

**Untersuchung der Effekte einer chronisch  
erhöhten Angiotensin II - Konzentration  
im Hinblick auf  
Überleben, Dedifferenzierung sowie die  
Induktion von Mutationen  
in Nierenzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Christina Hartmann**  
aus Werneck

Düsseldorf, August 2019

aus dem Institut für Toxikologie  
der Heinrich-Heine-Universität und des Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Frau PD Dr. Nicole Schupp
2. Herr Prof. Dr. Holger Stark

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2020

# Inhalt

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....                                                                              | <b>7</b>  |
| <b>1.1 Erhöhtes Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen in Hypertonie-Patienten</b> .....                   | <b>7</b>  |
| <b>1.2 Erhöhtes Risiko für Nierenkrebs in Hypertonie-Patienten</b> .....                                | <b>7</b>  |
| <b>1.3 Die Regulation des Blutdrucks über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ...</b>               | <b>8</b>  |
| 1.3.1 Anatomie und Physiologie der Niere .....                                                          | 11        |
| 1.3.2 Das renale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....                                               | 12        |
| 1.3.3 AngII-induzierte Signalwege.....                                                                  | 13        |
| <b>1.4 Pathophysiologie erhöhter AngII-Spiegel</b> .....                                                | <b>14</b> |
| 1.4.1 AngII-induzierter oxidativer Stress.....                                                          | 16        |
| 1.4.1.1 Die Entstehung von oxidativem Stress .....                                                      | 16        |
| 1.4.1.2 Oxidativer Stress und DNA-Schäden .....                                                         | 18        |
| 1.4.1.3 Oxidativer Stress im Zusammenhang mit Hypertonie .....                                          | 19        |
| 1.4.2 AngII-induzierte Inflammation und Nierenfibrose .....                                             | 20        |
| <b>1.5 “Hallmarks of Cancer” – die Kennzeichen einer Krebszelle</b> .....                               | <b>22</b> |
| 1.5.1 Zugrundeliegende Eigenschaften der Krebs-Entwicklung: Genomische Instabilität und Mutationen..... | 25        |
| 1.5.1.1 Zugrundeliegende Eigenschaften der Krebs-Entwicklung: verschiedene Arten von Mutationen .....   | 25        |
| 1.5.2 Proliferation und Apoptose – Gemeinsamkeiten von Krebs und Hypertonie .....                       | 26        |
| <b>1.6 Epithelial-Mesenchymale Transition</b> .....                                                     | <b>27</b> |
| 1.6.1 EMT Typ 2 bei der Regeneration und Fibrose.....                                                   | 29        |
| 1.6.2 EMT Typ 3 bei der Tumorprogression.....                                                           | 30        |
| 1.6.3 Mögliche Aktivierungskaskade der EMT.....                                                         | 31        |
| <b>2. Zielsetzung der Arbeit</b> .....                                                                  | <b>33</b> |
| <b>3. Material und Methoden</b> .....                                                                   | <b>35</b> |
| <b>3.1 Material</b> .....                                                                               | <b>35</b> |
| 3.1.1 Versuchstiere .....                                                                               | 35        |
| 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....                                                                  | 35        |
| 3.1.3 Blutdruckmessgerät .....                                                                          | 35        |
| 3.1.4 Oligonukleotide .....                                                                             | 35        |
| <b>3.2 Methoden</b> .....                                                                               | <b>36</b> |

|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.1 Chronischer Angiotensin II-Versuch .....                                                                      | 36        |
| 3.2.2 Akuter Aldosteron-Versuch .....                                                                               | 38        |
| 3.2.3 Immunhistochemie .....                                                                                        | 38        |
| 3.2.3.1 Visualisierung mithilfe der ABC-DAB Reaktion .....                                                          | 38        |
| 3.2.3.2 Detektion von 8-OxodG mittels ABC-DAB-Reaktion .....                                                        | 40        |
| 3.2.3.3 Visualisierung mithilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern.....                               | 41        |
| 3.2.3.4 Quantifizierung .....                                                                                       | 42        |
| 3.2.4 Immunfluoreszenz (DHE) .....                                                                                  | 42        |
| 3.2.5 Tunel-Assay .....                                                                                             | 43        |
| 3.2.6 Semiquantitative Untersuchung der Nierenmorphologie - Histopathologie .....                                   | 44        |
| 3.2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....                                                                             | 44        |
| 3.2.6.2 Siriusrot-Färbung .....                                                                                     | 44        |
| 3.2.6.3 Periodic-Acid-Schiff-Färbung.....                                                                           | 45        |
| 3.2.6.4 Glomeruloskleroseindex (GSI) und Mesangiolyseindex (MSI) .....                                              | 45        |
| 3.2.6.5 Tubulointerstiteller Schädigungsindex (TSI) .....                                                           | 46        |
| 3.2.7 WGA-Färbung zur Visualisierung von Zellmembranen.....                                                         | 47        |
| 3.2.8 Kompetitiver ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zur<br>Konzentrationsbestimmung.....                   | 48        |
| 3.2.8.1 Albumin Bestimmung im Urin .....                                                                            | 48        |
| 3.2.8.2 Bestimmung von 15-Isoprostan F <sub>2t</sub> im Urin.....                                                   | 49        |
| 3.2.8.3 Bestimmung von 8-OHdG im Urin .....                                                                         | 50        |
| 3.2.8.4 Bestimmung von 4-Nitrotyrosin im Serum .....                                                                | 50        |
| 3.2.9 Kolori- und fluorimetrische Assays zur Konzentrationsbestimmung.....                                          | 50        |
| 3.2.9.1 Kreatinin-Bestimmung mittels kolorimetrischer Messung.....                                                  | 50        |
| 3.2.9.2 TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) -Bestimmung mittels<br>fluorimetrischer Messung .....       | 51        |
| 3.2.10 Messung der Zytokin-Expression mittels des Inflammations-Panel LEGENDplex™<br>.....                          | 51        |
| 3.2.11 Mutations-Assay mit transgenen BigBlue®-Ratten .....                                                         | 53        |
| 3.2.11.1 Mutations-Assay.....                                                                                       | 55        |
| 3.2.11.2 Amplifikation des lacI-Gens der Mutanten .....                                                             | 55        |
| 3.2.12 RNA-Hybridisierung mittels RNAscope® Technologie.....                                                        | 56        |
| 3.2.13 Statistik .....                                                                                              | 57        |
| <b>4. Ergebnisse .....</b>                                                                                          | <b>58</b> |
| <b>4.1 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf den Blutdruck und die<br/>Nierenfunktion .....</b> | <b>58</b> |

|                                                                                                                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.1 Untersuchung des Blutdrucks während der AngII-Behandlung.....                                                                                                     | 58        |
| 4.1.2 Untersuchung des Körpergewichts und des relativen Nieren- und Herzgewichts nach AngII-Behandlung .....                                                            | 59        |
| 4.1.3 Untersuchung von Nierenfunktionsparametern nach AngII-Behandlung.....                                                                                             | 59        |
| 4.1.4 Untersuchung der Nierenmorphologie nach AngII-Behandlung.....                                                                                                     | 60        |
| 4.1.5 Untersuchung des GSI und MSI nach AngII-Behandlung.....                                                                                                           | 61        |
| 4.1.6 Untersuchung des TSI nach AngII-Behandlung.....                                                                                                                   | 62        |
| <b>4.2 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Induktion von Inflammation und Nierenfibrose.....</b>                                              | <b>63</b> |
| <b>4.3 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Produktion von systemischen und lokalen ROS .....</b>                                              | <b>66</b> |
| 4.3.1 Untersuchung von systemischen ROS nach AngII-Behandlung .....                                                                                                     | 66        |
| 4.3.2 Untersuchung von lokalen ROS nach AngII-Behandlung .....                                                                                                          | 67        |
| <b>4.4 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Induktion von DNA-Schäden in der Niere.....</b>                                                    | <b>69</b> |
| <b>4.5 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Mutationsfrequenz in Nierenzellen .....</b>                                                        | <b>72</b> |
| 4.5.1 Untersuchung der Mutationsfrequenz (MF) nach AngII-Behandlung in Nierenzellen .....                                                                               | 72        |
| 4.5.2 Untersuchung des Mutationsspektrums nach AngII-Behandlung in Nierenzellen ....                                                                                    | 73        |
| <b>4.6 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Apoptose- und Prolifertationsrate in der Niere .....</b>                                           | <b>75</b> |
| <b>4.7 Einfluss eines überaktivierten RAAS auf die Auflösung einer epithelial-mesenchymalen Transition in der Niere: Vergleich chronische und akute Behandlung.....</b> | <b>82</b> |
| 4.7.1 Untersuchung der Expression von mesenchymalen Markern nach akuter Behandlung mit Ald.....                                                                         | 82        |
| 4.7.2 Untersuchung der Expression von mesenchymalen Markern nach chronischer Behandlung mit AngII.....                                                                  | 85        |
| 4.7.3 Untersuchung der Expression von epithelialen Markern nach chronischer Behandlung mit AngII .....                                                                  | 88        |
| <b>5. Diskussion .....</b>                                                                                                                                              | <b>91</b> |
| <b>5.1 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration induziert Hypertonie und verschlechtert die generelle Nierenfunktion.....</b>                                         | <b>92</b> |

|                                                                                                                                              |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.2. Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu einer verstärkten lokalen Inflammation sowie zu Nierenfibrose.....</b>           | <b>94</b>  |
| <b>5.3 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zur vermehrten Bildung von ROS in der Niere.....</b>                                 | <b>96</b>  |
| <b>5.4 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu DNA-Schäden in der Niere ..</b>                                                   | <b>99</b>  |
| <b>5.5 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu Mutationen in der Niere .....</b>                                                 | <b>101</b> |
| 5.5.1 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu einer Erhöhung der Mutationsfrequenz (MF) in der Niere.....                        | 101        |
| 5.5.2 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu einer Veränderung des Mutationsspektrums in der Niere.....                         | 102        |
| <b>5.6 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu einem Anstieg an apoptotischen und proliferierenden Zellen in der Niere .....</b> | <b>104</b> |
| <b>5.7 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration induziert eine Erhöhung der mesenchymalen Marker in der Niere.....</b>                     | <b>106</b> |
| 5.7.2 Eine erhöhte AngII-Konzentration führt zur Aktivierung einer EMT in Nierenzellen: Vergleich chronische und akute Behandlung .....      | 109        |
| 5.7.3 Mögliche Signalkaskaden einer AngII-induzierten epithelial-mesenchymalen Transition.....                                               | 110        |
| 5.7.4 Beweis für die Existenz einer epithelial-mesenchymalen Transition.....                                                                 | 110        |
| <b>6. Zusammenfassung .....</b>                                                                                                              | <b>112</b> |
| <b>7. Summary .....</b>                                                                                                                      | <b>115</b> |
| <b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                                                                        | <b>117</b> |
| <b>9. Literaturverzeichnis.....</b>                                                                                                          | <b>121</b> |
| <b>10. Anhang .....</b>                                                                                                                      | <b>129</b> |
| 10.1 Ergänzende Abbildungen .....                                                                                                            | 129        |
| 10.2 Publikationsliste von Erst-Autorenschaften.....                                                                                         | 130        |
| <b>11. Danksagung .....</b>                                                                                                                  | <b>132</b> |
| <b>12. Eidesstattliche Erklärung.....</b>                                                                                                    | <b>134</b> |

## **1. Einleitung**

### **1.1 Erhöhtes Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen in Hypertonie-Patienten**

Laut einem Bericht der WHO forderten kardiovaskuläre Erkrankungen im Jahr 2016 weltweit die meisten durch Krankheiten verursachten Todesopfer [1]. Allein Schlaganfälle und Herzinfarkte kosteten laut diesem Bericht 15,2 Millionen Menschen das Leben. Als die drei hauptsächlichen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gelten erhöhter Blutdruck, erhöhte Cholesterinwerte und das Rauchen [2], wobei erhöhter Blutdruck laut einer Statistik aus dem Jahr 2001 als Risikofaktor noch vor dem Rauchen die meisten Tode verursachte [3]. Als erhöhter Blutdruck wird ein systolischer Druck von mindestens 140 mmHg sowie ein diastolischer Druck ab 90 mmHg definiert [4]. In 90 % der Fälle kann keine Ursache für den erhöhten Blutdruck, auch Hypertonie bezeichnet, gefunden werden. Diese Art der Hypertonie wird als essentielle oder primäre Hypertonie bezeichnet und unterscheidet sich von der sekundären Hypertonie, der andere Krankheiten wie beispielsweise eine Verengung der Nierenarterien zugrunde liegen. Die Regulation des Blutdrucks unterliegt einem komplexen System und wird u.a. durch Faktoren wie dem genetischen Hintergrund der Patienten, Ernährung und weiteren Umweltfaktoren bedingt [5].

Trotz pharmakologischer Fortschritte in der antihypertensiven Therapie soll die Zahl von Hypertonie-Patienten laut Schätzungen bis zum Jahr 2025 auf 1,56 Milliarden Menschen weltweit ansteigen, was einem prozentualen Anteil von 29 % der Gesamtbevölkerung entspricht [6].

### **1.2 Erhöhtes Risiko für Nierenkrebs in Hypertonie-Patienten**

Hypertonie-Patienten haben neben dem erhöhten Risiko, einen Schlaganfall oder Herzinfarkt zu erleiden auch ein erhöhtes Nierenkrebsrisiko [7-9]. Laut epidemiologischen Studien ist das Risiko, an Nierenkrebs zu erkranken, je nach Grad der Hypertonie bis zu verdoppelt und steigt an, je länger der Patient an Bluthochdruck leidet und je schlechter der Patient medikamentös eingestellt ist. Nierenkrebs wurde im Jahr 2015 weltweit als die neunt-häufigste Krebserkrankung bei Männern und die vierzehnt-häufigste Krebserkrankung bei Frauen aufgeführt [10].

## Einleitung

Die Gründe für das erhöhte Nierenkrebsrisiko von Hypertonie-Patienten sind noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass verschiedene Signalwege in Nierenzellen von Hypertonie-Patienten und in der Entwicklung von Krebs gleichermaßen verändert sind. So sind sowohl in der Pathogenese des Bluthochdrucks, als auch in der Entwicklung von Krebs erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Inositol-4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) sowie von zytosolischem Kalzium ( $Ca^{2+}$ ) zu finden.  $IP_3$ - und der zytosolische  $Ca^{2+}$ -Spiegel werden u.a. von Hormonen wie dem Peptidhormon Angiotensin II (AngII) oder Vasopressin reguliert, welche auch an der Kontrolle des Blutdrucks beteiligt sind und denen zusätzlich mitogene Effekte zugesprochen werden [11]. Außerdem sind in Nierenzellen von Hypertonie-Patienten häufig Signalwege der Apoptoseregulation verändert, was zu einem übermäßigen und unkontrollierten Zellwachstum führen kann. Eine reduzierte Apoptose-Rate begünstigt die Entwicklung von Krebs und kann daher auch in den meisten Krebszellen nachgewiesen werden [12]. Ein weiteres Beispiel für gemeinsame Signalwege sowohl bei Hypertonie, als auch der Kanzerogenese sind Veränderungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) [13]. Die Hauptaufgabe des RAAS ist die hormonelle Regulation des Blutdrucks, wodurch es auch Einfluss auf die Funktion der Niere hat [14]. Eine Überaktivität des RAAS begünstigt nachweislich die Entstehung einer Hypertonie, stimuliert die Angiogenese, welche den transienten Vorgang dieser Blutgefäß-Neubildung beschreibt, sowie die Invasion, das Zellüberlebens und die Proliferation [15]. Ein weiterer Punkt, der für die Gemeinsamkeit von Signalwegen in Hypertonie und Krebs spricht ist, dass verschiedene Genvarianten, sog. single nucleotide polymorphisms (SNPs) innerhalb des RAAS mit einem erhöhten Risiko, an Nierenkrebs zu erkranken, assoziiert sind [15].

Zusätzliche Risikofaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum und Übergewicht stehen ebenfalls mit Hypertonie und Krebs in Verbindung [4].

### **1.3 Die Regulation des Blutdrucks über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Das RAAS ist eine hormonelle Kaskade, welche den Blutdruck sowie den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers reguliert und dadurch auch an der Pathophysiologie der Hypertonie beteiligt ist. Ein erhöhtes bzw. überaktiviertes RAAS

## Einleitung

ist ein wichtiger Faktor für viele pathologische Vorgänge, da eine erhöhte Konzentration von AngII zum einen direkt zur Vasokonstriktion führt und damit den Blutdruck erhöht, zum anderen aber auch die Sekretion des Hormons Aldosteron (Ald) induziert und bei der Regulation vieler weiterer Signalwege beteiligt ist [16]. Durch diese Vorgänge ist das RAAS in entscheidender Weise an Endorganschäden von Herz, Gefäßen und Niere beteiligt [17].

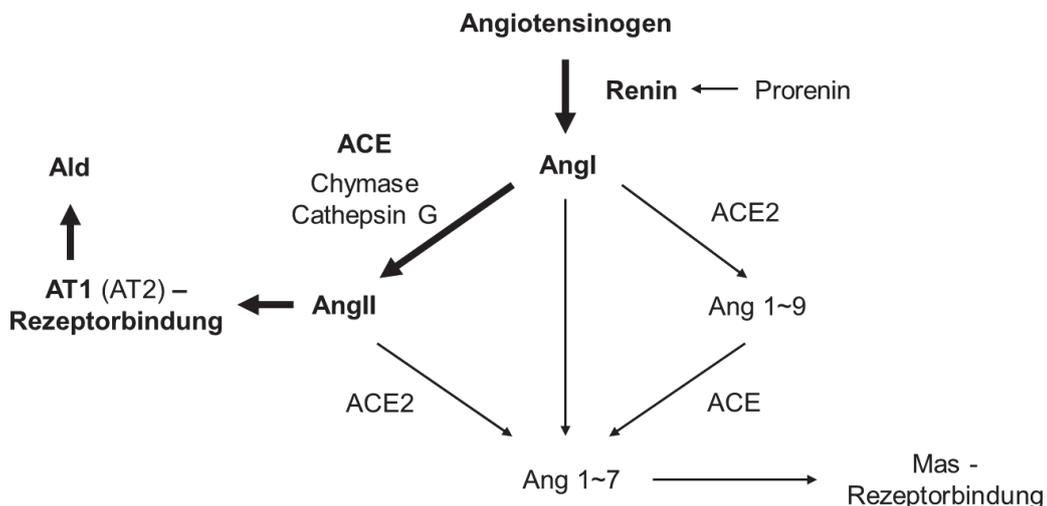
Der erste Schritt im RAAS ist die Synthese des Enzyms Renin in den juxtaglomerulären Zellen [18]. Renin wird zunächst als Prorenin gebildet und durch sequentielle Abspaltung von zwei Peptiden als aktives Renin in den Nieren- und systemischen Kreislauf abgegeben [19]. Die Ausschüttung von Renin ist von mehreren Faktoren abhängig: von einem Abfall des Blutdrucks, einer Verringerung des Blutvolumens, einer Veränderung des Elektrolythaushalts, einer sympathischen Stimulation von  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptoren oder einem negativen Feedback von direkten AngII-Effekten auf die juxtaglomerulären Zellen. Im systemischen Kreislauf spaltet Renin nun das aus der Leber entlassene Angiotensinogen zu dem biologisch inaktiven Dekapeptid Angiotensin I (AngI) (Abbildung 1). Da Angiotensinogen konstitutiv aus der Leber freigesetzt wird und somit der Plasma Angiotensinogen-Spiegel weitestgehend stabil ist, wird die Kontrolle der Renin-Freisetzung als Schlüsselkomponente der RAAS-Aktivität bezeichnet. Das mithilfe von Renin gebildete inaktive AngI wird dann durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE = Angiotensin Converting Enzyme, Angiotensin konvertierendes Enzym) durch Abspaltung des C-terminalen Dipeptids in das aktive Octapeptid AngII umgewandelt (Abbildung 1). ACE ist eine membrangebundene Exopeptidase, welche vorwiegend von Endothelzellen der Lunge synthetisiert wird, aber auch auf der Plasmamembran vieler anderer Zelltypen wie beispielsweise Neuroepithelzellen, Gefäßendothelzellen und auf dem Bürstensaum von proximalen Tubuluszellen der Niere zu finden ist [19]. AngII wird als Haupt-Effektorhormon des RAAS bezeichnet, da es systemisch den Blutdruck und den Elektrolythaushalt reguliert. Die Effekte von AngII werden über die Bindung an seinen Rezeptor vermittelt. Hier sind v.a. zwei Rezeptoren von Bedeutung, der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1R) und der Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2R), wobei die meisten physiologischen und pathophysiologischen Effekte vom AT1R vermittelt werden. Der AT1R ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und wird in Blutgefäßen, im Herz, in Niere und Nebenniere und in der Lunge exprimiert [20]. Zu den AT1R-vermittelten Effekten gehören eine Vasokonstriktion der Gefäße und somit

## Einleitung

eine Erhöhung des Blutdrucks, eine erhöhte Kontraktilität des Herzens, Gefäß- und Herzhypertrophie und eine Stimulierung des sympathischen Nervensystems. Auf renaler Ebene vermittelt der AT1R eine Inhibition der Renin-Freisetzung und eine Freisetzung von Ald aus der Nebenniere [21]. Der AT1R scheint auch weitere AngII-induzierte Effekte wie Zellwachstum und Proliferation sowie eine Immunantwort und oxidativen Stress zu vermitteln [22]. Der AT2R wirkt hingegen oftmals antagonistisch zu der durch den AT1R vermittelten Wirkung [23].

AngII kann auch unabhängig der eben beschriebenen RAAS Kaskade synthetisiert werden. So können andere lokale Enzyme wie die Chymase oder das Cathepsin G AngI auf einem ACE-unabhängigen Weg zu AngII umwandeln [19] (Abbildung 1).

Neben der klassischen Kaskade existieren auch alternative RAAS Signalwege. In einer dieser Kaskaden wird AngI oder AngII durch ein Enzym namens ACE2 über Abspaltung des C-terminalen Endes in das Peptid Ang1~9 umgewandelt. ACE2 kann allerdings auch die Umwandlung von AngII zu Ang 1~7 synthetisieren. Ang 1~7 übt seine Wirkung über die Bindung an einen anderen Rezeptor aus, den Mas-Rezeptor. Ang 1~7 scheint durch die Bindung an den Mas-Rezeptor, verglichen mit den AngII-induzierten Effekten über den AT1R, eine gegenteilige Wirkung auszuüben und eine vasodilatatorische Wirkung zu haben [16] (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.** Renin wird aus seiner Vorstufe Prorenin zu dem aktiven Enzym Renin umgewandelt. Angiotensinogen wird von Renin zu dem Vorläuferprotein AngI gespalten, welches dann von ACE, oder alternativ von den Enzymen Chymase oder Cathepsin G, zu AngII gespalten wird. Über Bindung an den AT1, oder alternativ an den AT2 werden die Effekte vermittelt und es kommt zur Sekretion von Ald. Alternativ zu dieser Kaskade kann das Enzym ACE2 auch AngI bzw. AngII zu Ang 1~7 oder Ang 1~9 umwandeln. Ang 1~7 bindet dann an den Mas-Rezeptor. In fett dargestellt sind Schritte des klassischen Renin-Angiotensin-Systems. ACE bzw. ACE2 = Angiotensin Converting Enzyme (2), AngI = Angiotensin I,

## Einleitung

AngII = Angiotensin II, Ald = Aldosteron, AT1 bzw. AT2 = Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 bzw. 2. Abbildung modifiziert nach Yim *et al.* [16].

Bei der Medikation von Hypertonie sind ACE-Inhibitoren und AT1R -Blocker die Mittel erster Wahl, was die Wichtigkeit des RAAS in der Regulation des Blutdrucks unterstreicht [24].

### 1.3.1 Anatomie und Physiologie der Niere

Die primäre Funktion der Niere ist die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts sowie die Aufrechterhaltung des Säure-Basenhaushalts. Dies geschieht über das Filtern gelöster Stoffe aus dem Blut. Hierbei werden metabolische Abfallprodukte aus dem Blut in den Urin ausgeschieden und Nährstoffe im Körper zurückgehalten. Die Niere wird in zwei funktionelle Elemente eingeteilt: in den äußeren Teil der Niere, die Nierenrinde oder Cortex, und den inneren Teil, das Nierenmark oder Medulla. Die funktionelle Einheit, die für die Produktion des Urins verantwortlich ist, ist das Nephron. Es besteht aus der Bowmanschen Kapsel, welche das Glomerulum umschließt, dem proximalen Tubulus, der Henle Schleife sowie dem distalen Tubulus [25].

Der proximale Tubulus ist für die Untersuchungen zum erhöhten Nierenkrebsrisiko in Hypertonie-Patienten von besonderer Bedeutung, da sich renale Karzinome überwiegend aus diesem Teil der Niere entwickeln [26].

Die Reinigung des Blutes beginnt im Nephron mit der glomerulären Filtration, wobei große Proteine und Eiweiße zurückgehalten werden, während kleine Stoffe durch die Poren der glomerulären Gefäße gefiltert werden. Dies bildet den Primärharn. Im nächsten Schritt folgt die tubuläre Reabsorption, bei der selektiv ausgefilterte Substanzen wieder rückresorbiert werden. Zu diesen Substanzen zählen Elektrolyte wie Natrium und Kalzium, nicht-Elektrolyte wie Glucose und Aminosäuren (AS) sowie Wasser. Das verbleibende Filtrat passiert die Henle Schleife, den distalen Tubulus und das Sammelrohr, wobei es weiter konzentriert wird. So gelangt nur etwa ein Prozent des Primärharns als Sekundärharn in die Harnblase und wird als Urin ausgeschieden [25].

Dem Hormon Ald wird eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts zugeschrieben, da es die Rückresorption von Natrium und Wasser in den distalen Tubulus und das Sammelrohr verstärkt und gleichzeitig eine

Kaliumexkretion induziert [27]. Durch eine erhöhte Sekretion von Ald kommt es somit zu einer Erhöhung des Flüssigkeitsvolumens, was wiederum zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt [19]. Die Sekretion von Ald aus der Zona Glomerulosa, der äußersten Schicht der Nebenniere, wird, wie bereits erwähnt (siehe 1.3), durch Bindung von AngII an den AT1R vermittelt. Dies erklärt die Bezeichnung von AngII als Haupt-Effektor des RAAS, da es zum einen zu einer direkten Vasokonstriktion führt und zum anderen über die Kontrolle der Sekretion von Ald den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt reguliert.

### **1.3.2 Das renale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Neben dem systemischen zirkulierenden RAAS, welches an der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts sowie des Blutdrucks und der Pathophysiologie von Herzkreislauf- und Nierenerkrankungen beteiligt ist, gibt es in vielen Organen auch lokale RAAS. So konnte deren Existenz im Gehirn, Herzen, peripheren Blutgefäßen, Nebenniere und Niere in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [17, 28-30]. Da renalen Mechanismen bei der Entwicklung der primären Hypertonie eine essentielle Rolle zugesprochen werden [5] und auch das Krebsrisiko in der Niere für Hypertonie-Patienten erhöht ist, ist v.a. das renale RAAS in diesem Kontext von besonderer Bedeutung für den Organismus.

Voraussetzung für ein lokales RAAS ist, dass alle seine Komponenten in dem Gewebe selbst exprimiert werden [16]. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von Renin, Angiotensinogen und ACE Nierenzelltyp-spezifisch über die Niere verteilt zu finden ist [31, 32]. Auch die Expression der AngII-Rezeptoren ist in vielen verschiedenen Nierenzelltypen, wie den glomerulären Mesangiumzellen oder den proximalen Tubuluszellen, zu finden [33]. AngII scheint in der Niere selbst die mRNA-Expression von Angiotensinogen sowie dessen Biosynthese stimulieren zu können [34, 35]. Das lässt die Vermutung zu, dass AngII in der Niere zu einer Verstärkung der RAAS-Aktivität führen kann. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass im Interstitium der Niere bis zu 1000-fach höhere AngII-Konzentrationen vorhanden sind, als im Plasma [36]. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte intrarenale AngII-Konzentrationen zu einer Erhöhung des systemischen Blutdrucks führen, ohne dabei die Plasma-Konzentration von AngII zu erhöhen [37].

Diese Unabhängigkeit des intrarenalen RAAS könnte eine Erklärung dafür sein, dass Hypertonie-Patienten auch durch Medikation oft nicht auf Ziel-Niveau eingestellt

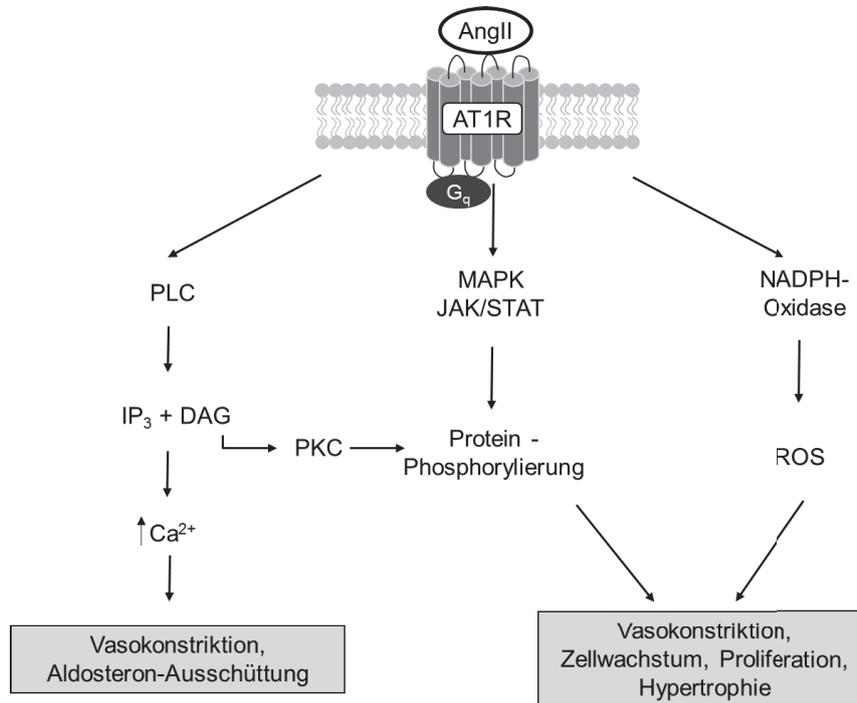
werden können [5]. Eine Therapie mit AT1R-Blockern oder ACE-Inhibitoren könnte auf systemischer Ebene für eine Normalisierung des RAAS sorgen, während das renale RAAS durch eine unabhängige Selbst-Stimulation weiterhin überaktiviert bleibt.

### 1.3.3 AngII-induzierte Signalwege

Die klassischen physiologischen Effekte von AngII werden über Bindung an den membrangebundenen AT1-Rezeptor vermittelt. Dieser Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Signale typischerweise über heterotrimere G-Proteine ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ ) ins Zellinnere weiterleiten. Der AT1-Rezeptor ist  $G_q$ -gekoppelt und an Prozessen beteiligt, die verschiedenste biologische Effekte induzieren [38]. So kommt es durch die Rezeptor-Bindung von AngII zum einen zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche die Synthese von  $IP_3$  und Diacylglycerol (DAG) induziert, woraufhin es zu einem intrazellulären Anstieg von  $Ca^{2+}$  kommt. Der Anstieg resultiert in einer Kontraktion der Gefäßmuskulatur und einer erhöhten Sekretion von Ald aus den Nebennieren [39] (Abbildung 2). Es kann zu einer Phosphorylierung von Proteinen durch DAG kommen, die wiederum eine wichtige Funktion bei der Vasokonstriktion und dem Zellwachstum innehaben [38, 40]. Zusätzlich kann es durch die Bindung von AngII an den AT1R auch zu einer Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinase) kommen, die mit Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung assoziiert sind (Abbildung 2). Zu ähnlichen Effekten kommt es auch durch die AngII-induzierte Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs (JAK = Januskinase, STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription) [38]. Durch die Aktivierung dieses Signalwegs kommt es zur vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) [41] und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) und VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) [42], was am Ende neben Zellwachstum und Proliferation auch zur Bildung von Atherosklerose führen kann [38] (Abbildung 2). AngII kann zudem durch Bindung an den AT1R zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase) führen, wodurch es zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = Reactive Oxygen Species) kommt [43]. Zu diesen AngII-Effekten, die zumindest in weiten Teilen durch ROS vermittelt sind, gehört beispielsweise eine Hypertrophie von glatten Muskelzellen [44], eine vermehrte

## Einleitung

Produktion von Interleukin-6 (IL-6) [45] oder eine Induktion von Atherosklerose [46] (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung AT1 Rezeptor-vermittelter Signalwege.** Die Bindung von AngII an den membrangebundenen G-Protein-gekoppelten ( $G_q$ ) AT1-Rezeptor resultiert in einer Aktivierung der PLC, welche die Synthese von  $IP_3$  und DAG induziert. Dadurch kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$ , was zu einer Vasokonstriktion der Gefäße und einer Aldosteron-Ausschüttung führt. Außerdem kann DAG die PKC aktivieren, was zu einer Protein-Phosphorylierung führen kann. Weiterhin vermittelt die AngII-Rezeptorbindung eine Aktivierung von MAPK- sowie JAK/STAT-Signalwegen. Dies führt ebenfalls zu einer Phosphorylierung von Proteinen, welche an der Regulation des Zellwachstums und -proliferation beteiligt sind, was zu einer Hypertrophie führen kann. Außerdem kommt es zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit zu einer vermehrten Produktion von ROS. Dies kann auch zu Veränderungen in Zellwachstum und -proliferation sowie zur Hypertrophie und Vasokonstriktion führen. AngII = Angiotensin II, AT1R = AngiotensinII-Rezeptor Typ 1, PLC = Proteinlipase C,  $IP_3$  = Inositol-1,4,5-triphosphat, DAG = Diacylglycerol, PKC = Proteinkinase C, MAPK = Mitogen-Aktivierte Protein Kinase (Mitogen-Activated Protein Kinase), JAK = Januskinase, STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription,  $Ca^{2+}$  = Kalzium, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species), NADPH-Oxidase = Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase. Modifiziert nach Kaschina *et al.* [38].

