

Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Fritz

Auswirkungen einer NADPH-Oxidase 1-Defizienz auf den oxidativen
Stress in der Niere und den Blutdruck unter der Behandlung mit
Angiotensin II

Dissertation

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

vorgelegt von

Nora Lea Spicker

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. Nicole Schupp

Zweitgutachter: PD Dr. Patrick Horn (Klinik für Kardiologie, Pneumologie & Angiologie)

Für meine Eltern

in Dankbarkeit und Liebe

Zusammenfassung

Neun Millionen Menschen sterben jedes Jahr weltweit an den Folgen einer arteriellen Hypertonie. Unter arterieller Hypertonie ist neben vaskulären Folgeschäden auch das Risiko für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms erhöht.

Eines der wichtigsten Hormone, das den Blutdruck reguliert, ist Angiotensin II (Ang II). Werden Mäuse mit pathophysiologischen Dosen AngII behandelt, so steigt ihr Blutdruck. In der Niere steigt die Anzahl an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und DNA-Doppelstrangbrüchen. Erhöhte Mengen an ROS induzieren oxidativen Stress. Oxidativer Stress entsteht bei einem Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Komponenten. ROS werden besonders durch NADPH-Oxidasen (NOX) produziert. NOX sind Multienzymkomplexe. Es gibt verschiedene Formen der NOX, die sich in Vorkommen und Aufbau unterscheiden. Komplexe mit den katalytischen Untereinheiten 1, 2 und 4 (Nox1, Nox2, Nox4) kommen in der Niere vor. Nox1 besteht aus membrangebundenen und zytosolischen Regulatoruntereinheiten: p22^{phox} stabilisiert den NOX-Komplex, NoxO1, NoxA1 und Rac regulieren die Aktivität der Nox1.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich eine Nox1-Defizienz unter einer Behandlung mit AngII auf den oxidativen Stress in der Niere und den Blutdruck auswirkt. Nox1-defiziente Mäuse wurden über 28 Tage mit Hilfe von osmotischen Minipumpen mit AngII oder mit PBS als Negativkontrolle behandelt. Während der 28 Tage wurde der Blutdruck gemessen und anschließend die Nieren entnommen.

Die drei bedeutendsten Erkenntnisse dieser Arbeit waren:

1. Die Nox1-Defizienz verminderte die Blutdruckerhöhung durch AngII zum Versuchsende signifikant.
2. Eine Nox1-Defizienz verminderte die Anzahl an DNA-Strangbrüchen in der Niere signifikant. Die Lipidperoxidation wurde tendenziell durch eine Nox1-Defizienz vermindert.
3. Die Nox1 war nicht der Hauptproduzent der ROS in der Niere. Eine Nox1-Defizienz aktivierte nicht verstärkt das oxidative Abwehrsystem. Eine Albuminurie wurde unter Nox1-Defizienz verstärkt. Zudem wurde die Ausbildung gesunder Glomeruli, eines gesunden Tubulussystems und gesunder Nierengefäße verhindert.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Nox1 an der Blutdruckerhöhung durch AngII beteiligt ist. Eine Hypertrophie der Media in den Nierengefäßen und eine Glomerulosklerose waren in den Nox1-defizienten Tieren stärker ausgeprägt. Die Nox1 scheint im Hinblick auf die Ausbildung eines gesunden Tubulussystems auch protektive Eigenschaften zu besitzen. Eine mögliche Erklärung für die nur gering verminderte Anzahl an ROS in der Niere, aber der signifikant geringeren Anzahl an DNA-Strangbrüchen könnte sein, dass nicht alle detektierten ROS in der Niere schädigend wirken. Die Hauptfunktionen der ROS sind die Unterstützung der Immunabwehr und die Signaltransduktion.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit wichtige Einblicke in die Wirkweise des AngII und der Nox1. Nox1 ist unseren Ergebnissen nach an der AngII-induzierten Erhöhung des Blutdrucks beteiligt, sowie an der Vermittlung von AngII-induzierten DNA-Strangbrüchen in der Niere. Diese Erkenntnisse können besonders für Patienten mit AngII-induzierter Hypertonie von Vorteil sein. In einem nächsten Schritt sind Untersuchungen mit Nox1-Hemmern unter der Behandlung mit AngII aufschlussreich. Untersuchungen der Nox1-Defizienz im Langzeitmodell können weitere wichtige Aufschlüsse zur Funktion der Nox1 liefern.

Summary

Nine million people die every year worldwide from the consequences of arterial hypertension. Arterial hypertension not only causes subsequent vascular damage but also increases the risk of developing renal cell carcinoma.

Angiotensin II (Ang II) is one of the most important hormones that regulates blood pressure. Mice treated with pathological concentrations of AngII show a rise in blood pressure. Also, in the kidney, the amount of reactive oxygen species (ROS) and DNA double-strand breaks increases. Increased presence of ROS induces oxidative stress. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between oxidative and antioxidative components. ROS are particularly produced by NADPH oxidases (NOX). NOX are multienzyme complexes. There are different forms of NOX, which differ in occurrence and structure. Complexes with the catalytic subunits 1, 2 and 4 (Nox1, Nox2, Nox4) are present in the kidney. Nox1 consists of membrane-bound and cytosolic regulatory subunits: p22phox stabilizes the NOX complex, NoxO1, NoxA1 and Rac regulate the activity of Nox1.

The aim of this study was to investigate the effects of Nox1 deficiency on oxidative stress in the kidney and blood pressure when treated with AngII. Nox1-deficient mice were treated with osmotic mini pumps containing AngII or PBS as a negative control for 28 days. During the 28 days, blood pressure was measured and the kidneys were removed afterwards.

The three most important results of this work were:

1. Nox1 deficiency significantly decreased the elevation in blood pressure induced by AngII.
2. Nox1 deficiency significantly reduced the number of DNA strand breaks in the kidney. Lipid peroxidation tended to be reduced by Nox1 deficiency.
3. Nox1 was not the main producer of ROS in the kidney. A Nox1 deficiency did not activate the oxidative defense system. Albuminuria was amplified under Nox1 deficiency. In addition, the formation of healthy glomeruli, a healthy tubular system and healthy kidney vessels was prevented.

The results suggest that Nox1 is involved in the increase in blood pressure caused by AngII. Hypertrophy of the media in the renal vessels and glomerulosclerosis were more present in Nox1-deficient animals. Nox1 also appears to have protective properties in regard to the formation of a healthy tubular system. One possible explanation for the only slightly reduced number of ROS in the kidney but the significantly lower number of DNA strand breaks could be that not all detected ROS in the kidney have a damaging effect. The main functions of ROS are to support immune defence and signal transduction.

In summary, this work provides important insights into the mode of action of AngII and Nox1. According to our results, Nox1 is involved in the AngII-induced increase in blood pressure as well as in the mediation of AngII-induced DNA strand breaks in the kidney. These findings may be particularly beneficial for patients with AngII-induced hypertension. In a next step, investigations with Nox1-inhibitors under the treatment with AngII could reveal further information. Investigations of Nox1 deficiency in the long-term model can provide further important information on the function of Nox1.

Abkürzungsverzeichnis

·OH	Hydroxylradikal
a. dest.	Aqua destillata
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADH	Antidiuretischen Hormon
AngI	AngiotensinI
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AT1-Rezeptor	Angiotensin1-Rezeptor
AT2-Rezeptor	Angiotensin2-Rezeptor
BRCA	BReast CAncer
BSA	bovines Serumalbumin
CBBG	Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CO	Kohlenstoffmonoxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Duox	Dual-Oxidase
Ecl-Lösung	enhanced chemiluminescence-Lösung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gpx	Glutathionperoxidase
GSI	Glomeruloskleroseindex
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin

HO	Hämoxygenase
HO-1	Hämoxygenase 1
HRP	Meerrettichperoxidase
KO	Knockout
Mox1	Mitogenic Oxidase 1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSI	Mesangiolyseindex
NAC	N-Acetylcystein
NCC	Nierenzellkarzinom
NF-κB	Transkriptionsfaktor: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
Nox	NADPH-Oxidase
NOX	NADPH-Oxidase-Multienzymkomplexe
Nox1-KO	Nox1-Knockout
Nox1-KO-AngII	Nox1-Knockout-Tiere mit Angiotensin II Behandlung
Nox1-KO-K	Nox1-Knockout-Tiere mit der Kontrolle PBS behandelt
O ₂ ⁻	Superoxidanion
PAS	Periodic acid-Schiff-Färbung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNS	reaktive Nitrogen Spezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase, Superoxiddismutase
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20

TMB	Tetramethylbenzidin
TSI	Tubulointestitiellen Schädigungsindex
Txnrd	Thioredoxin-Reduktase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSI	Vaskulären Schädigungsindex
WT	Wildtyp
WT-AngII	Wildtyp-Tiere behandelt mit AngiotensinII
WT-K	Wildtyp-Tiere mit der Kontrolle PBS behandelt, Wildtyp-Kontrolle
XO	Xanthinoxidase

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Niere: Aufbau und Funktion	1
1.2	Regulation des Blutdrucks	4
1.2.1	Systemische und organspezifische Regulationsmechanismen	4
1.2.2	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	4
1.2.3	Das Schlüsselhormon AngII und seine Funktionsweise	5
1.2.4	Das lokale Renin-Angiotensin-System in der Niere	6
1.3	Arterielle Hypertonie: Definition, Prävalenz und Risikofaktoren	7
1.4	Nierenzellkarzinom	8
1.5	Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies	10
1.5.1	Oxidativer Stress: Definition und Entstehungswege	10
1.5.2	Oxidativer Stress: DNA-Veränderungen und Reparaturmechanismen	12
1.5.3	Oxidativer Stress und Hypertonie	13
1.5.4	Oxidativer Stress und Tumorgenese	15
1.6	NADPH-Oxidasen als ROS-Produzenten	17
1.6.1	NADPH-Oxidasen: Isoformen und Aufbau	17
1.6.2	Zusammenhang zwischen Hypertonie, Nox und ROS	18
1.7	Das oxidative Abwehrsystem	19
1.7.1	Komponente des oxidativen Abwehrsystems	19
1.7.2	Therapie mit Antioxidantien	20
1.8	Ziele der Arbeit	21
2	<u>Material und Methoden</u>	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	21
2.1.2	Primer	21
2.1.3	Versuchstiere	21
2.1.4	Genehmigung der Tierversuche	22
2.1.5	Haltung der Versuchstiere	22
2.2	Methoden	22
2.2.1	Eigenleistung	22
2.2.2	Behandlung der Versuchstiere	22
2.2.3	Blutdruckmessung und Materialsammlung zur Messung der Nierenfunktion	23
2.2.4	Entnahme der Nieren	24

2.2.5	Immunhistochemiefärbung mit γ -H2AX	25
2.2.6	Alkalischer Comet-Assay	27
2.2.7	Fluoreszenzfärbung mit Dihydroethidium	28
2.2.8	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	29
2.2.9	Histopathologie	31
2.2.10	Proteinbiochemie	35
2.2.11	Molekularbiologie	38
2.3	Statistik	43
3	<u>Ergebnisse</u>	<u>44</u>
3.1	Validierung des Genotyps der Versuchstiere	44
3.2	Untersuchung des Blutdrucks unter Nox1-Defizienz	
3.3	Veränderung des Körper- und Organgewichtes durch AngII	45
3.4	Einfluss von AngII auf die Nierenfunktion unter Nox1-Defizienz	47
3.4.1	Auswirkungen der Nox1-Defizienz auf die Kreatinin-Clearance	47
3.4.2	Untersuchung der Albuminexkretion unter Nox1-Defizienz	47
3.5	Histopathologische Veränderungen in der Nierenrinde	48
3.5.1	Beurteilung der Gefäßwandhypertrophie unter Nox1-Defizienz	48
3.5.2	Histopathologische Veränderungen des Glomerulus	49
3.5.3	Beurteilung des TSI unter Nox1-Defizienz	51
3.6	Oxidativer Stress in der Niere	52
3.6.1	Beurteilung der Menge an ROS in der Niere unter Nox1-Defizienz	52
3.6.2	Beurteilung der Lipidperoxidation unter Nox1-Defizienz	53
3.6.3	Beurteilung der DNA-Strangbrüche in isolierten Nierenzellen unter Nox1-Defizienz	54
3.6.4	Beurteilung der DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere unter Nox1-Defizienz	55
3.7	Ursachenforschung zur ROS-Bildung unter Nox1-Defizienz	57
3.7.1	Expression der Xanthinoxidase1 unter Nox1-Defizienz	57
3.7.2	Beurteilung einer Kompensation durch Nox2 und Nox4 unter Nox1-Defizienz	59
3.7.3	Expression der Nox1-Regulatoruntereinheiten auf Proteinebene unter Nox1-Defizienz	60
3.8	Untersuchung des oxidativen Abwehrsystems	62
3.8.1	Hintergrund zur Untersuchung des oxidativen Abwehrsystems	62

3.8.2	Expression der antioxidativen Enzyme SOD1 und HO1 unter Nox1-Defizienz auf Proteinebene	62
3.8.3	Expression der antioxidativen Enzyme HO1, SOD1, GPx und Txnrd auf mRNA-Ebene unter Nox1-Defizienz	63
4	<u>Diskussion</u>	<u>65</u>
4.1	Blutdruckverlauf unter Nox1-Defizienz und AngII-Behandlung	66
4.2	Nierenfunktion und Nierenmorphologie unter Nox1-Defizienz	68
4.3	Einfluss der Nox1-Defizienz auf die GefäÙe in der Nierenrinde	70
4.4	DNA-Strangbrüche in der Niere unter Nox1-Defizienz	72
4.5	ROS in der Niere unter Nox1-Defizienz	73
4.6	Xanthinoxidase unter Nox1-Defizienz	74
4.7	Nox2 und Nox4 unter Nox1-Defizienz	75
4.8	NoxO1, NoxA1 und p47 ^{phox} unter Nox1-Defizienz	76
4.9	Oxidatives Abwehrsystem unter Nox1-Defizienz	77
4.10	Ausblick und Schlussfolgerungen	78
5	<u>Literatur- und Quellenverzeichnis</u>	<u>79</u>

1 Einleitung

1.1 Niere: Aufbau und Funktion

Die Niere reguliert den Elektrolyt- und Wasserhaushalt, den Säure-Basen-Haushalt und den Blutdruck, scheidet harnpflichtige Substanzen aus, bildet die Hormone Erythropoetin und Calcitriol und ist an der Gluconeogenese beteiligt.

Die Niere kann makroskopisch in die äußere Nierenrinde und das innere Nierenmark eingeteilt werden. Mikroskopisch besteht die Niere aus dem Tubulussystem mit ca. einer Million Nephronen. Ein Nephron bildet die Funktionseinheit der Niere: Es besteht aus dem Nierenkörperchen, dem proximalen, intermediären und distalen Tubulus und dem Sammelrohr (Abb. 1). Das Nierenkörperchen wird aus drei Teilen gebildet: Dem Glomerulus, dem juxtaglomerulären Apparat und der Bowman-Kapsel (Abb. 2). Innerhalb des Nierenkörperchens befindet sich der Glomerulus: Ein Gefäßknäuel aus *Vas afferens*, den gewundenen Kapillaren und *Vas efferens*. Die Bowman-Kapsel umgibt den Glomerulus. Der juxtaglomeruläre Apparat liegt dem Glomerulus am Gefäßpol an. Die einzelnen Abschnitte des Tubulussystems unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lage in der Niere, ihrem histologischen Aufbau und ihrer Funktion. Elektrolyte, harnpflichtige Substanzen und Wasser werden in den verschiedenen Abschnitten des Tubulussystems in unterschiedlichem Maße resorbiert und sekretiert. In der Nierenrinde liegen die Nierenkörperchen und die gewundenen und geraden Anteile der proximalen Tubuli. Im äußeren Mark befinden sich die geraden Anteile der proximalen und distalen Tubuli, die intermediären Tubuli und die Sammelrohre. Im inneren Mark liegen die Intermediärtubuli und die Sammelrohre. Auch histologisch unterscheiden sich die verschiedenen Abschnitte des Tubulussystems. Die proximalen Tubuli haben ein isoprismatisches, einschichtiges Plattenepithel mit hohem Bürstensaum und Mikrovilli (Abb. 3). Die Intermediärtubuli haben ein einschichtiges Plattenepithel mit linsenförmigem Zellkern und wenigen Mikrovilli. Das Epithel der distalen Tubuli ist niedrig, einschichtig und isoprismatisch ohne Bürstensaum. Die distalen Tubuli besitzen die größte Anzahl an Mitochondrien im Tubulussystem. Die Sammelrohre bestehen histologisch aus Hauptzellen und Schaltzellen. Die Hauptzellen haben ein isoprismatisches Epithel und sind für die Konzentration des Harns zuständig. Die Schaltzellen regulieren den Säure-Basen-Haushalt.

Eine der Hauptaufgaben der Niere ist es, das Blut zu filtrieren und den Endharn zu bilden. Die Nieren werden pro Minute von 20 % des Herzzeitvolumens durchflossen. Im Glomerulus wird das Blut aus den *Vas afferens* und *Vas efferens* zunächst durch die dreischichtige Barriere aus Kapillarendothel, glomerulärer Basalmembran und

Podozyten filtiert. Der Primärharn entsteht und geht in den proximalen Tubulus über. Der Primärharn ähnelt in seiner Zusammensetzung dem Blutplasma. Im Verlauf des gesamten Tubulussystems wird der Primärharn konzentriert: Elektrolyte, Wasser und harnpflichtige Substanzen werden resorbiert und sekretiert. In den Sammelrohren entsteht der Endharn.

Zwischen *Vas afferens* und *Vas efferens* liegt der juxtaglomeruläre Apparat. Er besteht aus extraglomerulären Mesangiumzellen, reninbildenden juxtaglomerulären Zellen und Macula-densa-Zellen. Im juxtaglomerulären Apparat findet die tubuloglomeruläre Rückkopplung sowie die Reninbildung statt. Renin ist eine Protease und Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Kapitel 1.2.2). Die tubuloglomeruläre Rückkopplung dient der Anpassung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) an die tubuläre Resorption. Die tubuloglomeruläre Rückkopplung verhindert, dass zu viel Blut filtiert wird, das heißt dass die GFR höher ist als die Resorptionskapazität des Tubulussystems. Die Macula densa misst die Chloridkonzentration im Tubulussystem. Bei einem hypertonen Harn mit hoher Chloridkonzentration wird Adenosin freigesetzt und das *Vas afferens* kontrahiert. Durch den verminderten Kapillardruck sinkt die GFR. Es gibt verschiedene Parameter anhand derer man die Nierenfunktion messen kann. Hier werden zwei Parameter beschrieben: Die Kreatininclearance als Parameter für die Nierenfunktion und die Albuminurie als Hinweis für einen morphologischen Schaden im Nierenkörperchen. Die GFR ist ein Indikator für die Nierenfunktion. Die GFR kann indirekt anhand der Kreatinin-Clearance berechnet werden. Kreatinin ist ein Abbauprodukt des Kreatins aus dem Muskel. Kreatinin wird im Tubulussystem kaum rückresorbiert. Es kann daher anhand der Konzentration von Kreatinin im Urin und im Serum die GFR berechnet werden. Der Kreatininwert ist sehr störanfällig. Erst ab einer Reduktion der GFR von $\geq 50\%$ steigt der Kreatininwert im Serum an. Viel Muskelmasse, eine hohe Proteinzufuhr und schwere körperliche Arbeit können Ursache eines falsch-positiven Kreatininwerts sein. Eine Albuminurie, das heißt eine Konzentration von ≥ 20 mg/L Albumin im Urin, kann ein Hinweis für eine hypertensive oder diabetische Nierenschädigung sein. Ein hoher Blutdruck erhöht die Permeabilität des glomerulären Kapillarendothels und schädigt die Podozyten. So gelangen größere Mengen an Albumin in den Primärharn.

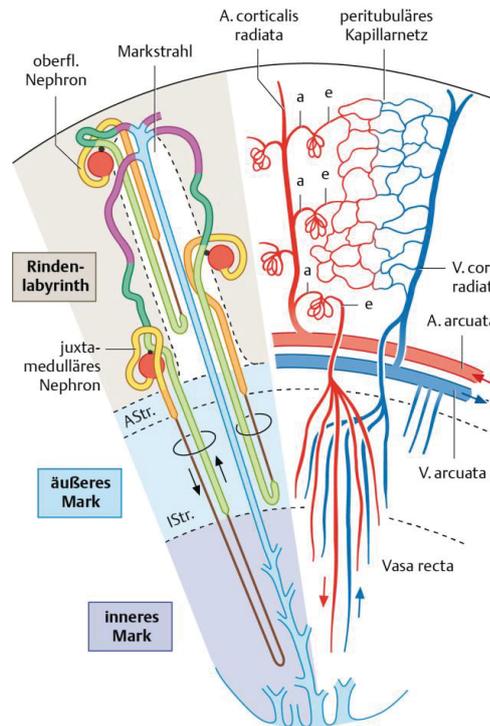


Abb. 1: Schematische Darstellung der Niere: Mikroskopischer Aufbau der Nierenrinde und des Nierenmarks. Links ist das Tubulussystem dargestellt mit Glomerulus (rot), proximalem (orange und gelb) und distalem Tubulus (grün), Henle-Schleife (braun) und Sammelrohr (blau). Rechts ist das venöse und arterielle Gefäßsystem dargestellt mit Gefäßknäuel und *Vas afferens* und *Vas efferens* (rechts). Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, Thieme, 4. Auflage, 2012 [1]. Druckgenehmigung durch Thieme.

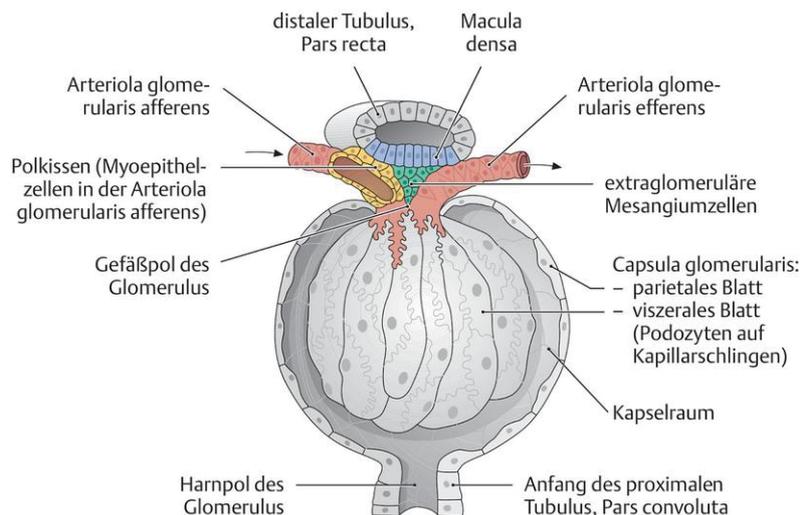


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Nierenkörperchens mit Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole (rot), umliegender Bowman-Kapsel und Mesangiumzellen (grün). Das Blut wird aus dem Gefäßsystem durch das fenestrierte Kapillarendothel mit der negativ geladenen Glycocalix, durch die glomeruläre Basalmembran und die Podozyten filtriert. Prometheus Lernatlas, Thieme, 3. Auflage. https://eref.thieme.de/ebooks/1124610#/ebook_1124610_SL47004553 am 30.07.2018. Druckgenehmigung durch Thieme.



Abb. 3: Histologische Färbung mit Azan des proximalen und distalen Tubulus. Präparat von Prof. Dr. Wilhelm Kriz, Heidelberg. Vergrößerung 800-fach. Abbildung nach Kühnel, Taschenatlas Histologie, Thieme, 2014. Druckgenehmigung durch Thieme.

1.2 Regulation des Blutdrucks

1.2.1 Systemische und organspezifische Regulationsmechanismen

Die Regulation des Blutdrucks gewährleistet, dass die Organperfusion in jeder Situation schnellstmöglich angepasst wird und die Vitalfunktionen aufrecht erhalten werden. Der Körper verfügt über systemische und organspezifische Regulationsmechanismen. Die systemischen Regulationsmechanismen lassen sich einteilen in kurz- und langfristige Mechanismen. Kurzfristig wird der Blutdruck durch den Parasympathikus und den Sympathikus reguliert. Pressor-, Volumen-, und Chemorezeptoren detektieren eine Veränderung des Blutdrucks. Sympathikus und Parasympathikus regulieren daraufhin den arteriellen und venösen Gefäßtonus und die Herzfrequenz. Die Volumenrezeptoren befinden sich im Vorhof sowie in der A. pulmonalis. Bei einem hohen Blutdruck wird der Vorhof gedehnt (Vorhofdehnungsreflex) und das atriale natriuretische Peptid (ANP) in den Herzvorhöfen freigesetzt. Zudem wird die Natriumchlorid- und Wasserretention in der Niere und der Parasympathikotonus erhöht. Bei Hypotonie schüttet der Hypothalamus das Antidiuretische Hormon (ADH) aus (Gauer-Henry-Reflex).

Das RAAS, der Gauer-Henry-Reflex und der Vorhofdehnungsreflex regulieren längerfristig den Blutdruck.

1.2.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das RAAS reguliert längerfristig den arteriellen Blutdruck. Das RAAS erhöht den arteriellen Blutdruck und passt die GFR an. Dies geschieht unter anderem durch eine verstärkte Wasserretention in der Niere und eine gesteigerte Natriumresorption im proximalen Tubulus (Abb. 4). Fünf Hormone bilden den Hauptbestandteil des RAAS.

Bei Hypotonie (systolisch $< 80\text{mmHg}$), Hypovolämie, Hyponatriämie und Sympathikusaktivierung wird in der Niere im juxtaglomerulären Apparat das Hormon Renin ausgeschüttet [2]. Renin ist eine Protease. Renin spaltet das Prohormon Angiotensinogen aus der Leber und dem Fettgewebe in Angiotensin I (AngI) [3]. Das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) aus den Endothelzellen der Lunge konvertiert AngI zu AngII. Renin ist das konzentrationsbestimmende Hormon für AngI und AngII im Plasma. Veränderungen der Angiotensinogen-Expression finden zu langsam statt und können daher die AngI- und AngII-Konzentration nicht kurzfristig verändern [4]. AngII bindet an die AngII-Rezeptor-Subtypen 1 und 2 (AT1-, AT2-Rezeptor). Zudem stimuliert AngII die Aldosteronsynthese. Aldosteron ist ein Mineralcorticoid, das die Natriumresorption und die Kaliumausscheidung in der Niere steigert. Zusammenfassend erhöht das RAAS über die Hormonkaskade den Blutdruck. Auf die vielfältigen Funktionen von AngII wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen.

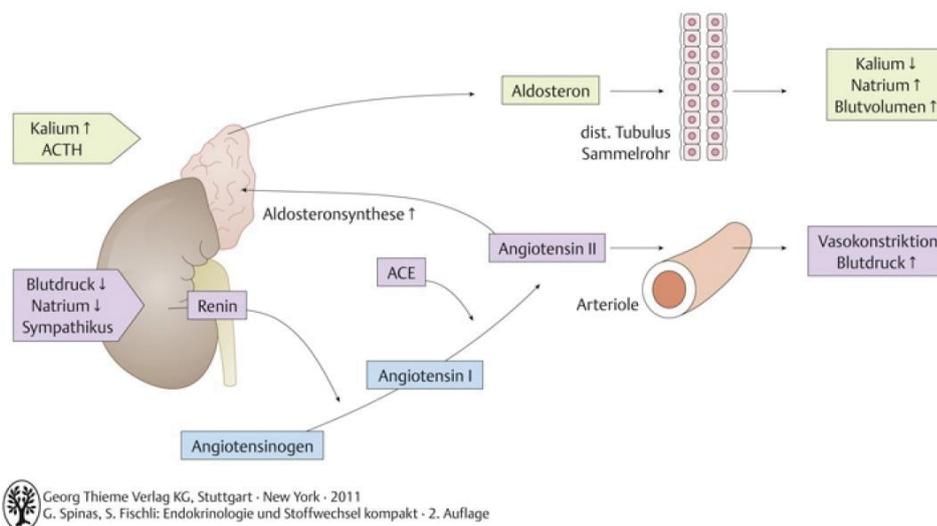


Abb. 4: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Durch Faktoren wie ein niedriger Blutdruck und eine geringe Serum-Natriumkonzentration wird Renin in der Niere ausgeschüttet und spaltet Angiotensinogen zu AngI. AngI wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in AngII gespalten. AngII vermittelt eine Vasokonstriktion und stimuliert die Aldosteronausschüttung. Das RAAS erhöht über die verschiedenen Mechanismen den Blutdruck. Abbildung aus „Endokrinologie und Stoffwechsel kompakt“, 2. Auflage, Thieme, 2011. Druckgenehmigung durch Thieme.

1.2.3 Das Schlüsselhormon AngII und seine Funktionsweise

Angiotensine sind Peptidhormone. Neben AngI und AngII können Angiotensin 1-7, AngIII und IV unterschieden werden [2]. AngII ist der bekannteste Vertreter der Angiotensine und das Hormon des RAAS mit den vielfältigsten Wirkweisen. Es setzt sich aus acht Aminosäuren zusammen. Aus AngI spaltet ACE AngII.

AngII wirkt über zwei Rezeptoren: Die G-Protein-gekoppelten Angiotensin1- und Angiotensin2-Rezeptoren (AT1- und AT2-Rezeptor). Die Affinität der beiden Rezeptoren zu AngII ist ähnlich. Der AT1- und AT2-Rezeptor haben zum Teil gegensätzliche Funktionen. Bindet AngII an den AT1-Rezeptor wird der Blutdruck erhöht: Durch Vasokonstriktion, verstärkter glomerulärer Natriumrückresorption, verstärktem Durstgefühl, Salz hunger und einer Stimulation der Aldosteron-Ausschüttung [5]. Der AT1-Rezeptor kommt in der Niere vor, in Gefäßwänden, Nebenniere, Herz, im zentralen Nervensystem und im peripheren Nervensystem.

Der AT2-Rezeptor vermittelt über Bradykinin eine Vasodilatation und eine verstärkte Natriumexkretion. Über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wirkt der AT2-Rezeptor antiinflammatorisch in Niere und Herz und vermindert oxidativen Stress. Der AT2-Rezeptor kommt in Niere, Gehirn, Leber, Ovarien, Uterus und Herz vor und spielt eine Rolle bei der Embryogenese [6].

In den glatten Muskelzellen der Gefäße aktiviert AngII die NAPH-Oxidase (NOX) (Kapitel 1.6.1) und stimuliert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [7]. Auch verstärkt AngII die Zytokinproduktion und Lipidperoxidation [8]. Erhöhte AngII-Konzentrationen können zellschädigend wirken indem sie das Zellwachstum und die Expression von Protoonkogenen stimulieren sowie die Erhöhung der Anzahl an ROS [9, 10].

Zusammenfassend ist AngII das Schlüsselhormon des RAAS und zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutdrucks ein wichtiger Bestandteil der Hormonkaskade. Eine hohe Konzentration an AngII in Geweben und Gefäßen kann den Zellmetabolismus beeinträchtigen.

1.2.4 Das lokale Renin-Angiotensin-System in der Niere

Neben dem systemischen RAAS existieren lokale Renin-Angiotensin-Systeme (RAS) in Gehirn, Herz, Gefäßen, Nebennieren und Nieren [11]. Das lokale RAS in der Niere ist von besonderer Bedeutung, da alle Komponente des systemischen RAAS auch in der Niere synthetisiert werden, durch den Blutfluss zur Niere transportiert werden oder aus Vorprodukten gespalten werden [2]. Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen, die sich zwischen *Vas afferens* und *Vas efferens* befinden, synthetisiert. Angiotensinogen wird in der Niere in den proximalen Tubuli synthetisiert und gelangt über den Blutfluss in die Niere. AngI gelangt ebenfalls über den Blutfluss in die Niere. ACE befindet sich im proximalen und distalen Tubulus, in den Sammelrohren und den Endothelzellen. AngII kann somit lokal in der Niere aus AngI abgespalten werden. Anders als beim systemischen RAAS, bei dem Renin das konzentrationsbestimmende

Hormon im Plasma ist, ist Angiotensinogen in der Niere das konzentrationsbestimmende Prohormon für AngII [12].

