszenzfärbung	32
2.2.9	Madin Darby Canine Kidney Zellen	33
2.2.10	Transduktion der Madin Darby Canine Kidney Zellen mit dem AT1-Rezeptor	33
2.2.11	Madin Darby Canine Kidney Zellen in der Zellkultur	35
2.2.12	Versuchsaufbau	36
2.2.13	Proteinisolation aus MDCK Zellen	37
2.2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.2.15	Western Blot	38
2.2.16	Auswertung der Ergebnisse	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Angiotensin II Infusion führt zu Prostaglandinausschüttung im Urin der Maus	41
3.2	Angiotensin II bewirkt erhöhte COX-2 mRNA in der <i>Medulla</i>	42
3.3	Immunhistochemischer Nachweis von COX-2 in renalen Zwischenzellen	43
3.4	Angiotensin II stimuliert die COX-2 Expression in MDCK AT1 Zellen	45
3.5	Angiotensin II Signaltransduktion	46
3.5.1	Angiotensin II aktiviert den G-Protein gekoppelten Signalweg	46
3.5.2	Angiotensin II aktiviert Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen)	47

3.5.3	P38-MAP-Kinase	47
3.5.4	Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK)	49
3.5.5	Zusammenhang zwischen Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Angiotensin II und COX-2	52
3.6	Prostaglandinkonzentrationen der Stimulationsversuche	53
3.6.1	Angiotensin II bewirkt Prostaglandinproduktion in MDCK Zellen	54
3.6.2	Prostaglandinproduktion wird durch Calphostin C inhibiert	55
3.6.3	Prostaglandinproduktion wird durch SB 202190 inhibiert	55
3.7	Angiotensin II stimuliert die COX-2 Expression in MDCK Δ319 Zellen	56
3.7.1	Zeitkinetik in MDCK Δ 319 Zellen	57
3.7.2	G-Protein gekoppelter Signalweg Proteinkinase C Signalweg	58
3.7.3	Angiotensin II aktiviert MAP-Kinasen in MDCK Δ 319 Zellen	59
3.7.4	P38-MAP-Kinase	59
3.7.5	Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK)	60
4	Diskussion	62
4.1	Angiotensin II Behandlung in Mäusen führt zur Prostaglandinausschüttung im Urin	62
4.2	Bedeutung der Zwischenzellen für die Blutdruckregulation	63
4.3	Angiotensin II Signalweg in MDCK AT1 Zellen	65
4.4	Angiotensin II aktiviert in MDCK Δ 319 Zellen den β -Arrestin vermittelten Signalweg	69
5	Schlussfolgerungen	72
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	75

1 Einleitung

Die Niere steht durch zahlreiche Aufgaben im Zentrum von wichtigen physiologischen Abläufen im Körper. Sie scheidet harnpflichtige Substanzen aus, steuert den Säure- und Basenhaushalt, produziert Hormone und Enzyme. Sie reguliert den Wasser- und Elektrolythaushalt durch Filtration, Modifikation und Konzentrierung des Primärharns und übt dadurch einen entscheidenden Einfluss auf den Blutdruck aus (Klinke R. 2010). Bereits 1972 sah Guyton die Niere als Hauptregulator des Langzeitblutdrucks und beschrieb dies in seinem Modell des *renal-body fluid-pressure control system*. Für einen konstanten Blutdruck ist es essentiell, dass zwischen Einfuhr und Ausscheidung von Salz und Wasser ein gut abgestimmtes Gleichgewicht besteht (Guyton 1991) (Navar 2005). Nach Guyton wird über den Mechanismus der Druck-Natriurese dieses Phänomen gewährleistet. Erhöht sich die orale Aufnahme von Natrium und Wasser, bewirkt dies eine Zunahme des intravasalen Volumens und des Schlagvolumens. Konsekutiv steigt das Herzzeitvolumen an und bedingt eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Der erhöhte Blutdruck wird von den Nieren registriert und resultiert in einer Steigerung des intraglomerulären Drucks, was wiederum den Filtrationsdruck erhöht. Dieser Druck bewirkt nun die gesteigerte Natriurese und somit auch Diurese. Die Druck-Natriurese wird solange aufrechterhalten, bis der normale systemische Blutdruck wieder erreicht wird. Andersrum wird bei Hypotonie die Druck-Natriurese und Diurese gedrosselt, sodass das Extrazellulärvolumen und der arterielle Blutdruck erhöht werden kann. Durch diesen Mechanismus kann bei voller Funktionsfähigkeit der Niere der Blutdruck in engen Grenzen konstant gehalten werden. Ist die Niere nicht mehr in der Lage ausreichend Salz und Wasser auszuschcheiden, muss kompensatorisch der arterielle Blutdruck erhöht werden, um das Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausfuhr zu gewährleisten. Dieser Anpassungsmechanismus bedeutet, dass sich langfristig ein chronisch erhöhter Blutdruck ausbilden wird. In Guytons Modell wird diese Anpassung als Verschiebung der *renal function curve* nach rechts zu höheren Blutdruckwerten verdeutlicht (Guyton 1987). In einer weiteren Studie von Guyton wurde der genaue Zusammenhang zwischen der renalen Natriumausscheidung und des arteriellen Blutdrucks anhand von Experimenten mit Hunden genauer untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Renin-Angiotensin-System (RAS) eine bedeutende Rolle in der

langfristigen Regulation der Natriumausscheidung einnimmt. Hunde, die mit Angiotensin II (Ang II) infundiert wurden und eine erhöhte orale Natriumaufnahme bekamen, benötigten einen deutlich höheren arteriellen Blutdruck, um eine physiologische renale Natriumausscheidung zu erreichen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Fähigkeit Natrium auszuscheiden unter hohen Ang II Konzentrationen deutlich reduziert ist. Bei Inhibition des RAS mit dem *Angiotensin Converting Enzyme* Hemmer (ACE-Hemmer) SQ-14255 konnte ein Gleichgewicht zwischen Natriumaufnahme und -ausscheidung bei viel niedrigeren Blutdruckwerten erreicht werden. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 1 dargestellt (Hall, Guyton et al. 1980).

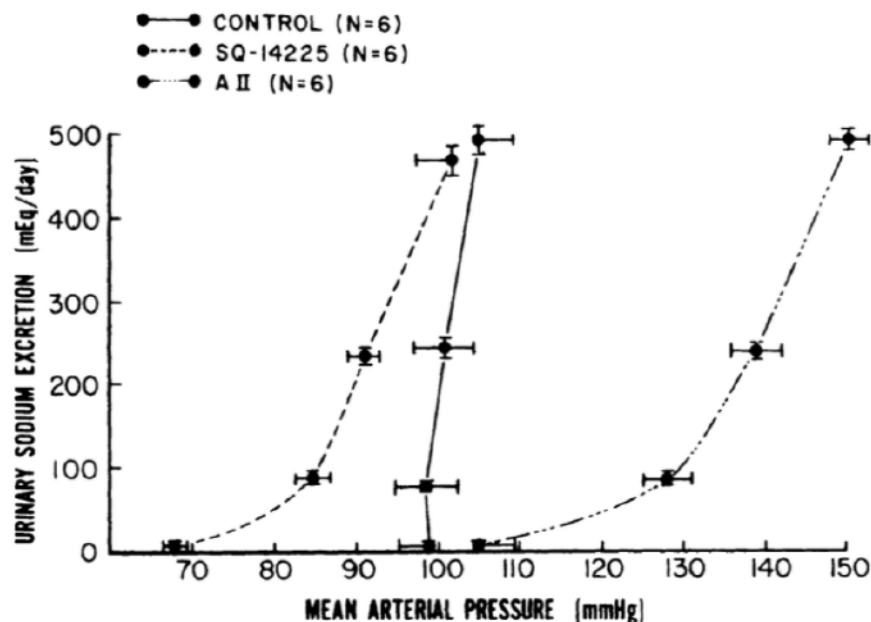


Abb. 1: Beziehung zwischen mittlerem arteriellem Blutdruck und renaler Natriumausscheidung in Kontrollhunden und in Hunden, die mit dem ACE-Hemmer SQ-14255 oder Ang II (5 ng/kg/min) infundiert wurden. Die Kontrollhunde weisen zur Natriumexkretion einen konstanten mittleren arteriellen Blutdruck auf, wohingegen Angiotensin II infundierte Hunde höhere Blutdruckwerte benötigen. Durch die Gabe eines ACE-Hemmers kann bei zuvor erfolgter Angiotensin II Infusion der Blutdruck gesenkt werden (Hall, Guyton et al. 1980). Abbildung zur Verfügung gestellt durch *American Physiological Society*.

1.1 Renin-Angiotensin-System

Das RAS beschreibt einen endokrin aktiven Hormonkreislauf, welcher im kardiovaskulären System eine zentrale Funktion einnimmt. Die wichtigste Funktion stellt

die Beeinflussung des Blutdrucks dar (Peach 1977). Die Erhöhung des Blutdrucks wird sowohl direkt über Vasokonstriktion, als auch indirekt über eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems und Aldosteronfreisetzung, wodurch der Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt entscheidend verändert wird, vermittelt (Hall, Mizelle et al. 1986). Andererseits ist das RAS auch mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert. Der wichtigste Metabolit Ang II spielt bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen, endothelialer Dysfunktion, Arteriosklerose, Hypertonie und Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle (Mehta and Griendling 2007).

Zu Beginn der Kaskade wird das Enzym Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere freigesetzt (siehe Abb. 2). Die Freisetzung von Renin erfolgt bei sinkender renaler Perfusion durch Hypotonie oder Hypovolämie. Renin spaltet nun von dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) ab. Ang I stellt als Prohormon eine biologisch inaktive Form dar. Als nächstes wird durch Abspaltung von zwei Aminosäuren (AS) durch das ACE aus Ang I das Oktapeptid Ang II generiert (Klinke R. 2010).

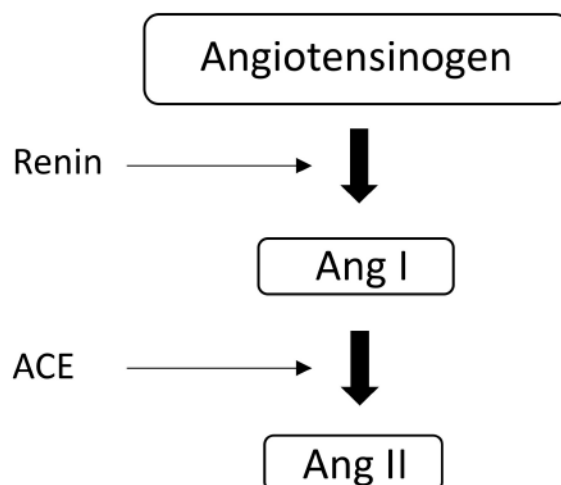


Abb. 2: Renin-Angiotensin-System. Das aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere freigesetzte Enzym Renin spaltet das aus der Leber kommende Angiotensinogen zu dem Prohormon Angiotensin I. Im nächsten Schritt wird aus Angiotensin I über das *Angiotensin Converting Enzyme* das biologisch aktive Angiotensin II synthetisiert. Selbst erstellte Abbildung nach (Klinke R. 2010).

Die Effekte von Ang II sind in unterschiedlichen Systemen sehr vielfältig. Ang II bewirkt Zellwachstum, -migration und -differenzierung und hat zudem einen profibrotischen Effekt. Zusätzlich scheint Ang II inflammatorisch zu wirken, Zytokine freizusetzen und die Bildung von *Reactive Oxygen Species* (ROS) zu fördern. Durch diese genannten Funktionen verstärkt Ang II eine Entzündung im Gefäßsystem und die endotheliale Dysfunktion, was erheblich zur pathologischen Gefäßadaptation bei kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt. Ang II weist demnach eine aktive Beteiligung am *Remodeling* von Gewebe auf (Touyz 2005).

Im Gefäßsystem wirkt Ang II stark vasokonstriktorisch, wodurch der Blutdruck direkt beeinflusst wird. Ang II bewirkt zudem die Ausschüttung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Aldosteron fördert die Na^+ -Rückresorption in den renalen Hauptzellen des Sammelrohres und zieht somit konsekutiv Wasser mit, was das Blutvolumen erhöht und somit blutdrucksteigernd wirkt. Zusätzlich wird durch Ang II das antidiuretische Hormon (ADH) aus dem Hypophysenhinterlappen freigesetzt. ADH führt zum vermehrten Einbau von Aquaporinen (AQP2) in das Sammelrohr, so dass die Wasserrückresorption gesteigert wird. Ang II regt zusätzlich den Durst und den Salzappetit an. Über die aufgeführten Aspekte wirkt Ang II indirekt blutdrucksteigernd. Die hämodynamisch relevanten Effekte in der Niere werden von Ang II über die Beeinflussung des renalen Blutflusses, der glomerulären Filtrationsrate und der Ausscheidung von Salz und Wasser vermittelt (Sparks, Crowley et al. 2014). Ang II selbst übt zusätzlich einen direkten Effekt auf das Tubulussystem aus. Die antinatriuretischen Wirkungen auf das proximale Tubulus sind in Studien gut beschrieben (Reilly, Harris et al. 1995) (Geibel, Giebisch et al. 1990) (Saccomani, Mitchell et al. 1990). Von entscheidender Bedeutung für die Zusammensetzung des Urins ist der distale Tubulusabschnitt. Das Sammelrohr kann über die Effekte von Ang II die Wasser- und Elektrolytzusammensetzung des Urins beeinflussen. Sun et.al konnten zeigen, dass Ang II über die Aktivierung des AT1-Rezeptors in Ratten direkt die Aktivität des epithelialen Natriumkanals (ENaC) im Sammelrohr erhöht. Dieser Mechanismus scheint durch die Bildung von Superoxiden vermittelt zu werden. (Sun, Yue et al. 2012) (Peti-Peterdi, Warnock et al. 2002) (Mamenko, Zaika et al. 2012). Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass die Aktivierung von ENaC Aldosteron unabhängig ist

(Mamenko, Zaika et al. 2013). Diese Studien lassen vermuten, dass das Sammelrohr als letzte Instanz entscheidend die Konzentration des Urins und damit des Blutplasmas beeinflussen kann. Ausgewählte Effekte von Ang II sind in Abb. 3 aufgeführt.

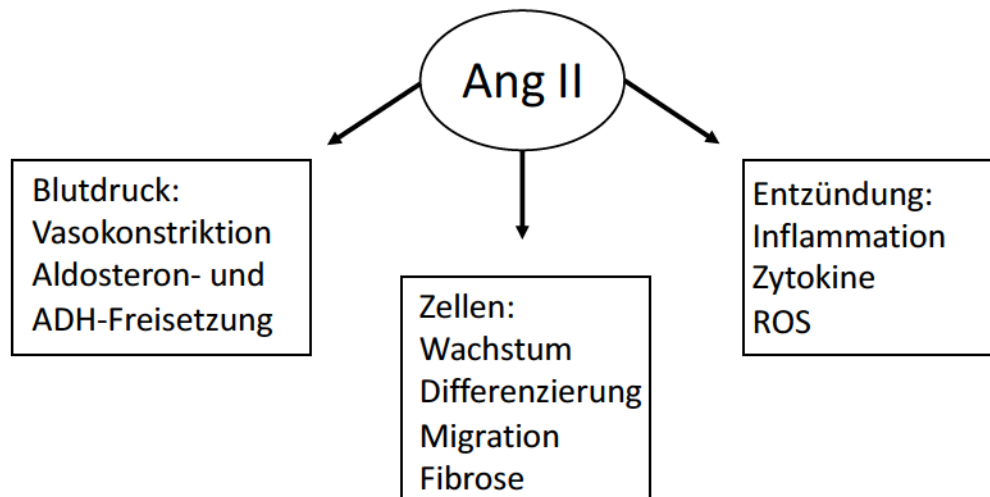


Abb. 3: Ausgewählte Effekte von Ang II. Ang II erhöht direkt und indirekt den arteriellen Blutdruck, beeinflusst die Zellen und wirkt proinflammatorisch durch Freisetzung von Zytokinen und Aktivierung von ROS. Selbst modifiziert nach (Touyz 2005).

Ang II vermittelt seine Funktionen hauptsächlich über den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT1-Rezeptor). Dieser ist in vielen verschiedenen Organen, im Gefäßsystem und im gesamten Tubulussystem der Niere exprimiert. Es handelt sich um einen sieben transmembranären, G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der aus 359 Aminosäuren (AS) besteht. Wenn Ang II an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet, werden verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert. Der AT1-Rezeptor interagiert mit multitrimeren G-Proteinen, wie zum Beispiel $G_{q/11}$, G_i , G_{12} oder G_{13} , und produziert *Second Messenger*, wie Inositol Triphosphat (IP_3), Diacylglycerol (DAG) und ROS. Desweiteren werden Rezeptorproteinkinasen wie der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) und intrazelluläre Proteinkinasen aktiviert, hierzu gehören zum Beispiel die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (Higuchi, Ohtsu et al. 2007).

1.2 Angiotensin II Signalweg

1.2.1 G-Protein gekoppelter Signalweg

Ein klassischer Aktivierungsweg des AT1-Rezeptors erfolgt über den G-Protein abhängigen Signalweg, über den die Vasokonstriktion vermittelt wird. Wenn Ang II an den AT1-Rezeptor bindet, werden die G-Proteine $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ und $G\beta\gamma$ aktiviert. Diese aktivieren Phospholipase C, Phospholipase A₂ und Phospholipase D. Die Phospholipase C produziert IP₃ und DAG. IP₃ erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, wodurch über Calmodulin eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin möglich wird (Yan, Kim et al. 2003). Ferner führt die Aktivierung von Phospholipase A₂ zur Produktion von Arachidonsäure und ihren Metaboliten (Mehta and Griendling 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Ang II eine erhöhte Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) in glatten Muskelzellen der Gefäße bewirkt (Hu, Kerb et al. 2002). Die von der COX-2 generierten Prostaglandine (PG), PGI₂ und PGE₂, wirken vasodilatatorisch und könnten vermutlich die vasokonstriktorischen Effekte von Ang II ein wenig abschwächen. Über den Signalweg der Ang II induzierten COX-2 Aktivität ist bis heute wenig bekannt.

DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche als Effektor im Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg wirkt. In diesem Signalweg sind MAP-Kinasen beteiligt. Es handelt sich dabei um intrazelluläre Serin/Threonin-Kinasen, die über eine Phosphorylierungskaskade aktiviert werden. MAP-Kinasen sind Teil eines mehrstufigen Signaltransduktionsweges, über welchen sie verschiedene Funktionen ausüben. Hierzu gehört die Regulation von Zelldifferenzierung und -wachstum, Genexpression, zellulärem Transport und Proliferation. Der ERK-Signalweg wird über die Rezeptorproteinkinase EGFR vermittelt. EGFR aktiviert Raf, welches zusammen mit dem kleinen G-Protein Ras anschließend die MAPK/ERK (MEK) Kinasen 1 und 2 phosphoryliert. Die aktivierten MEK 1 und 2 können schließlich ERK 1/2 phosphorylieren (Sugden and Clerk 1997). Eine weitere MAP-Kinase, die in Verbindung mit dem Ang II Signalweg steht, ist die p38-Kinase. Die Phosphorylierung von p38 erfolgt an den Aminosäuren Tyrosin und Threonin durch MEK 3 und MEK 6. Beide AS müssen phosphoryliert werden, um die MAP-Kinase zu aktivieren (Pearson, Robinson et al. 2001). Die Aktivierung von p38 erfolgt G-Protein gekoppelt. Das G-Protein $G\alpha_{12/13}$ aktiviert den membranständigen Enzymkomplex NADPH Oxidase. Dadurch werden konsekutiv intrazelluläre Superoxide produziert. Hierzu zählen zum

Beispiel das Superoxid Anion (O_2^-) und Hydrogen Peroxid (H_2O_2). Über die Bildung von ROS wird demnach p38 aktiviert (Nishida, Tanabe et al. 2005). Die MAP-Kinase p38 wird neben den oben genannten Funktionen auch in Zusammenhang mit Gefäßveränderungen gebracht, die durch arterielle Hypertonie induziert werden. So wurde herausgefunden, dass eine chronische p38 Inhibition in Mäusen mit Ang II induzierter Hypertonie den arteriellen Blutdruck abschwächen kann und somit das vaskuläre *Remodeling* und die Gefäßfunktion verbessert (Potthoff, Stamer et al. 2016).

1.2.2 β -Arrestin

Klassischerweise aktiviert der AT1-Rezeptor einen G-Protein gekoppelten Signalweg. Aktuelle Studien beschreiben eine neue Möglichkeit, wie Rezeptoren über sogenannte β -Arrestine G-Protein unabhängig intrazelluläre Signalwege aktivieren könnten. β -Arrestine sind multifunktionale Proteine, die zum einen G-Protein gekoppelte Rezeptoren desensibilisieren, Endozytose betreiben und auch den G-Protein unabhängigen Signalweg direkt beeinflussen. Bei Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird dieser phosphoryliert. Die G-Proteine werden aktiv und initiieren die weitere Signalkaskade (siehe dazu 1.2.1). An die Bindungsstelle der G-Proteine wird auch β -Arrestin rekrutiert und führt so zur Desensibilisierung des Rezeptors. Für die Bindung von β -Arrestin an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor ist im cytoplasmatischen Teil des sieben-transmembranären Rezeptors eine Serin/Threonin Domäne entscheidend, die auch im AT1-Rezeptor vorhanden ist (Shenoy and Lefkowitz 2011) (Oakley, Laporte et al. 2001). Die Desensibilisierung schützt den Rezeptor vor Überstimulation. Nach der Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors wird dieser mittels *Clathrin-coated vesicles* internalisiert. β -Arrestin weist eine Bindungsstelle für Clathrin auf und erleichtert demnach die Internalisierung (Goodman, Krupnick et al. 1996). Weitere Studien konnten zeigen, dass β -Arrestin MAP-Kinasen direkt aktiviert und als *scaffold* für *second messenger* wirkt. Es wurden für die Phosphorylierung von ERK 1/2 und c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) G-Protein abhängige und unabhängige Möglichkeiten beschrieben (Luttrell, Roudabush et al. 2001). In β 2-Adrenozeptoren konnte gezeigt werden, dass ERK 1/2 von β -Arrestin aktiviert wird. β -Arrestin nimmt hier die Wirkung eines *signal transducers* ein (Shenoy, Drake et al. 2006). Dieses Phänomen

konnte auch im Ang II Signalweg gezeigt werden. Bei dem mutierten AT1-Rezeptors (DRY -> AAY) fehlt die Bindungsstelle für G-Proteine. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, wird dennoch G-Protein unabhängig die MAP-Kinase ERK 1/2 aktiviert (Wei, Ahn et al. 2003).

1.3 Cyclooxygenasen und Prostaglandine in der Niere

Die Cyclooxygenasen (COX) sind die entscheidenden Enzyme in der Prostaglandinsynthese. Es handelt sich um Enzyme bestehend aus circa 600 AS. Die Cyclooxygenasen weisen zwei aktive Zentren auf. Ein aktives Zentrum führt die Oxidation der Arachidonsäure durch, das zweite aktive Zentrum dient der Peroxidase-Funktion der COX (Ferguson, Hebert et al. 1999). Es sind heute mindestens zwei Isoenzyme bekannt, die COX-1 und COX-2. Diese unterscheiden sich in ihrem renalen Vorkommen. COX-1 kommt in der Niere in glatten Muskelzellen und im Sammelrohr vor und ist in hohen Konzentrationen unter physiologischen Bedingungen detektierbar, wohingegen COX-2 in der *Macula densa*, dem dicken Ast der aufsteigenden Henle-Schleife und in hohen Mengen in den interstitiellen Zellen der *Medulla* zu finden ist. Immunhistochemisch konnte das Vorkommen von COX-2 auch in Zwischenzellen des Sammelrohres der Mausniere nachgewiesen werden (Ferguson, Hebert et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen kommt COX-2 in niedrigeren Konzentrationen vor. Entzündungsgeschehen und renale Erkrankungen wirken als starke Stimuli für COX-2, so dass unter pathologischen Bedingungen hohe COX-2 Level vorhanden sind (Breyer and Harris 2001). Aufgrund des hohen Vorkommens von COX-2 in der *Macula densa* liegt die Überlegung nahe, dass COX-2 vermutlich einen Effekt auf die Reninfreisetzung ausübt und damit im Zusammenhang mit dem RAS steht. In COX-2 Knockout-Mäusen ist die Reninexpression signifikant erniedrigt (Yang, Endo et al. 2000). Bei Rattenversuchen mit COX-2 Inhibitoren zeigte sich, dass Renin durch die Vorbehandlung mit den COX-2 Inhibitoren signifikant erniedrigt war (Matzdorf, Kurtz et al. 2007). Die COX-2 Expression in der Niere wird unter anderem durch Ang II reguliert und übt dann im Sinne eines Feedbackmechanismus Einfluss auf die Reninfreisetzung aus (Harris, Zhang et al. 2004). Eine große Rolle nimmt COX-2 ebenfalls in der *Medulla* ein. Eine erhöhte orale Natrium-Chlorid (NaCl)-Aufnahme führt dazu, dass COX-2 in der *Medulla* hochreguliert wird

(Yang, Singh et al. 1998). Infusionen von COX-2 Inhibitoren führen in Tierversuchen zur Entwicklung von Hypertonie, wenn die Tiere erhöhten NaCl-Aufnahmen ausgesetzt sind. Deswegen scheint die Aktivität von COX-2 vor allem in der *Medulla* vor einer Entwicklung einer Hypertonie zu schützen (Zewde and Mattson 2004). Die von der COX-2 produzierten Prostaglandine könnten den entscheidenden Effekt der Natriurese vermitteln.