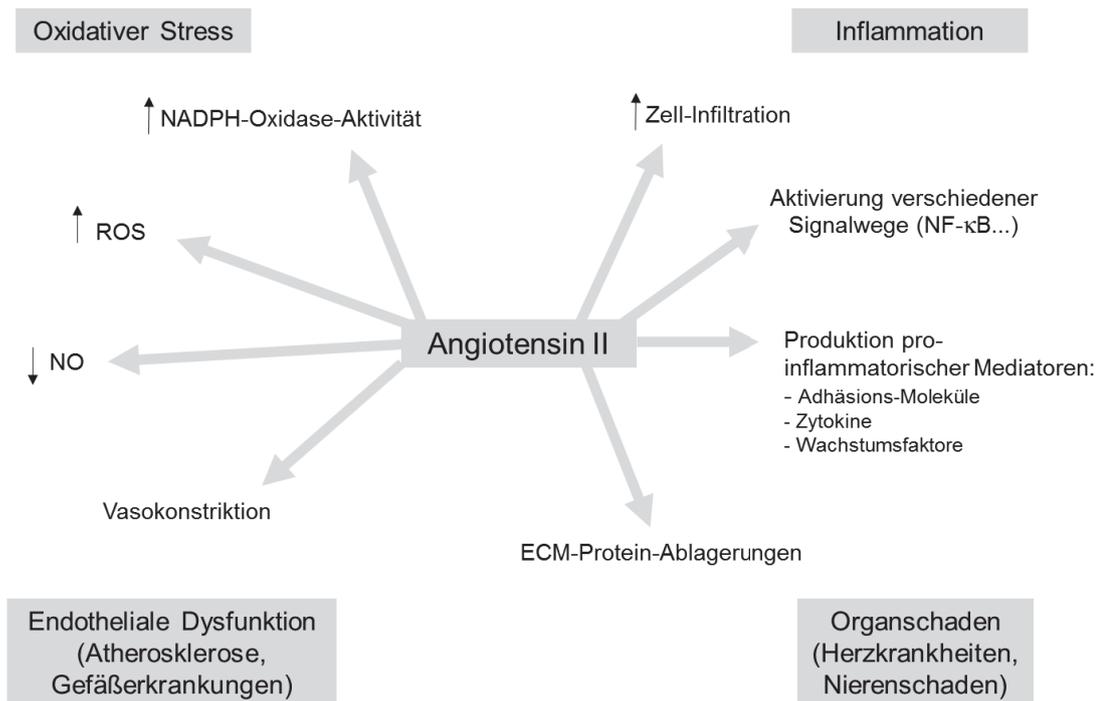
### 1.4 Pathophysiologie erhöhter AngII-Spiegel

Zusätzlich zu einer Erhöhung des Blutdrucks tragen erhöhte AngII-Spiegel außerdem zur Entwicklung von kardiovaskulären und renalen Erkrankungen bei [47]. Zu den kardiovaskulären Erkrankungen zählen v.a. die linksventrikuläre Hypertrophie [48] sowie die Bildung von Atherosklerose [38], was mit einem erhöhten Risiko einhergeht, Herzrhythmusstörungen zu entwickeln und einen Schlaganfall oder Herzinfarkt zu bekommen [14]. In der Pathophysiologie der linksventrikulären Hypertrophie spielen

## Einleitung

u.a. eine AngII-induzierte Akkumulation von Extrazellulärmatrix-Proteinen (ECM = Extracellular Matrix) wie Kollagen und Fibronectin im Interstitium und um die Blutgefäße im Herz eine wichtige Rolle [47]. In der Entstehung von Atherosklerose kommt es zu einer vaskulären Inflammation sowie zu einer erhöhten Produktion von ROS und einer Veränderung der Endothelfunktion [14] (Abbildung 3). Eine Aktivierung des RAAS mit der Bindung von AngII an den AT1R konnte sowohl in experimentellen, als auch in klinischen Studien als Haupt-Initiator dieser Prozesse identifiziert werden [49]. Weiterhin ist eine Überaktivierung des RAAS mit Diabetes Typ 2 assoziiert [14]. Es konnte gezeigt werden, dass eine RAAS-Blockade zu einer Reduzierung der Insulin-Resistenz führt, was ein Hauptmerkmal bei Diabetes Typ 2 ist [50]. Sowohl aus experimentellen, als auch aus klinischen Studien ist bekannt, dass erhöhte AngII-Spiegel eine zentrale Rolle in der Progression von chronischen Nierenerkrankungen (CKD = Chronic Kidney Disease) spielen [51, 52] (Abbildung 3). Laut einer Studie aus dem Jahr 2003 leiden 80 % der Patienten mit CKD auch an Hypertonie [53]. Wie bei der Behandlung von Hypertonie ist auch bei CKD eine Therapie mit ACE-Inhibitoren und AT1R-Blockern Mittel erster Wahl und kann nachgewiesenermaßen die Nierenfunktion wieder verbessern [54-56]. Bei der Entwicklung von CKD spielt die interstitielle tubuläre Fibrose eine zentrale Rolle. Auch bei der Progression der Fibrose wird der Aktivierung des RAAS eine Schlüsselrolle zuteil [57]. So konnte gezeigt werden, dass AngII zu einer Aktivierung von TGF- $\beta$  führt, was wiederum die Produktion von ECM-Proteinen anregt [58] (Abbildung 3). Die Beteiligung von TGF- $\beta$  bei der Entstehung von Nierenfibrose wird im folgenden Kapitel genauer ausgeführt. Die hier aufgeführten Beispiele zeigen, dass eine übersteigerte Aktivität des RAAS und die damit verbundenen erhöhten Konzentrationen von AngII an vielen zellulären Prozessen während der Entstehung und Entwicklung von kardiovaskulären und renalen Veränderungen beteiligt sind (Abbildung 3).

## Einleitung



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von Angiotensin II-induzierten Effekten, die mit der Entstehung von Atherosklerose und Organschäden assoziiert sind.** Erhöhte Ang II-Spiegel führen zu einer erhöhten Aktivität der NADPH-Oxidase und damit verbunden einer erhöhten Produktion von ROS und einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO sowie zu Vasokonstriktion. Außerdem kommt es zur Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren und zur Ablagerung von ECM-Proteinen. Erhöhte AngII-Level fördern eine erhöhte Zell-Infiltration von Entzündungszellen und aktivieren verschiedenste Signalwege wie z.B. die Aktivierung von NF-κB. All diese Prozesse können zu erhöhten Level an oxidativem Stress und Inflammation führen sowie eine endotheliale Dysfunktion und Organschäden induzieren. ROS = reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species), NADPH-Oxidase = Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase, NO = Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide), ECM = Extrazellulärmatrix (Extracellular Matrix), NF-κB = Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells. Modifiziert nach Schmieder *et al.* [14].

### 1.4.1 AngII-induzierter oxidativer Stress

In der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen und in der Entwicklung von Nierenschäden im Zusammenhang mit Hypertonie spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle [59].

#### 1.4.1.1 Die Entstehung von oxidativem Stress

Als oxidativen Stress bezeichnet man ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien. Oxidantien wie ROS sind chemisch aktive Moleküle, die Sauerstoff enthalten. Man unterscheidet hierbei zwischen ROS mit freien Radikalen, die ein ungepaartes Elektron besitzen, und zwischen ROS ohne ungepaarte Elektronen, die aber aufgrund ihrer oxidierenden Effekte zu oxidativem

## Einleitung

Stress führen. Zu den freien Radikalen gehören das Superoxid-Anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) und das Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\bullet}$ ). Zu den ROS ohne freie Radikale zählen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das Peroxinitrit-Anion ( $ONOO^-$ ) oder auch hypochlorige Säure ( $HOCl$ ) [60]. Zu den für den Körper am häufigsten mit toxischen Effekten verbundenen ROS gehören  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$  sowie  $O_2^{\bullet-}$  und  $OH^{\bullet}$  [61].  $O_2^{\bullet-}$  ist allerdings sehr instabil und besitzt daher nur eine sehr kurze Lebensdauer. Jedoch wird es von dem Enzym Superoxiddismutase (SOD) sehr schnell zu  $H_2O_2$  umgewandelt [62].  $H_2O_2$  ist sehr viel stabiler und kann aufgrund seiner Membranpermeabilität relativ gut innerhalb und zwischen den Zellen diffundieren. Außerdem entsteht aus  $O_2^{\bullet-}$  durch Reaktion mit NO  $ONOO^-$ . Diese Reaktion ist zum einen gefährlich für den Organismus, da das toxische  $ONOO^-$  entsteht, zum anderen sinkt dadurch aber auch die Bioverfügbarkeit des vasodilatierenden und anti-inflammatorischen NO [60, 63].

ROS entstehen im Körper entweder aufgrund exogener oder endogener Quellen. Zu den exogen, meist umweltvermittelten ROS, zählen ionisierende Strahlungen wie Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung und UV-Licht, aber auch oxidierende Chemikalien. Endogen entstehen ROS bei verschiedensten zellulären Signalwegen und metabolischen oder inflammatorischen Prozessen [64].

Auch bei enzymatischen Reaktionen können ROS entstehen, wie zum Beispiel durch die Xanthinoxidase, die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), Enzyme der mitochondrialen Atmungskette sowie durch die NADPH-Oxidase [65-67]. Die NADPH-Oxidase scheint allerdings als wichtigste Quelle für die Bildung von ROS innerhalb des kardiovaskulären und renalen Systems zu fungieren [59].

Die Enzym-Familie der NADPH-Oxidasen umfasst 7 Mitglieder: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5 und Duox1 und Duox2 [68]. Allen Mitgliedern gemein ist der grundsätzliche Aufbau aus sowohl membranständigen, als auch zytosolischen Komponenten. Sie besitzen eine katalytische Untereinheit und mehrere regulatorische Untereinheiten. Eine Überaktivierung der verschiedenen NADPH-Oxidasen führt zu einer exzessiven ROS-Produktion und kann dadurch verschiedenste zelluläre Signalwege induzieren [59]. So regulieren ROS unterschiedliche physiologische Prozesse, indem sie beispielsweise die Expression verschiedener Abwehrgene induzieren, Transkriptionsfaktoren stimulieren oder Ionen-Transporter aktivieren [69, 70].  $O_2^{\bullet-}$  und  $H_2O_2$  sind außerdem beteiligt an Prozessen der vaskulären Inflammation und Kontraktion. Hier beeinflussen sie beispielsweise die Aktivierung von MAPK und

## Einleitung

Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), können zu einer Erhöhung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  führen sowie die Expression von Protoonkogenen und pro-inflammatorischen Genen induzieren [59]. Durch eine Aktivierung der Immunabwehr spielen ROS zudem eine wichtige Rolle bei der Abwehr von invasiven Pathogenen [61].

Ein Organismus ist also ständig sowohl exogenen, als auch endogenen Quellen von ROS ausgesetzt. Um Schädigungen durch ROS zu vermeiden, besitzt die Zelle sowohl enzymatische, als auch nicht-enzymatische Abwehrmechanismen. Zu den enzymatischen Abwehrmechanismen gehören u.a. die Enzyme Katalase, Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase und Thioredoxin [71], zu den nicht-enzymatischen Mechanismen beispielsweise Glutathion oder Bilirubin [59]. Ist die Zelle nicht in der Lage, diese vermehrten ROS abzuwehren, kann es zu Schäden an Lipiden, Proteinen sowie an der DNA kommen [72]. Diese von ROS induzierten Schäden dienen oft als Biomarker für oxidativen Stress, da sie leichter messbar als die sich schnell abreagierenden ROS selbst sind. So werden Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS = Thiobarbituric Acid Reactive Substances) und Isoprostane (15-Isoprostan  $\text{F}_{2t}$ ) als gängige Biomarker für ROS-induzierte Lipidschäden bestimmt, da sie als Nebenprodukte bei der Lipidperoxidation entstehen und als ausgeschiedene Lipide im Urin gemessen werden können [71]. Zu den ROS-induzierten Schäden an Proteinen zählt die Entstehung von 3-Nitrotyrosin, bei der das reaktive  $\text{O}_2^{\bullet}$  mit NO zu  $\text{ONOO}^-$  reagiert, welches dann die AS Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin nitriert [73]. Auf die durch ROS-induzierten DNA-Schäden wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

### *1.4.1.2 Oxidativer Stress und DNA-Schäden*

Durch eine vermehrte Produktion von ROS können Schäden an der DNA entstehen. Hier kann es zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommen, aber auch zu oxidierten Purinen/Pyrimidinen und abasischen Stellen [64].

Als wohl bekannteste, durch ROS verursachte Veränderung der DNA zählt die Basenmodifikation 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-OxodG). Hier kommt es zur Oxidation der Purin-Base Guanin zu 8-OxodG [74]. Die Gefährlichkeit dieser Basenmodifikation liegt darin, dass das modifizierte Guanin nicht mehr mit Cytosin, sondern nun mit Adenin paart, wodurch bei fehlender Reparatur eine Punktmutation entsteht [75]. Das erklärt die Bedeutung von 8-OxodG in der Pathogenese von Krebs,

in Alterungsprozessen sowie bei der Entwicklung degenerativer Erkrankungen [76]. 8-OxodG wird deshalb als Biomarker für oxidativen Stress an der DNA und damit verbundenen Schäden im menschlichen Körper bei der Entstehung von Krebs eingesetzt [77].

Zur Untersuchung von DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen dient der Nachweis des phosphorylierten Proteins H2AX. Als Konsequenz eines Doppelstrangbruchs wird H2AX im Zuge der DNA-Schadensantwort an der Aminosäure Serin 139 phosphoryliert, worauf es als  $\gamma$ H2AX bezeichnet wird. Diese Phosphorylierung trägt dazu bei, dass der DNA-Schaden von Reparaturenzymen und Proteinen für den Chromatinumbau erkannt wird, wodurch die Reparatur initiiert wird. DNA-Doppelstrangbrüche stellen für die Zelle eine große Herausforderung dar, da sie zur genomischen Instabilität und im weiteren Verlauf zu Krebs führen können, sollten sie nicht erfolgreich repariert werden können [78].

### *1.4.1.3 Oxidativer Stress im Zusammenhang mit Hypertonie*

Ein Zusammenhang zwischen Hypertonie und ROS ist seit den 1960er Jahren bekannt [79]. Die Bedeutung von oxidativem Stress in der Pathogenese der Hypertonie wurde bereits in einigen experimentellen Tiermodellen gezeigt [80-82], ist aber auch aus humanen Studien bekannt [83-86]. Im Tiermodell konnte sogar eine kausale Beteiligung von ROS bei der Entstehung von Hypertonie gezeigt werden. Hier konnte beispielsweise durch die Inhibition von ROS-generierenden Enzymen oder durch zusätzliche Verabreichung von Antioxidantien ein AngII-induzierter Bluthochdruck wieder verringert werden [87, 88]. Jedoch konnte bis heute keine Kausalität des Zusammenhangs von ROS und der Entwicklung von Hypertonie in humanen Studien bewiesen werden. In der Literatur wird dieses Thema kontrovers diskutiert. So gibt es Studien, die eine Besserung des Bluthochdrucks durch den Einsatz von Antioxidantien im Patienten zeigen [89, 90], widersprüchlich dazu konnte diese Kausalität in anderen humanen Studien allerdings nicht gezeigt werden [91]. Unbestritten ist jedoch eine Erhöhung von ROS in Hypertonie-Patienten. Dies spiegelt sich beispielsweise in einer direkten Erhöhung von  $H_2O_2$  im Plasma von Hypertonie-Patienten, in verschiedenen Biomarkern für oxidativen Stress oder in einer Verringerung der Aktivität von antioxidativen Abwehrmechanismen wieder [59].

Ob Hypertonie-Patienten tatsächlich auch mehr DNA-Schäden aufweisen, ist derzeit noch Gegenstand von Untersuchungen, allerdings konnten in verschiedenen

tierexperimentellen Untersuchungen vermehrt DNA-Schäden durch eine AngII- bzw. Ald-induzierte Hypertonie gezeigt werden [92-94]. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass die Erhöhung von ROS bzw. der damit verbundene DNA-Schaden scheinbar unabhängig von der Erhöhung des Drucks auftritt und ausschlaggebend für die Schäden die erhöhte Aktivität des RAAS ist. Dies konnte beispielsweise in einem Ald-induzierten Ratten-Hypertonie-Modell gezeigt werden, bei dem die Tiere zusätzlich mit dem Ald-Rezeptor-Antagonisten Spironolacton behandelt wurden. Dieser Antagonist wurde allerdings nur in subtherapeutischer Dosis eingesetzt, die nicht den Ald-induzierten Bluthochdruck zu senken vermochte, jedoch die erhöhten Level an ROS und DNA-Schäden verringern konnte [94].

In humanen Studien über unterschiedliche Krebsarten konnte die Anwesenheit von oxidativem Stress und damit verbundenen DNA-Schäden in bösartigen Tumoren gezeigt werden. Diese Studien unterstützen die Hypothese, dass in vielen Krebsarten ein ständiger Kampf zwischen erhöhten Leveln an oxidativem Stress und somit verbundenen DNA-Schäden und zellulären Abwehrmechanismen herrscht [95-97].

### **1.4.2 AngII-induzierte Inflammation und Nierenfibrose**

Hypertonie und die damit einhergehende erhöhte Konzentration von AngII in der Niere ist bekanntermaßen assoziiert mit einer vermehrten Infiltration von inflammatorischen Zellen in die Niere und einer daraus resultierend erhöhten Freisetzung von Zytokinen [47, 98, 99]. Dabei bleibt jedoch weiterhin die Frage bestehen, ob Inflammation als Grund oder Konsequenz der Hypertonie betrachtet werden kann [100].

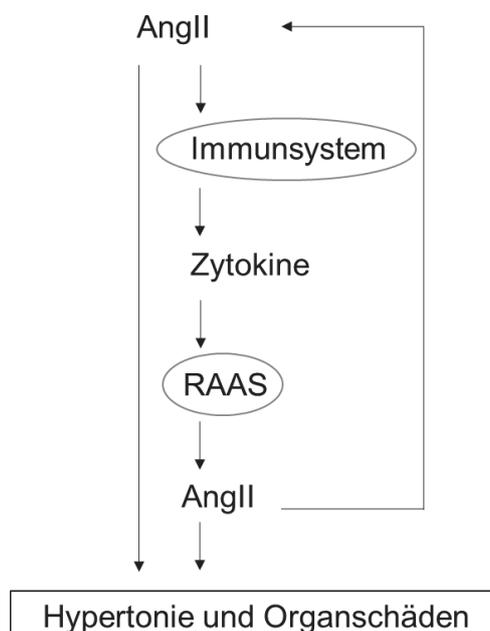
Eine vermehrte Infiltration von beispielsweise Monozyten und T-Zellen in die Niere und Blutgefäße unter Hypertonie-Bedingungen wurde des Öfteren gezeigt [98, 101]. Der genaue Mechanismus, wie T-Zellen unter diesen Bedingungen aktiviert werden, ist allerdings noch nicht aufgeklärt [99]. Die inflammatorischen Zellen sorgen u.a. für eine erhöhte Produktion von ROS. Dies wiederum führt zu einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO, was schließlich in einer Erhöhung des Blutdrucks endet. Außerdem kommt es durch die inflammatorischen Zellen zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen, sowohl lokal in der Niere, als auch auf systemischer Ebene. [100]. So konnte beispielsweise *in vivo* gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) und IL-17 (Interleukin-17) unter Hypertonie-Bedingungen

## Einleitung

in der Niere kommt [98]. Die Bedeutung infiltrierender Zellen mit der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  unterstrichen beispielsweise Venegas-Pont *et al.* in einer Studie, in der sie Mäuse mit einem TNF- $\alpha$ -Antagonisten behandelten und somit den Blutdruck der Tiere senken konnten [102]. In einer Studie mit RAG1 (Recombination Activating Gene 1) -defizienten Mäusen konnte außerdem die Wichtigkeit von inflammatorischen Zellen in der Entstehung der Hypertonie unterstrichen werden. Diese Mäuse besitzen keine reifen B- und T-Lymphozyten. Eine AngII-induzierte Hypertonie war in diesen Tieren reduziert und wurde durch die Gabe von T-Zellen wieder hergestellt [103].

Auch in Hypertoniepatienten finden sich erhöhte Level der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 und TNF- $\alpha$  [104].

Es wird außerdem über eine direkte Interaktion zwischen dem Immunsystem und dem RAAS diskutiert. Bekannt ist, dass erhöhte Konzentrationen von AngII zu einer Erhöhung des intrarenalen Angiotensinogen, der Vorstufe von Angiotensin I, führen (Abbildung 4). In kultivierten humanen proximalen Nierentubuluszellen konnte bereits gezeigt werden, dass diese Stimulation von Angiotensinogen durch AngII nur in Abhängigkeit von IL-6 vonstattengeht [105]. Es ist folglich von einer synergistischen Wirkung zwischen dem RAAS und dem Immunsystem die Rede, bei der eine intrarenale Erhöhung von AngII durch eine Aktivierung der Immunabwehr auch das intrarenale RAAS aktiviert und somit die Produktion von AngII weiter verstärkt (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Mögliche Kaskade zur Aktivierung des systemischen und lokalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems während der Entwicklung von Hypertonie durch ein stimuliertes Immunsystem.** Eine erhöhte AngII-Konzentration stimuliert direkt die Entwicklung von Hypertonie und damit verbundene Organschäden. Weiterhin führt eine erhöhte AngII-Konzentration zu einer Immun-vermittelten Hypertonie, indem es die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen aus Immunzellen verstärkt, welche wiederum die Expression von RAAS-Komponenten wie AngII hochregulieren. AngII = Angiotensin II, RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Abbildung modifiziert nach Satou *et al.* [23].

Weiterhin führt eine vermehrte Infiltration von inflammatorischen Zellen und die damit verbundene Freisetzung von Zytokinen zur Bildung von interstitieller Fibrose [106]. Interstitielle Fibrose ist bei fast allen Nierenkrankheiten vorhanden [106] und wird als einer der Hauptgründe für die Entwicklung von chronischen Nierenerkrankungen genannt [57].

Als Fibrose wird eine Imbalance zwischen der Matrix-Synthese und der Matrix-Degeneration zugunsten einer gesteigerten Matrix-Synthese und/oder einer verringerten Matrix-Degeneration bezeichnet [107]. Sie dient normalerweise dem Prozess der Wundheilung und kann als pathologische Antwort auf eine starke oder chronische Entzündung bezeichnet werden [106]. Fibrose kann zum einen verletztes Gewebe ersetzen, kann jedoch zum anderen im fortgeschrittenen Stadium zu einer Einschränkung der Organfunktion führen. AngII gilt als wichtiger Regulator in der Initiation und der Aufrechterhaltung von Nierenfibrose [47]. So zeigen Studien mit ACE-Inhibitoren oder AT1R-Antagonisten, dass ein überaktiviertes RAAS als Hauptfaktor für die Entwicklung von Nierenfibrose mitverantwortlich ist [108-111]. Als wohl wichtigster Mechanismus bei der Entstehung der AngII-induzierten Fibrose kann die Aktivierung von TGF- $\beta$  durch AngII genannt werden. So konnte eine Aktivierung von TGF- $\beta$  in der Niere, ausgelöst durch AngII, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* bereits gezeigt werden [112-114]. Durch diese Aktivierung kommt es zum einen zur Stimulation von ECM-Proteinen wie Fibronectin, Kollagen Typ I, II, III, IV und V [115], zum anderen verringert eine Aktivierung von TGF- $\beta$  die Aktivität von Metalloproteasen, sodass eine Degradation der Matrix verringert wird [106]. Als Resultat dieser Vorgänge kommt es zu einer Ablagerung der extrazellulären Matrix im Interstitium [116].

### 1.5 “Hallmarks of Cancer” – die Kennzeichen einer Krebszelle

Im Jahr 2000 veröffentlichten die Krebsforscher Douglas Hanahan and Robert Weinberg den wegweisenden Artikel „The Hallmarks of Cancer“, welcher bis zum Jahr 2011 laut „Science Dailiy“ der meist zitierte Artikel der Fachzeitschrift „Cell“ war. In

## Einleitung

dieser Publikation fassten die Autoren alle bis dahin bekannten Erkenntnisse der Krebsforschung zusammen und legten sog. Hallmarks of Cancer fest, also Kennzeichen, die (fast) jede Krebszelle zeigt und die sie von gesunden Zellen unterscheidet [117].

Laut Hanahan und Weinberg sind es sechs Merkmale, die bei der Unterscheidung einer gesunden von einer Krebszelle von Bedeutung sind: (1) Selbst-Versorgung mit Wachstumssignalen, (2) Insensitivität für wachstumshemmende Signale, (3) erhöhtes Unterbinden von Apoptose, (4) unlimitiertes Replikations-Potential, (5) dauerhafte Angiogenese sowie (6) Invasivität und Metastasierung in andere Gewebe.

So benötigt eine normale, gesunde Zelle verschiedene Signale wie Hormone und andere Moleküle, um von einem ruhenden in einen proliferierenden Zustand überzugehen, während eine Krebszelle unabhängig von diesen Signalen proliferieren kann bzw. in der Lage ist, diese Signale selbst zu generieren. Dieser Vorgang der Selbst-Versorgung mit Wachstumshormonen nennt sich autokrine Stimulation. Zusätzlich zu dieser Selbst-Versorgung sind Krebszellen in der Lage, nicht mehr auf wachstumshemmende Signale reagieren zu müssen. Verantwortlich für diese Insensitivität sind oft Veränderungen in der Expression von Tumorsuppressor-Genen, welche die Replikation kontrollieren. Diese Tumorsuppressor-Proteine sind unter gesunden Bedingungen u.a. dafür verantwortlich, dass sich beispielsweise eine Zelle mit DNA-Schäden nicht mehr teilt, wodurch der Schaden nicht weitergegeben werden kann. In Krebszellen ist diese negative Regulation meist gestört, wodurch es zur übermäßigen Proliferation auch kompromittierter Zellen kommt. Doch nicht nur aufgrund einer erhöhten Proliferation kommt es zur Expansion von Krebszellen. Auch ist (fast) allen Krebszellen die Fähigkeit gemein, sich dem programmierten Zelltod, der Apoptose, zu entziehen. So sind Krebszellen oft nicht in der Lage, Zellen mit einem Schaden zu erkennen oder Signale zu einer Aktivierung der Apoptose weiterzuleiten. Dieser Gewinn einer erhöhten Apoptose-Resistenz ist häufig gekennzeichnet durch Mutationen im Tumorsuppressor-Gen *TP53*. Dies führt zu einer funktionellen Inaktivierung des p53-Proteins und ist in ca. 50 % aller humanen Krebs-Arten zu finden. p53 agiert als Schlüsselkomponente in der DNA-Schadenserkenung [118]. Weiterhin zeigen Krebszellen gehäuft ein unlimitiertes Replikationspotential. Während fast alle gesunden Zellen eine intrinsische, Zell-autonome Programmierung besitzen, welche die Anzahl an möglichen Replikationen begrenzt, sind Krebszellen oft immortalisiert. Dadurch geht die Krebszelle nicht wie eine gesunde Zelle ab einer

## Einleitung

bestimmten Lebensdauer in Seneszenz über oder stirbt, sondern kann sich, ähnlich einer Stammzelle, unendlich oft teilen. Wichtig für alle Zellen, ob gesunde oder Krebszellen, ist eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Dies geschieht über Blutgefäße. Während der Organogenese bilden sich neue Blutgefäße, die die Organe mit den benötigten Nährstoffen versorgen können. Dieser transiente Vorgang ist im Körper streng reguliert. Krebszellen zeigen vielfach eine veränderte Genexpression von Angiogenese-initiiierenden Signalen. So herrscht in Krebszellen eine dauerhafte Aktivierung der Angiogenese, was dem Tumor eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr garantiert [119]. Als ein letztes wichtiges Merkmal von Krebszellen nennen Hanahan und Weinberg außerdem die Fähigkeit von Krebszellen, zu invasieren und zu metastasieren. Die Metastasierung, die das Entfernen der Zellen vom primären Tumor und die darauffolgende Neubildung eines sekundären Tumors an anderer Stelle im Körper beschreibt, ist verantwortlich für ca. 90 % aller Krebstode [120]. Bei diesem Prozess ist oft die Expression von Proteinen verändert, welche für die Adhäsion von Zellen an ihre benachbarte Umgebung verantwortlich sind, sog. Adhäsions-Proteine. Das von dieser Gruppe am häufigsten in Krebszellen veränderte Protein ist E-Cadherin. E-Cadherin ist ein Zell-Zell-Interaktionsmolekül, welches ubiquitär in Epithelzellen exprimiert wird und dessen Funktionsverlust in der Mehrheit der epithelialen Krebszellen zu finden ist. Dieser Funktionsverlust von E-Cadherin erleichtert es den Krebszellen, sich von ihrer benachbarten Umgebung zu lösen, in andere Gewebe zu invasieren und zu metastasieren.

Im Jahr 2011 veröffentlichten die gleichen Autoren mit dem Titel „Hallmarks of Cancer – The Next Generation“ eine aktuelle Version ihrer Publikation, in der sie aufgrund neuer experimenteller und technischer Möglichkeiten detailliertere Einblicke in die molekularen Hintergründe der Kennzeichen von Krebszellen geben [121]. So zeichnete sich in neueren Untersuchungen zu den veränderten Signalwegen in der Invasivität und Metastasierung von Krebszellen die Bedeutung einer phänotypischen Veränderung von Epithelzellen, der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), ab. Diese veränderten Epithelzellen gewinnen durch den Prozess der EMT die Fähigkeit, sich der Apoptose zu entziehen, zu invasieren und sich zu verbreiten [122]. Auf die detaillierteren Abläufe der EMT wird in Kapitel 1.6 eingegangen.

Als ein grundlegendes Merkmal aller Krebszellen wird sowohl von Hanahan und Weinberg, als auch von anderen Wissenschaftlern deren genomische Instabilität genannt [121, 123].

### **1.5.1 Zugrundeliegende Eigenschaften der Krebs-Entwicklung: Genomische Instabilität und Mutationen**

Vielen Wissenschaftlern zufolge zeigen Krebszellen verstärkt eine intrinsische genomische Instabilität, aufgrund derer es zu vermehrten Anomalien der DNA kommt [123]. Bei diesen Anomalien kann es sich um eine Chromosomen-Aneuploidie [124], d.h. um eine Vermehrung bzw. Verringerung ganzer Chromosomen, um eine Mikrosatelliteninstabilität [125], d.h. um eine Längenveränderung von kurzen, repetitiven DNA-Sequenzen, oder um eine erhöhte Anzahl an Punktmutationen [126] handeln. Oft betreffen diese Mutationen sog. Caretaker des Genoms, also Proteine, die beteiligt sind an der Erhaltung der DNA-Integrität [127]. Das resultiert entweder darin, dass ein DNA-Schaden nicht mehr erkannt wird oder die Reparatur nicht aktiviert werden kann, oder aber darin, dass mutagene Moleküle nicht inaktiviert werden können, bevor sie den Schaden verursachen [121]. Mutationen in diesen Caretakern des Genoms sind dafür verantwortlich, dass es im weiteren Verlauf leichter zu Mutationen kommen kann, was zu einer Akkumulation von Mutationen in Krebszellen führt [123]. Eine verringerte Reparatur-Fähigkeit kann dazu führen, dass sich DNA-Schäden wie DNA-Doppelstrangbrüche oder Basenmodifikationen wie in 1.4.1.2 beschrieben bei nachfolgender Zellteilung als Mutation an Tochterzellen weitergegeben werden kann.

#### *1.5.1.1 Zugrundeliegende Eigenschaften der Krebs-Entwicklung: verschiedene Arten von Mutationen*

Mutationen können in verschiedene Kategorien unterteilt werden, je nachdem, aus welchem Blickwinkel man sie unterscheidet. So kann beispielsweise grundsätzlich unterschieden werden zwischen vererbbarer (Keimbahnmutation) und nicht-vererbbarer (somatischer) Mutation. Außerdem kann man Mutationen nach ihrer Auswirkung auf die DNA-Struktur unterscheiden. Zu Mutationen, die eine großflächige Veränderung der DNA-Struktur verursachen, gehören beispielsweise Gen-Amplifikationen (Aneinanderreihung mehrerer Kopien eines Chromosomenabschnitts), Chromosomen-Translokationen (Austausch von Chromosomenabschnitten zwischen nicht-homologen Chromosomen) oder auch Deletionen ganzer Chromosomenabschnitte. Zu Mutationen, die keine großflächige Veränderung der DNA-Struktur zur Folge haben, gehören z.B. Insertionen und

## Einleitung

Deletionen einzelner (weniger) Nukleotide. Diese Insertionen oder Deletionen können zu einer Verschiebung des Leserasters führen, in Folge dessen es zu einer Veränderung der Aminosäureabfolge oder zu einem frühzeitigen Stopp-Codon kommt. In beiden Fällen kann meist kein funktionsfähiges Protein hergestellt werden [128]. Zusätzlich zählen zu dieser Kategorie auch Basen-Substitutionen, die häufig durch Chemikalien oder Störungen der DNA-Replikation verursacht werden [129]. Diese Substitutionen werden nochmals unterteilt in Transitionen und Transversionen. Bei einer Transition wird eine Purinbase (Adenin, Guanin) durch eine andere Purinbase ersetzt, während bei einer Transversion eine Purinbase durch eine Pyrimidinbase (Cytosin, Thymin), oder umgekehrt, ersetzt wird. Von besonderer Bedeutung in der Pathogenese von Krebs ist hier die G → T Transversion (G = Guanin, T = Thymin), da diese ein Resultat der nicht-reparierten Basenmodifikation 8-OxodG ist [130] und somit als Biomarker für oxidativen Stress an der DNA und bei der Entstehung von Krebs eingesetzt wird. Je nachdem, ob die Substitution zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führt oder nicht, kommt es zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die Funktion des Proteins [128].

### **1.5.2 Proliferation und Apoptose – Gemeinsamkeiten von Krebs und Hypertonie**

Wie bereits erläutert, bezeichnet Kanzerogenese eine unkontrollierte Vermehrung von Zellen, die darüber hinaus die Fähigkeit besitzen, zu invasieren und zu metastasieren. Proliferation und Apoptose sind die entscheidenden physiologischen Prozesse, die die Zellzahl regulieren, daher ist eine Deregulation in einer dieser Signalwege mit vielen Krankheiten wie beispielsweise CKD assoziiert [131]. Auch in der Niere führt ein Ungleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation zu Schäden, die sich beispielsweise histologisch in einer zellulären Hypertrophie [132] oder einer Atrophie [133] zeigen. Eine erhöhte Proliferation von Nierenzellen ist außerdem ein Kennzeichen für progressive Nierenschädigung [134].

So ist es nicht verwunderlich, dass auch eine übersteigerte Aktivität des RAAS zu einer vermehrten Proliferation in der Niere führt [94, 135]. Diese Stimulation geschieht wahrscheinlich über einen direkten Einfluss von AngII auf die renale Proliferation [136] oder über eine AngII-induzierte Erhöhung der Superoxid-Produktion [137]. Wie in 1.3.3 aufgeführt, kommt es durch die Bindung von AngII an den AT1R zu einer Aktivierung

des JAK/STAT-Signalwegs, welcher zur Wachstumskontrolle von Zellen beiträgt und bei Deregulierung zur vermehrten Proliferation führen kann [38].