Tiere, die mit AngII behandelt wurden, weisen einen erhöhten Blutdruck auf. Die AngII-Konzentration in der Niere ist bei diesen Tieren um ein Vielfaches höher als im Plasma [13]. Man nimmt an, dass das systemisch applizierte AngII das lokale RAS in der Niere aktiviert [2]. Mäuse, die genetisch so verändert wurden, dass sie in der Niere kein ACE besitzen, zeigen trotz systemischer AngII-Infusion und erhöhter AngII-Plasmakonzentration einen geringeren Blutdruckanstieg als die Kontrolltiere [14]. Der ausbleibende Blutdruckanstieg bei einem dysfunktionalen lokalen RAS in der Niere weist darauf hin, dass das lokale RAS der Niere den systemischen Blutdruck beeinflusst. Bei Patienten mit AngII-induzierter Hypertonie kann die Aktivität des RAS über die Konzentration an Angiotensinogen im Urin bestimmt werden [15]. Die zielführende Therapie bei diesen Patienten ist die Applikation von ACE-Hemmern.

Festzuhalten ist, dass die Niere ein lokales RAS besitzt, das unabhängig vom systemischen RAAS funktioniert. Die Konzentrationen von AngII können in der Niere um ein Vielfaches höher sein als im Plasma. Auch innerhalb der Niere kann sich die AngII-Konzentration lokal unterscheiden [16]. Die hohe Konzentration an AngII bei Dysregulation des RAS kann zu oxidativem Stress und Zellschäden, wie DNA-Strangbrüchen (Desoxyribonukleinsäure), in der Niere führen.

1.3 Arterielle Hypertonie: Definition, Prävalenz und Risikofaktoren

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert die arterielle Hypertonie als einen systolischen und diastolischen Blutdruck von über 140/90mmHg (Milde Hypertonie Stufe 1). Eine Milliarde Menschen leben nach den Angaben der WHO weltweit mit einem erhöhten arteriellen Blutdruck. Neun Millionen Menschen sterben jedes Jahr an den Folgen einer arteriellen Hypertonie [17].

Die arterielle Hypertonie zählt zu den Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. Die Ursachen der arteriellen Hypertonie sind multifaktoriell: Genetische und soziale Faktoren sowie das Umfeld des Patienten haben einen Einfluss auf den Blutdruck. Der Lebensstil in den Industrienationen ist eng mit einem erhöhten arteriellen Blutdruck assoziiert: Mangel an körperlicher Bewegung, zucker- und fetthaltige Nahrungsmittel, Übergewicht, Stress, übermäßiger Kochsalzkonsum, Alkohol-, und Tabakkonsum.

Je nach Ursache der arteriellen Hypertonie wird eingeteilt in eine primäre und sekundäre Hypertonie. In 90 % der Fälle ist die Ursache der Hypertonie unbekannt: Es liegt eine primäre (essentielle) Hypertonie ohne erkennbare Grunderkrankung vor. Entsteht ein erhöhter Blutdruck in Folge einer Grunderkrankung, so spricht man von einer sekundären arteriellen Hypertonie. Zu den häufigsten Formen der sekundären

Hypertonie zählen Erkrankungen des renalen und endokrinen Systems. Eine Hypertonie renaler Ursache ist häufig durch eine einseitige Stenose einer Nierenarterie bedingt. Die betroffene Niere wird minderperfundiert und das RAAS aktiviert [18]. So wird zum einen die Nierenperfusion erhöht und eine Ischämie verhindert, zum anderen erhöhen die Hormone des RAAS den peripheren Blutdruck und unterstützen die Entwicklung einer Hypertonie.

Ein erhöhter Blutdruck stellt die Basis multipler Folgeerkrankungen dar. 45 % der Myokardinfarkte und 51 % der Schlaganfälle sind Folge einer Hypertonie [17]. Wie in Kapitel 1.4 bereits erwähnt, begünstigt die arterielle Hypertonie die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms (NCC) [19]. Arterielle Hypertonie führt zu histopathologischen Veränderungen in der Niere wie tubulointerstitieller Fibrose (hypertensive Nephrosklerose) und Podozytendegeneration [20]. Diese strukturellen Veränderungen führen zunächst zu einer Mikroalbuminurie und später zur Makroalbuminurie mit chronischer Niereninsuffizienz und Schrumpfnieren im Endstadium. Wir untersuchten, ob AngII über Nox1 zu vermehrtem oxidativen Stress in der Niere führt und so die Entstehung des NCCs begünstigt.

1.4 Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (NCC) gehört zu den zehn häufigsten Karzinomen weltweit. Die höchste Inzidenz weltweit findet sich in der Tschechischen Republik (Inzidenz 22/100.000 bei Männern, 9.9/100.000 bei Frauen), die geringste Inzidenz in Afrika und Asien [21]. 2012 wurden in Afrika bei 1/100.000 Personen ein NCC diagnostiziert, in Europa bei 16/100.000 Personen. Besonders betroffen sind die Industrienationen, in denen die Inzidenz mehr als doppelt so hoch ist wie in den Entwicklungsländern. Diese epidemiologische Verteilung beruht unter anderem auf besseren diagnostischen Mitteln in den Industrienationen und der Verteilung der Risikofaktoren [21]. Das NCC tritt bei Männern doppelt so häufig auf wie bei Frauen. Die Prävalenz ist zwischen dem 55. und 74. Lebensjahr am höchsten [21].

Das NCC geht vom Epithel des Tubulussystems aus und wird histologisch in verschiedene Subtypen unterteilt. Die drei häufigsten Formen sind das NCC vom klarzelligen, papillären und chromophoben Typ. Mit 70 % ist das klarzellige NCC das häufigste maligne NCC: Die Zellen des proximalen Tubulussystems entarten und weisen ein eosinophiles Zytoplasma auf. Charakteristisch sind Gefäßeinlagerungen im Tumorgewebe [22]. Neben den drei häufigsten Formen des NCC sind die restlichen 10-15 % der NCCs Tumore anderer Art. Sie kommen jeweils mit einer Häufigkeit von ≤ 1 % vor [23]. Darunter fallen unter anderem das Nierenzellkarzinom im Endstadium der Niereninsuffizienz, das papilläre Adenom, das erblich bedingte NCC, das

Angiomyolipom, das Sammelrohrkarzinom (Ductus-Bellini-Karzinom), das medulläre Karzinom und das muzinös tubuläre und spindelzellige Karzinom [24].

Zu den meist belegten Risikofaktoren für die Entwicklung eines NCCs zählen: Tabakkonsum, Übergewicht, eine zystisch veränderte Niere und arterielle Hypertonie [21]. Auch eine salzreiche Ernährung erhöht das Risiko für ein NCC [25]. Im Vergleich zu Nichtrauchern haben Raucher ein relatives Risiko von 1,38 an einem NCC zu erkranken [26]. Die Karzinogene des Zigarettenrauchs werden inhaliert, konsumiert oder treten ins Blut über [27]. Das harnableitende System kommt mit den Karzinogenen in Kontakt, wenn diese über den Urin ausgeschieden werden [28]. Benzopyrene sind Karzinogene im Zigarettenrauch. Sie induzieren die Bildung von ROS und DNA-Addukten. Die DNA-Addukte kommen auch in Geweben und Organen vor, die nicht direkt mit dem Zigarettenrauch in Kontakt sind. Bei Rauchern kommen mehr DNA-Addukte in der Mukosa des Kolons vor als bei Nichtrauchern [29]. DNA-Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder in dem für K-Ras kodierenden Gen werden durch Karzinogene induziert [30, 31]. Unabhängig vom Geschlecht, einer antihypertensiven Medikation, dem Body-Mass-Index und Tabakkonsum führen erhöhte systolische und diastolische Blutdruckwerte zu einem zwei- bis dreifach erhöhten Risiko für ein NCC [32]. In einer anderen Studie wurden Patienten untersucht, die bereits eine antihypertensive Therapie erhielten, der Blutdruck aber nicht dem Therapiezielwert entsprach. Bei diesen Patienten war das Risiko für ein NCC doppelt so hoch wie bei normotensiven Patienten [33]. In den Vereinigten Staaten von Amerika ist die Inzidenz für ein NCC für Personen der schwarzen Bevölkerung um 19 % höher als für Personen der weißen Bevölkerung [34]. Die Prävalenz des Bluthochdrucks als Risikofaktor für das NCC ist ebenfalls in der schwarzen Bevölkerung höher als in der weißen (Prävalenz 39 % in der schwarzen Bevölkerung, 28 % in der weißen Bevölkerung) [35]. Für jede 5 kg/m² des Body-Mass-Index erhöht sich das Risiko für ein NCC bei Männern um 24 % und bei Frauen um 34 % [36]. Zusammenfassend sind die drei häufigsten modifizierbaren Risikofaktoren für die Entstehung eines NCCs das Vorliegen eines Bluthochdrucks, Tabakkonsum und Übergewicht (Tabelle 1) [37].

In der Frühphase liegen meist keine Symptome vor. Später kann eine Makrohämaturie auftreten, Flankenschmerz, ein tastbarer Oberbauchtumor und paraneoplastische Syndromen wie Polyglobulie oder Hyperkalzämie. Das NCC metastasiert in Lunge, Knochen, Leber, Gehirn und Haut.

Therapeutisch unterscheidet sich die kurative von der palliativen Therapie. Da das NCC sehr resistent gegenüber Chemotherapeutika ist, ist die First-Line-Therapie eine parenchymsparende oder radikale Nephrektomie mit Lymphknotendissektion bei

Metastasen. Kann der Tumor nicht primär reseziert werden, wird neoadjuvant mit Therapeutika behandelt, die in den Signaltransduktionsweg der Tumorzellen eingreifen. Beispiele sind der Multikinase-Inhibitor Sorafenib, der Tyrosinkinase-Hemmer Sunitinib oder mTOR-Inhibitoren (Everolimus, Temsirolimus) sowie VEGF-Antikörper (Bevacizumab).

Der Zusammenhang zwischen Hypertonie und dem Nierenzellkarzinom ist für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung. Oft liegt zwei bis drei Jahre vor der Diagnose des NCCs bereits eine Hypertonie vor [38]. Ein verminderter Blutdruck senkt das Risiko für ein NCC [19]. Nach einer Nephrektomie sinken die erhöhten Blutdruckwerte [38]. Da unter Hypertonie vermehrt ROS in der Niere gebildet werden, gehen wir davon aus, dass ROS den physiologischen Zellmetabolismus beeinträchtigen und so zur Karzinomentstehung in der Niere beitragen [39]. In dieser Arbeit untersuchten wir, ob die NADPH-Oxidase1 (Nox1) an der ROS-Entstehung unter Hypertonie beteiligt ist.

Belegte Risikofaktoren		Vermutliche Risikofaktoren
Modifizierbare	Nicht modifizierbare	
Hypertonie Rauchen	Alter (55-74 Jahre) Geschlecht (Männer > Frauen)	Diabetes Analgetikaeinnahme
Übergewicht	Herkunft Genetisch bedingt Zystisch veränderte Niere	Ernährung Alkoholkonsum

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms. Einteilung nach belegten Risikofaktoren (modifizierbare und nicht modifizierbare) und vermutlichen Risikofaktoren. Nach Kabaria, 2016 [2].

1.5 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

1.5.1 Oxidativer Stress: Definition und Entstehungswege

In den glatten Muskelzellen der Gefäße aktiviert AngII die NOX und stimuliert die ROS-Produktion [7]. Wir untersuchten, ob AngII in der Niere die Nox1 aktiviert, so die Anzahl der ROS erhöht und damit den oxidativen Stress in der Niere erhöht.

Erstmals wurde der Begriff oxidativer Stress 1985 definiert: Von oxidativem Stress spricht man bei Vorliegen eines Ungleichgewichtes von prooxidativen und antioxidativen Komponenten [40]. Pathophysiologisch liegt oxidativer Stress bei vielen Krankheiten vor: Morbus Alzheimer, Idiopathischem Parkinson-Syndrom, Schlaganfall, Arteriosklerose, Hypertonie, Katarakt oder generell bei entzündlichen Prozessen.

ROS sind Verbindungen mit einem Sauerstoffatom, das entweder als Radikal oder als nicht-Radikal vorliegt. Reaktive Nitrogen Spezies (RNS) sind Verbindungen mit einem

Stickstoffatom. Physiologisch fungieren ROS als Signalmoleküle bei embryonalen Prozessen, Zellwachstum, Apoptose und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Phagozyten produzieren ROS zur Immunabwehr. Liegt das Sauerstoff-/Stickstoffatom als Radikal vor, so sind die Verbindungen hochreaktiv und haben das Bestreben, mit anderen Molekülen oder Atomen Verbindungen einzugehen. Bei einem Ungleichgewicht zwischen oxidativen und prooxidativen Komponenten - bei Vorliegen von oxidativem Stress - können ROS zu Zellschäden wie DNA-Strangbrüchen und der Degradation von Lipiden durch Lipidperoxidation führen.

Die Hauptvertreter der ROS/RNS sind das Superoxidanion O_2^- , das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Das Superoxidanion O_2^- ist das Ausgangsmolekül für viele andere ROS wie Wasserstoffperoxid, dem Hydroxylradikal oder Radikalen aus Stickstoffverbindungen. Wasserstoffperoxid entsteht entweder spontan aus dem Superoxidanion oder durch die Superoxiddismutase (SOD). Wasserstoffperoxid ist membranpermeabel.

Es gibt verschiedene Entstehungswege für ROS/RNS. Zigarettenrauch, Alkohol, UV- und Röntgenstrahlung, Pestizide, Ozon und starke körperliche Belastung, aber auch AngII, Aldosteron und Chemokin-Rezeptoren induzieren die Bildung von ROS/RNS [41-44]. Am häufigsten entstehen ROS in der Atmungskette, über die NOX, Lipooxygenase und die Xanthinoxidase. Die wichtigsten Produzenten von ROS sind die NOX. In der Atmungskette entstehen ROS als Nebenprodukte, besonders in den Komplexen I und II. Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) produziert Stickstoffmonoxid (NO). Bei einer NOS-Dysregulation kann das Radikal Superoxidanion und Wasserstoffperoxid entstehen. Eine NOS-Dysregulation entsteht, wenn der Kofaktor der NOS, Tetrahydrobiopterin, durch Radikale oxidiert wird. Diese NOS-Dysregulation spielt eine Rolle bei Hypertonie, Artherosklerose, Diabetes, Ischämie und Schlafapnoe. Mäuse, die keine NOX besitzen, weisen weniger oxidiertes Tetrahydrobiopterin auf und haben ein vermindertes Hypertonie-Risiko [45].

Ein weiterer Entstehungsweg für ROS ist über das Enzym Xanthinoxidoreduktase möglich. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure. Die Xanthinoxidoreduktase kann in zwei Formen vorliegen: Der Xanthindehydrogenase oder der Xanthinoxidase (XO). Unter physiologischen Bedingungen überträgt die Xanthindehydrogenase freierwerdende Elektronen über $FADH_2$ auf NAD^+ und NADH entsteht. Bei inflammatorischen Prozessen, Hypoxie und Strahlung konvertiert die Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase [46]. Elektronen werden nun über FAD auf ein Sauerstoffatom übertragen und die ROS H_2O_2 und O_2^- entstehen [47]. Die Xanthinoxidase ist daher besonders unter pathologischen

Bedingungen neben den Nox ein starker ROS-Produzent. Die XO unterstützt die Entstehung einer Hypertonie [48].

Um die Menge an oxidativem Stress quantifizieren zu können, kann der Anteil der Lipidperoxidation durch die Konzentration an Isoprostanen im Urin gemessen werden. Auch mittels Detektion von γ H2AX, kann die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen gemessen werden. H2AX ist ein Histon. Seine phosphorylierte Form, γ H2AX, bildet sich als Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen. So werden DNA-Reparaturproteine rekrutiert. Mittels eines Antikörpers kann γ H2AX detektiert werden und damit die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche gemessen werden.

1.5.2 Oxidativer Stress: DNA-Veränderungen und Reparaturmechanismen

Veränderungen an der Basensequenz der DNA verändern das Erbgut. Eine dauerhafte Veränderung des Erbguts ist eine Mutation. Kanzerogen ist eine Mutation dann, wenn mit der Mutation zusammen das Zellwachstum verändert wird. Mutationen können durch drei Mechanismen entstehen: Erstens exogen durch physikalische Mutagene, wie UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung, die die Bildung von freien Radikalen erzeugt. Zweitens exogen durch chemische Mutagene wie Alkylanzien und aromatische Kohlenwasserstoffe. Und drittens endogen durch Fehler, die zufällig während der Replikation entstehen. DNA-Läsionen können in drei große Gruppen eingeteilt werden: Strangbrüche, Basenmodifikationen und Basenverluste (Tabelle 2). Bei den Strangbrüchen kann entweder nur ein Strang (Einzelstrangbruch) unterbrochen werden oder beide (Doppelstrangbruch). Strangbrüche entstehen häufig durch physikalische Mutagene und endogene oder exogene ROS-Bildung. Basenverluste entstehen durch Depurinisierung und Depyrimidisierung. Basenmodifikationen entstehen durch Oxidation, Alkylierung, Methylierung und Pyrimidindimerbildung.

Damit nicht jede spontane Veränderung am Erbgut zu einem Zellarrest oder einem dauerhaften Schaden führt, gibt es je nach Art der DNA-Veränderung verschiedene Reparaturmechanismen. Einzelstrangbrüche werden durch die Nukleotid-Reparatur repariert: Reparaturenzyme erkennen die verformte DNA mit dem Einzelstrangbruch. Nukleasen trennen den Strang auf beiden Seiten des Bruchs und schneiden einige Nukleotide heraus. Eine Polymerase ersetzt die herausgeschnittenen Nukleotide komplementär zum verbliebenen, nicht geschädigten Einzelstrang. Zuletzt verbindet eine Ligase den DNA-Strang wieder [49, 50]. Doppelstrangbrüche werden durch homologe Rekombination repariert: Einige Nukleotide werden am Doppelstrangbruch durch Exonukleasen entfernt. Es entstehen überhängende Einzelstränge, die durch Proteine stabilisiert werden (Nucleoproteinfilament). Die Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2*

Cancer 1 (BRCA1) und *BReast Cancer 2* (BRCA2) sind beispielsweise solche stabilisierenden Proteine. Bei Defekten in einem der beiden Gene ist die homologe Rekombination beeinträchtigt. Die Nucleofilamente suchen in einem intakten DNA-Strang nach dem homologen DNA-Stück und schieben sich zwischen den Doppelstrang. Die DNA-Polymerase vervollständigt anhand der Matrize des unbeschädigten DNA-Strangs die entstandene Lücke [49].

Art der DNA-Veränderung		Ursache	Reparatur-mechanismus
Strangbrüche	Einzelstrangbrüche	ROS Radioaktive Strahlung Alkylanzien	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
	Doppelstrangbrüche	ROS Radioaktive und ionisierende Strahlung	Homologe Rekombination End-zu-End-Reparatur
Basen-modifikationen	DNA-Addukte	ROS UV-Licht Polyzyklische Kohlenwasserstoffe	
	DNA-Methylierung DNA-Oxidation	Methyltransferase ROS	Alkyltransferase
Basenverluste	Depurinierung Depyrimidierung	Replikationsfehler spontane Hydrolyse	Basen-Exzisions-Reparatur Mismatch-Reparatur

Tabelle 2: Überblick über DNA-Schäden durch verschiedene Mutagene sowie die jeweiligen Reparaturmechanismen. DNA-Schäden lassen sich einteilen nach Strangbrüchen, Basenmodifikationen und Basenverluste. Bestimmte Mutagene verursachen bestimmte DNA-Veränderungen. Der wichtigste Reparaturmechanismus für Einzelstrangbrüche ist die Nukleotid-Exzisions-Reparatur, für Doppelstrangbrüche die homologe Rekombination.

1.5.3 Oxidativer Stress und Hypertonie

Es liegt ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von oxidativem Stress und Hypertonie vor [51] (Abb. 5). Bei essentieller Hypertonie korreliert die Höhe des oxidativen Stress mit der Höhe des Blutdrucks [52]. Wir haben untersucht, ob das blutdruckerhöhende Hormon AngII über eine Aktivierung der Nox1 zu vermehrtem oxidativen Stress in der Niere führt.

Durch verschiedene Mechanismen unterstützen ROS die Entstehung einer Hypertonie. Bei AngII-induzierter Hypertonie ist die Konzentration an Superoxidanionen in der Tunica media der Gefäße doppelt so hoch wie unter Normotension [8]. ROS erhöhen die Expression des AT1-Rezeptors [53]. Der AT1-Rezeptor vermittelt die blutdruckerhöhende Funktion von AngII. Zudem können ROS die Konzentration von NO vermindern. NO ist ein wirkvoller Vasodilatator. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-

Synthase (eNOS) ist der Hauptproduzent von freiem NO. Superoxidanionen können die Konzentration des Vasodilatators NO vermindern: Indem Superoxidanionen den Kofaktor Tetrahydrobiopterin der eNOS oxidieren oder mit freiem NO zu Peroxynitrit reagieren [54]. Der Wegfall von NO durch ROS wird als Endotheldysfunktion unter Hypertonie bezeichnet. Auch in der Niere degradiert das Superoxidanion O_2^- NO. Dies führt zur Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen und die GFR wird reduziert. Das Elektrolyt Calcium ist an der Vasokonstriktion beteiligt. O_2^- erhöht die intrazelluläre Calcium-Konzentration in afferenten Arteriolen und führt so zu einer verstärkten Vasokonstriktion [55].

Hinweise, dass durch die Nox2 oxidativer Stress unter Hypertonie entsteht, geben Patienten mit chronischer Granulomatose. Diese Patientengruppe hat eine Nox2-Mutation und produziert weniger ROS. Das Risiko für Artherosklerose und Vasokonstriktion ist bei diesen Patienten vermindert [56]. Bei Überexpression von Nox1 und Behandlung mit AngII steigt der Blutdruck auf hypertensive Werte [19]. Im Tierversuch zeigte sich, dass bei AngII-induzierter Hypertonie die NOX p22-Untereinheit in der Niere hochreguliert wird [57]. Wird p22 hochreguliert, wurden mehr Superoxidanionen produziert. Dies verminderte die Vasodilatation [57]. Zudem ist unter Hypertonie die Sensitivität gegenüber Hypertonie-fördernden Faktoren, wie AngII, Aldosteron und Endothelin-1, erhöht [58]. Auch die Xanthinoxidase als ROS-Produzent ist bei Hypertonie erhöht [59]. ROS erhöhen zudem die Anzahl an Entzündungszellen im Endothel bei hypertensiven Patienten [60].

Antioxidative Enzyme und Antioxidantien, die dem oxidativen Stress entgegen wirken, sind bei Hypertonie wiederum vermindert: so z.B. SOD, Vitamin E und Glutathion [52, 61]. Ein aktiviertes RAAS mindert die Produktion und Aktivität von SOD [62]. Zusammengefasst ist das oxidative System an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Hypertonie beteiligt. Inwieweit Nox1 in diesen Mechanismus involviert ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

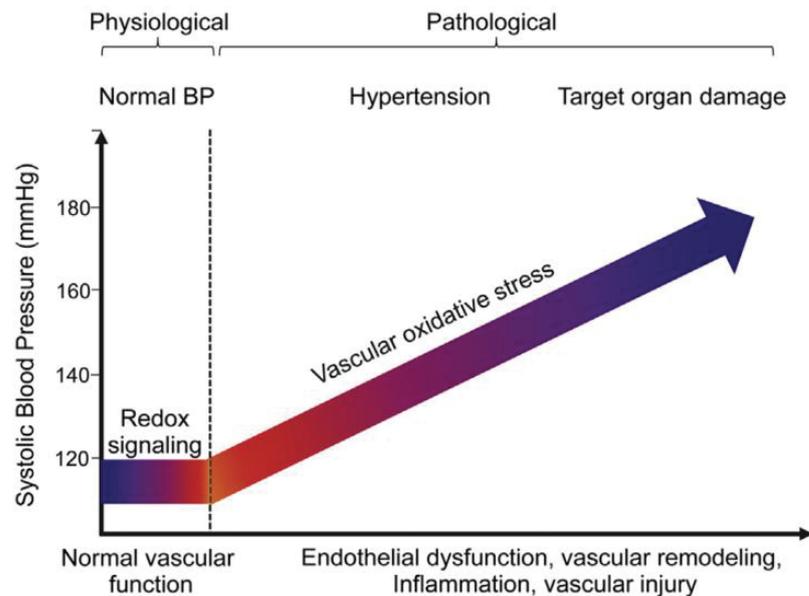


Abb. 5: Zusammenhang zwischen der Höhe des Blutdrucks und oxidativen Stress im Gefäßsystem. Bei normotensiven Werten besteht ein Gleichgewicht zwischen antioxidativen und oxidativen Komponenten. Liegen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies in den Gefäßen vor, werden die Gefäße geschädigt und die Entwicklung einer Hypertonie gefördert. Unter Hypertonie steigt die Konzentration an oxidativem Stress im Gefäßsystem. Letztendlich kommt es unter sehr hohen Blutdruckwerten und einer hohen Konzentration an oxidativem Stress zu Organschäden wie Nieren- und Herzinsuffizienz, Schlaganfall und aortalen Aneurysmen. Abbildung aus Montezano, 2015 [51], Daten aus Dikalov und Ungvari [63]. Druckgenehmigung durch Elsevier.

1.5.4 Oxidativer Stress und Tumorgenese

Hypertonie ist ein Risikofaktor für die Entstehung eines NCCs. Das blutdruckerhöhende Hormon AngII fördert die Entstehung von oxidativem Stress. Ob oxidativer Stress die Karzinogenese fördert oder die Tumorproliferation hemmt, ist nicht abschließend untersucht [64, 65].

Untersuchungen von Tumorzellen ergaben Hinweise, dass oxidativer Stress die Karzinogenese fördert. In Tumorzellen befindet sich eine höhere Konzentration an ROS als in nicht-malignen Zellen [66]. ROS verändern Gene, beispielsweise durch DNA-Strangbrüche und Regulation von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen. So beeinflussen ROS das Tumorwachstum. Tumorsuppressorgene in Tumorzellen sind in größerer Anzahl methyliert als in nicht malignen Zellen. ROS können Tumorsuppressorgene methylieren [67]. Wasserstoffperoxid hemmt das Tumorsuppressorgen p53 und stimuliert die Aktivierung von Protoonkogenen wie c-Ha-ras-1 [68]. Zudem reguliert Wasserstoffperoxid NF- κ B indem es Interleukin-1 β aktiviert [69]. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in die Entstehung von Tumoren involviert ist. Auch ROS, die von der NOX synthetisiert werden, aktivieren Protoonkogene wie Src und Ras und hemmen Tumorsuppressorgene wie p53 [70]. Tumorzellen können

über NOX Superoxidanionen produzieren, einen Einfluss auf Apoptose-Signalwege nehmen und das Zellwachstum regulieren [71]. Keratinozyten, die mit UV-B Strahlung bestrahlt werden, weisen eine aktivierte Nox1 auf. Wird Nox1 gehemmt, sinkt das Tumorwachstum durch eine gesteigerte DNA-Reparatur und eine verminderte Apoptoserate [72]. Pankreaskarzinomzellen sind gegenüber Apoptose äußerst resistent. Von Nox4 produzierte ROS schützen Pankreaskarzinomzellen vor Apoptose und unterstützen das Tumorwachstum [73]. Ovarialkarzinomzellen haben eine höhere Nox4-Expression als benigne Zellen. In den Ovarialkarzinomzellen wird der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) durch Nox4 hochreguliert und damit die Angiogenese in den Tumorzellen gefördert. Wird Nox4 gehemmt, sinkt die Konzentration an ROS in den Tumorzellen. Die Nox4 fördert über ROS die Angiogenese in den Tumorzellen [74]. Das von-Hippel-Lindau-Syndrom ist eine seltene, erbliche Phakomatose, bei der unter anderem gehäuft Nierenzellkarzinome auftreten. In Zellen, in denen das von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen ausgeschaltet ist, ist die Nox4-Expression, die p22^{phox} und NADPH-abhängige Superoxidanion-Produktion höher als in gesunden Tubuluszellen der Niere [75].

Andererseits gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass oxidativer Stress das Tumorwachstum hemmt. Beim Bronchialkarzinom schützen Antioxidantien vor einer malignen Zellproliferation. Das K-ras-abhängige Bronchialkarzinom bei Mäusen zeigte unter Vitamin E und dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) eine stärkere Tumorzellproliferation und verringerte die Überlebensrate der Tiere [65]. Ein weiterer Hinweis, dass oxidativer Stress das Tumorwachstum hemmt, bietet eine Studie zur Untersuchung des Antioxidans Glutathion. Zur Glutathion-Synthese durch die Glutamat-Cystein-Ligase wird ein Enzymkomplex mit den zwei Untereinheiten GCLC und GCLM benötigt. Liegt ein Mangel der Untereinheiten GCLM vor, sinkt die Glutathion-Konzentration um 75 % und der oxidative Stress steigt. Die erhöhte Konzentration an oxidativem Stress vermindert die Anzahl der Tumorzellen und verlangsamt die Tumorzellproliferation [76]. Der oxidative Stress hemmt das Tumorwachstum.

Ein Unterschied besteht bei metastasierten Tumorzellen. Isolierte, metastasierte Tumorzellen bei Melanom-Patienten zeigten eine höhere Konzentration an ROS als Zellen aus dem Primärtumor. Eine Therapie mit dem Antioxidans NAC erhöhte die Zahl zirkulierender Tumorzellen und damit die Anzahl an metastasierten Zellen. Metastasierte Zellen benötigen erstens eine hohe Konzentration an ROS und zweitens ein gutes oxidatives Abwehrsystem, um dem oxidativen Stress standzuhalten, den sie auf dem Weg zu ihrem Absiedlungsort erfahren [77].

Zusammenfassend ist der Einfluss von ROS auf die Karzinogenese nicht abschließend untersucht, sehr komplex und je nach Tumor und Konzentration an ROS unterschiedlich. In dieser Arbeit gehen wir davon aus, dass AngII über Nox1 die ROS-Synthese stimuliert und oxidativer Stress die Karzinogenese in der Niere fördert.

1.6 NADPH-Oxidasen als ROS-Produzenten

1.6.1 NADPH-Oxidasen: Isoformen und Aufbau

ROS entstehen im Körper oft als Nebenprodukte. Die hauptsächliche Funktion der NOX hingegen ist die Produktion von ROS [78]. Die Multienzymkomplexe produzieren den größten Anteil an ROS im Körper. Erstmals wurde NOX in Phagozyten entdeckt, wo die von ihnen produzierten ROS als „respiratory burst“ der Immunabwehr dienen. Es gibt sieben verschiedene Formen der NOX: NOX 1-5 und die *Dual-Oxidasen* Duox1 und Duox2 (Tabelle 3) [78, 79]. Sie unterscheiden sich in a) Aufbau, b) Funktion, c) Vorkommen, d) Art der gebildeten ROS.

NOX sind Transmembranproteine, die sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen. Sie transportieren Elektronen über die Membran und reduzieren Sauerstoff zu ROS. Es gibt einige Komponenten, die jede Form der NOX besitzen: a) eine Bindungsstelle für NADPH, b) eine Bindungsstelle für FAD, c) sechs transmembrane Domänen und d) in den transmembranen Domänen III und V vier Histidin-Bindungsstellen für zwei Häm-Proteine. Die Elektronen werden von NADPH auf FAD, nacheinander auf die beiden Häm-Proteine und anschließend auf molekularen Sauerstoff transportiert. Ohne Aktivierung und im physiologischen Zustand haben NOX eine geringe basale Aktivität. Aktiviert werden NOX über Zytokine, Wachstumsfaktoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Hyperlipidämie und hohe Serumglucosewerte [80]. Nox1, Nox2, Nox3 und Nox5 produzieren primär das Superoxidanion O_2^- während Duox1, Duox2 und Nox4 primär H_2O_2 produzieren.

Nox1 und Nox4 sind hauptsächlich in die Entwicklung von Pathologien involviert [81]. Da in dieser Arbeit mit Nox1-Knockout-Mäusen (Nox1-KO) gearbeitet wurde, wird hier der Aufbau der Nox1 genauer beschrieben (Abb. 6). Nox1 wurde 1999 erstmalig unter dem Namen Mitogenic Oxidase 1 (Mox1) entdeckt [82]. Nox1 besitzt membrangebundene Untereinheiten und zytosolische Untereinheiten. $p22^{phox}$ und Nox1 sind die membrangebundenen Untereinheiten. $p22$ stabilisiert die NOX-Proteine. Außerdem besitzt Nox1 vier zytosolische Untereinheiten, die jeweils zwei verschiedene Funktionen haben: Die zytosolische Untereinheit NoxO1 ist eine Organisator-Untereinheit. Die zytosolische Untereinheit NoxA1 eine Aktivator-Untereinheit [78]. NoxO1 und NoxA1 sind Regulatoruntereinheiten. NoxA1 ist ein Homolog der Nox2-

Untereinheit p67^{phox}, NoxO1 ist ein Homolog der Nox2-Untereinheit p47^{phox}. Es wird davon ausgegangen, dass Nox1 und Nox2 nicht nur strukturelle Ähnlichkeiten haben, sondern sich auch funktionell ähnlich sind [83]. Es gibt Hinweise, dass die GTPase Rac1 Nox1 ebenfalls reguliert [84]. Zudem ist Nox1 bei Abwesenheit der Regulatoruntereinheit p47^{phox} inaktiv [85]. Die Nox1 ist im Kolon sehr stark exprimiert, sie kommt aber auch in der Niere, in den glatten Muskelzellen, im Uterus und der Prostata vor [82].