Prostaglandine gehören zur Stoffklasse der Eikosanoide und werden enzymatisch aus der Arachidonsäure synthetisiert. Diese wird zunächst durch die Phospholipase A₂ aus Phospholipiden in der Membran freigesetzt und danach in einem mehrstufigen Prozess durch die geschwindigkeitsbestimmenden Cyclooxygenasen zu Prostaglandin G₂ und Prostaglandin H₂ umgewandelt. Durch gewebsspezifische Synthesen entstehen schließlich die biologisch aktiven Prostaglandine E₂, I₂ (Prostacyclin), D₂, F_{2α} und Thromboxane. Siehe dazu Abb. 4:

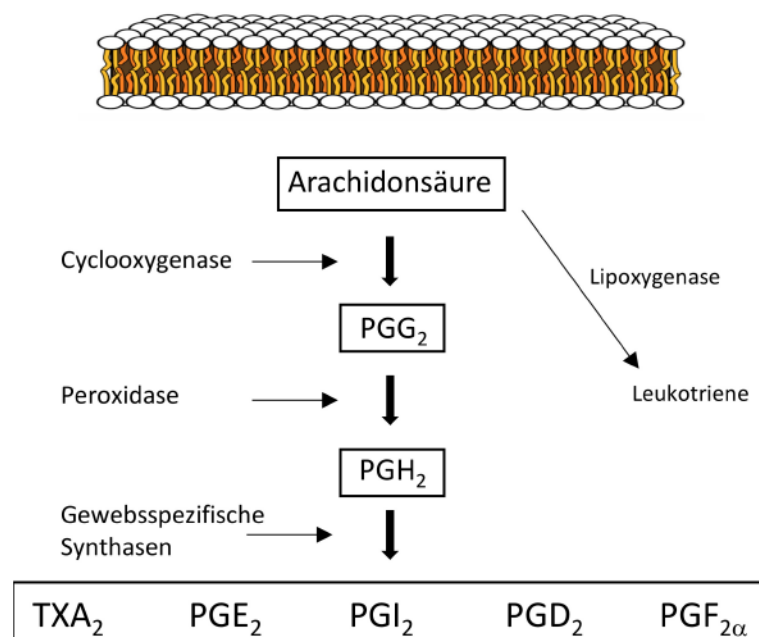


Abb. 4: Prostaglandinsynthese. Die in der Phospholipidmembran enthaltene Arachidonsäure wird über die Cyclooxygenase in einer zweistufigen Reaktion zu Prostaglandin H₂ umgewandelt. Durch gewebsspezifische Synthesen entstehen die biologisch aktiven Prostaglandine E₂, I₂, D₂, F_{2α} und Thromboxan. Des Weiteren wird die Arachidonsäure über die Lipoxygenase zu Leukotrienen metabolisiert. Selbst modifiziert nach (Klinke R. 2010).

Die Prostaglandine üben sowohl autokrine als auch parakrine Effekte in den Organsystemen aus. Die klassischen Effekte der Prostaglandine werden im Rahmen von Entzündungsgeschehen vermittelt. Gefäßdilatation und erhöhte Gefäßpermeabilität gehören zu der frühen Entzündungsantwort durch die Prostaglandine (Funk 2001). Thromboxan kommt in den Thrombozyten vor und fördert die Thrombozytenaggregation. Prostacyclin kann als Gegenspieler von Thromboxan die Aggregation von Thrombozyten verhindern und zudem die Gefäßkontraktion in glatten Muskelzellen hemmen. Interessant für die vorliegende Arbeit sind die renalen Wirkungen der Prostaglandine. Das Prostaglandin E_2 weist über verschiedene Mechanismen einen natriuretischen und diuretischen Effekt in der Niere auf, wodurch die renale Durchblutung und die glomeruläre Filtrationsrate gesteigert werden. Zum einen hemmt PG E_2 die Na^+ -Absorption im dicken Teil der aufsteigenden Henleschleife durch Inhibition der $Na^+-K^+-2Cl^-$ Kotransporters und wirkt vasodilatatorisch (Kim 2008). Zum anderen schwächt es die Wirkung von Vasopressin ab, indem der Einbau von Aquaporin 2 in die Sammelrohrmembran reduziert wird. Hierdurch wird durch Natriurese das Blutplasmavolumen gesenkt (Hebert, Jacobson et al. 1990), (Zelenina, Christensen et al. 2000). Zusammenfassend scheinen die Prostaglandine in der *Medulla* entscheidend die Ausscheidung von Salz und Wasser zu beeinflussen (Yang, Singh et al. 1998). Gleichzeitig schwächen die Prostaglandine auch die vasokonstriktorisches und antidiuretischen Effekte von Ang II ab. Andererseits stimuliert PG E_2 die Reninfreisetzung aus dem juxtaglomerulären Apparat (Navar, Inscho et al. 1996). Hier scheint es einen entscheidenden Zusammenhang zwischen den Prostaglandinen und dem RAS zu geben.

1.4 Ziele der Arbeit

Das RAS steht mit seinem Hauptmetaboliten Ang II schon lange im Zentrum der medizinischen Forschung. Die zahlreichen Effekte von Ang II sind gut erforscht, aktuelle Studien zeigen, dass es auch einen Zusammenhang zwischen Ang II und COX-2 in der Niere geben könnte. In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob das RAS einen Einfluss auf die Cyclooxygenase Expression ausübt. Die zentralen Fragestellungen lauten:

1) Übt Ang II einen Effekt auf die renale COX-2 Expression aus?

Zahlreiche Studien belegten in Tierversuchen bereits den Zusammenhang von hohem Ang II Leveln und erhöhtem arteriellen Blutdruck. In der vorliegenden Arbeit soll ein möglicher gegenregulatorischer Effekt von Ang II auf die renale COX-2 Expression untersucht werden. Dazu wollen wir als gängige Methode Ang II Infusionen im Mausmodell durchführen und sowohl den Urin und als auch das Nierengewebe untersuchen. Mithilfe von Genexpressionsanalysen soll ein Effekt von Ang II nachgewiesen werden.

2) Wo genau kommt COX-2 in der Niere vor?

Bisher ist bekannt, dass COX-2 in der Niere vor allem in der *Macula densa*, dem dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und in den interstitiellen Zellen der *Medulla* vorkommt. Einige Studien konnten zeigen, dass COX-2 auch im Sammelrohr zu finden ist. Durch immunhistochemische Verfahren aus Nierengewebe von Mäusen wollen wir herausfinden, wo genau COX-2 bei Einwirkung von Ang II lokalisiert ist.

3) Über welchen zellulären Signalweg führt Ang II zu einer COX-2 Expression?

In vielen verschiedenen Zelllinien sind die Auswirkungen von Ang II bereits umfassend untersucht worden. Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen weisen Charakteristika von Sammelrohrzellen auf und eignen sich deswegen besonders gut für unsere Experimente. In MDCK Zellen wollen wir den Signalweg herausfinden, wie Ang II speziell in diesen Zellen zu einer COX-2 Expression führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein monoklonales Prostaglandin E₂ ELISA Kit wurde für die Prostaglandinbestimmung im 24 Stunden Sammelurin von Mäusen und im Zellmedium verwendet und von Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA, bezogen. Benötigte Materialien sind zusammenfassend in Tabelle 1 dargestellt.

Materialien

Produkt	Cat. No.
anti-Prostaglandin E ₂ monoklonal	414013
Prostaglandin E ₂ AChE Tracer	414010
Prostaglandin E ₂ ELISA Standard	414014
ELISA Puffer 10x Konzentrat	400060
Waschpuffer 400x Konzentrat	400062
Polysorbat 20	400035
96 Well Platte, Goat anti-Mouse IgG beschichtet	400009
Abdeckfolie für 96 Well Platte	400012
Ellman's Reagenz	400050
ELISA Tracer Farbstoff	400040
ELISA Antiserum Farbstoff	400042
UltraPure Wasser	400000

Tabelle 1: Übersicht von Materialien für ELISA mit Bezugsquelle.

2.1.2 Genexpressionsanalysen

Die folgenden Tabellen stellen eine Auflistung aller Materialien dar, die für die Genexpressionsanalysen des Nierengewebes gebraucht wurden.

Kits

Bezeichnung	Hersteller	Cat. No.
RNeasy [®] Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	74136
QuantiTect [®] Reverse Transcription	Qiagen, Hilden, Deutschland	205313
HotStarTaq [®] DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland	203205
Power SYBR Green [®] PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland	4367659

Tabelle 2: Kits für PCR Analysen mit Bezugsquellen.

Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' -> 3'	bp
COX-2	<i>for</i> CAG CAC TTC ACC CAT CAG TTT <i>rev</i> GGC GCA GTT TAT GTT GTC TGT	130
GAPDH	<i>for</i> GGT CAT CCA TGA CAA CTT TGG TAT CG <i>rev</i> GTC GTC GTT GAA GTC AGA GGA GAC	384

Tabelle 3: Übersicht über Primer mit Primersequenzen (Vorwärt und Rückwärts), Länge der Primern in Basenpaaren.

Als endogenes Referenzgen wurde ein QuantiTect Primer Assay für murine 18S ribosomale RNA von Qiagen bezogen (Cat. No. QT00324940).

Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarosegel 1,5 %	1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer 4 Tropfen Ethidiumbromid

TAE-Elektrophoresepuffer	39,96 mM Tris Base 19,97 mM Eisessig 2 nM Na ₂ EDTA * 2H ₂ O
TAE fünffach Orange-G Ladepuffer	0,2 % Orange G 15 % Ficoll 400 15 % Glycerin

Tabelle 4: Übersicht über Puffer für Genexpressionsanalysen.

2.1.3 Immunfluoreszenz

In den folgenden Tabellen sind alle Materialien, Lösungen und Antikörper dargestellt, die für die Immunfluoreszenzen der Nierenschnitte verwendet wurden.

Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Citrat-Puffer	2,94 g (10 nM) Tri-Na-Citrat-Dihydrat 1 l aqua dest.

Tabelle 5: Citrat-Puffer für Hitzeandau.

Nach Fertigstellung des Puffers wird der pH auf 6 eingestellt.

Materialien für Immunfluoreszenzanalysen

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Cryomold® Standard	Tissue-Tek® Sakura Finetek, Torrance, CA, USA	4557
DAPI Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA	0100-20
Deckgläser	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland	
Histosette I, Tissue Processing Cassettes	Simport, Beloeil, Canada	M490-3
Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland	J1800AMNZ

Shandon Cryotome G	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland	CS1010Z9902
Tissue Freezing Medium®	Jung, Leica Microsystems Nussloch, Deutschland	020108926

Tabelle 6: Materialien für Immunfluoreszenzanalysen mit Bezugsquellen.

Für die COX-2 Färbung wurden die Nieren in GPAS fixiert. GPAS setzt sich zusammen aus 2,5 % Glutaraldehyd, 10 mM Natriumperiodat, 40 mM Phosphatpuffer und 1 % Essigsäure.

Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Cat. No.
Anti-AQP2 (C-17), 1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	Sc-9882
Anti-COX-2 (M-19), 1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	Sc-23984
Anti-V-ATPase (H-140), 1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	Sc-28801

Tabelle 7: Primärantikörper für Immunfluoreszenz.

Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Cat. No.
Alexa Fluor® 568, 1:1000, rabbit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	A-11011
Alexa Fluor® 488, 1:1000, goat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	A-21222

Tabelle 8: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz.

2.1.4 Zellkultur

2.1.4.1 Zelllinie

In folgender Tabelle sind die Zellen aufgeführt, mit denen die Versuche in der Zellkultur durchgeführt wurden.

Zelllinie

Zellen	Bezugsquelle
Madin Darby Canine Kidney Zellen, Klon 11	Herrn Professor Dr. Oberleitner, Medizinische Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Zellen in der Zellkultur mit Bezugsquelle.

2.1.4.2 Materialien in der Zellkultur

Die folgenden Tabellen listen die in der Zellkultur verwendeten Nährmedien, ihre Zusätze, Puffer und weitere Lösungen auf.

Nährmedien und ihre Zusätze

Produkt	Hersteller	Cat. No.
DMEM, mit Glutamin, mit 2,2 g/L NaHCO ₃	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	FG0415
DMEM/HAM'S F-12 mit stabilem Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	FG4815
FBS Superior	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	S0615
Trypsin 0,05 % / EDTA 0,02 %	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	L2143
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	A2213
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	D2650

Tabelle 10: Übersicht über Nährmedien und ihre Zusätze mit Bezugsquellen.

Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
EDTA-Puffer	0,2 g EDTA (Titrplex III) von Merck 8418 8,0 g NaCl 0,2 g KCl

	1,15 g 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L steriles Aqua dest
HBS	10 mM D-Glucose 40 mM HEPES 10 mM KCl 270 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄

Tabelle 11: Puffer in der Zellkultur.

Der pH-Wert des EDTA-Puffers wurde nach Fertigstellung zwischen 7,1 und 7,3 eingestellt, anschließend wurde der Puffer für 30 Minuten bei 121°C autoklaviert und dann bei 4 °C gelagert.

Der pH-Wert von HBS wurde auf 7,13 eingestellt und bei -20 °C gelagert.

2.1.4.3 Stimulanzen und Inhibitoren

Nachfolgende Übersichten fassen alle Agenzien zusammen, die in den Zellkulturversuchen eingesetzt wurden.

Stimulanz

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Angiotensin II	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A9525

Tabelle 12: Übersicht über Stimulanz für Zellversuche mit Bezugsquelle.

Inhibitoren

Produkt	Hersteller	Cat. No.
SB 202190	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	559388
PD 98059	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	513000
Calphostin C	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	C6303
Acetovanillone	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	STBD1490V

Tabelle 13: Übersicht über die Inhibitoren für Zellversuche mit Bezugsquellen.

Das Stimulanz und die Inhibitoren wurden alle in Dimethyl Sulfoxid (DMSO) gelöst.

2.1.4.4 Materialien und Geräte in der Zellkultur

Tabelle 14 listet weitere Materialien und Geräte auf, die in der Zellkultur verwendet wurden.

Materialien und Geräte

Produkt	Hersteller	Cat. No.
6 Well Zellkulturplatten	Costar, Corning, NY, USA	3506
Kulturflaschen T75 beschichtet	Nunc, Roskilde, Dänemark	156499
Deckgläser 12 mm Ø	VWR, Darmstadt, Deutschland	631 – 1577
Zählkammer für Zellen, Neubauer	Laboroptik, Lacing, Großbritannien	
Pipetten Pipetman Classic™	Gilson, Middleton, WI, USA	
Filterspitzen für Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Serologische Pipetten, einzeln verpackt	Costar, Corning, NY, USA	
Inversmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen, Deutschland	
Digitalkamera Coolpix 4500	Nikon, Düsseldorf, Deutschland	
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland	
Zellinkubator Hera Cell 150	Thermo FisherScientific, Dreieich, Deutschland	
Zentrifuge Rotixa/RP (Rotor 4294)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland	
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland	

Tabelle 14: Übersicht über Materialien und Geräte in der Zellkultur mit Bezugsquellen.

2.1.5 Chemikalien im Labor

Nachfolgend aufgeführt sind alphabetisch geordnete Chemikalien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Chemikalien im Labor

Produkt	Hersteller	Cat. No.
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2267.4
APS	Biomol, Hamburg, Deutschland	50404
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim, Deutschland	C9008
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	6574
DTT	Biomol, Hamburg, Deutschland	04010
Essigsäure 100 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	6755.2
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.11727
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	HP47.1
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland	17-0400-01
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland	104094
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A1377
H ₂ O, steril	VWR Prolabo Chemicals, Lutterworth, Großbritannien	83650.320
Isopropanol 100 %	Apotheke Uniklinik Düsseldorf, Deutschland	
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	P9541
Kaliumhydrogenphosphat	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande	0240
Luminol	Fluka, Buchs, Schweiz	09253
Methanol	Pancreac, Castellar del Vallés, Spanien	131091
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A2942
Orange G	Fluka, Buchs, Schweiz	75380
Paraformaldehyd 4 %	Morphisto, Frankfurt a.M., Deutschland	11762
RNase Away®	Molecular BioProducts, San Diego, USA	7005-11

Rotiphorese® Gel 30 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	3029.2
SDS	Biomol, Hamburg, Deutschland	04051.1
TEMED 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	2367
TRIS Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland	4855.2
TRIS HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	T5941
Tween® 20	Merck, Darmstadt, Deutschland	8.17072.1000
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	8070.2

Tabelle 15: Übersicht über Chemikalien im Labor mit Bezugsquellen.

2.1.6 Proteinanalysen

Die folgenden Tabellen stellen alle Module, Puffer, und Antikörper dar, die für Western Blot Analysen benutzt wurden.

Module für Western Blot Analysen

Bezeichnung	Hersteller
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
PowerPac™ Universal	Bio-Rad, München, Deutschland

Tabelle 16: Übersicht über Model für Western Blot Analysen mit Bezugsquellen.

Puffer für Western Blot Analysen

Puffer	Zusammensetzung
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 4,29 mM Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 1,47 mM KH ₂ PO ₄
4 x Laemmli-Probenpuffer	160 mM Tris Hcl pH 6,8 6,4 % SDS 32 % Glycerol

	0,32 % Bromphenolblau 200 mM DTT
Trenngelpuffer (pH 8,8)	360 mM Tris Hcl 1140 mM Tris Base 0,4 % SDS
Sammelgelpuffer (pH 6,9)	484 mM Tris Hcl 16 mM Tris Base 0,4 % SDS
Polyacrylamidgel	
2 10 %ige Trenngele	3 ml Rotiphorese® 1,5 ml VE-Wasser 4,5 ml Trenngelpuffer 90 µl 10 % APS 15 µl TEMED
2 Sammelgele	0,535 ml Rotiphorese® 1,135 ml VE-Wasser 1,665 ml Sammelgelpuffer 40 µl 10 % APS 5 µl TEMED
Laufpuffer für SDS-PAGE	191,8 mM Glycin 23,9 mM Tris Base 0,1 % SDS
Transferpuffer	31 mM Tris Base 240 mM Glycin 20 % Methanol
Proteinwaschpuffer	12,9 mM Tris pH 7,5 129 mM NaCl 0,13 % Tween 20
ECL-Lösung A	100 mM Tris pH 8,5 0,4 mM Coumarinsäure (gelöst in DMSO) 2,5 mM Luminol (gelöst in DMSO)
ECL-Lösung B	100 mM Tris pH 8,5 5,87 mM H ₂ O ₂

Tabelle 17: Übersicht über Puffer für Western Blot Analysen.

Eine Auflistung der benutzten Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot Analysen findet sich in den folgenden zwei Tabellen.

Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Cat. No.
Anti-COX-2, 1:2000	Cayman, Ann Arbor, USA	160126
Anti- β -Aktin, 1:20000	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	A5316
Anti-p44/42 MAPK (ERK $\frac{1}{2}$) 1:1500	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9102
anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK $\frac{1}{2}$) (Thr202/Tyr204) 1:1000	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9101
anti-p38 MAPK 1:1500	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9212
anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) 1:1000	Cell Signaling, Leiden, Niederlande	9211

Tabelle 18: Übersicht über Primärantikörper mit Verdünnungen und Bezugsquellen.

Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Cat. No.
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, 1:7500	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	NA934V
Anti-Maus, HRP-konjugiert, 1:7500	Dako, Hamburg, Deutschland	P0447

Tabelle 19: Übersicht über Sekundärantikörper mit Verdünnungen und Bezugsquellen.

Antikörper für Western Blots wurden je nach Verdünnung mit Proteinwaschpuffer versetzt und bei 4° C gelagert. Hierdurch war eine Mehrfachverwendung möglich.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Eine Übersicht über weitere Materialien und Geräte geben folgende Tabellen.

Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Cat. No
---------	------------	---------

Pasteurpipetten	Rotilab, Dreieich, Deutschland	2600111
Combitips advanced® 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030089.782
SafeSeal Gefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	0030121.023
Tubes (15; 50 ml), PP, conical bottom, sterile	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Dualfilter 10 µl M	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Nitrocellulose Membran	Whatman Protran, Dassel, Deutschland	10401196
Blotting-Papier	Whatman, Dassel, Deutschland	10426892

Tabelle 20: Übersicht über Materialien im Labor mit Bezugsquellen.

Geräte

Produkt	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Centrifuge 541R (Rotor F-45-24-11)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DTX 880 Multimode Detector	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Eismaschine AF 80	Scotsman®, Mailand, Italien
Elektrophoresekammer Agagel	Biometra, Göttingen, Deutschland
Imager FluorChem® FC2	Biozym, Hess, Oldendorf, Deutschland
Laborschüttler HS 260 control	IKA®, Staufen, Deutschland
Laborwaage	Bizerba, Balingen, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle NN-E202CB	Panasonic, Wiesbaden, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Pico 21 Centrifuge (Rotor 75003424)	Heraeus, Hanau, Deutschland

Pipettierhilfe Easytip	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real Time PCR System 7300	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Research plus (0,1-2,5 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reference (2-20; 50-200 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reference 2 (0,1-2,5; 0,5-10; 10-100; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Shaker Mini See-Saw Rocker SSM4	Stuart, Staffordshire, Großbritannien
Shaker Rocking Platform	VWR, Darmstadt, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermostat DryBlockHeating BioTDB-100	Biosan, Riga, Lettland

Tabelle 21: Übersicht über Geräte im Labor mit Bezugsquellen.

2.1.8 Software und Statistik

Nachfolgende Tabelle listet die in dieser Arbeit verwendeten Programme auf.

Software und Statistik

Programm	Anwendung
FluorChem FC2 Version 6.0.2	Ausführung des Imaging Systems
AlphaEase FC Version 6.0.0	Densitometrische Auswertung der Banden
Cayman Analysis Tools	Auswertung der ELISA Ergebnisse
AxioVision LE Software, Carls Zeiss Microimaging Solutions	Analyse der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie
Microsoft Excel 2016	Statistische Auswertung
GraphPad Prism 5 Software Inc.	Diagramme und statistische Auswertung
EndNote X7	Literaturangaben

Tabelle 22: Übersicht über verwendete Software mit Anwendungsgebiet.

2.2 Methoden

2.2.1 Prostaglandinkonzentration in 24 Stunden Sammelurin von Mäusen

Die Prostaglandinkonzentration wurde im 24 Stunden Sammelurin von 129/SvEv Mäusen zu Versuchsbeginn und nach einer zweiwöchigen Ang II Infusion nach einer Implantation von osmotischen Minipumpen von Alzet[®] bestimmt. Ang II wurde in einer Konzentration von 1000 ng/kg/min verabreicht. Die Implantation und Gewinnung des Sammelurins erfolgte freundlicherweise durch wissenschaftliche Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, die im Tierschutzvertrag gelistet und durch einen Tierversuchskurs für Experimente mit Tieren berechtigt sind. Das Aktenzeichen der ZETT lautet G216-08. Zur Gewinnung von 24 Stunden Sammelurin wurden Mäuse einzeln in metabolische Käfige gesetzt. Der Urin wurde durch einen Trichter gesammelt. Nach 24 Stunden wurde das Urinvolumen gewogen. Die Urinproben wurden nach ihrer Generierung zentrifugiert, um feste Urinbestandteile zu entfernen, anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Prostaglandinkonzentration wurde schließlich aus den Urinproben mittels eines Prostaglandin E₂ ELISA von Cayman nach der unten angegebenen Methode gemessen.

2.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Für die Messung der Prostaglandin E₂ Konzentration aus dem Überstand der Zellen und dem Sammelurin von Mäusen wurde ein monoklonales Prostaglandin E₂ *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) von Cayman benutzt. Für die Herstellung der Puffer mit den im Kit enthaltenen Reagenzien (Konzentrate) wurde *UltraPure* Wasser verwendet. Alle Konzentrate wurden damit zu gebrauchsfertigen Lösungen verdünnt. Die hergestellten Puffer wurden schließlich bei 4 °C gelagert. Als nächstes wurde der Standard hergestellt, siehe dazu Abb. 5. Zunächst wurde dem Standard 1 ml Waschpuffer hinzugefügt und anschließend eine Verdünnungsreihe wie unten dargestellt gestartet. Hierfür wurden acht Mikroreaktionsgefäße durchnummeriert. In Gefäß eins wurde 900 µl Waschpuffer gegeben und in Gefäß zwei bis acht jeweils 500 µl Waschpuffer. Anschließend wurde 100 µl des Standardkonzentrats in das erste Gefäß überführt. Nach ausreichendem Durchmischen des Inhaltes wurde 500 µl in das zweite

Gefäß transferiert. Diese Verdünnung wurde für die Gefäße drei bis acht identisch fortgesetzt.