Auch das Apoptoseverhalten von Zellen ist unter Hypertonie-Bedingungen verändert [12]. Hier scheint die Datenlage allerdings nicht vollkommen klar. Zwar gibt es viele Studien, die eine Erhöhung der Apoptose in der Niere durch eine Überaktivierung des RAAS zeigen [92, 135], allerdings ist auch von einer Verringerung von apoptotischen Zellen in der Niere die Rede [138]. Für eine Verringerung der Apoptose spricht auch eine bereits gezeigte Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch AngII bzw. Ald [14, 94]. NF- $\kappa$ B reguliert als Transkriptionsfaktor u.a. Gene, welche das Überleben der Zelle begünstigen [139]. Dieses Überleben hat für die einzelne Zelle eine schützende Bedeutung, kann sich aber auf den gesamten Organismus negativ auswirken, da sich geschädigte Zellen so der Apoptose entziehen können. Eine konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B kann folglich zu einer unkontrollierten Proliferation und anti-apoptischen Regulierung führen, was letztendlich auch die Entstehung von Krebs begünstigen kann [140, 141].

### **1.6 Epithelial-Mesenchymale Transition**

Als epithelial-mesenchymale Transition wird ein biologischer Prozess bezeichnet, im Laufe dessen sich polarisierte Epithelzellen biochemischen Veränderungen unterziehen, durch die sie einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Durch diese Dedifferenzierung zurück zu einem mesenchymalen Phänotyp erlangen sie eine verstärkte Proliferations- und Migrations-Fähigkeit, eine erhöhte Apoptose-Resistenz und produzieren vermehrt ECM-Komponenten, die wiederum zur Bildung von fibrotischem Gewebe führen können [142, 143]. Beschrieben wurde dieser Prozess erstmals 1995 von der Wissenschaftlerin Elizabeth Hay, die ihn noch als eine epithelial-mesenchymale Transformation bezeichnete [144]. Im Laufe der Jahre wurde der Begriff Transformation durch Transition ersetzt, um die Reversibilität des Vorgangs zu unterstreichen. Das Konzept der Plastizität von differenzierten Zellen wurde daraufhin oft durch Beobachtungen anderer Wissenschaftler gestützt, die beschrieben, dass Epithelzellen sich zwischen einem epithelialen und einem mesenchymalen Stadium hin und her bewegen können. Diese Plastizität zwischen verschiedenen Phänotypen kann mit dem Prozess der EMT und dessen Umkehrprozess, der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) erklärt werden [145].

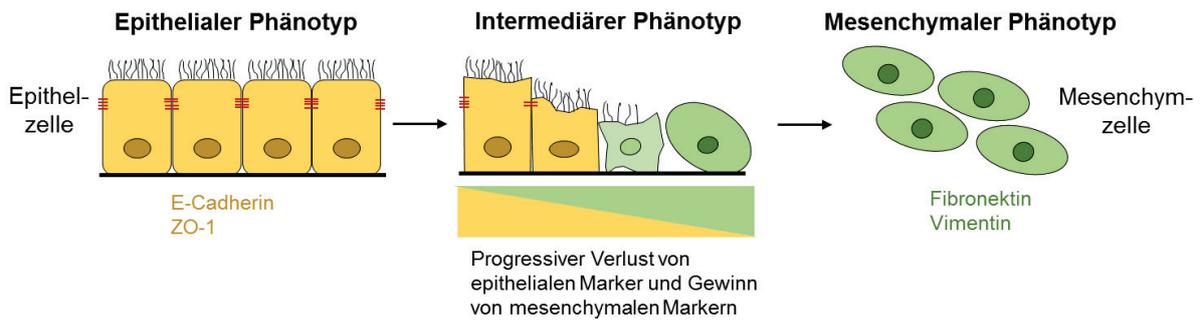
## Einleitung

Die EMT wird je nach funktioneller Konsequenz in drei verschiedene Typen eingeteilt. Die EMT Typ 1 ist ein wichtiger Vorgang während der Embryonal- und Organentwicklung. Hier wird die EMT aktiviert, um aus bereits differenzierten Epithelzellen wieder ein sog. primäres Mesenchym zu generieren, welches sich darauffolgend durch eine MET wieder zu einem sekundären Epithel formen kann [142]. Die EMT Typ 2 ist ein wichtiger Prozess in der Wundheilung und Regeneration von Geweben und ist mit Organ-Fibrose assoziiert. Die EMT wird hier zunächst als Teil des Wundheilungsprozesses aktiviert, kann aber zu einer andauernden inflammatorischen Reaktion beitragen und so zu Organ-Schäden führen. Durch die Aktivierung der EMT können sich aus Epithelzellen Fibroblasten entwickeln, die zur Wundheilung beitragen. Im besten Fall werden aus diesen Fibroblasten durch den Vorgang der MET wieder gesunde Epithelzellen, im schlechteren Fall kommt es zu einer übersteigerten Fibrose-Bildung [142]. Die EMT Typ 3 ist beteiligt an der Entwicklung von epithelialen Zellkarzinomen. Hier wird durch die Aktivierung der EMT ein mesenchymaler Phänotyp angenommen, der es den Zellen erleichtert, sich aus dem primären Tumor zu lösen und in andere Gewebe zu migrieren. Durch den Vorgang der MET können die Zellen dort daraufhin metastasieren, d.h. einen sekundären Tumor bilden [146].

Da die EMT Typ 1 nicht mit Krankheiten assoziiert ist, wird in dieser Arbeit nicht im Detail auf diesen Vorgang eingegangen.

Durch den progressiven Verlust des epithelialen Phänotyps mit dem gleichzeitigen Gewinn eines mesenchymalen Phänotyps verändert sich die Expression zelltypspezifischer Markerproteine (Abbildung 5). So zeigen Epithelzellen, in denen eine EMT aktiviert wurde, im Verlauf des Prozesses einen Rückgang typischer epithelialer Markerproteine. Zu diesen Markern zählen beispielsweise das Adhäsionsprotein E-Cadherin oder das Tight Junction Protein ZO-1 (Zonula Occludens). Zusätzlich zu diesem Verlust exprimieren diese Zellen nun vermehrt Mesenchym- bzw. Fibroblast-spezifische Markerproteine wie die zytoskelettalen Proteine Vimentin,  $\alpha$ -SMA (alpha Smooth Muscle Actin), FSP-1 (Fibroblast-Specific Proteine 1) oder das ECM-Protein Fibronectin [146]. Eine gleichzeitige Expression sowohl Epithel-, als auch Mesenchym-spezifischer Markerproteine ist typisch für Zellen, die sich in einem intermediären Stadium befinden, in dem der Prozess der EMT noch weiter voranschreiten kann, bis ein vollständiger mesenchymaler Phänotyp erreicht wird, oder aber, in dem durch eine Aktivierung der MET wieder ein epithelialer Phänotyp angenommen werden kann [142] (Abbildung 5).

## Einleitung



**Abbildung 5: Schematischer Ablauf der epithelial-mesenchymalen Transition.** Durch eine Aktivierung der EMT kommt es zu einer funktionellen Transition von polarisierten Epithelzellen zu mobilen Mesenchymzellen. Typische epitheliale Markerproteine wie E-Cadherin und ZO-1 sind in gelb, typische mesenchymale Markerproteine wie Fibronectin und Vimentin in grün aufgeführt. Eine gleichzeitige Expression der zelltypspezifischen Proteine zeigt ein intermediäres Stadium, in dem die Zellen den Prozess der EMT (noch) nicht vollständig durchlaufen haben. ZO-1 = Zona Occludens 1. Abbildung modifiziert nach Kalluri *et al.* [142].

Außerdem kommt es bei einer Aktivierung der EMT zu einer Veränderung von Transkriptionsfaktoren. Die Familie der Snail-Transkriptionsfaktoren scheint bei der Regulation der EMT eine wichtige Rolle einzunehmen und sowohl an der EMT Typ 2, als auch der Typ 3 beteiligt zu sein [147]. Snail-Transkriptionsfaktoren unterdrücken zum einen die Expression von E-Cadherin, zum anderen führen sie zu einer verstärkten Expression von Mesenchym- bzw. Fibroblast-spezifischen Markern wie Fibronectin und verstärken die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs). MMPs sorgen für einen Abbau von Typ IV-Kollagen, was zu einer Degradation der Basalmembran führt [142], was im darauffolgenden das Ablösen von Nachbarzellen erleichtert. Eine Aktivierung von Snail schützt Zellen außerdem vor Apoptose, indem es die Expression von verschiedenen Caspasen, welche im Signalweg der Apoptose nötig sind, unterdrückt [146]. Durch die Aktivierung von Snail verliert die Zelle somit ihre epithelialen Eigenschaften, gewinnt Mesenchym- bzw. Fibroblast-spezifische Eigenschaften und erlangt eine erhöhte Apoptose-Resistenz.

### 1.6.1 EMT Typ 2 bei der Regeneration und Fibrose

Bei der Bildung von Fibrose werden von inflammatorischen Zellen und Fibroblasten inflammatorische Signale sowie ECM-Proteine und Zytokine freigesetzt. Diese Fibroblasten können zum einen in die Niere infiltrieren oder aber durch EMT aus Nieren-Epithelzellen entstehen. So konnte in einer Studie aus dem Jahr 2002 durch Klonierungsexperimente in Mäusen mit Nierenfibrose gezeigt werden, dass 36 % der

Fibroblasten in der Niere aus einer Transition von Tubuluszellen entstanden sind [148]. Eine Aktivierung der EMT Typ 2 wird in den meisten Fällen stimuliert durch inflammatorische Zellen, die Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , EGF (Epidermal Growth Factor) oder FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2) freisetzen. Die Beteiligung der EMT bei der Bildung von fibrotischem Gewebe konnte *in vivo* bereits in verschiedenen Organen wie der Niere, der Leber, der Lunge und dem Darm gezeigt werden [142]. In diesem Zusammenhang ist es nicht verwunderlich, dass auch das RAAS als Mediator einer EMT in der Niere genannt wird [149]. So zeigen Studien, dass erhöhte Konzentrationen von AngII sowohl *in vitro* [150-152] als auch *in vivo* [153] zu einer Aktivierung der EMT führen. Eine Beteiligung von AngII bei der Aktivierung der EMT konnte auch mittels Losartan, einem AT1R -Blocker gezeigt werden. Hier konnte *in vitro* mit der zusätzlichen Behandlung von Losartan die AngII-induzierte erhöhte Expression der mesenchymalen Marker Fibronectin und Vimentin wieder verringert sowie die verringerte Expression des epithelialen Markers E-Cadherin wieder gesteigert werden [154].

Auch in humanen Nierenbiopsie-Proben von Patienten mit progressiver Nieren-Fibrose und anderen Nierenkrankheiten, wie sie auch in Hypertonie-Patienten zu finden sind, konnte eine Aktivierung der EMT nachgewiesen werden [155, 156]. Rastaldi *et al.* wiesen diese Aktivierung in einer Studie mit 133 Nierenbiopsie-Proben aus Patienten mit unterschiedlichen Nierenkrankheiten nach. So konnten sie zeigen, dass die Anzahl an tubulären Epithelzellen, die sich in diesen Patienten einer EMT unterziehen, mit dem Grad des interstitiellen Schadens korreliert [156].

### **1.6.2 EMT Typ 3 bei der Tumorprogression**

Die EMT Typ 3 spielt eine große Rolle in der Tumorprogression, v.a. indem sie die Invasivität und Metastasierung der Zellen erleichtert und die Zellen sich verstärkt der Apoptose entziehen können [122]. Das komplette Spektrum an Signalen, die EMT Typ 3 aktivieren, ist nicht geklärt, jedoch scheinen ähnliche Signale wie bei Typ 2 von Bedeutung zu sein: eine verstärkte Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , EGF oder HGF (Hepatocyte Growth Factor), wodurch es dann zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Snail kommen kann [142]. Vor allem der Verlust von E-Cadherin scheint bei Typ 3 von großer Bedeutung zu sein, da sich Zellen durch den Verlust von Zell-Zell-Adhäsionen von ihren Nachbarzellen lösen und in andere

Gewebe migrieren können. E-Cadherin agiert folglich als Suppressor von Invasivität und Metastasierung [157].

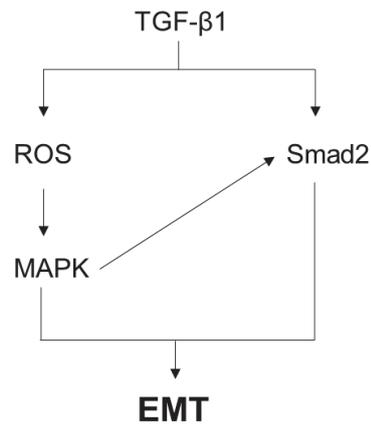
Auch hier wird von einer Plastizität der Krebszellen ausgegangen. Es wird vermutet, dass die Zellen durch eine Aktivierung der EMT leichter vom primären Tumor in den Organismus migrieren können. Durch das Fehlen der EMT-stimulierenden Signale in neuer Umgebung könnte es daraufhin zu einer MET kommen, wodurch die Tumorzellen wieder epitheliale Eigenschaften annehmen und erneut Zell-Zell-Adhäsionen ausbilden kann. Dadurch wird ein sekundärer Tumor in einem anderen Gewebe gebildet [121].

### 1.6.3 Mögliche Aktivierungskaskade der EMT

Die genauen Signalwege, über die die EMT erfolgt, bleiben weiterhin aufzuklären. Es wird aber vermutet, dass alle drei Typen der EMT, so unterschiedlich das daraus resultierende Ergebnis für die Zelle auch sein mag, zunächst gleiche Mechanismen teilen [146]. Warum aber eine Zelle, bei der als Teil des Wundheilungsprozesses eine EMT aktiviert wurde, nun invasiert und metastasiert, bleibt weiterhin zu untersuchen [142].

Allerdings scheinen sich zwei Schlüsselfaktoren bei der Aktivierung sowohl der Typ 2, als auch der EMT Typ 3 abzuzeichnen: zum einen eine Aktivierung über TGF- $\beta$  und zum anderen eine Aktivierung über ROS (Abbildung 6). Hierbei wird die Aktivierung über ROS allerdings meist als downstream Stimulus einer TGF- $\beta$ -induzierten Aktivierung vermutet [158, 159], es wird aber auch über mögliche TGF- $\beta$ -unabhängige Signalwege diskutiert [57]. Laut einer Studie von Rhyu *et al.* geschieht eine TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT über die Aktivierung von Smad2 und/oder ROS-vermittelt über eine Aktivierung der MAPK ERK1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2) und ist schematisch in Abbildung 6 aufgezeigt.

## Einleitung



**Abbildung 6: Schematischer Ablauf der TGF- $\beta$ 1-induzierten epithelial-mesenchymalen Transition in proximalen Nierentubulus-Zellen (NRK-52E).** TGF- $\beta$ 1 führen zu einem erhöhten Spiegel an ROS, welcher wiederum zu einer Aktivierung von MAPK führt. Weiterhin sorgt TGF- $\beta$ 1 direkt für eine Aktivierung von Smad2. Sowohl eine Aktivierung von MAPK, als auch die Aktivierung von Smad2 führt zu einer Aktivierung der EMT. TGF- $\beta$ 1 = Transforming Growth Factor  $\beta$ 1, ROS = reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species), MAPK = Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Mitogen-Activated Protein Kinase), EMT = epithelial-mesenchymale Transition. Abbildung modifiziert nach Rhyu *et al.* [158].

Eine Beteiligung von AngII bei der Induktion von EMT über einen TGF- $\beta$ -abhängigen Signalweg ist wahrscheinlich, da erhöhte AngII-Konzentrationen nachweislich zu einer Aktivierung von TGF- $\beta$  führen. So zeigten beispielsweise Ruprez *et al.* eine erhöhte Konzentration von TGF- $\beta$ 1 in der Niere, ausgelöst durch AngII [112], aber auch unter *in-vitro*-Bedingungen konnte diese erhöhte Konzentration von TGF- $\beta$ 1 gezeigt werden [113, 114].

### 2. Zielsetzung der Arbeit

Epidemiologische Studien beschreiben ein erhöhtes Risiko für Hypertonie-Patienten, Nierenkrebs zu entwickeln [160]. Eine mögliche Erklärung für dieses gesteigerte Krebsrisiko könnten Veränderungen des hormonellen Systems sein, welches den Blutdruck reguliert, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Angiotensin II (AngII) agiert als Haupteffektor des RAAS und vermittelt durch die Bindung an seinen Rezeptor eine Verengung der Blutgefäße, was zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt [161]. Zusätzlich zu den Blutdruck-regulierenden Mechanismen gehen erhöhte AngII-Konzentrationen einher mit einer erhöhten Produktion von ROS, welche zu einer Schädigung der DNA z.B. in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen können [43] [64]. Ist die Zelle nicht in der Lage, die Schäden zu reparieren, können diese bei einer nachfolgenden Zellteilung als Mutation weitergegeben werden [121]. Mutationen führen oft zu Veränderungen der Zellbiologie, was zur Folge haben kann, dass sich Zellen unkontrolliert vermehren und darüberhinaus in andere Gewebe invasieren und dort metastasieren. Ziel dieser Arbeit war es nun, zu analysieren, ob bzw. in wieweit eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration zu dem gesteigerten Nierenkrebsrisiko von Hypertonie-Patienten beiträgt. Um dies zu untersuchen, wurden transgene BigBlue®-Ratten für 20 Wochen mit einer erhöhten AngII-Konzentration behandelt, welche integriert in ihr Genom das *LacI*-Gen trugen, das als Zielgen für eine Mutations-Analyse dienen sollte. Im Laufe der 20 Wochen wurde mittels nicht-invasiver Blutdruckmessung der Blutdruck der Tiere ermittelt. Zusätzlich zu den Mutations-Analysen lag der Fokus der Untersuchungen auf weiteren, für eine Krebs-Initiierung wichtigen Endpunkten wie der Aktivierung einer epithelial-mesenchymalen Transition und der Proliferation von Nierenzellen.

Die Auswirkungen der erhöhten AngII-Konzentration wurden anhand folgender Parameter untersucht:

- allgemeine Nierenfunktionsparameter
- histopathologische Veränderungen in der Niere
- Inflammation und Nierenfibrose
- Produktion von systemischen und lokalen ROS und damit verbundenen DNA-Schäden in der Niere

## Zielsetzung

- Mutationsfrequenz in der Niere
- Apoptose- und Proliferationsrate in der Niere
- Aktivierung einer epithelial-mesenchymalen Transition in der Niere nach chronischer AngII- und akuter Ald-Behandlung

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Um im folgenden Versuch mit heterozygoten BigBlue®-Ratten arbeiten zu können, wurden weibliche Sprague Dawley Ratten (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) mit männlichen F344-TgN ( $\lambda$ /lacI) Ratten (im Besitz der BioReliance Corporation, Rockville, USA, geliefert von Taconic Biosciences, Germantown, USA, wo sie im Auftrag von BioReliance gehalten und gezüchtet werden) gekreuzt.

##### **3.1.2 Chemikalien und Reagenzien**

Falls nicht anders im Text angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland oder St. Louis, USA), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die im Tierversuch verwendeten Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen: Angiotensin II von Calbiochem (Darmstadt, Deutschland); osmotische Minipumpen von Alzet, Model 2004 (Alzet, Durect Corporation, Cupertino, USA); Ketamin von Zoetis (Parsippany, USA) und Xylazin (Rompun 2%) von Bayer Vital (Leverkusen, Deutschland).

##### **3.1.3 Blutdruckmessgerät**

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

##### **3.1.4 Oligonukleotide**

Oligonukleotide für die Amplifikation und die anschließende Sequenzierung des *LacI*-Gens wurden mithilfe des Programms des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>) entworfen und von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die verwendeten

Oligonukleotide wurden gegen das Organismusgenom geblastet und auf die Amplifikation von unspezifischen Fragmenten hin überprüft.

**Tabelle. 1: Übersicht über die zur Amplifikation und Sequenzierung des *lacI*-Gens verwendeten Primer.** for = forward (vorwärts gerichteter Primer), rev = reverse (rückwärts gerichteter Primer).

| Primer   | Sequenz (5'-)                 |
|----------|-------------------------------|
| lacI for | GCG TCG ATT TTT GTG ATG CT    |
| lacI rev | CGC TAT TAC GCC AGC TG        |
| lacI 1   | GTA TTA CCG CCA TGC ATA CTA G |
| lacI 2   | TCT GGT CGC ATT GGG TC        |
| lacI 3   | AGA ACT TAA TGG GCC CG        |
| lacI 4   | CTC TCT CAG GGC CAG GC        |
| lacI 5   | TCC GCT CAC AAT TCC ACA       |

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Chronischer Angiotensin II-Versuch

Die hier beschriebenen Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft zur Handhabung von Versuchstieren und dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Genehmigung 84-02.04.2014.A386).

In diesem Versuch wurde mit männlichen heterozygoten BigBlue®-Ratten (Kreuzung weiblicher Sprague Dawley mit männlichen F344-TgN) gearbeitet. Die Tiere wurden in einer Tierversuchsanlage unter konstanten Temperaturen ( $22 \pm 2$  °C) in einem 12 Stunden Licht/Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Im Alter von 5 bis 8 Wochen wurden die Tiere in zwei altersangepasste Gruppen eingeteilt, wobei jede Gruppe aus 10 Tieren bestand. Die Tiere wurden mit einer osmotischen Minipumpe (Alzet, Model 2004) versehen. Dazu wurden sie in Narkose gelegt (6 mg/kg Xylazin und 90 mg/kg Ketamin i.m.), wobei außerdem jedem Tier einmalig 5 mg/kg Carprofen (Zoetis Deutschland GmbH) subkutan gegen postoperative Schmerzen verabreicht wurde. Anschließend wurde am Nacken eine subkutane Tasche geformt, in welche die osmotischen Pumpen eingesetzt werden konnte. Der Einschnitt wurde danach zugenäht. Von den osmotischen Minipumpen erhielten die Tiere entweder 400 µg / kg x Tag AngII (Behandlungsgruppe) oder PBS als Lösungsmittelkontrolle (Kontrollgruppe). Nach einem Zeitraum von 34 Tagen

## Material und Methoden

musste die Pumpe aufgrund ihrer begrenzten Laufzeit durch eine neue osmotische Minipumpe (Alzet, Model 2006) ersetzt werden. Dies geschah unter einer Inhalationsanästhesie mittels Isofluran (3-5 % Isofluran über Begasungs-Anästhesie-Station MiniTAG, TEM SEGA, Pessac, Frankreich). Von diesen Minipumpen erhielten die Tiere wieder entweder  $400 \mu\text{g} / \text{kg} \times \text{Tag AngII}$  oder PBS als Lösungsmittelkontrolle für nun 48 Tage. Nach diesem Zeitraum wurden die Pumpen ein letztes Mal durch neue osmotische Minipumpen des gleichen Typs ersetzt. Wieder bekam die Behandlungsgruppe  $400 \mu\text{g} / \text{kg} \times \text{Tag AngII}$  und die Kontrollgruppe PBS über einen Zeitraum von 56 Tagen. Der Austausch der Pumpen erfolgte erneut mittels Inhalationsanästhesie durch Isofluran. Berücksichtigt man die Gewichtsveränderungen während dieser 20 Wochen, entsprach die Behandlungsdosis von AngII im Mittel  $410 \mu\text{g} / \text{kg} \times \text{Tag}$ . Wegen eines Gewichtsverlusts zu Beginn der Behandlung, vermutlich hervorgerufen durch die AngII-Behandlung, erhielten alle Tiere, inklusive der Kontrollgruppe, 150-180 ml einer 10 %igen Saccharose-Lösung über einen Zeitraum von zwei Wochen zu Beginn der Behandlung zusätzlich zu ihrem Trinkwasser.

Während des Versuchszeitraums wurde ein Mal pro Woche mittels nicht-invasiver Methode der Blutdruck der Tiere gemessen. Dies geschah über ein automatisiertes System (BP-2000 Series II, Blood Pressure Analysis System) an wachen Tieren, indem eine Druckmanschette um den Schwanz der Ratten gelegt wurde. Um die Tiere an die Blutdruckmessung zu gewöhnen, wurde bereits vier Wochen vor Implantation der Minipumpen mit den Messungen begonnen. Die Blutdruckmessung wurde immer vormittags durchgeführt. Das Versuchsschema ist in Abbildung 7 dargestellt.

15 Wochen nach Behandlungsstart wurden die Ratten für 22 Stunden in Stoffwechsellkäfige gesetzt und der Urin für zukünftige Untersuchungen gesammelt.

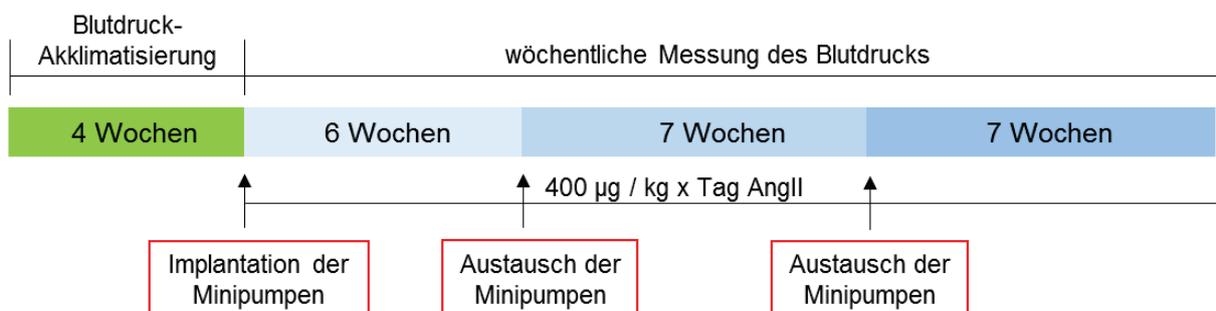


Abbildung 7: Übersicht über den zeitlichen Verlauf des chronischen Angiotensin II-Versuchs.

### 3.2.2 Akuter Aldosteron-Versuch

Vergleichend zu dem chronischen Angiotensin II-Versuch wurde auch mit Proben eines bereits von Frau Dr. Queisser durchgeführten Tierversuchs gearbeitet [94]. Dieser Tierversuch wurde mit männlichen Sprague Dawley Ratten durchgeführt, die für einen Zeitraum von 4 Wochen mit  $0,75 \mu\text{g} / \text{h} \times \text{kg}$  Ald mittels osmotischer Minipumpe infundiert wurden. Das Versuchsschema ist in Abbildung 8 dargestellt. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks, zu mehr oxidativem Stress und zu erhöhtem DNA-Schaden [94]. Für die vorliegende Arbeit wurde mit bereits vorhandenen, in Paraffin eingebetteten Nierenproben gearbeitet.

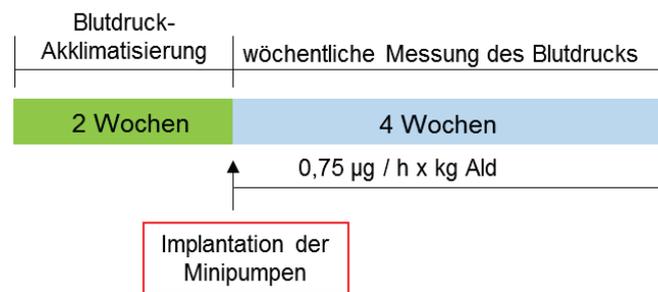


Abbildung 8: Übersicht über den zeitlichen Verlauf des akuten Aldosteron-Versuchs.

### 3.2.3 Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht darauf, mittels Antikörper die Lokalisation von Proteinen auf Gewebeschnitten nachzuweisen. Dazu verwendet man spezifische Primärantikörper, welche gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet sind. An diese Primärantikörper bindet dann ein Sekundärantikörper, der entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist oder biotinyliert ist. Der biotinylierte Sekundärantikörper ist mit einer Peroxidase gekoppelt, sodass es durch Zugabe eines Substrats zur Bildung eines farbigen Präzipitats kommt, wodurch nun das zu untersuchende Protein lokalisiert werden kann.

#### 3.2.3.1 Visualisierung mithilfe der ABC-DAB Reaktion

Bei der ABC-DAB-Reaktion erfolgten alle Schritte, soweit nicht anders beschrieben, bei RT. Zwischen den jeweiligen Schritten erfolgte das Waschen in PBS. Die zu untersuchenden  $3 \mu\text{m}$  dicken Paraffin-Schnitte wurden für eine Stunde bei  $60^\circ\text{C}$  getrocknet und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (3 x 3

## Material und Methoden

min Roti-Histol, 2 x 3 min 100 % EtOH, 2 x 3 min 96 % EtOH, 2 x 3 min 70 % EtOH). Durch die Fixierung des Gewebes kam es zu Quervernetzungen von Proteinen, wodurch sie durch einen Primärantikörper nicht mehr detektierbar sind. Um diese Quervernetzungen wieder aufzubrechen und die Epitope wieder zugänglich für den Antikörper zu machen, erfolgte eine Antigendemaskierung im Citratpuffer (DAKO Retrieval Solution, pH 6.0, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) für 30 min im Dampfgarer. Zum Abkühlen blieben die Schnitte für weitere 30 min in Citratpuffer. Um unspezifische Antikörper und somit unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurden die Schnitte für mindestens eine Stunde mit einer „Protein Block Serum-Free“ Blockierlösung (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) inkubiert. Die Blockierlösung lagert sich an unspezifischen Bindungsstellen an und verhindert gleichzeitig eine Interaktion mit dem Sekundärantikörper. Anschließend erfolgte eine Absättigung der endogenen Peroxidase mit 3 %igem  $H_2O_2$  für 15 min. Es folgte eine Inkubation mit 0,001 %igem Avidin und Biotin für je 15 min, um im Gewebe vorhandenes Biotin abzusättigen. Der Primärantikörper wurde in der jeweiligen Verdünnung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem nicht gebundene Primärantikörper abgewaschen waren, wurde der biotinylierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS auf die Schnitte gegeben und für 45 min inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte für 30 min mit dem ABC-Reagenz inkubiert (PK-6100, Vectastain Elite ABC Kit, Burlingame, CA, USA), welches aus einer Mischung aus Avidin und einer biotinylierten Meerrettichperoxidase (HRP = Horseradish peroxidase) besteht. Die Visualisierung erfolgte durch Inkubation mithilfe des 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Reagenz (SK-4100, DAB Peroxidase Substrate Kit, Burlingame, CA, USA). Das dazugegebene DAB wird hier in Anwesenheit von  $H_2O_2$  durch das Enzym HRP zu einem braunen Chromogen umgewandelt, das dann auf dem Gewebe sichtbar ist. Die Inkubationszeit des DABs lag zwischen 30 Sekunden und 7 min, je nach verwendetem Antikörper. Das DAB wurde zuerst mit Leitungswasser und anschließend mit  $dH_2O$  gewaschen, bevor die Schnitte zur Gegenfärbung der Kerne für 20-40 Sekunden in Hämatoxylin gefärbt wurden. Die Schnitte wurden daraufhin für 8 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte entwässert (2 x 3 min 70 % EtOH, 2 x 3 min 96 % EtOH, 2 x 3 min 100 % EtOH, 3 x 3 min Roti-Histol) und zur Konservierung mit Eukitt Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Die Bilder der einzelnen Färbungen wurden am Leica Lichtmikroskop DM750 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in einer 100- bzw. 200-

fachen Vergrößerung aufgenommen und mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) ausgewertet.

Die Methode wurde durchgeführt mit folgenden Primärantikörpern:

Anit-  $\gamma$ H2AX (1:200 in PBS, #9718 Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt, Deutschland), anti-8-OxodG (1:1000 3 % BSA (Bovine serum albumin), #AA1005 Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland), anti-3-Nitrotyrosin (1:1000 in PBS, #sc-327547 Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Deutschland), anti-PCNA (1:500 in PBS, #MAB424 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), anti-CD68 (1:100 in PBS, #ab125212 Abcam, Cambridge, England), anti-Fibronektin (1:400 in PBS, #ab2413 Abcam, Cambridge, England), anti-Vimentin (1:500 in PBS, #ab8978 Abcam, Cambridge, England).

Als Sekundärantikörper wurden verwendet: donkey anti-rabbit IgG-B (1:200 in PBS, #sc-2089 Santa Cruz Biotechnology, USA) und goat anti-mouse IgG-B (1:200 in PBS, #sc-2039, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Das Prinzip des immunhistochemischen Nachweises mittels DAB ist schematisch in Abbildung 9 A dargestellt.

### *3.2.3.2 Detektion von 8-OxodG mittels ABC-DAB-Reaktion*

8-OxodG ist ein Derivat des Nukleosids Desoxyguanosin, welches aus der Oxidation von Guanosin, hervorgerufen durch freie Radikale, entsteht. Somit dient die Messung von 8-OxodG als Nachweis für durch oxidativen Stress verursachte DNA-Schäden.

Die Färbung von 8-OxodG funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die ABC-DAB-Reaktion, allerdings wurden hier einige Schritte verändert. Gewaschen wurde nach den jeweiligen Schritten mit einem TNT-Waschpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween 20). Nach dem einstündigen Trocknen bei 60 °C mit anschließendem Entparaffinieren (siehe 3.2.3.1) wurden die Paraffinschnitte auch mit 3 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Verdünnung von 30 % auf 3 % in Methanol) inkubiert, um die endogene Peroxidase abzusättigen. Die Antigendemaskierung erfolgte im Citratpuffer (siehe 3.2.3.1), hier allerdings für 15 min, gefolgt von einem 20-minütigen Abkühlen im Citratpuffer. Die Schnitte wurden in 2 N HCl für 20 min bei 37 °C inkubiert, anschließend kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgte ein RNase-Verdau (200 µg/ml) für eine Stunde und ein anschließender Verdau mit Pepsin (0,2 %) für 15-20 min bei jeweils 37 °C. Unspezifische Bindestellen wurden bei dieser Färbung mit 3 % Rinder-Serum, gefolgt von 5 % Pferde-Serum für jeweils 30 min bei 37 °C blockiert. Es folgte

nun auch bei dieser Färbung eine Inkubation mit 0,001 %igem Avidin und Biotin für je 15 Minuten, um im Gewebe vorhandenes Avidin abzusättigen. Der Primärantikörper gegen 8-OxodG (Immundiagnostik, AG, Bensheim, Deutschland, AA1005.1) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 (in 3 % Rinder-Serum) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem nicht gebundene Primärantikörper am nächsten Tag abgewaschen waren, wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (ab6788) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS auf die Schnitte gegeben und für 45 min inkubiert. Die restlichen Schritte erfolgten wie in 3.2.3.1 beschrieben, wobei die Inkubation des DABs 20 Sekunden betrug. Die Bilder der Färbung wurden am Leica Lichtmikroskop DM750 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen und mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) ausgewertet.