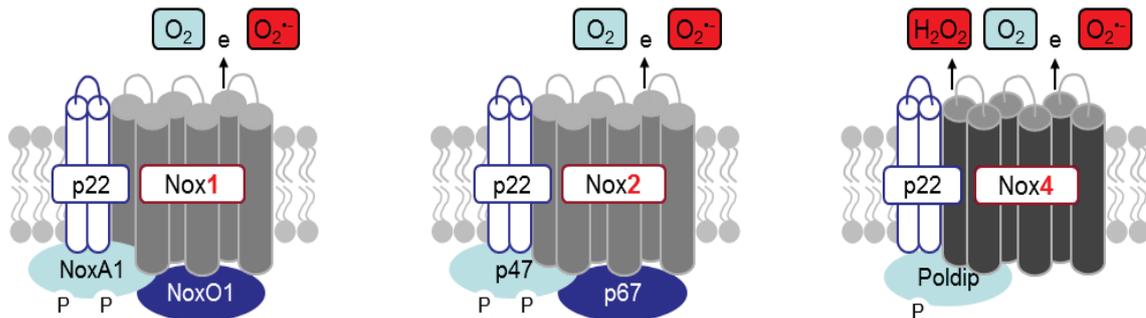


Abb. 6: Schematische Darstellung der NADPH-Oxidasen 1, 2 und 4 (Nox1, 2 und 4). Nox1 und Nox2 produzieren Superoxidanionen. Nox4 produziert Superoxidanionen und zusätzlich Wasserstoffperoxid. Nox 1, 2 und 4 besitzen die Untereinheit p22 als membrangebundene Untereinheit. Nox1 und 2 besitzen zudem zwei zytosolische Untereinheiten (NoxA1 und NoxO1 bzw. p47 und p67). Abbildung modifiziert nach Drummond, 2014 [86].

Nox-Isoform	Vorkommen	Funktion
Nox1	Niere, Colon, Muskel, Prostata, Uterus, Gefäße	Blutdruckregulation
Nox2	Endothelzellen, Tubuluszellen der Niere, Immunzellen	Immunabwehr in Phagozyten
Nox3	Embryogenese Gewebe, Innenohr	Funktion des Innenohrs
Nox4	Niere, Gefäße, Knochen	Gefäßregulation
Nox5	Lymphknoten, Gefäße, Hoden	Erythropoetinsynthese
Duox1/2		Arteriosklerose Hormonsynthese in der Schilddrüse

Tabelle 3: NADPH-Oxidase-Isoformen (Nox) und ihr Vorkommen in verschiedenen Organen und Strukturen. Dargestellt sind außerdem die Hauptfunktionen der jeweiligen Nox. Man unterscheidet sieben Nox-Isoformen: Nox1-5 und die zwei Dual-Oxidasen Duox1 und Duox2 [78].

1.6.2 Zusammenhang zwischen Hypertonie, Nox und ROS

In der Niere werden Nox1, 2 und 4 ubiquitär exprimiert: Besonders im proximalen Tubulus, im Glomerulus und in den afferenten Arteriolen. Die Versuchstiere wurden über 28 Tage mit AngII behandelt. AngII ist ein wichtiger Aktivator der Nox1 und Nox4 [87]. In den glatten Muskelzellen des Endothels aktiviert AngII die Nox1. Die Nox1-Aktivierung durch AngII geschieht über den AT1-Rezeptor durch eine Rac1-

Translokation [58, 88]. Außerdem fördern AngII und Aldosteron über ROS eine Glomerulosklerose und die Proliferation mesangialer Zellen in der Niere [89]. Bei Dahl-sensitiven Ratten ist Nox2 und p22^{phox} hochreguliert. Das Antioxidans Tempol vermindert die Glomerulosklerose und die Proteinurie [38]. Wird Nox im Nierenmark aktiviert, führt dies zu einer Vasokonstriktion, vermindert die Natriurese und erhöht so den Blutdruck. Bei einem Polymorphismus der p22^{phox}-Untereinheit ist die Nox-Aktivität verändert und die ROS-Produktion erhöht [90]. Es wurde in der Studie nicht zwischen den einzelnen Nox-Isoformen unterschieden. Liegen vermehrt Superoxidanionen in der Macula densa vor, wird NO inaktiviert und die Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen reduziert die GFR [91]. Bei hypertensiven Tieren präsentierte sich eine verdickte Gefäßwand und eine erhöhte Nox-Aktivität [92]. Ein Hinweis für eine AngII-induzierte Hypertonie kann also eine hypertrophierte Media in den Gefäßen sein [93]. ACE-Hemmer und Statine, die zur Blutdruckregulation verwendet werden, mindern die Aktivität der Nox1 [94].

1.7 Das oxidative Abwehrsystem

1.7.1 Komponente des oxidativen Abwehrsystems

Antioxidantien sind Komponenten, die die Oxidation von Substraten verhindern und somit einer Zellschädigung durch ROS entgegen wirken. Unter physiologischen Bedingungen liegen etwas mehr ROS als Antioxidantien vor. Es ist physiologisch, wenn eine geringe Konzentration an oxidativem Stress vorliegt [95]. Mit dem Alter nimmt die Anzahl an endogenen Antioxidantien ab.

Das oxidative Abwehrsystem lässt sich in zwei große Gruppen einteilen. Die erste Gruppe sind Antioxidantien, die die Radikale abfangen und somit ihre Funktion erfüllen, bevor ROS einen Zellschaden verursacht haben. Zur zweiten Gruppe des antioxidativen Systems zählen Antioxidantien, die zum Reparatursystem der Zelle gehören: Die Phospholipase/Peroxidase oder die Acyltransferase sorgen dafür, dass bereits geschädigte DNA/Proteine/Lipide repariert werden [96].

Die erste Gruppe lässt sich nochmals einteilen in endogene und exogene Antioxidantien. Zu den endogenen Antioxidantien zählen Enzyme und nicht-Enzyme. Sie befinden sich in der Zellmembran sowie im Zytosol. Endogene antioxidative Enzyme sind die Superoxiddismutase, Katalase und die Glutathionperoxidase. Nicht-enzymatische endogene Antioxidantien sind Cyclooxygenase, Lipooxygenase, Harnsäure, Glutathione und Proteine wie Ferritin, Transferrin, Caeruloplasmin und Albumin. Exogene Antioxidantien befinden sich in hoher Anzahl in Obst und Gemüse

und werden über die Nahrung aufgenommen. Dazu zählen die Vitamine C, E, β -Carotin und Flavonoide.

Die antioxidativen Enzyme Katalase und die Glutathionperoxidase reduzieren Wasserstoffperoxid zu H_2O . Das endogene enzymatische Antioxidans SOD kommt in der Niere vor und lässt sich in drei Gruppen einteilen, die sich in ihrem Vorkommen und katalytischen Zentrum unterscheiden. Die SOD1 enthält ein Kupfer-Zink-Ion und kommt im Zytosol vor, die SOD2 enthält Mangan und kommt in der mitochondrialen Matrix vor, SOD3 findet sich extrazellulär [97].

Das Enzym Hämoxigenase (HO) ist ebenfalls ein Bestandteil des oxidativen Abwehrsystems. Es sind drei Isoformen der HO bekannt. HO1 wird besonders in der Niere exprimiert, HO2 in Niere, Gefäßen, Herz, Nervensystem und Leber. HO3 ist ein Pseudogen und enzymatisch nicht aktiv [98]. Das Enzym Hämoxigenase (HO) konvertiert Häm zu Biliverdin. Die Biliverdinreduktase überführt Biliverdin zu Bilirubin. Kofaktoren bei der Reaktion von Häm zu Biliverdin sind NADPH und molekularer Sauerstoff. Bei der Reaktion wird Eisen und Kohlenstoffmonoxid (CO) frei. Das Endprodukt Bilirubin ist antioxidativ, antientzündlich und antiapoptotisch [99]. In der Niere wird HO1 durch oxidativen Stress und durch AngII aktiviert [100, 101]. *In vivo* wird HO1 bei Hypertonie, chronischem Nierenversagen und bei Glomerulonephritis verstärkt aktiviert [102, 103]. AngII wird als ein starker Regulator der HO1 in der Niere betrachtet, sodass die Konzentration von HO1 im Urin als Biomarker für die Aktivität des RAAS dienen kann [104].

1.7.2 Therapie mit Antioxidantien

In vielen Studien wurde die Therapie mit Antioxidantien in Form von Nahrungsergänzungsmitteln untersucht. Der Nutzen wird kontrovers diskutiert. Die tägliche Einnahme von Vitamin C und E wirkt eher prooxidativ [105]. Die Tumorzinzidenz im Gastrointestinaltrakt konnte durch die Einnahme von Antioxidantien durch Nahrungsergänzungsmittel nicht gesenkt werden [9]. Gleiches gilt für das kardiovaskuläre Risiko [106]. Die Patienten wiesen im Vorhinein allerdings auch keine erhöhten Konzentrationen an oxidativen Stress auf. Ist die Konzentration an oxidativem Stress von vornherein erhöht, vermindern antioxidative Nahrungsergänzungsmittel den oxidativen Stress [107, 108]. Patienten mit einem Haptoglobin 2/2 Genotyp haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von oxidativem Stress. Eine Behandlung mit Vitamin E zeigte bei diesen Patienten eine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse um 50 % [109].

Im Diabetes-Modell senkte eine Nox-Hemmung die Produktion an Nox und so das Atheroskleroserisiko [110].

1.8 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkungen einer Nox1-Defizienz auf den AngII-induzierten oxidativen Stress in der Niere zu untersuchen. Zudem sollte ein möglicher Einfluss der Nox1 auf den Blutdruck unter einer Behandlung mit AngII untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Alle Verbrauchsmaterialien und Reagenzien, die nicht gesondert bezeichnet wurden, wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland oder St. Louis, Missouri, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Primer

Unten aufgelistet sind die verschiedenen Primer für die Real-Time-qPCR (Tabelle 4).

Primer	Sequenz: 3' → 5'	Sequenz: 5' → 3'
<i>GAPDH</i>	TTCCTGCGACTTCAACA	TCTCTTGCTCAGTGTCTT
<i>β-Aktin</i>	GCATTGCTGACAGGATGCAG	CCTGCTTGCTGATCCACATC
<i>SOD1</i>	ACCAGTTGTGTTGTCAGG	TTTCTTAGAGTGAGGATTAATGAG
<i>HO1</i>	CCAGAGTCCCTCACAGAT	CCCAAGAGAAGAGAGCCA
<i>Gpx1</i>	TTGGTGATTACTGGCTGC	TGATATTCAGCACTTTATTCTTAGTAG
<i>Txnrd1</i>	CAGTTCGTCCCAACGAAAAT	GCACATTGGTCTGCTCTTCA
<i>Nox2</i>	GGTCCAGTGCGTGTGCT	GCGGTGTGCAGTGCATCAT
<i>Nox4</i>	CCCAAGTTCCAAGCTCATTTC	TGGTGACAGGTTTGTGCTCCT
<i>Nox1-Common</i>	TAGCTGCCATGGAAGTGCAG	
<i>Nox1-Wildtyp</i>	TTG CAGTTGTTGGGTGATCT	
<i>No1-Mutante</i>	CGAGCGCTCTGAAGTTCTT	

Tabelle 4: Übersicht der Primer für die Real-Time qPCR. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Superoxiddismutase 1 (SOD1), Hämoxygenase 1 (HO1), Glutathionperoxidase 1 (Gpx1), Thioredoxin-Reduktase 1 (Txnrd1), NADPH-Oxidase (Nox), NADPH-Oxidase-Organisator (NoxO), NADPH-Oxidase-Aktivator (NoxA).

2.1.3 Versuchstiere

Es wurde mit 14 männlichen, wildtypischen C57BL/6J-Mäusen von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) und 15 männlichen NADPH-Oxidase1-Knockout-Mäusen (Nox1-KO) (B6.129X1-*Nox1^{tm1Kkr}*/J) von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) gearbeitet. Zum Zeitpunkt der Entnahme der Nieren, waren die Tiere 16 Wochen alt.

2.1.4 Genehmigung der Tierversuche

Die durchgeführten Tierversuche wurden nach Absatz §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) genehmigt (Aktenzeichen: 84- 02.04.2014.A383).

2.1.5 Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Diese verfügte über einen 12-Stunden Licht-Dunkel-Rhythmus bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C. Futter und Wasser waren den Tieren frei zugänglich.

2.2 Methoden

2.2.1 Eigenleistung

Die Methoden 2.2.2, 2.2.3., 2.2.4 sowie 2.2.6 wurden freundlicherweise von Frau Dr. Anna Zimnol durchgeführt. Das genaue methodische Vorgehen ist in ihrer Arbeit beschrieben [111].

2.2.2 Behandlung der Versuchstiere

Um die Rolle der Nox1 in der Niere, unter der Behandlung mit AngII, zu untersuchen, wurden 14 Wildtyp- (WT) und 15 Nox1-KO-Versuchstieren osmotische Minipumpen (Abb. 7, Alzet, Model 1004, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) subkutan, medial der Skapulae implantiert. Die Tiere wurden dazu narkotisiert (Ketamin 90 mg/kg und Xylazin 6 mg/kg i.m.). Die Haut wurde mit einer Klammernaht verschlossen [111]. Über die Pumpen wurden die Tiere über 28 Tage mit Angiotensin II (AngII) oder PBS als Lösungsmittelkontrolle behandelt. AngII (600 ng/kg × min (Calbiochem/Merck KGaA)) oder PBS befanden sich im Reservoir im Inneren der Pumpe. Die äußere Membran osmotischer Minipumpen ist semipermeable. Extrazelluläre Flüssigkeit dringt durch die semipermeable Membran in die Minipumpe ein und komprimiert das Reservoir. Durch das komprimierte Reservoir trat AngII oder PBS mit einer konstanten, kontinuierlichen Laufrate aus der Minipumpe in das subkutane Gewebe aus [112]. Aus dem subkutanen Raum wurde AngII oder PBS in die Zellen aufgenommen.

Die AngII-Gruppe bestand aus sieben WT- und sieben Nox1-KO-Tieren. Die PBS-Kontrollgruppe bestand aus sieben WT- und acht Nox1-KO-Tieren (Tabelle 5). Die Zuteilung der Tiere in die AngII- oder PBS-Gruppe erfolgte zufällig. Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wurde der Versuchsteil 2.2.2 freundlicherweise von Frau Dr. Anna Zimnol durchgeführt [111]. Im Verlauf der 28-tägigen Behandlung verstarben zwei Tiere in der WT-K-Gruppe und vier in der WT-AngII-Gruppe. Als Ersatz für die Versuche 2.2.5,

2.2.7, 2.2.8, 2.2.9, 2.2.10, 2.2.11 wurde das jeweilige Material von WT-Tieren verwendet, die dem gleichen Tierversuchsantrag entstammten, die gleiche Behandlung in einem Zeitraum von 28 Tagen erhalten hatten und dem Tierversuch zur Untersuchung der Nox2 und Nox4 zugeordnet waren [111].

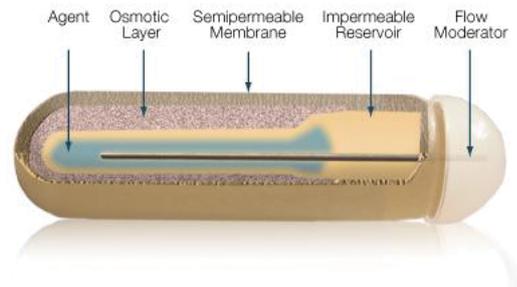


Abb. 7: Schematische Darstellung einer osmotischen Minipumpe der Firma Alzet. Außen die semipermeable Membran, innen das Reservoir (blau) mit der zu behandelnden Flüssigkeit. Flüssigkeit dringt von außen über die osmotische Membran ein und komprimiert das Reservoir. Die Substanz tritt mit einer kontinuierlichen Laufrate aus. Druckgenehmigung durch Durect Corporation, 2019.

Quelle: http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps/howdoesitwoho.html, 18:59 Uhr am 10.09.2016).

Gruppe	Inhalt der osmotischen Minipumpe	Tierzahl
WT-K	PBS	7
WT-AngII	AngII	7
Nox1-KO-K	PBS	8
Nox1-AngII	AngII	7

Tabelle 5: Verteilung der Tierzahl auf die vier Behandlungsgruppen. 14 Wildtyp- und 15 Nox1-Knockout-Tiere wurden über osmotische Minipumpen für 28 Tage mit AngII behandelt, als Lösungsmittelkontrolle wurde PBS verwendet. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II.

2.2.3 Blutdruckmessung und Materialsammlung zur Messung der Nierenfunktion

AngII erhöht den Blutdruck. Um den Einfluss der Nox1 auf die AngII-vermittelte Blutdruckerhöhung zu messen, wurde während der 28-tägigen AngII-Behandlung alle zwei bis vier Tage der Blutdruck der Versuchstiere gemessen (Abb. 8) [111]. Dazu wurde das „Tail-cuff-System“ (BP-2000 Series II, Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, USA) verwendet. Die mit der „Tail-cuff-Messmethode“ ermittelten Werte korrelieren mit jenen einer invasiven intraarteriellen Blutdruckmessung. Daher eignet sich die Methode für Versuchsmodelle mit mehrmaligen Blutdruckmessungen [113]. Das BP-2000-System arbeitet mit der Methode der Photoplethysmographie. Dabei wird der Schwanz der Maus mit

Infrarotlicht durchleuchtet und die Änderungen in der Lichtabsorption gemessen. Die Absorption ist abhängig vom Füllungsstatus der Gefäße. Aus den Absorptionswerten kann der systolische und diastolische Blutdruck ermittelt werden. Zunächst wurden die Tiere eine Woche lang an die Methode gewöhnt. Nach Implantation der AngII-Minipumpen wurde innerhalb der nächsten 28 Tage zu acht Zeitpunkten im Abstand von zwei bis vier Tagen der Blutdruck gemessen. Pro Tier wurden zu jedem Messzeitpunkt fünf bis zehn Einzelmessungen durchgeführt.

Anhand der Albumin- und Kreatininkonzentration im Urin und Serum konnte die Nierenfunktion der Versuchstiere gemessen werden. Um den Urin zu sammeln, wurden die Tiere zu zwei Zeitpunkten für 20 Stunden in Stoffwechsellkäfige gesetzt: Vor Implantation der Minipumpen und an Tag 28. Zur Messung der Kreatininkonzentration im Serum wurde den narkotisierten Tieren an Tag 28, vor Entnahme der Nieren, Blut aus der Aorta abdominalis entnommen. Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wurde der Versuchsteil 2.2.3 freundlicherweise von Frau Dr. Anna Zimnol durchgeführt [111].

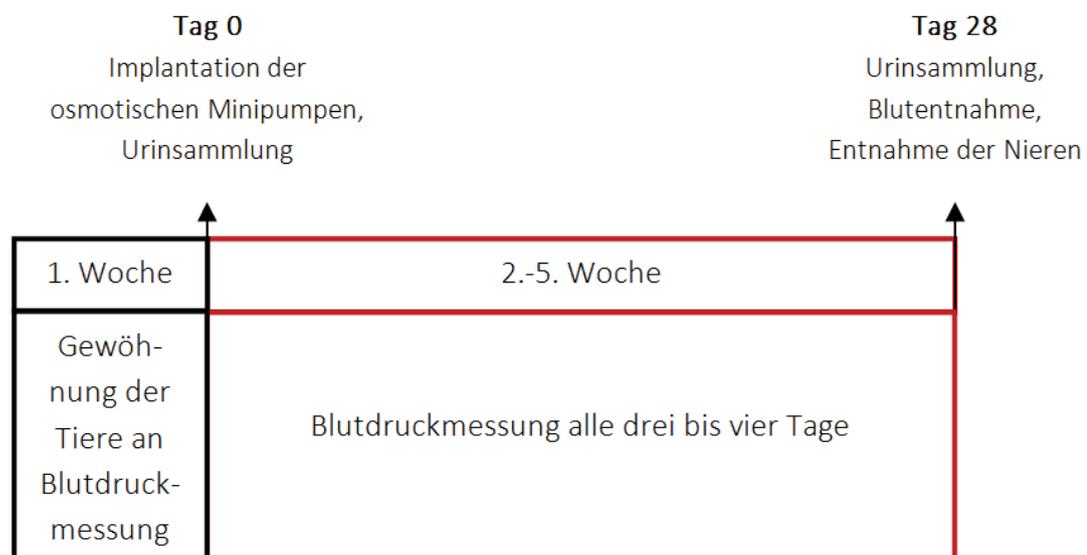


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes und der Behandlung der Versuchstiere über 28 Tage. Die Tiere wurden eine Woche an die Blutdruckmessung mittels Tail-cuff-Methode gewöhnt. Nach Implantation der osmotischen Minipumpe wurde innerhalb von 28 Tagen alle drei bis vier Tage der Blutdruck gemessen. Zu Versuchsbeginn und am Versuchsende wurden die Tiere in Stoffwechsellkäfige gesetzt und der Urin gesammelt.

2.2.4 Entnahme der Nieren

Nach einer 28-tägigen Behandlung mit AngII sollten die Folgen des Fehlens der Nox1 auf die Nieren untersucht werden. Dazu wurden die Nieren an Tag 28 entnommen

[111]. Die Mäuse wurden in Narkose versetzt (8 mg/kg KG Xylazin und 120 mg/kg KG Ketamin) und abdominal eröffnet. Aus der Aorta abdominales wurde Blut entnommen. Eine Vasodilatation erfolgte durch eine Perfusion mit Deltadex 40 (10 % Dextran 40, 0,9 % NaCl + 10 % Procainhydrochlorid (Alleman Pharma, Rimbach, Deutschland)) für ca. 2 min. Um das restliche Blut aus den Nieren zu spülen, wurden die Gefäße mit eiskalter 0,9 %iger Natriumchloridlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) perfundiert und die Nieren daraufhin entnommen. Das Gewicht der linken und der rechten Nieren wurde gemessen und jeweils ins Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt (\triangleq relatives Nierengewicht). Anschließend wurde der Mittelwert aus dem relativen Nierengewicht der rechten und der linken Niere berechnet. Eine Hälfte der rechten Niere wurde in Paraffin eingebettet, ein Viertel wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ein Viertel zur Zellextraktion für den Comet-Assay verwendet. Die linke Niere wurde bei -80 °C gelagert. Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wurde der Versuchsteil 2.2.4 freundlicherweise von Frau Dr. Anna Zimnol durchgeführt [111].

2.2.5 Immunhistochemiefärbung mit γ -H2AX

Zur Untersuchung der Beteiligung der Nox1 an der AngII-induzierten Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen, wurde eine Immunhistochemiefärbung mit γ -H2AX durchgeführt. γ -H2AX ist die phosphorylierte Form des Histons H2AX und wurde hier zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen verwendet [114]. Die Immunhistochemiefärbung basiert auf dem Nachweis eines Antigens im Gewebe mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Die Antigen-Antikörper-Bindung wurde anhand der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) visualisiert. Bei der ABC-Methode wird ein biotinylierter Zweitantikörper, ein Enzym-gekoppelter Komplex aus Avidin und Biotin und ein chromogenes Substrat verwendet. In einem ersten Schritt, bindet das tetramere Avidin des AB-Komplexes an das Biotinmolekül am Zweitantikörper. In einem zweiten Schritt überführt das Enzym am AB-Komplex das chromogene Substrat in einen Farbstoff. Hier setzte die Meerrettichperoxidase das Benzidin 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in Anwesenheit von H₂O₂ zu einem braunen Chromogen um und färbt γ -H2AX-positive Kerne im histologischen Schnitt der Niere braun. Die Färbung erfolgte auf 2 μ m dicken Paraffinschnitten der Niere (Mikrotom Hyrax M25 (Carl Zeiss AG, Deutschland)). Um das Paraffin zu lösen, wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde bei 60 °C im Trockenschrank inkubiert und jeweils für drei Minuten in neun Küvetten einer absteigenden Alkoholreihe behandelt (Abb. 9).



Abb. 9: Rehydrierung der Gewebeschnitte. Um die Gewebeschnitte der Niere für die Immunhistochemiefärbung mit Anti- γ -H2AX zu rehydrieren, wurden die Gewebeschnitte für jeweils drei Minuten in neun Küvetten einer absteigenden Alkoholreihe gegeben. Hier ist die absteigende Alkoholreihe schematisch dargestellt. Jeder Kasten bezeichnet eine Küvette mit dem Inhalt und der jeweiligen Alkoholkonzentration in %.

Es folgte ein Waschschrift. Für die Immunhistochemiefärbung mit γ -H2AX gilt, dass ein Waschschrift aus dreimal fünfminütigem Schwenken der Gewebeschnitte in PBS bestand. Die Einbettung in Paraffin demaskiert einzelne Proteine. Um dem Antikörper die Bindungsstellen am Protein zugänglich zu machen, wurden die Gewebeschnitte für 35 Minuten in einem Dampfkocher bei 95 °C in Citratpuffer (Target Retrieval Solution, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, 1:10 verdünnt mit dH₂O) inkubiert. Die Gewebeschnitte kühlten 30 Minuten im Citratpuffer ab und wurden anschließend gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Blockierlösung (5 % Esel-Serum in PBS) inkubiert. Es folgte ein Waschschrift. Endogenes Avidin und Biotin wurden abgesättigt, damit diese nicht mit dem AB-Komplex reagierten. Auch die endogenen Peroxidasen wurden abgesättigt. Die Absättigung geschah durch drei Inkubationschritte von je 15 Minuten in 3 %igem H₂O₂ bzw. 0,001 %igem Avidin und Biotin. Zwischen jeder Inkubation erfolgte ein Waschschrift. Für 12 bis 15 Stunden (über Nacht) wurden die Schnitte bei 4° C mit dem Primärantikörper Anti- γ -H2AX (#9718, Cell Signaling, Herts, UK), 1:200 in Signal Stain (#8112, Cell Signaling, Herts, UK) inkubiert. Nach einem Waschschrift, wurde der biotinylierte Sekundärantikörper ((donkey anti-rabbit IgG-B, sc-2089, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), 1:200 in PBS) auf die Gewebeschnitte aufgetragen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Waschschrift. Die Gewebeschnitte inkubierten für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem ABC-Reagenz. Das ABC-Reagenz besteht aus einer Mischung aus Avidin und einer biotynilierten Meerrettichperoxidase (PK-6100, Vectastain Elite ABC Kit, Burlingame, CA, USA). Es folgte ein Waschschrift. Das Chromogen DAB (SK-4100, DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Burlingame, CA, USA) wurde für zwei Minuten auf den Gewebeschnitten belassen. Die Gewebeschnitte wurden jeweils nacheinander zehn Mal in zwei Küvetten mit *Aqua destillata* (A. dest.) getaucht und ruhten schließlich für 3 min in A. dest. Um γ -H2AX-negative Zellkerne gegenzufärben, folgte eine Färbung mit Hämatoxylin (2 g Hämatoxylin, 96 ml 99,8 % Isopropanol, 103,8 ml A. dest., 100 ml Glycerin, 3 g Kaliumaluminiumsulfat, 10 ml Essigsäure, 0,4 g Kaliumjodat) für 15 Sekunden. Für den blauvioletten Farbumschlag

des Hämatoxylins durch eine Alkalisierung wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Durch eine Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration wurden die Gewebeschnitte dehydriert (Abb. 10). Zuletzt wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.



Abb. 10: Dehydrierung der Gewebeschnitte. Um die Gewebeschnitte der Niere für die Immunhistochemiefärbung mit Anti- γ -H2AX zu entwässern, wurden die Gewebeschnitte für jeweils drei Minuten in acht Küvetten einer aufsteigenden Alkoholreihe gegeben. Hier ist die aufsteigende Alkoholreihe schematisch dargestellt. Jeder Kasten bezeichnet eine Küvette mit dem Inhalt und der jeweiligen Alkoholkonzentration in %.

Pro Tier wurden 10 Gesichtsfelder fotografiert (Mikroskop Olympus BX43 (Olympus Deutschland GmbH, Deutschland), Kamera Olympus XC10 (Olympus Deutschland GmbH, Deutschland), 250-facher Vergrößerung mit Durchlicht)). Die Auszählung der braunen Kerne im Verhältnis zu den γ -H2AX-negativen-Zellkernen erfolgte mit Hilfe des Programms Cell Profiler (Cell image analysis software 2.0 (www.cellprofiler.org)) [115].

2.2.6 Alkalischer Comet-Assay

Anhand eines Comet-Assays wurde untersucht, ob Nox1 an der AngII-vermittelten Bildung von DNA-Strangbrüchen in der Niere beteiligt ist. Entgegen der immunhistochemischen Färbung mit γ -H2AX, werden hier die DNA-Strangbrüche nicht im Gewebeschnitt nachgewiesen, sondern in isolierten Nierenzellen (Abb. 11). Die Nierenzellen wurden nach Organentnahme isoliert und die DNA in einem Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Intakte DNA ist unter dem Fluoreszenzmikroskop als kompakte Struktur erkennbar. DNA-Bruchstücke sind hingegen kürzer und wandern schneller durch die Poren im Agarosegel. Bruchstückhafte DNA ähnelt einem Kometenschweif hinter der kompakten Struktur aus intakter DNA. Je mehr DNA-Bruchstücke sich in den isolierten Nierenzellen befinden, desto ausgeprägter ist das kometenschweifartige Muster (Abb. 12) [116]. Der Versuchsablauf orientierte sich an der Arbeit von Frau Dr. Anna Zimnol [111]. Die Auswertung erfolgte freundlicherweise durch die AG Stopper (Universität Würzburg, Institut für Toxikologie).

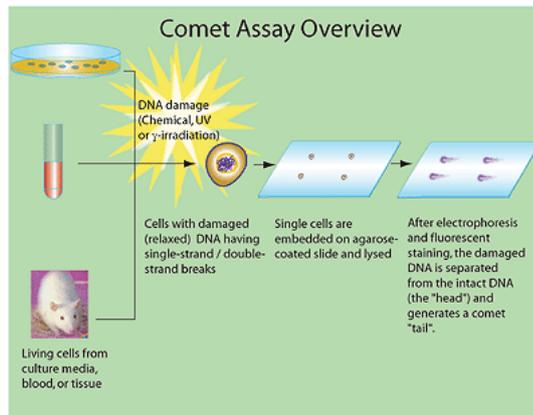


Abb. 11: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes eines Comet-Assays. Für den Comet-Assay können die Zellen aus Gewebe, Zellkultur oder Blut isoliert werden. Hier wurden Zellen aus der Niere isoliert. Die Zellen werden aufbereitet und die DNA im Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. DNA mit Strangbrüchen hat unter dem Fluoreszenzmikroskop ein kometenschweifartiges Muster

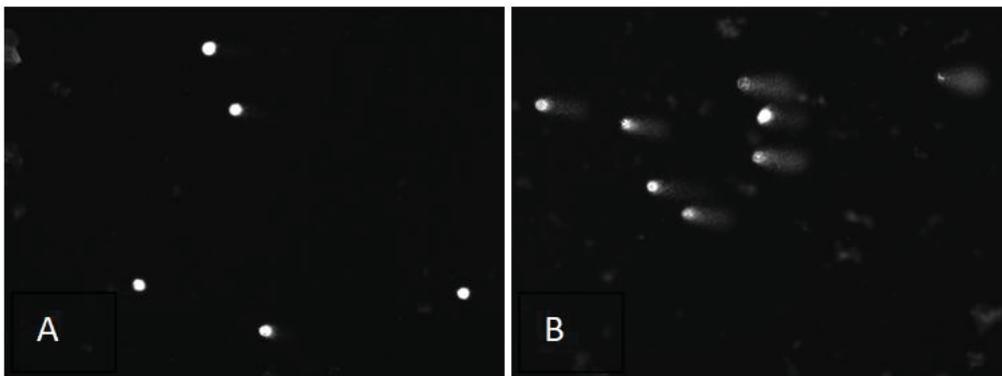


Abb. 12: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Abbildung nach Durchführung eines Comet-Assays. Dargestellt ist elektrophoretisch aufgetrennte DNA aus isolierten Nierenzellen. Intakte DNA wandert gleichmäßig schnell im elektrischen Feld und stellt sich als kompakte Struktur dar (Abb. 12A). DNA mit Doppel-/Einzelstrangbrüchen wandert schneller durch das Agarosegel und bildet ein kometenschweifartiges Muster (Abb. 12B). (Abb. 12B). Quelle: <http://cometassayuoc.blogspot.de/2010/03/comet-assay-overview.html>, erstellt von „Amila“ um 8:08 AM, Quelle verwendet um 10:32 Uhr am 12.09.2016.