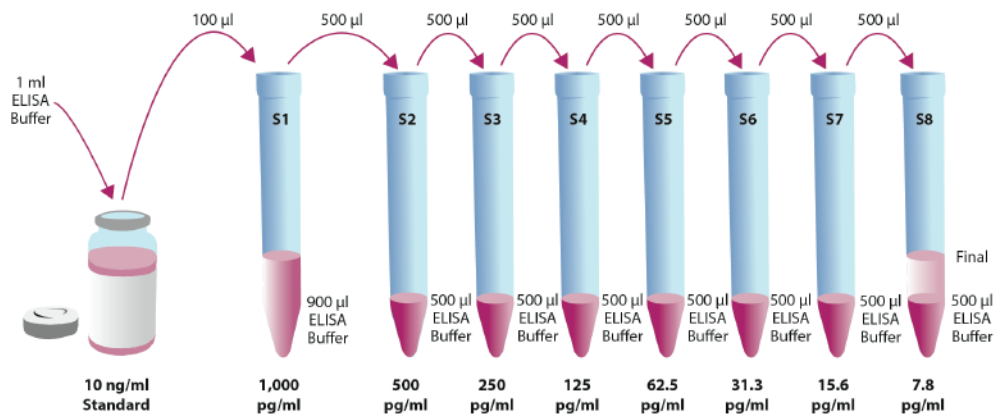


Abb. 5: Herstellung der Standardreihe. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Cayman Chemical.

Die im Kit enthaltene 96 Well Platte ist gebrauchsfertig und bereits mit anti-Maus IgG vorbeschichtet. Wie in Abb. 6 dargestellt, muss jede Platte mindestens zwei Negativkontrollen (Blank), zwei Nicht-Spezifische-Bindungen (NSB), zwei Maximal-Bindungen (B_0) und die komplette Standardreihe in doppelter Ausführung enthalten. Diese Vorgaben stellen präzise und reproduzierbare Ergebnisse sicher. Die 96 Well Platte wird nach Herstellerangaben pipettiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B_0	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B_0	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B_0	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk - Blank
 TA - Total Activity
 NSB - Non-Specific Binding
 B_0 - Maximum Binding
 S1-S8 - Standards 1-8
 1-24 - Samples

Abb. 6: Schematisch dargestellte 96 Well Platte für ELISA. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Cayman Chemical.

Beim Pipettieren des ELISA war zu beachten, dass bei jedem neuen Reagenz eine neue Pipettenspitze verwendet werden muss. Zunächst wurde 100 µl ELISA Puffer in NSB hinzugegeben und 50 µl zu B_0 . Daraufhin wurde die Standardreihe (50 µl) in S1-S8 in

doppelter Ausführung pipettiert. Nun wurden die Proben mit jeweils 50 µl hinzugegeben. Als Letztes wurde 50 µl des Tracers zu TA und Blk dazugegeben. Der Prostaglandinantikörper wurde schließlich in jedes Well außer TA, NSB, und Blk pipettiert. Die fertig pipettierte ELISA Platte wurde dann mit der Klebefolie abgedeckt und für 18 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach einem fünfmaligen Waschvorgang wurde die 96 Well Platte mit dem verdünnten Substrat für eine Stunde unter abgedunkelten Bedingungen auf dem Schüttler inkubiert. Die Extinktion wurde dann bei einer Längenwelle von 405 nm und 420 nm im Microplattenreader DTX 880 Multimode Detector spektrophotometrisch gemessen. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit den ELISA Analysis Tools von Cayman.

2.2.3 RNA-Isolierung aus Nierengewebe

Die RNA-Isolierung aus Nierengewebe, welches freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte mit einem RNeasy Mini Plus Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die Gewebeproben in RNALater-Lösung eingefroren. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter RNase freien Bedingungen bei Raumtemperatur (RT). Nachdem die RNALater-Lösung vorsichtig abgesaugt wurde, wurde 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol vermengt. Hierbei wurde 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT-Puffer benutzt. Mit dem Tissue Ruptor wurde das Gewebe unter stark denaturierenden Bedingungen zunächst homogenisiert. Nach Überführung in Mikrozentrifugengefäße wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für drei Minuten zentrifugiert. Die Probe wurde anschließend in eine genomische DNA (gDNA)-Eliminierungssäule überführt, um die gDNA unter Zentrifugation (15 Sekunden, 10000 rpm) zu binden. Dann wurde die Probe mit je 350 µl RNase-freiem 70 %igem Ethanol gemischt. Schließlich wurde die Probe in die RNA-Eliminierungssäule pipettiert, die durch eine Membran die RNA unter Zentrifugation (15 Sekunden, 10000 rpm) bindet. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde dann verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Für die Eliminierung der restlichen gDNA wurde ein Gemisch aus 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Puffer vorbereitet. Dieses Gemisch wurde auf die Säule gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 350 µl RW1-

Puffer wurde die Säule für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert und die aufgefangene Flüssigkeit verworfen. Es folgte die Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und eine Zentrifugation (15 Sekunden, 10000 rpm). Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde dann verworfen. Die Säule wurde schließlich in ein neues Auffanggefäß überführt und zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Als letztes wurde für die Elution 50 µl RNase freies H₂O in die Mitte der Säule gegeben und für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Die isolierte RNA konnte dann weiterverarbeitet werden.

2.2.4 Reverse Transkription

Mit dem QuantiTect-Kit von Qiagen wurde nach den Angaben des Herstellers die reverse Transkription durchgeführt. Die reverse Transkription dient der Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) für die spätere Quantifizierung mittels Quantitativer Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Für die Transkription wurden 750 ng RNA benutzt. Um noch eventuell vorhandene gDNA zu eliminieren, wurde ein Verdau der Probe mit 2 µl gDNA Wipeout Buffer durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für drei Minuten bei 42 °C im Thermoblock. Danach wurden die Proben auf Eis gelegt. Nach dem gDNA-Verdau wurde 0,5 µl der Probe entnommen. In einer anschließenden PCR wird die Probe auf noch vorhandene gDNA überprüft. Für die cDNA Synthese wurde ein sogenannter Mastermix angesetzt, der aus 4 µl RT-Buffer, 1 µl Reverse Transkriptase, 1 µl RT-Primer-Mix und 0,5 µl RNase-freies H₂O besteht. 6,5 µl RT-Mastermix wurde schließlich den Proben hinzugegeben, dann folgte die cDNA Synthese im Mastercycler für 25 Minuten bei 42 °C. Danach wird die Probe für drei Minuten bei 95 °C inkubiert. Durch diese Hitzeeinwirkung wird die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die gewonnene cDNA kann nun in der Real Time PCR untersucht werden.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die klassische Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) dient der Vervielfältigung einer bestimmten Gensequenz innerhalb eines cDNA Abschnittes. In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe der PCR eine Qualitätskontrolle der isolierten

RNA, der RNA nach *Wipeout* und der umschriebenen cDNA durchgeführt. Die Kontrolle erfolgte mit GAPDH als *housekeeping* Gen. Ein Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

Reaktionsansatz	Menge
H ₂ O, Nuklease frei	16,78 µl
10-fach PCR Buffer in 15 mM MgCl ₂	2 µl
dNTP je 5 mM	0,4 µl
Rückwärtsprimer 100 pM	0,1 µl
Vorwärtsprimer 100 pM	0,1 µl
HotStarTaq-DNA-Polymerase	0,12 µl
cDNA/RNA/RNA nach Wipeout	0,5 µl

Tabelle 23: Reaktionsansatz für Genexpressionsanalysen.

Die PCR wird schließlich in einem Thermocycler nach folgendem Schema mit insgesamt 40 Zyklen durchgeführt:

- Initialdenaturierung für 15 Minuten bei 95 °C
- Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C
- Annealing für 30 Sekunden bei 58 °C
- Elongation für 30 Sekunden bei 72 °C
- Finale Elongation für fünf Minuten bei 72 °C

Die PCR-Produkte wurde in einem 1,5 %igem Agarose-Gel nachgewiesen. Hierbei werden die Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt und können dann durch das Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Für die Herstellung des Agarose-Gels wurde 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht und anschließend bei 60 °C gelagert. Dann wurden vier Tropfen Ethidiumbromid hinzugegeben. Nach Aushärtung des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer gespannt. Diese Kammer ist mit TAE-Puffer gefüllt. Die PCR-Proben wurden dann mit

fünffach Orange-G Ladepuffer vermischt und zentrifugiert. Danach erfolgte die Ladung von zunächst 6 µl 100-bp-Markern und je 9 µl PCR-Proben pro Gelkassette. Die Elektrophorese erfolgte schließlich bei einer konstanten Spannung von 85 V für etwa 40 Minuten. Mit einer UV-sensitiven Kamera im Imaging System konnte als letztes das Bild aufgenommen werden.

2.2.6 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR basiert auf der Methode der herkömmlichen PCR. Als Besonderheit wird bei der qPCR mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes die cDNA in Echtzeit quantifiziert. Als Farbstoff wird SYBR Green I verwendet, es handelt sich um einen Cyanin Farbstoff, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Nach jedem Multiplikationszyklus wird die Fluoreszenz von SYBR Green I gemessen, dabei steigt die Menge der Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte. Der Verlauf des Fluoreszenzsignals wird anhand einer Amplifikationskurve dargestellt. Die qPCR wurde für den Nachweis der COX-2 DNA durchgeführt. Als *housekeeping* Gen wurde hier 18S verwendet. Ein Reaktionsansatz setzt sich wie in Tabelle 24 dargestellt zusammen:

Reaktionsansatz	Für COX-2	Für 18S
HPLC-Wasser	8,5 µl	7 µl
SYBR Green I	10 µl	10 µl
Rückwärtsprimer	0,25 µl	Primermix 2 µl
Vorwärtsprimer	0,25 µl	-
cDNA, 1:3	1 µl	1 µl

Tabelle 24: Reaktionsansatz für qPCR.

Nach Fertigstellung des Reaktionsansatzes wurden die Proben im Doppelansatz auf die 96-Well Platte pipettiert. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsmix mit 1 µl sterilem Wasser statt cDNA pipettiert. Die 96-Well Platte wurde mit einer Klebefolie bedeckt und in den Thermoblock des Real Time PCR Geräts gelegt. Die PCR-Zyklen für den COX-2 DNA

Nachweis verliefen nach unten beschriebenem Schema, insgesamt wurden 40 Zyklen für die Amplifikation durchgeführt.

- Initialdenaturierung für 15 Minuten bei 95 °C
- Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C
- Annealing für 30 Sekunden bei 58 °C
- Elongation für 30 Sekunden bei 72 °C
- Aufnahme der SYBR Green I Fluoreszenz für 34 Sekunden bei 77 °C

Die PCR für den 18S Quanti Tect Primer verläuft nach folgendem Schema:

- Initialdenaturierung für 15 Minuten bei 95 °C
- Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C
- Annealing für 30 Sekunden bei 55 °C
- Aufnahme der SYBR Green I Fluoreszenz für 34 Sekunden bei 72 °C

Nach Ende der PCR wurden die Amplifikationskurven erstellt. Für die statistische Auswertung ist der Schwellenzyklus (*cycle threshold*, C_T) von Bedeutung. Der C_T -Wert stellt den ersten Zyklus dar, bei dem eine exponentielle Verdopplung des Fluoreszenzsignals vorhanden ist. Nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode wird die unterschiedliche Expression berechnet. Zunächst wird die Differenz aus dem C_T -Wert des Zielgens und des Referenzgens 18S gebildet (ΔC_T (Zielgen) - ΔC_T (Referenzgen)). Anschließend werden die zwei zu vergleichenden Gruppen voneinander subtrahiert (ΔC_T (behandelt) - ΔC_T (unbehandelt)). Das Ergebnis wird in die Gleichung $n\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ gesetzt (Livak and Schmittgen 2001). Die relativen, normalisierten Genexpressionsdaten werden schließlich als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede bestehen bei $p \leq 0,05$ im t-Test nach *Student* für ungepaarte Stichproben.

2.2.7 Herstellung der Kryoschnitte aus Nierengewebe

Nach der Organentnahme durch wissenschaftliche Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, die im Tierschutzvertrag gelistet und durch einen Tierversuchskurs für Experimente mit Tieren berechtigt sind, wurden die Nieren zunächst zugeschnitten, in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend für sechs Stunden in einer 30 %

Sucroselösung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Sucroselösung verhindert die Bildung von intra- und extrazellulären Eiskristallen. Anschließend folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Nach der Einbettung der Nieren mittels Tissue Tek wurde der Kryoblock unter Anleitung einer technischen Assistentin des Labors longitudinal in 5 µm dicke Schichten mithilfe des auf -20 °C gekühlten Kryostats geschnitten. Die Schnitte wurden auf Superfrost Objektträgern aufgezogen und getrocknet.

2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung

Für den Nachweis von COX-2 in Zwischenzellen des Sammelrohrs wurde Immunfluoreszenzfärbung auf Kryoschnitten des Nierengewebes durchgeführt. Zunächst erfolgt die Antigendemaskierung durch Hitzeandau für fünf Minuten im Citrat-Puffer in der Mikrowelle. Für die COX-2 Färbung wurden die Kryoschnitte mit GPAS fixiert. Anschließend wurde der Kryoschnitt mit 5 % Magermilchpulver (Blockierungspuffer), gelöst in PBS, inkubiert, um unspezifische Bindungen zu sättigen. Danach wurden die Schnitte für 60 Minuten mit 0,1 % Triton X-100 bei RT permeabilisiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, gelöst in Blockierungspuffer, bei 4 °C über Nacht. Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit PBS wurden die Schnitte mit dem in Blockierungspuffer gelösten Sekundärantikörper, für eine Stunde bei RT inkubiert. Ab der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde lichtgeschützt gearbeitet. Hiernach erfolgte die Färbung mit dem zweiten Primärantikörper. Die Inkubation erfolgte über Nacht, daraufhin wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und mit dem zweiten Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert. Nun wurden nach einem ausführlichen Waschvorgang die Schnitte mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) haltigem Fluoromount-G eingedeckt. Mit einem konfokalen Lasermikroskop von Zeiss LSM 510 wurden die Fluoreszenzbilder in einer Vergrößerung von 1:20 und 1:40 aufgenommen. Es wurden Wasserobjektive mit einer numerischen Apertur von 1,4 benutzt. Mit Filtersets wurde die Exzitation (488 nm für GFP, 568 nm für Rhodamin) und Emission (515-540 nm für GFP, 590-610 nm für Rhodamin) aufgenommen und die Bilder mit der AxioVision LE Software analysiert.

2.2.9 Madin Darby Canine Kidney Zellen

Für die Zellkulturversuche wurden in dieser Arbeit MDCK Zellen verwendet, es handelt sich hierbei um epitheliale Zellen aus dem Hund, die erstmals von Madin und Darby beschrieben worden sind (Madin and Darby 1958). MDCK Zellen stammen aus dem renalen Sammelrohr, dieses besteht aus Haupt- und Zwischenzellen. Aufgabe der Hauptzellen ist der K^+ - und Na^+ -Transport und somit die Blutdruckregulation, die Zwischenzellen sind für den transepithelialen Säure-Basen-Haushalt verantwortlich. Gekle und Wunsch klonierten zwei Zellsubtypen der MDCK Zellen, die sich in Funktion und Morphologie unterscheiden und jeweils die Charakteristika der Haupt- und Zwischenzellen des Sammelrohres widerspiegeln. MDCK Klon sieben stellt die Hauptzellen dar, Klon elf spiegelt die Zwischenzellen wider (Wunsch, Gekle et al. 1995). Für diese Arbeit wurden die Experimente mit den MDCK C11 Zellen durchgeführt.

2.2.10 Transduktion der Madin Darby Canine Kindey Zellen mit dem AT1-Rezeptor

Die Expression des endogen vorhandenen AT1-Rezeptors war in den MDCK Zellen sehr unterschiedlich ausgeprägt. Mit zunehmender Passage waren die Ergebnisse immer schwächer. Um stabile Ergebnisse erhalten zu können, wurde den MDCK Zellen ein AT1-Rezeptor (pLEGFP.AT1R oder pLEGFP.AT1R Δ 319) stabil transduziert. Die Transduktion wurde retroviral durchgeführt. Die hierzu verwendeten Viren wurden durch Transfektion von HEK293T-Zellen in deren Überstand produziert. Für die Transfektion wird Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNA) des Zielgens benötigt, die im Vorfeld freundlicherweise von Frau Dr. Königshausen zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Zielplasmid diente der Übertragung der genetischen Information des AT1-Rezeptors in die MDCK Zellen. Die Zielplasmide pLEGFP.AT1R und pLEGFP.AT1 Δ 319 wurden freundlicherweise von Dr. Laszlo Hunyady zur Verfügung gestellt. Dem mutierten AT1-Rezeptor Δ 319 fehlt ab AS 319 der cytosolische Anteil des Rezeptors.

Die gesamte Prozedur besteht aus Transfektion, gefolgt von Transduktion und anschließend einer Genitacin Selektion. Für die Transfektion wurden HEK293T Zellen kultiviert. Die HEK-Zellen erhielten DMEM/F-12 Medium mit 10 %igem FCS. Die Zellen wurden mit jeweils 5 ml Medium in T25 Flaschen ausplattiert. Die Zellzahl pro Flasche

betrug 10^6 . Vier bis sechs Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Als nächstes wurde das Transfektionsgemisch hergestellt. Dieses setzt sich wie folgt zusammen:

Gene of Interest	GFP-Kontrolle
5 µg pLEGFP.AT1R bzw. Δ319	5 µg pLEGFP-N1
2 µg pHIT60	2 µg pHIT60
3 µg pHIT-G	3 µg pHIT-G
3 µg Carrier	3 µg Carrier
2 M CaCl	2 M CaCl
H ₂ O	H ₂ O
2 M HBS	2 M HBS

Tabelle 25: Zusammensetzung des Transfektionsgemisches.

Das Plasmid pHIT 60 ist ein CMV gag-pol Expressionsplasmid, welches für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, sowie Protease, reverse Transkriptase und Integrase kodiert. pHIT-G kodiert für das *vesicular stomatitis virus glycoprotein g* (VSV G-Protein), welches als integrales Membranprotein der Viruskapsel für die Fusion mit der Wirtszelle verantwortlich ist. Das Kontrollplasmid pLEGFP-N1 enthält grün fluoreszierendes Protein (GFP), welches am Ende der Prozedur als Kontrolle mikroskopisch dargestellt wird. Das Transfektionsgemisch wurde nach Herstellung bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde es in das Medium der HEK-Zellen dazugegeben. Die Transfektion erfolgte über Nacht. Die Viruspartikel wurden von den HEK-Zellen im Überstand produziert. Am folgenden Tag wurde der Überstand aus den Zellen abpipettiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Bei 1000 rpm wurde das Falcon für zehn Minuten zentrifugiert, sodass sich der Zelldetritus von den Viruspartikeln absetzt. Der Überstand wurde dann durch einen 0,45 µm großen Filter filtriert, in 1 ml Kryotubes aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Für die Transduktion wurden die MDCK Zellen in T25 Flaschen kultiviert. Für eine genaue Beschreibung der

Kultivierung siehe Kapitel 2.2.11. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und jeweils 1 ml Viruspartikel pro T25 Flasche ohne zusätzliches Nährmedium dazugegeben. Nach zwei bis vier Stunden erhielten die Zellen 4 ml Medium. In dieser Konstellation wurden die Zellen zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend folgte das Selektionsprotokoll. Für die Selektion wurde das Antibiotikum Geneticin G418 in einer Dosis von 800 µg/ml eingesetzt. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach 24 Stunden bei gleichbleibender Konzentration des Geneticins. Für die Expansion der MDCK Zellen mit AT1-Rezeptor bzw. D319 wurden diese passagiert. Nach vier Passagen wurde die Konzentration des Geneticins auf eine Erhaltungsdosis von 400 µg pro ml Medium reduziert. Die Transduktions- und Selektionskontrolle erfolgte mikroskopisch. Das Vorhandensein des AT1-Rezeptors bzw. D319 in den MDCK Zellen wurde mittels q-PCR bewiesen und die Funktionalität des AT1-Rezeptors im Western Blot überprüft.

2.2.11 Madin Darby Canine Kidney Zellen in der Zellkultur

Die Kultivierung der MDCK Zellen und Durchführung von Versuchen in der Zellkultur erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse Zwei von Thermo Fisher Scientific. Vor Beginn der Arbeiten mit den Zellen wurden die Arbeitsflächen und Materialien mit 70 %igem Isopropanol gereinigt, um sterile Bedingungen zu gewährleisten. Die verwendeten Nährmedien, ihre Zusätze und Trypsin/EDTA wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Dem Nährmedium wurde vor Erstgebrauch 10 % fetales Kälberserum und 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt. Die Zugabe von Antibiotika sollte eine Kontamination der Zellen mit Bakterien verhindern. Das Supplement FBS enthält Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und Vitamine, die für das Wachstum, den Stoffwechsel und die Proliferation der Zellen essentiell sind.

Die MDCK Zellen wurden zur Proliferation bei 37 °C und 5 % CO₂ in 10 ml Nährmedium in T75 Kulturflaschen kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte bei 90 %iger Konfluenz. Nach Entfernen des alten Mediums und einem Waschschriff der Zellen mit 4 ml EDTA-Puffer wurden die MDCK Zellen mit 4 ml EDTA-Puffer bei 37 °C und 5 % CO₂ für drei bis fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit dem Axiovert 40 CFL Mikroskop mit Phasenkontrast von Zeiss geprüft, ob sich die Zell-Zell-Kontakte gelöst haben. Nach

Absaugen des EDTA-Puffers wurden die Zellen in 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung für circa fünf Minuten inkubiert, bis sich die Zellen durch sanftes Schlagen der Flasche gut vom Boden lösen lassen. Durch Zugabe des Nährmediums wurde die Aktivität des Trypsins beendet. Diese Suspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurde dem Nährmedium 400 µg pro ml Genitacin hinzugegeben. Das nach der Zentrifugation entstandene Pellet enthielt nun die Zellen, der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde nach leichtem Beklopfen des Zentrifugenröhrchens in circa 10 ml Medium aufgelöst und gut vermischt. Für die Verdünnungen von 1:4 bis 1:6 wurde ein Teil der Zellsuspension für die Erhaltungskultur in neue T75 Kulturflaschen überführt und inkubiert. Aus der verbleibenden Suspension wurden Zellen für Versuche ausgesät. Hierfür erfolgte die Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer von Laboroptik, um ein standardisiertes Aussäen einer bestimmten Zellzahl zu gewährleisten. Es wurden 200000 Zellen in 6-Well Zellkulturplatten pro Well in 2 ml Nährmedium ausgesät. Das Nährmedium wurde circa drei Mal pro Woche gewechselt und die Zellen wurden täglich mikroskopiert, um Veränderungen von Wachstum und Morphologie der Zellen frühzeitig zu erkennen.

2.2.12 Versuchsaufbau

Die Zellen wurden für Versuche maximal bis Passage 85 verwendet. Zwölf Stunden vor jedem Versuch wurden die Zellen mit 1 ml Hungermedium versetzt und inkubiert. Das Hungermedium enthielt kein FBS, so dass die Zellen einem Mangel an Wachstumsfaktoren ausgesetzt wurden. Vor Beginn der Versuche wurde das Hungermedium erneuert, um tote Zellen zu entfernen. Exemplarisch für jeden Versuch folgt nun eine Beschreibung des Versuchsaufbaus, siehe dazu Abb. 7. Zunächst wurde in Well A2 und B2-3 der versuchsspezifische Inhibitor pipettiert. Nach einstündiger Inkubation des Inhibitors wurde DMSO in Well A1 dazugegeben. Ang II wurde in DMSO gelöst. Deswegen muss im Sinne einer Negativkontrolle ein Effekt von DMSO auf die Zellen ausgeschlossen werden. Dann wurde 1 µl Ang II in Well A3, B1-3 pipettiert. Die Inkubation mit Ang II erfolgte für sechs Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Zur anschaulicheren Darstellung der Ergebnisse wurde eine doppelt angelegte Ang II

Stimulation und die doppelte Ang II Stimulation plus Inhibitorinkubation in den Western Blot Ergebnissen ausgeschnitten.

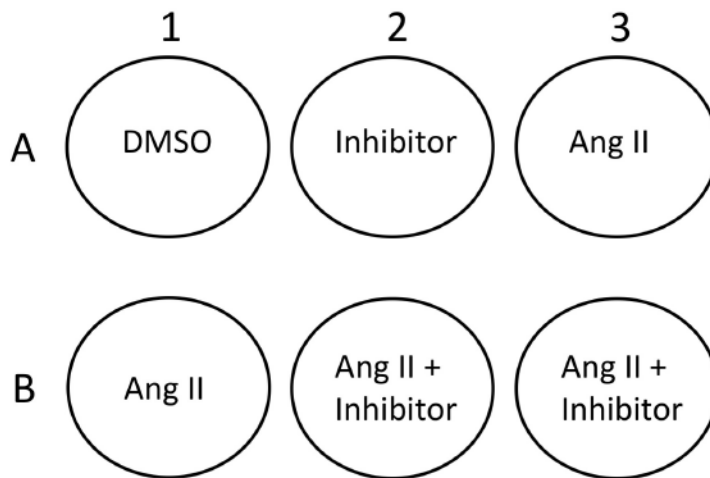


Abb. 7: Schematisch dargestellte 6 Well Platte mit einem Versuchsaufbau. Selbst erstelltes Bild.

2.2.13 Proteinisolation aus MDCK Zellen

Die Proteinisolation aus den MDCK Zellen wurde nach Beendigung eines Stimulationsversuches durchgeführt. Die Stimulation der Zellen wurde durch rasches Entfernen des agenshaltigen Hungermediums gestoppt. Dieser Überstand wurde in separate Reaktionsgefäße überführt und später für die Messung von Prostaglandin E₂ Konzentration mittels ELISA verwendet. Die Wells wurden daraufhin mit 4 °C kaltem PBS gespült und anschließend wurde in alle Vertiefungen der 6-well Platte 2-fach Laemmli-Puffer pipettiert. Nach mechanischer Ablösung der Zellen mit Zellspachteln wurde das Lysat in beschriftete 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt. Die Mikroreaktionsgefäße wurden dann zum Schluss für fünf Minuten im Thermomixer bei 95 °C gekocht und bei -20 °C eingefroren. Die isolierten Proteine konnten anschließend im Western Blot detektiert werden.