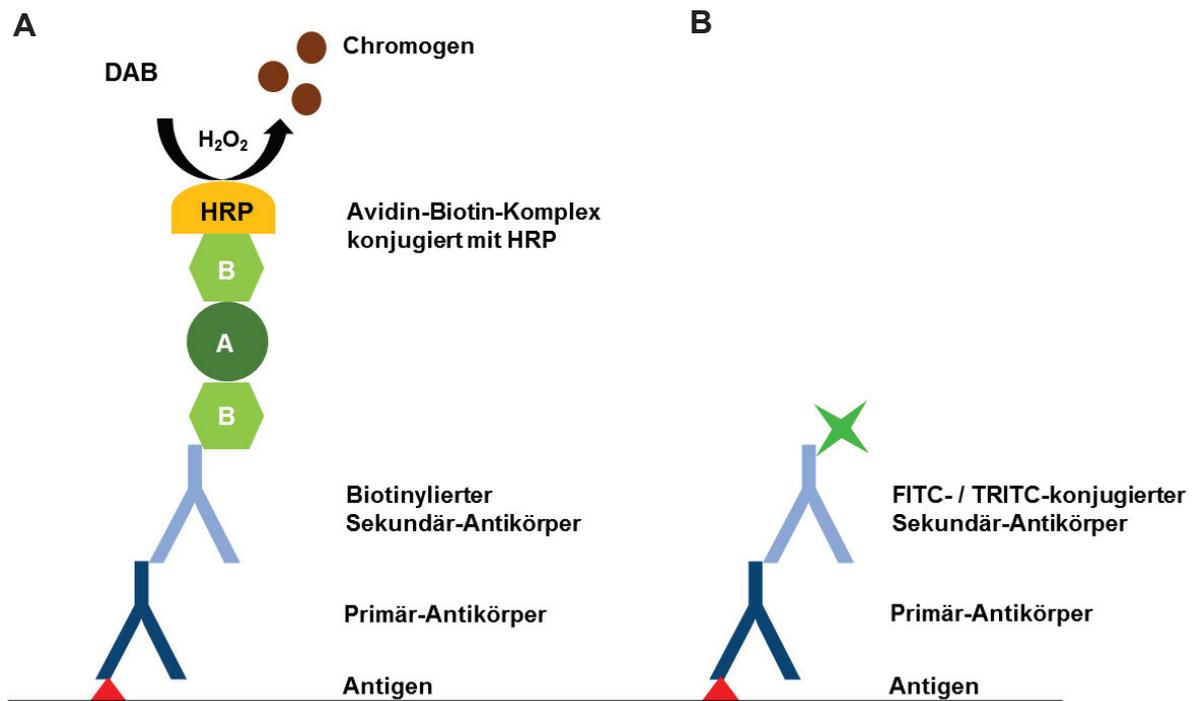
### *3.2.3.3 Visualisierung mithilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern*

Die immunhistochemische Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen läuft ähnlich ab wie die DAB-Färbung. Bei dieser Färbung kann allerdings auf das Blockieren der endogenen Peroxidase sowie auf die Absättigung des endogenen Avidins verzichtet werden. Durch Zugabe eines Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers kann der Primärantikörper bzw. das zu untersuchende Antigen direkt unter einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Auch hier erfolgte die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers (Verdünnung je nach Antikörper) über Nacht bei 4 °C. Nachdem nicht gebundene Primärantikörper abgewaschen wurden, wurde der Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 488 oder Alexa-Fluor 555) in einer Verdünnung von 1:600 in PBS für 2 Stunden auf die Schnitte gegeben. Nach Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit 0,1 %igem PBS-T (Tween 20) wurden die Schnitte zur weiteren Analyse in Einbettmedium „VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium“ mit DAPI (Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) eingedeckt. Die Bilder der Färbungen wurden am Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX43 (Olympus, Tokio, Japan) mit einem DAPI-, FITC- bzw. TRITC-Filter in der 200- oder 400-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die Methode wurde durchgeführt mit folgenden Primärantikörpern:

Anti-E-Cadherin (1:1000 in PBS, #610181 Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), anti-CD13 (1:4000 in PBS, #ab108310 Abcam, Cambridge, England).

Das Prinzip des immunhistochemischen Nachweises mittels Fluoreszenz-gekoppeltem Zweitantikörper ist schematisch in Abbildung 9 B dargestellt.



**Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten. A:** ABC-DAB-Reaktion: Der Primär-Antikörper bindet an das zu untersuchende Target-Protein (Antigen), der dazugegebene korrespondierende Sekundär-Antikörper bindet wiederum an den Primär-Antikörper. Der ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex, konjugiert mit HRP) bindet an den biotinylierten Sekundär-Antikörper, woraufhin dazugegebenes DAB in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vom Enzym HRP zu einem braunen Chromogen umgesetzt wird, welches als Braunfärbung auf dem Schnitt sichtbar ist. **B:** Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen: Der Primär-Antikörper bindet an das zu untersuchende Target-Protein (Antigen). Der korrespondierende Sekundär-Antikörper ist FITC- oder TRITC-konjugiert, wodurch an einem Fluoreszenzmikroskop ein spezifisches Signal auf dem Schnitt sichtbar ist. DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, A = Avidin, B = Biotin, HRP = Horseradish peroxidase.

### 3.2.3.4 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Immunhistochemie-Bilder erfolgte mithilfe des Programms ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Hier wurden entweder die positiven Kerne auf die Gesamtzellzahl oder die positive Fläche auf die Gesamtfläche bezogen. Falls dies aufgrund einer schlechten Gegenfärbung der Kerne, wie im Falle der 8-OxodG-Färbung, nicht möglich war, wurden die positiven Kerne auf die Gesamtfläche bezogen.

### 3.2.4 Immunfluoreszenz (DHE)

Um die Niere auf die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies zu untersuchen, wurde mit dem Fluorophor Dihydroethidium (DHE) gearbeitet. In Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies wird DHE in seine oxidierte Form Ethidium umgewandelt,

wobei sich die Farbe der Fluoreszenz nach Interkalation in die DNA von blau nach rot umwandelt. Für die Färbung wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte am Gefriermikrotom Leica CM 3050 S (Leica Camera, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zum Anfärben der Schnitte wurden diese zunächst kurz angetaut und dann für 20 min im Dunkeln bei RT mit 10 µM DHE-Färbelösung inkubiert. Die gefärbten Schnitte wurden im Anschluss darauf direkt unter dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX43 (Olympus, Tokio, Japan) im 20er Objektiv im TRITC-Filter fotografiert. Ausgewertet wurden ca. 25 Bilder pro Tier, indem die Fluoreszenzintensität der Zellen abzüglich der Hintergrundfluoreszenz mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) gemessen wurde.

### 3.2.5 Tunel-Assay

Der Tunel (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling; TdT = terminal desoxynucleotidyl transferase) -Assay dient der Analyse von apoptotischen Zellen. Das Prinzip beruht darauf, dass der DNA-Strang während der Apoptose fragmentiert wird, wodurch freie Hydroxygruppen entstehen. Das Enzym TdT, welches mit fluoreszierenden Nukleotiden markiert ist, bindet nun an diese freien Hydroxygruppen, wodurch sie später unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden können.

Für die Detektion von apoptotischen Zellen wurden mit dem „In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein“ (Roche, Mannheim, Germany) gearbeitet. Die Schnitte wurden hierfür zunächst eine Stunde bei 60 °C getrocknet und wie in 3.2.3.1 beschrieben entparaffiniert. Ein Protein-Verdau wurde mit 20 µg/ml Proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany) (verdünnt in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) für 15 min bei RT durchgeführt. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurde ein Schnitt als Positiv-Kontrolle mit 150 U/ml DNase (Qiagen) für 10 min bei RT behandelt. Das Markieren der apoptotischen Zellen geschah durch 60minütige Inkubation mit der im Kit enthaltenen Labeling-Solution (50 µl Enzyme-Solution + 45 µl Labeling-Solution pro Schnitt) in einer dunklen feuchten Kammer. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Schnitte mit „VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium“ mit DAPI (Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) eingedeckt und mit dem 20er Objektiv unter dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX43 (Olympus, Tokio, Japan) analysiert. Fotografiert wurden 10 Sichtfelder des Cortex und 5 Sichtfelder der Medulla, die

Auswertung geschah mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>), indem die Tunel-positiven Zellen auf die Gesamtzellzahl bezogen wurde.

### **3.2.6 Semiquantitative Untersuchung der Nierenmorphologie - Histopathologie**

Um histopathologische Veränderungen in der Niere feststellen zu können, wurde eine Hälfte der Niere in Paraffin eingebettet und 3 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden dann zur Bewertung ihrer Morphologie mit unterschiedlichen Färbemethoden angefärbt (Hämatoxylin-Eosin-Färbung = HE-Färbung, Siriusrot-Färbung, Periodic-Acid-Schiff-Färbung = PAS-Färbung). Um daraufhin histopathologische Veränderungen in der Niere beurteilen zu können, wurden drei verschiedene Parameter zur Beurteilung herangezogen: der Glomeruloskleroseindex (GSI), der Mesangiolyseindex (MSI) und der tubulointerstitielle Schädigungsindex (TSI).

#### *3.2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Die HE-Färbung ist eine oft angewandte Färbemethode in der Histologie zur Evaluierung und Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild.

Die 3 µm dicken Paraffinschnitte wurden zunächst für 1 h bei 60 °C getrocknet und in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend wurden durch eine Inkubation mit Hamatoxylin für 4 min bei RT die sauren bzw. basophilen Strukturen des Gewebes, also insbesondere Zellkerne, angefärbt. Durch ein Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 8 min erhalten Zellkerne ihre typische blaue Färbung. Die Schnitte wurden daraufhin für 2 min mit Eosin (kurz vor Gebrauch 2 Tropfen 100%ige Essigsäure auf 100 ml Eosin dazugeben) inkubiert, wodurch acidophile bzw. basische (eosinophile) Strukturen rot angefärbt werden. Nach kurzem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und zur Konservierung mit Eukitt eingedeckt.

#### *3.2.6.2 Siriusrot-Färbung*

Mithilfe der Siriusrot-Färbung lässt sich Kollagen auf Gewebeschnitten anfärben, sodass fibrotische Flächen lichtmikroskopisch analysiert werden können. Hierfür wurden die Schnitte entparaffiniert und mittels Inkubation für 6 min bei RT mit

Weigert's Hämatoxylin die Zellkerne angefärbt. Nach darauffolgendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min wurden die Schnitte 30 min mit der Picro-Siriusrot-Lösung (Siriusrot-Stammlösung: 1 g Siriusrot auf 100 ml dH<sub>2</sub>O; 25 ml der Siriusrot-Stammlösung + 225 ml gesättigte Pikrinsäure) inkubiert. Hierdurch entsteht die typische rote Färbung der Kollagenfasern. Nach kurzem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte durch Dippen in 100 %igem EtOH entwässert und zur längeren Aufbewahrung mit Eukitt eingedeckt.

### *3.2.6.3 Periodic-Acid-Schiff-Färbung*

Die Periodic-Acid-Schiff-Färbung (PAS) wird häufig in der Histologie verwendet, um Kohlenhydrate wie Glykogen oder Glykolipide zu färben und somit Bindegewebsfasern oder Basalmembranen sichtbar zu machen.

Die Schnitte wurden hierfür entparaffiniert. Mittels Periodsäure (1 %) werden freie Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert.

Nach kurzem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte mit dem Schiff's Reagenz inkubiert. Die gebildeten Aldehydgruppen formen dann mit dem im Schiff's Reagenz enthaltenen, schwefelsauren Fuchsin rot-violette Komplexe, die im mikroskopischen Bild sichtbar werden. Durch anschließende Inkubation mit Mayer's Hämatoxylin wurden die Zellkerne gegengefärbt. Nach kurzem Bläuen der Schnitte wurden diese durch mit 70 %igem bzw. 100 %igem Ethanol entwässert und zur längeren Aufbewahrung mit Eukitt eingedeckt.

### *3.2.6.4 Glomeruloskleroseindex (GSI) und Mesangiolyseindex (MSI)*

Anhand des GSI und des MSI lässt sich die Beschaffenheit der Glomeruli in der Niere beurteilen. Da beide Parameter ineinander übergehen und gleichzeitig auftreten, fand die Auswertung parallel statt. Während der GSI die Proliferation von Mesangiumzellen sowie die Zunahme von mesangialer Matrix beurteilt, gibt der MSI Aussage über den Verlust an Mesangiumzellen und die daraus folgende Erweiterung von Kapillarschlingen. Für die Auswertung wurden 50 Glomeruli eines PAS-gefärbten Nierenschnittes pro Ratte bewertet. Die Beurteilung der Beschaffenheit der Glomeruli erfolgte nach einer Methode von El Nahas [162], bei der die Schädigung in fünf verschiedene Stadien unterteilt und wie folgt berechnet wird:

## Material und Methoden

$$\text{GSI/MSI} = \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4)}{50}$$

n = Anzahl an Glomeruli in Stadium 0-4

S = Stadium 0-4

**Tabelle 2: Stadien der Glomerulosklerose und Mesangiolyse nach Nahas.**

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

### 3.2.6.5 Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI)

Der tubulointerstitielle Schädigungsindex dient der Beurteilung des Tubulussystems sowie des umgebenden interstitiellen Raums der Nierenrinde. Die Auswertung hierbei erfolgt durch Bewertung von Entzündung (HE-Färbung), Fibrose (Siriusrot-Färbung) und der Atrophie der Basalmembran von Tubuluszellen (PAS-Färbung). Bewertet wurden je 20 Gesichtsfelder in 200-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop in Anlehnung an das in Tabelle 3 aufgeführte Bewertungssystem nach Véniant [163].

$$\text{TSI} = \left( \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4) \text{Entzündung}}{20} \right) + \left( \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4) \text{Fibrose}}{20} \right) + \left( \frac{(n \times S0) + (n \times S1) + (n \times S2) + (n \times S3) + (n \times S4) \text{Atrophie}}{20} \right) / 3$$

n = Anzahl an Gesichtsfeldern in Stadium 0-4

S = Stadium 0-4

**Tabelle 3: Stadien der tubulointerstitiellen Schädigung nach Véniant.**

| <b>Stadium (Score)</b> | <b>Histologische Veränderungen</b>                                        | <b>Prozentualer Anteil</b> |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| 0                      | Normales Tubulussystem                                                    | 0 %                        |
| 1                      | Anzeichen von interstitieller Infammation, Fibrose und tubulärer Atrophie | < 5 %                      |
| 2                      | Anzeichen von interstitieller Infammation, Fibrose und tubulärer Atrophie | 5-25 %                     |
| 3                      | Anzeichen von interstitieller Infammation, Fibrose und tubulärer Atrophie | 25-50 %                    |
| 4                      | Anzeichen von interstitieller Infammation, Fibrose und tubulärer Atrophie | > 50 %                     |

### **3.2.7 WGA-Färbung zur Visualisierung von Zellmembranen**

Die WGA-Färbung dient zum Anfärben von Membranen, wodurch sich beispielsweise durchschnittliche Zellgrößen bestimmen lassen. Zur Entparaffinierung wurden Paraffinschnitte für mindestens 30 min bei 60-70 °C im Trockenschrank inkubiert und anschließend für 3 x 5 min in Xylol inkubiert. Es folgte eine anschließende Wässerung je 5 min in 2 x 100 %igem, 2 x 96 %igem und 2 x 70 %igem EtOH, woraufhin 2 x in dH<sub>2</sub>O geschwenkt wurde. Nach 5-minütigem Waschen in PBS erfolgte die Antigendemaskierung in einem 1:10 verdünnten DAKO-Puffer (DAKO Retrieval Solution, pH 6.0, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) im Dampfgeräts für 60 min, woraufhin die Schnitte für 20 min in selbigem Puffer langsam bei RT abkühlten. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit WGA-Alexa555 (10 µg/ml) für 30 min bei RT in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert, woraufhin 3 x für je 10 min mit PBS + 0,2 % TritonX gewaschen wurde. Zur Konservierung wurden die Schnitte mit „VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium“ mit DAPI (Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA) eingedeckt und mit dem 100er Objektiv unter dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX43 (Olympus, Tokio, Japan) analysiert. Fotografiert wurden 5-7 Sichtfelder, die Auswertung geschah mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>), indem die durchschnittliche Zellengröße gemessen wurde.

### **3.2.8 Kompetitiver ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zur Konzentrationsbestimmung**

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren. Die Auswertung besteht aus der Analyse einer enzymatischen Farbreaktion. Hierbei bindet das nachzuweisende Antigen an einen Primärantikörper, der fest an eine Mikrotiterplatte gebunden ist. Ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper bindet daraufhin an den Primärantikörper und führt zu einer Reaktion eines Farbstoffsubstrates. Anhand des Substratumsatzes, welcher fluorimetrisch oder kolorimetrisch nachgewiesen wird, kann dann eine quantitative Aussage über die Antigenkonzentration getroffen werden. Einer der am häufigsten verwendeten ELISA ist der kompetitive Immun-Assay.

Das Prinzip des kompetitiven ELISAs beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hier wird mit einer Mikrotiterplatte gearbeitet, an die ein Primärantikörper fest gebunden ist, der das zu untersuchende Antigen bindet. Zur Detektion wird allerdings kein markierter Sekundärantikörper eingesetzt, sondern ein markiertes Kompetitor-Antigen, welches auch an den an der Mikrotiterplatte sitzenden Antikörper bindet und so mit dem zu untersuchenden Antigen um einen Bindungsplatz am Antikörper konkurriert. Der Nachweis erfolgt hierbei durch Zugabe des Substrats TMB, welches von der HRP zum blauen Präzipitat umgesetzt wird. Allerdings verhält sich das Signal beim kompetitiven ELISA umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration, d.h. je mehr Antigen in der Probe vorhanden war, desto weniger Substrat kann umgesetzt werden, desto niedriger das Farbsignal. Das Prinzip des kompetitiven ELISAs fand Anwendung für die Messung von Albumin (Nephrot Kit, Exocell, Philadelphia, USA), 15-Isoprostan F<sub>2t</sub> (Oxford Biomedical Research, Oxford, USA), 8-OHdG (StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Canada) und 3-Nitrotyrosin (StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Canada).

#### *3.2.8.1 Albumin Bestimmung im Urin*

Die Albumin-Bestimmung erfolgte nach dem Prinzip des kompetitiven ELISAs, allerdings war die Mikrotiterplatte in diesem ELISA nicht mit einem Primärantikörper gegen Albumin beschichtet, sondern mit Albumin selbst, welches als Kompetitor für das in der Probe vorhandene Albumin fungiert. Je mehr Albumin in der flüssigen Urin-Probe vorhanden war und an den HRP-konjugierten dazugegebenen

Sekundärantikörper gebunden hat, desto geringer war am Ende die Absorption, da das in der Probe enthaltene lösliche Albumin nach Bindung an den Sekundärantikörper gewaschen wurde, nicht aber das immobilisierte Albumin.

Vor Beginn des Versuchs wurde aus dem Standard eine Verdünnungsreihe hergestellt. 22-Stunden-Sammelurin wurde 15 Wochen nach Behandlungsstart gesammelt und für den ELISA 1:10 verdünnt.

Zunächst wurden 90 µl der verdünnten, im Kit enthaltenen „NHEBSA-Diluent“ in die Mikrotiterplatte gegeben, anschließend wurden 10 µl der Urin-Probe dazugegeben, was so eine Verdünnung des Urins von 1:10 darstellt. Nach Zugabe des Nephrot-Konjugats in jedes Well wurde die Mikrotiterplatte für 45 min bei RT inkubiert. Der nicht-gebundene Anteil wurde abgekippt und die Wells 6 x mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Der Nachweis erfolgte auch hier durch Zugabe von TMB (5 min Inkubation), anschließend wurde die Reaktion durch eine im Kit enthaltene „Color Stopper“ Lösung gestoppt.

Die Absorption wurde anschließend am Photospektrometer Sunrise™ (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) bei 450 nm gemessen.

### *3.2.8.2 Bestimmung von 15-Isoprostan F<sub>2t</sub> im Urin*

Zu Beginn wurden Waschkonzentrat und das 15-Isoprostan F<sub>2t</sub> HRP-Konjugat entsprechend der Herstellerangaben verdünnt und eine Standardreihe des beigefügten 15-Isoprostan F<sub>2t</sub> Standards erstellt. Für die Bestimmung von 15-Isoprostan F<sub>2t</sub> wurde 22-Stunden-Sammelurin 15 Wochen nach Behandlungsstart gesammelt und nach Herstellerempfehlung mit β-Glucuronidase behandelt. Dies ermöglicht, nicht nur das freie, sondern auch das an Glucuronsäure gebundene Isoprostan zu messen und somit eine genauere Aussage über den tatsächlichen Gehalt des Stressmarkers treffen zu können. Der Urin wurde nach Inkubation mit der β-Glucuronidase 1:4 mit Verdünnungspuffer verdünnt und anschließend mit dem 15-Isoprostan F<sub>2t</sub> HRP-Konjugat für 2 h bei RT in der Mikrotiterplatte inkubiert. Das TMB-Substrat wurde nach mehrmaligem Waschen für 20-40 min inkubiert (bis eine blaue Färbung beobachtet werden konnte) und die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 M Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm am Photospektrometer Sunrise™ (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gemessen.

Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT.

### *3.2.8.3 Bestimmung von 8-OHdG im Urin*

Vor dem Starten des Assay-Protokolls wurden Standards und Urin-Proben nach Herstellerangaben verdünnt. Gearbeitet wurde hier mit dem 22-Stunden-Sammelurin, 15 Wochen nach Start der AngII-Behandlung. Von den jeweiligen Standards bzw. den verdünnten Urinproben wurden je 50 µl auf die Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden 50 µl des Primärantikörpers in die Wells gegeben und für 60 min inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung der ungebundenen Substanzen wurde das TMB Substrat dazugegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe einer im Kit enthaltenen „Stop-Solution“ wurde die Umsetzung des Substrats gestoppt und die Absorption wurde im Plate Reader Photospektrometer Sunrise™ (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) bei 450 nm gemessen. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT.

### *3.2.8.4 Bestimmung von 4-Nitrotyrosin im Serum*

Zu Beginn wurden Standards und Serum-Proben nach Herstellerangaben verdünnt. Das Serum wurde aus Blut, welches durch Punktion des retrobulbären Venenplexus am Ende des Behandlungszeitraums gewonnen wurden, hergestellt.

Der Versuchsablauf ist identisch zu der Messung von 8-OHdG im Urin (siehe 3.2.8.3).

## **3.2.9 Kolori- und fluorimetrische Assays zur Konzentrationsbestimmung**

Die kolori- bzw. fluorimetrische Bestimmung einer in der Probe vorhandenen Substanz beruht auf einem direkten messbaren Farbumschlag, ohne Zugabe von Enzymen. Dieser Farbumschlag kann entweder kolorimetrisch oder fluorometrisch gemessen werden.

### *3.2.9.1 Kreatinin-Bestimmung mittels kolorimetrischer Messung*

Die Bestimmung der Kreatinin-Werte im Serum und Urin erfolgte mittels der Jaffé-Reaktion. Hierbei kommt es zu einem orange-gelben Farbumschlag, wenn der zu untersuchende Metabolit mit Pikrinsäure versetzt wird. Der Farbumschlag ist direkt proportional zu der Konzentration von Kreatinin im Serum oder Urin. Gearbeitet wurde mit dem 22-Stunden-Sammelurin, 15 Wochen nach Start der AngII-Behandlung und mit Plasmaproben, welche am Versuchsende gewonnen wurden.

Es wurde mit dem „Creatinine (urinary) Colorimetric Assay Kit“ (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, USA) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Zunächst wurde ein Kreatinin Standard vorbereitet, welcher anschließend zur Bestimmung der Standardreihe in eine Mikrotiterplatte gegeben wurden. Zusätzlich wurde die gleiche Menge an unverdünnter Probe in die Wells gegeben. Durch Zugabe des „Creatinin Reacation Buffers“ und „Creatinin Color Reagent“ kam es zu einem Farbumschlag. Die Absorption wurde nach einer und sieben min bei 490 nm im Photospektrometer Sunrise™ (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gemessen.

### *3.2.9.2 TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) -Bestimmung mittels fluorimetrischer Messung*

Die Messung von TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) erfolgte mit dem „QuantiChrom™ TBARS Assay Kit (DTBA-100)“ (BioAssay Systems, Hayward, USA) nach Herstellerangaben. Gemessen wurde bei diesem Assay die Konzentration von MDA (Malondialdehyd), einem der Haupt-Endprodukte, die bei der Lipidperoxidation entstehen.

Das Prinzip des Assays beruht auf der Messung eines pinken Farbumschlags durch Zugabe von Thiobarbitursäure (TBA) in Anwesenheit von MDA. Dieser Farbumschlag ist direkt proportional zu der Konzentration von MDA in der Probe.

Gearbeitet wurde hier mit 22-Stunden-Sammelurin, 15 Wochen nach Start der AngII-Behandlung, welcher 1:10 verdünnt wurde. Zunächst wurde eine Standardreihe von MDA hergestellt und das TBA-Reagenz zu der Standardreihe bzw. den Proben gegeben und 1 h bei 100 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT und kurzem Vortexen wurden 100 µl des Proben - bzw. Standard – TBA – Gemischs in eine 96-Well-Platte überführt und die Fluoreszenzintensität im Photospektrometer Sunrise™ (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) ( $\lambda_{ex/em}=560\text{ nm}/585\text{ nm}$ ) gemessen.

### **3.2.10 Messung der Zytokin-Expression mittels des Inflammations-Panel LEGENDplex™**

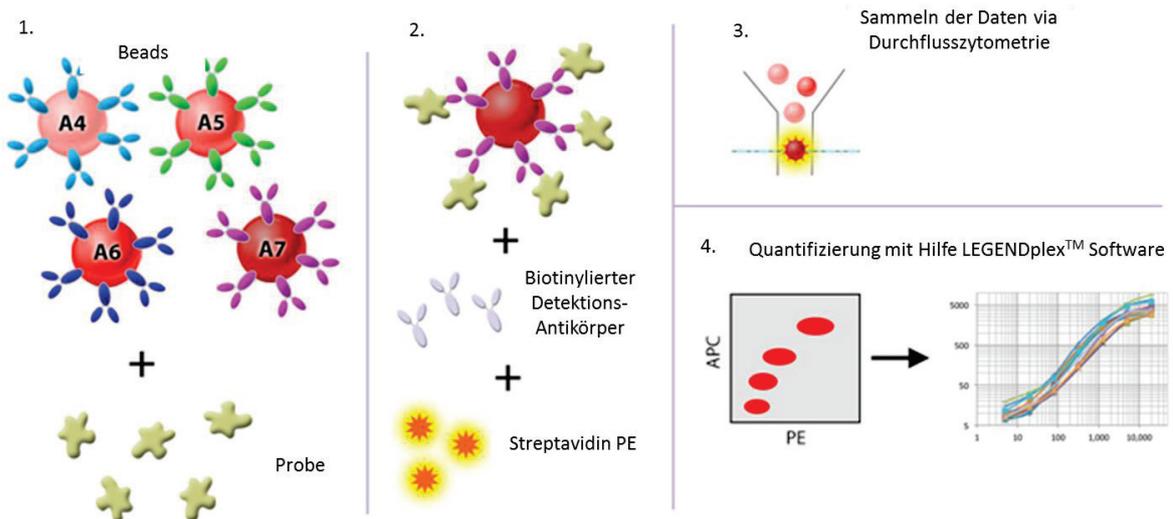
Der „LEGENDplex™ Inflammations-Panel“ (BioLegend, San Diego, USA) ist ein Bead-basierter Immunoassay, welcher es durch den Einsatz von Fluoreszenz-gekoppelten Beads erlaubt, innerhalb eines Assays mehrere Analyte zu analysieren. Das Prinzip beruht darauf, dass die verwendeten Beads in zwei unterschiedlichen Größen und

## Material und Methoden

Levels der Allophycocyanin (APC) -Fluoreszenz eingesetzt werden, was es in der späteren Analyse erlaubt, sie voneinander zu unterscheiden. Alle unterschiedlichen Beads sind mit einem spezifischen Antikörper an der Oberfläche konjugiert, welcher gegen einen Analyten (Zytokin) gerichtet ist. Durch Inkubation der Beads mit einer zu untersuchenden Probe binden die Beads spezifisch an einen Analyten. Ein hinzugegebener biotinylierter Antikörper (Detektions-Antikörper) bindet an den spezifischen Analyten, welcher bereits an einen Bead gekoppelt ist. Es kommt zu einem Sandwich aus Bead – Analyt – biotinyliertem Detektions-Antikörper. Zugegebenes Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) bindet an den biotinylierten Detektions-Antikörper, wodurch ein Fluoreszenz-Signal zu messen ist, welches proportional zur Menge der gebundenen Analyte ist. Die Messung erfolgt an einem Durchflusszytometer, die Analyse geschieht mittels der „LEGENDplex™ data Analysis Software“ (Abbildung 10).

Es wurde mit dem „LEGENDplex™ Rat Th1 Panel (6-plex) with V-bottom Plate“ Kit nach Herstellerangaben gearbeitet.

Zunächst wurde eine Standardreihe der Analyte hergestellt und die Standards bzw. die Serum-Proben (1:1 verdünnt) in eine Mikrotiterplatte gegeben. Es wurde die im Kit enthaltene Matrix C zu den Standards bzw. Assaypuffer zu den Serum-Proben gegeben und anschließend die gemischten Beads in jedes Well gegeben. Dieser Mix wurde 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Platte abzentrifugiert und der Überstand abgekippt, sodass nur noch die Beads mit den jeweiligen Analyten in der Platte verblieben. Anschließend wurde der Detektions-Antikörper in jedes Well gegeben und für 1 h im Dunkeln inkubiert, bevor der Mix für 30 min mit SA-PE im Dunkeln inkubiert wurde. Es wurde erneut Waschpuffer zu den Wells gegeben und die gesamte Platte zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgekippt. Nun befanden sich lediglich das Sandwich aus Bead – Analyt – biotinyliertem Detektions-Antikörper in den Wells. Die Lösung wurde in Waschpuffer resuspendiert und am Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) gemessen.



**Abbildung 10: Prinzip des LEGENDplex™ Inflammations-Panels.** Die unterschiedlichen Beads sind mit einem spezifischen Antikörper an der Oberfläche konjugiert, welcher gegen einen zu untersuchenden Analyten (Zytokin) gerichtet ist. Durch Inkubation der Beads mit der Probe binden diese spezifisch an einen Analyten. Ein hinzugegebener biotinylierter Antikörper (Detektions-Antikörper) bindet an den spezifischen Analyten, welcher bereits an einen Bead gekoppelt ist. Es kommt zu einem Sandwich aus Bead – Analyt – biotinyliertem Detektions-Antikörper. Zugegebenes Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) bindet an den biotinylierten Detektions-Antikörper, wodurch im Durchflusszytometer ein Fluoreszenz-Signal zu messen ist. Dieses Signal ist proportional zur Menge der gebundenen Analyte. Die Auswertung der Messung geschah mittels der LEGENDplex™ Software. Quelle: <https://www.biolegend.com/legendplex>.

### 3.2.11 Mutations-Assay mit transgenen BigBlue®-Ratten

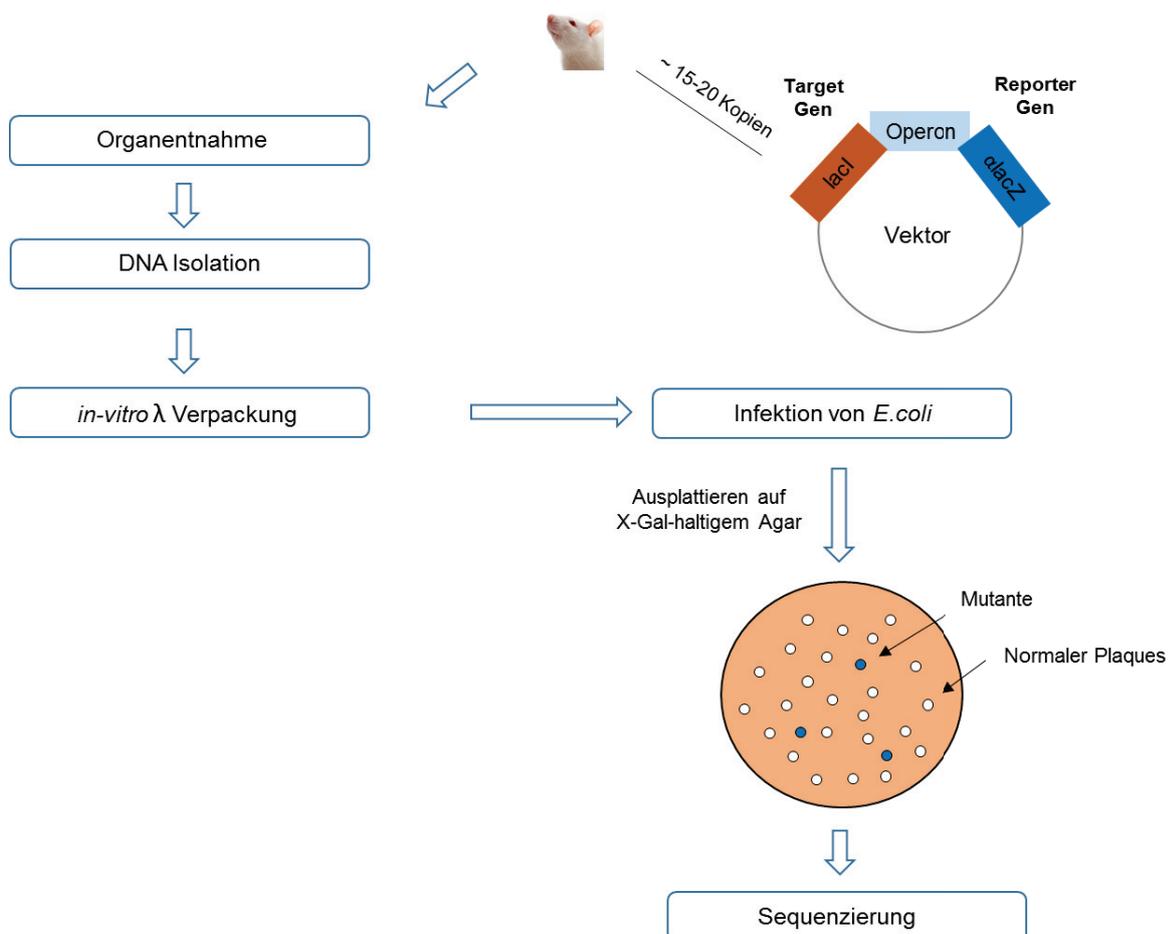
In dem hier durchgeführten Tierexperiment wurde mit transgenen BigBlue®-Ratten gearbeitet, die es ermöglichen, mithilfe eines Mutations-Assays Mutationen in der Niere zu untersuchen. Der Mutations-Assay wurde von Stratagene entwickelt und dient zur Untersuchung von spontanen und induzierten Mutationen *in vivo* in unterschiedlichen Organen von BigBlue®-Ratten. Die Basis dieses Tests bildet der 45,5 kb lange BigBlue® λLIZ Shuttle-Vektor, welcher die genetische Information für das bakterielle *lacI*-Gen (*lacI*) und den α-Teil des bakteriellen *lacZ*-Gens enthält (*αlacZ*). Dieser Vektor ist mit etwa 15-20 Kopien an einer einzigen Stelle im Genom (Chromosom 4) der Ratten integriert [164]. Das bakterielle *lacI* fungiert als Target-Gen für Mutationen, das *αlacZ* als Reporter-Gen. Im Falle von einem nicht-mutierten *lacI* ist der Lac-Repressor funktionsfähig und verhindert somit in Bakterien die Transkription von *αlacZ*, was bei späterem Ausplattieren auf einer Platte mit X-Gal-haltigem Agar dazu führt, dass X-Gal nicht in den blauen Indigofarbstoff umgewandelt werden kann. Kommt es allerdings zu einer Mutation im *lacI*, so ist der Lac-Repressor inaktiv, wodurch die Transkription von *αlacZ* ermöglicht wird. Durch eine Fusion des α-

## Material und Methoden

und des  $\beta$ -Teils der  $\beta$ -Galaktosidase, welches in bestimmten Bakterienstämmen exprimiert wird, kann X-Gal zu dem blauen Farbstoff umgewandelt werden. Somit erscheinen mutierte Plaques auf dem Agar blau, während nicht-mutierte Plaques ein weißes Erscheinungsbild zeigen (Abbildung 11).