2.2.7 Fluoreszenzfärbung mit Dihydroethidium

Eine Fluoreszenzfärbung mit Dihydroethidium (DHE) wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Fehlen der Nox1 unter der Behandlung mit AngII einen Einfluss auf die Menge an ROS in der Niere hat. DHE ist zellpermeabel und reagiert mit ROS, insbesondere mit intrazellulären Superoxid-Radikalen O_2^{\bullet} zu einem roten Fluoreszenzfarbstoff [117]. Es wurden 5 μ m dicke Gefrierschnitte der Niere angefertigt (Gefriermikrotom Leica CM 3050 S). Die Gefrierschnitte wurden bei -80 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurden die Gefrierschnitte kurz angetaut und mit einer 10 μ M DHE-Lösung (50 mM DHE-Stocklösung, D7008, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Taufkirchen, Deutschland, 1:5000 in A. dest.) für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Von den Gefrierschnitten pro Tier wurden sechs bis sieben Bilder gemacht und ausgewertet (20er-Objektiv, Mikroskop Olympus BX43 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Germany), Olympus XM10 Kamera (Hamburg, Deutschland)). Mit dem Programm Cell Profiler (Cell image analysis software 2.0, www.cellprofiler.org) [115] wurde die Gesamtintensität der Fluoreszenz eines jeden Bildes gemessen.

2.2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

2.2.8.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay: Übersicht

Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer Antigen-Antikörper-Bindung basiert. Ein Enzymgekoppelter Antikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Antigen. Das Enzym am Antikörper (hier die Meerrettichperoxidase (HRP)) setzt ein chromogenes Substrat um. Das Reaktionsprodukt ist als Farbumschlag in der Probe erkennbar. Mit einem Photometer wird die Absorption einer jeden Probe gemessen. Die Absorption korreliert mit der Stärke des Farbumschlags und somit mit der Antigenkonzentration in der Probe. Anhand einer Standardkurve aus bekannten Antigenkonzentrationen kann die Konzentration des Antigens in der Probe errechnet werden. Hier wurden zwei verschiedene ELISA-Verfahren verwendet: ein Sandwich-ELISA, um die Konzentration von Albumin im Urin zu bestimmen. Sowie ein kompetitiver ELISA, um die Konzentration von 15-isoprostan F_{2t} im Urin zu bestimmen.

2.2.8.2 Sandwich-Elisa zur Messung der Albuminkonzentration im Urin

AngII verursacht eine Albuminurie, wenn Mäuse für 28 Tage mit 600 ng/kg min behandelt werden [111]. Um zu untersuchen, ob Nox1 die AngII-induzierte Albuminurie vermittelt, wurde mittels Sandwich-ELISA die Albuminkonzentration im Urin gemessen. Eine hohe Albuminkonzentration im Urin, weist auf einen glomerulären Schaden in der Niere hin [118]. Der Sandwich-ELISA ist eine Sonderform des (in-)direkten ELISAs, bei der zwei Antikörper verwendet werden. Der erste Antikörper haftet am Boden der Mikrotiterplatte und wird von dem in der jeweiligen Probe enthaltenen Antigen gebunden. Der zweite Antikörper ist biotinyliert und bindet wiederum an das Antigen. Das Antigen befindet sich zwischen dem Erst- und Zweitantikörper. HRP-konjugiertes Streptavidin bindet daraufhin an das Biotin am Zweitantikörper. HRP setzt das chromogene Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Reaktionsprodukt um. Die Stärke des Farbumschlags korreliert mit der Konzentration des Antigens in der Probe [119].

Es wurde das ELISA-Kit von AssayPro (EMA 3201-1, St. Charles, USA) verwendet und nach den Angaben des Herstellers gearbeitet (Protokoll Maus-Albumin ELISA-Kit (EMA 3201-1)). Damit die Antigenkonzentration der Proben innerhalb der Standardkurve lag, wurden die Urinproben verdünnt (Tabelle 6). Die Proben wurden für 12 Minuten mit dem TMB-Substrat inkubiert. Salzsäure stoppte die Umsetzung des TMBs. Sofort im Anschluss wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit dem Spektralphotometer Tecan Sunrise (Analysesoftware XFLUOR4 Version V4.51, Tecan, Männedorf, Schweiz) die Absorption gemessen. Die Auswertung der Absorptionswerte erfolgte mit Hilfe der Software von www.my-assay.com (März 2016) Die Albuminkonzentration im Urin wurde anhand des Albumin-/Kreatinin-Quotienten (mg/ml) bestimmt (Formel 1).

Versuchsgruppe	WT-K	WT-AngII	Nox1-KO-K	Nox1-KO-AngII
Verdünnung der Urinprobe in A. dest.	1:500	1:2000	1:1000	1:2000

Tabelle 6: Messung der Albuminkonzentration im Urin mittels ELISA. Dargestellt ist die Verdünnung des Urins in den einzelnen Versuchsgruppen. Der Urin wurde mit A. dest. verdünnt. WT-K: Wildtyp Kontrolle, WT-AngII: Wildtyp Angiotensin II, Nox1-KO-K: Nox1 Knockout Kontrolle, Nox1-KO-AngII: Nox1 Knockout Angiotensin II.

$$\text{Albumin-Kreatinin-Quotient (mg/ml)} = \frac{C_{\text{Albumin Urin}}}{C_{\text{Kreatinin Urin}}}$$

Formel 1: Berechnung der Albuminkonzentration im Urin mittels ELISA. Es wurde die Konzentration von Albumin im Urin ins Verhältnis zur Konzentration von Kreatinin im Urin gesetzt und daraus der Albumin-Kreatinin-Quotient bestimmt. Die Konzentration von Kreatinin im Urin wurde ebenfalls mittels Jaffé-Reaktion bestimmt (Kap. 2.2.8.4). $C_{\text{Albumin Urin}}$ = Konzentration von Albumin im Urin, $C_{\text{Kreatinin Urin}}$ = Konzentration von Kreatinin im Urin.

2.2.8.3 Kompetitive ELISA zur Messung der Konzentration an 15-isoprostan F_{2t} im Urin

AngII erhöht die Konzentration an 15-isoprostan F_{2t} im Urin, wenn Mäuse über 28 Tage mit 600 ng/mg min behandelt werden. Es wurde nun untersucht, ob Nox1 die Lipidperoxidation beeinflusst. Dazu wurde die Konzentration von 15-isoprostan F_{2t} im Urin gemessen. Isoprostane gehören zur Gruppe der Prostaglandine. Wird Arachidonsäure durch freie Radikale peroxidiert, entstehen Isoprostane. Isoprostane können als Nachweis für oxidativen Stress quantifiziert werden [120, 121]. Der kompetitive ELISA ist eine Sonderform des (in-)direkten ELISAs. Beim kompetitiven ELISA konkurrieren zwei Antigene um die Bindungsstelle am Antikörper: Das Antigen in der Probe und ein artifizielles HRP-konjugiertes Antigen. Je höher die Konzentration des Antigens in der Probe, desto weniger HRP-konjugiertes Antigen bindet an den Antikörper. Die Konzentration des Antigens in der Probe ist somit umgekehrt

proportional zur Stärke des Farbumschlags. Es wurde nach den Angaben des Herstellers des Isoprostan Elisa-Kits der Firma Oxford Biomedical Research (Urinary Isoprostane ELISA Kit, EA85, Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA) gearbeitet. Der Primärantikörper bindet nur freies 15-isoprostan F_{2t} , daher wurden die Urinproben zunächst mit Glucuronidase vorbehandelt. Die Glucuronidase spaltet Glucuronsäure vom Isoprostan ab. Die Proben wurden für 35 Minuten mit dem Substrat TMB im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe der Salzsäure wurde die Absorption sofort im Anschluss bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ mit dem Spektralphotometer Tecan Sunrise (Analysesoftware XFLUOR4 Version V4.51, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Auswertung der Absorptionswerte erfolgte mit Hilfe der Software von www.my-assay.com (März 2016).

2.2.8.4 Jaffé-Reaktion zur Messung der Kreatininclearance

Zur Messung der Kreatininkonzentration in Serum und Urin wurde ein Assay verwendet, der auf der Jaffé-Reaktion basiert. Die Reaktion von Kreatinin mit Pikrinsäure führt in einer alkalischen Lösung zu einer Rotfärbung und einem Niederschlag [122]. Die Stärke der Rotfärbung korreliert mit der Konzentration von Kreatinin im Urin bzw. Serum. Bei bekannter Kreatininkonzentration im Serum und im Urin kann die Kreatininclearance berechnet werden (Formel 2). Die Kreatininclearance ist ein Maß für die GFR der Niere. Hier wurde untersucht, ob Nox1 und AngII die GFR mindern. Es wurde das Creatinine urinary/serum Assay Kit (urinary: #500701/serum: #700460, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) verwendet und nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Der Urin wurde zunächst 1:10 mit A. dest. verdünnt, das Serum wurde unverdünnt verwendet. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 490 \text{ nm}$ mit dem Spektralphotometer Tecan Sunrise (Analysesoftware XFLUOR4 Version V4.51, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen.

$$\text{Kreatinin - Clearance (ml/h)} = \frac{C_{\text{Kreatinin Urin}} * \text{Urinmenge (ml)}}{C_{\text{Kreatinin Serum}} * \text{Urin Sammelzeit (h)}}$$

Formel 2: Berechnung der Kreatinin-Clearance als Parameter für die Nierenfunktion.

$C_{\text{Kreatinin Urin}}$ = Konzentration von Kreatinin im Urin, $C_{\text{Kreatinin Serum}}$ = Konzentration von Kreatinin im Serum.

2.2.9 Histopathologie

2.2.9.1 Histopathologie: Übersicht

Anhand von drei verschiedenen histologischen Färbungen wurde untersucht, ob das Fehlen der Nox1 die AngII-induzierten morphologischen Veränderungen verbessert.

Um die Morphologie in der Nierenrinde beurteilen zu können, wurden die Gefäße, die Tubuli und die Glomeruli anhand von vier verschiedenen Indizes in Stadien eingeteilt: Die Gefäße wurden anhand des Vaskulären Schädigungsindex (VSI) beurteilt. Die Glomeruli wurden anhand zweier Indizes beurteilt: Dem Glomeruloskleroseindex (GSI) und dem Mesangiolyseindex (MSI). Die Tubuli wurden anhand des Tubulointestitiellen Schädigungsindex beurteilt (TSI). Es wurde ein Standardprotokoll für drei verschiedene Färbungen verwendet: Einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE), einer Periodic acid-Schiff-Färbung (PAS) und einer Siriusrot-Färbung. Mit der PAS-Färbung werden glykogene Strukturen violett, mit der Siriusrot-Färbung kollagene Fasern rot angefärbt. HE färbt basophile Strukturen wie die Zellkerne blau. Die 2 µm dicken Gewebeschnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Leica DM750) und einem 20er Objektiv beurteilt.

2.2.9.2 Vaskulärer Schädigungsindex (VSI)

Der Schädigungsindex für vaskuläre Strukturen beurteilt die Gefäßwandhypertrophie in den Arterien und Venen der Nierenrinde. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin gefärbt. Die Einteilung erfolgte anhand der Stadien null bis vier nach Véniant et al [123]. Pro Tier wurden 20 Gefäße in der Nierenrinde untersucht. Die großen zu- und abführende *Arteria* und *Vena Renalis* wurden nicht in die Beurteilung mit eingeschlossen. Die Stadieneinteilung richtete sich nach dem Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gesamtdurchmesser des Gefäßes in % (Tabelle 7). Stadium null ist ein physiologisches Gefäß ohne Hypertrophie der Gefäßwand. In Stadium vier ist die Gefäßwand fibrinoide hypertrophiert. Der VSI der 20 Gefäße eines Gewebeschnittes wurde addiert. Der Mittelwert ergab den Gesamt-VSI des Tieres (Formel 3).

Stadium	Gefäßwandhypertrophie in % (Gefäßwanddicke/Gesamtdurchmesser Gefäß)
0	0
1	≤ 25
2	≥ 25-50
3	≥ 50
4	Fibrinoide Gefäßwandhypertrophie

Tabelle 7: Die fünf Stadien des Vaskulären Schädigungsindex (VSI) nach Véniant. Der VSI wurde verwendet, um die Morphologie der Gefäße in der Nierenrinde zu beurteilen. Je dicker die Gefäßwand im Verhältnis zum Gesamtdurchmesser des Gefäßes, desto größer das VSI-Stadium und desto pathologischer die Gefäßmorphologie [123].

$$VSI = \frac{(n * S_0) + (n * S_1) + (n * S_2) + (n * S_3) + (n * S_4)}{20}$$

Formel 3: Berechnung des Vaskulären Schädigungsindex eines Tieres. Es wurden 20 Gefäße pro Tier beurteilt. S_{1-4} = Stadium null bis vier nach Véniant [123]. n = Anzahl der Gefäße im entsprechenden Stadium.

2.2.9.3 Glomerulosklerose- und Mesangiolyseindex (GSI und MSI)

Strukturänderungen durch AngII in den Glomeruli wurden anhand des Glomerulosklerose- und Mesangiolyseindex nach El Nahas (GSI) und Dimmler (MSI) [124, 125] beurteilt. Anhand des MSIs wurde die Weite der Kapillare beurteilt (Stadium eins und zwei) oder die Größe eines Kapillaraneurysmas (Stadium zwei und drei). Mit dem GSI wurde die Obliteration und Sklerose der Kapillare beurteilt. Das Stadium richtete sich danach wie viel Fläche in % die Kapillarerweiterung (MSI) bzw. die Kapillarsklerose (GSI) im Verhältnis zur Gesamtfläche des Glomerulums einnahmen (Tabelle 8 und Tabelle 9). Pro Tier wurden 50 Glomeruli in PAS-gefärbten Gewebeschnitten bewertet. Der MSI- bzw. GSI- Wert eines Tieres ergab sich aus der Addition der Anzahl der Glomeruli pro Stadium S_0 bis S_4 (Formel 4).

Stadium	Mesangiolyseindex in % (Fläche der Kapillarerweiterung)
0	0
1	≤ 25
2	≥ 25 oder Kapillaraneurysma ≤ 50
3	Kapillaraneurysma ≥ 50
4	Kapillaraneurysma ≥ 75

Tabelle 8: Beurteilung der Glomeruli anhand des Mesangiolyseindex (MSI) nach El Nahas [124]. Die Stadien des MSIs ergeben sich aus der Fläche der Kapillarerweiterung oder eines Kapillaraneurysmas in % im Verhältnis zur Gesamtfläche des Glomerulus in %.

Stadium	Glomeruloskleroseindex in % (Fläche der Kapillarsklerose)
0	0
1	≤ 25
2	≤ 50
3	≥ 50
4	> 75

Tabelle 9: Beurteilung der Glomeruli anhand des Glomeruloskleroseindex (GSI) nach El Nahas [124]. Die Stadien des GSIs richten sich nach der Fläche der Obliteration der Kapillare in % im Verhältnis zur Gesamtfläche des Glomerulus in %.

$$MSI \text{ bzw. } GSI = \frac{(n * S_0) + (n * S_1) + (n * S_2) + (n * S_3) + (n * S_4)}{50}$$

Formel 4: Formel zur Berechnung des Glomerulosklerose- und Mesangiolyseindex eines Tieres. Pro Tier wurden 50 Glomeruli ausgewertet. S_{1-4} = Stadium null bis vier nach El Nahas [124]. n = Anzahl der Gefäße im entsprechenden Stadium.

2.2.9.4 Tubulointerstieller Schädigungsindex

Der Tubulointerstielle Schädigungsindex (TSI) nach Veniant [123] beurteilt die Morphologie des Interstitiums und der Tubuli in der Nierenrinde. Die Beurteilung erfolgte auf Gewebeschnitten der Niere anhand von verschiedenen histologischen Färbungen. Im Verhältnis zur Gesamtfläche des Gesichtsfeldes wurde die Fläche bestimmt, die

- durch Entzündungszellen im Interstitium,
- durch Fibrosefasern im Interstitium,
- durch dilatierte Tubuli,
- durch Tubuli mit atrophierter Basalmembran

verändert war (Tabelle 10) Für jedes Beurteilungskriterium wurde dem Gesichtsfeld eines von vier Stadien zugeteilt. Das Stadium ergab sich aus dem Verhältnis der Fläche der pathologischen Veränderung im Verhältnis zur Gesamtfläche des Gesichtsfeldes. In Stadium null haben Tubuli und Interstitium eine physiologische

Morphologie, in Stadium eins sind ≤ 25 % des Gesichtsfeldes pathologisch verändert, Stadium zwei ≤ 50 % und Stadium drei > 50 %. Pro Tier wurden 20 Gesichtsfelder ausgewertet. Zur Berechnung des TSIs wurde das Gesamtstadium jedes einzelnen Beurteilungskriteriums berechnet (Formel 5A) und die Gesamtstadien der vier Beurteilungskriterien addiert (Formel 5B).

	Entzündung	Fibrose	Dilatation	Atrophie
Histologische Färbung	HE	Siriusrot	PAS	PAS

Tabelle 10: Übersicht über die vier Beurteilungskriterien aus denen sich der Tubulointerstitielle Schädigungsindex (TSI) zusammensetzt: Vorkommen von Entzündungszellen und Fibrosefasern im Interstitium, Dilatation der Tubulilumen und Atrophie der Basalmembran der Tubuli. Zudem eine Übersicht der histologischen Färbungen, die zur Erhebung der vier Beurteilungskriterien verwendet wurden. Das Stadium ergab sich aus dem Verhältnis der Fläche der pathologischen Veränderung im Verhältnis zur Gesamtfläche des Gesichtsfeldes (0 %, <25 %, 25-50 %, >50 %).

$$(A) \quad S_{\text{Entzündung/Fibrose/Dilatation/Atrophie}} = \frac{(n * S_0) + (n * S_1) + (n * S_2) + (n * S_3)}{20}$$

(B)

$$TSI = \frac{(S_{\text{Entzündung}} + S_{\text{Fibrose}} + S_{\text{Dilatation}} + S_{\text{Atrophie}})}{4}$$

Formel 5: Formeln zur Berechnung des TSIs. Pro Tier wurden 20 Gesichtsfelder ausgewertet. Zur Berechnung des Tubulointerstitiellen Schädigungsindex eines Tieres wurde zunächst das Stadium S für jedes einzelne Beurteilungskriteriums berechnet (Formel 5A). Anschließend wurden die Stadien für die Entzündung, Fibrose, Dilatation und Atrophie addiert (Formel 5B). Die addierten Werte der Stadien S ergaben den TSI.

2.2.10 Proteinbiochemie

2.2.10.1 Western Blot: Übersicht

Der Western Blot ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von Proteinen auf einer Membran. Hier wurde die Expression von antioxidativen Proteinen sowie der Nox1-Isoformen und -Untereinheiten in der Niere untersucht. Der Proteinnachweis gliedert sich in drei Abschnitte. In einem ersten Schritt werden die Proteine aus dem Gewebe isoliert und mittels Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In einem zweiten Schritt werden die Proteine auf eine Membran übertragen. Im letzten Schritt wird die Membran mit einem Antikörper inkubiert, der das nachzuweisende Protein bindet. Die Protein-Antikörper-Bindung wird durch eine Chemolumineszenzreaktion detektiert.

2.2.10.2 Proteinisolation

Um die Proteine aus dem Nierengewebe zu isolieren, wurden 30 mg der Niere in 250 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40 (Tergitol), 0,1 % SDS, 1 % Natriumdesoxycholat, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM PMSF, 50 mM Natriumfluorid, Protease-Inhibitor (Thermo Scientific, Rockford, USA)) im Tissue Lyser (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) für dreimal zehn Sekunden homogenisiert (Frequenz 30 %). Um noch intakte Zellen aufzuschließen, wurde eine Ultraschall-Sonde (EpiShear™ Probe Sonicator, Active Motif, Carlsbad, USA) für fünfmal zwei Sekunden bei einer Amplitude von 30 % verwendet. Das Homogenisat wurde für 10 Minuten bei 4 °C bei 13000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), sodass sich proteinfreies Zellmaterial am Boden ablagerte. Der Überstand wurde abgenommen. Um die Proteinmenge zu quantifizieren, wurde ein Bradford-Assay (Bio-Rad DC Protein Assay Kit 1, 500-0111-MSDS, Bio-Rad, Hercules, USA) eingesetzt [126]. Der Assay verwendet den Farbstoff Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG). Proteine bilden mit CBBG Komplexe und überführen den Farbstoff vom instabilen, kationischen in einen stabilen, anionischen Zustand. Die Komplexbildung ist an einer Farbänderung der Probe von rot zu blau erkennbar. Die Blaufärbung ist proportional zur Proteinkonzentration. Die Absorption wurde mittels Spektralphotometer ($\lambda = 595 \text{ nm}$, Tecan Sunrise mit der Analysesoftware XFLUOR4 Version V4.51, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Anhand einer aufsteigenden Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) wurde die Proteinmenge im Lysat errechnet.

2.2.10.3 Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE-Elektrophorese und Überführung der Proteine auf eine Membran

Um die Proteine nach ihrer Größe und ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurden 10 und 12,5 %ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Um als langgestreckte Aminosäureketten durch das Gel wandern zu können, müssen die Proteine in ihrer Primärstruktur vorliegen. Die Primärstruktur wird durch die Hitzedenaturierung (95 °C für 5 min) der Proteine und durch die negative Ladung des SDS (Natriumdodecylsulfat) stabilisiert. Die Geltaschen wurden mit 20-100 µg Protein, in Roti-Load 1 (8 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 20 % β -Mercaptoethanol, 40 % Glycerin, 0,015 % Bromphenolblau; Roth, Karlsruhe, Deutschland) und dem Größenstandard (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, #26619, Thermo Scientific, Waltham, USA) beladen. Um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren, wurde zunächst eine Stromstärke von 0,02 A für 20 min angelegt. Zur Auftrennung der Proteine wurde die

Stromstärke für 60 min auf 0,06 A erhöht. Der Laufpuffer mit einem pH von 8,3 bestand aus 2,5 mM Tris, 0,1 % SDS, und 19,2 mM Glycin.

Mittels Nass-Blotting wurden die Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) (Amersham™ Protran® Western blotting membranes, #10600001, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) übertragen. Die Proteine wanderten im elektrischen Feld (0,3 A, 1,5 h, Blottingpuffer (0,025 M Tris-Base, 0,192 M Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3)) vom Gel auf die Membran und blieben dort durch hydrophobe Wechselwirkung haften. Die Proteinübertragung auf die PVDF-Membran wurde durch Anfärben mit dem Azofarbstoff PonceauS (0,375 g PonceauS, 1,25 ml Essigsäure, ad. 250 ml dest. H₂O) überprüft. Die Membran wurde dreimal für fünf Minuten in Tris-gepufferter Saline mit Tween (TBST: Tris-gepufferte Saline: 0,5 M Tris-Base, 1,5 M Natriumchlorid mit 0,1 % Tween 20) gewaschen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu vermeiden, folgte eine einstündige Inkubation der Membran in einer Blockierlösung (5 %iges Milchpulver in TBST). Nach einem Waschschrift (dreimal fünf Minuten in TBST) wurde die Membran für 12 bis 15 Stunden bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Hämoxygenase 1 (HO-1): 1:1000, #2322-1, Epitomics, Burlingame, USA; Superoxiddismutase 1 (SOD1): 1:4000, #GTX100554, GeneTex, CA, USA; Xanthinoxidase1 (XO1): 1:1000, NoxO1: 1:500, #orb221810, biorbyt, USA; NoxA1: 1:500, #orb221810biorbyt, USA; p47^{phox}: 1:500, #orb256707, phospho S- 328, biorbyt, USA) in 5 % Milchpulver/TBST inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG HRP, #KCB003, Rockland, PA, USA, 1:2000 in 5 % Milchpulver/TBST) für zwei Stunden auf der Membran belassen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Antikörperbindung an das zu untersuchende Protein mittels Ecl-Lösung (*enhanced chemiluminescence*-Lösung: 1 ml Lösung A: 200 ml Tris Hydrochlorid pH 8,5, 50 mg Luminol; 10 µl Lösung B: 11 mg Para-Hydroxycoumarinsäure, 10 ml DMSO; 1 µl Lösung C: 30 % H₂O₂) visualisiert. Die Meerrettichperoxidase am Sekundärantikörper oxidiert das Luminol aus der Ecl-Lösung. Oxidiertes Luminol emittiert Licht, das mit dem Bio-Rad ChemiDoc (ChemiDoc™Touch, Imaging System, Bio-Rad, Hercules, USA) detektiert wurde. Die Stärke der Banden wurde mit dem Programm Imaging Lab™ Software (Imaging Lab™ Software, Version 5.2.1, Bio-Rad, Hercules, USA) errechnet. Als Referenzprotein wurde das konstitutiv exprimierte Protein GAPDH (1:1000 in 5 % BSA/TBS –T, #2118, Cell Signaling Technology, Beverly, USA) verwendet. Die Daten der WT-K-Tiere wurden auf eins normiert.

2.2.11 Molekularbiologie

2.2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion: Übersicht

Die quantitative Real-Time-PCR (qPCR, Polymerase-Kettenreaktion) ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von DNA-Fragmenten. Hier wurde eine qPCR durchgeführt, um zwei Aspekte zu untersuchen. Erstens, ob unter der Behandlung mit AngII das Fehlen der Nox1 zu einer veränderten Genexpression der antioxidativen Enzyme SOD1, XO1, HO1, Glutathionperoxidase (Gpx) und Thioredoxin-Reduktase (Txnrd) führt. Und zweitens, ob unter der Behandlung mit AngII das Fehlen der Nox1 durch ihre Untereinheiten NoxO1/NoxA1/p47^{phox} oder durch die Isoformen Nox2/Nox4 kompensiert wird.

Die Expression der oben genannten Gene wurde auf mRNA-Level (*messenger* Ribonukleinsäure) untersucht. Das methodische Vorgehen lässt sich in drei Schritte gliedern: In einem ersten Schritt wird mRNA aus biologischem Material isoliert. In einem zweiten Schritt wird die mRNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase), in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben. Die cDNA wird in einem dritten Schritt im Thermocycler mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und quantifiziert. Im Thermocycler durchlaufen die Proben in ca. 20-50 Zyklen drei sich wiederholende Abläufe: Zunächst wird die Temperatur auf 94–96 °C erhöht, die Wasserstoffbrückenbindungen in der cDNA werden aufgebrochen und die cDNA wird in zwei Einzelstränge getrennt. Anschließend wird die Temperatur soweit gesenkt, dass die Primer sich an die Einzelstränge anlagern können (Annealingtemperatur). Diese Annealingtemperatur liegt meist 5-8 °C unter der Schmelztemperatur der Primer. Im letzten Schritt ergänzt eine Taq-Polymerase die fehlenden Nukleotide zwischen den beiden Primerpaaren. In jedem Zyklus wird die Anzahl der PCR-Produkte exponentiell erhöht. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte in der qPCR stehen verschiedene Substrate zur Verfügung. Hier wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green I verwendet. SYBR®Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der in jedem Zyklus in die neu amplifizierte, doppelsträngige DNA interkaliert. Die Real-Time PCR unterscheidet sich von der konventionellen PCR darin, dass während jedes Zyklus die Amplifikationsmenge des PCR-Produktes durch das Fluoreszenzsignal gemessen wird. Dazu wird jede einzelne Probe von einem Lichtstrahl durchleuchtet und die Lichtemission gemessen. Je größer die Konzentration des amplifizierten DNA-Segmentes, desto mehr SYBR®Green lagert sich in die DNA ein und desto höher ist die Lichtemission der Probe. Aus diesen kontinuierlichen Messungen und nach Überschreiten der Hintergrundfluoreszenz lässt sich errechnen, wie viel cDNA relativ zu einem Referenzgen in der Probe gewesen ist. Bei der

Auswertung wurden nur die Ergebnisse als biologisch relevant gewertet, bei denen das PCR-Produkt doppelt so hoch war (bzw. um die Hälfte reduziert war) wie die mRNA-Expression der WT-Kontrollgruppe. Zudem wurden die Schmelzkurven eines jeden PCR-Produktes überprüft. Unspezifische Schmelzkurven können ein Hinweis auf eine Primer-Dimer-Bildung sein.

Um den Genotyp der Tiere zu überprüfen, wurde DNA isoliert. Für die WT-Tiere wurde eine konventionelle PCR durchgeführt, für die KO-Tiere eine Touchdown-PCR. Die Touchdown-PCR vermindert durch eine hohe Annealingtemperatur in den ersten Zyklen unspezifische PCR-Produkte [127, 128]. Während der nächsten PCR-Zyklen wird die Annealingtemperatur kontinuierlich gesenkt und die Ausbeute maximiert [128]. Zur Auswertung wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.11.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurde das RNeasy® Mini Kit (#74104, Qiagen, Valencia, CA, USA) verwendet. Zunächst wurden 30 mg der Niere in 600 µl RLT Puffer im Tissue-Lyser (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert (2x10 Sekunden, Frequenz 30 %). Für die weiteren Schritte wurde mit dem Qiacube gearbeitet und das Protokoll des Herstellers befolgt (RNA_RNeasyMini animal tissues and cells, Qiacube, Stand 2008). Zur Isolierung der RNA wird die Silikagel-Fällungsmethode angewandt (siehe Abschnitt DNA-Isolierung). Die Konzentration der isolierten RNA wurde gemessen (Nanodrop 200C UV-Spektrometer, Thermo Scientific, Rockford, USA) und auf 1600 ng RNA mit RNase freiem Wasser (RNeasy® Mini Kit, #74104, Qiagen, Valencia, CA, USA) verdünnt. Das mRNA-Produkt wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.11.3 Synthese der cDNA durch die Reverse Transkriptase

Die mRNA wurde mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kits (#1401192, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurden 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt: 10 µl Reverse Transkriptase-Mastermix (Omniscript® Reverse Transcription Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und 1600 ng/10 µl mRNA in RNase-freiem H₂O (Tabelle 11). Im Biometra Thermocycler (Göttingen, Deutschland) wurde das Protokoll aus Tabelle 12 verwendet. Das cDNA-Produkt wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für die qPCR verwendet.

Reagenz	Menge (μl)
1600 ng mRNA in 10 μl RNase-freiem H_2O	10
10x Reverse Transkriptase Puffer	2
25x dNTP Mix [100 mM]	0,8
10x Random Primers	2
Ribolock RNase Inhibitor (40 U/ μl)	0,5
MultiScribe Reverse Transkriptase	1
RNase-freies H_2O	3,7

Tabelle 11: Übersicht über das Pipettierschema für die cDNA-Synthese für die cDNA-Synthese im Biometra Thermocycler. Die 20 μl Gesamtvolumen enthielten 10 μl RNase-freies H_2O mit 2000 ng mRNA.

Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Dauer (min)
25	10
37	120
85	5
4	∞

Tabelle 12: Übersicht über das PCR-Protokoll für die cDNA-Synthese im Biometra Thermocycler. Die 20 μl Gesamtvolumen enthielten 10 μl RNase-freies H_2O mit 2000 ng mRNA.

2.2.11.4 Quantitative Real-Time-PCR

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurde pro Ansatz 20 μl Gesamtvolumen mit 20 ng cDNA eingesetzt. Die Endkonzentration der Primer betrug 0,25 μM . Es wurde das SensiMix™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline, London, UK) verwendet. Das Kit enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Stabilisatoren wie Mg^{2+} und eine Taq-Polymerase. Für die Amplifikation in 45 Zyklen wurde der CFX96™ Real-Time System Thermocycler (C1000 Touch, Bio-Rad, Hercules, California, USA) verwendet (Tabelle 13 und Tabelle 14). Mit Hilfe der Bio-Rad CFX Software 3.1 wurde die relative mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression von GAPDH und β -Aktin berechnet.

Reagenz	Menge (μl)
cDNA [20 ng/ μl]	1
SensiMix™ SYBR® Hi-ROX Kit	10
Primer sense	0,5
Primer antisense	0,5
RNase-freies H_2O	8

Tabelle 13: Übersicht über das Pipettierschema für eine Probe für die qPCR.

Schritt	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Dauer (min)	Bemerkung
1	95	10:00	
2	95	00:15	45 Zyklen
3	55	00:15	45 Zyklen
4	72	00:17	

Tabelle 14: Übersicht über das PCR-Protokoll für die qPCR für 45 Zyklen.