2.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) wurden die isolierten Proteine nach Molekülgröße aufgetrennt. Es handelt sich um ein

diskontinuierliches Trennverfahren. Nach standardisiertem Schema wurde ein 10 %iges 0,75 mm oder 1 mm dickes SDS Gel bestehend aus Trenn- und Sammelgel gegossen. Diese Gele unterscheiden sich in pH-Wert und Porengröße. Für die Herstellung der Gele wurde ein Gelgießgestell mit jeweils einer Glasplatte und einer Spacerplatte verwendet. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel ist der Tabelle 17 zu entnehmen. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten möglichst frei von Luftblasen pipettiert und mit 100 %igem Isopropanol überschichtet, um die Oberfläche zu glätten und um eine sauerstofffreie Polymerisation zu gewährleisten. Die Polymerisation des Gels dauerte circa 20 Minuten, währenddessen wurde das Sammelgel gefertigt. Das Isopropanol wurde abgegossen, der Zwischenraum mit Aqua dest gespült und mit Filterpapier getrocknet. Dann wurde das Sammelgel bis zum Rand der Glasplatte pipettiert und die Kämme (10 well oder 15 well) unter Vermeidung von Luftblasen bis zum vollständigen Versinken der Zähnchen reingedrückt. Das fertige Gel wurde schließlich mit den Glasplatten in die Elektrophoresekammer gespannt. Die Kammer wurde dann mit Laufpuffer aufgefüllt. Als letztes wurden die Kämme gezogen. Für die Entfernung von Kondenswasser und Schaum wurden die Proben kurzzeitig zentrifugiert. Pro Gel wurde zunächst in die erste Tasche 10 µl Proteingrößenmarker befüllt, anschließend erfolgte nach Durchmischen der Probe die Zugabe von je 15 µl der Proben in die restlichen Taschen des Sammelgels. Für das Sammeln des Lysats wurde eine konstante Spannung von 70 Volt für 30 Minuten angelegt, die Trennung nach Größe der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel für eine Stunde und 30 Minuten (Laemmli 1970).

2.2.15 Western Blot

Um die aufgetrennten Proteine dauerhaft auf einer Nitrocellulosemembran zu fixieren, wurde ein Western Blot nach dem Tank Blot Verfahren durchgeführt (Towbin, Staehelin et al. 1979). Die Plastikschwämme, das Blottingpapier, die Nitrocellulosemembran und das Trenngel wurden zunächst in Transferpuffer getränkt. Nach ausreichender Tränkung wird die Gelhalterkassette wie folgt zusammengebaut.



Abb. 8: Prinzip des Tank Blot Verfahrens. Auf in Methanol getränktes Plastischwämmchen und Blottingpapier wird das SDS-Gel gelegt, darauf wird mittig die Nitrocellulosemembran getan und von Blottingpapier und Plastischwämmen bedeckt. Die Proteine werden nun durch Anlage einer äußeren Spannung auf die Membran übertragen. Abbildung selbst erstellt.

Die zusammengebaute Kassette wurde dann mit einem Eisblock in die Blotkammer gesetzt, welche dann mit Transferpuffer aufgefüllt wird. Durch Anlage einer Spannung von 200 mA für zwei Stunden wurden die Proteine vom SDS-Gel auf die Membran transferiert. Nach diesem Vorgang wurde die Membran in 5 %igem Magermilchpulver für eine Stunde bei 37 °C auf dem Shaker geblockt. Freie Bindungsstellen wurden dadurch gesättigt, so dass unspezifische Antikörperreaktionen verhindert werden konnten. Daraufhin wurde die Membran nach kurzem Durchziehen durch Proteinwaschpuffer im jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nun wurde die Membran drei Mal fünf Minuten in Proteinwaschpuffer gewaschen. Dann folgte die Inkubation in Sekundärantikörper, der mit Horseradish Peroxidase (HRP) markiert ist, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Färbung mit anti- β -Aktin sowie die Inkubation im anti-Maus Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Laborschüttler. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die Membran mit der ECL Lösung beschichtet und in den Imager FluorChem FC2 gelegt, um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen. Die Horseradish Peroxidase des Sekundärantikörpers diente der Oxidation des Luminols der ECL Lösung, wodurch sichtbare Chemilumineszenz entstand und durch die CCD-Kamera aufgenommen werden konnte. Die COX-2 gefärbte Membran wurde für jeweils eine, zwei und fünf Minuten entwickelt, Aktin gefärbte Membranen wurden wegen des starken Signals nur eine Minute und 30 Sekunden gemessen.

2.2.16 Auswertung der Ergebnisse

Die densitometrische Messung der Western Blot Banden erfolgte mit AlphaEase FC Version 6.0.0. Für die Quantifizierung der Ergebnisse wurde der Quotient aus der COX-2- und β -Aktin-Untersuchung gebildet. Dieser Quotient wurde auf die Negativkontrolle normalisiert. Die Negativkontrolle erhielt die Einheit Eins. Die Anzahl der Experimente pro Versuch wurde mit n aufgeführt. Dabei wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse sind als normalisierte Expressions-Ratios in Form von Diagrammen mit GraphPad Prism 5 dargestellt. Dabei wurden die Ergebnisse als Mittelwert mit Standardfehler ($\pm$ Standard Error of Mean, SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben. Signifikante Unterschiede bestanden bei $p \leq 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Angiotensin II Infusion führt zu Prostaglandinausschüttung im Urin der Maus

Um einen möglichen Einfluss einer chronischen Ang II Behandlung auf die Prostaglandinproduktion in der Niere zu untersuchen, wurde der 24 Stunden Sammelurin von Mäusen verglichen. Zum Zeitpunkt des Versuchsstartes wurde die basale Prostaglandinkonzentration im Urin gemessen. Daraufhin erfolgte eine zweiwöchige Ang II Infusion mit erneuter Bestimmung der Prostaglandinkonzentration. Wie in Abb. 9 dargestellt, sind zum ersten Zeitpunkt der Messung sehr niedrige Konzentrationen von Prostaglandin E₂ zu finden. Nach der zweiwöchigen Ang II Infusion weisen die Mäuse eine signifikant hohe Prostaglandin E₂ Konzentration im 24 Stunden Sammelurin auf.

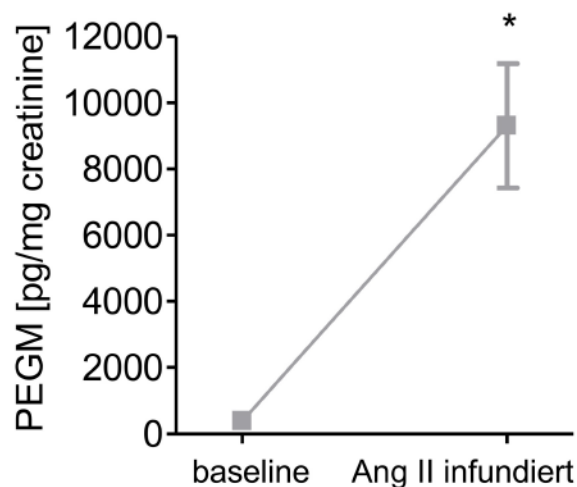


Abb.9: Prostaglandinkonzentration in pg/mg im 24 Stunden Sammelurin von Mäusen. Gemessen wurde zum Zeitpunkt null und nach zweiwöchiger Angiotensin II Infusion, wonach eine signifikant hohe Prostaglandin E₂ Konzentration zu messen ist (Baseline MW 387,13 ± 25,73 SEM, Ang II infundiert MW 9303 ± 1881 SEM). Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (*: $p \leq 0,05$). Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=11

3.2 Angiotensin II bewirkt erhöhte COX-2 mRNA in der *Medulla*

Das vasodilatatorisch wirksame Prostaglandin E_2 entsteht primär aus der Arachidonsäure und wird durch COX-2 generiert. Nachdem der Nachweis von Prostaglandinen im Sammelurin von Ang II behandelten Mäusen erfolgt war, wurde als nächstes untersucht, ob im Nierengewebe COX-2 RNA in erhöhten Mengen vorhanden ist. Daher wurde im folgenden Versuch RNA aus dem renalen *Cortex* und der renalen *Medulla* der Mäuse isoliert und untersucht. In dem *Cortex* ist wie in der folgenden Abbildung dargestellt bei Mäusen sowohl ohne vorangegangene Behandlung als auch nach zweiwöchiger Ang II Infusion kaum messbare COX-2 RNA zu finden.

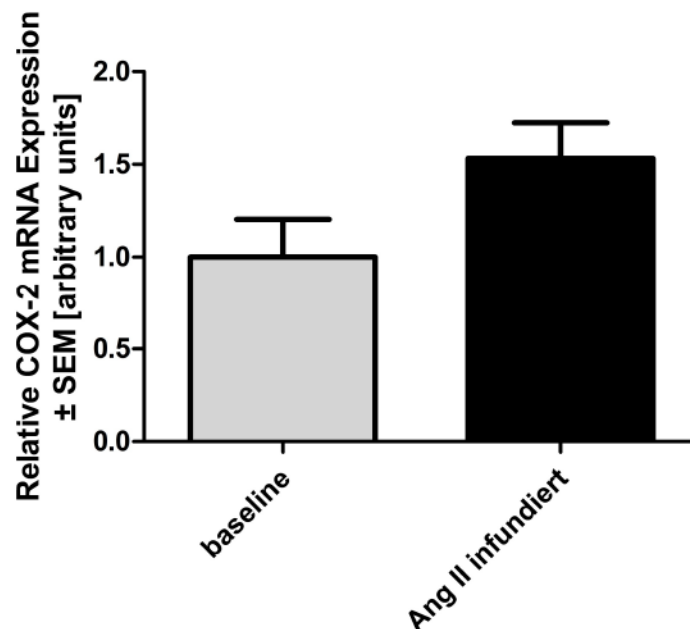


Abb. 10: COX-2 mRNA aus renalem Cortex in unbehandelten und Ang II behandelten Mäusen. Dargestellt ist die relative COX-2 mRNA Expression, welche ohne Ang II und mit Ang II im *Cortex* nicht signifikant nachweisbar ist (Baseline MW $1 \pm 0,2$ SEM, Ang II infundiert MW $1,53 \pm 0,3$ SEM). Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben. Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=4$

In der *Medulla* hingegen liegen bei den Ang II infundierten Mäusen signifikant hohe COX-2 RNA Level vor. Unbehandelt kann man auch in der *Medulla* kaum COX-2 RNA messen.

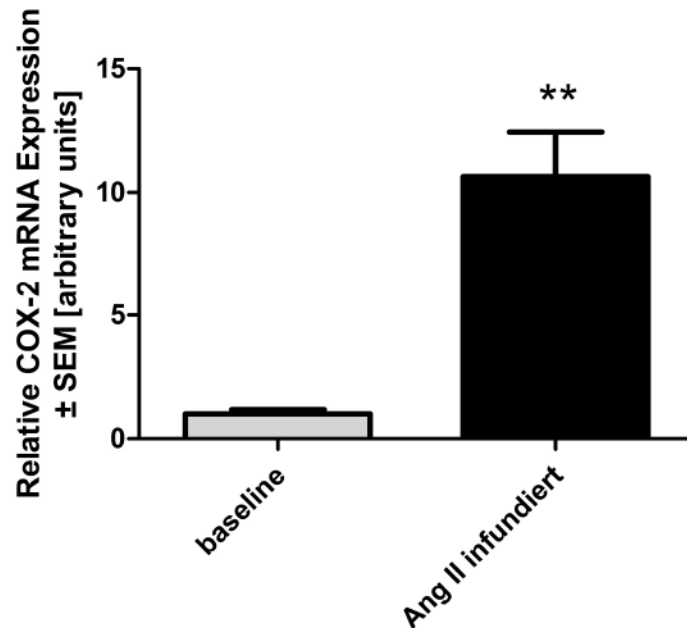


Abb. 11: COX-2 mRNA aus renaler Medulla in unbehandelten und Ang II behandelten Mäusen. Dargestellt ist die relative COX-2 mRNA Expression, welche in Ang II behandelter *Medulla* signifikant erhöht ist (Baseline $1 \pm 0,16$ SEM, Ang II infundiert $10,65 \pm 1,8$ SEM). Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (**: $p \leq 0,01$). Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=10$

3.3 Immunhistochemischer Nachweis von COX-2 in renalen Zwischenzellen

Um herauszufinden, wo genau COX-2 in der *Medulla* exprimiert wird, führten wir eine Immunhistochemie aus Mausnieren durch. Nierenschnitte der unbehandelten und der mit Ang II behandelten Mäuse wurden mit Antikörpern gegen COX-2 und mit Antikörpern gegen Zwischen- und Hauptzellen des Sammelrohres gefärbt. Die v-ATPase stellt einen spezifischen Marker für Zwischenzellen dar. AQP2 dient als Marker für die Hauptzellen. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich COX-2 mit den Bereichen, die mit v-ATPase gefärbt wurden, in Ang II behandelten Mäusen deckt, so dass angenommen werden kann, dass COX-2 in den Zwischenzellen vorkommt (Stegbauer, Chen et al. 2017). Bei den unbehandelten Mäusen war in der Mikroskopie kein COX-2 sichtbar.

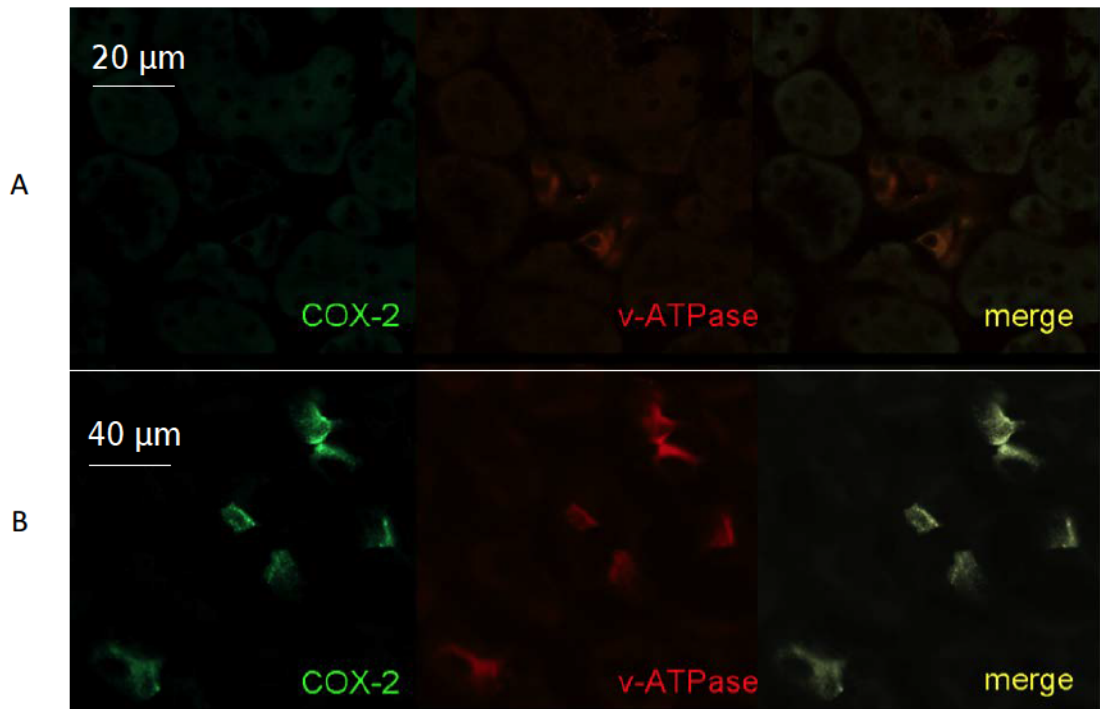


Abb. 12: Repräsentative Aufnahmen der Immunhistochemie von COX-2 in renalen Zwischenzellen der *Medulla* in unbehandelten und Ang II behandelten Mäusen mittels konfokaler Mikroskopie. A: Kein COX-2 Nachweis in Zwischenzellen von unbehandelten Mäusen. B: Nachweis von COX-2 in Ang II behandelten Mäusen, Co-Lokalisation von COX-2 mit v-ATPase als Marker für Zwischenzellen. Aufnahmen mit konfokalem Lasermikroskop von Zeiss LSM 510, Bild A in 20-facher Vergrößerung, Bild B in 40-facher Vergrößerung. Eigene Darstellung publiziert in (Stegbauer, Chen et al. 2017).

Bei der Färbung der Schnitte mit AQP2, dem Marker für Hauptzellen, zeigte sich keine Übereinstimmung mit COX-2 in der konfokalen Mikroskopie.

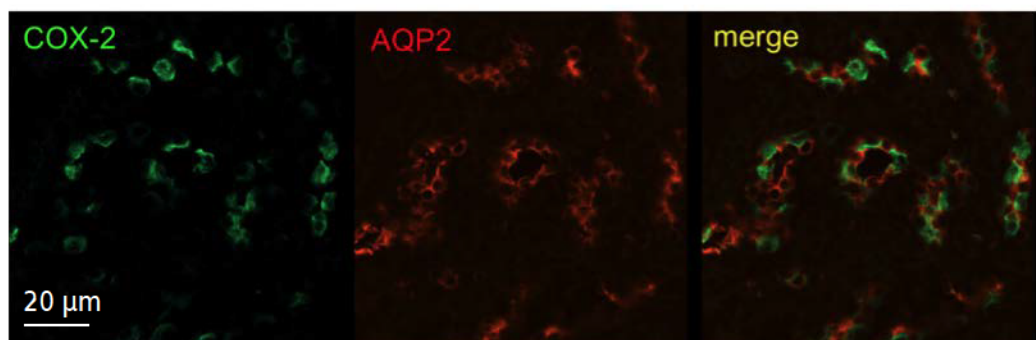


Abb. 13: Repräsentative Aufnahme der Immunhistochemie von COX-2 in renalen Hauptzellen der *Medulla* in Ang II behandelten Mäusen mittels konfokaler Mikroskopie. Keine Co-Lokalisation von COX-2 mit AQP2 als Marker für Hauptzellen. Aufnahmen mit konfokalem Lasermikroskop von Zeiss LSM 510 in 20-facher Vergrößerung.

3.4 Angiotensin II stimuliert die COX-2 Expression in MDCK AT1 Zellen

Nachdem das Vorkommen von COX-2 in renalen Zwischenzellen der Maus gezeigt werden konnte, sollte nun in Zellkultur der genaue Mechanismus, wie Ang II eine COX-2 Bildung induziert, untersucht werden. Die Experimente wurden mit den MDCK AT1 Zellen durchgeführt.

Als erstes führten wir eine Zeitkinetik durch, um herauszufinden, welche Zeitdauer die optimale Stimulationszeit der Zellen mit Ang II darstellt. Hierbei zeigte sich, dass nach einer Stimulationsdauer von sechs Stunden eine signifikant hohe COX-2 Expression im Western Blot zu sehen war. Bei der densitometrischen Auswertung, wie in Abb. 14 dargestellt, ergab die sechsstündige Stimulation ein signifikant hohes COX-2 Signal (MW $6,38 \pm 0,84$ SEM) im Vergleich zur Negativkontrolle (Einheit 1). Bei Stimulationen, die zwölf (MW $1,9 \pm 1,08$ SEM) und 24 Stunden (MW $1,14 \pm 0,37$ SEM) lang dauerten, war das COX-2 Signal schwach signifikant ausgeprägt (Stegbauer, Chen et al. 2017). Deswegen wurde aufgrund dieses Ergebnisses die Stimulationszeit mit Ang II bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ auf sechs Stunden festgelegt.

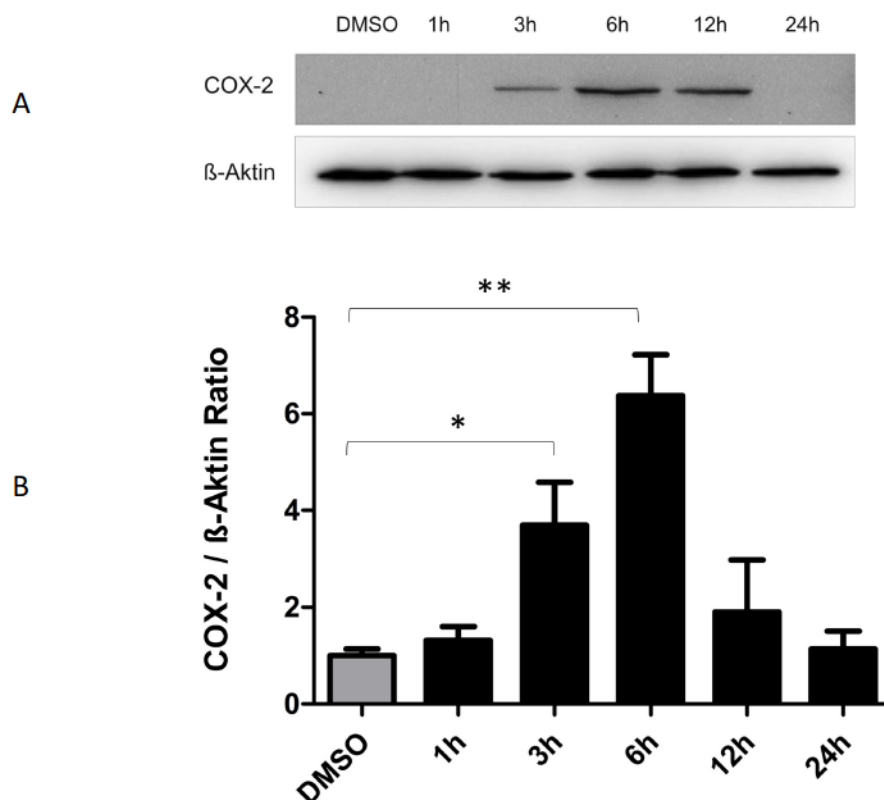


Abb. 14: Zeitkinetik der Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 AT1-Rez. Zellen nach zeitabhängiger Stimulation mit 1 µg/ml Angiotensin II. Ang II stimuliert zeitabhängig die COX-2 Expression in MDCK AT1-Rez. Zellen (DMSO MW $1 \pm 0,13$ SEM, 1 h MW $1,32 \pm 0,29$ SEM, 3 h MW $3,7 \pm 0,9$ SEM, 6 h MW $6,38 \pm 0,84$ SEM, 12 h MW $1,9 \pm 1,08$ SEM, 24 h MW $1,14 \pm 0,37$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β -Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/ β -Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (**: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrolle), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=3. Eigene Darstellung publiziert in (Stegbauer, Chen et al. 2017)

3.5 Angiotensin II Signaltransduktion

3.5.1 Angiotensin II aktiviert den G-Protein gekoppelten Signalweg

Ein klassischer Aktivierungsweg des AT1-Rezeptors erfolgt über den G-Protein abhängigen Signalweg. Nach Bindung von Ang II an den AT1-Rezeptor werden G-Proteine aktiviert. Hiernach folgt die Aktivierung der Phospholipase C mit Produktion der *Second Messenger* IP_3 und DAG und Phosphorylierung von PKC. Im folgenden Versuch setzten wir einen PKC Inhibitor (Calphostin C) in einer Endkonzentration von 1 µM ein, um rückwirkend zu überprüfen, ob dieser Signalweg inhibierbar ist. Bei der Western Blot Analyse zeigte sich, dass eine alleinige Ang II Stimulation eine deutlich signifikant erhöhte COX-2 Exprimierung (MW $2,69 \pm 0,15$ SEM) bewirkte. Durch den Einsatz von Calphostin C konnte die COX-2 Freisetzung stark signifikant inhibiert werden. Hier lag der Mittelwert bei $1,17 \pm 0,27$ SEM. Die deutlich inhibierte COX-2 Expression war im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO nicht signifikant verschieden.