Die Mutationsfrequenz lässt sich nun dadurch ermitteln, dass das Verhältnis von blauen Plaques zur Gesamtzahl der Plaques bestimmt wird.

Durch anschließende Sequenzierung des *lacI* können Mutationen genauer untersucht werden.



**Abbildung 11. Schematischer Ablauf des Mutations-Assays.** Ratten tragen den BigBlue®  $\lambda$ LIZ Shuttle-Vektor, welcher die genetische Information für das bakterielle *LacI*-Gen (*lacI*) und den  $\alpha$ -Teil des bakteriellen *lacZ*-Gens enthält (*alacZ*). Dieser Vektor ist mit etwa 15 - 20 Kopien an einer einzigen Stelle im Genom der Ratten integriert. Das bakterielle *lacI*-Gen fungiert als Target-Gen für Mutationen, das *alacZ* als Reporter-Gen. Nach Organentnahme wird die DNA isoliert und in Phagen injiziert, welche daraufhin in *E. coli* infiziert werden. Durch Ausplattieren auf X-Gal-haltigem Agar kann zwischen mutierten (blau) und nicht-mutierten (weiß) Plaques unterschieden werden. Durch Sequenzieren des *lacI*-Gens in den mutierten Plaques kann zusätzlich das Mutationsspektrum bestimmt werden.

3.2.11.1 Mutations-Assay

DNA-Isolation, Verpackung der DNA in Phagen, Infektion in *E.coli* und Mutantenscreening wurde am Institut für Pharmazie und Biochemie in Mainz von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Epe durchgeführt.

3.2.11.2 Amplifikation des *lacI*-Gens der Mutanten

Bevor die Amplifikation von *lacI* durchgeführt werden konnte, mussten zunächst die Phagen lysiert werden. Hierfür wurde eine Lösung aus 11 µl dH<sub>2</sub>O, 2,5 µl PCR-Puffer (10x), 1,5 µl Proteinase K-Lösung (1 mg/ml) und 10 µl Plaques (diese wurden, in Puffer gelöst, aus Mainz geschickt) hergestellt. Anschließend wurde das Gemisch im Thermocycler für 60 min bei 52 °C und danach zur Inaktivierung der Proteinase K für 15 min bei 95 °C inkubiert. Um nun das *lacI* zu amplifizieren, wurde eine PCR durchgeführt (Tabelle 4)

**Tabelle 4: Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Programm zur Amplifikation von *lacI*.**

|                                  | µl    | Programm               |      |     |     |
|----------------------------------|-------|------------------------|------|-----|-----|
|                                  |       | [°C]                   | [s]  |     |     |
| dH <sub>2</sub> O                | 14,85 |                        |      |     |     |
| 5x HF-PCR-Puffer                 | 5     | Initiale Denaturierung | 98   | 30  | 1x  |
| dNTP-Mix 2,5 mM                  | 0,4   | Denaturierung          | 98   | 10  | 35x |
| Primer forward                   | 1,25  | Primer Hybridisierung  | 61,3 | 30  |     |
| Primer reverse                   | 1,25  | Elongation             | 72   | 45  |     |
| Phusion High Fidelity Polymerase | 0,25  | Finale Elongation      | 72   | 600 | 1x  |
| <b>Mastermix</b>                 | 23    |                        |      |     |     |
| Lysierter Phage                  | 2     |                        |      |     |     |
| <b>Summe</b>                     | 25    |                        |      |     |     |

Das PCR-Produkt wurde daraufhin in einem 1 %igem Agarosegel auf seine Länge überprüft und nach anschließendem Ausschneiden aus dem Gel mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, Germany) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Das amplifizierte *lacI* wurde mit den dazugehörigen Primern (siehe Tabelle 1) direkt zur Sequenzierung zum Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gebracht. Für die Auswertung der Sequenzierung wurden durch Vergleich der Originalsequenz des *lacI* [165] und der Sequenz der isolierten Plaques Mutationen detektiert.

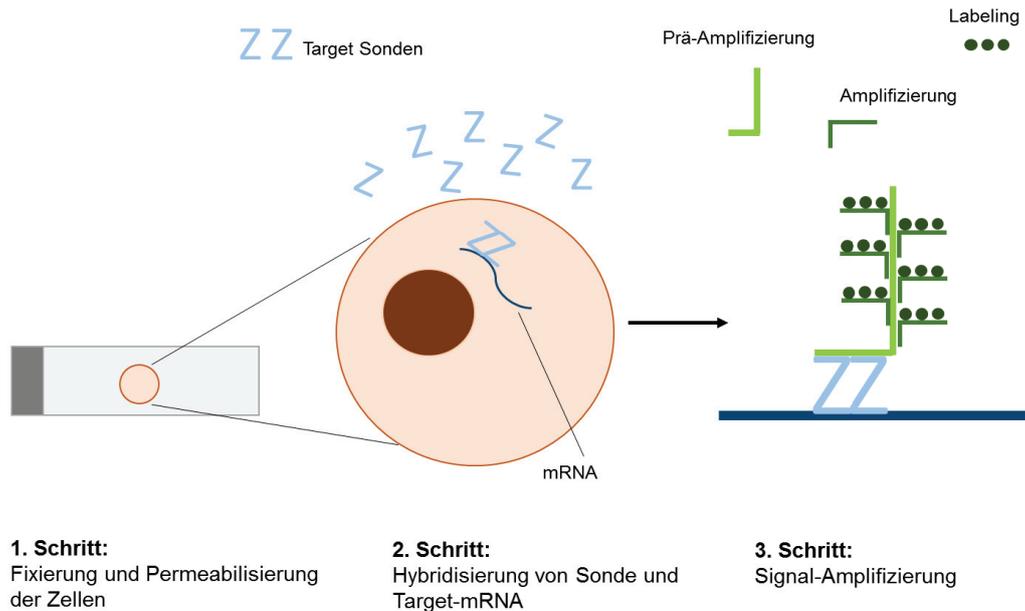
### 3.2.12 RNA-Hybridisierung mittels RNAscope® Technologie

Die RNA-Hybridisierung ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von RNA-Expression in Geweben, Zellen oder auf Metaphase-Chromosomen. Hierbei kommen künstlich hergestellte Sonden zum Einsatz, die komplementär zu der nachzuweisenden mRNA sind. Es kommt zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Nukleinbasen der Sonde und der mRNA. Die RNAscope®-Technologie ist ein neuer, da nicht-radioaktiver, Assay zum Nachweis von RNA auf Gewebeschnitten.

Für den Nachweis wurde mit den Kits „RNAscope 2.5 HD Assay – BROWN“ und „RNAscope® Pretreatment Reagents“ (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA) gearbeitet.

Im ersten Schritt des Assays wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte (3 µm) für 1 h bei 60°C getrocknet, anschließend entparaffiniert (2 x 5 min Roti-Histol, 2 x 1 min 100 % EtOH) und für mindestens 5 min getrocknet. Durch eine Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die endogene Peroxidase abgesättigt. Das fixierte Gewebe wurde nun zur Permeabilisierung mit einem im Kit enthaltenen Target Retrieval Puffer behandelt (15 min im Dampfgarer), anschließend für 3 min in 96 %igem EtOH inkubiert und trocken bis zum nächsten Tag gelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit einer im Kit enthaltenen Protease vorbehandelt (20-30 min bei 40 °C). Daraufhin folgte die Hybridisierung der Sonden (2 h bei 40 °C, feuchte Kammer). Die folgenden Schritte dienten der Amplifikation des Signals (AMP1 – AMP4 15 bzw. 30 min bei 40 °C und AMP5 und AMP6 30 bzw. 15 min bei RT) (Abbildung 12). Die Waschschrte zwischen den Amplifikationsschritten erfolgten mit einem im Kit enthaltenen Wasch-Puffer. Für die Detektion des Signals wurde mit DAB gearbeitet (je gleiche Menge DAB A und DAB B zusammenführen und auf den Schnitt geben). Die Inkubation des DABs erfolgte für 10-20 min bei RT. Zum Anfärben der Zellkerne wurden die Schnitte mit Hämatoxilin gegengefärbt (8 Sekunden). Die Schnitte wurden danach dehydriert (2 min in 70 %igem, 2 min in 96 %igem EtOH, 2 x 5 min Roti-Histol und zur Konservierung mit Eukitt eingedeckt. Die Bilder der Färbung wurden am Leica Lichtmikroskop DM750 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen und mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) ausgewertet. Der Ablauf der RNA-Hybridisierung ist schematisch in Abbildung 12 aufgezeigt.

## Material und Methoden



**Abbildung 12: Ablauf der RNA-Hybridisierung mittels RNAscope® Technologie.** Die fixierten Zellen werden in einem ersten Schritt permeabilisiert, bevor dann in einem zweiten Schritt die synthetisierten Sonden dazugegeben werden. Diese binden aufgrund ihrer komplementären Struktur an die nachzuweisende mRNA. Durch mehrere Amplifizierungsschritte kommt es in einem dritten Schritt zur Signalverstärkung. An jeden dieser Signalverstärker ist ein chromogenes Enzym gekoppelt (Labeling), welches am Ende durch Zugabe von DAB zur Signal-Detektion führt.

### 3.2.13 Statistik

Die Daten von 10 Tieren pro Gruppe wurden dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (standard error mean, SEM). Die Daten wurden zunächst mittels GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung überprüft. Unterschiede zwischen der Kontroll- und der AngII-Behandlungsgruppe wurden mit dem ungepaarten zweiseitigem T-Test (bei Normalverteilung) oder dem Mann-Whitney U-Test (Nicht-Normalverteilung) auf Signifikanz überprüft. Bei der Überprüfung auf Signifikanz bei der Mutationsfrequenz und den DNA Läsionen wurde mit dem einseitigen T-Test oder dem einseitigen Mann-Whitney U-Test gearbeitet. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet.

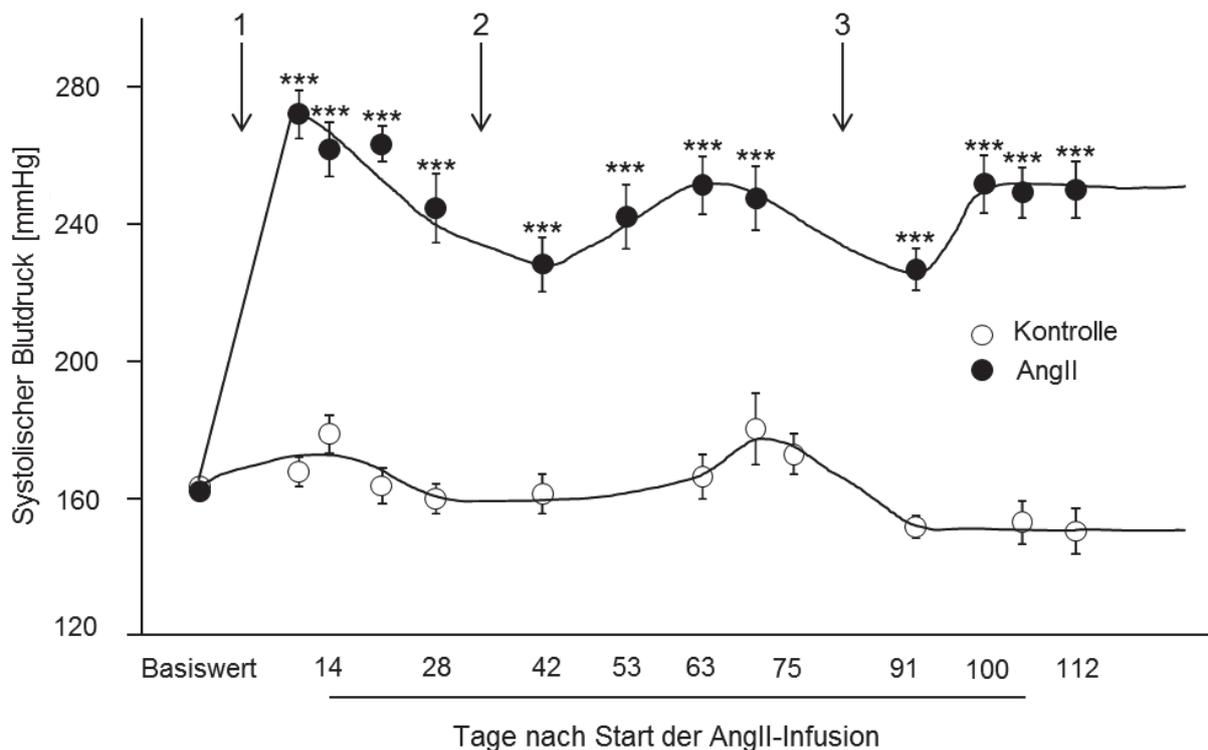
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf den Blutdruck und die Nierenfunktion

Um Aussagen über den Blutdruck treffen zu können, wurde über die gesamte Behandlungsdauer wöchentlich der Blutdruck der Tiere gemessen. Aussagen über die Nierenfunktion konnten erst durch Untersuchungen im Urin nach 15-wöchiger, bzw. im Plasma oder im Nierengewebe nach 20-wöchiger Behandlungszeit getroffen werden.

#### 4.1.1 Untersuchung des Blutdrucks während der AngII-Behandlung

Die Behandlung mit AngII führte zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks. Der höchste Blutdruckwert wurde bereits gleich nach Implantation der osmotischen Minipumpen erreicht. Nach einer Adaptationszeit von drei Wochen blieb der Blutdruck weitestgehend konstant und war während des gesamten Behandlungszeitraums signifikant erhöht im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe (Abbildung 13).



## Ergebnisse

**Abb. 13: Entwicklung des systolischen Blutdrucks [mmHg] in Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren über einen Zeitraum von 112 Tagen.** Pfeile zeigen jeweils den 1., 2. und 3. Zeitpunkt des Pumpen-Einsetzens bzw. -Austauschs. Die Blutdruckwerte wurden nicht-invasiv ermittelt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Kontrolle; n = 10.

### 4.1.2 Untersuchung des Körpergewichts und des relativen Nieren- und Herzgewichts nach AngII-Behandlung

Es ließ sich kein Unterschied im Körpergewicht zwischen den AngII-behandelten und den Kontroll-Tieren feststellen. Auch das relative Nierengewicht zwischen beiden Tiergruppen zeigte keinen Unterschied. Allerdings zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Herzgewichts in den AngII-behandelten Tieren. Während Kontroll-Tiere ein relatives Herzgewicht von 2,74 ‰ aufwiesen, zeigten AngII-behandelte Tiere ein relatives Gewicht von 3,37 ‰ (Tabelle 5). Diese Erhöhung lässt auf eine Hypertrophie des Herzens schließen. Auch eine Färbung mit WGA (Wheat germ agglutinin, Weizenlektin, verwendet zum Anfärben der Zellmembran) zur Bestimmung der Zellgröße zeigte tendenziell vergrößerte Zellen in Herzen von AngII-behandelten Tieren verglichen mit Kontroll-Tieren (siehe Anhang).

**Tabelle 5: Übersicht über klinische Parameter in Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Kontrolle; n = 10.

|                                    | Kontrolle      | AngII              |
|------------------------------------|----------------|--------------------|
| <b>Körpergewicht [g]</b>           | 576 $\pm$ 13   | 575 $\pm$ 10       |
| <b>Relatives Nierengewicht [‰]</b> | 2,9 $\pm$ 0,05 | 2,9 $\pm$ 0,08     |
| <b>Relatives Herzgewicht [‰]</b>   | 2,7 $\pm$ 0,05 | 3,4 $\pm$ 0,09 *** |

### 4.1.3 Untersuchung von Nierenfunktionsparametern nach AngII-Behandlung

Für die Untersuchung der Nierenfunktion wurden verschiedene Parameter zur Hilfe gezogen. Bei Betrachtung des Trink- bzw. Urinvolumens zeigte sich, dass die AngII-behandelten Tiere sowohl signifikant mehr tranken, als auch signifikant mehr Urin ausschieden. Die Untersuchung der Albumin-Ausscheidung gibt grundsätzlich

## Ergebnisse

Hinweise auf eine gestörte Filtration, was auf eine mögliche Nierenschädigung hindeutet. Es zeigte sich, dass AngII-behandelte Tiere, verglichen mit den Kontroll-Tieren, eine signifikant erhöhte Albumin-Exkretion aufwiesen. Als weiterer Marker für die glomeruläre Filtrationsrate und somit für die Nierenfunktion wurde die Kreatinin-Clearance bestimmt. Diese war in den AngII-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontroll-Tieren tendenziell verringert, allerdings ohne Signifikanz zu erreichen (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Übersicht über Nierenfunktionsparameter in Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren.** Bestimmt wurden die gezeigten Parameter im Urin nach 15-wöchiger bzw. im Serum nach 20-wöchiger Behandlung der Tiere. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Kontrolle;  $n = 10$ .

|                               | Kontrolle       | AngII             |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|
| Trinkvolumen [ml]             | 22,8 $\pm$ 1,4  | 44,7 $\pm$ 4,8*** |
| Urinvolumen [ml]              | 12,1 $\pm$ 0,59 | 32,3 $\pm$ 2,7*** |
| Kreatinin-Clearance [mg/dl*h] | 3,4 $\pm$ 0,4   | 2,5 $\pm$ 0,4     |
| Albumin-Ausscheidung [mg/22h] | 1,2 $\pm$ 0,26  | 32,1 $\pm$ 6,0*** |

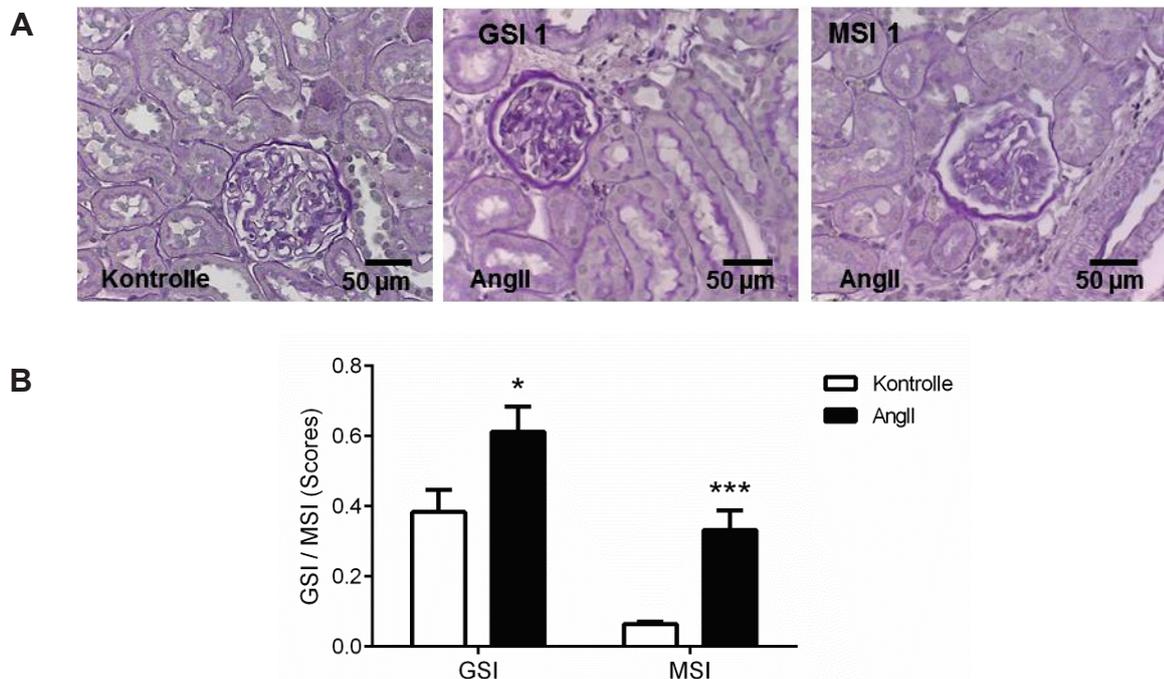
Unter Berücksichtigung aller eben aufgeführten Parameter kann geschlossen werden, dass die AngII-behandelten Tiere eine im Vergleich zu den Kontroll-Tieren verschlechterte Nierenfunktion hatten.

### 4.1.4 Untersuchung der Nierenmorphologie nach AngII-Behandlung

Um AngII-Effekte im Hinblick auf die Nierenmorphologie zu untersuchen, wurden verschiedene Schädigungsindizes analysiert. Der GSI/MSI beschreibt die Beschaffenheit der Glomeruli hinsichtlich der Proliferation und Verdickung von Mesangiumzellen und der Erweiterung der Kapillaren der Niere (genauere Berechnung des GSI/MSI siehe 3.2.6.4). Mithilfe des TSI hingegen beurteilt man Schäden des Tubulussystems sowie des umgebenden Interstitiums im Rindbereich der Niere (genauere Bestimmung des TSI siehe 3.2.6.5). Hierbei bewertet man vor allem interstitielle Entzündungen, Fibrose und tubuläre Atrophien.

#### 4.1.5 Untersuchung des GSI und MSI nach AngII-Behandlung

Die Behandlung mit AngII führte zu einer morphologischen Veränderung der Glomeruli. Während die Glomeruli der Kontroll-Tiere weitestgehend eine normale Struktur aufwiesen (Abbildung 14 A links), fanden sich in vielen Glomeruli der AngII-behandelten Tiere sowohl eine vermehrte Proliferation bzw. Verdickung von Mesangiumzellen (Abbildung 14 A mittig), als auch eine Erweiterung der Kapillaren (Abbildung 14 rechts). Fasst man die Beobachtungen aller 50 Glomeruli in den Kontroll- und AngII-behandelten Tieren in den GSI bzw. MSI zusammen, so zeigte sich eine Erhöhung des GSI von 0,4 auf 0,6 und des MSI von 0,07 auf 0,3. Der Unterschied in der Bewertung der Glomeruli war sowohl hinsichtlich des GSI, als auch des MSI signifikant zwischen den Kontroll- und den AngII-behandelten Tieren (Abbildung 14 B).

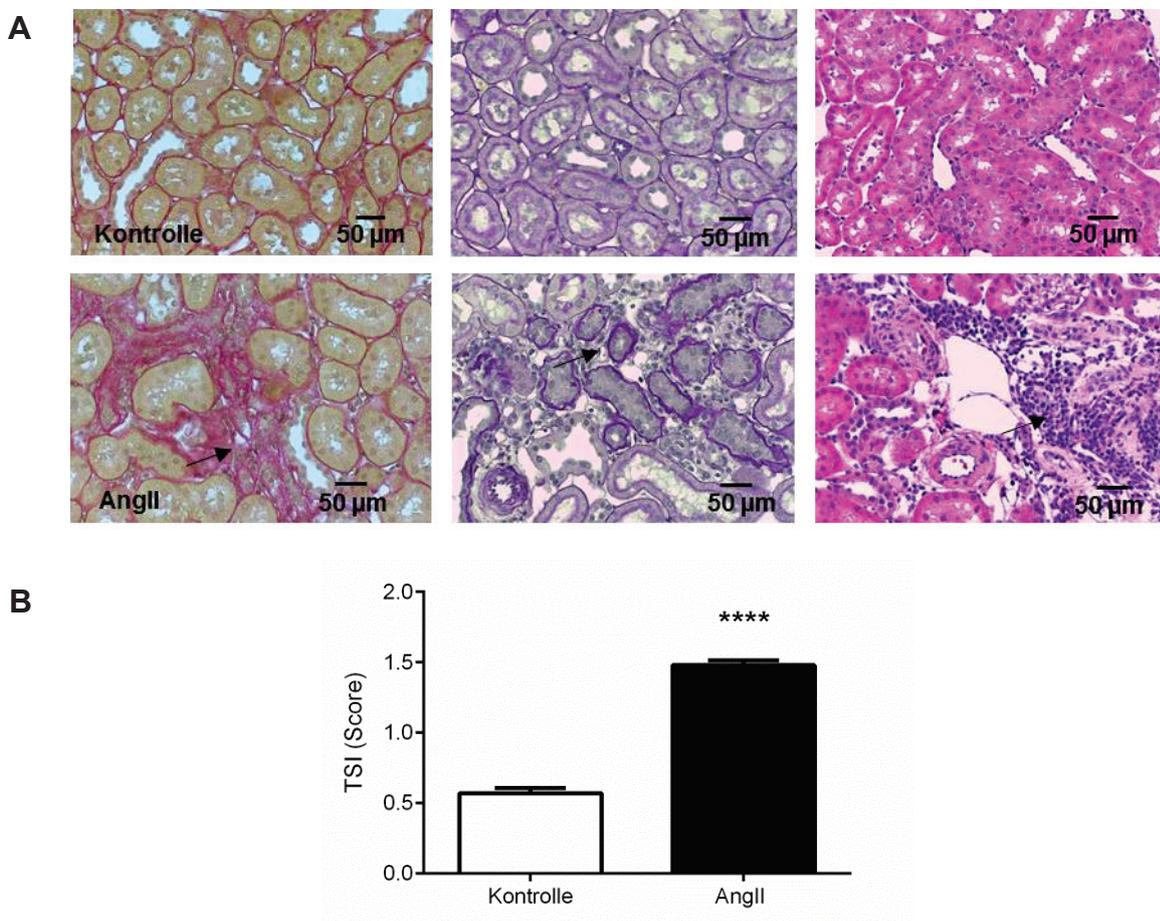


**Abbildung 14: Semiquantitative Auswertung des GSI und MSI in Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Beispielbilder der Glomeruli, die zur Auswertung des Schadens herangezogen wurden. Kontrolle (links) zeigt einen gesunden Glomerulus mit einem GSI und MSI von 0, AngII zeigt einen Glomerulus mit einem GSI von 1 (mittig) und einen Glomerulus mit einem MSI von 1 (rechts). Aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. **B:** Auswertung der Schädigung mithilfe der Scores (siehe 3.2.6.4). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, GSI = Glomeruloskleroseindex, MSI = Mesangiolyseindex; \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,0001$  vs. Kontrolle;  $n=10$ .

Somit kann geschlussfolgert werden, dass eine AngII-Behandlung zu einer Schädigung der Glomeruli führte, was wiederum die Verschlechterung der Nierenfunktion begründen könnte.

#### 4.1.6 Untersuchung des TSI nach AngII-Behandlung

Bei der Bewertung des Tubulussystems zeigte sich, dass in AngII-behandelten Tieren das Level an Fibrose, Atrophie der Basalmembran sowie der Entzündung höher war als in den unbehandelten Kontroll-Tieren (Beispielbilder Abbildung 15 A). Die Zusammenfassung dieser drei Schädigungsindizes in den TSI zeigte, dass die Kontroll-Tiere durchschnittlich einen TSI von 0,6 aufwiesen, während die AngII-behandelten Tiere einen TSI von 1,5 hatten. Die AngII-Tiere wiesen also einen signifikant erhöhten Tubulusschaden auf (Abbildung 15 B).

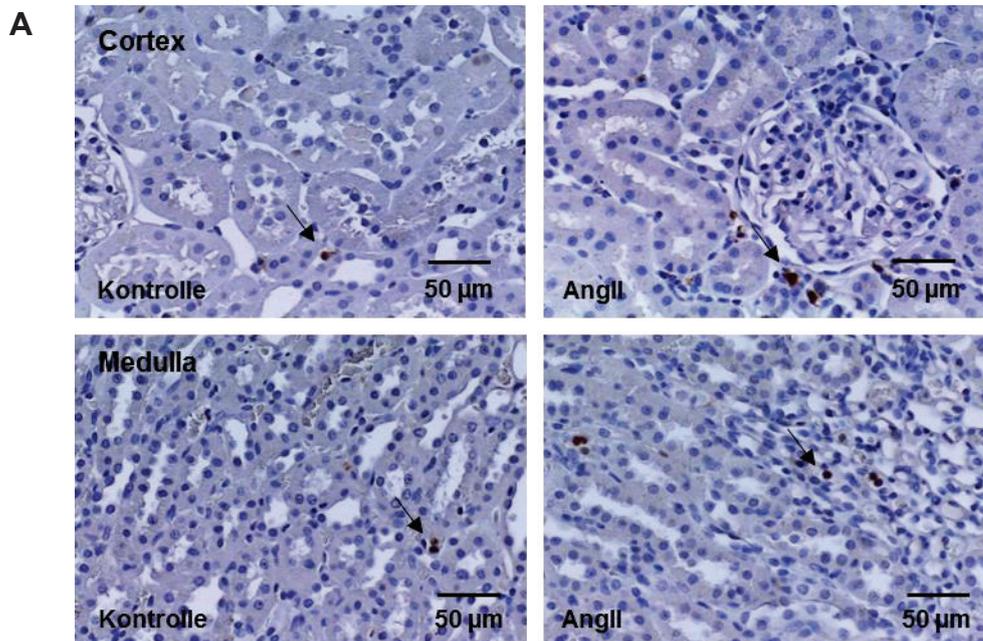


**Abbildung 15: Semiquantitative Auswertung des TSI Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Beispielbilder der Marker, die zur Auswertung des Schadens herangezogen wurden. Pfeile zeigen beispielhaft die jeweilige Schädigung. Links = Siriusrot-Färbung zum Anfärben von Fibrose, mittig = PAS-Färbung zum Anfärben von atrophischen Tubuli, rechts = HE-Färbung zum Anfärben von infiltrierenden Immunezellen. Aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. **B:** Auswertung der Schädigung mithilfe der Scores (3.2.6.5). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  vs. Kontrolle;  $n=10$ .

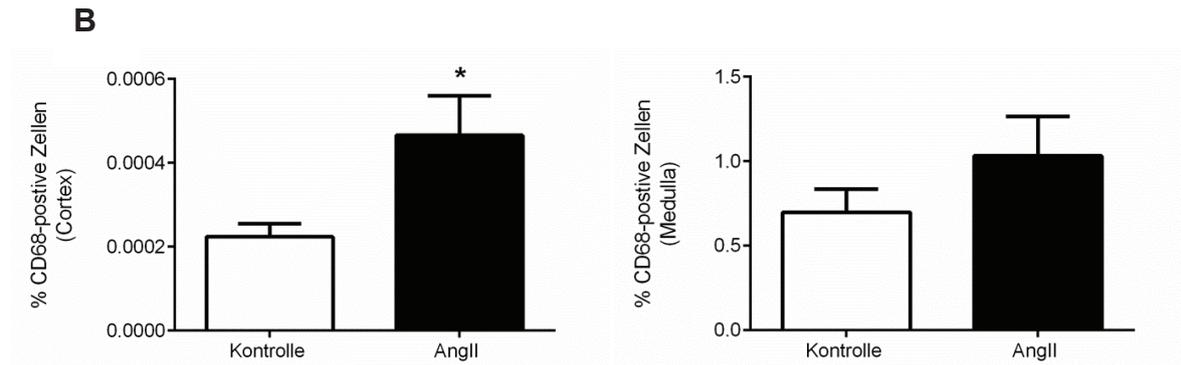
## 4.2 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Induktion von Inflammation und Nierenfibrose

Oft geht der Entstehung von fibrotischem Gewebe eine Entzündung voraus, welche sich durch die Untersuchung von infiltrierenden Zellen nachweisen lässt. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit überprüft, ob es durch die Behandlung mit AngII zu einer erhöhten Inflammation in der Niere kommt. Um dies zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Untersuchung mit CD68, einem Marker für Makrophagen, durchgeführt.

Es zeigte sich, dass sowohl im Cortex, als auch in der Medulla von AngII-behandelten Tieren mehr CD68-positive Zellen detektiert werden konnten als in Kontroll-Tieren (Abbildung 16 A). Durch eine Quantifizierung aller CD68-positiven Zellen ließ sich eine, verglichen mit den Kontroll-Tieren, Verdopplung im Cortex von AngII-behandelten Tieren feststellen. Der Anstieg an CD68-positiven Zellen in der Medulla der AngII-behandelten Tiere war dagegen nur tendenziell (Abbildung 16 B).

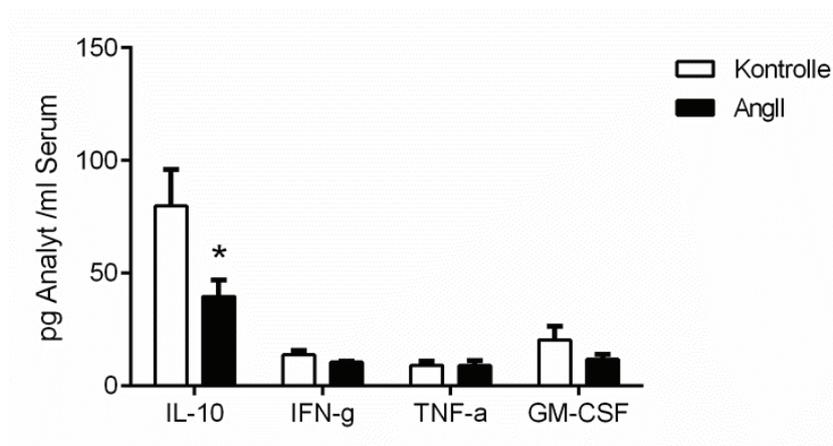


## Ergebnisse



**Abbildung 16: CD68-Färbung als Nachweis von infiltrierenden Makrophagen in die Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung für CD68-positive Zellen auf Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf positive Zellen. **B:** Quantifizierung der positiven Zellen im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtzellzahl des jeweiligen Bildausschnitts, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle;  $n = 9$ .