2.2.11.5 DNA-Isolierung

Für die Isolierung der DNA wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Valencia, CA, USA) verwendet. Es wurde das Protokoll (Purification of Total DNA from Animal Tissues) von Qiagen befolgt. Zunächst wurden 20-25 mg der Niere mit 180 µl ALT Puffer aus dem Kit im Tissue-Lyser (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert (2x10 Sekunden, Frequenz 30 %). Dem Überstand wurden 20 µl Proteinase K hinzugefügt und gevortext. Anschließend wurden die Proben für zwei Stunden bei 56 °C inkubiert. Da in der Niere viel RNA vorhanden ist und diese nicht zusammen mit der DNA extrahiert werden sollte, wurden die Proben für zwei Minuten mit vier µl RNase A (100 mg/ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Für die weiteren Schritte wurde mit dem Qiacube gearbeitet (Protokoll: DNA_DNeasy blood and tissue tissues and rodent tails, Stand 2014). Die DNA wurde durch die Silikagel-Fällungsmethode extrahiert. Dabei bindet die DNA an eine Membran aus Kieselgel. Chaotrope Salze denaturieren die Proteine, die an die DNA gebunden sind. Nach zwei Waschsritten wurde die DNA von der Kieselgel-Membran eluiert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde mit dem Nandodrop 200C UV-Spektrometer (Thermo Scientific, Rockford, USA) gemessen und mit a. dest. auf 50 ng/µl DNA verdünnt. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert oder direkt zur Überprüfung der Genotypen in der konventionellen und Touchdown-PCR eingesetzt.

2.2.11.6 Konventionelle und Touchdown-PCR zur Genotypisierung

Zur Überprüfung der Genotypen wurde jede Probe mit dem Wildtyp- und mit dem Mutanten-Primer amplifiziert. Für die WT-Primer wurde eine Standard-PCR verwendet, für die Mutanten-Primer eine Touchdown-PCR. Die Primer wurden von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bereitgestellt. Die Proben wurden im Biometra Thermocycler (Göttingen, Deutschland) wie in Tabelle 15 eingesetzt und verwendet (Tabelle 16 und Tabelle 17). Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,8 %iges Agarosegel aufgetragen: 1,8 g Agarose wurden durch Erwärmen in der Mikrowelle in 1000 ml 1x TAE-Puffer (40 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8 mit Eisessig eingestellt) gelöst und 7 µl Ethidiumbromid zugefügt. Die Taschen des Agarosegels wurden mit 20 µl der Proben und 3 µl des Größenmarkers (Gene Ruler™ 1000 bp DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) beladen. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. An der Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 30 V für 15 min angelegt und für 1,5 Stunden auf 60 V erhöht. Das in die DNA interkalierte, Ethidiumbromid wurde unter UV-Licht mit dem GelDoc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) detektiert.

Reagenz	Menge (µl)
H ₂ O	5
Nox1-Common-Primer (10 µM)	1,25
Nox1-Wildtyp-/ODER Mutant-Primer (10 µM)	1,25
DNA (50 ng/µl)	5
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	12,5

Tabelle 15: Pipettierschema für die Standard- und Touchdown-PCR zur Überprüfung des Genotyps der Versuchstiere. Für alle Proben wurden jeweils zwei Ansätze hergestellt: Ein Ansatz mit dem Nox1-Common-Primer und dem Nox1-Wildtyp-Primer für eine Standard-PCR und ein zweiter Ansatz mit dem Nox1-Common-Primer und dem Nox1-Mutante-Primer für eine Touchdown-PCR. Daher wurde in einem Ansatz entweder der Nox1-Wildtyp- oder der Nox1-Mutanten-Primer verwendet.

Schritt	Temp. (°C)	Dauer (sec)	Bemerkung
1	94 °C	120	
2	94 °C	20	10 Zyklen
3	65 °C	15	10 Zyklen, -0,5 °C/Zyklus
4	68 °C	10	10 Zyklen
5	94 °C	15	28 Zyklen
6	60 °C	15	28 Zyklen
7	72	10	28 Zyklen
8	72	60	
9	4	∞	

Tabelle 16: PCR-Programm für die Standard- und Touchdown-PCR zur Überprüfung des Genotyps der Versuchstiere.

Schritt	Temp. (°C)	Dauer (sec)	Bemerkung
1	94	180	
2	94	20*	36 Zyklen
3	50	30*	36 Zyklen
4	72	30*	36 Zyklen
5	4	∞	

Tabelle 17: Übersicht über das PCR-Programm für die konventionelle PCR für die Ansätze mit dem Nox1-Wildtyp-Primer. Übersicht über das PCR-Programm der Touchdown-PCR für die Ansätze mit dem Nox1-Mutanten-Primer. Das PCR-Programm der Touchdown-PCR richtet sich nach den Angaben der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). In der Touchdown-PCR wird die Annealing-Temperatur nach jedem Zyklus um 0,5 °C gesenkt. Dies ermöglicht eine hochspezifische Amplifikation.

2.3 Statistik

Die Abbildungen und Graphen zeigen die Mittelwerte von sieben bis acht Versuchstieren \pm Standardfehler (SEM). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 23 (IBM, Somers, USA). Zunächst wurden die Daten mit dem Test nach Shapiro auf Normalverteilung getestet. Waren die Daten normalverteilt und bestand eine Homogenität der Varianzen, wurde eine Varianzanalyse mittels einfaktoriellem Test nach Anova durchgeführt. Der post-hoc Test Bonferroni zeigte, zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede bestanden. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ galt als signifikant. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der non-parametrische Kruskal-Wallis- und der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Korrektur des alpha-Fehlers wurde berücksichtigt.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung des Genotyps der Versuchstiere

Der Genotyp der Versuchstiere wurde durch die Amplifikation des Nox1-Gens mittels PCR überprüft. Das PCR-Produkt der Nox1-KO-Tiere mit fehlerhaftem Nox1-Gen war 300 bp groß (Abb. 13 rechts). Das intakte Nox1-Gen der Wildtyp-Tiere war 500 bp groß (Abb. 13 links). Die Genotypen aller Tiere konnten validiert werden.

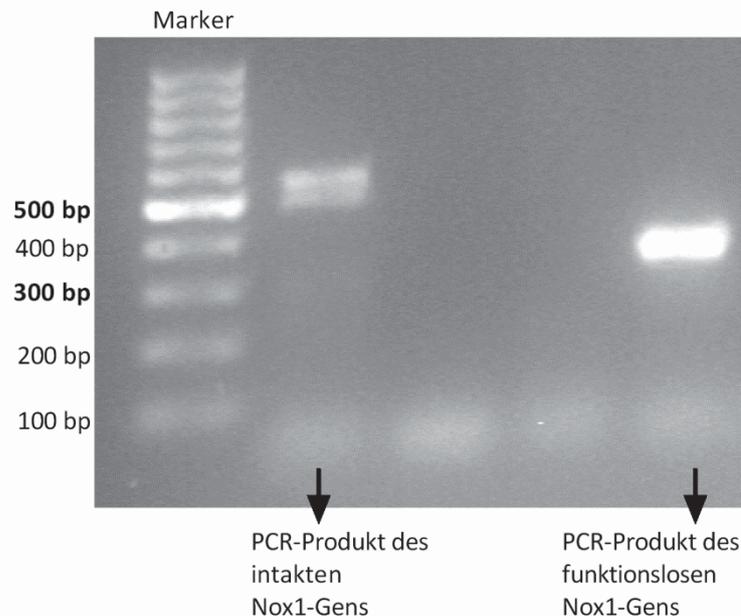


Abb. 13: Repräsentative Validierung des Genotyps einer Nox1-KO-Maus (Abb. 13 rechts) sowie einer WT-Maus (Abb. 13 links). Die PCR-Produkte des Nox1-Gens wurden mittels Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt. In der Abbildung rechts ist das PCR-Produkt des funktionslosen Nox1-Gens einer Nox1-KO-Maus auf einer Höhe von 300 bp zu sehen. In der Abbildung links das intakte Nox1-Gen einer Wildtyp-Maus bei 500 bp. Marker: Größenstandard (1 kbp).

3.2 Untersuchung des Blutdrucks unter Nox1-Defizienz

Um zu untersuchen, ob AngII trotz Fehlens der Nox1 zu einem Blutdruckanstieg führt, wurde der Blutdruck mittels „Tail-cuff-Methode“ gemessen. Die Messungen erfolgten während der 28-tägigen Behandlung mit AngII oder PBS zu acht Zeitpunkten. Zu Versuchsbeginn betrug der Blutdruck in allen vier Versuchsgruppen um die 120 mmHg (Abb. 14). Der systolische Blutdruck in den Kontrolltieren stieg während der Behandlung mit PBS kaum an. AngII führte während der 28 Tage in den Wildtyp- und Nox1-KO-Tieren zu einem kontinuierlichen, signifikanten Blutdruckanstieg gegenüber den Kontrolltieren. An Tag sieben und neun sowie an den letzten beiden Messtagen (Tag 19 und Tag 22) war der Blutdruck der Nox1-KO-AngII-Tiere signifikant niedriger

der Tiere über den Verlauf der 28 Tage nicht signifikant. Das Gewicht der Kontrollmäuse der WT- und Nox1-KO-Tiere war bei der ersten Messung niedriger als bei den AngII-behandelten Mäusen (Abb. 15). Von der ersten Messung bis zur letzten Messung gewannen die Kontrollmäuse stetig an Gewicht (WT-K: + 2,84 g und Nox1-KO-K: + 2,08 g). An Tag 18 wurden die osmotischen Minipumpen implantiert. Bei Vergleich von Tag 0 und dem Tag der letzten Messung fällt auf, dass die Behandlung mit AngII das Körpergewicht der WT- und Nox1-KO-Tiere verminderte (WT-AngII: -0,23 g und Nox1-KO-AngII: -0,6 g).

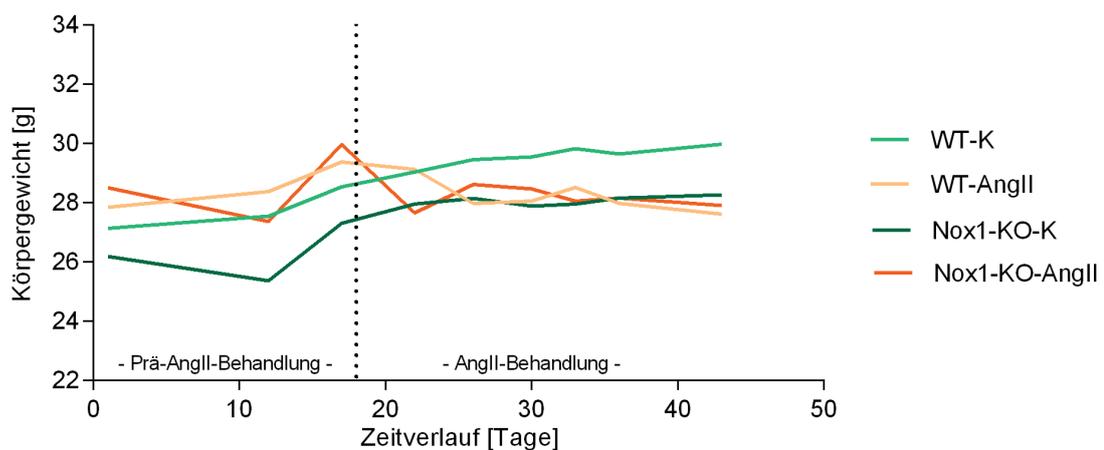


Abb. 15: Darstellung des Körpergewichts (in Gramm) vor Versuchsbeginn (Tag 0 bis 18) und nach Implantation der Minipumpen mit AngII oder PBS (Tag 18 bis 43). Die gepunktete Linie an Tag 18 markiert den Zeitpunkt der Implantation der osmotischen Minipumpen und den Beginn der AngII-/PBS-Behandlung. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. WT-K: n = 8, WT-AngII: n = 8, Nox1-KO-K: n = 8, Nox1-KO-AngII: n = 8, ab Tag 16 Nox1-KO-AngII: n = 7.

Nach Organentnahme wurden beide Nieren separat gewogen. Die Nieren der AngII-behandelten Nox1-KO-Tiere waren tendenziell leichter als die Nieren der unbehandelten Nox1-KO-Tiere sowie der WT-AngII-Tiere (Tabelle 19).

Versuchsgruppe	WT-K	WT-AngII	Nox1-KO-K	Nox1-KO-AngII
Relatives Nierengewicht [mg]	5,95 \pm 0,23	5,96 \pm 0,46	6,05 \pm 0,15	5,88 \pm 0,14

Tabelle 19: Relatives Nierengewicht der Versuchstiere nach 28-tägiger Behandlung mit AngII oder PBS. Das relative Nierengewicht ergibt sich aus dem Verhältnis von linker bzw. rechter Niere zum Körpergewicht der Maus. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. WT-K: n = 8, WT-AngII: n = 8, Nox1-KO-K: n = 8, Nox1-KO-AngII: n = 8, ab Tag 16 Nox1-KO-AngII: n = 7.

3.4 Einfluss von AngII auf die Nierenfunktion unter Nox1-Defizienz

3.4.1 Auswirkungen der Nox1-Defizienz auf die Kreatinin-Clearance

Um die Nierenfunktion zu beurteilen, wurde die Kreatininausscheidung im Urin anhand der Jaffé-Reaktion gemessen. Die Kreatinin-Clearance korreliert mit der GFR der Niere und ist ein Parameter für die Filtrationsleistung der Niere.

In den Nox1-KO-Tieren war die Kreatinin-Clearance tendenziell höher als in der WT-Gruppe (Abb. 16). Durch die Behandlung mit AngII sank nicht-signifikant die Kreatinin-Clearance und damit die Nierenfunktion in den WT-Tieren (WT-K: $4,13 \pm 0,47$ vs. WT-AngII: $3,57 \pm 0,66$). In den Nox1-KO-Tieren stieg nicht-signifikant die Kreatinin-Clearance durch die Behandlung mit AngII (Nox1-KO-K: $5,39 \pm 0,66$ vs. Nox1-KO-AngII: $6,00 \pm 1,43$).

Die Nox1-Defizienz verbesserte nicht-signifikant die Filtrationsleistung der Niere in den unbehandelten und behandelten Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren. In den WT-Tieren sank die Kreatinin-Clearance unter der Behandlung mit AngII. Die Verminderung der Kreatinin-Clearance durch AngII tritt bei den Nox1-Tieren nicht auf.

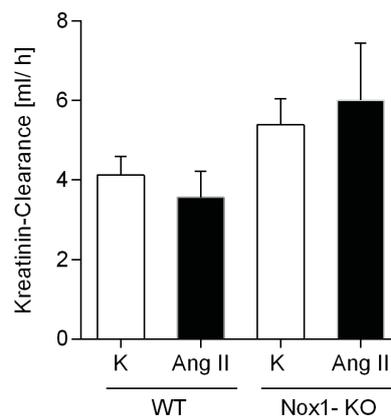


Abb. 16: Bestimmung der Kreatinin-Clearance als Parameter für die glomeruläre Filtrationsleistung der Niere. Die Kreatinin-Clearance bildet das Verhältnis zwischen der Kreatininkonzentration im Urin und der Kreatininkonzentration im Serum. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. ml/h = Milliliter/Stunde. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen n = 7.

3.4.2 Untersuchung der Albuminexkretion unter Nox1-Defizienz

Um einen glomerulären Schaden in der Niere zu untersuchen, wurde die Albuminausscheidung anhand eines Sandwich-ELISAS gemessen. Das Albumin/Kreatinin-Ratio wurde aus den Albumin- und Kreatininkonzentrationen im Urin berechnet. Eine Albuminurie weist auf eine größere Permeabilität der Filtrationsbarriere im Glomerulus hin und damit auf einen glomerulären Schaden.

AngII erhöhte sowohl in den WT- als auch in den Nox1-KO-Tieren signifikant die Albuminausscheidung (Abb. 17). Die Albuminausscheidung der behandelten Nox1-KO-Tiere war nicht-signifikant höher als die der WT-AngII-Tiere (WT-K: $0,10 \pm 0,04$ vs. Nox1-KO-AngII: $0,14 \pm 0,02$).

Zusammengefasst erhöhte AngII signifikant sowohl in der Nox1-KO-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe die Albuminausscheidung. Sowohl die unbehandelte als auch die AngII-behandelten Nox-1-KO-Tiere zeigten eine, im Vergleich zu den zugehörigen WT-Gruppen, tendenziell erhöhte Albumin-Ausscheidung.

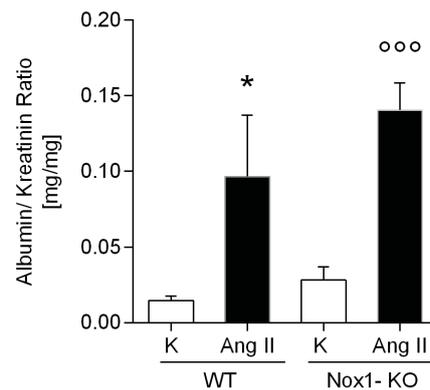


Abb. 17: Bestimmung von Albumin im Urin nach 28-tägiger Behandlung der Tiere mit AngII oder PBS. Dargestellt ist jeweils die Albuminkonzentration im Urin, normalisiert auf die Kreatininkonzentration im Urin. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. WT-K: n = 5, WT-AngII: n = 3, Nox1-KO-K: n = 8, Nox1-KO-AngII: n = 7. *p \leq 0,05 vs. WT-K, °°°p \leq 0,001 vs. Nox1-KO-K.

3.5 Histopathologische Veränderungen in der Nierenrinde

AngII führt zu histopathologischen Veränderungen in der Niere [111]. Anhand von HE-, Sirius-Red- und PAS-gefärbten Gewebeschnitten wurde untersucht, ob Nox1 einen Einfluss auf diese histopathologischen Veränderungen hat. Untersucht wurden Veränderungen am Gefäßsystem, an den Glomeruli und den Tubuli in der Nierenrinde.

3.5.1 Beurteilung der Gefäßwandhypertrophie unter Nox1-Defizienz

Die Gefäße in der Nierenrinde wurden auf HE-gefärbten Gewebeschnitten untersucht. Es wurde die Gefäßwanddicke unter der Behandlung mit AngII beurteilt.

In der WT-Gruppe führte AngII zu einer signifikanten Hypertrophie der Gefäßwände in der Nierenrinde (Abb. 18). Die Gefäßwände der Nox1-KO-Tiere waren von vornherein tendenziell verdickter als die Gefäßwände der WT-Tiere (WT-K: $0,47 \pm 0,08$ vs. Nox1-KO-K: $0,64 \pm 0,06$). AngII führte in den Nox1-KO-Tieren zu keiner signifikanten Verschlechterung des VSI.

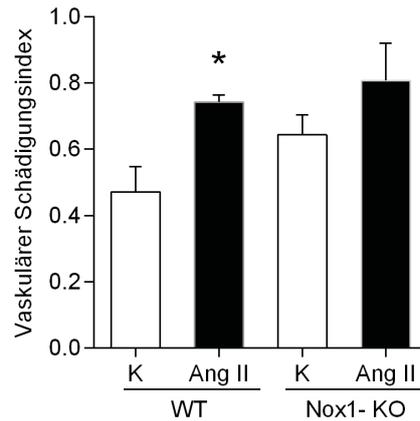


Abb. 18: Bestimmung des Vaskulären Schädigungsindex in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Niere. In sieben Gesichtsfeldern pro Tier wurden jeweils 20 Gefäße in die Stadien null bis vier eingeteilt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen n = 7. *p \leq 0,05 vs. WT-K. *p \leq 0,05 vs. WT-K.

3.5.2 Histopathologische Veränderungen des Glomerulus

3.5.2.1 Beurteilung des Glomeruloskleroseindex unter Nox1-Defizienz

Es wurde untersucht, ob die Behandlung mit AngII zu morphologischen Strukturänderungen im Glomerulus führt. Anhand des GSI wurde die Obliteration (Sklerose) der Kapillarlumina in den Glomeruli der Niere beurteilt.

Im Vergleich zu den unbehandelten WT-Tieren war das Kapillarlumen der unbehandelten Nox1-KO-Tiere von vornherein nicht-signifikant stärker sklerosiert (Abb. 19, WT-K: $0,62 \pm 0,22$ vs. Nox1-KO-K: $1,24 \pm 0,11$). In den WT-Tieren erhöhte AngII die Kapillarobliteration signifikant (WT-K: $0,62 \pm 0,22$ vs. WT-AngII: $1,48 \pm 0,20$). In den Nox1-KO-Tieren verstärkte AngII nicht-signifikant die Glomerulosklerose. In beiden Gruppen führte AngII zu einer Glomerulosklerose. Die Nox1-Defizienz verbesserte nicht den GSI.

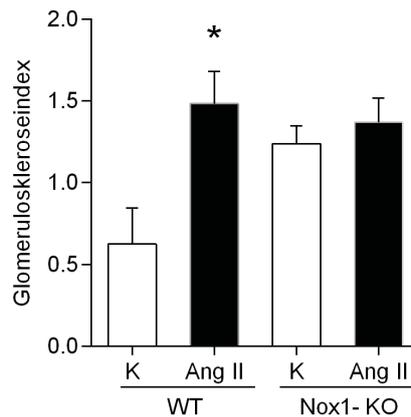


Abb. 19: Bestimmung des Glomeruloskleroseindex (GSI) in PAS-gefärbten Paraffinschnitten der Niere. Der GSI beurteilt das Ausmaß der Kapillarobliteration in den Glomeruli. Pro Tier wurden 50 Glomeruli in jeweils sieben Gesichtsfeldern in die Stadien null bis vier eingeteilt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen n = 7. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K.

3.5.2.2 Beurteilung des Mesangiolyseindex unter Nox1-Defizienz

Neben dem GSI wurden die Kapillaren in den Glomeruli anhand des MSI beurteilt. Die Stadieneinteilung richtete sich nach dem Verlust von Mesangiumzellen und der Kapillarerweiterung oder dem Vorhandensein eines Kapillaraneurysmas.

AngII führte in den Kontrolltieren zu keiner signifikanten Kapillarerweiterung (Abb. 20). In den Nox1-KO-Tieren erweiterte AngII das Kapillarlumen gegenüber den Nox1-KO-Kontrolltieren nicht-signifikant (Nox1-KO-K: $0,26 \pm 0,08$ vs. Nox1-KO-AngII: $0,35 \pm 0,07$). Die Kapillare der Nox1-KO-K-Tiere waren im Vergleich zu den WT-K-Tieren nicht-signifikant enger, der MSI der Nox1-KO-K-Tiere also nicht-signifikant geringer (WT-K: $0,31 \pm 0,08$ vs. Nox1-KO-K: $0,26 \pm 0,08$).

AngII führte in keiner der Gruppen zu einer signifikanten Kapillarerweiterung.

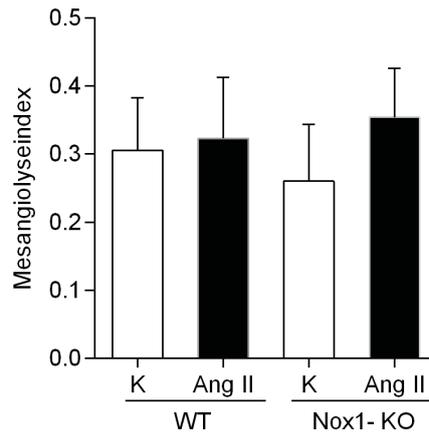


Abb. 20: Bestimmung des Mesangiolyseindexes in PAS-gefärbten Paraffinschnitten der Niere. Der Mesangiolyseindex beurteilt die Erweiterung der Kapillare in den Glomeruli und das Vorhandensein eines Kapillareneurysmas. Pro Tier wurden 50 Glomeruli in jeweils sieben Gesichtsfeldern in die Stadien null bis vier eingeteilt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen: n = 7.

3.5.3 Beurteilung des TSI unter Nox1-Defizienz

Das Interstitium und die Tubuli in der Nierenrinde wurden anhand des tubulointerstitiellen Schädigungsindex beurteilt. Der TSI setzte sich aus den vier Parametern Anteil der (1) Entzündungszellen und (2) Fibrosefasern, (3) Atrophie der Basalmembran an den Tubuli und (4) Dilatation der Tubuli zusammen.

In der WT-Gruppe führte AngII zu keinen signifikanten strukturellen Veränderungen im Interstitium und den Tubuli (Abb. 21). In den unbehandelten Nox1-KO-Tieren war der tubuläre Schaden tendenziell größer als in den WT-Tieren. Nach Behandlung mit AngII war der tubulointerstitielle Schädigungsindex in den Nox1-KO-AngII-Tieren ähnlich hoch wie in den WT-Tieren (Nox1-KO-K: $1,19 \pm 0,24$ vs. Nox1-KO-AngII: $0,93 \pm 0,11$). AngII erhöhte nicht den TSI. Die Nox1-Defizienz verschlechterte tendenziell den basalen TSI in den unbehandelten Nox1-KO-Tieren.

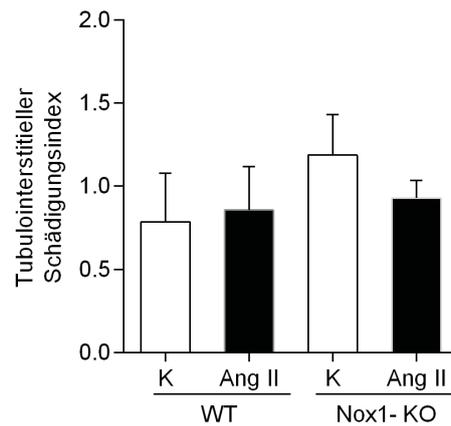


Abb. 21: Bestimmung des Tubulointerstitiellen Schädigungsindex (TSI) auf HE-, Sirius-Rot- und PAS- gefärbten Paraffinschnitten der Niere. Der TSI ergibt sich aus der Beurteilung des Ausmaßes der Entzündungszellen und der Fibrose im Interstitium. Außerdem aus der Atrophie der Basalmembran der Tubuli und der Dilatation der Tubuluslumina. Es wurden jeweils 20 Gesichtsfelder pro Tier in die Stadien null bis drei eingeteilt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen: n = 7.

3.6 Oxidativer Stress in der Niere

3.6.1 Beurteilung der Menge an ROS in der Niere unter Nox1-Defizienz

Zur Detektion der ROS in der Niere wurde eine Fluoreszenzfärbung mit DHE auf Gefrierschnitten durchgeführt.

AngII erhöhte nicht-signifikant in geringem Maße die Zahl der ROS in der Niere in WT- und Nox1-KO-Tieren (Abb. 22). Das Fehlen der Nox1 verminderte tendenziell den Anstieg der ROS durch AngII nicht-signifikant (WT-AngII: $1,23 \pm 0,09$ vs. Nox1-KO-AngII: $1,11 \pm 0,09$). In den Nox1-KO- und WT-Kontrolltieren unterschied sich die Menge an ROS nicht (WT-K: $1,01 \pm 0,02$ vs. Nox1-KO-K: $1,00 \pm 0,07$). Zusammenfassend liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen vor.

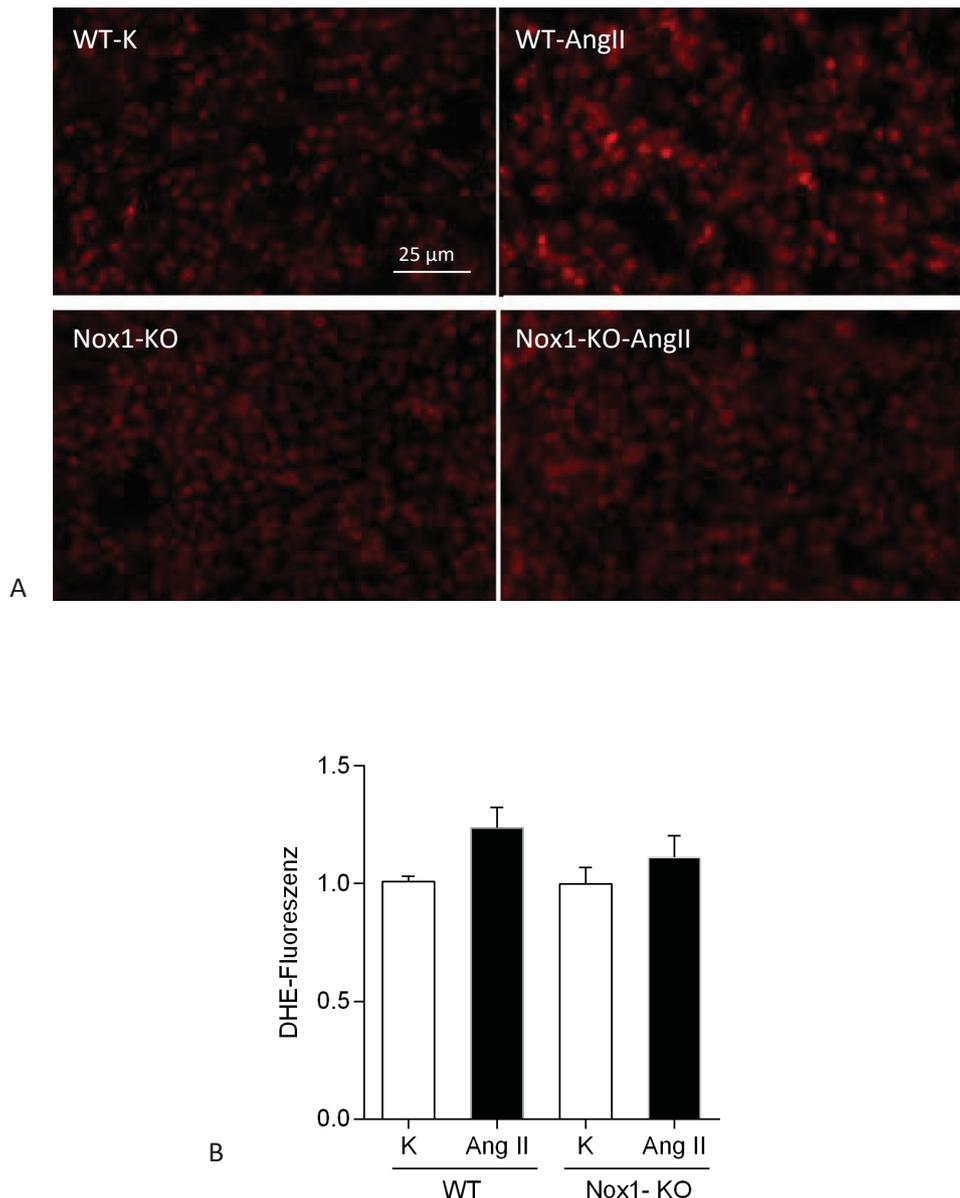


Abb. 22: Bestimmung der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies in der Niere mittels Dihydroethidium (DHE). A: Repräsentative Bilder der DHE-Färbung in 250-facher Vergrößerung. Quantifizierung der DHE-Färbung durch Bestimmung des durchschnittlichen Grauwerts der DHE-Fluoreszenz mit dem Bildverarbeitungsprogramm Cell-Profilier. Pro Tier wurden sieben Gesichtsfelder ausgewertet (Abb. 22B). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen n = 7.

3.6.2 Beurteilung der Lipidperoxidation unter Nox1-Defizienz

Im Urin können Isoprostane als Nachweis für oxidativen Stress quantifiziert werden [120, 121]. Um zu untersuchen, ob Nox1 den AngII-induzierten oxidativen Stress vermittelt, wurde anhand eines Sandwich-ELISAs die Konzentration von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin gemessen. Isoprostane gehören zur Gruppe der Prostaglandine. Wird Arachidonsäure durch freie Radikale peroxidiert, entstehen Isoprostane.

In der Kontroll- und in der Nox1-KO-Gruppe erhöhte die Behandlung mit AngII tendenziell die Konzentration an 15-isoprostan F_{2t} im Urin (Abb. 23). Die Nox1-KO-Kontrolltiere hatten signifikant weniger 15-isoprostane F_{2t} im Urin, als die WT-Kontrolltiere (WT-K: $4,42 \text{ ng/mg} \pm 0,90$, Nox1-KO-K: $1,99 \text{ ng/mg} \pm 0,70$). In den Nox1-KO-AngII-Tieren wurde im Vergleich zu den WT-AngII-Tieren eine nicht-signifikante geringere Konzentration an 15-Isoprostan F_{2t} gemessen (WT-AngII: $5,59 \text{ ng/mg} \pm 1,60$ vs. Nox1-KO-AngII: $3,51 \text{ ng/mg} \pm 0,85$). AngII erhöhte allerdings in den Nox1-KO-Tieren mehr die Konzentration an 15-isoprostane F_{2t} als in den WT-Tieren (WT-AngII: $+ 1,17 \text{ ng/mg}$ vs. Nox1-KO-AngII: $+ 1,52 \text{ ng/mg}$).