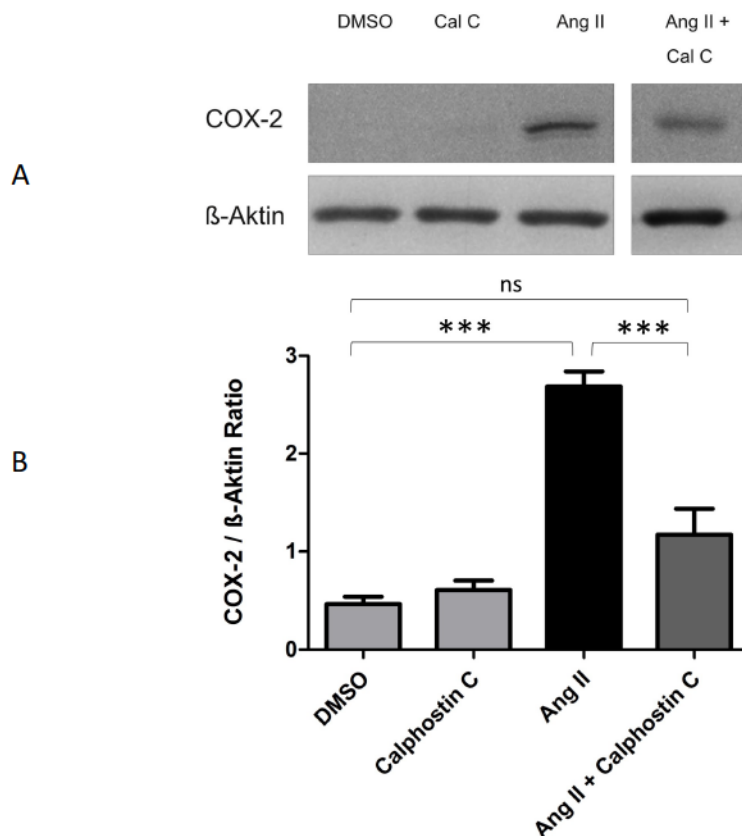


Abb. 15: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 AT1-Rez. Zellen nach sechsständiger Stimulation mit 1µg/ml Angiotensin II und einstündiger Vorinkubation mit 1µM Calphostin C. Calphostin C inhibiert die Ang II induzierte COX-2 Expression signifikant (DMSO MW $1 \pm 0,54$ SEM, Calphostin C MW $0,74 \pm 0,56$ SEM, Ang II MW $2,69 \pm 0,15$ SEM, Ang II + Calphostin C MW $1,17 \pm 0,27$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β-Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/β-Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$; ns: nicht signifikant, $p = 0,11$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=6

3.5.2 Angiotensin II aktiviert Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen)

3.5.3 P38-MAP-Kinase

Wie bereits in der Einleitung erläutert (siehe 1.2), aktiviert Ang II über den AT1-Rezeptor auch MAP-Kinasen. Um dies zu prüfen, wurden zunächst Phosphorylierungsversuche mit der MAP-Kinase p38 durchgeführt. In einer zeitabhängigen Ang II Stimulation der MDCK Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten zeigte sich im Western Blot, dass die MAP-Kinase p38 bereits nach fünfminütiger Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant phosphoryliert wurde (MW $3,37 \pm 0,25$ SEM). Je länger die Stimulation der Zellen andauerte, desto schwächer signifikant wurde das Phosphorylierungssignal. Der MW der zehn Minuten lang stimulierten Zellen lag bei $3,04 \pm 0,12$ SEM, 15 Minuten

Stimulation ergab einen MW von $2,56 \pm 0,21$ SEM und eine 30-minütige Ang II Stimulation einen MW von $1,67 \pm 0,05$ SEM. Die Ang II Stimulation der MDCK Zellen führte also zu einer Aktivierung der p38-Signaltransduktion.

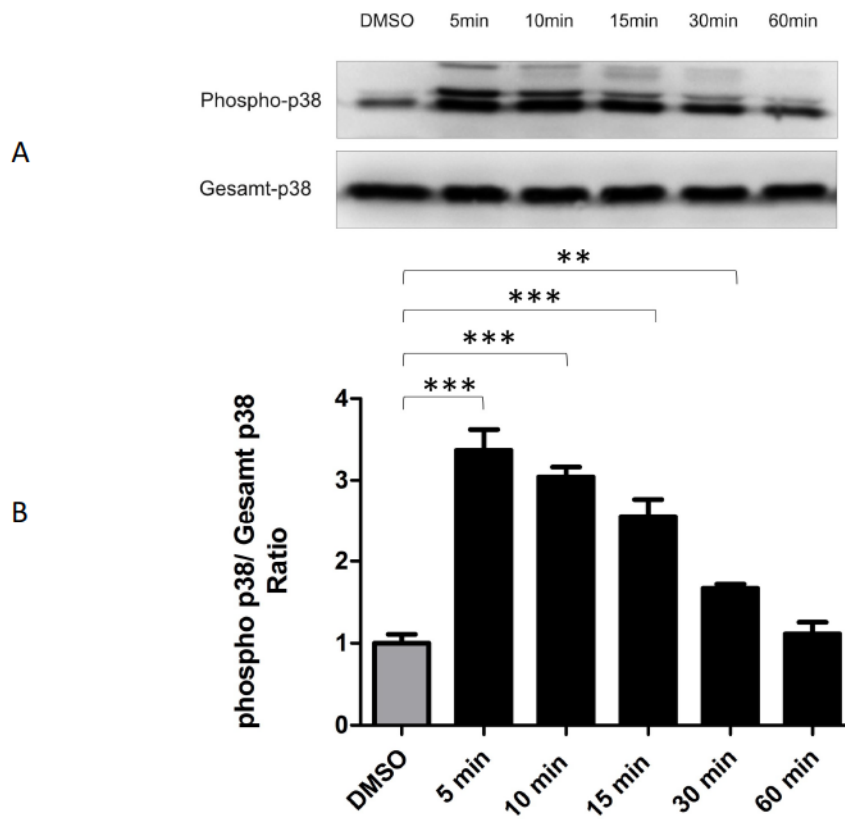


Abb. 16: P38 Phosphorylierung in MDCK C11 AT1-Rez. Zellen nach zeitabhängiger Stimulation mit $1\mu\text{g/ml}$ Angiotensin II. Ang II Stimulation phosphoryliert die MAP Kinase p38 (DMSO $1 \pm 0,11$ SEM, 5 min MW $3,37 \pm 0,25$ SEM, 10 min MW $3,04 \pm 0,12$ SEM, 15 min MW $2,56 \pm 0,21$ SEM, 30 min MW $1,67 \pm 0,05$ SEM, 60 min MW $1,11 \pm 0,14$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: Phospho-p38, zweite Reihe: Gesamt-p38. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die Phospho-p38/Gesamt-p38-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=4$

Nachdem die Aktivierung der MAP-Kinase p38 gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Versuch der p38 Signalweg inhibiert. Hierfür setzen wir einen selektiven p38 Inhibitor (SB 202190) in einer Endkonzentration von $10\mu\text{M}$ ein. Im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO kam es durch alleinige Ang II Stimulation zu einer deutlich signifikanten Steigerung der COX-2 Expression (MW $5,83 \pm 0,67$). Bei einstündiger Vorinkubation mit dem p38 Inhibitor SB 202190 wurde die COX-2 Expression stark

signifikant inhibiert ($MW\ 2,04 \pm 0,32\ SEM$). Das COX-2 Signal mit p38 Inhibition ist im Vergleich zur Negativkontrolle dennoch leicht signifikant erhöht.

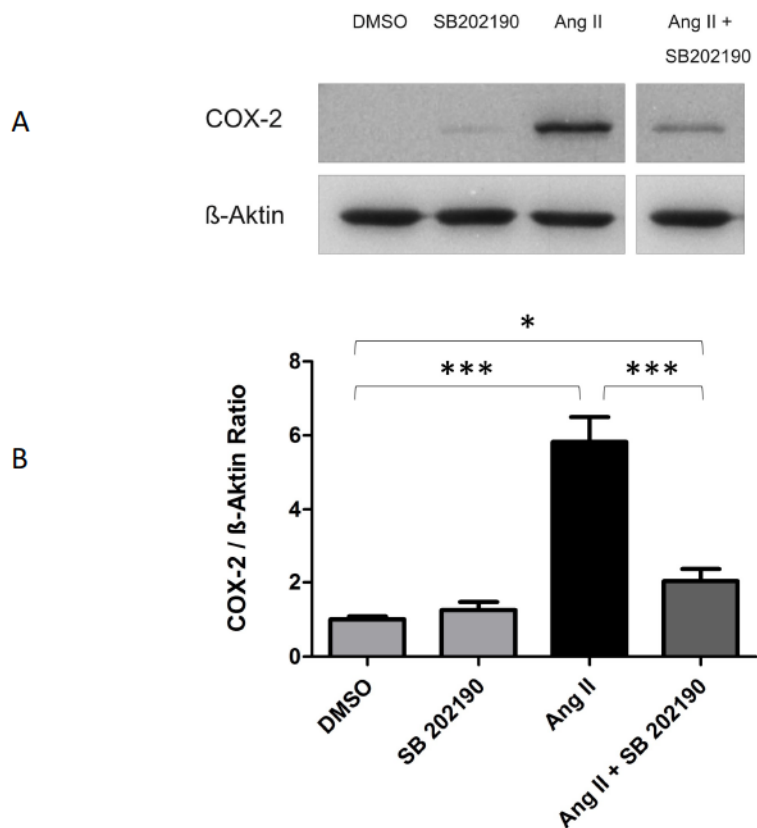


Abb. 17: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 AT1-Rez. Zellen nach sechsständiger Stimulation mit $1\mu g/ml$ Angiotensin II und einstündiger Vorinkubation mit $10\mu M$ SB 202190. SB 202190 inhibiert stark signifikant die Ang II induzierte COX-2 Expression (DMSO $MW\ 1 \pm 0,1\ SEM$, SB 202190 $MW\ 1,25 \pm 0,24\ SEM$, Ang II $MW\ 5,83 \pm 0,67\ SEM$, Ang II + SB 202190 $MW\ 2,04 \pm 0,32\ SEM$). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β-Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/β-Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$; *: $p \leq 0,05$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=5$

3.5.4 Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK)

Extracellular-signal Regulated Kinasen (ERK) gehören ebenfalls zu den MAP-Kinasen und sind in der Angiotensin II Signalkaskade Teil der G-Protein unabhängigen Aktivierung. ERK wird über die Proteinkinasen MEK 1 und MEK 2 phosphoryliert. Um die Aktivität von ERK zu überprüfen, wurde ein zeitabhängiger Phosphorylierungsversuch durchgeführt. Nach fünfminütiger Stimulation mit Ang II zeigte sich bereits eine signifikante Phosphorylierung von ERK ($MW\ 2,58 \pm 0,13\ SEM$) im Vergleich zu Negativkontrolle. Bei

längerer Stimulationsdauer konnte keine Steigerung des Aktivitätsniveaus, hingegen eher eine abnehmende Aktivität gesehen werden. Eine zehnminütige Stimulation ergab einen MW von $2,13 \pm 0,16$ SEM, 15 Minuten einen MW von $1,77 \pm 0,14$ SEM und 30 Minuten einen MW von $1,41 \pm 0,07$ SEM.

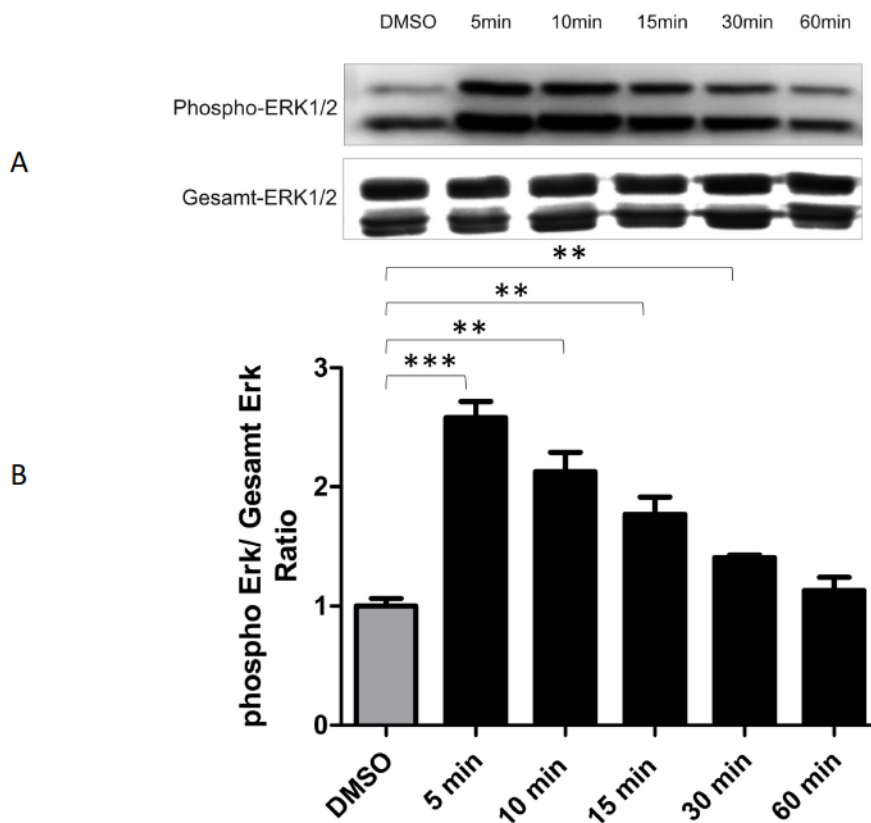


Abb. 18: ERK1/2 Phosphorylierung in MDCK C11 AT1-Rez. Zellen nach zeitabhängiger Stimulation mit $1\mu\text{g/ml}$ Angiotensin II. Ang II phosphoryliert ERK (DMSO MW $1 \pm 0,1$ SEM, 5 min MW $2,58 \pm 0,13$ SEM, 10 min MW $2,13 \pm 0,16$ SEM, 15 min MW $1,77 \pm 0,14$ SEM, 30 min MW $1,41 \pm 0,07$ SEM, 60 min MW $1,13 \pm 0,11$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: Phospho-Erk1/2, zweite Reihe: Gesamt-ERK1/2. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die Phospho-ERK1/2/Gesamt-ERK1/2-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=3$

Um herauszufinden, ob sich die p42/44 Signalkaskade ebenfalls inhibieren lässt, setzten wir nun einen spezifischen MEK-Inhibitor (PD 98059) in einer Endkonzentration von $50\mu\text{M}$ ein, so dass ERK nicht phosphoryliert werden kann. Die alleinige Ang II Stimulation bewirkte im Gegensatz zur Negativkontrolle mit DMSO und dem Inhibitor eine signifikante Erhöhung der COX-2 Expression (MW $3,25 \pm 0,29$ SEM). Bei Vorinkubation

mit PD 98059 und nachfolgender Ang II Stimulation zeigte sich wider Erwarten eine Steigerung der COX-2 Antwort (MW $7,18 \pm 0,36$ SEM) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Ang II. Die signifikante Erhöhung bestand sowohl im Vergleich zur Negativkontrolle als auch im Vergleich zur alleinigen Ang II Stimulation.

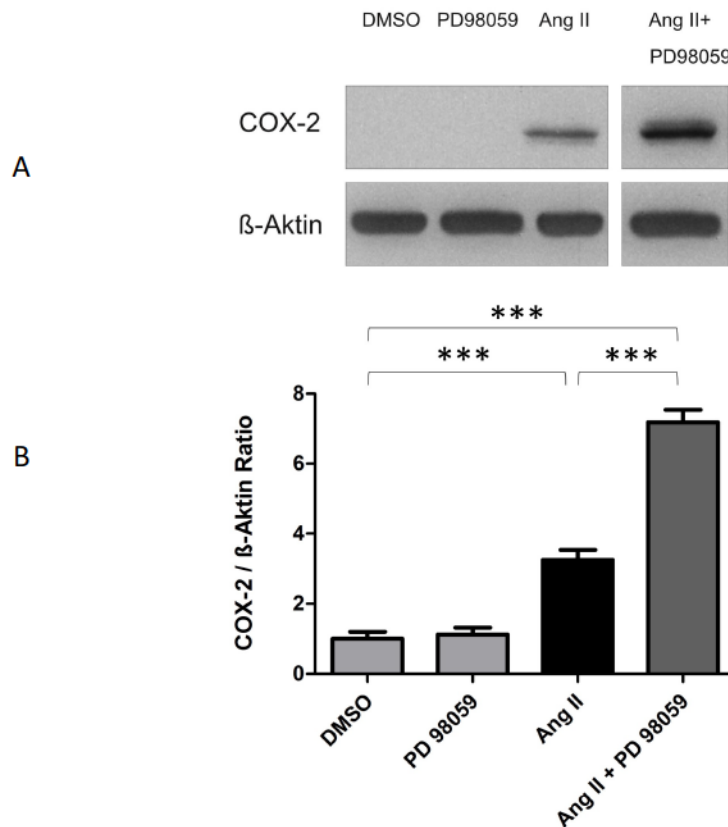


Abb. 19: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 AT1-Rez. Zellen nach sechsstündiger Stimulation mit $1\mu\text{g/ml}$ Angiotensin II und einstündiger Vorinkubation mit $50\mu\text{M}$ PD 98059. ERK Inhibition führt zu einer erhöhten COX-2 Expression (DMSO MW $1 \pm 0,2$ SEM, PD 98059 MW $1,13 \pm 0,19$ SEM, Ang II MW $3,25 \pm 0,29$ SEM, Ang II + PD 98059 MW $7,18 \pm 0,36$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β-Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/β-Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=8

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welcher Signalweg den stärkeren Einfluss auf die COX-2 Expression ausübt. Daher wurden die Zellen simultan mit SB 202190 und PD 98059 vorinkubiert. Hierbei zeigte sich, dass die COX-2 Expression bei der gleichzeitigen Inhibition von p38 und MEK (MW $1,4 \pm 0,26$ SEM) im Vergleich zur alleinigen Stimulation

(MW $3,87 \pm 0,42$ SEM) deutlich signifikant gesenkt wurde. Das COX-2 Signal der inhibierten Zellen war im Vergleich zu DMSO nicht signifikant erhöht.

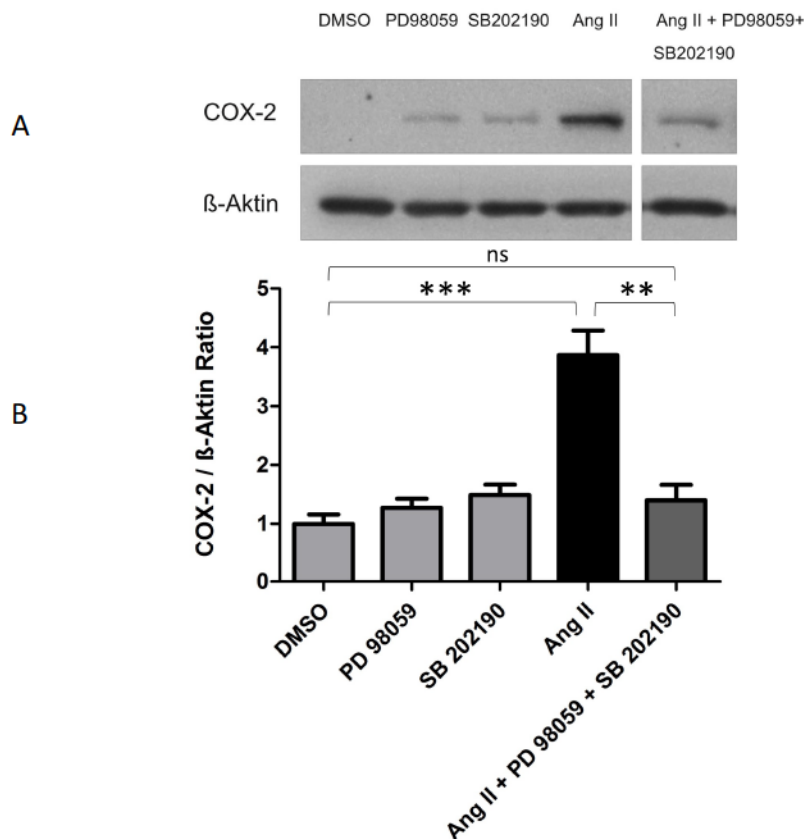


Abb. 20: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 AT1-Rez. Zellen nach sechsständiger Stimulation mit $1\mu\text{g/ml}$ Angiotensin II und einstündiger Vorinkubation mit $50\mu\text{M}$ PD 98059 und $10\mu\text{M}$ SB 202190. Simultane Inhibition von ERK und p38 führt zur signifikanten Inhibition der Ang II induzierten COX-2 Expression (DMSO MW $1 \pm 0,16$ SEM, PD 98059 MW $1,27 \pm 0,15$ SEM, SB 202190 MW $1,5 \pm 0,18$ SEM, Ang II MW $3,87 \pm 0,42$ SEM, Ang II + PD 98059 + SB 202190 MW $1,4 \pm 0,26$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β-Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/β-Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$; ns: nicht signifikant, $p = 0,25$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=4$

3.5.5 Zusammenhang zwischen Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Angiotensin II und COX-2

Im nächsten Versuch wurde Apocynin, ein NADPH Oxidase Inhibitor, eingesetzt. Hier zeigte sich bei Vorinkubation der Zellen mit 100 mmol Apocynin für zwölf Stunden eine schwach signifikante Reduktion der COX-2 Expression im Western Blot (MW $2,27 \pm 0,12$ SEM) im Vergleich zur alleinigen Ang II Stimulation (MW $3 \pm 0,15$ SEM). Die COX-2

Exprimierung bei Vorinkubation mit Apocynin war jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht.

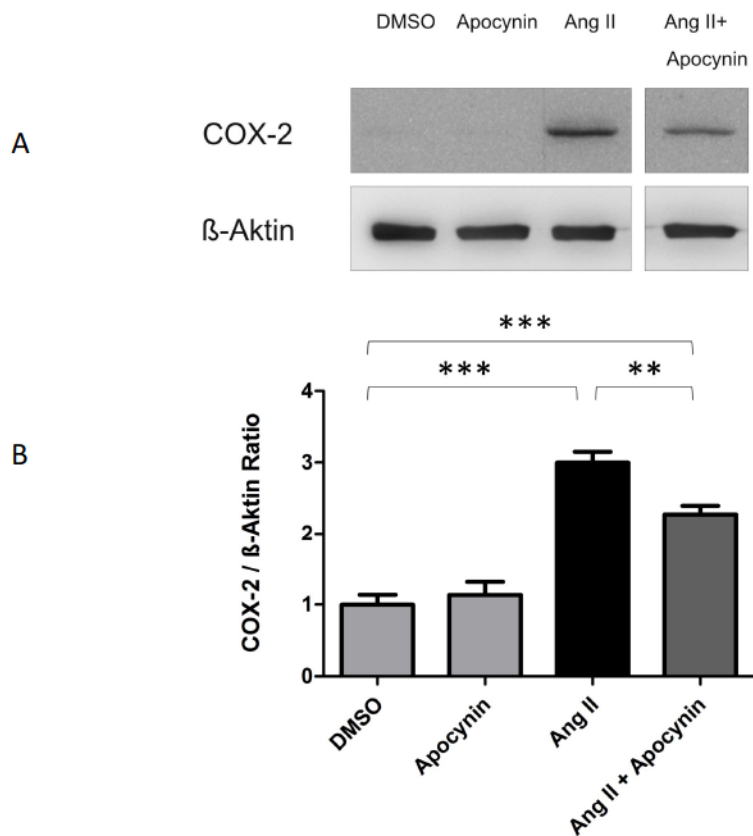


Abb. 21: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 AT1-Rez. Zellen nach sechsständiger Stimulation mit 1 µg/ml Angiotensin II und zwölfständiger Vorinkubation mit 100 mM Apocynin. Apocynin hemmt signifikant die Ang II induzierte COX-2 Expression (DMSO MW $1 \pm 0,14$ SEM, Apocynin MW $1,14 \pm 0,18$ SEM, Ang II MW $3 \pm 0,15$ SEM, Ang II + Apocynin MW $2,27 \pm 0,12$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β-Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/β-Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=6

3.6 Prostaglandinkonzentrationen der Stimulationsversuche

Nachdem mithilfe des Western Blots der Enzymnachweis der Stimulationsversuche gelungen ist, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob durch das nachgewiesene Enzym ein Produkt entsteht. Die COX-2 ist das entscheidende Enzym der Prostaglandinsynthese.

Die Prostaglandinkonzentrationen wurden aus dem Überstand der Zellen nach einem Stimulationsversuch mit einem Prostaglandin E₂ Kit von Cayman gemessen.

3.6.1 Angiotensin II bewirkt Prostaglandinproduktion in MDCK Zellen

Zunächst wurden die Überstände aus den zeitabhängigen Stimulationen mit Ang II untersucht, um zu überprüfen, ob eine Produktion der Prostaglandine durch die Cyclooxygenase 2 überhaupt stattfindet. Wie in Abb. 22 dargestellt, ist zu beobachten, dass im Überstand der nicht stimulierten Zellen kaum Prostaglandin produziert wird (MW $259,6 \pm 112,5$ SEM). Eine sechsstündige Ang II Inkubation bewirkt analog zur Zeitkinetik eine signifikant hohe Prostaglandinkonzentration (MW $4193 \pm 314,5$ SEM). Zwölf Stunden lang stimulierte Zellen führten ebenfalls zu einer hohen Prostaglandinproduktion (MW $4599 \pm 587,2$ SEM), genau wie die 24 Stunden lang stimulierten Zellen (MW $4573 \pm 87,53$ SEM) (Stegbauer, Chen et al. 2017).