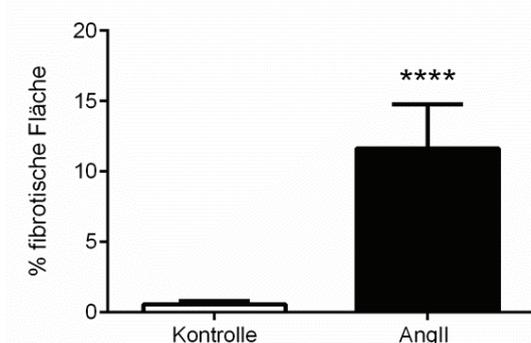
Inflammatorische Zellen wie beispielsweise Makrophagen oder T-Zellen setzen nach Aktivierung eine Vielzahl von Zytokinen frei. Um diese Zytokin-Freisetzung auf systemischer Ebene zu untersuchen, wurde mithilfe des LEGENDplex™ Inflammations-Panels die Produktion von einigen dieser Zytokine im Serum nach 20-wöchiger Behandlung analysiert. Untersucht wurde hier die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Interleukin-10) sowie die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). Die Produktion von GM-CSF war durch die AngII-Behandlung leicht verringert, während sich keine Veränderung der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zeigte. Allerdings kam es in AngII-behandelten Tieren zu einer signifikanten Verringerung der Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Abbildung 17).



## Ergebnisse

**Abbildung 17: LEGENDplex™ Inflammations-Panel zur Analyse von Zytokinen im Serum von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Untersucht wurden folgende Zytokine: IL-10 (Interleukin-10), IFN- $\gamma$  (Interferon-  $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) und GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). Gemessen wurde in pg/ml Serum. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle; n = 10.

Zusätzlich wurde untersucht, ob es durch die AngII-Behandlung auch zu einer erhöhten interstitiellen Fibrose in der Niere kam. Wie in 4.1.6 zu sehen, zeigten AngII-behandelte Tiere einen erhöhten TSI im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Da der TSI aber mehrere Parameter zusammenfasst und auch eine Atrophie der Basalmembran sowie die Infiltration von Zellen in die Niere bewertet, wurde noch separat die Ablagerung von Kollagen im interstitiellen Raum der Niere quantifiziert (unter Ausschluss größerer Blutgefäße). Beispielbilder der Färbung sind in Abbildung 15 zu finden. Wie in Abbildung 18 zu sehen, kam es durch die Behandlung mit AngII in den Tieren zu einer signifikant vermehrten Ablagerung von Kollagen, verglichen mit den Kontroll-Tieren.



**Abbildung 18: Quantifizierung der fibrotischen Fläche in der Niere in Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Quantifiziert wurde in Rinde und Medulla die Fläche an Kollagen, welche zuvor mittels Siriusrot-Färbung sichtbar gemacht wurde. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  vs. Kontrolle; n=10.

Zusammenfassend kann durch diese Untersuchungen gesagt werden, dass es durch die Behandlung mit AngII zu einer erhöhten lokalen Infiltration von Immunzellen in die Niere kam, was mittels CD68-positiver Zellen und der Analyse der HE-Färbung im TSI gezeigt wurde. Zum anderen konnten größere Flächen an interstitieller Fibrose nachgewiesen werden. Auf systemischer Ebene ließ sich eine verringerte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 feststellen, während hier pro-inflammatorische Zytokine unverändert blieben.

### 4.3 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Produktion von systemischen und lokalen ROS

In vorangegangenen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte bereits gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von sowohl AngII, als auch Ald zu oxidativem Stress führen. Um die Entstehung von oxidativem Stress auch in diesem Versuch zu untersuchen, wurden verschiedene Marker verwendet, die Aufschluss über den systemischen und den lokalen oxidativen Stress in der Niere geben sollten. Da ROS im Allgemeinen sehr reaktiv und daher schwer messbar sind, ist es üblich, durch ROS entstandene stabilere Produkte zu messen. TBARS und 15-Isoprostan  $F_{2t}$  entstehen als Nebenprodukt bei Lipidperoxidationen. 8-OxodG ist ein Derivat von Deoxyguanosin und entsteht durch ROS verursachte DNA-Oxidation. Bei dessen Ausscheiden im Urin entsteht 8-OHdG (8-Hydroxydesoxyguanosin). 3-Nitrotyrosin ist ein Derivat der Aminosäure Tyrosin und entsteht durch die Einwirkung von Peroxinitrit auf Tyrosin. Um ROS auf systemischer Ebene zu untersuchen, wurde TBARS, 15-Isoprostan  $F_{2t}$  und 8-OHdG im Urin und 3-Nitrotyrosin im Serum untersucht.

Als Marker für lokalen oxidativen Stress in der Niere wurde eine DHE-Messung durchgeführt. Außerdem wurde die Niere auf Anwesenheit von 3-Nitrotyrosin hin überprüft.

#### 4.3.1 Untersuchung von systemischen ROS nach AngII-Behandlung

Wie in Tabelle 7 zu sehen, wurden beide Marker für Lipidperoxidation, TBARS und 15-Isoprostan  $F_{2t}$ , in den AngII-behandelten Tieren wider Erwarten signifikant verringert, während der Marker für Proteinperoxidation 3-Nitrotyrosin tendenziell erhöht war und der Marker für oxidative DNA-Schädigung 8-OHdG in den AngII-behandelten Tieren signifikant erhöht war.

Die Gründe für diese Diskrepanz zwischen den ausgeschiedenen Lipiden (TBARS und 15-Isoprostan  $F_{2t}$ ) und den gemessenen Markern für Proteinperoxidation (3-Nitrotyrosin) und DNA-Oxidation (8-OHdG) werden in der Diskussion erörtert.

**Tabelle 7: Marker für systemischen oxidativen Stress in Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Bestimmt wurden die jeweiligen Parameter im Urin nach 15-wöchiger bzw. im Serum nach 20-wöchiger Behandlung der Tiere. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, TBARS = Thiobarbitursäure; \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  vs. Kontrolle;  $n = 10$ .

## Ergebnisse

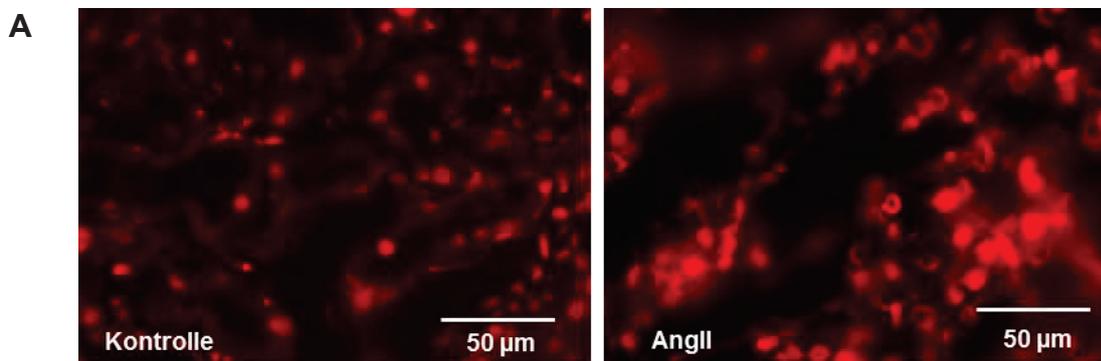
|                                        | Kontrolle   | AngII        |
|----------------------------------------|-------------|--------------|
| Exkretion von TBARS [mMol/22h]         | 0,28 ± 0,04 | 0,17 ± 0,04* |
| 15-Isoprostan F <sub>2t</sub> [ng/22h] | 70 ± 6      | 22 ± 5***    |
| 8-OHdG [µg/22h]                        | 3,5 ± 0,2   | 4,9 ± 0,2*** |
| 3-Nitrotyrosin [µg im Serum]           | 0,49 ± 0,06 | 0,57 ± 0,07  |

Auf systemischer Ebene lässt sich folglich keine allgemeine Aussage treffen, ob es zu einer erhöhten Produktion von ROS kam.

### 4.3.2 Untersuchung von lokalen ROS nach AngII-Behandlung

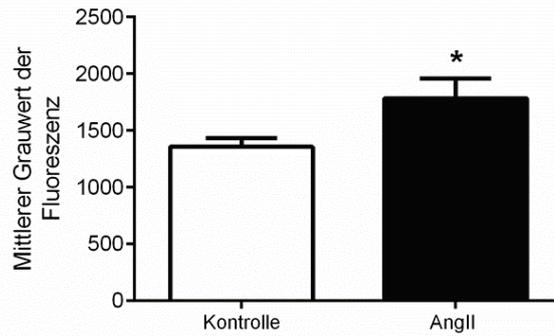
Die Untersuchung der Niere auf die Anwesenheit von ROS erfolgte mittels DHE-Messung. Als weiterer Marker für oxidativen Stress wurde 3-Nitrotyrosin verwendet, welcher über eine immunhistochemische Färbung in der Niere sichtbar gemacht wurde.

Wie in Abbildung 19 A zu sehen, kam es auf Gefrierschnitten der Niere von AngII-behandelten Tieren zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität bestätigte eine signifikante Zunahme (Abbildung 19 B), was die Schlussfolgerung erlaubt, dass es in diesen Tieren zu einer verstärkten Bildung von ROS kam.



## Ergebnisse

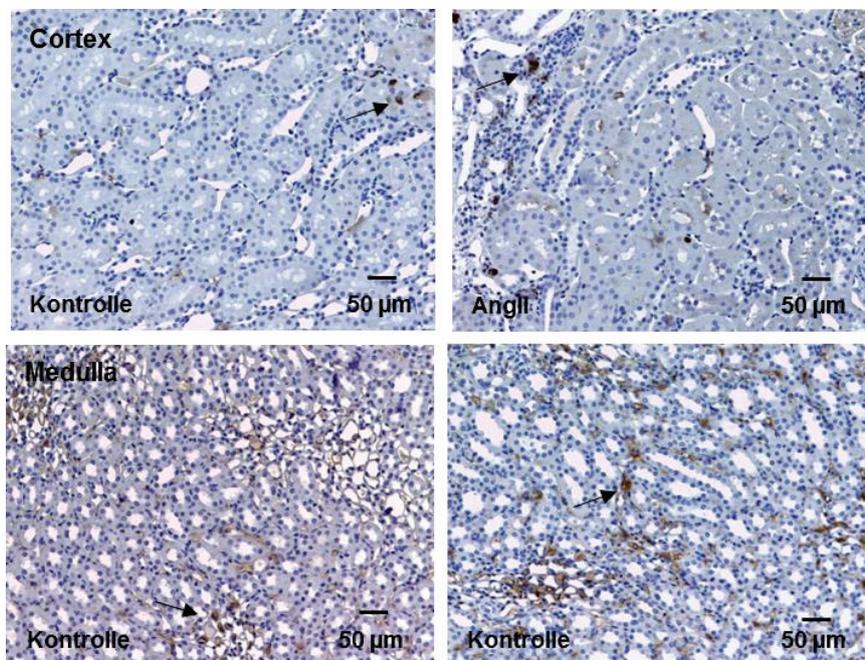
**B**



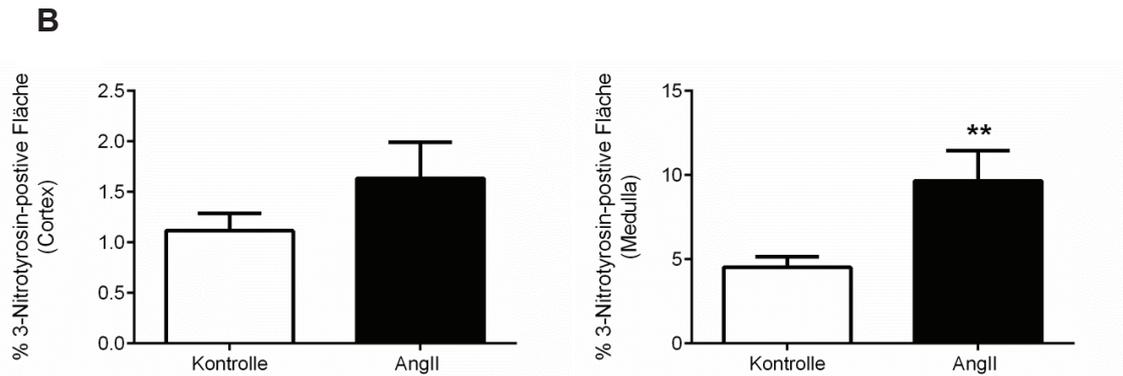
**Abbildung 19: DHE-Färbung zum Nachweis der Bildung von ROS in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Repräsentative Bilder von Gefrierschnitten der Niere nach Inkubation mit dem Fluorophor DHE, aufgenommen in einer 400-fachen Vergrößerung. **B:** Quantifizierung der Fluoreszenzintensität durch Messung des mittleren Grauwerts von 50 Gesichtsfeldern je Tier mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, DHE = Dihydroethidium; \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle;  $n = 10$  bzw.  $n = 9$  (Kontrolle).

Der Nachweis von 3-Nitrotyrosin in der Niere zeigte, dass auch dieser Marker in AngII-Tieren tendenziell (Cortex) bzw. signifikant (Medulla) vermehrt gebildet wurde (Abbildung 20 A und B). So kam es in der Medulla von AngII-behandelten Tieren fast zu einer Verdopplung der 3-Nitrotyrosin-positiven Fläche im Vergleich zu den Kontroll-Tieren.

**A**



## Ergebnisse



**Abbildung 20: 3-Nitrotyrosin-Färbung als Marker für ROS in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 100-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf 3-Nitrotyrosin-positive Flächen. **B:** Quantifizierung der 3-Nitrotyrosin-positiven Flächen im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, ROS = reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species); \*\* $p \leq 0,01$  vs. Kontrolle;  $n = 10$ .

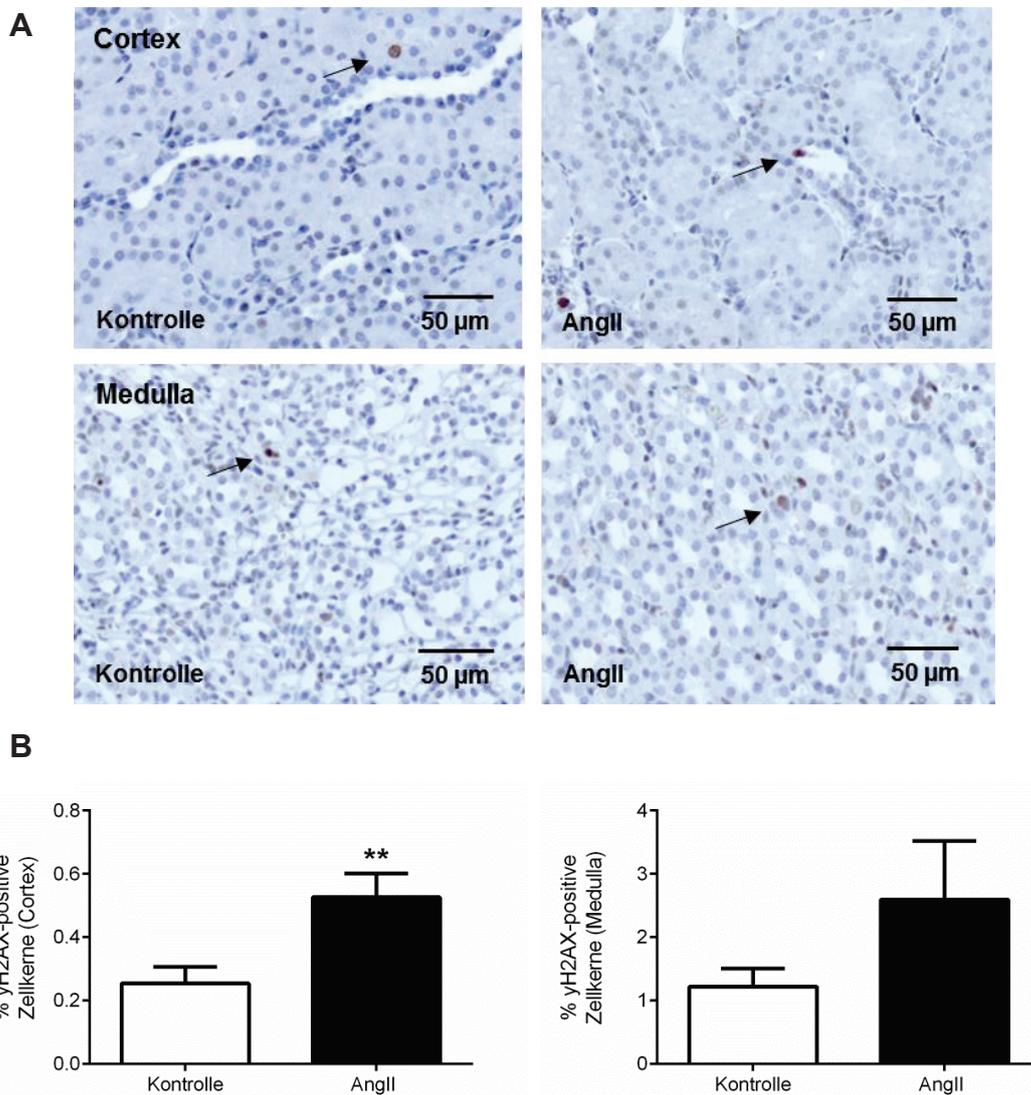
Fasst man die hier verwendeten Marker für oxidativen Stress zusammen, lässt sich schlussfolgern, dass es durch die Behandlung mit AngII vermehrt zur Bildung von ROS und damit verbunden einem Anstieg von Markern für oxidativen Stress in der Niere der behandelten Tiere kam.

### 4.4 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Induktion von DNA-Schäden in der Niere

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von AngII sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* vermehrt zu DNA-Schäden führt. Die vermehrte Bildung von ROS lässt vermuten, dass es auch in dieser Arbeit zu einer Erhöhung von DNA-Schäden kam. Um dies zu untersuchen, wurde die Bildung von phosphoryliertem H2AX ( $\gamma$ H2AX) untersucht. Zusätzlich wurde die durch ROS-verursachte Basenmodifikation 8-OxodG in der Niere untersucht.

Der immunhistochemische Nachweis von  $\gamma$ H2AX zeigte, dass es durch die Behandlung von AngII zu mehr DNA-Schäden kam (Abbildung 21 A). So ließen sich im Cortex von AngII-behandelten Tieren fast doppelt so viel  $\gamma$ H2AX-positive Zellen detektieren wie im Cortex von Kontroll-Tieren. Der Unterschied in der Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen war im Cortex signifikant zwischen den behandelten Tieren und den Kontroll-Tieren, in der Medulla war er in den AngII-behandelten Tieren tendenziell erhöht (Abbildung 21 B).

## Ergebnisse

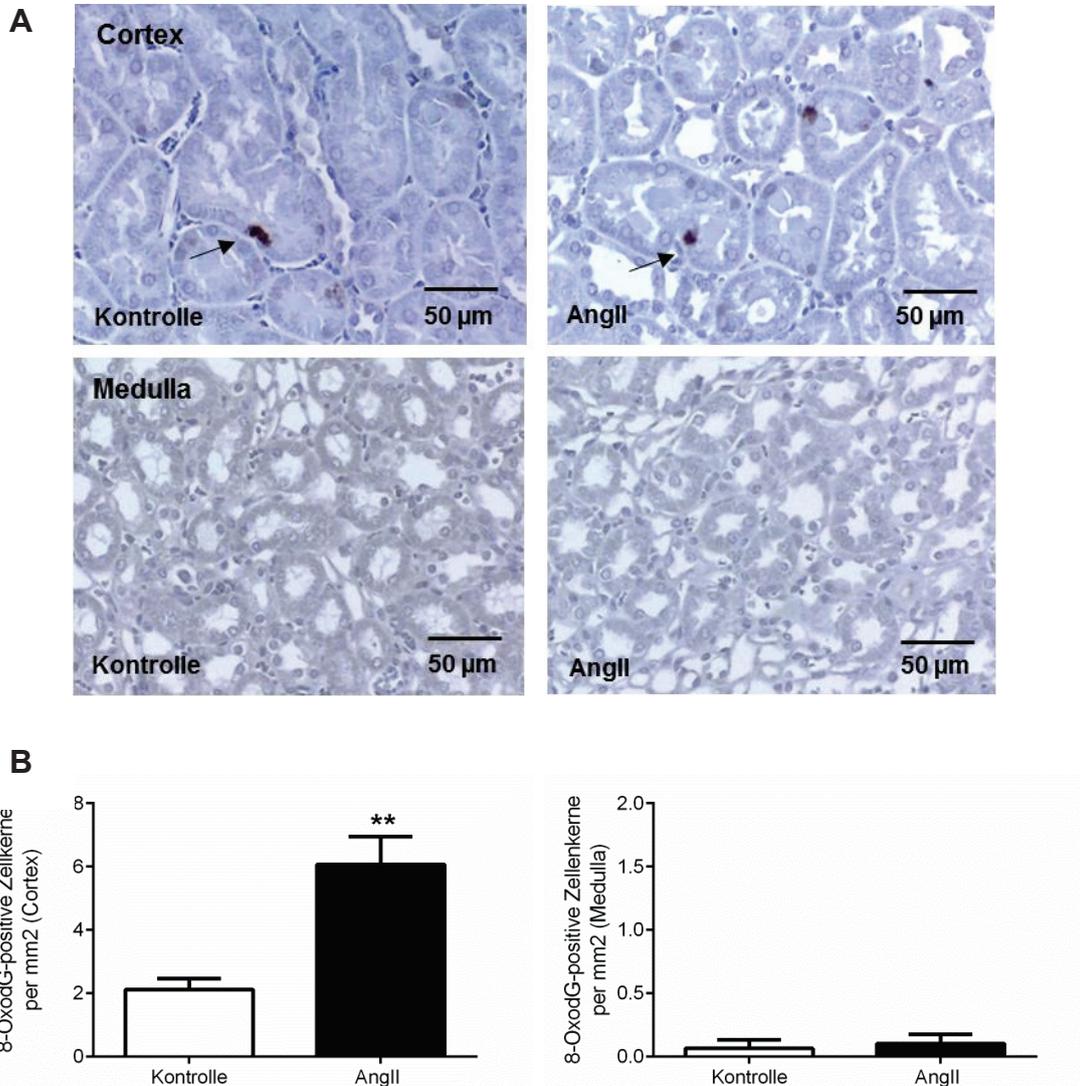


**Abbildung 21:  $\gamma$ H2AX-Färbung zum Nachweis von DNA-Schäden in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf  $\gamma$ H2AX-positive Zellkerne. **B:** Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-positiven Zellkerne im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtzahl der Zellkerne des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \*\* $p \leq 0,01$  vs. Kontrolle;  $n = 10$ .

Die immunhistochemische Färbung von 8-OxodG in der Niere zeigte, dass es zu einer signifikant vermehrten Bildung von 8-OxodG im Cortex der AngII-behandelten Tiere kam (Abbildung 22 A oben). So zeigten AngII-behandelte Tiere eine dreifach erhöhte Zahl an 8-OxodG-positiven Zellkernen pro  $\text{mm}^2$  Nierenfläche im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 22 B). In der Medulla beider Tiergruppen konnte fast keine Bildung von 8-OxodG nachgewiesen werden. Hier wurde in der gesamten Medulla

## Ergebnisse

sowohl in den Kontroll-, als auch in den AngII-behandelten Tieren lediglich ein 8-OxodG-positiver Zellkern detektiert. Mögliche Gründe für diese hohe Diskrepanz zwischen Cortex und Medulla werden im späteren Verlauf diskutiert.



**Abbildung 22: 8-OxodG-Färbung als Marker für oxidative DNA-Schäden in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf 8-OxodG-positive Zellkerne. **B:** Quantifizierung der 8-OxodG-positiven Zellkerne im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, ROS = reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species); \*\* $p \leq 0,01$  vs. Kontrolle;  $n = 10$  bzw.  $n = 9$  (Kontrolle).

Die immunhistochemischen Untersuchungen von  $\gamma$ H2AX und 8-OxodG zeigten folglich, dass es durch die AngII-Behandlung vermehrt zu DNA-Schäden und Basenmodifikationen v.a. im Cortex der Niere dieser Tiere kam.

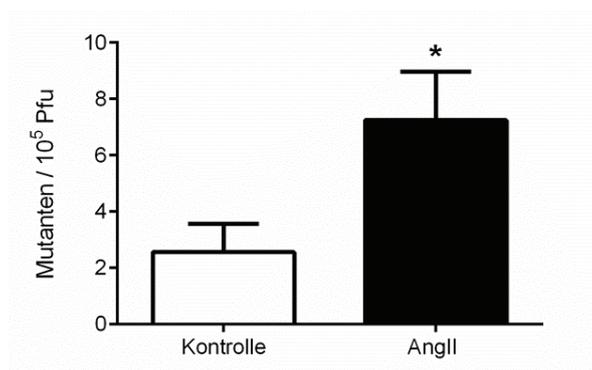
#### 4.5 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Mutationsfrequenz in Nierenzellen

Die Ergebnisse, die bisher betrachtet wurden, sind jedoch nur Marker für oxidativen Stress oder DNA-Schäden, diese könnten aber theoretisch wieder repariert werden. Um nun unsere Hypothese eines karzinogenen Potentials von AngII weiter zu untersuchen, wurde überprüft, ob nach der 20-wöchigen Behandlung mit AngII tatsächlich vermehrt Mutationen in den Nieren der Tiere auftraten.

##### 4.5.1 Untersuchung der Mutationsfrequenz (MF) nach AngII-Behandlung in Nierenzellen

In diesem Modell wurde, wie bereits beschrieben, mit transgenen Big Blue®-Ratten gearbeitet, die integriert in ihrem Genom einen Vektor tragen, mit dessen Hilfe die Mutationsfrequenz (MF) innerhalb des Organismus analysiert werden kann. Hierfür wurden Mutationsfrequenzanalysen in der Niere der Tiere nach 20-wöchiger AngII-Behandlung durchgeführt.

Es zeigte sich, dass es durch die Behandlung mit AngII zu einer Verdreifachung der Mutationsfrequenz kam ( $2,6 \pm 1,0 \times 10^{-5}$  in der DNA der Nieren der Kontroll-Tiere und  $7,2 \pm 1,7 \times 10^{-5}$  in der DNA der Nieren der AngII-behandelten Tiere). Der Unterschied zwischen AngII-behandelter und Kontroll-Tieren war signifikant (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Analyse der Mutationsfrequenz in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Das Ergebnis wird angezeigt als Zahl der Mutationen pro  $10^5$  Pfu (plaque forming units). Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle;  $n = 4$  (Kontrolle) bzw.  $n = 5$  (AngII).

Die genauen Parameter, aus denen sich die Mutationsfrequenz zusammensetzt, sind in Tabelle 8 zu finden. Insgesamt wurden aus den Kontroll-Tieren 10 und aus den

## Ergebnisse

AngII-behandelten Tieren 34 Pfus (Plaque forming unit, Plaque-formende-Einheit) detektiert, welche dann zur Definition des Mutationsspektrums isoliert und sequenziert wurden.

**Tabelle 8: Angaben zur Berechnung der Mutationsfrequenz.** Verwendet wurden für den Mutations-Assay DNA aus der Niere von 5 AngII-behandelten bzw. 4 Kontroll-Tieren. Pfu = Plaque forming unit, MF = Mutationsfrequenz  $\times 10^{-5}$ .

| Tier-Gruppe      | Tier | Gesamt Pfus | Mutierte Pfus | MF    |
|------------------|------|-------------|---------------|-------|
| Kontrolle        | 1    | 118201      | 2             | 1,69  |
| Kontrolle        | 2    | 74521       | 4             | 5,37  |
| Kontrolle        | 3    | 148119      | 1             | 0,68  |
| Kontrolle        | 4    | 119787      | 3             | 2,50  |
| AngII-Behandlung | 1    | 109850      | 8             | 7,28  |
| AngII-Behandlung | 2    | 88695       | 9             | 10,15 |
| AngII-Behandlung | 3    | 185416      | 6             | 3,24  |
| AngII-Behandlung | 4    | 137428      | 5             | 3,64, |
| AngII-Behandlung | 5    | 50375       | 6             | 11,91 |

### 4.5.2 Untersuchung des Mutationsspektrums nach AngII-Behandlung in Nierenzellen

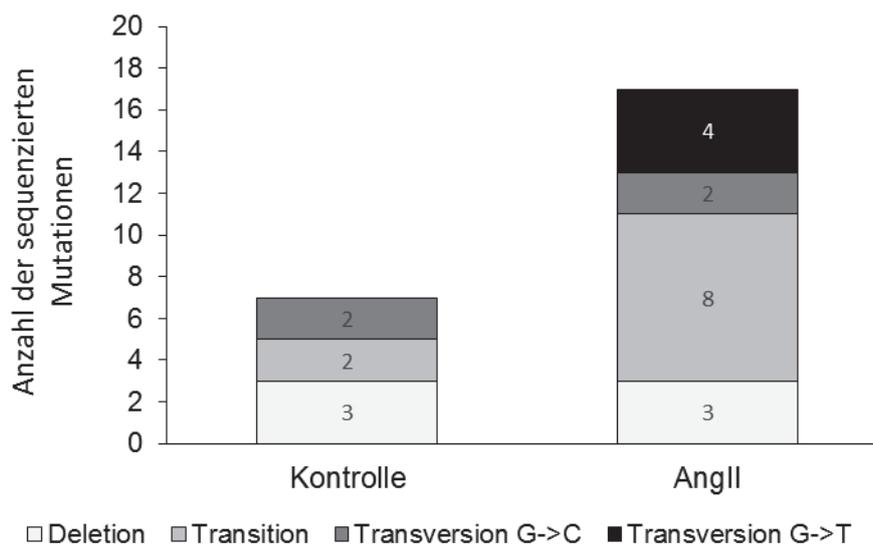
Um nach der detektierten Mutationsfrequenz nun die einzelnen Mutationen genauer zu untersuchen, wurden die mutierten Pfus sequenziert. Somit kann eine Aussage über das Mutationsspektrum getroffen werden. Insgesamt wurden 44 mutierte Pfus detektiert, von denen in 42 das komplette *lacI* sequenziert werden konnte.

Von den 10 sequenzierten Mutanten aus der DNA der Kontroll-Tiere konnte in 7 eine Mutation in der Sequenz nachgewiesen werden, während aus der DNA der AngII-behandelten Tieren von 34 detektierten Pfus in 17 eine Mutation gefunden werden

## Ergebnisse

konnte. Auch durch wiederholte Sequenzierung konnte nicht in allen Pfus, die durch die typische blaue Färbung als mutiert detektiert wurden, eine Mutation nachgewiesen werden. Mögliche Gründe für diese Diskrepanz werden im späteren Verlauf diskutiert. In mutierten Pfus von Kontroll-Tieren wurden drei verschiedene Arten von Mutationen detektiert. Die häufigste Art von Mutationen waren hier Deletionen, gefolgt von G → A Transitionen und G → C Transversionen. Durch die AngII-Behandlung kam es zu einem anderen Mutationsspektrum. Hier war die häufigste Mutation C → T Transitionen, gefolgt von G → T Transversionen, Deletionen und G → C Transversionen (Abbildung 24).

Auffällig war hierbei, dass nur in den AngII-behandelten Tieren G → T Transversionen vorkamen. Diese sind von besonderem Interesse, da sie bekanntermaßen aus nicht-reparierten 8-OxidG DNA-Basenmodifikationen entstehen.



**Abbildung 24: Analyse des Mutationsspektrums in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Gezeigt ist die Anzahl an Deletionen, Transitionen (Austausch einer Purinbase gegen eine andere Purinbase oder Austausch einer Pyrimidinbase gegen eine andere Pyrimidinbase) und Transversionen (Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase oder andersherum), welche in den isolierten Pfus nachgewiesen werden konnten. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin.

Die Betrachtung der Verteilung der Mutationen über die Sequenz des *lacI* zeigte eine Mutation in der Operator-Region, während alle anderen Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz des *lacI* lagen (Abbildung 25). Alle detektierten Mutationen wurden an unterschiedlichen Stellen innerhalb des Gens gefunden, womit eine klonale Expansion ausgeschlossen werden kann. Eine klonale Expansion beschreibt einen Prozess, bei dem eine Zelle durch bestimmte Mutationen ein Wachstumsvorteil

## Ergebnisse

gegenüber gesunden Zellen erlangt hat und sich dadurch unkontrolliert vermehren kann. Alle Tochterzellen weisen somit die gleichen Mutationen auf wie die Ursprungszelle.