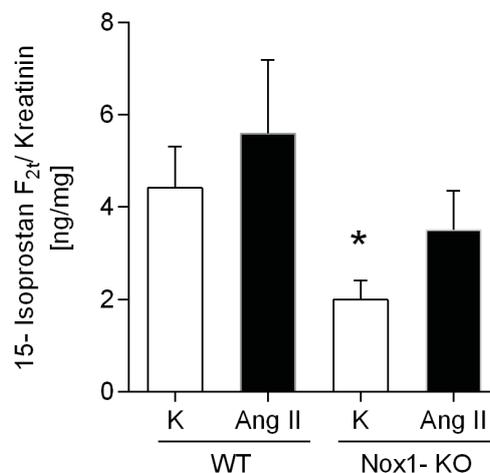


Abb. 23: Bestimmung der Konzentration von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin nach 28-tägiger Behandlung mit AngII oder PBS. Die Konzentration von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin ist auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normalisiert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: $n = 8$, andere Gruppen $n = 7$. * $p \leq 0,05$ vs. WT-K.

3.6.3 Beurteilung der DNA-Strangbrüche in isolierten Nierenzellen unter Nox1-Defizienz

Um die DNA-Strangbrüche in den Nierenzellen quantifizieren zu können, wurde ein Comet-Assay durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob durch die Nox1-Defizienz unter der Behandlung mit AngII weniger DNA-Strangbrüche in der Niere entstehen. Die Nierenzellen wurden nach Organentnahme isoliert und die DNA in einem Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Intakte DNA stellte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop als kompakte Struktur dar. Bruchstückhafte DNA ähnelte einem Kometenschweif hinter der kompakten Struktur aus intakter DNA (siehe Bild in Kapitel 2.2.6.).

AngII erhöhte im Comet-Assay in den WT-Tieren die Anzahl der DNA-Strangbrüche nicht signifikant (Abb. 24). Die Zahl der DNA-Strangbrüche in der Niere war in den

Knockout-Mäusen sowohl in den AngII-behandelten als auch in den unbehandelten Nox1-KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren nicht-signifikant vermindert (WT-AngII: 1,08 % \pm 0,17 vs. Nox1-KO-AngII: 0,80 % \pm 0,49).

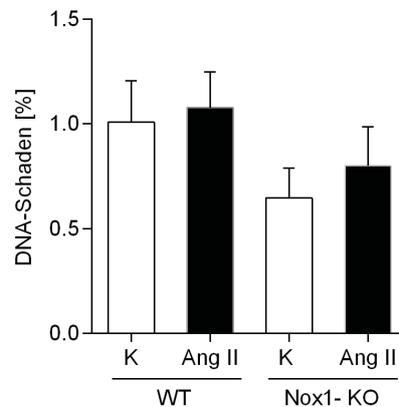


Abb. 24: Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen in frisch isolierten Nierenzellen mittels Comet-Assay. Gezeigt ist der Mittelwert des DNA-Schaden in % \pm Standardfehler. Die Auswertung erfolgte freundlicherweise durch AG Stopper am Institut für Toxikologie der Universität Würzburg. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen n = 7.

3.6.4 Beurteilung der DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere unter Nox1-Defizienz

AngII wirkt genotoxisch und führt *in vivo* in der Niere vermehrt zu DNA-Doppelstrangbrüchen [111, 129, 130]. Durch eine immunhistochemische Färbung mit Anti- γ -H2AX wurde untersucht, ob das Fehlen der Nox1 die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere vermindert (Abb. 25). γ -H2AX ist die phosphorylierte Form des Histons H2AX und wurde hier zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen verwendet [114].

AngII erhöhte in den WT-Tieren die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche signifikant (Abb. 26). Die Nox1-Defizienz verminderte die AngII-induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere signifikant (WT-AngII: 4,11 % \pm 0,67 vs. Nox1-KO-AngII: 1,68 % \pm 0,77). Die behandelten Nox1-KO- und die unbehandelten Wildtyp-Tiere wiesen eine ähnliche Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen auf (WT-K: 1,58 % \pm 0,54 vs. Nox1-KO-AngII: 1,68 % \pm 0,77).

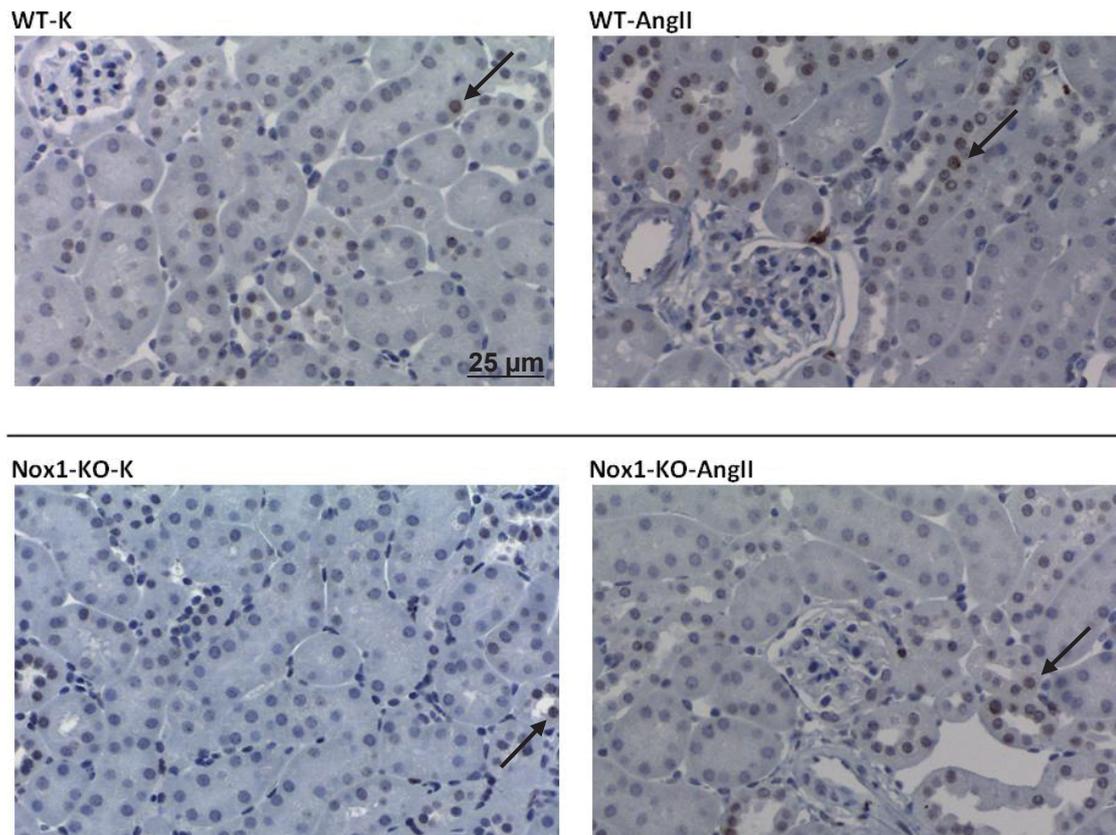


Abb. 25: Immunhistochemische Färbung der Nierenrinde mit Anti- γ -H2AX zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen. γ -H2AX-positive Zellkerne sind braun gefärbt. Die Pfeile zeigen beispielhaft γ -H2AX-positive Zellkerne in der Nierenrinde. Die AngII-behandelten Nox1-KO-Tiere zeigten signifikant weniger DNA-Doppelstrangbrüche als die AngII-behandelten WT-Tiere. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen n = 7.

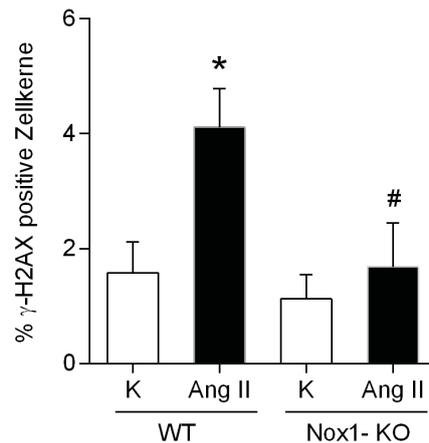


Abb. 26: Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung von γ -H2AX mit Hilfe der Bildanalyse-Software ImageJ. Die γ -H2AX-positiven Zellkerne wurden ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellkerne pro Gesichtsfeld gesetzt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen n = 7. *p \leq 0,05 vs. WT-K, #p \leq 0,05 vs. WT-AngII.

3.7 Ursachenforschung zur ROS-Bildung unter Nox1-Defizienz

Trotz Nox1-Defizienz erhöhte AngII in den Nox1-KO-Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Nox1-KO-Tieren nicht-signifikant die Zahl der ROS in der Niere. Nox1 ist daher nicht der alleinige Vermittler der AngII-induzierten ROS-Erhöhung. Es wurde nun untersucht, ob verschiedene Komponenten auf mRNA- oder Proteinebene das Fehlen der Nox1 kompensieren:

- (1) Das prooxidative Enzym Xanthinoxidase auf mRNA- und Proteinebene (Kapitel 3.7.1).
- (2) Die Nox1-Isoformen Nox2 und Nox4 auf mRNA-Ebene (Kapitel 3.7.2).
- (3) Die Nox1-Regulatoruntereinheiten NoxA1, NoxO1 und p47^{phox} auf Proteinebene (Kapitel 3.7.3).

3.7.1 Expression der Xanthinoxidase1 unter Nox1-Defizienz

Die Xanthinoxidase (XO) wird aus der Xanthindehydrogenase gespalten und produziert ROS. Die mRNA- und Protein-Expression der XO1 wurde untersucht.

Die Behandlung mit AngII induzierte weder in den WT-Tieren noch in den Nox1-KO-Tieren eine signifikant stärkere Proteinexpression der XO1 (Abb. 27). Die Expression der Xanthinoxidase unterschied sich in den AngII-behandelten WT-Tieren und in den unbehandelten Tieren kaum (WT-K: $1,02 \pm 0,06$ vs. WT-AngII: $1,06 \pm 0,03$). Auch in

den Nox1-KO-Tieren führte AngII zu keiner signifikanten Veränderung auf Proteinebene (Nox1-KO-K: $0,99 \pm 0,08$ vs. Nox1-KO-AngII: $0,96 \pm 0,10$).

Unter Berücksichtigung der PCR-Kriterien (Menge an PCR-Produkt mindestens doppelt so groß oder mindestens halb so groß wie in der Kontrollgruppe) zeigten die Ergebnisse der mRNA-Expression der XO1 keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 28). AngII erhöhte in den WT-Tieren die mRNA-Expression der XO1 nicht (WT-K: 100 % vs. WT-AngII: 109 %). Im Vergleich zu den unbehandelten Nox1-KO-Tieren erhöhte AngII die mRNA-Expression der XO1 in den behandelten Nox1-KO-Tieren um 49 % (Nox1-KO-K: 124 % vs. Nox1-KO-AngII: 173 %).

Zusammengefasst induzierte das Fehlen der Nox1 und die Behandlung mit AngII weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene eine veränderte Expression der XO1. Die mRNA-Expression wurde durch die AngII-Behandlung in den Nox1-KO-Tieren nicht-signifikant erhöht. Diese Erhöhung konnte auf Proteinebene aber nicht mehr nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentration der XO1 war unter Nox1-Defizienz im Vergleich zu den WT-Tieren eher geringer.

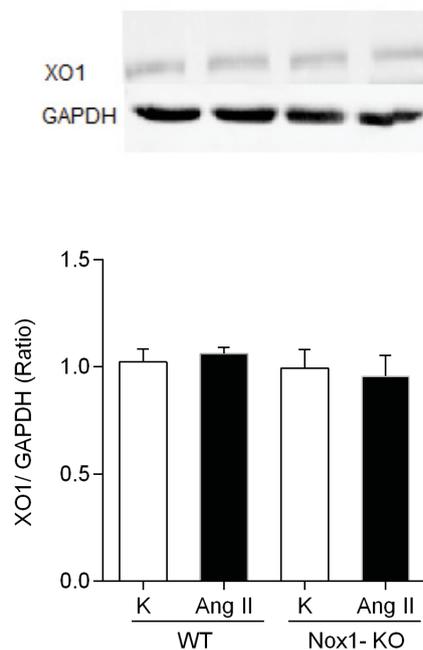


Abb. 27: Relative Quantifizierung der Proteinexpression der Xanthinoxidase1 (XO1) im Nierengewebe mittels Western Blot. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet. Normierung der Proteinexpression auf die WT-Kontrolle. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: Nox1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen: n = 7.

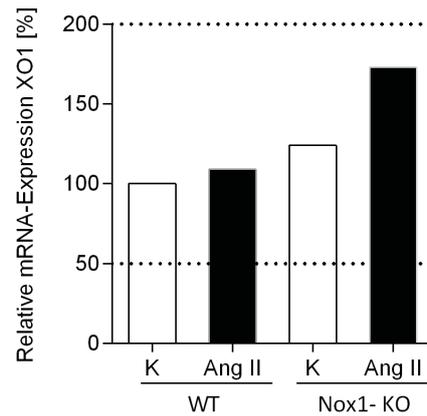


Abb. 28: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Xanthinoxidase1 (XO1) im Nierengewebe mittels Real-Time-qPCR. GAPDH und β -Aktin wurden als Referenzgene verwendet. Die relative mRNA-Expression der WT-Kontrolle wurde auf eins normiert. Es wurden nur Ergebnisse als biologisch signifikant angesehen und in die statistische Auswertung mit einbezogen, deren Expressionsveränderung ≥ 2 oder $\leq 0,5$ waren (dargestellt durch die gestrichelte Linie). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Die cDNA von 7 Tieren pro Versuchsgruppe wurde gepoolt: n = 1.

3.7.2 Beurteilung einer Kompensation durch Nox2 und Nox4 unter Nox1-Defizienz

Unter Berücksichtigung der PCR-Kriterien für eine biologische Relevanz (PCR-Produkt mindestens doppelt so groß oder mindestens halb so groß wie in der Kontrollgruppe) wurde die mRNA der Nox2 und Nox4 in keiner Versuchsgruppe signifikant vermehrt exprimiert. In den Nox1-KO-Tieren war die mRNA-Expression der Nox2 und Nox4 im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren tendenziell vermindert (Abb. 29). In den WT-Tieren erhöhte AngII nicht-signifikant die mRNA-Expression der Nox4. In den Nox1-KO-Tieren verringerte AngII nicht-signifikant die mRNA-Expression der Nox2 und Nox4 gegenüber den unbehandelten Nox1-KO-Tieren.

Zusammengefasst kompensieren Nox2 und Nox4 auf mRNA-Ebene nicht das Fehlen der Nox1. Durch die Nox1-Defizienz wird die mRNA-Expression der Nox2 und Nox4 vermindert, dies jedoch nicht-signifikant.

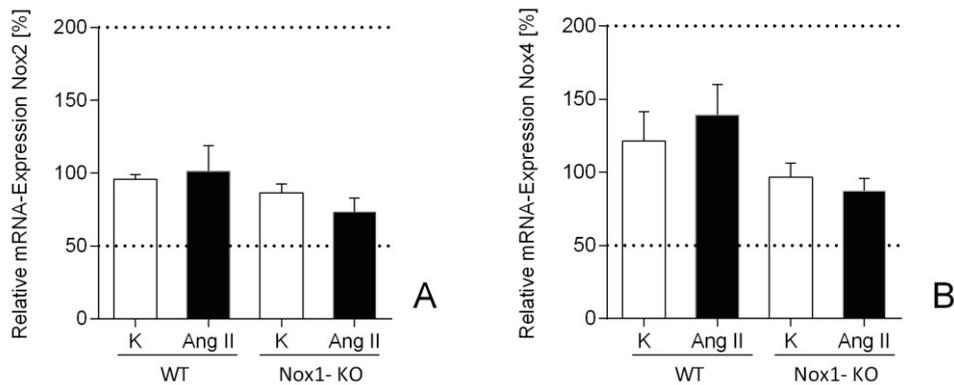


Abb. 29: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Untereinheiten Nox2 (Graph A) und Nox4 (Graph B) im Nierengewebe mittels Real-Time-qPCR. GAPDH und β -Aktin wurden als Referenzgene verwendet. Die relative mRNA-Expression der WT-Kontrolle wurde auf eins normiert. Es wurden nur Ergebnisse als biologisch signifikant angesehen und in die statistische Auswertung mit einbezogen, deren Expressionsveränderung ≥ 2 oder $\leq 0,5$ im Vergleich zur WT- oder Nox1-Kontrollgruppe waren (dargestellt durch die gestrichelten Linien). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen n = 7.

3.7.3 Expression der Nox1-Regulatoruntereinheiten auf Proteinebene unter Nox1-Defizienz

AngII führte in der WT- und Nox1-KO-Gruppe zu einer verminderten Expression der Organisatoruntereinheit NoxO1 auf Proteinebene (Abb. 30). In den AngII-behandelten Nox1-KO-Tieren war die NoxO1 signifikant gegenüber den unbehandelten Nox1-KO-Tieren vermindert (Nox1-KO-K: $0,81 \pm 0,03$ vs. Nox1-KO-AngII: $0,59 \pm 0,04$). AngII erhöhte tendentiell in der WT-Gruppe die Expression der Aktivatoruntereinheit NoxA1. In der Nox1-KO-Gruppe veränderte die Behandlung mit AngII die Expression des NoxA1-Proteins nicht (Nox1-KO-K: $1,44 \pm 0,21$ vs. Nox1-KO-AngII: $1,45 \pm 0,59$). Die Organisatoruntereinheit $p47^{\text{phox}}$ wurde auf Protein-Ebene in den Nox1-KO-Tieren weniger exprimiert als in der WT-Gruppe. Durch AngII stieg die $p47^{\text{phox}}$ -Expression in der WT-Gruppe an (WT-K: $1,00 \pm 0,10$ vs. WT-K-AngII: $1,66 \pm 0,96$). Bei den Nox1-KO-Tieren erhöhte AngII die $p47^{\text{phox}}$ -Expression gering (Nox1-KO-K: $0,64 \pm 0,19$ vs. Nox1-KO-AngII: $0,95 \pm 0,15$).

Zusammenfassend erhöhte AngII nicht-signifikant die Expression der NoxA1 und der $p47^{\text{phox}}$ auf Proteinebene in den WT-Tieren. Diese nicht-signifikante Erhöhung der NoxA1- und $p47^{\text{phox}}$ -Expression durch AngII blieb in den Nox1-defizienten Tieren aus. Die Nox1-Defizienz wurde nicht durch eine signifikant verstärkte Expression der Nox1-Untereinheiten kompensiert.

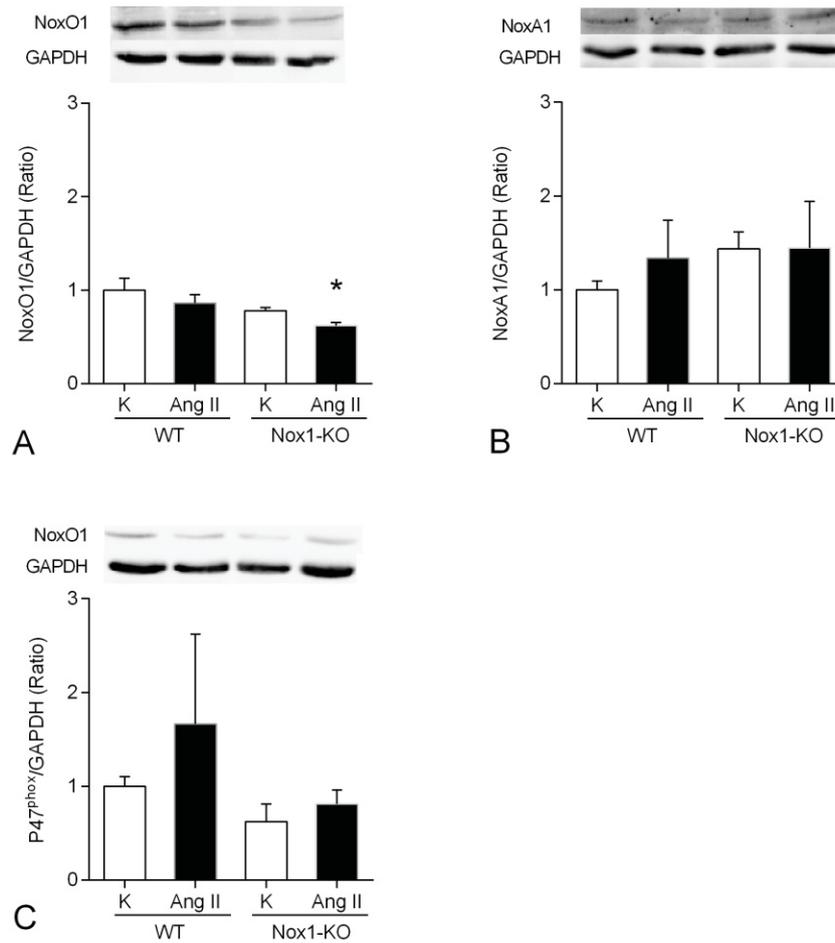


Abb. 30: Relative Quantifizierung der Proteinexpression im Nierengewebe mittels Western Blot. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet. Normierung der Proteinexpression auf die WT Kontrolle. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: Nox1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Graph A: Proteinexpression von NoxO1: Nox1-KO-K: $n = 8$, andere Gruppen: $n = 7$. * $p < 0,05$ vs. Nox1-KO-K. Graph B: Proteinexpression von NoxA1: WT-AngII: $n = 6$, Nox1-KO-K: $n = 8$, andere Gruppen: $n = 7$. Graph C: Proteinexpression von p47^{phox}: Nox1-KO: $n = 8$, andere Gruppen: $n = 7$.

3.8 Untersuchung des oxidativen Abwehrsystems

3.8.1 Hintergrund zur Untersuchung des oxidativen Abwehrsystems

Das Fehlen der Nox1 verminderte die AngII-induzierte Blutdruckerhöhung, die Anzahl der DNA-Strangbrüche sowie die Konzentration von 15-isoprostane F_{2t} im Urin. Es wurde nun untersucht, ob die antioxidativen Enzyme HO1 und SOD1 im Nox1-Knockout-Modell durch die Behandlung mit AngII verändert exprimiert werden.

3.8.2 Expression der antioxidativen Enzyme SOD1 und HO1 unter Nox1-Defizienz auf Proteinebene

AngII senkte in der WT- und in der Nox1-KO-Gruppe leicht die Proteinexpression von SOD1 (Abb. 31). In der Nox1-KO-Kontrollgruppe war SOD1 weniger stark exprimiert als in der WT-Kontrollgruppe.

AngII erhöhte in der WT- und in der Nox1-KO-Gruppe nicht-signifikant die HO1-Expression. Die Expression von HO1 war in der Nox1-Gruppe sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Tieren geringer als in der WT-Gruppe.

Zusammengefasst verringerte die Nox1-Defizienz nicht-signifikant die SOD1 und die HO1-Expression. In den Nox1-KO-AngII-Tieren war die Konzentration an HO1 nicht-signifikant geringer als in den WT-AngII-Tieren. Das antioxidative Abwehrsystem wurde im Hinblick auf SOD1 und HO1 unter Nox1-Defizienz weniger stark aktiviert. Dies allerdings nicht-signifikant.

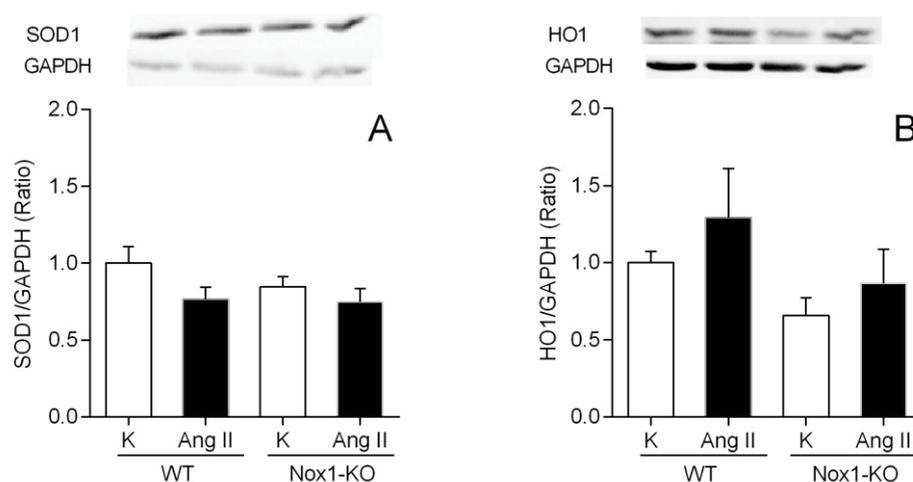


Abb. 31: Relative Quantifizierung der Proteinexpression der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase1 (SOD1) (Graph A) und Hämoxigenase 1 (HO1) (Graph B) im Nierengewebe mittels Western Blot. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet. Normierung der Proteinexpression auf die WT-Kontrolle. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: Nox1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-K: n = 8, andere Gruppen: n = 7.

3.8.3 Expression der antioxidativen Enzyme HO1, SOD1, GPx und Txnrd auf mRNA-Ebene unter Nox1-Defizienz

Um die mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme HO1, SOD1, Glutathionperoxidase (Gpx) und Thioredoxin Reduktase (Txnrd) zu untersuchen, wurde eine Real-Time-qPCR durchgeführt.

In den WT-Tieren erhöhte AngII signifikant die mRNA-Expression von HO1. (Abb. 32). In den Nox1-KO-Tieren war die HO1-Expression nach AngII-Behandlung tendenziell niedriger als in den unbehandelten Nox1-defizienten Tieren.

Die SOD1-Expression wurde weder in den WT- noch in den Nox1-KO-Tieren signifikant durch AngII beeinflusst.

AngII erhöhte in der WT-Gruppe nicht-signifikant die Expression der Txnrd. In der Nox1-KO-AngII-Gruppe wurde Txnrd nicht-signifikant weniger exprimiert als in der WT-AngII-Gruppe.

AngII erhöhte in der WT-Gruppe nicht-signifikant die Expression von Gpx. In der Nox1-KO-AngII-Gruppe verminderte AngII nicht-signifikant die Gpx-Expression gegenüber der Nox1-KO-Kontrollgruppe.

Zusammengefasst verhinderte die Nox1-Defizienz eine AngII-vermittelte verstärkte Expression von HO1. Die Nox1-Defizienz verminderte nicht-signifikant die Expression von HO1, Txnrd und Gpx unter der Behandlung mit AngII.

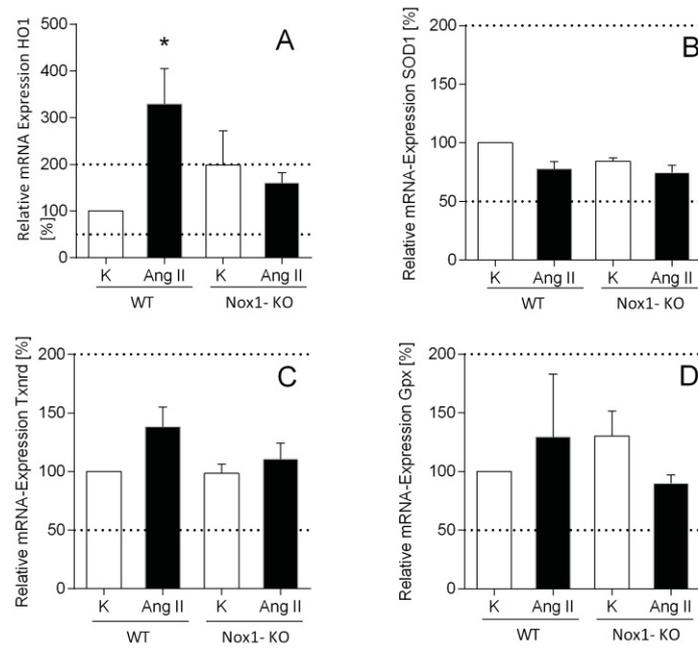


Abb. 32: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression im Nierengewebe mittels Real-Time-qPCR. Graph A: mRNA-Expression der Hämoxxygenase 1 (HO1). Graph B: mRNA-Expression der Superoxiddismutase 1 (SOD1). Graph C: mRNA-Expression der Thioredoxinreduktase (Txnrd). Graph D: mRNA-Expression der Glutathionperoxidase (Gpx). GAPDH und β -Aktin wurden als Referenzgene verwendet. Die relative mRNA-Expression der WT-Kontrolle wurde auf eins normiert. Es wurden nur Ergebnisse als biologisch signifikant angesehen und in die statistische Auswertung mit einbezogen, deren Expressionsveränderung ≥ 2 oder $\leq 0,5$ waren (dargestellt durch die gestrichelte Linie). Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. WT: Wildtyp, Nox1-KO: NADPH-Oxidase 1-Knockout, K: Kontrolle, AngII: Angiotensin II. Nox1-KO-AngII: n = 6, andere Gruppen: n = 7. *p $\leq 0,05$ vs. WT-K.

4 Diskussion

Eines der wichtigsten Hormone, das den Blutdruck erhöht, ist AngII. Eine Behandlung mit AngII *in vivo* führt erstens zu einer Erhöhung des Blutdrucks, zweitens wurde beobachtet, dass sich in der Niere die Anzahl an ROS sowie die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen erhöht [111, 129]. AngII erhöht folglich den oxidativen Stress in der Niere. Oxidativer Stress kann die Entstehung von Karzinomen fördern. Hypertoniker haben ein erhöhtes Risiko an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken [21]. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Nox1 die Wirkung von AngII auf den Blutdruck und den oxidativen Stress in der Niere vermittelt. Nox1 ist eine Isoform der NADPH-Oxidasen. NOX sind Transmembranproteine, die Sauerstoff reduzieren und ROS produzieren. Auch wurde das oxidative Abwehrsystem untersucht, die Nierenfunktion und AngII-vermittelte morphologische Veränderungen in der Niere. Für die Untersuchung der Nox1 wurden Nox1-KO-Mäusen osmotische Minipumpen implantiert. So wurden die Tiere über 28 Tage mit AngII (600 ng/kg/min = 0,864 mg/kg/Tag) oder PBS als Kontrolle behandelt. Während dieser Zeit wurde der Blutdruck gemessen. Nach den 28 Tagen wurden die Nieren entnommen und untersucht.

Die drei bedeutendsten Erkenntnisse dieser Arbeit sind:

1. Eine Nox1-Defizienz vermindert die Blutdruckerhöhung durch AngII.
2. Eine Nox1-Defizienz vermindert die Anzahl an DNA-Strangbrüchen in der Niere und die Lipidperoxidation.
3. Die Nox1 ist nicht der alleinige ROS-Produzent in der Niere unter einer Behandlung mit AngII. In den behandelten und in den unbehandelten Tieren aktiviert eine Nox1-Defizienz nicht das oxidative Abwehrsystem. Die Nox1-Defizienz erhöht signifikant die Albuminurie unter der Behandlung mit AngII und verhindert die Ausbildung gesunder Glomeruli, eines gesunden Tubulussystems und gesunder Nierengefäße.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert.

Ein Störfaktor dieser Arbeit war, dass zwei Tiere in der WT-K-Gruppe und vier Tiere in der WT-AngII-Gruppe ersetzt werden mussten. Obwohl die Tiere der Ersatzgruppe die gleiche Behandlung erhalten hatten und in der gleichen Einrichtung für Tierforschung behandelt wurden, unterschied sich der Zeitpunkt der Behandlung um 24 Monate.

Limitationen für diese Arbeit haben sich durch Proben- und Gewebeknappheit ergeben. Es muss bedacht werden, dass ein NOX-Knockout auf lange Zeit zu kompensatorischen Veränderungen führen kann, die hier im Kurzzeitmodell nicht detektiert werden konnten.

4.1 Blutdruckverlauf unter Nox1-Defizienz und AngII-Behandlung

Pathophysiologisch besteht eine Korrelation zwischen dem Vorliegen von oxidativem Stress und der Entwicklung einer Hypertonie [131, 132]. Eine Behandlung von Mäusen mit AngII erhöht den Blutdruck [111, 130]. Es wurde vermutet, dass AngII die NOX aktiviert und diese NOX-Aktivierung zwei Folgen hat: 1. Die Bildung von mehr oxidativem Stress in der Niere und 2. einen höheren Blutdruck.

Die Nox1-KO-Tiere zeigten ab den letzten beiden Messtagen sowie an Tag sieben und neun einen signifikant geringeren Blutdruck als die WT-AngII-Tiere. Trotz Nox1-Defizienz war der Blutdruck der Nox1-Tiere durch die AngII-Behandlung jedoch signifikant höher als in den unbehandelten Nox1-KO-Tieren. Im Gesamtverlauf über die 28 Behandlungstage betrachtet, verminderte die Nox1-Defizienz den Blutdruckanstieg durch AngII.