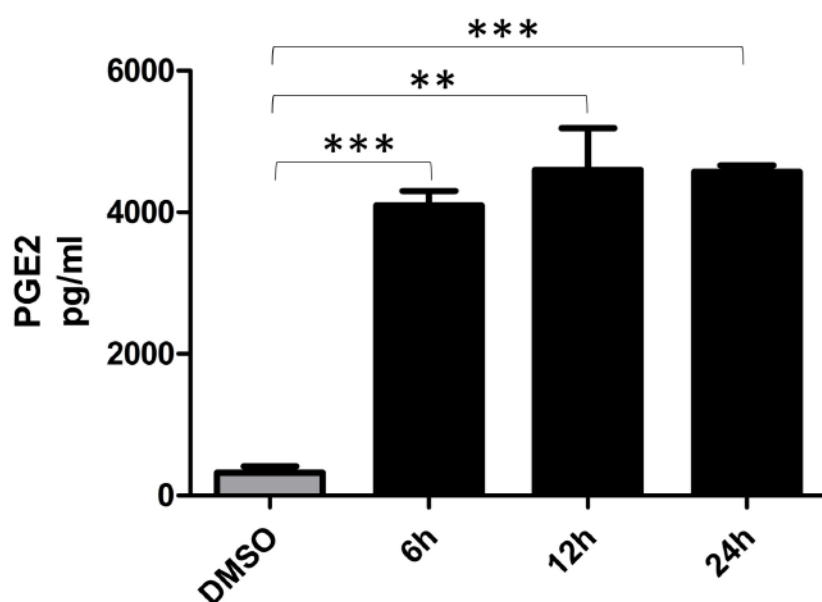


Abb. 22: Prostaglandinkonzentration in pg/ml der Angiotensin II abhängigen Zeitkinetik, gemessen in Zellüberständen der MDCK C11 AT1-Rez. Zellen. Ang II Stimulation führt zu signifikant erhöhten Prostaglandin E₂ Konzentrationen im Zellmedium (DMSO MW $259,6 \pm 112,5$ SEM, 6 h MW $4193 \pm 314,5$ SEM, 12 h MW $4599 \pm 587,2$ SEM, 24 h MW $4573 \pm 87,53$ SEM). Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=3. Eigene Darstellung publiziert in (Stegbauer, Chen et al. 2017)

3.6.2 Prostaglandinproduktion wird durch Calphostin C inhibiert

Als nächstes wurden die Überstände aus den PKC Inhibitionsversuchen untersucht. Die Negativkontrolle DMSO ergab kaum Freisetzung von Prostaglandinen ($MW\ 240,8 \pm 42,48\ SEM$). Die Ang II Stimulation bewirkte eine signifikant hohe Ausschüttung von $4213\ pg/ml$ Prostaglandinen $\pm 341,7\ SEM$. Die Stimulation mit PKC Inhibition ergab eine signifikant reduzierte Prostaglandinausschüttung ($MW\ 2100 \pm 295,3\ SEM$). Siehe dazu Abb. 23.

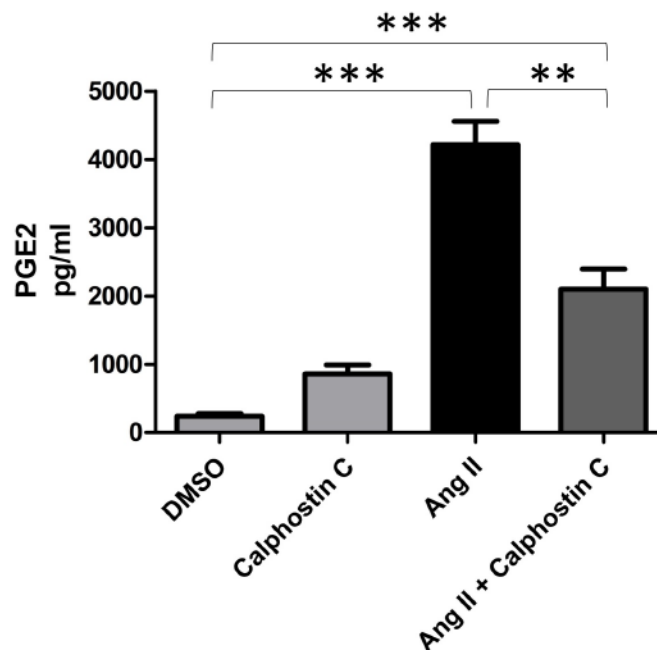


Abb. 23: Prostaglandinkonzentration in pg/ml der PKC Inhibitionsversuche, gemessen in Zellüberständen der MDCK C11 AT1-Rez. Zellen. Die mit Calphostin C inhibierten Zellen weisen signifikant erniedrigte Prostaglandin E₂ Konzentrationen auf (DMSO $MW\ 240,8 \pm 42,48\ SEM$, Calphostin C $MW\ 859,5 \pm 129\ SEM$, Ang II $MW\ 4213 \pm 341,7\ SEM$, Ang II + Calphostin C $MW\ 2100 \pm 295,3\ SEM$). Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=4$

3.6.3 Prostaglandinproduktion wird durch SB 202190 inhibiert

Als nächstes wurde die Prostaglandinkonzentration aus den p38 Inhibitionsversuchen gemessen. Hier ergaben die beiden Negativkontrollen aus DMSO und dem p38 Inhibitor keine erhöht messbaren Prostaglandinkonzentrationen. Im Überstand der Ang II stimulierten Zellen konnte im Vergleich zur Negativkontrolle ($MW\ 445,8 \pm 41,26\ SEM$) signifikant erhöhte Konzentration von Prostaglandin E₂ gemessen werden ($MW\ 8383 \pm 2091\ SEM$). In dem Überstand mit p38 Inhibition und Ang II Stimulation konnte durch

die Inhibition die Prostaglandinkonzentration stark signifikant reduziert werden. Der Mittelwert liegt hier bei $746,7 \pm 183,2$ SEM. Es bestand im Vergleich zur Negativkontrolle kein signifikanter Unterschied. Das Ergebnis der Prostaglandinkonzentration im ELISA (siehe Abb. 24) deckt sich demnach mit dem Ergebnis des Western Blots.

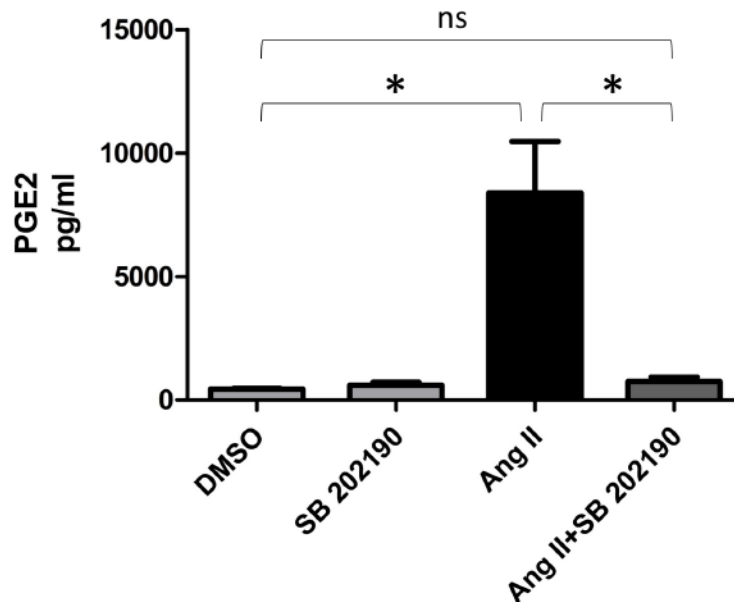


Abb. 24: Prostaglandinkonzentration in pg/ml der p38 Inhibitionsversuche, gemessen in Zellüberständen der MDCK C11 AT1-Rez. Zellen. Die mit SB 202190 inhibierten Zellen weisen signifikant erniedrigte Prostaglandin E₂ Konzentrationen auf (DMSO MW $445,8 \pm 41,26$ SEM, SB 202190 MW $592,5 \pm 127,4$ SEM, Ang II MW 8383 ± 2091 SEM, Ang II + SB 202190 MW $746,7 \pm 183,2$ SEM). Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (*: $p \leq 0,05$; ns: nicht signifikant, $p = 0,18$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=3$

3.7 Angiotensin II stimuliert die COX-2 Expression in MDCK Δ 319 Zellen

In der Literatur ist neben dem klassischen G-Protein gekoppelten Signalweg von Ang II auch eine G-Protein unabhängige Aktivierung des AT1-Rezeptors, vermutlich über β -Arrestin, beschrieben worden. Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurden die folgenden Experimente mit den MDCK C11 Δ 319 Zellen durchgeführt. Den Zellen wurde ein mutierter AT1-Rezeptor transduziert. Ab der AS 319 fehlt dem mutierten AT1-Rezeptor Δ 319 der cytosolische Anteil. Der Versuchsaufbau der folgenden Experimente wurde identisch zu den Versuchen mit den MDCK C11 AT1 Zellen gestaltet.

3.7.1 Zeitkinetik in MDCK Δ 319 Zellen

Zunächst wurde eine zeitabhängige Ang II Stimulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit den MDCK C11 Δ 319 Zellen durchgeführt, um eine bestimmte Stimulationsdauer festzulegen. Hier zeigte sich, dass eine sechsstündige Ang II Stimulation eine hohe COX-2 Expression (MW $7,64 \pm 0,98$ SEM) im Vergleich zur Negativkontrolle (MW $1 \pm 0,12$ SEM) bewirkt. Bei kürzer oder länger andauernden Stimulationen wurde keine erhöhte COX-2 Expression bewirkt (drei Stunden Stimulation MW $2,46 \pm 0,26$ SEM; zwölf Stunden Stimulation MW $5,54 \pm 0,38$ SEM). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auch in dieser Zellreihe die Stimulationsdauer auf sechs Stunden festgelegt.

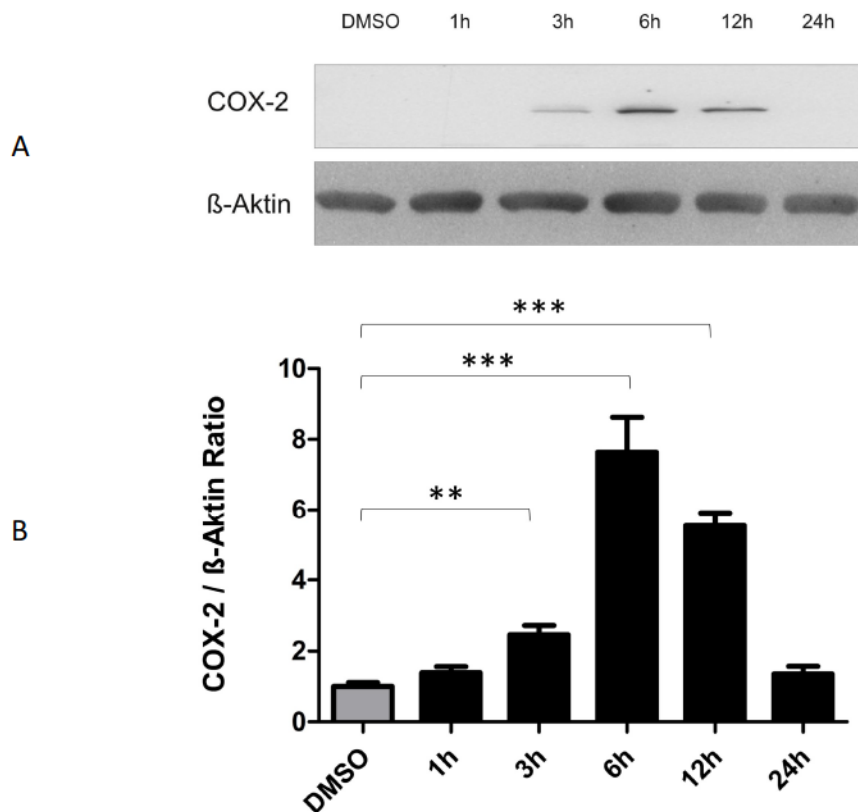


Abb. 25: Zeitkinetik der Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 Δ 319 Zellen nach zeitabhängiger Stimulation mit 1 μ g/ml Angiotensin II. Ang II induziert zeitabhängig COX-2 in MDCK C11 Δ 319 Zellen (DMSO MW $1 \pm 0,12$ SEM, 1 h MW $1,39 \pm 0,17$ SEM, 3 h MW $2,46 \pm 0,26$ SEM, 6 h MW $7,64 \pm 0,98$ SEM, 12 h MW $5,54 \pm 0,38$ SEM, 24 h MW $1,35 \pm 0,22$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β -Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/ β -Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$; **: $p \leq 0,01$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=4

3.7.2 G-Protein gekoppelter Signalweg Proteinkinase C Signalweg

Als nächstes wurde untersucht, ob in den MDCK C11 Δ 319 Zellen die G-Protein abhängige Aktivierung von PKC stattfindet. Die alleinige Ang II Stimulation der Zellen verursachte ein signifikant erhöhtes COX-2 Signal (MW $4,21 \pm 0,19$ SEM). Bei Inhibition von PKC mit Calphostin C war keine Reduktion der COX-2 Freisetzung festzustellen. Das COX-2 Level blieb fast identisch zu der reinen Ang II Stimulation (MW $5,26 \pm 0,59$ SEM) und war auch im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO signifikant erhöht.

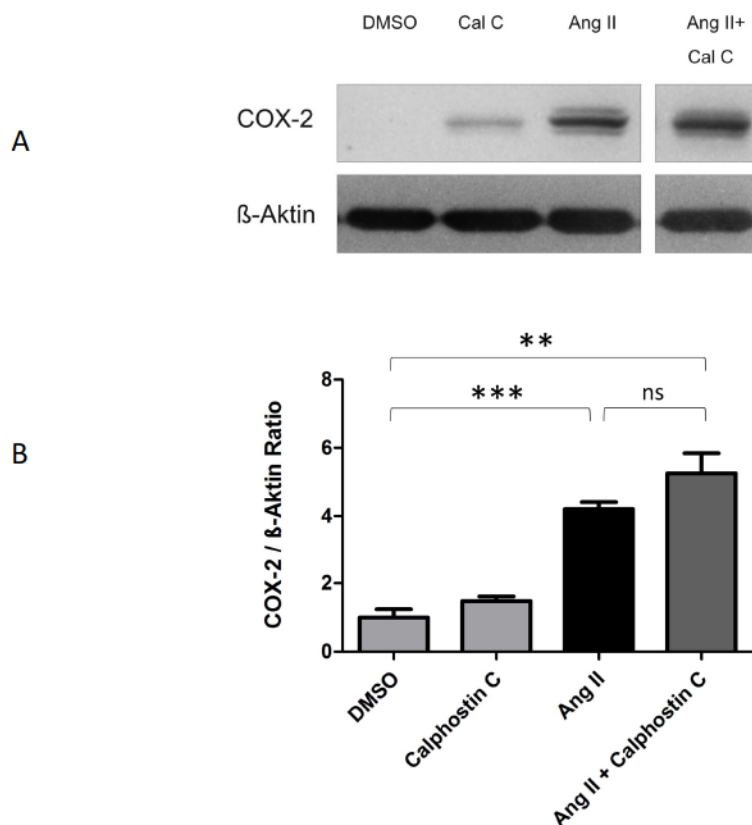


Abb. 26: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 Δ 319 Zellen nach sechsständiger Stimulation mit 1 μ g/ml Angiotensin II und einstündiger Vorinkubation mit 1 μ M Calphostin C. Die Ang II induzierte COX-2 Expression wird durch Calphostin C nicht inhibiert (DMSO MW $1 \pm 0,24$ SEM, Calphostin C MW $1,47 \pm 0,14$ SEM, Ang II MW $4,21 \pm 0,19$ SEM, Ang II + Calphostin C MW $5,26 \pm 0,59$ SEM) A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β -Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/ β -Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$, **: $p \leq 0,01$, ns: nicht signifikant, $p = 0,12$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=6$

3.7.3 Angiotensin II aktiviert MAP-Kinasen in MDCK Δ 319 Zellen

3.7.4 P38-MAP-Kinase

Im folgenden Versuch setzten wir einen spezifischen p38 Inhibitor (SB 202190) ein, um zu prüfen, ob durch Inhibierung der p38 MAPK Signalkaskade eine Veränderung in der COX-2 Expression zu beobachten ist. Wie im folgenden Diagramm dargestellt bewirkte die Ang II Stimulation eine signifikant hohe COX-2 Expression (MW $4,32 \pm 0,2$ SEM). Bei Vorinkubation mit SB 202190 sah man eine deutlich signifikante Reduktion der Ang II induzierten COX-2 Expression (MW $2,16 \pm 0,25$ SEM). Das COX-2 Signal mit Vorinkubation mit SB 202190 war im Vergleich zu DMSO schwach signifikant erhöht.

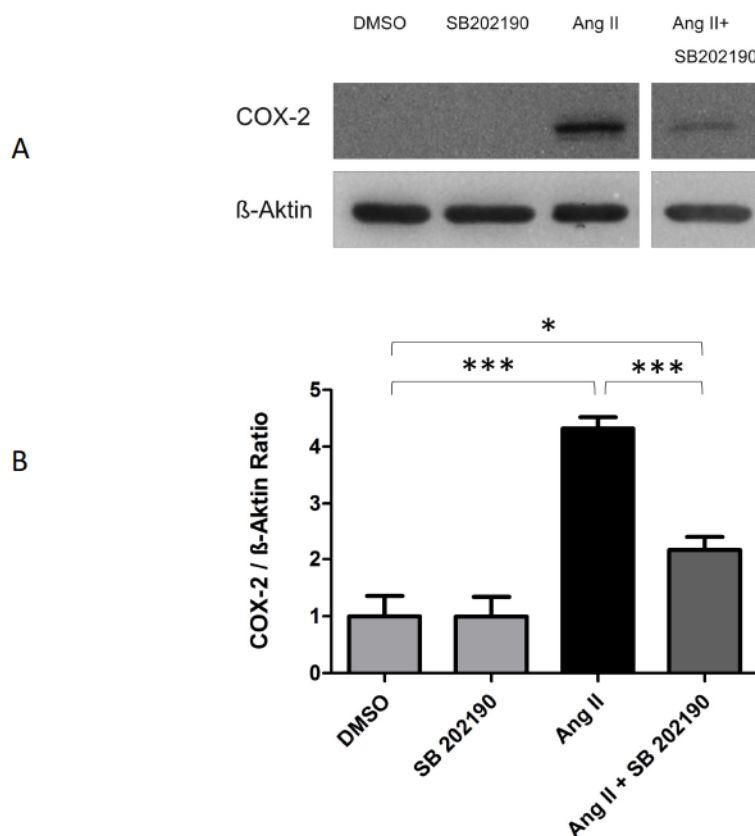


Abb. 27: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 Δ 319 Zellen nach sechsständiger Stimulation mit 1 μ g/ml Angiotensin II und einstündiger Vorinkubation mit 10 μ M SB 202190. SB 202190 inhibiert die Ang II induzierte COX-2 Expression in MDCK C11 Δ 319 Zellen signifikant (DMSO MW $1 \pm 0,36$ SEM, SB 202190 MW $1 \pm 0,35$ SEM, Ang II MW $4,32 \pm 0,2$ SEM, Ang II + SB 20190 MW $2,16 \pm 0,25$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β -Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/ β -Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$; *: $p \leq 0,05$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=8

3.7.5 Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK)

Im nächsten Versuch wurde mit den MDCK C11 Δ 319 eine MEK Inhibition durchgeführt. Die Stimulation der Zellen mit Ang II führte zu einer signifikant erhöhten COX-2 Freisetzung (MW $3,93 \pm 0,17$ SEM). Bei Inhibierung von MEK und folgender Ang II Stimulation war die COX-2 Freisetzung deutlich gesteigert (MW $8,73 \pm 0,79$ SEM). Die signifikant erhöhte COX-2 Expression besteht sowohl im Vergleich zur Negativkontrolle als auch im Vergleich zur alleinigen Ang II Stimulation.

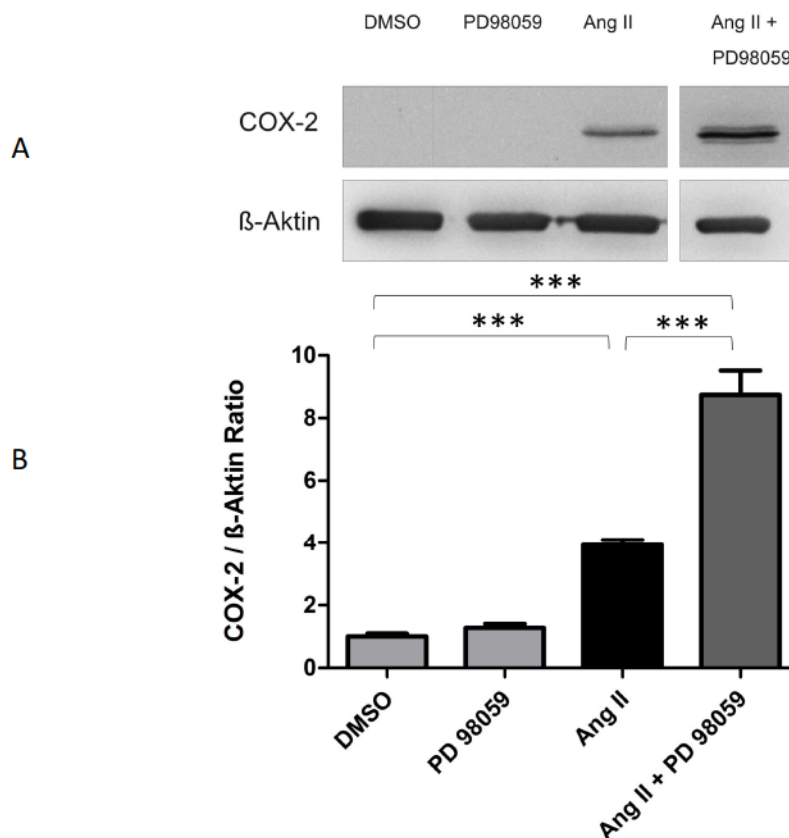


Abb. 28: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 Δ 319 Zellen nach sechsständiger Stimulation mit 1 μ g/ml Angiotensin II und einstündiger Vorinkubation mit 50 μ M PD 98059. ERK Inhibition in MDCK C11 Δ 319 Zellen führt zu einer erhöhten COX-2 Expression (DMSO MW $1 \pm 0,1$ SEM, PD 98059 MW $1,28 \pm 0,14$ SEM, Ang II MW $3,93 \pm 0,17$ SEM, Ang II + PD 98059 MW $8,73 \pm 0,79$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β -Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/ β -Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. n=6

Aufgrund der Ergebnisse aus der p38- und MEK-Inhibition wurde als nächstes durch simultane Inhibition von p38 und MEK geprüft, welcher Signalweg überwiegt. Die Ang II

Stimulation bewirkte im Vergleich zur Negativkontrolle aus DMSO (MW $1 \pm 0,11$ SEM) und den Inhibitoren PD 98059 (MW $1,07 \pm 0,07$ SEM) und SB 202190 (MW $1,22 \pm 0,07$ SEM) eine signifikant erhöhte COX-2 Expression (MW $2,07 \pm 0,05$ SEM). Bei einstündiger Vorinkubation mit PD 98059 und SB 202190 konnte die COX-2 Expression inhibiert werden (MW $1,24 \pm 0,06$ SEM). Das COX-2 Signal der zuvor inhibierten Zellen war im Vergleich zu DMSO nicht signifikant erhöht.

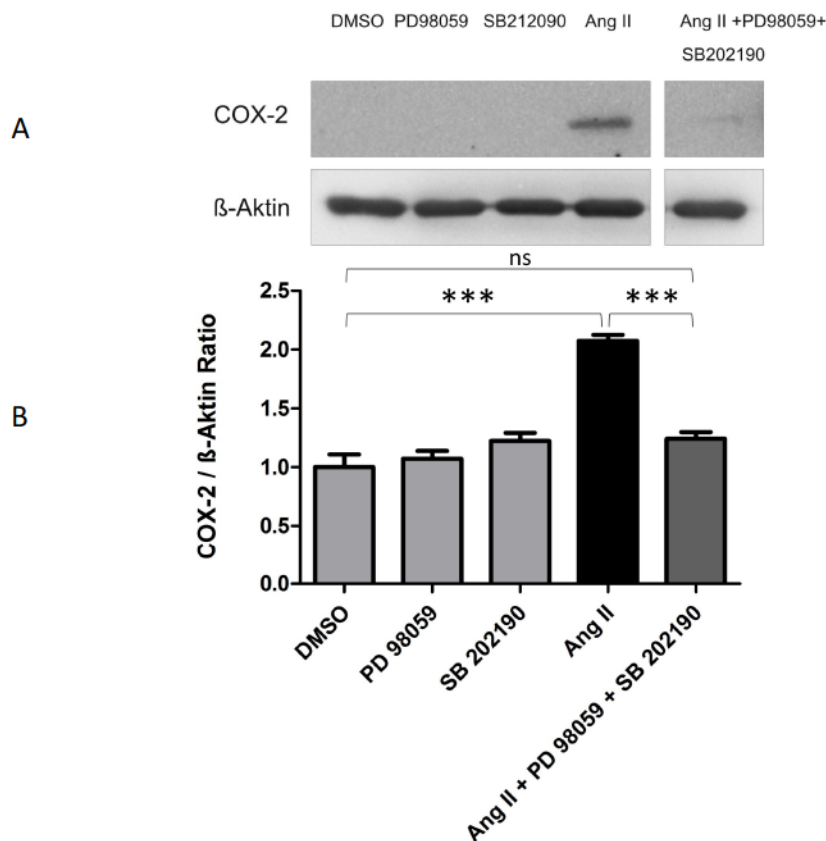


Abb. 29: Cyclooxygenase-2 Expression in MDCK C11 Δ 319 Zellen nach sechsstündiger Stimulation mit 1 μ g/ml Angiotensin II und einstündiger Vorinkubation mit 50 μ M PD 98059 und 10 μ M SB 202190. Simultane Inhibition von ERK und p38 führt zu einer signifikanten COX-2 Reduktion nach Ang II Stimulation (DMSO $1 \pm 0,11$ SEM, PD 98059 MW $1,07 \pm 0,07$ SEM, SB 202190 MW $1,22 \pm 0,07$ SEM, Ang II MW $2,07 \pm 0,05$ SEM, Ang II + PD 98059 + Sb 202190 MW $1,24 \pm 0,06$ SEM). A: Repräsentativer Western Blot, erste Reihe: COX-2, zweite Reihe: β-Aktin. B: Densitometrische Auswertung, dargestellt ist die COX-2/β-Aktin-Ratio als Mittelwert normalisiert auf die Negativkontrolle DMSO. Statistische Auswertung mit t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben (***: $p \leq 0,001$; ns: nicht signifikant, $p = 0,21$), Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken angegeben. $n=3$

4 Diskussion

4.1 Angiotensin II Behandlung in Mäusen führt zur Prostaglandinausschüttung im Urin

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Effekte von Ang II auf die renale COX-2 Expression untersucht. Ziel der Experimente war es herauszufinden, ob es einen endogenen Mechanismus gibt, der die hypertensiven Effekte von Ang II möglicherweise abschwächen kann und somit als Gegenregulationsmechanismus dient. Diese schützende Gegenregulation könnte durch die natriuretischen Effekte der Prostaglandine erfolgen. Um einen möglichen Zusammenhang von Ang II und COX-2 herauszufinden, infundierten wir Mäusen Ang II, welches in Tierversuchen eine gängige experimentelle Methode darstellt. Wir verglichen die Prostaglandinwerte im Sammelurin zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Die erste Messung erfolgte zum Zeitpunkt null, um basale Werte ohne vorangegangene Behandlung zu messen. Wie erwartet, fanden wir kaum messbare Prostaglandinkonzentrationen vor. Denselben Mäusen infundierten wir Ang II und stellten fest, dass nach zweiwöchiger Ang II Behandlung erhöhte Prostaglandinkonzentrationen im Urin zu finden waren. Die hypertensiven Effekte von Ang II konnten bereits in vielen Tierversuchen gezeigt werden. Guyton infundierte Hunden Ang II und konnte beweisen, dass der daraus resultierende erhöhte mittlere arterielle Blutdruck nötig war, um die oral aufgenommene Menge an Natrium wieder in gleichen Mengen auszuscheiden (Hall, Guyton et al. 1980). Ang II Infusionen in Ratten erhöhten die Na^+ Retention und den Blutdruck bereits ab Tag eins. Der Blutdruck blieb über den Versuchszeitraum von sieben Tagen konstant erhöht. Die antinatriuretischen und blutdrucksteigernden Effekte wurden vermutlich über den AT1-Rezeptor verursacht (Kemp, Howell et al. 2016). Weiterhin infundierten Potthoff et al. Wildtyp Mäusen für zwei Wochen Ang II (1000 ng/kg/min) und beobachteten den systolischen Blutdruck. Nach zwei Wochen war der Blutdruck durch die Ang II Infusion von 120 mmHg auf 170 mmHg gestiegen, was die hypertensiven Effekte von Ang II deutlich untermauert. In selbiger Studie konnte gezeigt werden, dass eine chronische Inhibition von p38 den Blutdruck senkt (Potthoff, Stamer et al. 2016).