Aus diesem Grund kann in dieser Arbeit der Begriff „Mutationsfrequenz“ mit der Bezeichnung „Mutanten-Frequenz“ gleichgesetzt werden.

```
-236 AGC GTC GAT TTT TGT GAT GCT CGT CAG GGG GGC GGA GCC TAT GGA AAA ACG CCA GCA ACG CGG CCT TTT TAC
-164 GGT TCC TGG CCT TTT GCT GGC CTT TTG CTC ACA TGT TCT TTC CTG CGT TAT CCC CTG ATT CTG TGG ATA ACC
-92  GTA TTA CCG CCA TGC ATA CTA GTC TCG AGT ACG TAG GTA CCC GAC ACC ATC GAA TGG TGC AAA ACC TTT CGC
-20  GGT ATG GCA TGA TAG CGC CCG GAA GAG AGT CAA TTC AGG GTG GTG AAT GTG AAA CCA GTA ACG TTA TAC GAT

52  GTC GCA GAG TAT GCC GGT GTC TCT TAT CAG ACC GTT TCC CGC GTG GTG AAC CAG GCC AGC CAC GTT TCT GCG
124 AAA ACG CGG GAA AAA CTG GAA GCG GCG ATG GCG GAG CTG AAT TAC ATT CCC AAC CGC GTG GCA CAA CAA CTG
196 GCG GGC AAA CAG TCG TTG CTG ATT GGC GTT GCC ACC TCC AGT CTG GCC CTG CAC GCG CCG TCG CAA ATT GTC
268 GCG GCG ATT AAA TCT CGC GCC GAT CAA CTG GGT GCC AGC GTG GTG GTG TCG ATG GTA GAA CGA AGC GGC GTC
340 GAA GCC TGT AAA GCG GCG GTG CAC AAT CTT CTC GCG CAA CGC GTC AGT GGG CTG ATC ATT AAC TAT CCG CTG
412 GAT GAC CAG GAT GCC ATT GCT GTG GAA GCT GCC TGC ACT AAT GTT CCG GCG TTA TTT CTT GAT GTC TCT GAC
483 CAG ACA CCC ATC AAC AGT ATT ATT TTC TCC CAT GAA GAC GGT ACG CGA CTG GGC GTG GAG CAT CTG GTC GCA
556 TTG GGT CAC CAG CAA ATC GCG CTG TTA GCG GGC CCA TTA AGT TCT GTC TCG GCG CGT CTG CGT CTG GCT GGC
628 TGG CAT AAA TAT CTC ACT CGC AAT CAA ATT CAG CCG ATA GCG GAA CGG GAA GGC GAC TGG AGT GCC ATG TCC
700 GGT TTT CAA CAA ACC ATG CAA ATG CTG AAT GAG GGC ATC GTT CCC ACT GCG ATG CTG GTT GCC AAC GAT CAG
772 ATG GCG CTG GGC GCA ATG CGC GCC ATT ACC GAG TCC GGG CTG CGC GTT GGT GCG GAT ATC TCG GTA GTG GGA
844 TAC GAC GAT ACC GAA GAC AGC TCA TGT TAT ATC CCG CGC TTA ACC ACC ATC AAA CAG GAT TTT CGC CTG CTG
916 GGG CAA ACC AGC GTG GAC CGC TTG CTG CAA CTC TCT CAG GGC CAG GCG GTG AAG GGC AAT CAG CTG TTG CCC
988 GTC TCA CTG GTG AAA AGA AAA ACC ACC CTG GCG CCC AAT ACG CAA ACC GCC TCT CCC CGC GCG TTG GCC GAT

1060 TCA TTA ATG CAG CTG GCA CGA CAG GTT TCC CGA CTG GAA AGC GGG CAG TGA GCG CAA CGC AAT TAA TGT GAG
1132 TTA GCT CAC TCA TTA GGC ACC CCA GGC TTT ACA CTT TAT GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG TGG AAT TGT GAG
1204 GGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CCG ATT CAC TGG CCG TCG TTT TAC AAC GTC
1276 GTG ACT GGG AAA ACC CTG GCG TTA CCC AAC TTA ATC GCC TTG CAG CAC ATC CCC CTT TCG CCA GCT GGC GTA
1348 ATA GCG
```

**Abbildung 25: Verteilung der sequenzierten Mutationen über das Reportergen *lacI* in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Nicht-kodierende Bereiche sowie Promotor und Operator des Gens sind mit hellgrauen Buchstaben geschrieben, wobei Promotor und Operator fett und kursiv gekennzeichnet sind, die kodierende Sequenz ist in schwarzen Buchstaben dargestellt. Detektierte Mutationen in der Niere von Kontroll-Tieren sind mit Kästchen mit grüner Füllung markiert, während Mutationen in AngII-behandelten Tieren mit einem Kästchen mit blauer Füllung markiert sind. G->T Transversionen, die wahrscheinlich aus nicht-reparierten 8-OxodG Läsionen resultieren, sind rot markiert.

### 4.6 Einfluss einer chronisch erhöhten AngII-Konzentration auf die Apoptose- und Prolifertationsrate in der Niere

Wie bereits erwähnt, wird als ein Kennzeichen von Krebszellen genannt, dass sich diese durch Umprogrammierung von Signalwegen eine erhöhte Resistenz gegen die

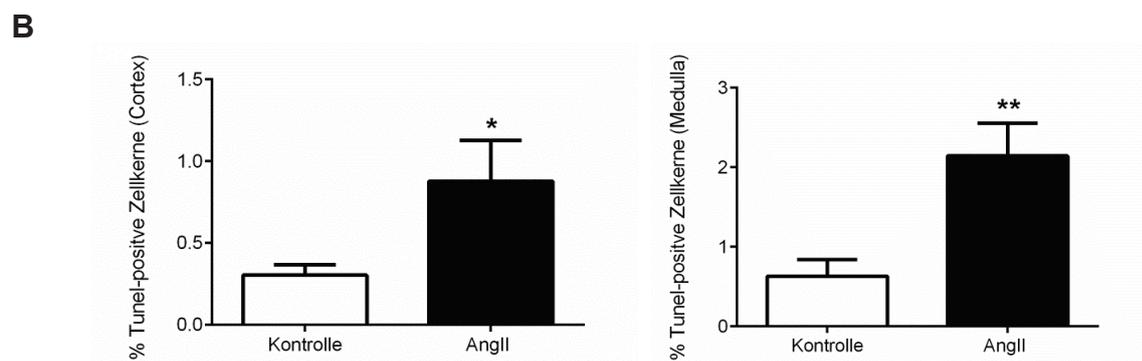
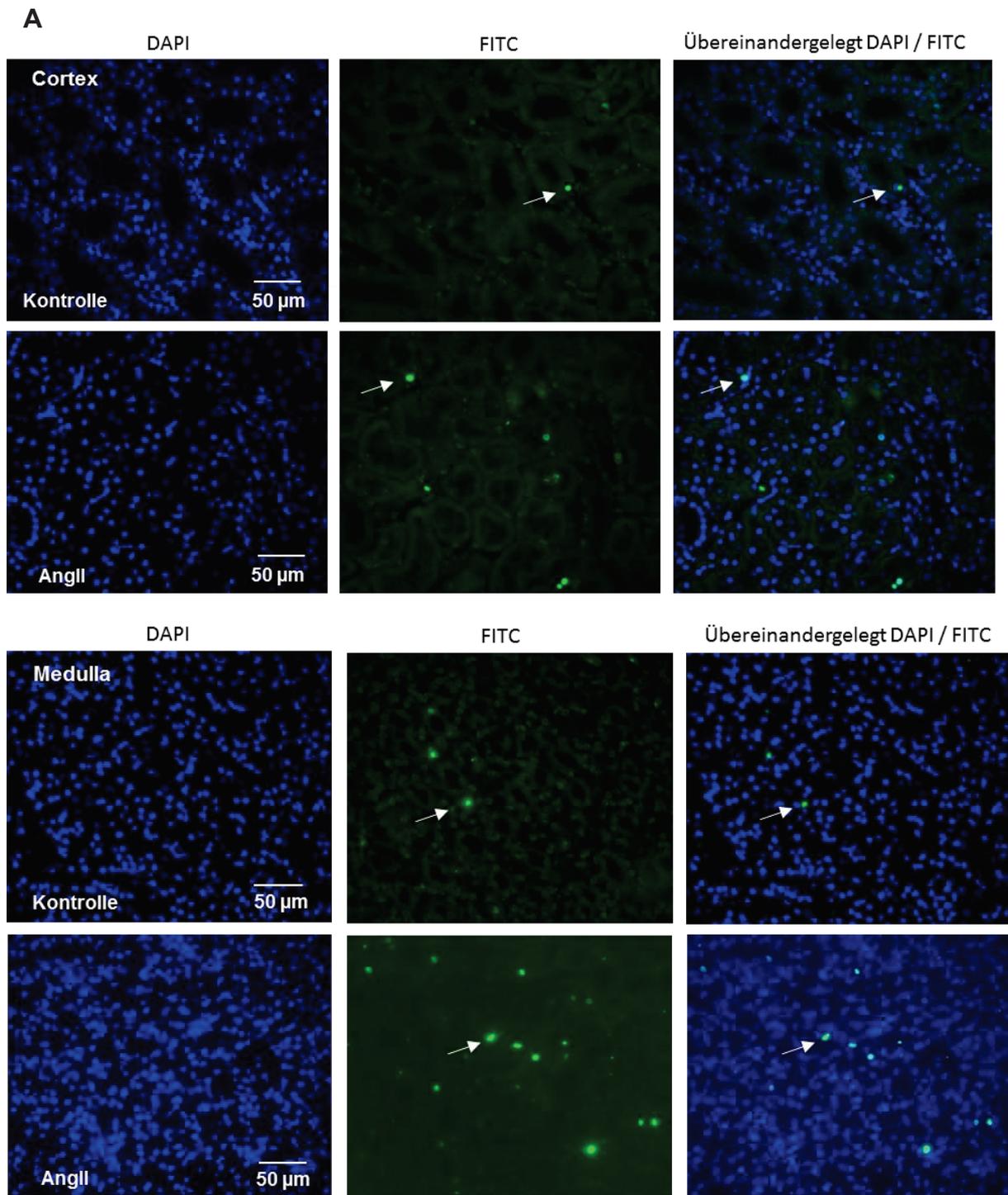
## Ergebnisse

Auslösung von Apoptose aneignen. Um die Apoptoserate der Zellen durch eine AngII-Behandlung zu untersuchen, wurde der Tunel-Assay durchgeführt.

Der Tunel-Assay dient der Detektion von apoptotischen Zellen, indem freie Hydroxygruppen, welche bei der Fragmentierung des DNA-Strangs während der Apoptose entstehen, fluoreszent markiert werden. Dadurch können Zellen mit fragmentierter DNA unter einem Mikroskop sichtbar gemacht.

Die Analyse des Assays zeigte, dass es in AngII-behandelten Tieren zur vermehrten Bildung apoptotischer Zellen kam (Abbildung 26 A). Sowohl im Cortex, als auch in der Medulla von AngII-behandelten Tieren wurde eine Verdreifachung der apoptotischen Zellen detektiert. Dieser Unterschied war sowohl im Cortex als auch in der Medulla signifikant (Abbildung 26 B).

# Ergebnisse



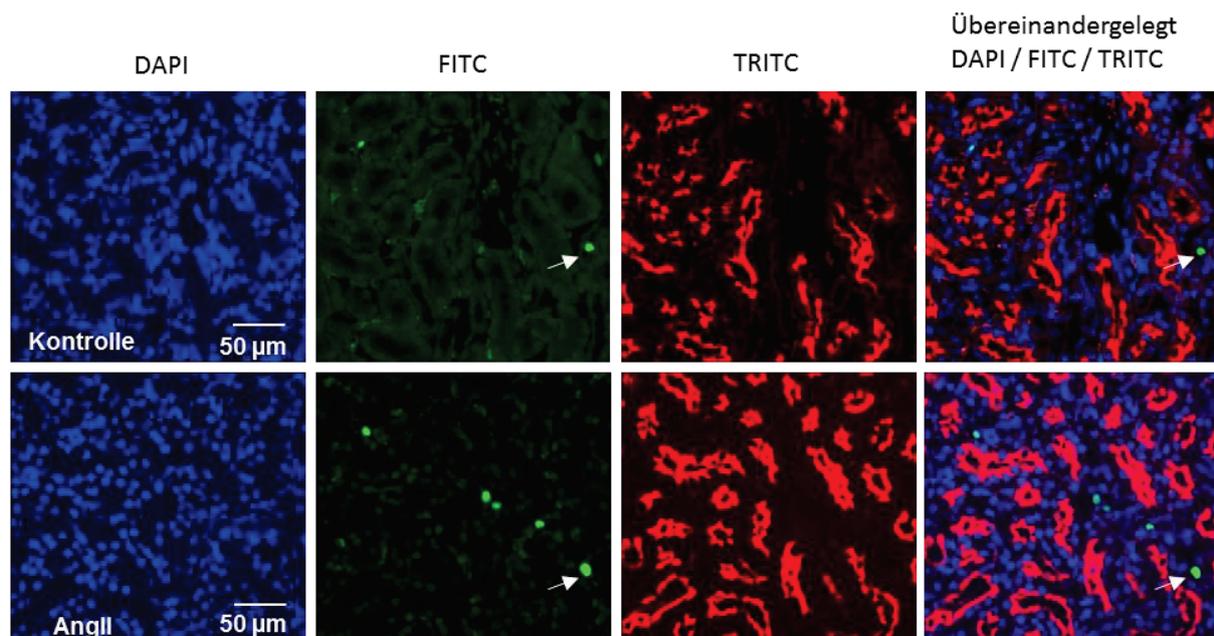
## Ergebnisse

**Abbildung 26: TUNEL-Assay zum Nachweis apoptotischer Zellen in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** **A:** Repräsentative Bilder der Fluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Zu sehen sind im DAPI-Filter alle Zellkerne, im FITC-Filter alle TUNEL-positiven Zellkerne. Die Pfeile zeigen auf beispielhaft auf TUNEL-positive Zellkerne. **B:** Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellkerne im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtzahl der Zellkerne des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  vs. Kontrolle;  $n = 10$  bzw.  $n = 8$  (Kontrolle).

Die ursprüngliche Hypothese, dass sich durch die AngII-Behandlung geschädigte Zellen der Apoptose entziehen können, konnte demzufolge nicht bestätigt werden.

Allerdings konnte in dieser Analyse nicht geklärt werden, um welchen Zelltyp es sich bei den apoptotischen Zellen handelt. Die Betrachtung aller mikroskopischen Bilder legte die Vermutung nahe, dass der Großteil der Zellen mit TUNEL-positiven Zellkernen keine Tubuluszellen waren. Die proximalen Tubuluszellen wären allerdings von besonderem Interesse, da aus Studien hervorgeht, dass sich Nierenkrebs meist aus proximalen Tubuluszellen entwickelt. Um dies weiter zu untersuchen, wurde eine TUNEL-Doppelfärbung mit CD13, einem Marker für proximale Tubuluszellen, durchgeführt.

Diese Doppelfärbung zeigte, dass sowohl in den AngII-behandelten, als auch in den Kontroll-Tieren keine Co-Lokalisation von CD13 mit TUNEL-positiven Zellkernen zu finden war (Abbildung 27). Lediglich je ein TUNEL-positiver Zellkern fand sich in allen Bildausschnitten der AngII-behandelten und Kontroll-Tieren.



**Abbildung 27: TUNEL-CD13-Doppelfärbung zur Analyse von apoptotischen Zellen im proximalen Tubulus in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Zu sehen sind repräsentative Bilder der Fluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten der

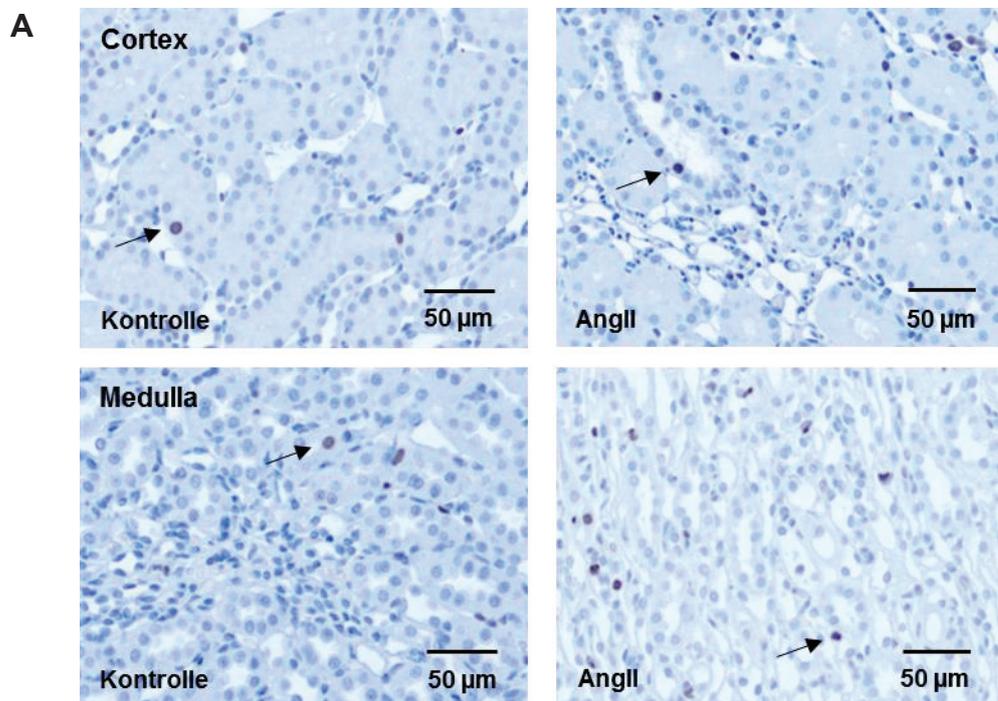
## Ergebnisse

Niere aus dem Cortex, aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Zu sehen sind im DAPI-Filter alle Zellkerne, im FITC-Filter alle TUNEL-positiven Zellkerne und im TRITC-Filter alle CD13-positiven Zellen. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf TUNEL-positive Zellkerne, die nicht mit CD13 co-lokalisiert sind. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; n = 10.

Es kann aus diesen Analysen geschlussfolgert werden, dass die Behandlung von AngII zwar zu einer erhöhten Apoptoserate führte, diese apoptotischen Zellen aber nicht Teil des proximalen Tubulus waren. Um welche Zelltypen es sich bei den apoptotischen Zellen handelt, bleibt weiterhin zu untersuchen und wird im späteren Verlauf diskutiert.

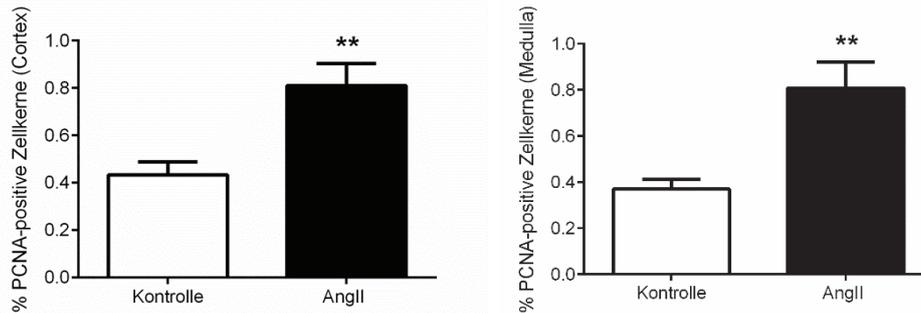
Auch die Proliferationsrate in der Niere wurde untersucht. Hierfür wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) durchgeführt. PCNA wird während der eukaryotischen DNA-Replikation an die DNA rekrutiert und trägt dazu bei, dass die DNA mit einer hohen Geschwindigkeit vervielfältigt werden kann. Als Markerprotein wird es deshalb oft zur Analyse von proliferierenden Zellen verwendet.

Die Untersuchung von PCNA in der Niere zeigte, dass es im Cortex und in der Medulla zu einer Verdopplung von PCNA-positiven Zellen in AngII-behandelten Tieren kam, welche sich signifikant von den Kontroll-Tieren unterschied (Abbildung 28 A,B).



## Ergebnisse

**B**

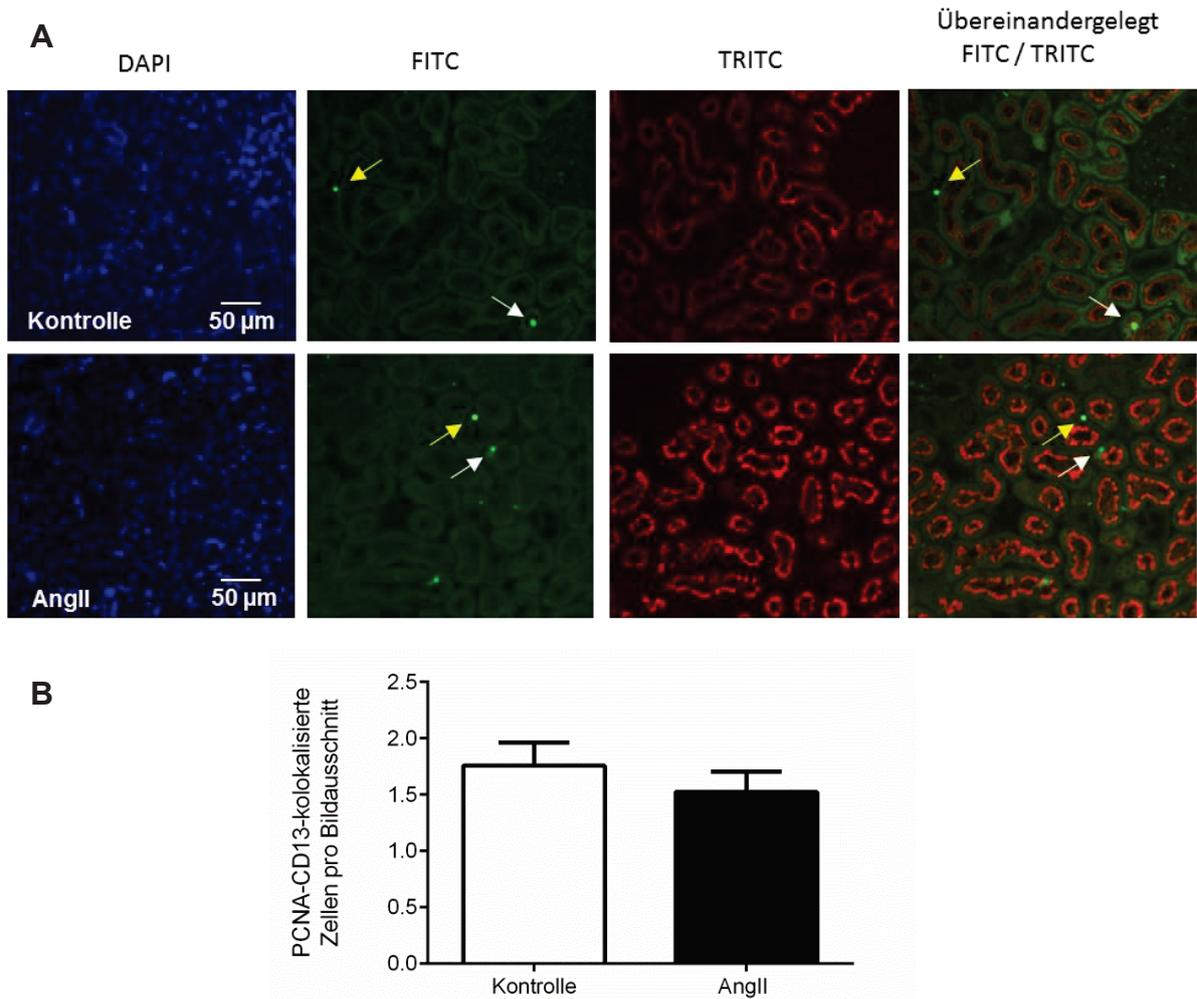


**Abbildung 28: PCNA-Färbung zum Nachweis von proliferierenden Zellen in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf PCNA-positive Zellkerne. **B:** Quantifizierung der PCNA-positiven Zellkerne im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, PCNA = Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen; \*\* $p \leq 0,01$  vs. Kontrolle;  $n = 10$  bzw.  $n = 9$  (AngII).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass eine Behandlung mit AngII zu einer Erhöhung der Proliferation in der Niere beitrug. Allerdings ist auch hier durch einen Nachweis von PCNA noch nicht geklärt, um welche Zelltypen es sich bei den proliferierenden Zellen handelte. Um dies zu klären, wurde eine Doppelfärbung von PCNA mit CD13, dem im vorherigen Verlauf bereits beschriebenen Marker für proximale Tubuluszellen, durchgeführt.

Es zeigte sich, dass in beiden Tier-Gruppen eine Co-Lokalisation von PCNA mit CD13 zu finden war, die sich zwischen Kontroll- und Behandlungstieren nicht unterschied (Abbildung 29 A und B).

## Ergebnisse



**Abbildung 29: PCNA-CD13-Doppelfärbung zur Analyse von proliferierenden Zellen im proximalen Tubulus in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Zu sehen sind repräsentative Bilder der Fluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex, aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Zu sehen sind im DAPI-Filter alle Zellkerne, im FITC-Filter alle PCNA-positiven Zellen und im TRITC-Filter alle CD13-positiven Zellen. Die weißen Pfeile zeigen auf beispielhaft die Co-Lokalisation von PCNA mit CD13, die gelben Pfeile zeigen beispielhaft auf PCNA-positive Zellkerne, die nicht mit CD13 kolokalisiert sind. **B:** Quantifizierung der Co-Lokalisation von PCNA mit CD13 pro Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, PCNA = Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen; n = 10 bzw. n = 9 (Kontrolle).

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass es sich bei den vorher detektierten proliferierenden Zellen auch um Zellen des proximalen Tubulus handelte. Welche Zelltypen außerdem vermehrt proliferieren, bleibt weiterhin zu untersuchen und wird im späteren Verlauf diskutiert.

### **4.7 Einfluss eines überaktivierten RAAS auf die Auflösung einer epithelial-mesenchymalen Transition in der Niere: Vergleich chronische und akute Behandlung**

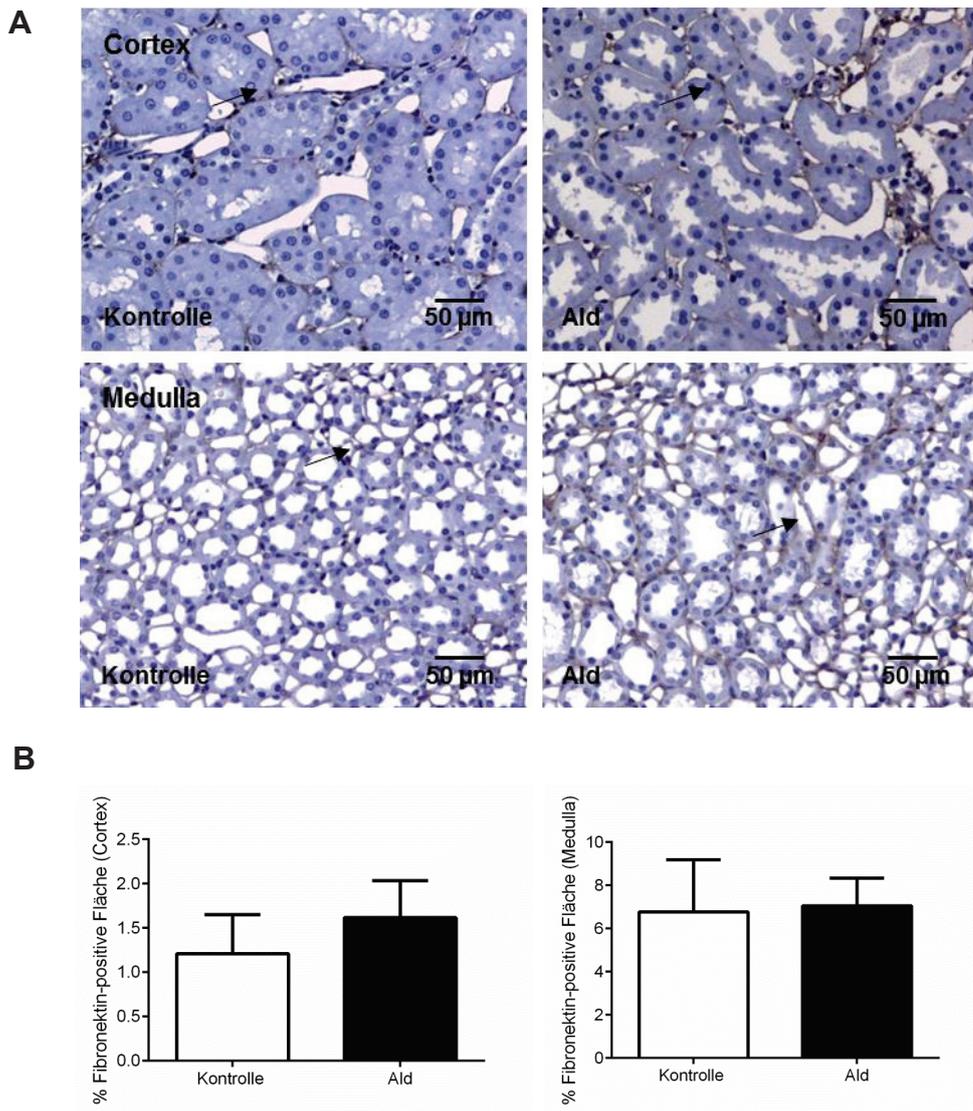
In *in vitro* Modellen mit Nierenzellen wurde gezeigt, dass ein überaktiviertes RAAS den Prozess der EMT initiieren kann. Eine mögliche Auslösung der EMT wurde hier zum einen in dem beschriebenen chronischen AngII-Versuch untersucht. Zum anderen wurden vergleichend dazu Analysen zu einem bereits abgeschlossenen Tierversuch durchgeführt, bei dem Ratten für 4 Wochen mit Ald behandelt wurden, was einer akuten Behandlungszeit entspricht. Diese parallel laufenden Untersuchungen dienten dazu, die Folgen einer AngII- bzw. Aldo-induzierten Hypertonie hinsichtlich der EMT nach einem chronischen (20 Wochen) bzw. akuten (4 Wochen) Behandlungszeitraum zu vergleichen, was Aufschluss über mögliche zeitabhängige Unterschiede in der Aktivierung der EMT geben sollte.

#### **4.7.1 Untersuchung der Expression von mesenchymalen Markern nach akuter Behandlung mit Ald**

Zunächst wurde die Expression der mesenchymalen Markerproteine Fibronectin und Vimentin nach einer 4-wöchigen akuten Behandlung mit Ald untersucht.

Die immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Fibronectin zeigte eine leicht erhöhte Expression von Fibronectin im Cortex von Ald-behandelten Tieren, während sich in der Medulla keine Veränderung detektieren ließ (Abbildung 30 A und B).

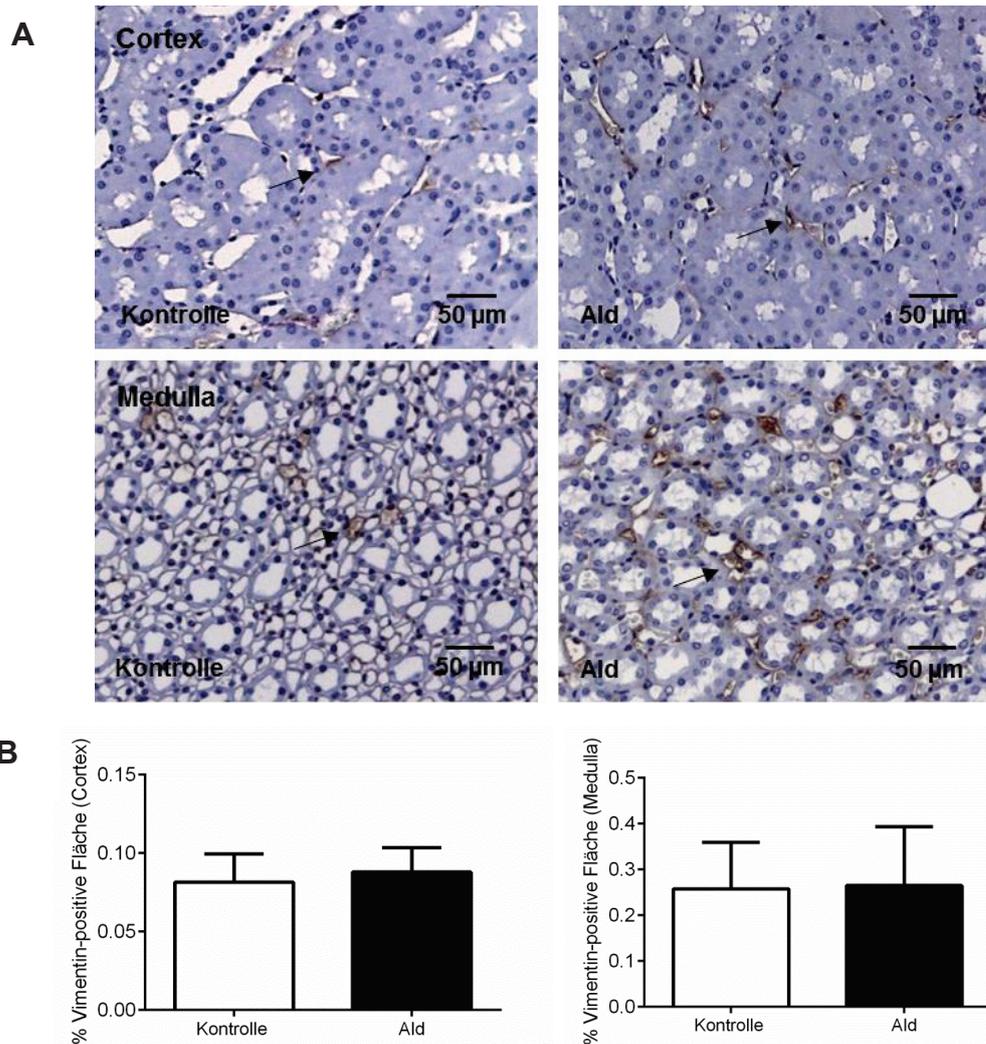
## Ergebnisse



**Abbildung 30: Fibronectin-Färbung als Nachweis des mesenchymalen Markers in der Niere von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Tieren nach 4-wöchiger Behandlung. A:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Fibronectin-positive Flächen. **B:** Quantifizierung der Fibronectin-positiven Fläche im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. Ald = Aldosteron-behandelte Tiere; n = 8 bzw. n = 7 (Kontrolle).

Auch der weitere untersuchte mesenchymale Marker Vimentin zeigte keine veränderte Expression nach 4-wöchiger Ald-Behandlung (Abbildung 31 A und B).