In anderen Arbeiten verminderte eine Nox1-Defizienz ebenfalls eine Blutdruckerhöhung durch AngII [133, 134]. In der Arbeit von Gavazzi et al. wurden die Mäuse über einen kürzeren Zeitraum (sechs Tage) mit einer sehr viel höheren AngII-Dosis (3 mg/kg/Tag) behandelt [134]. Ähnlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit, stieg der Blutdruck in den ersten drei Tagen in WT- und Nox1-KO-Tieren zunächst an. Am sechsten Tag war der Blutdruck der Nox1-KO-Mäuse signifikant niedriger. Unsere Ergebnisse zeigten einen ähnlichen Verlauf: An Tag 13 und 16 kam es kurzfristig zu einem Blutdruckanstieg in den AngII-behandelten Nox1-KO-Tieren. Es lässt sich vermuten, dass AngII die Nox1 erst nach einigen Behandlungstagen aktiviert bzw. die Folgen der Aktivierung sich erst nach einigen Tagen in einem Blutdruckanstieg zeigen. Auch die Ergebnisse von Matsuno et al. bestätigen diese Vermutung [133]. Matsuno et al. behandelten WT- und Nox1-defiziente Mäuse über 14 Tage mit AngII (0.7 mg/kg/Tag). Erst ab dem fünften Tag stieg der Blutdruck der Nox1-KO-Tiere nicht mehr an. Dikalova et al. arbeiteten mit Mäusen, bei denen die Nox1 in den glatten Muskelzellen überexprimiert war [93]. Die Tiere wurden über zwei Wochen mit AngII (0.7 mg/kg/Tag) behandelt. Der Blutdruck der Tiere mit der Nox1-Überexpression war höher als in den Kontrollmäusen. Wurden die Tiere mit dem Antioxidans Tempol behandelt, war die Blutdruckerhöhung geringer. Tempol verminderte vermutlich die ROS, die an der Blutdruckerhöhung beteiligt waren. Dies bestätigt unsere Vermutung, dass AngII die Nox1 aktiviert, die Anzahl der ROS sich erhöht und der Blutdruck folglich steigt. Basset et al. arbeiteten mit Nox1-defizienten Mäusen und untersuchten den Einfluss von AngII auf die glatten Muskelzellen in der Aorta [135]. Der AT1-Rezeptor war bei den Nox1-KO-Tieren weniger exprimiert. Bindet AngII an den AT1-Rezeptor, wird der Blutdruck erhöht. In dieser Arbeit wurde die Expression des AT1-

Rezeptors nicht untersucht. Der verminderte Blutdruckanstieg in den Nox1-KO-Tieren könnte durch eine verminderte AT1-Rezeptor-Expression verursacht worden sein. Weitere Erkenntnisse würde die Untersuchung der AT1-Rezeptor-Expression liefern.

Die Nox1 ist bei Abwesenheit der Regulatoruntereinheit p47^{phox} inaktiv [85]. Landmesser et al. behandelten p47^{phox}-defiziente Mäuse über sieben Tage mit AngII (0.7 mg/kg/Tag). Die p47^{phox}-Defizienz verminderte die Blutdruckerhöhung durch AngII [136].

Andere Studien wiederum korrelieren nicht mit den hier aufgezeigten Ergebnissen: NOX und ihre Untereinheiten erhöhen gemäß den Ergebnissen anderer Studien nicht den Blutdruck. Transgene Mäuse, die aktives Renin in der Leber produzieren, haben eine ein bis zwei Mal höhere AngII-Konzentration im Blut. Kreuzte man diese Tiere mit Nox1-KO-Mäusen, so erhöhte AngII trotz der Nox1-Defizienz den Blutdruck [92]. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit war die AngII-Konzentration bei den Tieren von Geburt an erhöht. Hier wurden die Mäuse über 28 Tage mit AngII behandelt. Es könnte also ein Unterschied in subakut und chronisch erhöhten AngII-Konzentrationen und den Auswirkungen auf die Nox bestehen. Bei Nox2- und Nox4-defizienten Mäusen, die ebenfalls über 28 Tage mit AngII behandelt wurden, konnte keine Blutdruckminderung notiert werden [111]. Grote et al. arbeiteten wie Landmesser et al. mit p47^{phox}-defizienten Mäusen [137]. Landmesser et al. behandelten die Tiere mit AngII, Grote et al. nicht. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Landmesser et al. war der Blutdruck der p47^{phox}-KO-Mäuse von Grote et al. höher als der Blutdruck der Kontrolltiere. Ab der 20. Lebenswoche sanken die Blutdruckwerte der p47^{phox}-defizienten Mäuse. Die p47^{phox}-defizienten Mäuse hatten aber niemals geringere Blutdruckwerte als die Kontrolltiere. Es lässt sich nicht abschließend sagen, inwieweit sich eine p47^{phox}-Defizienz, und damit eine anzunehmende Nox1-Dysfunktion, auf den Blutdruck auswirkt.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung des Blutdrucks, dass eine Nox1-Defizienz die Blutdruckerhöhung durch AngII vermindert. Da sich der Blutdruck in den Nox1-KO-Tieren erst ab Tag 20 signifikant unterschied, kann vermutet werden, dass Nox1 stärker aktiviert wird, wenn die erhöhten AngII-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum bestehen. Eine Behandlung mit einem Antioxidans wie Tempol könnte bestätigen, dass Nox1-produzierte ROS an der Blutdruckerhöhung beteiligt waren. Eine Untersuchung der Expression des AT1-Rezeptors könnte beweisen, dass auch dieser an dem verminderten Blutdruckanstieg durch AngII in den Nox1-KO-Tieren beteiligt ist. Es mag ein Unterschied zwischen einer chronischen und einer subakuten AngII-Behandlung bestehen. Es wurde in dieser Arbeit nicht der Langzeiteffekt auf den

Blutdruck untersucht, sondern nur ein Zeitraum von vier Wochen. Viele Studien diskutieren, dass in AngII-Modellen der Blutdruck anhand von hohen AngII-Konzentrationen untersucht werden würde. Dies wiederum würde zu AngII-Konzentrationen im Plasma führen, die nicht physiologisch sind. Im Vergleich zu anderen Studien verwendeten wir eine mittlere AngII-Dosis von 600 ng/kg/min pro Tag. Aufgrund der kontroversen Datenlage zum Blutdruckverlauf unter Nox1-Defizienz ist zu diskutieren, ob Patienten mit einer primär AngII-induzierten Hypertonie, von Nox1-Hemmern profitieren würden. Diesen Daten nach, könnten Patienten mit chronisch erhöhten Blutdruckwerten von einer Hemmung der Nox1 profitieren. Bisher konnte nur der duale Nox1/4-Hemmer GKT137831 der Firma Genkyotex in einer Phase II klinisch zu Diabetes Typ I, Nierenerkrankungen und Primärer biliärer Zirrhose getestet werden [138]. Es liegen keine klinischen Daten zur Untersuchung von Nox-Hemmern auf den Blutdruck vor.

4.2 Nierenfunktion und Nierenmorphologie unter Nox1-Defizienz

AngII erhöht die Anzahl der ROS in der Niere und fördert so eine chronische Niereninsuffizienz mit Glomerulosklerose [139]. Es wurde untersucht, ob die Nox1 morphologische Schäden wie Glomerulosklerose fördert und die Nierenfunktion beeinträchtigt. Als Parameter für die glomeruläre Filtrationsrate wurde mittels ELISA die Kreatininclearance bestimmt. Die Nierenmorphologie wurde anhand von histologischen Färbungen von Nierengewebschnitten untersucht.

Es wurde vermutet, dass der tendenziell niedrigere Blutdruck in den Nox1-KO-Tieren zu einer besseren Nierenfunktion und weniger morphologischen Schäden in der Niere führt. Gemäß unseren Erwartungen war die glomeruläre Filtrationsrate in den Nox1-KO-Tieren tendenziell höher als in den WT-Tieren. Entgegen unserer Erwartungen erhöhte AngII in den Nox1-KO-AngII-Tieren signifikant die Albuminurie. Eine hohe Albuminurie lässt einen stärkeren glomerulären Schaden in den Nox1-KO-Tieren vermuten mit einer höheren Permeabilität der Filtrationsbarriere im Glomerulus.

Die Niere wurde daraufhin histologisch untersucht. Die Nox1-Defizienz verminderte die Glomerulosklerose durch AngII kaum. Die Glomerulosklerose war in den unbehandelten Nox1-KO-Tieren stärker als in den WT-Tieren. Es lässt sich vermuten, dass Nox1 tendenziell eher vor einer Glomerulosklerose schützt. Dies konnte jedoch bisher in keiner anderen Arbeit bestätigt werden und bedarf daher weiterer Untersuchungen.

Zudem wurde beurteilt, wie stark die Kapillarerweiterung in den Glomeruli war. Dazu wurde der Mesangiolyseindex verwendet. Weder in der WT- noch in der Nox1-KO-Gruppe führte AngII zu einer signifikanten Kapillarerweiterung. Brand et al. zeigten,

dass AngII einen Verlust an Mesangiumzellen und eine Kapillarerweiterung verursacht [139]. Auch diese Tiere wurden über 28 Tage mit 600 ng/kg/Tag AngII behandelt.

AngII führte in dieser Arbeit nicht zu einer vermehrten Fibrose des Niereninterstitiums und einem höheren TSI. In anderen Arbeiten zeigte sich, dass AngII zu einer Hypertrophie proximaler Tubuluszellen und einer Fibrose des Tubulusinterstitiums führt und so eine Niereninsuffizienz fördert [139, 140]. AngII stimuliert proximale Tubuluszellen, sodass diese Wachstumsfaktoren sekretieren und die Proliferation von Fibroblasten fördern [141, 142]. Außerdem fördert AngII die Biosynthese des Wachstumsfaktors TGF-beta, der ebenfalls die Fibroblastenbildung unterstützt [142, 143]. Der basale TSI war in den Nox1-KO-Tieren tendenziell höher als in den WT-Tieren.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Niere, dass unter Nox1-Defizienz tendenziell basal eher mehr Glomerulosklerose und tubuläre Schäden vorhanden sind als in den WT-Tieren. Anders als vermutet, förderte Nox1 hier nicht die AngII-induzierten morphologischen Nierenschäden. Es muss bedacht werden, dass AngII im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen nur eine signifikante Glomerulosklerose verursachte, der MSI und TSI blieben trotz der AngII-Behandlung unverändert. Zur objektiveren Beurteilung der Nierenmorphologie könnte eine maschinelle Auswertung mittels eines Bildbearbeitungsprogramms verwendet werden.

Trotz signifikant stärkerer Albuminurie in den Nox1-KO-AngII-Tieren, war die Kreatininclearance der Nox1-KO-AngII-Tiere höher als in der WT-Gruppe. Es stellte sich daher die Frage, ob das Ergebnis zur Kreatininclearance annehmbar ist. Der Kreatininwert ist abhängig von Faktoren wie Muskelmasse und Bewegung. K_f ist der glomeruläre Ultrafiltrationskoeffizient. K_f setzt sich zusammen aus dem Produkt der Filtrationspermeabilität in den Glomeruli und der Filtrationsoberfläche [144]. Bei einem glomerulären Schaden, beispielsweise durch Glomerulonephritiden, sinkt die Ultrafiltrationskapazität und damit K_f [145]. Es ergibt sich ein höherer Filtrationsdruck [144]. Schließlich sinkt die GFR weniger als der tatsächlich bestehende glomeruläre Schaden vermuten lassen würde [144]. So ergeben sich falsch-hohe Werte für die GFR im Vergleich zum vorliegenden glomerulären Schaden. Dies könnte erklären, warum die Kreatinin-Clearance in der Nox1-KO-Gruppe trotz Albuminurie und Glomerulosklerose nicht niedriger ist. Alternativ kann Cystatin C als Referenz zur Messung der GFR bestimmt werden [146].

Trotz Nox1-Defizit sank die Albuminurie und Glomerulosklerose nicht. Andere Studien zeigten, dass verschiedene Nox-Isoformen und -Untereinheiten eine Albuminurie und

Glomerulosklerose fördern. Wang et al. arbeiteten mit p47^{phox}-defizienten Mäusen, die nicht mit AngII behandelt wurden. p47^{phox} ist eine Regulatoruntereinheit der Nox1 und Nox2. Die Tiere wurden mit Integrin $\alpha 1$ -defizienten Mäusen gekreuzt [147]. Die Integrin $\alpha 1$ -defizienten Mäuse hatten eine stärkere Glomerulosklerose [148]. Die p47^{phox}-Defizienz verminderte die Albuminurie und Glomerulosklerose [147]. p47^{phox} förderte also AngII-unabhängig die Glomerulosklerose. In zwei anderen Studien wurden die Effekte von dualen Nox1/Nox4-Inhibitoren im Diabetes-Modell getestet. Diabetes und chronisch erhöhte Glukosewerte schädigen ähnlich wie AngII die Glomeruli in der Niere und führen zu einer Nephropathie. Gorin et al. behandelten Mäuse mit Typ 1 Diabetes mit dem dualen Nox1/Nox4-Inhibitor GKT137831 über vier Wochen. Die Albuminurie sank signifikant in den Tieren [149]. Sedeek et al. verwendeten den dualen Nox1/Nox4-Inhibitor GKT136901 über 16 Wochen [150]. In den ersten acht Wochen war die Albuminurie in den behandelten Typ II Diabetes-Tieren signifikant geringer als in unbehandelten Tieren. Nach 16 Wochen entwickelten auch die behandelten Typ II Diabetes-Tiere eine signifikant erhöhte Albuminurie. In den Studien lässt sich nicht unterscheiden, ob Nox1 oder Nox4 den größeren Effekt auf die Albuminurie-Reduktion haben. Nox1 fördert nicht nur über AngII eine Albuminurie, sondern vermutlich auch im Diabetes-Modell. Ob die AngII-Konzentration bei den Tieren erhöht war, wurde nicht untersucht. In einer Studie wurde die Albuminurie bei Nox2- und Nox4-defizienten Mäusen unter einer Behandlung mit AngII untersucht. Die AngII-behandelten Nox4-defizienten Tiere wiesen gegenüber den WT-AngII-Tieren eine signifikant geringere Albuminurie auf. Die Nox2-Defizienz schützte die Tiere nicht vor einer Albuminurie nach AngII-Behandlung [111].

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Nox1-Defizienz nicht vor einer AngII-induzierten Albuminurie und Glomerulosklerose schützt. In anderen Studien konnte im Diabetes-Modell ein protektiver Effekt von Nox1/Nox4-Inhibitoren auf die Albuminurie und Glomerulosklerose festgestellt werden.

4.3 Einfluss der Nox1-Defizienz auf die Gefäße in der Nierenrinde

AngII führt in den Gefäßen zu einer Vasokonstriktion und einer Hypertrophie der Media [151]. Eine Vasokonstriktion unterstützt die Entwicklung einer Hypertonie.

Es wurde der Einfluss der Nox1-Defizienz auf die Morphologie der kleinen Gefäße in der Nierenrinde unter einer Behandlung mit AngII untersucht. Die Gefäßwandhypertrophie wurde anhand des Vaskulären Schädigungsindex nach Véniant beurteilt [123]. ROS und ein hoher Blutdruck tragen zu einer Gefäßwandhypertrophie bei. Da der Blutdruck der Nox1-KO-Tiere zum Behandlungsende signifikant geringer war als in den WT-Tieren, vermuteten wir eine

geringere Gefäßwandhypertrophie in den Nox1-KO-Tieren. Anhand einer HE-Färbung von Nierengewebschnitten wurden die Gefäße in der Nierenrinde beurteilt.

Entgegen unserer Vermutungen verminderte die Nox1-Defizienz die AngII-induzierte Gefäßwandhypertrophie der Nierengefäße nicht. In den unbehandelten Nox1-KO-Tieren war die Gefäßwand tendenziell stärker hypertrophiert als in den WT-Tieren. Zwei mögliche Erklärungen für die nicht verminderte Gefäßwandhypertrophie könnten Wachstumsfaktoren sein, die durch a) ROS und/oder b) einen hohen Blutdruck zum Behandlungsbeginn aktiviert wurden. Im Vergleich zu den WT-Tieren war der Blutdruck der Nox1-KO-Tiere in den ersten Tagen nicht konstant niedriger sondern stieg nach Tag sieben noch einmal an. Ab Tag 19 war bis zum Behandlungsende kein Blutdruckanstieg mehr eruierbar. In den ersten Behandlungstagen könnten die Blutdruckschwankungen zur Gefäßwandhypertrophie beigetragen haben. Die Anzahl der ROS in den Nox1-KO-Tieren unterschied sich nicht-signifikant von den WT-Tieren. Die Vermutung, dass ROS die tendenziell stärkere Hypertrophie in den unbehandelten Nox1-KO-Tieren verursacht haben, liegt daher nicht nahe.

Matsuno et al. untersuchten die Gefäßwandhypertrophie der Aorta in Nox1-defizienten Mäusen [133]. AngII führte in den Nox1-KO-Mäusen und den WT-Mäusen zu einer signifikanten Hypertrophie der Gefäßwand. Dies begründen die Untersucher damit, dass ROS die für die Hypertrophie der Gefäßwand verantwortlich sind, von Nox2 synthetisiert werden und somit auch unter Nox1-Defizienz eine Hypertrophie bedingen können [133].

Andere Studien zeigten, dass Nox1 eine Gefäßwandhypertrophie durch AngII fördert. Allerdings wurden in diesen Arbeiten die Gefäße außerhalb der Niere untersucht. Dikalova et al. untersuchten die Gefäßwanddicke der Aorta in Mäusen mit einer Nox1-Überexpression in den glatten Muskelzellen. Die Nox1-Überexpression erhöhte die Gefäßwanddicke durch AngII [93]. Gavazzi et al. zeigten, dass Nox1-defiziente Mäuse eine verminderte Gefäßwandhypertrophie der Aorta nach einer AngII-Behandlung haben [134]. Im Unterschied zu unserer Arbeit, haben Gavazzi et al. die Mediadicke anhand eines Bildbearbeitungsprogramms gemessen. In einer anderen Studie zeigten Gavazzi et al., dass Nox1-defiziente Mäuse eine geringere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Aortendissektion nach einer Behandlung mit AngII haben. In den Nox1-defizienten Tieren war die Expression des Metalloproteinasehemmers 1 (TIMP1) vermindert. [152]. Nox1 scheint nach Gavazzi et al. eine AngII-induzierte Hypertrophie der Gefäßwand in der Aorta sowie die Entstehung einer Aortendissektion zu unterstützen.

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit, dass unter einer Nox1-Defizienz die Gefäßwandhypertrophie durch AngII nicht vermindert wird. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der Blutdruck erst ab Tag 19 bis zum Versuchsende konstant niedriger war als in den WT-Tieren. Für eine digitale, objektive Quantifizierung, könnte die Gefäßwanddicke anhand eines Bildbearbeitungsprogramms bestimmt werden.

4.4 DNA-Strangbrüche in der Niere unter Nox1-Defizienz

DNA-Doppelstrangbrüche und 15-Isoprostan F_{2t} entstehen unter anderem durch oxidativen Stress. 15-Isoprostan F_{2t} ist ein Marker für die Lipidperoxidation. In der Niere erhöht AngII die Anzahl der ROS und der DNA-Doppelstrangbrüche, im Urin erhöht AngII die Konzentration an peroxidierten Lipiden (15-Isoprostan F_{2t}) [111, 130]. Es wurde nun untersucht, ob das Fehlen der Nox1 zu weniger oxidativen Stress führt.

Um die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen in der Niere zu messen, wurden zwei Untersuchungen durchgeführt: Die phosphorylierte Form des Histons γ -H2AX wurde immunhistochemisch auf Gewebsschnitten der Niere angefärbt und es wurde ein Comet-Assay mit isolierten Nierenzellen durchgeführt.

AngII erhöhte in den WT-Tieren die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche signifikant. Gemäß unseren Erwartungen verminderte die Nox1-Defizienz die AngII-induzierten DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere signifikant. Nox1 ist folglich an der Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch AngII beteiligt. Das Fehlen der Nox1 verminderte die Genotoxizität von AngII in der Niere signifikant.

Beim Comet-Assay wiesen die Nierenzellen der AngII-behandelten Nox1-KO-Tiere tendenziell weniger DNA-Strangbrüche auf. Es muss bedacht werden, dass es beim Comet-Assay bei der Durchführung zu technischen Problemen kam, sodass das Ergebnis nicht abschließend gewertet werden kann. Betrachtet man die Ergebnisse aus Comet-Assay und γ -H2AX-Färbung gemeinsam, zeichnet sich eine Verringerung der AngII-induzierten DNA-Strangbrüche durch die Nox1-Defizienz ab.

Der Antikörper für γ -H2AX ist ein sehr guter Marker, um DNA-Doppelstrangbrüche und damit eine DNA-Instabilität zu detektieren. Andere DNA-Schäden werden nicht detektiert [153]. DNA-Instabilität ist ein Risikofaktor für die Entstehung von Tumoren [154]. Betrachtet man das Ergebnis der DNA-Strangbrüche isoliert, ohne andere Risikofaktoren mit einzubeziehen, so würde ein (Nierenzell-) Karzinom in den Nox1-KO-Tieren mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit entstehen.

γ -H2AX wird in manchen Studien als möglicher Marker für das Risiko einer Tumorentstehung diskutiert [155]. Es muss allerdings zwischen permanenten und vorübergehenden γ -H2AX-Foci unterschieden werden. Vorübergehende γ -H2AX-Foci können entstehen, wenn sich die Zelle gerade im Stadium der DNA-Reparatur befindet

[156]. Mit der immunhistochemischen Färbung kann nicht zwischen permanenten und vorübergehenden γ -H2AX-Foci unterschieden werden. γ -H2AX-Foci treten auch bei Apoptose auf [157]. Eine Doppelfärbung mit einem Apoptosemarker zusätzlich zu der γ -H2AX-Färbung in den WT- und Nox1-KO-Tieren könnte einen Hinweis auf die Anzahl der durch Apoptose verursachten γ -H2AX-Foci geben.

Als weiteren Marker für oxidativen Stress wurde die Konzentration von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin mittels ELISA quantifiziert. 15-Isoprostan F_{2t} ist ein Parameter der Lipidperoxidation. AngII steigerte die Lipidperoxidation in den WT- und in den Nox1-KO-Tieren. In den AngII-behandelten Nox1-KO-Tieren war die Lipidperoxidation geringer als in den WT-Tieren. Die unbehandelten Nox1-KO-Kontrolltiere wiesen eine signifikant geringere Konzentration an 15-Isoprostan F_{2t} im Urin auf als die WT-Tiere.

AngII erhöhte auch in anderen Studien die Konzentration an 15-Isoprostan F_{2t} [158]. Reckelhoff et al. behandelten Ratten mit AngII [159]. AngII erhöhte den Blutdruck und den oxidativen Stress. Der oxidative Stress wurde mittels 15-Isoprostan F_{2t} im Plasma quantifiziert. Schnackenberg et al. gaben spontan hypertensiven Ratten zwei Wochen lang über das Trinkwasser das Antioxidans Tempol. Die Tiere wiesen eine verminderte Konzentration von 15-Isoprostan F_{2t} im Urin sowie einen niedrigeren Blutdruck als die Kontrollgruppe auf [160]. Durch die Behandlung mit Tempol lässt sich vermuten, dass ROS an der Aufrechterhaltung der Hypertonie und des oxidativen Stresses beteiligt waren.

Es liegen nicht viele Studien zur Lipidperoxidation unter Nox1-Defizienz vor. Lan et al. untersuchten die Lipidperoxidation in der Leber bei Nox1-defizienten Mäusen [161]. Die Mäuse wurden mit Tetrachlorkohlenstoff behandelt, um eine Entzündungsreaktion zu induzieren. Als Marker für die Lipidperoxidation wurde 4-Hydroxynonenal (4-HNE) und Malondialdehyd in der Leber quantifiziert. Die Nox1-Defizienz verminderte die Lipidperoxidation in der Leber. Gago-Dominguez et al. vermuten, dass die Lipidperoxidation bei Patienten mit Hypertonie und Übergewicht das Risiko für ein NCC erhöht [162]. Eine Ursache dafür könnte sein, dass 15-Isoprostan F_{2t} unter Hypertonie erhöht ist und Hypertonie ein Risikofaktor für das NCC darstellt [163-165]. Die Nox1-Defizienz würde daher diesem Ergebnis nach das Risiko für ein NCC senken.

Nach unseren Ergebnissen vermindert eine Nox1-Defizienz die DNA-schädigende Wirkung und die Lipidperoxidation durch AngII in der Niere.

4.5 ROS in der Niere unter Nox1-Defizienz

Die Konzentration an 15-Isoprostan F_{2t} , die Anzahl an DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüchen und auch der Blutdruck waren in den AngII-behandelten Nox1-KO-Mäusen geringer als in den behandelten WT-Mäusen. Wir vermuteten daher eine

geringere Anzahl an ROS in der Niere der Nox1-KO-AngII-Mäuse. Anhand einer Färbung mit DHE auf Gefrierschnitten der Niere quantifizierten wir die Anzahl an ROS. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Tendenziell erhöhte AngII in WT- und Nox1-KO-Gruppe die Anzahl an ROS. In den Nox1-KO-Tieren war der ROS-Anstieg tendenziell geringer als in den WT-Tieren.

Brandt et al. beobachteten einen signifikanten Anstieg der ROS durch AngII in WT-Mäusen [139]. Zwei Erklärungen für die signifikant verminderte Anzahl an DNA-Strangbrüchen in den Nox1-KO-Tieren trotz nur nicht-signifikant gering vermindelter Anzahl an ROS können folgende sein: Erstens wirken nicht alle in der Niere detektierten ROS schädigend. Die primäre Funktion von ROS ist die Signaltransduktion und Immunabwehr. Zweitens werden mit einer Färbung mit DHE nur ROS angefärbt, die sich aktuell in der Niere befinden. ROS, die durch das oxidative Abwehrsystem eliminiert wurden, aber bereits DNA-Strangbrüche verursacht haben, werden nicht mehr detektiert.

Andere Arbeiten zeigten ebenfalls, dass in Nox1-defizienten Mäusen die Superoxidproduktion nach AngII-Behandlung geringer war als in den WT-Tieren [92, 133]. Matsuno et al. verwendeten eine DHE-Färbung zur Detektion der ROS [133]. Allerdings wurde in beiden Studien die ROS-Anzahl in der Aorta untersucht, nicht in der Niere. In Mäusen mit einer Nox1-Überexpression und einer AngII-Behandlung (0.7 mg/kg/Tag) über 14 Tage, erhöhte AngII die Superoxidanzahl in der Aorta [93]. Yogi et al. arbeiteten mit Nox1-defizienten Mäusen [92], die mit transgenen Tieren mit einer Defizienz für das humane aktive Renin gekreuzt wurden. Bei den Tieren war die Konzentration an H_2O_2 in der Niere signifikant geringer. Auch die Konzentration an TBARS (Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen) im Plasma war in den Nox1-/Renin-defizienten Mäusen geringer. Eine Nox2- und Nox4-Defizienz minderte die Anzahl der ROS in der Niere nach AngII-Behandlung nicht [111].

Unseren Ergebnissen nach ist die Nox1 tendenziell an der AngII-induzierten ROS-Erhöhung in der Niere beteiligt. Da die Anzahl der ROS durch die Nox1-Defizienz allerdings nicht-signifikant vermindert werden konnte, ist zu vermuten, dass unter dem Einfluss von AngII Nox1 nicht der alleinige Produzent der ROS in der Niere ist.

4.6 Xanthinoxidase unter Nox1-Defizienz

Das Enzym Xanthinoxidoreduktase katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure. Die Xanthinoxidoreduktase kann in zwei Formen vorliegen: Der Xanthindehydrogenase oder der Xanthinoxidase [46]. Unter physiologischen Bedingungen überträgt die Xanthindehydrogenase freiwerdende Elektronen über $FADH_2$ auf NAD^+ und NADH entsteht. In bestimmten Prozessen

konvertiert die Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase, beispielsweise bei Entzündungsreaktionen. Die Xanthinoxidase überträgt Elektronen über FAD auf ein Sauerstoffatom. Es entstehen ROS (H_2O_2 und O_2^-) [47]. Die Xanthinoxidase ist daher besonders unter pathologischen Bedingungen neben der NOX ein starker ROS-Produzent.

Die Anzahl der ROS in der Niere war in den Nox1-KO-AngII-Tieren nur tendenziell geringer als in den WT-Tieren. Es wurde nun untersucht, ob die Nox1-Defizienz durch die Xanthinoxidase auf RNA- und Proteinebene kompensiert wird und zur verbleibenden ROS-Produktion in der Niere beiträgt.

Die Behandlung mit AngII induzierte weder in den WT-Tieren noch in den Nox1-KO-Tieren eine signifikant stärkere Proteinexpression der XO1. Unter Berücksichtigung der PCR-Kriterien (PCR-Produkt mindestens doppelt so groß oder mindestens halb so groß wie in der Kontrollgruppe) unterschied sich die mRNA-Expression der XO1 nicht-signifikant zwischen den Versuchsgruppen.

Durch die Nox1-Defizienz wurde die Xanthinoxidase nicht verstärkt exprimiert. Die Xanthinoxidase kann daher unter der Nox1-Defizienz nicht wesentlich zur ROS-Produktion in der Niere beigetragen haben. Die Expression der Xanthinoxidase wurde hier nur in der Niere untersucht. Interessant wäre auch eine Untersuchung der Xanthinoxidase im vaskulären System. Produziert die Xanthinoxidase im Gefäßsystem vermehrt ROS, fördert dies eine Hypertonie. In letzter Zeit wurden Studien zum Xanthinoxidasehemmer Allopurinol gemacht. Allopurinol wird primär zur Therapie von Hyperurikämie eingesetzt. Terawaki et al. setzten Allopurinol bei Patienten mit hypertensiver Nephropathie ein [166]. Die Therapie mit Allopurinol senkte das kardiovaskuläre Risiko der Patienten. Allopurinol senkt vermutlich unter anderem den oxidativen Stress in den Gefäßen und vermindert so das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit hypertensiver Nephropathie [166, 167]. Zudem senkte es die Harnsäurekonzentration. Harnsäure ist ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall [168]. Bei der Untersuchung der Xanthinoxidase im vaskulären System unter Nox1-Defizienz wäre auch eine Behandlung mit Allopurinol unter der Behandlung mit AngII interessant.

Zusammenfassend wird die Xanthinoxidase unter Nox1-Defizienz in der Niere nicht verstärkt exprimiert. Die anfallenden ROS in der Niere der Nox1-KO-Tiere wurden nicht verstärkt von der Xanthinoxidase produziert.

4.7 Nox2 und Nox4 unter Nox1-Defizienz

Nox2 und Nox4 sind ebenfalls Isoformen der NOX. Beide kommen in der Niere vor und sind Produzenten von ROS. Wir untersuchten, ob die Nox1-Defizienz die mRNA-

Expression der Nox2 und Nox4 hochreguliert. Unter Berücksichtigung der PCR-Kriterien für eine biologische Relevanz (PCR-Produkt mindestens doppelt so groß oder mindestens halb so groß wie in der Kontrollgruppe) wurde die mRNA der Nox2 und Nox4 in keiner Versuchsgruppe vermehrt exprimiert. Die Untersuchung der Expression der Nox2 und Nox4 auf Proteinebene wurde nicht durchgeführt.

Gavazzi et al. konnten ebenfalls keine Kompensation einer Nox1-Defizienz durch Nox2 und Nox4 in AngII-behandelten Mäusen detektieren [134]. Auch in einer anderen Studie wurde die mRNA von Nox2 und Nox4 in Nox1-KO-Mäusen nicht kompensatorisch vermehrt exprimiert [133]. In der Studie von Matsuno et al. stieg während der 14-tägigen AngII-Behandlung die mRNA-Expression der Nox2 und Nox4 zunächst an und fiel dann ab Tag 7 ab. Der Anstieg der Nox2- und Nox4-mRNA bis Tag 7 kann darauf hinweisen, dass Nox2 und Nox4 in den ersten Behandlungstagen durch AngII aktiviert werden.

Insgesamt wurde die Nox1-Defizienz nicht durch die Isoformen Nox2 und Nox4 kompensiert. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, sollte die Expression von Nox2 und Nox4 auf Proteinebene überprüft werden. Wird die Nox2- und Nox4-Expression in den Nox1-KO-Tieren über den gesamten Behandlungszeitraum untersucht, kann dies Erkenntnisse zur zeitlichen Expression der Nox2 und Nox4 liefern.