Da wir Prostaglandine im Urin finden konnten, stellte sich die Frage, ob Ang II entweder direkt eine Prostaglandinfreisetzung bewirkt oder den COX-2 Zyklus stimuliert. Um dem nachzugehen, isolierten wir aus den mit Ang II behandelten Mäusen *Cortex* und *Medulla* und bestimmten die COX-2 Genexpression. Nur in dem Gewebe aus der *Medulla* der Mäuse, die mit Ang II infundiert wurden, erhielten wir erhöhte COX-2 mRNA. Durch diesen Zusammenhang vermuten wir, dass Ang II über die Stimulation des COX-2 Zyklus eine Prostaglandinfreisetzung bewirkt. Bereits Ferguson et al. konnten immunhistochemisch zeigen, dass COX-1 und COX-2 im Sammelrohr vorkommen (Ferguson, Hebert et al. 1999). Für eine genauere Lokalisation von COX-2 im Sammelrohr führten wir mit Nierenschnitten eine Immunhistochemie durch. Wir konnten mittels konfokaler Mikroskopie zeigen, dass sich COX-2 mit vATPase, dem Marker für Zwischenzellen, deckt. Diese Übereinstimmung gab es nicht mit AQP2, einem Marker für Hauptzellen, weswegen wir annehmen, dass in unseren Versuchen COX-2 hauptsächlich in den Zwischenzellen der Sammelrohrepithelien vorkommt (Stegbauer, Chen et al. 2017).

4.2 Bedeutung der Zwischenzellen für die Blutdruckregulation

Das Vorkommen von COX-2 in Zwischenzellen stellt ein neues und überraschendes Charakteristikum der Zwischenzellen dar. Die epithelialen Zellen als Teil des renalen Sammelrohres sind klassischerweise für die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes verantwortlich (Crayen and Thoenes 1978). Hierfür werden in Typ A Zwischenzellen über eine apikal gelegene H^+ -ATPase Protonen in das Lumen sezerniert (Teng-umnuay, Verlander et al. 1996). Interessanterweise gibt es in der Literatur Hinweise auf eine mögliche Blutdruckregulation durch die Zwischenzellen des Sammelrohres. Typ B, non-A und non-B Zellen der Zwischenzellen weisen einen apikal gelegenen Cl^-/HCO_3^- Austauscher, auch Pendrin genannt, auf (Royaux, Wall et al. 2001). Pendrin nimmt eine besondere Rolle in der Niere ein. Pendrin-vermittelte Cl^- Absorption führt zur Zunahme des Blutplasmavolumens und damit auch des Blutdrucks (Verlander, Hassell et al. 2003). Bei oraler Cl^- Restriktion wurde Pendrin in Mausversuchen hochreguliert und während

der Cl^- Diät konnten hohe Plasmapreninwerte in Pendrin Knockout-Mäusen gefunden werden (Verlander, Kim et al. 2006).

Weitere Studien, die die Bedeutung der Zwischenzellen für die Blutdruckregulation stützen, bewiesen, dass der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher bei Absorption von Chlorid auch Na^+ durch die Typ B Zwischenzellen absorbiert und somit blutdrucksteigernd wirkt (Eladari, Chambrey et al. 2012) (Leviel, Hubner et al. 2010). Daraus ableitend konnte in Mausversuchen herausgefunden werden, dass ein Pendrin Knockout vor der Entwicklung einer Hypertonie schützt. Diese Mäuse hatten eine höhere Na^+ und Cl^- Ausscheidung und dadurch einen niedrigeren Blutdruck als die Wildtypmäuse (Kim, Pech et al. 2007). Als Erklärung für den niedrigeren Blutdruck wird zum einen die erhöhte Exkretion von Na^+ und Cl^- gesehen, zum anderen aber konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Pendrin die Funktion von ENaC in Hauptzellen stört. In Pendrin Knockout-Mäusen war die Aktivität von ENaC im Vergleich zu Wildtyptieren deutlich reduziert (Pech, Pham et al. 2010). Interessanterweise konnten einige Studien zeigen, dass das RAS auch einen Einfluss auf Pendrin hat. Es wurde bewiesen, dass Ang II die Expression von Pendrin über den AT1-Rezeptor erhöht (Verlander, Hong et al. 2011).

Ein weiterer Aspekt, der in der Literatur beschrieben ist, sind die direkten Effekte der Prostaglandine auf das Sammelrohr. Guan et al. fanden heraus, dass Prostaglandin E_2 durch die Aktivierung des EP1 Rezeptors im Sammelrohr die Na^+ Absorption verhindert (Guan, Zhang et al. 1998). Auch Hebert und Kollegen zeigten einen direkten Effekt der Prostaglandine auf das Sammelrohr. Sie konnten in isolierten Sammelrohrepithelien zeigen, dass Prostaglandin E_2 den transepithelialen Na^+ Transport im Sammelrohr deutlich reduziert (Hebert, Jacobson et al. 1993). Gueutin et al. untersuchten in Mausversuchen den genauen Mechanismus, wie die Na^+ Absorption im Sammelrohr reduziert wird. Sie stellten die Vermutung auf, dass die Typ B Zwischenzellen erhöhte Werte von NaCl im distalen Tubulus registrieren und als Reaktion darauf die Synthese von Prostaglandin E_2 initiieren können, so dass die Prostaglandine eine vermehrte Na^+ Absorption durch die Hauptzellen verhindern. Prostaglandin E_2 senkt somit die Expression und Funktion von ENaC in den Hauptzellen (Gueutin, Vallet et al. 2013).

Interessanterweise konnten wir in unseren Mausversuchen hohe Prostaglandinkonzentrationen im Urin nach Ang II Stimulation detektieren. In immunhistochemischen Analysen aus Mausnieren haben wir herausgefunden, dass nach Ang II Stimulation COX-2 in den Zwischenzellen vorkommt. Wir vermuten daher einen direkten Effekt von Ang II, dem Hauptmetaboliten des RAS, auf die Prostaglandinfreisetzung in den Zwischenzellen des Sammelrohrs. Hiermit nehmen die renalen Zwischenzellen im Gegensatz zu ihren klassischen Funktionen eine zunehmend wichtige Bedeutung in der Blutdruckregulation ein.

4.3 Angiotensin II Signalweg in MDCK AT1 Zellen

Gekle und Wunsch klonierten zwei stabile MDCK Zelllinien, die sie in Klon sieben und Klon elf unterschieden. Klon sieben spiegelt Hauptzellen des Sammelrohres wider und Klon elf Zwischenzellen. Die Zellen unterscheiden sich in ihrer Morphologie und in ihren Funktionen, so sezernieren Zellen aus Klon elf Cl^- und Zellen aus Klon sieben eher K^+ (Wunsch, Gekle et al. 1995). Wegen der beschriebenen Eigenschaften eignen sich die MDCK Zellen Klon elf besonders gut für unsere Experimente, um den Ang II Signalweg in renalen Zwischenzellen zu erforschen.

Da die AT1-Rezeptor Expression mit zunehmender Passage der MDCK Zellen unsteter war, entschlossen wir uns dazu den Rezeptor stabil zu transduzieren. Nach der erfolgreichen Transduktion der MDCK Zellen mit dem AT1-Rezeptor konnte bereits in ersten zeitabhängigen Stimulationsversuchen mit Ang II eine signifikant hohe COX-2 Expression gemessen werden. Damit konnten wir auf zellulärer Ebene zeigen, dass Ang II eine COX-2 Freisetzung in MDCK AT1 Zellen bewirkt. Analog zu dem Ergebnis der Proteinanalyse konnten wir in den Zellmedien signifikant erhöhte Prostaglandinkonzentrationen im ELISA nachweisen (Stegbauer, Chen et al. 2017). Dieses steht im Einklang zu Versuchen mit innermedullären Sammelrohrzellen (IMCD = *inner medullary collecting duct*) aus Ratten. Hierbei konnte festgestellt werden, dass in IMCD Zellen nach Stimulation mit Adenosin 5'-Thiotriphosphat ebenfalls erhöhte Konzentrationen von Prostaglandin E_2 vorhanden waren. Durch Einsatz sowohl eines unspezifischen COX Inhibitors als auch eines spezifischen COX-2 Hemmers konnte die

Prostaglandinexpression signifikant gesenkt werden (Welch, Carlson et al. 2003). In Versuchen mit MDCK Zellen konnte eine erhöhte Freisetzung der Arachidonsäure herausgefunden werden. Bereits in den von Xing et al. veröffentlichten Ergebnissen wurde beschrieben, dass für die Aktivierung der von der Phospholipase A₂ freigesetzten Arachidonsäure sowohl der PKC als auch der MAP-Kinase Signalweg wichtig sind (Xing, Firestein et al. 1997). Wir vermuten daher, dass in den MDCK Zellen der PKC abhängige Signalweg für die Freisetzung der Prostaglandine ebenfalls eine wichtige Rolle spielen wird. Ähnlich konnten Dulin et. al. in Epithelzellen aus dem renalen proximalen *Tubulus* zeigen, dass bei Inkubation der Zellen mit Ang II Phospholipase A₂ stimuliert wurde. Die Freisetzung der Arachidonsäure war abhängig von PKC (Dulin, Alexander et al. 1998). Um zu zeigen, dass auch in den MDCK AT1 Zellen der klassische G-Protein gekoppelte Signalweg von Ang II aktiviert wird, setzten wir einen spezifischen PKC Inhibitor, Calphostin C, ein. Die Ang II induzierte COX-2 Expression wurde durch den Inhibitor stark signifikant reduziert. Die Inhibition ist in der Proteinanalyse nahezu vollständig, denn die inhibierte COX-2 Exprimierung ist im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO nicht signifikant unterschiedlich. Wie erwartet deckt sich unser Ergebnis mit den Experimenten von Dulin et al. So konnten wir damit beweisen, dass ein wesentlicher Teil der COX-2 Expression in den MDCK AT1 Zellen über den PKC Signalweg vermittelt wird. Dieses Ergebnis findet sich auch im ELISA wider. Die zuvor mit Calphostin C inhibierten MDCK AT1 Zellen wiesen signifikant erniedrigte Prostaglandinkonzentrationen im Medium auf. Die durch Calphostin C inhibierte Prostaglandinsynthese ist jedoch nicht vollständig gehemmt, da sie trotz Inhibition im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO einen signifikanten Unterschied aufweist. Somit bleibt interessanterweise eine gewisse Restfunktion des AT1-Rezeptors übrig, die über andere Signalwege als den PKC abhängigen vermittelt sein muss.

In der Literatur wurde gezeigt, dass der AT1-Rezeptor neben der Proteinkinase C auch über MAP-Kinasen aktiviert werden kann. Die MAP-Kinase p38 wurde in mehreren Studien in Verbindung mit dem Angiotensin II Signalweg gesehen. So zeigten beispielsweise Potthoff et al., dass eine chronische p38 Inhibition die hypertensiven Effekte von Ang II abschwächt (Potthoff, Stamer et al. 2016). Um zu prüfen, ob die p38 MAP-Kinase speziell in den MDCK AT1 Zellen ebenfalls am Signalweg teilnimmt, führten

wir zunächst Phosphorylierungsversuche durch und konnten sehen, dass p38 durch Ang II Stimulation aktiviert wird. Um rückschließend herauszufinden, ob p38 auch im direkten Zusammenhang mit der COX-2 Expression steht, inhibierten wir die MAP-Kinase mit einem selektiven Inhibitor, SB 202190. Die COX-2 Expression war auf Proteinebene stark signifikant erniedrigt. Dieses Ergebnis konnten Pham et al. in ihren Versuchen mit intestinalen Epithelzellen und auch Ohnaka et al., die ähnliche Versuche mit glatten Gefäßmuskelzellen isoliert aus Ratten durchführten, ebenfalls nachweisen (Pham, Chong et al. 2008) (Ohnaka, Numaguchi et al. 2000). Die von uns durchgeführte p38 Inhibition war jedoch nicht vollständig ausgeprägt, da die inhibierte COX-2 Expression im Vergleich zur Negativkontrolle in der Proteinanalyse einen schwach signifikanten Unterschied aufweist. Im ELISA fanden wir heraus, dass durch die Inhibition der p38 MAP-Kinase die Prostaglandinsynthese in den MDCK AT1 Zellen signifikant gehemmt wurde. Die durch SB 202190 inhibierte Synthese der Prostaglandine war im Vergleich zur Negativkontrolle vollständig gehemmt, so dass wir daraus schließen, dass p38 im Ang II vermittelten Signalweg eine bedeutende Rolle spielt. Zusammenfassend konnten wir die AT1-Rezeptor gekoppelte Aktivierung von p38 in MDCK AT1 Zellen zeigen.

Eine weitere ausführlich beschriebene MAP-Kinase, die in Zusammenhang mit dem Ang II vermittelten Signalweg steht, ist ERK 1/2. Aktivierungsmöglichkeiten für ERK sind sowohl G-Protein vermittelt, als auch G-Protein unabhängig (Wei, Ahn et al. 2003). Unsere Phosphorylierungsversuche zeigten, dass bei Ang II Stimulation der MDCK Zellen ERK aktiviert wird. Bei Einsatz eines spezifischen MEK-Inhibitors, PD 98059, kam es interessanterweise nicht zu einer Reduktion der COX-2 Expression. Vielmehr wurde die COX-2 Freisetzung stark signifikant erhöht. In einer Studie mit intestinalen Epithelzellen, die mit Ang II und EGF stimuliert wurden, konnte bei Einsatz von PD 98059 auch keine Inhibition der COX-2 Expression festgestellt werden. Ob eine Steigerung der COX-2 Freisetzung zu beobachten war, wurde nicht beschrieben (Pham, Chong et al. 2008). Um die Bedeutung der MAP-Kinasen p38 und ERK genauer zu untersuchen, führten wir eine gleichzeitige Inkubation der MDCK AT1 Zellen mit beiden Inhibitoren durch. Bei simultaner Inhibition von ERK und p38, die auch von Pham et al. durchgeführt wurde, konnte die COX-2 Expression wieder gehemmt werden, so dass wir davon ausgehen,

dass die MAP-Kinase p38 eine stärkere Rolle im Ang II vermittelten Signalweg einnimmt. Die gehemmte COX-2 Expression war im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant unterschiedlich, welches die Bedeutung von p38 nochmals unterstützt.

Die MAP-Kinase p38 wird zum einen direkt über den AT1-Rezeptor aktiviert. Zusätzlich gibt es auch eine indirekte Aktivierungsmöglichkeit über die Bildung von ROS. Diese werden als wichtige Signalmoleküle für die Vermittlung des Gefäßtonus und für die Regulation von Zellwachstum und –differenzierung gesehen. Auch mit der Entwicklung von Gefäßentzündung und Hypertonie werden ROS in Verbindung gebracht (Griendling, Sorescu et al. 2000). In glatten Gefäßmuskelzellen konnte herausgefunden werden, dass durch Stimulation der Zellen mit Ang II ROS gebildet werden. Diese wurden von der in der Zellmembran befindlichen NADPH-Oxidase generiert (Seshiah, Weber et al. 2002). Barbieri et al. konnten einen Zusammenhang zwischen ROS und der COX-2 Induktion in Monozyten zeigen. Die COX-2 Expression wurde durch ROS Induktoren gesteigert und durch NADPH Oxidase Inhibitoren reduziert (Barbieri, Eligini et al. 2003). Um diesen Kontext zu überprüfen, setzten wir Apocynin in den MDCK AT1 Zellen ein und untersuchten die COX-2 Expression. Hierbei handelt es sich um einen Inhibitor der NADPH Oxidase. Bei Vorinkubation der Zellen mit Apocynin konnten wir in den MDCK AT1 Zellen eine signifikant reduzierte COX-2 Expression beobachten. Die Inhibition ist nicht vollständig ausgeprägt, denn die COX-2 Expression ist trotz Vorbehandlung mit Apocynin im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant unterschiedlich. Zur weiteren Analyse wären auch andere NADPH Oxidase Hemmer, wie Tempol, geeignet gewesen. Um den genauen Zusammenhang zwischen ROS und der Aktivierung von p38 zu untersuchen, könnte in weiteren Experimenten geprüft werden, ob durch den Einsatz von ROS Induktoren in den MDCK AT1 Zellen die MAP-Kinase p38 phosphoryliert wird. Darauf folgend könnte untersucht werden, ob sich diese Aktivierung von p38 durch NADPH Oxidase Inhibitoren hemmen lässt.

4.4 Angiotensin II aktiviert in MDCK Δ 319 Zellen den β -Arrestin vermittelten Signalweg

Neben dem klassischen G-Protein vermittelten Signalweg gibt es auch eine Möglichkeit den AT1-Rezeptor über β -Arrestin zu aktivieren. Zahlreiche Studien haben Experimente mit mutierten AT1-Rezeptoren durchgeführt, um dieses Phänomen näher zu beleuchten. So konnten Wei et al. in HEK-Zellen zeigen, dass für die Bindung der G-Proteine an den Rezeptor eine AS Domäne im zweiten intrazellulären Abschnitt des Rezeptors besonders wichtig ist. Eine Mutation in diesem Bereich führt dazu, dass die G-Protein vermittelte Signalkaskade nicht stattfinden kann. Dennoch konnten sie zeigen, dass GFP-markiertes β -Arrestin rekrutiert wird, wenn der mutierte Rezeptor eine Stimulation durch Ang II erfährt. In einem weiteren Schritt fanden sie heraus, dass bei Stimulation des mutierten Rezeptors ERK aktiviert wird. Damit konnten sie beweisen, dass β -Arrestin MAP-Kinasen aktivieren kann. Somit fand in den HEK-Zellen mit dem mutierten Rezeptor eine G-Protein unabhängige Signalkaskade statt. (Wei, Ahn et al. 2003).

Um die G-Protein unabhängige Signalkaskade sowie einen möglichen Einfluss von β -Arrestin auf den Angiotensin II Signalweg in den MDCK Zellen genauer zu untersuchen, transduzierten wir in die MDCK Zellen einen mutierten AT1-Rezeptor Δ 319, bei dem der cytosolische Anteil des Rezeptors ab der AS 319 fehlt. Die AS Sequenz von T332 bis S338 ist verantwortlich für die Ang II vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors sowie für die Bindung von β -Arrestin (Thomas and Qian 2003). Durch die inkomplette Rezeptorstruktur erwarten wir Unterschiede in der Signalkaskade der Ang II induzierten COX-2 Expression, da wir davon ausgehen, dass wichtige Bindungsstrukturen am mutierten AT1-Rezeptor fehlen.

Bei ersten zeitabhängigen Stimulationsversuchen mit Ang II in den MDCK Δ 319 Zellen konnten wir sehen, dass es zu einer signifikant hohen COX-2 Expression in der Proteinanalyse kam. Damit konnten wir zeigen, dass durch Stimulation des mutierten AT1-Rezeptors Δ 319 die Ang II vermittelte Signalkaskade aktiviert wird und der mutierte Rezeptor trotz inkompletter Struktur funktionsfähig ist. Nun kamen die gleichen Inhibitoren wie aus den Versuchen mit den MDCK AT1 Zellen zum Einsatz, um in einem

direkten Vergleich herausfinden zu können, welcher Signalweg in den MDCK Δ 319 Zellen überwiegt. Zunächst untersuchten wir den G-Protein abhängigen Signalweg. Bei Vorinkubation der Zellen mit dem selektiven PKC Inhibitor Calphostin C zeigte sich in der Proteinanalyse, dass es nicht zu einer Inhibition der COX-2 Expression im Vergleich zu alleinigen Stimulation mit Ang II kam. Damit bewiesen wir, dass durch den fehlenden cytosolischen Teil des AT1-Rezeptors wichtige Bindungsstrukturen für die G-Proteine fehlen. Hier widerspricht unser Ergebnis dem von Wei et al., die die entscheidenden Bindungsstrukturen für die G-Proteine im zweiten intrazellulären Abschnitt des AT1-Rezeptors fanden. Trotzdem konnten wir damit zeigen, dass die Signalkaskade in den MDCK Δ 319 Zellen nicht über die G-Proteine und somit über PKC vermittelt sein kann, weil die Inhibition der Proteinkinase C nicht zu einer Reduktion der COX-2 Expression führte. Dieses Ergebnis erklärt zudem auch die Restfunktion des AT1-Rezeptors in den MDCK AT1 Zellen bei PKC Inhibition. Die nicht vollständig supprimierte Prostaglandinkonzentration im ELISA deutet einen zusätzlichen Signalweg an, den wir mithilfe des mutierten AT1-Rezeptors genauer spezifizieren konnten. Aufgrund der fehlenden Reduktion der COX-2 Expression bei PKC Inhibition der MDCK Δ 319 Zellen konnten wir so den G-Protein abhängigen Signalweg ausschließen und schlussfolgerten, dass es bei beiden AT1-Rezeptorvarianten eine G-Protein unabhängige Aktivierung geben muss. Um dem nachzugehen, inhibierten wir als nächstes die MAP-Kinasen p38 und ERK in den MDCK Δ 319 Zellen. In der Literatur ist beschrieben, dass die MAP-Kinasen durch β -Arrestin und somit G-Protein unabhängig aktiviert werden können. Bei der Inhibition von p38 konnten wir feststellen, dass die COX-2 Expression stark signifikant erniedrigt war. Bei Inkubation der MDCK Δ 319 Zellen mit einem selektiven MEK Inhibitor, erhielten wir ein ähnliches Ergebnis wie in den MDCK AT1 Zellen. Die COX-2 Expression war stark signifikant erhöht. Um herauszufinden, welche der beiden MAP-Kinasen einen stärkeren Einfluss auf die COX-2 Expression ausübt, inhibierten wir auch hier die MDCK Δ 319 simultan mit SB 202190 und PD 98059. Bei gleichzeitiger Inkubation der Inhibitoren wurde die COX-2 Expression stark signifikant gehemmt. Dadurch konnten wir zeigen, dass auch in den MDCK Δ 319 Zellen mit dem mutierten Rezeptor die MAP-Kinase p38 eine größere Rolle einnimmt als ERK. Zusammenfassend bewiesen wir hiermit, dass der mutierte AT1-Rezeptor G-Protein unabhängig über den MAP-Kinase Signalweg aktiviert werden kann. Thomas et. al. konnten zeigen, dass β -

Arrestin an den mutierten Rezeptor mit fehlendem cytoplasmatischen Anteil nicht binden kann, so dass die Aktivierung der Ang II Signalkaskade in den MDCK Zellen nicht über eine direkte Bindung von β -Arrestin an den mutierten AT1-Rezeptor zu erklären ist (Thomas and Qian 2003). Eine Rezeptor unabhängige Rekrutierung der MAP-Kinasen, die von Shah et al. beschrieben wurde, kann als Erklärungsansatz herangezogen werden. In Stimulationsversuchen mit dem AT1 Wildtyprezeptor und einem mutierten AT1 Δ 335 Rezeptor konnten sie feststellen, dass der mutierte Rezeptor nicht internalisiert wird und β -Arrestin nicht binden kann. Dennoch wurde die MAP-Kinase ERK aktiviert (Shah, Alberto Olivares-Reyes et al. 2002). Demnach werden über die Scaffold Wirkung von β -Arrestin, die auch von Luttrell et al. gezeigt wurde (Luttrell, Roudabush et al. 2001), trotz fehlendem cytoplasmatischen Anteil des AT1 Rezeptors MAP-Kinasen rekrutiert und so die Ang II vermittelte Signalkaskade ermöglicht, die letztendlich zur Bildung der natriuretisch wirkenden Prostaglandine führt.

5 Schlussfolgerungen

Die zugrundeliegende Arbeit spiegelt das komplexe Verhältnis der Blutdruckregulation wider. Die Prostaglandinfreisetzung im Urin von Mäusen nach Ang II Infusion stellt eine neue Bedeutung der Ang II vermittelten Effekte dar. Das natriuretisch wirkende Prostaglandin E_2 kann durch die konsekutiv gesteigerte Diurese, bedingt durch die osmotischen Eigenschaften des Natriums, die hypertensiven Effekte von Ang II abschwächen und so Einfluss auf die Blutdruckregulation des Körpers nehmen. Die Freisetzung der Prostaglandine wird über Aktivierung des COX 2 Mechanismus bewirkt. COX 2 konnte in den Zwischenzellen des Sammelrohres von Ang II behandelten Mäusen lokalisiert werden. Diese Wirkung von Ang II wurde in Zellkultur nach Transduktion des AT1-Rezeptors genauer untersucht. Hier schien die Ang II induzierte COX-2 Freisetzung in den Zellkulturversuchen zunächst allein über eine G-Protein gekoppelte Signaltransduktion vermittelt zu sein. Jedoch war die PKC Inhibition unvollständig und zeigte im ELISA eine Restfunktion auf, so dass wir durch Versuche mit einem mutierten AT1-Rezeptors einen G-Protein unabhängigen Signalweg, der vermutlich über β -Arrestin aktiviert wird, untersuchten. Dem mutierten AT1-Rezeptor fehlt ab der AS 319 der cytosolische Anteil des Schwanzes, so dass G-Proteine nicht binden konnten. Dennoch kommt es zu einer COX-2 Freisetzung, welche durch die MAP-Kinase p38 bewirkt wird. Hierbei konnten wir zeigen, dass über eine G-Protein unabhängige MAP-Kinasen Rekrutierung die intrazelluläre Signalkaskade vermittelt wird. In der Literatur wird genau diese Eigenschaft β -Arrestin zugeschrieben. Somit konnten die Experimente mit zwei AT1-Rezeptor Varianten in den MDCK Zellen beweisen, dass es eine G-Protein gekoppelte und eine G-Protein unabhängige Aktivierungsmöglichkeit der COX-2 Expression gibt. Die Ergebnisse waren stabil reproduzierbar, sodass man daraus schließen konnte, dass die MDCK Zellen AT1-Rezeptor abhängig sind. Deswegen ist es naheliegend, dass in den Mausversuchen die Prostaglandinausschüttung im Urin nach Ang II Infusion ebenfalls über den AT1-Rezeptor vermittelt werden. Der Ang II vermittelte Signalweg in den MDCK Zellen wird anhand der durchgeführten Versuche in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

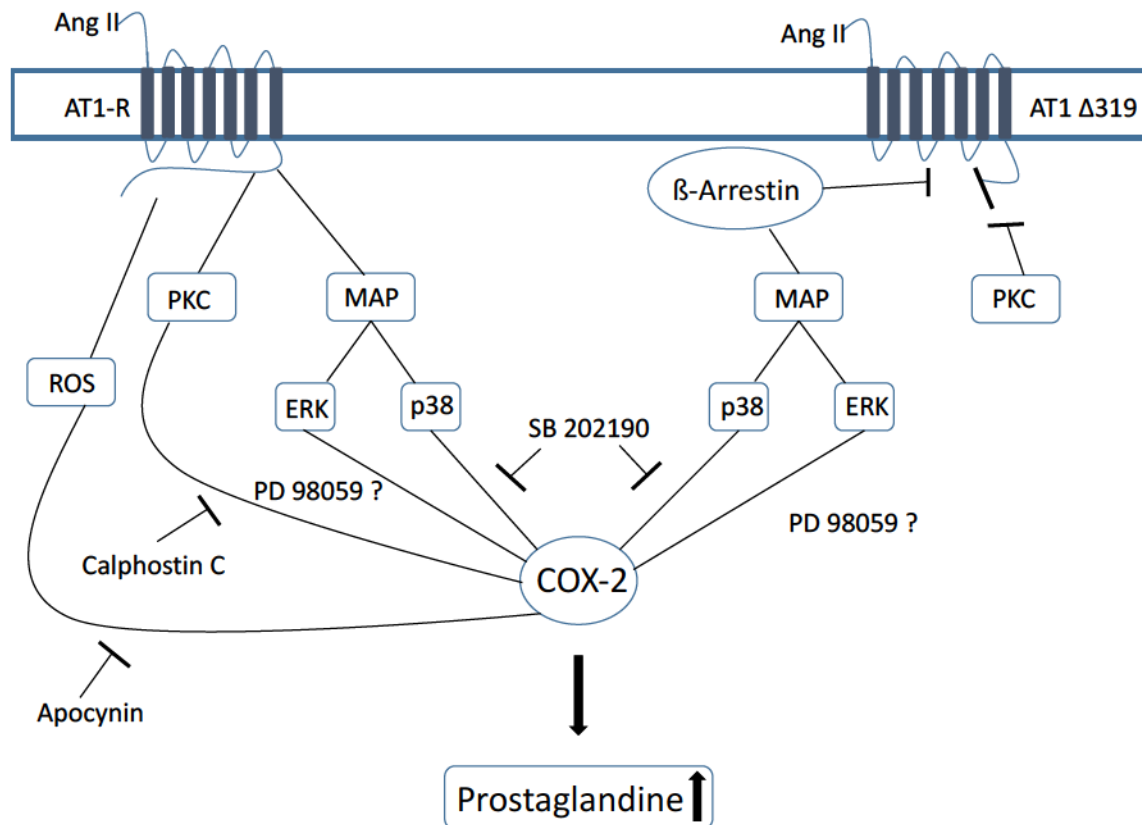


Abb. 30: Ang II induzierte AT1-Rezeptor Aktivierung mit G-Protein abhängiger und G-Protein unabhängiger Signaltransduktion in MDCK Zellen, welche über eine COX-2 Expression zur Prostaglandinfreisetzung führt. Dargestellt sind auch die eingesetzten Inhibitoren. Abbildung anhand der Ergebnisse selbst erstellt.

Die zwei unterschiedlichen Aktivierungsmöglichkeiten nach Rezeptorstimulation durch Ang II nehmen eine entscheidende Bedeutung ein. Wir konnten zeigen, dass durch Ang II Stimulation blutdrucksenkende Prostaglandine ausgeschüttet werden. Durch Einsatz von beispielsweise Angiotensin Rezeptor Antagonisten wird die vasokonstriktorische Wirkung von Ang II gehemmt und damit der Blutdruck gesenkt. Durch Inhibition des Ang II Signalweges fällt jedoch auch der positive Effekt der von Ang II produzierten Prostaglandine weg, sodass es wünschenswert wäre, den Ang II Signalweg nur teilweise zu blockieren beziehungsweise zu aktivieren. So genannte *biased agonists* sind dazu in der Lage, einen Signalweg selektiv zu aktivieren, welches vermutlich einen therapeutischen Vorteil darstellen kann. Sar¹, Ile⁴, Ile⁸ Ang II (SII) und Sar¹, D-Ala⁸ (TRV120027) aktivieren über den AT1-Rezeptor den β-Arrestin vermittelten Signalweg und blockieren den G-Protein abhängigen Weg, über den beispielsweise Vasokonstriktion und Hypertrophie vermittelt werden. Kardioprotektive Effekte wie Zellmigration, Regulierung der Kontraktilität und Überleben von Myozyten, wurden in

Verbindung mit dem β -Arrestin abhängigen Signalweg des AT1 Rezeptors gesehen (Aplin, Christensen et al. 2008). Durch Blockierung der G-Protein abhängigen Effekte bei gleichzeitiger Förderung der vorteilhaften β -Arrestin vermittelten Effekte könnten die *biased agonists* eine bessere Wirksamkeit und weniger Nebenwirkungen haben (Whalen, Rajagopal et al. 2011). Violin et al. konnten speziell bei Einsatz von TRV120027 in Versuchen mit Ratten zeigen, dass einerseits der mittlere arterielle Blutdruck gesenkt wird, während andererseits das Herzzeitvolumen und das Schlagvolumen gesteigert und konstant gehalten werden. Im Gegensatz dazu reduzieren klassische Angiotensin Rezeptor Antagonisten generell das Herzzeitvolumen (Violin, DeWire et al. 2010). Zusammenfassend unterstützt die vorliegende Arbeit die blutdrucksenkenden und kardioprotektiven Effekte von Ang II, welche durch Einsatz von *biased agonists* einen wünschenswerten therapeutischen Vorteil in der Blutdrucktherapie darstellen könnten.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Aplin, M., G. L. Christensen and J. L. Hansen (2008). "Pharmacologic perspectives of functional selectivity by the angiotensin II type 1 receptor." Trends Cardiovasc Med **18**(8): 305-312.

Barbieri, S. S., S. Eligini, M. Brambilla, E. Tremoli and S. Colli (2003). "Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase." Cardiovasc Res **60**(1): 187-197.

Breyer, M. D. and R. C. Harris (2001). "Cyclooxygenase 2 and the kidney." Curr Opin Nephrol Hypertens **10**(1): 89-98.

Crayen, M. L. and W. Thoenes (1978). "Architecture and cell structures in the distal nephron of the rat kidney." Cytobiologie **17**(1): 197-211.

Dulin, N. O., L. D. Alexander, S. Harwalkar, J. R. Falck and J. G. Douglas (1998). "Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8098-8102.

Eladari, D., R. Chambrey and J. Peti-Peterdi (2012). "A new look at electrolyte transport in the distal tubule." Annu Rev Physiol **74**: 325-349.

Ferguson, S., R. L. Hebert and O. Laneuville (1999). "NS-398 upregulates constitutive cyclooxygenase-2 expression in the M-1 cortical collecting duct cell line." J Am Soc Nephrol **10**(11): 2261-2271.

Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." Science **294**(5548): 1871-1875.

Geibel, J., G. Giebisch and W. F. Boron (1990). "Angiotensin II stimulates both Na(+)-H+ exchange and Na+/HCO3- cotransport in the rabbit proximal tubule." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(20): 7917-7920.

Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen and J. L. Benovic (1996). "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." Nature **383**(6599): 447-450.

Griendling, K. K., D. Sorescu and M. Ushio-Fukai (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.

Guan, Y., Y. Zhang, R. M. Breyer, B. Fowler, L. Davis, R. L. Hebert and M. D. Breyer (1998). "Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na+ absorption by activating the EP1 receptor." J Clin Invest **102**(1): 194-201.

Gueutin, V., M. Vallet, M. Jayat, J. Peti-Peterdi, N. Corniere, F. Leviel, F. Sohet, C. A. Wagner, D. Eladari and R. Chambrey (2013). "Renal beta-intercalated cells maintain body fluid and electrolyte balance." J Clin Invest **123**(10): 4219-4231.

- Guyton, A. C. (1987). "Renal function curve--a key to understanding the pathogenesis of hypertension." Hypertension **10**(1): 1-6.
- Guyton, A. C. (1991). "Abnormal renal function and autoregulation in essential hypertension." Hypertension **18**(5 Suppl): III49-53.
- Hall, J. E., A. C. Guyton, M. J. Smith, Jr. and T. G. Coleman (1980). "Blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake: role of angiotensin." Am J Physiol **239**(3): F271-280.
- Hall, J. E., H. L. Mizelle and L. L. Woods (1986). "The renin-angiotensin system and long-term regulation of arterial pressure." J Hypertens **4**(4): 387-397.
- Harris, R. C., M. Z. Zhang and H. F. Cheng (2004). "Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system." Acta Physiol Scand **181**(4): 543-547.
- Hebert, R. L., H. R. Jacobson and M. D. Breyer (1990). "PGE2 inhibits AVP-induced water flow in cortical collecting ducts by protein kinase C activation." Am J Physiol **259**(2 Pt 2): F318-325.
- Hebert, R. L., H. R. Jacobson, D. Fredin and M. D. Breyer (1993). "Evidence that separate PGE2 receptors modulate water and sodium transport in rabbit cortical collecting duct." Am J Physiol **265**(5 Pt 2): F643-650.
- Higuchi, S., H. Ohtsu, H. Suzuki, H. Shirai, G. D. Frank and S. Eguchi (2007). "Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology." Clin Sci (Lond) **112**(8): 417-428.
- Hu, Z. W., R. Kerb, X. Y. Shi, T. Wei-Lavery and B. B. Hoffman (2002). "Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells." J Pharmacol Exp Ther **303**(2): 563-573.
- Kemp, B. A., N. L. Howell, S. R. Keller, J. J. Gildea, S. H. Padia and R. M. Carey (2016). "AT2 Receptor Activation Prevents Sodium Retention and Reduces Blood Pressure in Angiotensin II-Dependent Hypertension." Circ Res **119**(4): 532-543.
- Kim, G. H. (2008). "Renal effects of prostaglandins and cyclooxygenase-2 inhibitors." Electrolyte Blood Press **6**(1): 35-41.
- Kim, Y. H., V. Pech, K. B. Spencer, W. H. Beierwaltes, L. A. Everett, E. D. Green, W. Shin, J. W. Verlander, R. L. Sutliff and S. M. Wall (2007). "Reduced ENaC protein abundance contributes to the lower blood pressure observed in pendrin-null mice." Am J Physiol Renal Physiol **293**(4): F1314-1324.
- Klinke R., P. H., Kurtz A., Silbernagl S. (2010). Physiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

- Leviel, F., C. A. Hubner, P. Houillier, L. Morla, S. El Moghrabi, G. Brideau, H. Hassan, M. D. Parker, I. Kurth, A. Kougioumtzes, A. Sinning, V. Pech, K. A. Riemony, R. L. Miller, E. Hummler, G. E. Shull, P. S. Aronson, A. Doucet, S. M. Wall, R. Chambrey and D. Eladari (2010). "The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice." J Clin Invest **120**(5): 1627-1635.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Luttrell, L. M., F. L. Roudabush, E. W. Choy, W. E. Miller, M. E. Field, K. L. Pierce and R. J. Lefkowitz (2001). "Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2449-2454.
- Madin, S. H. and N. B. Darby, Jr. (1958). "Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin." Proc Soc Exp Biol Med **98**(3): 574-576.
- Mamenko, M., O. Zaika, D. V. Ilatovskaya, A. Staruschenko and O. Pochynyuk (2012). "Angiotensin II increases activity of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) in distal nephron additively to aldosterone." J Biol Chem **287**(1): 660-671.
- Mamenko, M., O. Zaika, M. C. Prieto, V. B. Jensen, P. A. Doris, L. G. Navar and O. Pochynyuk (2013). "Chronic angiotensin II infusion drives extensive aldosterone-independent epithelial Na⁺ channel activation." Hypertension **62**(6): 1111-1122.
- Matzdorf, C., A. Kurtz and K. Hoferl (2007). "COX-2 activity determines the level of renin expression but is dispensable for acute upregulation of renin expression in rat kidneys." Am J Physiol Renal Physiol **292**(6): F1782-1790.
- Mehta, P. K. and K. K. Griendling (2007). "Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C82-97.
- Navar, L. G. (2005). "The role of the kidneys in hypertension." J Clin Hypertens (Greenwich) **7**(9): 542-549.
- Navar, L. G., E. W. Inscho, S. A. Majid, J. D. Imig, L. M. Harrison-Bernard and K. D. Mitchell (1996). "Paracrine regulation of the renal microcirculation." Physiol Rev **76**(2): 425-536.
- Nishida, M., S. Tanabe, Y. Maruyama, S. Mangmool, K. Urayama, Y. Nagamatsu, S. Takagahara, J. H. Turner, T. Kozasa, H. Kobayashi, Y. Sato, T. Kawanishi, R. Inoue, T. Nagao and H. Kurose (2005). "G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes." J Biol Chem **280**(18): 18434-18441.

- Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, L. S. Barak and M. G. Caron (2001). "Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*." J Biol Chem **276**(22): 19452-19460.
- Ohnaka, K., K. Numaguchi, T. Yamakawa and T. Inagami (2000). "Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells." Hypertension **35**(1 Pt 1): 68-75.
- Peach, M. J. (1977). "Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action." Physiol Rev **57**(2): 313-370.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.
- Pech, V., T. D. Pham, S. Hong, A. M. Weinstein, K. B. Spencer, B. J. Duke, E. Walp, Y. H. Kim, R. L. Sutliff, H. F. Bao, D. C. Eaton and S. M. Wall (2010). "Pendrin modulates ENaC function by changing luminal HCO₃." J Am Soc Nephrol **21**(11): 1928-1941.
- Peti-Peterdi, J., D. G. Warnock and P. D. Bell (2002). "Angiotensin II directly stimulates ENaC activity in the cortical collecting duct via AT(1) receptors." J Am Soc Nephrol **13**(5): 1131-1135.
- Pham, H., B. Chong, R. Vincenti and L. W. Slice (2008). "Ang II and EGF synergistically induce COX-2 expression via CREB in intestinal epithelial cells." J Cell Physiol **214**(1): 96-109.
- Potthoff, S. A., S. Stamer, K. Grave, E. Konigshausen, S. H. Sivritas, M. Thieme, Y. Mori, M. Woznowski, L. C. Rump and J. Stegbauer (2016). "Chronic p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves vascular function and remodeling in angiotensin II-dependent hypertension." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **17**(3).
- Reilly, A. M., P. J. Harris and D. A. Williams (1995). "Biphasic effect of angiotensin II on intracellular sodium concentration in rat proximal tubules." Am J Physiol **269**(3 Pt 2): F374-380.
- Royaux, I. E., S. M. Wall, L. P. Karniski, L. A. Everett, K. Suzuki, M. A. Knepper and E. D. Green (2001). "Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4221-4226.
- Saccomani, G., K. D. Mitchell and L. G. Navar (1990). "Angiotensin II stimulation of Na(+)-H+ exchange in proximal tubule cells." Am J Physiol **258**(5 Pt 2): F1188-1195.
- Seshiah, P. N., D. S. Weber, P. Rocic, L. Valppu, Y. Taniyama and K. K. Griendling (2002). "Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators." Circ Res **91**(5): 406-413.

Shah, B. H., J. Alberto Olivares-Reyes, A. Yesilkaya and K. J. Catt (2002). "Independence of angiotensin II-induced MAP kinase activation from angiotensin type 1 receptor internalization in clone 9 hepatocytes." Mol Endocrinol **16**(3): 610-620.

Shenoy, S. K., M. T. Drake, C. D. Nelson, D. A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R. T. Premont, O. Lichtarge and R. J. Lefkowitz (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." J Biol Chem **281**(2): 1261-1273.

Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2011). "beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction." Trends Pharmacol Sci **32**(9): 521-533.

Sparks, M. A., S. D. Crowley, S. B. Gurley, M. Mirotsoy and T. M. Coffman (2014). "Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology." Compr Physiol **4**(3): 1201-1228.

Stegbauer, J., D. Chen, M. Herrera, M. A. Sparks, T. Yang, E. Konigshausen, S. B. Gurley and T. M. Coffman (2017). "Resistance to hypertension mediated by intercalated cells of the collecting duct." JCI Insight **2**(7): e92720.

Sugden, P. H. and A. Clerk (1997). "Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors." Cell Signal **9**(5): 337-351.

Sun, P., P. Yue and W. H. Wang (2012). "Angiotensin II stimulates epithelial sodium channels in the cortical collecting duct of the rat kidney." Am J Physiol Renal Physiol **302**(6): F679-687.

Teng-umnuay, P., J. W. Verlander, W. Yuan, C. C. Tisher and K. M. Madsen (1996). "Identification of distinct subpopulations of intercalated cells in the mouse collecting duct." J Am Soc Nephrol **7**(2): 260-274.

Thomas, W. G. and H. Qian (2003). "Arresting angiotensin type 1 receptors." Trends Endocrinol Metab **14**(3): 130-136.

Touyz, R. M. (2005). "Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II." Exp Physiol **90**(4): 449-455.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Verlander, J. W., K. A. Hassell, I. E. Royaux, D. M. Glapion, M. E. Wang, L. A. Everett, E. D. Green and S. M. Wall (2003). "Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension." Hypertension **42**(3): 356-362.

Verlander, J. W., S. Hong, V. Pech, J. L. Bailey, D. Agazatian, S. W. Matthews, T. M. Coffman, T. Le, T. Inagami, F. M. Whitehill, I. D. Weiner, D. B. Farley, Y. H. Kim and S.

M. Wall (2011). "Angiotensin II acts through the angiotensin 1a receptor to upregulate pendrin." Am J Physiol Renal Physiol **301**(6): F1314-1325.

Verlander, J. W., Y. H. Kim, W. Shin, T. D. Pham, K. A. Hassell, W. H. Beierwaltes, E. D. Green, L. Everett, S. W. Matthews and S. M. Wall (2006). "Dietary Cl(-) restriction upregulates pendrin expression within the apical plasma membrane of type B intercalated cells." Am J Physiol Renal Physiol **291**(4): F833-839.

Violin, J. D., S. M. DeWire, D. Yamashita, D. H. Rominger, L. Nguyen, K. Schiller, E. J. Whalen, M. Gowen and M. W. Lark (2010). "Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance." J Pharmacol Exp Ther **335**(3): 572-579.

Wei, H., S. Ahn, S. K. Shenoy, S. S. Karnik, L. Hunyady, L. M. Luttrell and R. J. Lefkowitz (2003). "Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10782-10787.

Welch, B. D., N. G. Carlson, H. Shi, L. Myatt and B. K. Kishore (2003). "P2Y2 receptor-stimulated release of prostaglandin E2 by rat inner medullary collecting duct preparations." Am J Physiol Renal Physiol **285**(4): F711-721.

Whalen, E. J., S. Rajagopal and R. J. Lefkowitz (2011). "Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists." Trends Mol Med **17**(3): 126-139.

Wunsch, S., M. Gekle, U. Kersting, B. Schuricht and H. Oberleithner (1995). "Phenotypically and karyotypically distinct Madin-Darby canine kidney cell clones respond differently to alkaline stress." J Cell Physiol **164**(1): 164-171.

Xing, M., B. L. Firestein, G. H. Shen and P. A. Insel (1997). "Dual role of protein kinase C in the regulation of cPLA2-mediated arachidonic acid release by P2U receptors in MDCK-D1 cells: involvement of MAP kinase-dependent and -independent pathways." J Clin Invest **99**(4): 805-814.

Yan, C., D. Kim, T. Aizawa and B. C. Berk (2003). "Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(1): 26-36.

Yang, T., Y. Endo, Y. G. Huang, A. Smart, J. P. Briggs and J. Schnermann (2000). "Renin expression in COX-2-knockout mice on normal or low-salt diets." Am J Physiol Renal Physiol **279**(5): F819-825.

Yang, T., I. Singh, H. Pham, D. Sun, A. Smart, J. B. Schnermann and J. P. Briggs (1998). "Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake." Am J Physiol **274**(3 Pt 2): F481-489.

Zelenina, M., B. M. Christensen, J. Palmer, A. C. Nairn, S. Nielsen and A. Aperia (2000). "Prostaglandin E(2) interaction with AVP: effects on AQP2 phosphorylation and distribution." Am J Physiol Renal Physiol **278**(3): F388-394.

Zewde, T. and D. L. Mattson (2004). "Inhibition of cyclooxygenase-2 in the rat renal medulla leads to sodium-sensitive hypertension." Hypertension **44**(4): 424-428.

Danksagung

Zu allererst danke ich Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump für die Möglichkeit in der experimentellen Nephrologie zu forschen.

Meinem Doktorvater PD Dr. med. Johannes Stegbauer danke ich für die Bereitstellung des spannenden Themas. Seine Unterstützung während der gesamten Phase der Dissertation war unermüdlich. Seine Begeisterung für die Forschung und seine stete Motivation haben mich immer wieder inspiriert und so auch erheblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Allen Labormitgliedern danke ich für eine tolle Zeit während meiner Forschung. Eine große Unterstützung habe ich dabei durch die technischen Assistentinnen, Blanka Duvnjak und Christina Schwandt, erfahren. Von der Einarbeitung im Labor bis hin zur Durchführung meiner Experimente standen sie mir stets zur Seite. Besonders durch Barbara, Clara und Raphael ist die Laborzeit für mich unvergesslich geworden. Aus Mitdoktoranden habe ich Freunde fürs Leben gewonnen. Vor allem unsere Weihnachtsfeiern werde ich vermissen.

Hafez danke ich für seine bedingungslose Hilfe in jeder Situation.

Meinen Geschwistern Aylin, Sabiha und Arda möchte ich besonders für ihre Motivation danken. Sie haben meinen Werdegang stets mit großem Interesse begleitet und immer an mich geglaubt.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern. Durch ihre Unterstützung konnte ich mein Studium und die Dissertation meistern. Sie waren immer für mich da. Daher widme ich ihnen meine Dissertation.