4.8 NoxO1, NoxA1 und p47^{phox} unter Nox1-Defizienz

Neben der Kompensation der Nox1-Defizienz durch die Isoformen Nox2 und Nox4, wurde hier eine Kompensation durch die NOX1-Regulatoruntereinheiten NoxO1, NoxA1 und p47^{phox} auf Proteinebene untersucht. p47^{phox} ist eine Untereinheit der NOX2 und ein Homolog zur NOX1-Regulatoruntereinheit NoxO1. Bei Abwesenheit von p47^{phox} ist die NOX1 inaktiv [85].

NoxO1 wurde in den Nox1-KO-AngII-Tieren signifikant weniger exprimiert als in den WT-AngII-Tieren. Die Expression der NoxA1 unterschied sich zwischen den AngII-behandelten und unbehandelten Nox1-KO-Tieren nicht. p47^{phox}, als Regulatoruntereinheit der Nox2, wurde in den Nox1-KO-Tieren sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Tieren nicht-signifikant vermindert exprimiert. Zusammenfassend ergab sich, dass die Regulatoruntereinheiten nicht verstärkt unter der Nox1-Defizienz exprimiert wurden. NoxO1 und p47^{phox} wurden tendenziell unter Nox1-Defizienz vermindert exprimiert.

Die Kompensation der Nox1-Defizienz durch NoxO1, NoxA1 und p47^{phox} wurde in wenigen Studien untersucht. Die verminderte Expression der p47^{phox} in den Nox1-KO-AngII-Tieren könnte dazu beigetragen haben, dass der Blutdruck der Tiere geringer war. Eine weitere Erklärung für den verminderten Blutdruckanstieg in den Nox1-

defizienten Mäusen bietet eine Studie von Lai et al. mit p47^{phox}-defizienten Mäusen [169]. Lai et al. behandelten p47^{phox}-defiziente Mäuse mit AngII. Bei den p47^{phox}-KO-Tieren erhöhte sich der Blutdruck durch AngII nicht.

4.9 Oxidatives Abwehrsystem unter Nox1-Defizienz

Die Anzahl der DNA-Strangbrüche und die Lipidperoxidation waren in den Nox1-KO-Mäusen vermindert. Die Anzahl der ROS ergab keinen signifikanten Unterschied in den Versuchsgruppen. In den Nox1-KO-Tieren war der ROS-Anstieg unter AngII tendenziell geringer als in den WT-Tieren. Es wurden nun die Auswirkungen einer Nox1-Defizienz auf das oxidative Abwehrsystem untersucht. Es wurde eine PCR und ein Western Blot für die antioxidativen Enzyme SOD1 und HO1 durchgeführt, sowie eine PCR für Txnrd und Gpx.

AngII erhöhte die mRNA-Expression von HO1 in den WT-Tieren signifikant. Dies zeigten auch Brandt et al. in ihren Ergebnissen [139]. Auch Haugen et al. zeigten, dass AngII die Expression von renalem HO1 erhöht [101]. Die mRNA der anderen Enzyme des oxidativen Abwehrsystems wurden in keiner der Versuchsgruppen biologisch relevant verändert exprimiert. Allerdings verminderte die Nox1-Defizienz tendenziell die mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme HO1, Txnrd und Gpx unter der Behandlung mit AngII im Vergleich zur WT-AngII-Gruppe. Die Nox1-Defizienz verminderte tendenziell die Protein-Expression von HO1 in den AngII-behandelten und unbehandelten Tieren. SOD1 wurde nicht verändert exprimiert.

Insgesamt wurde das oxidative Abwehrsystem in den Nox1-KO-Mäusen tendenziell weniger aktiviert als in den WT-Tieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Anzahl der ROS in der Niere der Nox1-KO-AngII-Tiere tendenziell geringer war. Das antioxidative Abwehrsystem musste daher weniger aktiviert werden als in den WT-Tieren, bei denen mehr ROS vorlagen. HO1 wurde zwar auf mRNA-Ebene in den WT-AngII-Tieren signifikant stärker exprimiert. Auf Proteinebene zeigte sich jedoch eine nicht-signifikante Erhöhung von HO1 durch AngII in den WT-Tieren.

Es wird immer wieder kontrovers diskutiert, ob eine Therapie mit Antioxidantien das Tumorrisiko senkt. Arrick et al. zeigen, dass eine Therapie mit Antioxidantien die Anzahl an ROS vermindert und das Tumorrisiko senken könnte [170]. Mittlerweile gibt es auch Studien, die zeigen, dass Antioxidantien ein Tumorwachstum fördern können. So zeigten Harris et al., dass der Signalweg des Antioxidans Glutathion zur Tumorentstehung notwendig ist [76]. Vitamin E, das oral supplementiert wird, erhöht das Prostatarisiko [171].

Das oxidative Abwehrsystem und antioxidative Enzyme sind bei Patienten mit Hypertonie vermindert [172, 173]. Bei den WT-Tieren, die den höchsten Blutdruck

aufwiesen, waren die antioxidativen Enzyme allerdings auf mRNA-Ebene tendenziell hochreguliert. Brandt et al. zeigten, dass eine Behandlung von WT-Mäusen mit AngII und dem Antioxidans Tempol zu einer verminderten ROS-Produktion in der Niere führte [139]. Eine Behandlung mit Antioxidantien, wie beispielsweise N-Acetylcystein, unter Nox1-Defizienz könnte zeigen, wie sich dies auf den Blutdruck und den oxidativen Stress in der Niere auswirkt.

4.10 Ausblick und Schlussfolgerungen

Zusammenfassend wurden drei wichtige Erkenntnisse zur Nox1 aus dieser Arbeit gewonnen: Erstens vermindert das Fehlen der Nox1 die Entstehung einer Hypertonie durch AngII. Zweitens vermindert das Fehlen der Nox1 den oxidativen Stress in der Niere, das heißt die Bildung von DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüchen und die Lipidperoxidation. Drittens ist die Nox1 unter der Behandlung mit AngII nicht der Hauptproduzent der ROS in der Niere.

Konsequenzen aus diesen Erkenntnissen ergeben sich besonders für Patienten mit AngII-induzierter Hypertonie und Nephropathie. In letzter Zeit werden Nox1-Hemmer in Studien erprobt. Sedeek et al. testeten den dualen Nox1/Nox4-Inhibitor GKT136901 bei Mäusen mit Diabetes Typ 2 [150]. Der duale Nox1/Nox4-Hemmer verminderte die Albuminurie und den oxidativen Stress in der Niere. Der Blutdruck wurde durch den Nox1/Nox4-Hemmer nicht vermindert, allerdings hatten die Tiere schon vor Behandlungsbeginn normotensive Werte. Ein weiterer bekannter dualer Nox1/Nox4-Hemmer ist GKT137831. Somanna et al. arbeiteten mit isolierten Fibroblasten aus dem Herzen [174]. GKT137831 minderte unter der Behandlung mit AngII eine Proliferation der isolierten Fibroblasten aus dem Herzen und die Expression von Entzündungsmarkern. Somanna et al. vermuten, dass der duale Nox1/Nox4-Hemmer GKT137831 einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer hypertensiven Kardiomyopathie haben könnte [174]. Der neue Nox1-Hemmer NOS31 hemmt das Wachstum von Kolontumor und Magenkarzinom-Zellen [175]. Es stellt sich die Frage, ob ein Nox1-Hemmer bei AngII-behandelten WT-Mäusen den Blutdruck und den oxidativen Stress in der Niere senken würde. Bei einem positiven Effekt könnten Nox1-Hemmer eine Option zur Senkung einer AngII-induzierten Hypertonie und des Nierenzellkarzinomrisikos sein.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, (4. Auflage, 2012).
2. Kobori, H., et al., *The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease*. *Pharmacol Rev*, 2007. **59**(3): p. 251-87.
3. Brasier, A.R., Y. Han, and C.T. Sherman, *Transcriptional regulation of angiotensinogen gene expression*. *Vitam Horm*, 1999. **57**: p. 217-47.
4. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(3): p. 747-803.
5. Ichikawa, I. and B.M. Brenner, *Importance of efferent arteriolar vascular tone in regulation of proximal tubule fluid reabsorption and glomerulotubular balance in the rat*. *J Clin Invest*, 1980. **65**(5): p. 1192-201.
6. Yu, L., et al., *Developmental changes in AT1 and AT2 receptor-protein expression in rats*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2010. **11**(4): p. 214-21.
7. Seshiah, P.N., et al., *Angiotensin II Stimulation of NAD(P)H Oxidase Activity*. *Upstream Mediators*, 2002. **91**(5): p. 406-413.
8. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
9. Berk, B.C., et al., *Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells*. *Hypertension*, 1989. **13**(4): p. 305-14.
10. Naftilan, A.J., et al., *Induction of the proto-oncogene c-jun by angiotensin II*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(10): p. 5536-40.
11. Navar, L.G., et al., *Enhancement of intrarenal angiotensin II levels in 2 kidney 1 clip and angiotensin II induced hypertension*. *Blood Press Suppl*, 1995. **2**: p. 88-92.
12. Nishiyama, A. and H. Kobori, *Independent regulation of renin-angiotensin-aldosterone system in the kidney*. *Clin Exp Nephrol*, 2018.
13. Kobori, H., L.M. Harrison-Bernard, and L.G. Navar, *Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin II-dependent hypertension*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(3): p. 431-9.
14. Gonzalez-Villalobos, R.A., et al., *The absence of intrarenal ACE protects against hypertension*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(5): p. 2011-23.
15. Kobori, H., et al., *Urinary Angiotensinogen as an Indicator of Intrarenal Angiotensin Status in Hypertension*. *Hypertension*, 2003. **41**(1): p. 42-49.
16. Ichihara, A., et al., *Renal Renin-Angiotensin System*. *Contributions to nephrology*, 2004. **143**: p. 117-130.
17. WHO, *A global brief on hypertension: Silent killer, global public health crisis*. 2013.
18. Stephen C. Textor, M., *Secondary hypertension Renovascular hypertension*. Vol. 8. 2014, *Journal of the American Society of Hypertension: American Society of Hypertension Self-Assessment Guide*. 943-945.
19. Chow, W.H., L.M. Dong, and S.S. Devesa, *Epidemiology and risk factors for kidney cancer*. *Nat Rev Urol*, 2010. **7**(5): p. 245-57.
20. Seccia, T.M., B. Caroccia, and L.A. Calo, *Hypertensive nephropathy. Moving from classic to emerging pathogenetic mechanisms*. *J Hypertens*, 2017. **35**(2): p. 205-212.
21. Kabaria, R., Z. Klaassen, and M.K. Terris, *Renal cell carcinoma: links and risks*. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 2016. **9**: p. 45-52.
22. Tumours, W.H.O.C.o., *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 2004, Lyon: IARC Press

23. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/nierenzellkarzinom-hypernephrom/@@view/html/index.html#ID0EHLAC>, *Leitlinien Nierenzellkarzinom Stand Januar 2018*. 30.07.2018.
24. B. Ljungberg (Chair), K.B., A. Bex (Vice-chair), et al., *EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma*. 2016.
25. Deckers, I.A., et al., *Long-term dietary sodium, potassium and fluid intake; exploring potential novel risk factors for renal cell cancer in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(3): p. 797-801.
26. Hunt, J.D., et al., *Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies*. *Int J Cancer*, 2005. **114**(1): p. 101-8.
27. Dayan, A.D., *Tobacco. A Major International Health Hazard*. *Journal of Clinical Pathology*, 1988. **41**(2): p. 238-238.
28. Kuper, H., P. Boffetta, and H.O. Adami, *Tobacco use and cancer causation: association by tumour type*. *J Intern Med*, 2002. **252**(3): p. 206-24.
29. Alexandrov, K., et al., *Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa*. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(9): p. 2081-3.
30. Hecht, S.S., *Research opportunities related to establishing standards for tobacco products under the Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act*. *Nicotine Tob Res*, 2012. **14**(1): p. 18-28.
31. Hecht, S.S., *Tobacco smoke carcinogens and lung cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(14): p. 1194-210.
32. Coughlin, S.S., et al., *Predictors of mortality from kidney cancer in 332,547 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial*. *Cancer*, 1997. **79**(11): p. 2171-7.
33. Colt, J.S., et al., *Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans*. *Epidemiology*, 2011. **22**(6): p. 797-804.
34. Chow, W.H. and S.S. Devesa, *Contemporary epidemiology of renal cell cancer*. *Cancer J*, 2008. **14**(5): p. 288-301.
35. Cutler, J.A., et al., *Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988-1994 and 1999-2004*. *Hypertension*, 2008. **52**(5): p. 818-27.
36. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. *Lancet*, 2008. **371**(9612): p. 569-78.
37. Gelfond, J., et al., *Modifiable risk factors to reduce renal cell carcinoma incidence: Insight from the PLCO trial*. *Urol Oncol*, 2018. **36**(7): p. 340.e1-340.e6.
38. Stojanovic, M., B. Goldner, and D. Ivkovic, *Renal cell carcinoma and arterial hypertension*. *Clin Exp Nephrol*, 2009. **13**(4): p. 295-9.
39. Schupp, N., et al., *Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(5): p. F1427-34.
40. Jones, D.P. and R. Radi, *Redox pioneer: professor Helmut Sies*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **21**(18): p. 2459-68.
41. Miyata, K., et al., *Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(10): p. 2906-12.
42. Huber, T.B., et al., *Expression of functional CCR and CXCR chemokine receptors in podocytes*. *J Immunol*, 2002. **168**(12): p. 6244-52.
43. Gorin, Y., et al., *Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells*. *Biochem J*, 2004. **381**(Pt 1): p. 231-9.

44. Hannken, T., et al., *Angiotensin II-mediated expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals*. *Kidney Int*, 1998. **54**(6): p. 1923-33.
45. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003. **111**(8): p. 1201-1209.
46. Kuwabara, Y., et al., *Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(14): p. 8170-8175.
47. Harris, C.M. and V. Massey, *The oxidative half-reaction of xanthine dehydrogenase with NAD; reaction kinetics and steady-state mechanism*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(45): p. 28335-41.
48. Cardillo, C., et al., *Xanthine Oxidase Inhibition With Oxypurinol Improves Endothelial Vasodilator Function in Hypercholesterolemic but Not in Hypertensive Patients*. *Hypertension*, 1997. **30**(1): p. 57-63.
49. Hirsch-Kauffmann, M., M. Schweiger, and M.-R. Schweiger, *Biologie und molekulare Medizin*. 2009(7. Auflage).
50. Wenisch, T., *Kurzlehrbuch Biologie*. 2015(4. Auflage).
51. Montezano, A.C., et al., *Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies*. *Can J Cardiol*, 2015. **31**(5): p. 631-41.
52. Rodrigo, R., et al., *Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage*. *Dis Markers*, 2013. **35**(6): p. 773-90.
53. Leong, X.F., et al., *Association of elevated blood pressure and impaired vasorelaxation in experimental Sprague-Dawley rats fed with heated vegetable oil*. *Lipids Health Dis*, 2010. **9**: p. 66.
54. Forstermann, U. and H. Li, *Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(2): p. 213-23.
55. Fellner, S.K. and W.J. Arendshorst, *Angiotensin II, reactive oxygen species, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **289**(5): p. F1012-9.
56. Sibley, C.T., et al., *Assessment of Atherosclerosis in Chronic Granulomatous Disease*. *Circulation*, 2014. **130**(23): p. 2031-2039.
57. Wang, D., et al., *Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(11): p. 2783-9.
58. Touyz, R.M., G. Yao, and E.L. Schiffrin, *c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(6): p. 981-7.
59. Berry CE, H.J., *Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications*. *The Journal of Physiology*, 2004. **555**(3): p. 589-606.
60. Sesso, H.D., et al., *C-reactive protein and the risk of developing hypertension*. *JAMA*, 2003. **290**(22): p. 2945-2951.
61. Niki, E., *Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2014. **1840**(2): p. 809-817.
62. Brown, K.A., et al., *Effect of aging, MnSOD deficiency, and genetic background on endothelial function: evidence for MnSOD haploinsufficiency*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(9): p. 1941-6.
63. Dikalov, S.I. and Z. Ungvari, *Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2013. **305**(10): p. H1417-H1427.

64. Andrisic, L., et al., *Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer*. Redox Biol, 2018. **14**: p. 47-58.
65. Sayin, V.I., et al., *Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice*. Sci Transl Med, 2014. **6**(221): p. 221ra15.
66. Raafat Yousri1*, E.N., Omama El Shawi2, Nadia Fahmy2, Maha Ghazy3, *Evaluation of Anti-Oxidant Status and Radioprotective Activity of a Novel Anti-Cancer Drug in Mice*. Journal of Cancer Therapy, 2011.
67. Miyata, Y., et al., *A Mini-Review of Reactive Oxygen Species in Urological Cancer: Correlation with NADPH Oxidases, Angiogenesis, and Apoptosis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
68. Du, M.Q., P.L. Carmichael, and D.H. Phillips, *Induction of activating mutations in the human c-Ha-ras-1 proto-oncogene by oxygen free radicals*. Mol Carcinog, 1994. **11**(3): p. 170-5.
69. Li, Q. and J.F. Engelhardt, *Interleukin-1beta induction of NFkappaB is partially regulated by H2O2-mediated activation of NFkappaB-inducing kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1495-505.
70. Block, K. and Y. Gorin, *Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(9): p. 627-37.
71. Heinzelmann, S. and G. Bauer, *Multiple protective functions of catalase against intercellular apoptosis-inducing ROS signaling of human tumor cells*. Biol Chem, 2010. **391**(6): p. 675-93.
72. Raad, H., et al., *NADPH Oxidase-1 Plays a Key Role in Keratinocyte Responses to UV Radiation and UVB-Induced Skin Carcinogenesis*. J Invest Dermatol, 2017. **137**(6): p. 1311-1321.
73. Vaquero, E.C., et al., *Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34643-54.
74. Xia, C., et al., *Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10823-30.
75. Block, K., et al., *NAD(P)H oxidases regulate HIF-2alpha protein expression*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 8019-26.
76. Harris, I.S., et al., *Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression*. Cancer Cell, 2015. **27**(2): p. 211-22.
77. Peiris-Pages, M., et al., *Metastasis and Oxidative Stress: Are Antioxidants a Metabolic Driver of Progression?* Cell Metab, 2015. **22**(6): p. 956-8.
78. Bedard, K. and K.-H. Krause, *The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology*. Physiological Reviews, 2007. **87**(1): p. 245-313.
79. Takac, I., et al., *The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 13304-13.
80. Chen, F., et al., *From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system*. Frontiers in Physiology, 2012. **3**: p. 412.
81. Teixeira, G., et al., *Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(12): p. 1647-1669.
82. Suh, Y.A., et al., *Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 79-82.
83. Geiszt, M., *NADPH oxidases: new kids on the block*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 289-99.
84. Cheng, G., et al., *Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1*. J Biol Chem, 2006. **281**(26): p. 17718-26.
85. Takeya, R. and H. Sumimoto, *Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1523-32.

86. Drummond, G.R. and C.G. Sobey, *Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease?* Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(9): p. 452-63.
87. Dikalov, S.I., et al., *Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production.* Free Radic Biol Med, 2008. **45**(9): p. 1340-51.
88. Seshiah, P.N., et al., *Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators.* Circ Res, 2002. **91**(5): p. 406-13.
89. Hua, P., et al., *The transcription factor ETS-1 regulates angiotensin II-stimulated fibronectin production in mesangial cells.* Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(11): p. F1418-29.
90. Rafiq, A., et al., *C242T polymorphism of the NADPH oxidase p22PHOX gene and its association with endothelial dysfunction in asymptomatic individuals with essential systemic hypertension.* Mol Med Rep, 2014. **9**(5): p. 1857-62.
91. Liu, R., et al., *Superoxide enhances tubuloglomerular feedback by constricting the afferent arteriole.* Kidney International, 2004. **66**(1): p. 268-274.
92. Yogi, A., et al., *Renal redox-sensitive signaling, but not blood pressure, is attenuated by Nox1 knockout in angiotensin II-dependent chronic hypertension.* Hypertension, 2008. **51**(2): p. 500-6.
93. Dikalova, A., et al., *Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice.* Circulation, 2005. **112**(17): p. 2668-76.
94. Streeter, J., et al., *Opportunity nox: the future of NADPH oxidases as therapeutic targets in cardiovascular disease.* Cardiovasc Ther, 2013. **31**(3): p. 125-37.
95. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function.* Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
96. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry.* British Medical Bulletin, 1993. **49**(3): p. 481-493.
97. Sung, C.C., et al., *Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease.* Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 301982.
98. Hayashi, S., et al., *Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene.* Gene, 2004. **336**(2): p. 241-50.
99. Shcherbinina, M.B., *Low blood bilirubin level: possible diagnostic and prognostic importance.* Klin Med (Mosk), 2007. **85**(10): p. 10-4.
100. Sikorski, E.M., et al., *The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury.* Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(3): p. F425-41.
101. Haugen, E.N., A.J. Croatt, and K.A. Nath, *Angiotensin II induces renal oxidant stress in vivo and heme oxygenase-1 in vivo and in vitro.* Kidney Int, 2000. **58**(1): p. 144-52.
102. Ishizaka, N., et al., *Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta.* Circulation, 1997. **96**(6): p. 1923-9.
103. Vogt, B.A., et al., *Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury.* J Clin Invest, 1996. **98**(9): p. 2139-45.
104. Konvalinka, A., et al., *Determination of an angiotensin II-regulated proteome in primary human kidney cells by stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC).* J Biol Chem, 2013. **288**(34): p. 24834-47.
105. Poljsak, B. and I. Milisav, *The neglected significance of "antioxidative stress".* Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 480895.
106. Lonn, E., *Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: A randomized controlled trial.* Journal of the American Medical Association, 2005. **293**(11): p. 1338-1347.

107. Cutler, R.G., *Oxidative stress profiling: part I. Its potential importance in the optimization of human health*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1055**: p. 93-135.
108. Cutler, R.G., et al., *Oxidative stress profiling: part II. Theory, technology, and practice*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1055**: p. 136-58.
109. Milman, U., et al., *Vitamin E supplementation reduces cardiovascular events in a subgroup of middle-aged individuals with both type 2 diabetes mellitus and the haptoglobin 2-2 genotype: A prospective double-blinded clinical trial*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(2): p. 341-347.
110. Gray, S.P., et al., *NADPH Oxidase 1 Plays a Key Role in Diabetes Mellitus–Accelerated Atherosclerosis*. Circulation, 2013. **127**(18): p. 1888-1902.
111. Zimmol, A., *Relevanz des Angiotensin II Typ 1a-Rezeptors und der NADPH-Oxidase für die Entstehung Angiotensin II-vermittelter DNA-Schäden*. 2016.
112. Theeuwes, F. and S.I. Yum, *Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations*. Ann Biomed Eng, 1976. **4**(4): p. 343-53.
113. Krege, J.H., et al., *A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice*. Hypertension, 1995. **25**(5): p. 1111-5.
114. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
115. Jones, T.R., et al., *CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 482.
116. Fairbairn, D.W., P.L. Olive, and K.L. O'Neill, *The comet assay: a comprehensive review*. Mutat Res, 1995. **339**(1): p. 37-59.
117. Rothe, G. and G. Valet, *Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein*. J Leukoc Biol, 1990. **47**(5): p. 440-8.
118. *Clinical practice guidelines: For Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification*. AmJ Kidney Dis, 2002: p. 39:S1-266.
119. Cox, K.L., et al., *Immunoassay Methods*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD).
120. Morrow, J.D., *The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(8): p. 895-902.
121. Morrow, J.D., et al., *A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(23): p. 9383-9387.
122. Jaffe, M., *Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über neue reaction des Kreatinins*. . Z Physiol Chem 1886: p. 10: 391–400.
123. Veniant, M., et al., *Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats*. Kidney Int, 1994. **46**(2): p. 421-9.
124. el Nahas, A.M., et al., *Chronic renal failure after nephrotoxic nephritis in rats: contributions to progression*. Kidney Int, 1987. **32**(2): p. 173-80.
125. Dimmler, A., et al., *Laser capture microdissection and real-time PCR for analysis of glomerular endothelin-1 gene expression in mesangiolytic rat anti-Thy 1.1 and murine Habu Snake Venom glomerulonephritis*. Diagn Mol Pathol, 2003. **12**(2): p. 108-17.
126. Kruger, N.J., *The Bradford method for protein quantitation*. Methods Mol Biol, 1994. **32**: p. 9-15.
127. Don, R.H., et al., *'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(14): p. 4008.

128. Hecker, K.H. and K.H. Roux, *High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR*. Biotechniques, 1996. **20**(3): p. 478-85.
129. Brand, S., K. Amann, and N. Schupp, *Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts*. J Hypertens, 2013. **31**(2): p. 333-44.
130. Brand, S., et al., *Oxidative DNA damage in kidneys and heart of hypertensive mice is prevented by blocking angiotensin II and aldosterone receptors*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115715.
131. Montezano, A.C. and R.M. Touyz, *Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(1): p. 164-82.
132. Montezano, A.C. and R.M. Touyz, *Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies*. Ann Med, 2012. **44 Suppl 1**: p. S2-16.
133. Matsuno, K., et al., *Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2677-85.
134. Gavazzi, G., et al., *Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice*. FEBS Lett, 2006. **580**(2): p. 497-504.
135. Basset, O., et al., *NADPH Oxidase 1 Deficiency Alters Caveolin Phosphorylation and Angiotensin II-Receptor Localization in Vascular Smooth Muscle*. Antioxidants & Redox Signaling, 2009. **11**(10): p. 2371-2384.
136. Landmesser, U., et al., *Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 511-5.
137. Grote, K., et al., *Critical role for p47phox in renin-angiotensin system activation and blood pressure regulation*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(3): p. 596-605.
138. Teixeira, G., et al., *Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors*. British journal of pharmacology, 2017. **174**(12): p. 1647-1669.
139. Brandt, S., *Oxidativer Stress und DNA-Schäden induziert durch das Peptidhormon Angiotensin II in vivo Identifizierung des AT1-Rezeptors und reaktiver Sauerstoffspezies als ursächliche Faktoren 2012*.
140. Wolf, G. and F.N. Ziyadeh, *Renal tubular hypertrophy induced by angiotensin II*. Semin Nephrol, 1997. **17**(5): p. 448-54.
141. Wolf, G., *Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms*. Nephrologie, 1998. **19**(7): p. 451-6.
142. Wolf, G., *Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury*. Nephrol Dial Transplant. 2000.
143. Wolf, G., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1366-72.
144. Shemesh, O., et al., *Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients*. Kidney International, 1985. **28**(5): p. 830-838.
145. Maddox, D.A., et al., *Determinants of glomerular filtration in experimental glomerulonephritis in the rat*. J Clin Invest, 1975. **55**(2): p. 305-18.
146. Laterza, O.F., C.P. Price, and M.G. Scott, *Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate?* Clin Chem, 2002. **48**(5): p. 699-707.
147. Wang, H., et al., *p47(phox) contributes to albuminuria and kidney fibrosis in mice*. Kidney Int, 2015. **87**(5): p. 948-62.
148. Chen, X., et al., *Lack of Integrin α 181 Leads to Severe Glomerulosclerosis after Glomerular Injury*. The American Journal of Pathology, 2004. **165**(2): p. 617-630.

149. Gorin, Y., et al., *Targeting NADPH oxidase with a novel dual Nox1/Nox4 inhibitor attenuates renal pathology in type 1 diabetes*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **308**(11): p. F1276-87.
150. Sedeek, M., et al., *Renoprotective effects of a novel Nox1/4 inhibitor in a mouse model of Type 2 diabetes*. Clin Sci (Lond), 2013. **124**(3): p. 191-202.
151. Griffin, S.A., et al., *Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism*. Hypertension, 1991. **17**(5): p. 626-35.
152. Gavazzi, G., et al., *NOX1 deficiency protects from aortic dissection in response to angiotensin II*. Hypertension, 2007. **50**(1): p. 189-96.
153. Yu, T., et al., *Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(8): p. 935-46.
154. Milholland, B., et al., *Age-related somatic mutations in the cancer genome*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 24627-35.
155. Georgoulis, A., et al., *Genome Instability and gammaH2AX*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
156. Siddiqui, M.S., et al., *Persistent gammaH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2015. **766**: p. 1-19.
157. Rogakou, E.P., et al., *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9390-5.
158. Haas, J.A., et al., *Low-dose angiotensin II increases free isoprostane levels in plasma*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 983-6.
159. Reckelhoff, J.F., et al., *Subpressor doses of angiotensin II increase plasma F(2)-isoprostanes in rats*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 476-9.
160. Schnackenberg, C.G. and C.S. Wilcox, *Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha*. Hypertension, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 424-8.
161. Lan, T., T. Kisseleva, and D.A. Brenner, *Deficiency of NOX1 or NOX4 Prevents Liver Inflammation and Fibrosis in Mice through Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0129743.
162. Gago-Dominguez, M. and J.E. Castela, *Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(4): p. 721-33.
163. Lerman, L.O., et al., *Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension*. Hypertension, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 541-6.
164. Dobrian, A.D., et al., *Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension*. Hypertension, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 554-60.
165. Shapiro, J.A., et al., *Hypertension, antihypertensive medication use, and risk of renal cell carcinoma*. Am J Epidemiol, 1999. **149**(6): p. 521-30.
166. Terawaki, H., et al., *Effect of allopurinol on cardiovascular incidence among hypertensive nephropathy patients: the Gonryo study*. Clin Exp Nephrol, 2013. **17**(4): p. 549-53.
167. George, J., et al., *High-dose allopurinol improves endothelial function by profoundly reducing vascular oxidative stress and not by lowering uric acid*. Circulation, 2006. **114**(23): p. 2508-16.
168. Bos, M.J., et al., *Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study*. Stroke, 2006. **37**(6): p. 1503-7.
169. Lai, E.Y., et al., *p47(phox) is required for afferent arteriolar contractile responses to angiotensin II and perfusion pressure in mice*. Hypertension, 2012. **59**(2): p. 415-20.
170. Arrick, B.A., C.F. Nathan, and Z.A. Cohn, *Inhibition of glutathione synthesis augments lysis of murine tumor cells by sulfhydryl-reactive antineoplastics*. Journal of Clinical Investigation, 1983. **71**(2): p. 258-267.

171. Klein, E.A., et al., *Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)*. *Jama*, 2011. **306**(14): p. 1549-56.
172. Mullan, B.A., et al., *Ascorbic acid reduces blood pressure and arterial stiffness in type 2 diabetes*. *Hypertension*, 2002. **40**(6): p. 804-9.
173. Simic, D.V., et al., *Byproducts of oxidative protein damage and antioxidant enzyme activities in plasma of patients with different degrees of essential hypertension*. *J Hum Hypertens*, 2006. **20**(2): p. 149-55.
174. Somanna, N.K., et al., *The Nox1/4 Dual Inhibitor GKT137831 or Nox4 Knockdown Inhibits Angiotensin-II-Induced Adult Mouse Cardiac Fibroblast Proliferation and Migration. AT1 Physically Associates With Nox4*. *J Cell Physiol*, 2016. **231**(5): p. 1130-41.
175. Yamamoto, T., et al., *Identification and Characterization of a Novel NADPH Oxidase 1 (Nox1) Inhibitor That Suppresses Proliferation of Colon and Stomach Cancer Cells*. *Biol Pharm Bull*, 2018. **41**(3): p. 419-426.

Danksagung

Sehr herzlich danken möchte ich meiner Doktormutter und Betreuerin Frau PD Dr. Nicole Schupp für ihre Hilfestellungen und die Ratschläge im Labor und während der schriftlichen Anfertigung der Arbeit. Außerdem danken möchte ich Christina Hartmann für die gute Betreuung. Danke für eure schnellen Rückmeldungen und Hilfestellungen. Mein Dank richtet sich außerdem an Frau Dr. Anna Zimnol, die es mir ermöglicht hat, an dem Projekt weiterarbeiten zu können. Vielen Dank ebenfalls an Kerstin de Mezzo, Lena Schumacher und Sandra Ohler für die Unterstützung und die Einarbeitung bei der Laborarbeit. Auch danke ich dem Institut für Toxikologie in Würzburg für die Auswertung des Comet Assays.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Fritz für die Möglichkeit, im Institut für Toxikologie promovieren zu dürfen.

Zudem bedanke ich mich bei meinem Zweitgutachter für die Betreuung meiner Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Toxikologie. Es war mir eine Freude mit Euch arbeiten zu dürfen.

Ein großer Dank gilt meinen liebsten Geschwistern, meinem Freund und meinen Freunden, die mich immer wieder durch gute Ratschläge unterstützten.

Zutiefst dankbar bin ich meinen Eltern für die konsequente Betreuung meiner Arbeit. Eurer Unterstützung und eurer Motivation verdanke ich den Abschluss meiner Promotion.