## Ergebnisse

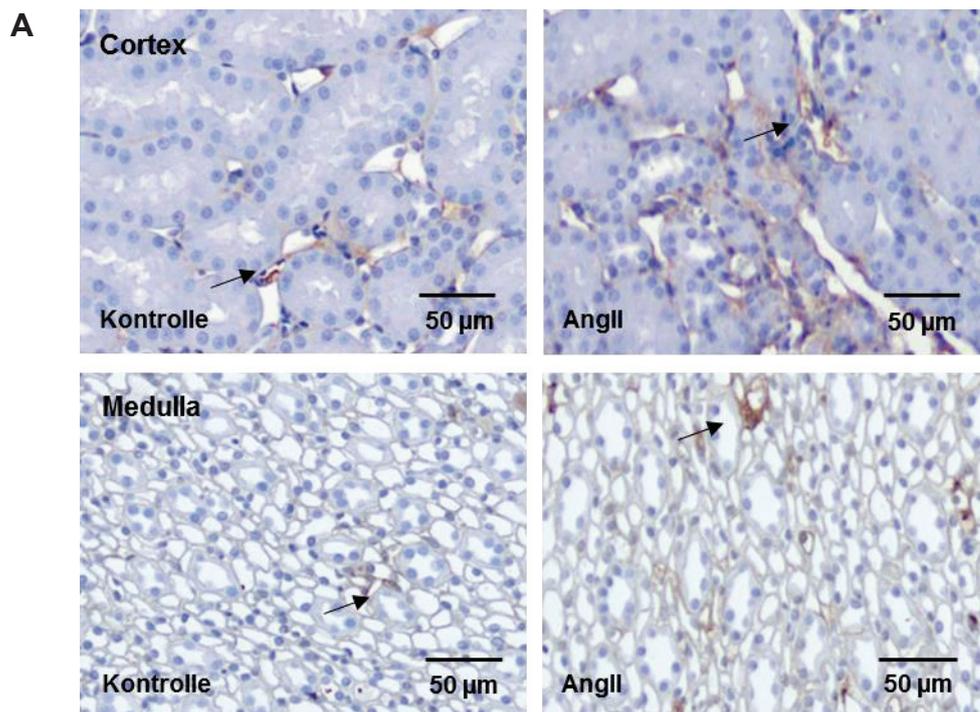


**Abbildung 31: Vimentin-Färbung als Nachweis des mesenchymalen Markers in der Niere von Aldosteron-infundierten und Kontroll-Tieren nach 4-wöchiger Behandlung. A:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Vimentin-positive Flächen. **B:** Quantifizierung der Vimentin-positiven Fläche im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. Ald = Aldosteron-behandelte Tiere; n = 8 bzw. n = 7 (Ald).

Die Analysen des 4-wöchigen akuten Ald-induzierten Hypertonie-Versuchs zeigten folglich, dass es nach diesem Behandlungszeitraum zu keiner erhöhten Expression von mesenchymalen Markerproteinen kam. Da durch diese fehlende Erhöhung von mesenchymalen Markern eine Aktivierung einer EMT ausgeschlossen werden kann, wurde auf die Analyse von epithelialen Markern verzichtet.

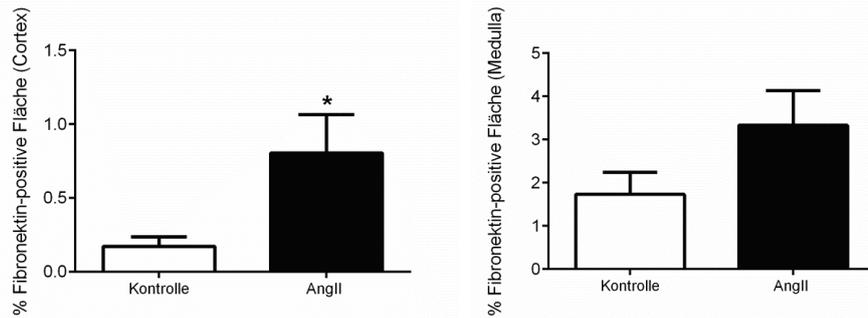
#### 4.7.2 Untersuchung der Expression von mesenchymalen Markern nach chronischer Behandlung mit AngII

Zunächst wurde die Expression des mesenchymalen Markers Fibronektin sowohl auf Proteine-Ebene mittels Immunhistochemie, als auch auf RNA-Ebene mittels RNAscope® Technologie in Tieren nach 20-wöchiger AngII-Behandlung untersucht. Die immunhistochemische Färbung zeigte sowohl im Cortex, als auch in der Medulla eine erhöhte Expression von Fibronektin in der Niere der Tiere nach 20-wöchiger AngII-Behandlung (Abbildung 32 A). Die Quantifizierung der Fibronektin-positiven Fläche bestätigte die Beobachtung und zeigte eine vierfach erhöhte Expression von Fibronektin im Cortex von AngII-Tieren sowie eine Verdopplung der Expression in der Medulla (Abbildung 32 B). Hier war der Unterschied der Expression zwischen beiden Tiergruppen allerdings, anders als im Cortex, aufgrund der hohen Standardabweichung innerhalb der Gruppe nicht signifikant.



## Ergebnisse

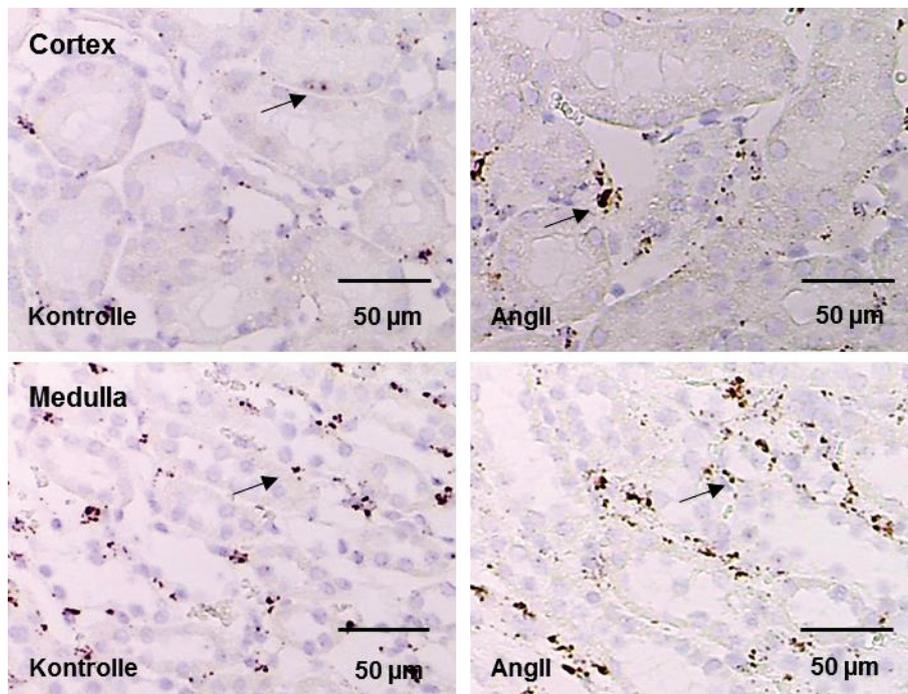
**B**



**Abbildung 32: Fibronectin-Färbung als Nachweis für mesenchymale Zellen in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Fibronectin-positive Fläche. **B:** Quantifizierung der Fibronectin-positiven Fläche im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle;  $n = 9$ .

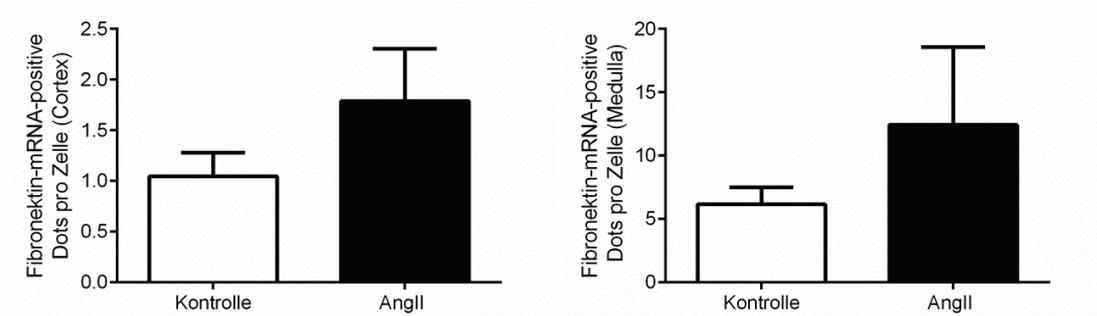
Auch auf RNA-Ebene zeigte sich eine tendenziell erhöhte Expression von Fibronectin im Cortex und der Medulla von AngII-behandelten Tieren, verglichen mit den Kontroll-Tieren (Abbildung 33 A), allerdings war der Unterschied zwischen beiden Gruppen aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Individuen nicht signifikant (Abbildung 33 B)

**A**



## Ergebnisse

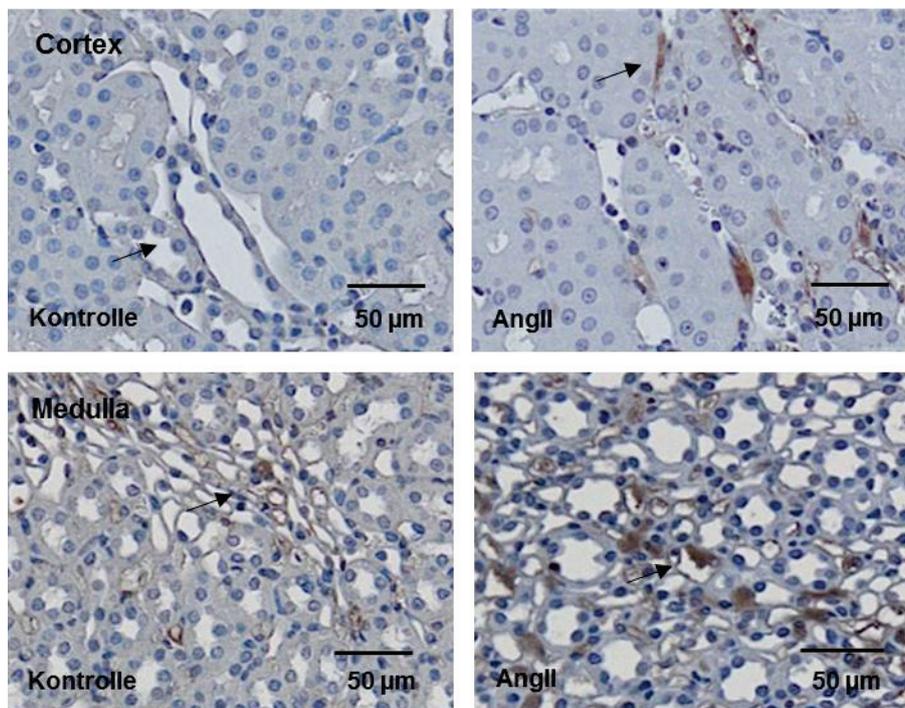
**B**



**Abbildung 33: Analyse der Expression des mesenchymalen Markers Fibronectin auf RNA-Ebene in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung mittels RNAscope® Technologie. A:** Repräsentative Bilder der Hybridisierung auf Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 400-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Fibronectin-mRNA-positive Dots. **B:** Quantifizierung der Fibronectin-mRNA-positiven Dots im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; n = 10.

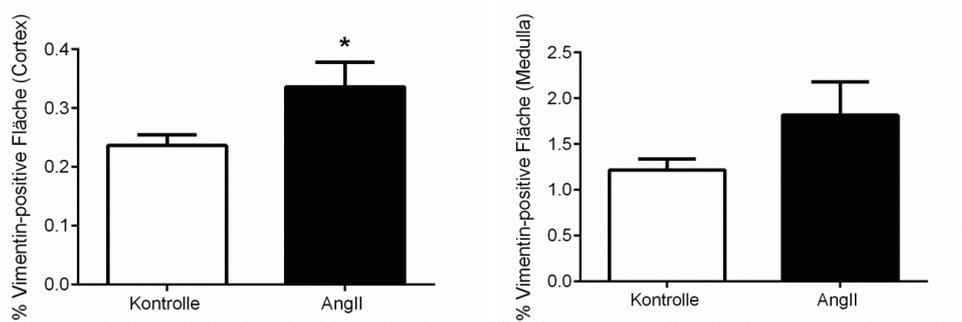
Weiterhin wurde die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Färbung in der Niere untersucht. Auch hier ließ sich, wie bei dem bereits untersuchten Marker Fibronectin, eine erhöhte Expression sowohl im Cortex, als auch in der Medulla nach 20-wöchiger AngII-Behandlung detektieren (Abbildung 34 A). Die Erhöhung der Expression war im Cortex von AngII-behandelten Tieren signifikant verglichen mit den Kontroll-Tieren und auch in der Medulla war sie tendenziell erhöht (Abbildung 34 B).

**A**



## Ergebnisse

**B**



**Abbildung 34: Vimentin-Färbung als Nachweis des mesenchymalen Markers in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** **A:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Vimentin-positive Flächen. **B:** Quantifizierung der Vimentin-positiven Fläche im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; \* $p \leq 0,05$  vs. Kontrolle;  $n = 10$ .

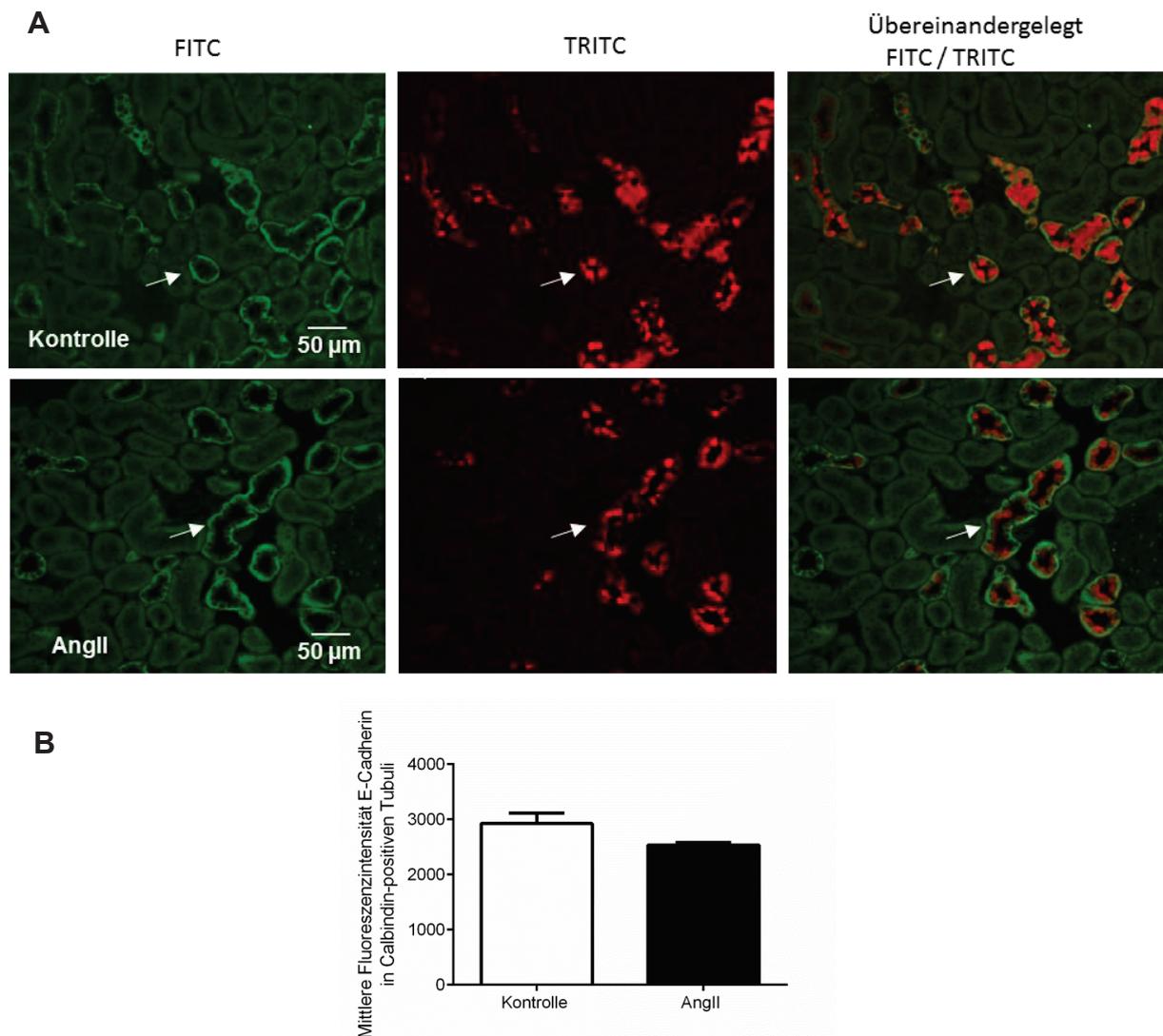
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine 20-wöchige Behandlung mit AngII zu einer erhöhten Expression von beiden untersuchten mesenchymalen Markern Fibronektin und Vimentin führte, was auf eine Aktivierung einer EMT zurückgeführt werden könnte.

### 4.7.3 Untersuchung der Expression von epithelialen Markern nach chronischer Behandlung mit AngII

E-Cadherin wird bekanntermaßen in der Niere von einigen Wirbeltieren nicht in allen Zelltypen gleichermaßen exprimiert. So konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin in der Niere von Schweinen v.a. im distalen Tubulus und in der Henle-Schleife lokalisiert ist [166]. Auch in dieser Arbeit wurde zunächst die Lokalisation von E-Cadherin untersucht. So zeigte sich, dass E-Cadherin auch in Ratten nicht im proximalen (siehe Anhang), aber dafür im distalen Tubulus exprimiert wird. Um Fehler bei der Auswertung zu vermeiden, die auf die unterschiedliche Expression in den verschiedenen Nierenzelltypen zurückzuführen sind, wurde daher nur die Expression von E-Cadherin in den distalen Tubuli untersucht. Hierfür wurde eine Doppelfärbung von E-Cadherin mit Calbindin, einem Marker für distale Tubuluszellen, durchgeführt. Es zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Fluoreszenzintensität in den untersuchten distalen Tubuli der AngII-behandelten Tiere, vergleichen mit Kontroll-

## Ergebnisse

Tieren (Abbildung 35 A). Diese Intensitätsabnahme erreichte allerdings keine Signifikanz zwischen den beiden Tiergruppen (Abbildung 35 B).

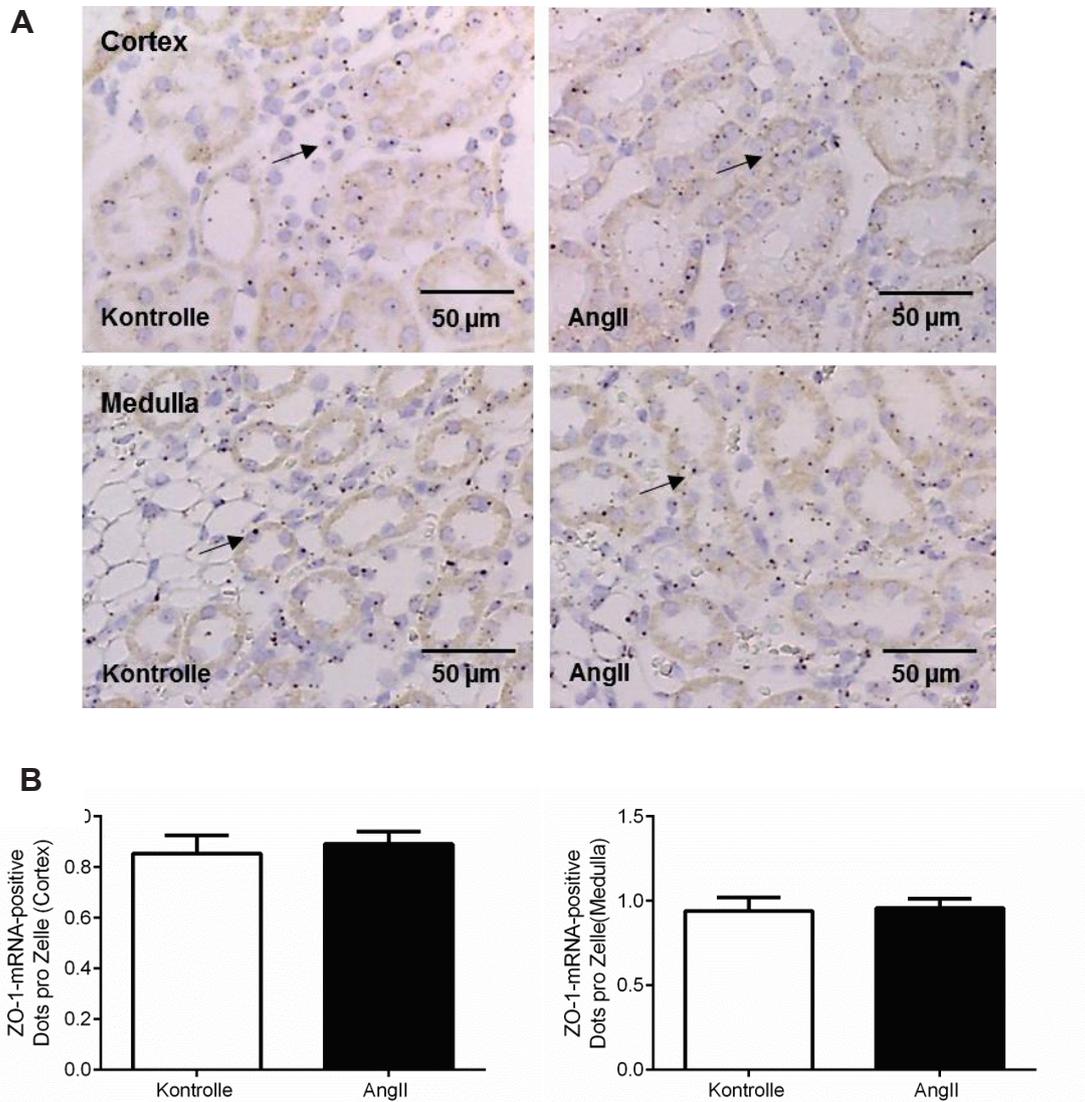


**Abbildung 35: E-Cadherin-Calbindin-Doppelfärbung zur Quantifizierung epithelialer Marker im distalen Tubulus in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Zu sehen sind repräsentative Bilder der Fluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex, aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Zu sehen sind im FITC-Filter alle E-Cadherin-positiven Zellen und im TRITC-Filter alle Calbindin-positiven Zellen. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Co-Lokalisation von E-Cadherin mit Calbindin. **B:** Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von E-Cadherin in ca. 100 Calbindin-positiven Zellen, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere; n = 10 bzw. n = 9 (AngII).

Als weiterer Marker für epitheliale Zellen wurde die Expression von ZO-1 untersucht. Allerdings konnte hier aufgrund fehlender Verfügbarkeit funktionierender Antikörper nur die Expression mittels RNAscope® auf RNA-Ebene, aber nicht die Expression auf Protein-Ebene untersucht werden. Bei Betrachtung der Bilder der RNA-Analysen zeigte sich kein Unterschied in der Expression von ZO-1 zwischen Kontroll- und AngII-

## Ergebnisse

behandelten Tieren (Abbildung 36 A), was die Quantifizierung bestätigte (Abbildung 36B).



**Abbildung 36: Analyse der Expression des epithelialen Markers ZO-1 auf RNA-Ebene in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung mittels RNAscope® Technologie. A:** Repräsentative Bilder der Hybridisierung auf Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex (oben) und der Medulla (unten), aufgenommen in einer 400-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf ZO-1-mRNA-positive Dots. **B:** Quantifizierung der ZO-1-mRNA-positiven Dots im Cortex (links) und der Medulla (rechts), bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen des Gewebes im jeweiligen Bildausschnitt, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, ZO-1 = Zonula Occludens; n = 10.

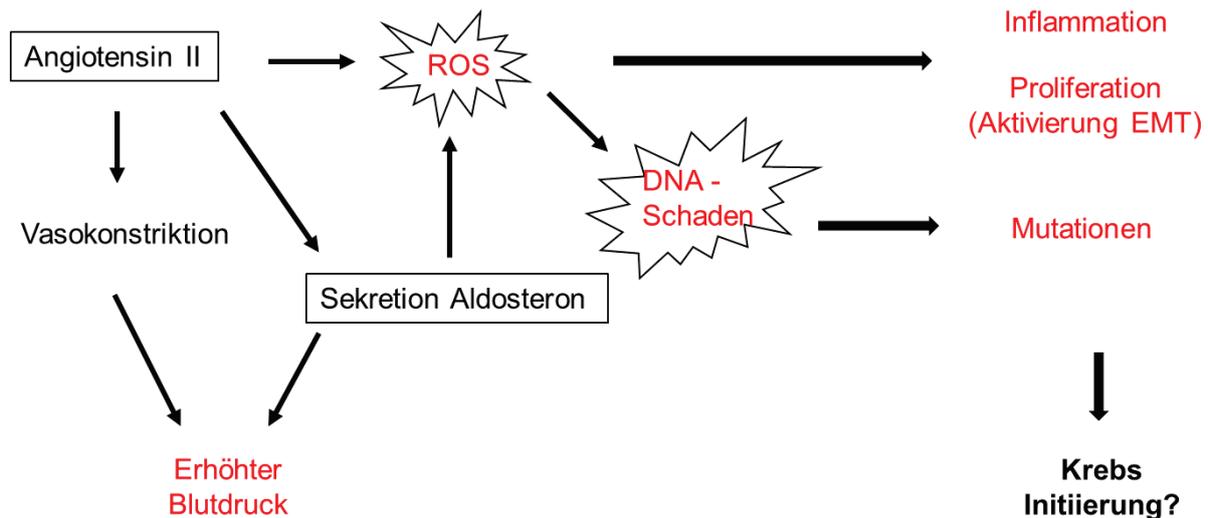
Betrachtet man beide untersuchten Marker, E-Cadherin und ZO-1, kann zusammenfassend gesagt werden, dass es durch eine 20-wöchige AngII-Behandlung zu keiner signifikanten Verringerung der Expression von epithelialen Markern kam.

### 5. Diskussion

Das RAAS ist eine hormonelle Kaskade, die zur Regulation des Blutdrucks beiträgt. AngII agiert als einer von zwei Haupteffektoren des RAAS und vermittelt durch die Bindung an den AT1R eine Verengung der Blutgefäße, was zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt. Im gesunden Menschen trägt das RAAS zu einem ausbalancierten Blutdruck bei, unter krankhaften Bedingungen ist dieser Mechanismus jedoch gestört und es kommt zu einer Überaktivierung des RAAS und einer vermehrten Ausschüttung von AngII [161]. Zusätzlich zu den Blutdruck-regulierenden Eigenschaften können erhöhte Konzentrationen von AngII auch zu pathologischen Veränderungen wie einer Nierenfibrose führen [47]. Darüberhinaus könnten Veränderungen im RAAS zu einem gesteigerten Nierenkrebs-Risiko in Hypertonie-Patienten beitragen [160].

Untersuchungen in dieser Arbeit sollten dazu beitragen, aufzuklären, ob eine chronische Behandlung mit erhöhten AngII-Konzentrationen bestimmte Signalwege im Körper verändert, die zu diesem gesteigerten Krebsrisiko beitragen. Dieses durch AngII verursachte erhöhte Nierenkrebsrisiko könnte sich einer vermehrten Anzahl von Mutationen in der Niere widerspiegeln. Außerdem wurden AngII-induzierte Veränderungen wie eine vermehrte Produktion von ROS und damit verbundenen DNA-Schäden in der Niere sowie eine erhöhte Inflammation untersucht. Auch das Apoptose- und Proliferationsverhalten von Nierenzellen sowie eine Aktivierung der EMT in der Niere wurde analysiert. (Abbildung 37).

Im Folgenden werden die einzelnen Punkte, die zu dieser Aufklärung beitragen sollen, genauer diskutiert.



**Abbildung 37: Schematische Darstellung der durch erhöhte Angiotensin II-Konzentrationen veränderte Endpunkte.** AngII induziert über einen direkten Weg eine Vasokonstriktion der peripheren Blutgefäße, was zu einer Erhöhung des Blutdruck führt. Durch Bindung an den AT1-Rezeptor kommt es bei pathologisch gesteigerten AngII-Konzentrationen zu einer vermehrten Produktion von ROS, welche wiederum DNA-Schäden verursachen können. Werden diese DNA-Schäden von der Zelle nicht repariert, können sie sich als Mutationen in der Zelle manifestieren. Erhöhte AngII-Konzentrationen führen außerdem zu einer vermehrten Inflammation und möglicherweise zu der Aktivierung einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), was eine gesteigerte Proliferation zur Folge haben kann. AngII fördert zusätzlich die erhöhte Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere. Aldosteron kann wiederum ähnliche Signalwege induzieren wie AngII. Die pathologischen Veränderungen der aufgeführten Endpunkte könnten folglich zu einer Initiierung von Krebs beitragen und eine Erklärung für das erhöhte Krebsrisiko in Hypertonie-Patienten darstellen. In Rot dargestellt sind Endpunkte, die in der Arbeit untersucht und im Folgenden genauer diskutiert werden. ROS = reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species).

## 5.1 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration induziert Hypertonie und verschlechtert die generelle Nierenfunktion

Das Einsetzen der osmotischen Minipumpen und die damit verbundene Infusion von 400 µg AngII / kg pro Tag führte zu einer Erhöhung des Blutdrucks um ca. 100 mmHg über den gesamten Behandlungszeitraum. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von AngII im Modellorganismus zu einer Erhöhung des Blutdrucks führen [17]. In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte in Mäusen ebenfalls eine AngII-induzierte Hypertonie nachgewiesen werden [92, 93, 167]. Auch eine dosisabhängige Erhöhung des Blutdrucks mit einer damit verbundenen Verschlechterung der Nierenfunktion konnten wir zeigen [92]. Da es noch keine vergleichbaren Versuche mit einer AngII-Infusion in Ratten über einen so langen Zeitraum gibt, wurde mit einer vergleichsweise niedrigen Konzentration gearbeitet, sodass eine daraus resultierende Hypertonie auch über einen Behandlungszeitraum von 20 Wochen für die Tiere tolerierbar war. Trotz der

eher niedrig eingesetzten AngII-Konzentration entwickelte sich allerdings eine Hypertonie, die vergleichbar ist mit der von der WHO bezeichneten Grad-3-Hypertonie [168]. Dieser Schweregrad ist nachgewiesenermaßen assoziiert mit einem erhöhten Krebsrisiko [9].

Weiterhin ist bekannt, dass es durch erhöhte intrarenale AngII-Konzentrationen unter Hypertonie-Bedingungen zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion kommt [17].

Die Betrachtung des GSI/MSI zeigte eine pathologische Veränderung der Glomeruli in den AngII-behandelten Tieren, was ein Hinweis auf eine verschlechterte Filtration und somit eine verschlechterte Nierenfunktion ist. Zusätzlich zeigte auch die histopathologische Untersuchung der Tubuli mittels des TSI eine signifikante Veränderung in den AngII-behandelten Tieren. Da in die Bewertung des TSI auch die Bildung von fibrotischem Gewebe mit einbezogen wird, wird der TSI in Kapitel 5.2 detaillierter diskutiert. Diese histologisch beobachteten Veränderungen werden oft bei der Bewertung eines Nierenschadens zu Hilfe gezogen und gelten als wichtige Eckpunkte in der Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen [169].

Weiterhin konnte in dieser Arbeit eine erhöhte Albumin-Ausschüttung und eine verschlechterte Kreatinin-Clearance detektiert werden, was zusätzlich auf eine Verschlechterung der Nierenfunktion hindeutet. Die Albumin-Ausscheidung der behandelten Tiere war deutlich erhöht. Eine AngII-bedingte gesteigerte Albumin-Ausscheidung konnte auch in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe in Mäusen nach vier Wochen [92, 93, 167] und in weiteren Studien in Ratten nach 8 Wochen bestätigt werden [170]. Die Kreatinin-Clearance hingegen war in den AngII-behandelten Tieren nur tendenziell verschlechtert. Somit stehen die beiden Ergebnisse nicht im vollen Einklang miteinander. Allerdings ist hier zu erwähnen, dass die Bestimmung der Kreatinin-Clearance einige bekannte experimentelle Schwierigkeiten wie beispielsweise Interaktionen sogenannter Pseudo-Chromogene (Proteine, Glucose usw.) bei der Jaffe-Reaktion birgt [171]. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Kreatinin-Clearance in den behandelten Tieren nur tendenziell verschlechtert ist, während die Albumin-Ausscheidung deutlich erhöht war. Eine vermehrte Albumin-Ausscheidung im Urin und eine verschlechterte Kreatinin-Clearance finden sich häufig bei Hypertonie-Patienten und sind erste Anzeichen einer Nierenfunktionsstörung. Die erhöhte Ausscheidung weist auf eine Filtrationsstörung der Glomeruli oder auf eine Beeinträchtigung der Reabsorption von Proteinen im Tubulus hin [172].

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl die pathologischen Veränderungen der Glomeruli und des Tubulussystems, als auch die vermehrte Albumin-Ausscheidung und die verschlechterte Kreatinin-Clearance auf eine Verschlechterung der Nierenfunktion, bedingt durch die AngII-Behandlung, hindeuten.

### **5.2. Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu einer verstärkten lokalen Inflammation sowie zu Nierenfibrose**

Erhöhte AngII-Konzentrationen sind bekanntermaßen assoziiert mit einer vermehrten Infiltration von inflammatorischen Zellen in die Niere und damit einhergehend einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen [47, 98, 99]. Auch ein Anstieg an CD68-positiven Zellen konnte nach einer AngII-Behandlung in Mäusen gezeigt werden [173]. Passend zu diesen Beobachtungen konnte auch in dieser Arbeit eine deutlich erhöhte Anzahl an infiltrierenden Makrophagen (CD68-positive Zellen) in den AngII-behandelten Tieren gezeigt werden.

Bei Gewebeschädigung werden inflammatorische Monozyten aus der Zirkulation in das Gewebe rekrutiert und dort zu Makrophagen differenziert. In frühen Stadien der Wundheilung setzen diese Makrophagen oft inflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , und IL-1 frei, wodurch eine Immunreaktion ausgelöst wird. Durch die Freisetzung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine werden außerdem T-Zellen aktiviert, die die Immunabwehr verstärken. So konnte bereits gezeigt werden, dass inflammatorische Makrophagen zu einer inflammatorischen Progression beitragen können, sollte die Immunreaktion nicht unter strenger Kontrolle stehen [174].

Um hier eine Aktivierung der Immunabwehr weiter zu untersuchen, könnte außerdem eine Aktivierung von T-Zellen in der Niere untersucht werden.

Systemisch ließ sich in dieser Arbeit keine Erhöhung von pro-inflammatorischen Zytokinen feststellen, jedoch eine Verringerung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. IL-10 übt als anti-inflammatorisches Zytokin eine schützende Wirkung auf den Organismus vor einer übermäßigen Immunantwort aus, indem es beispielsweise aktivierte Makrophagen hemmt [175].

Die Freisetzung von IL-10 wirkt protektiv gegenüber AngII-induziertem oxidativem Stress oder Herzerkrankungen [99]. In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass IL-10 über die Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität oxidativen Stress verringern kann und auch zu einer Senkung des Blutdrucks führt [176]. Auch als

## Diskussion

Therapeutikum konnte IL-10 seine protektiven Eigenschaften in *in vivo* Experimenten unterstreichen, indem es bei Verabreichung AngII-vermittelte Effekte wie Bluthochdruck in Mäusen verringern konnte [177]. Unterstützt werden diese Studien durch die Arbeit von Mirhafez *et al.*, welche in 155 Hypertonie-Patienten und 148 gesunden Kontrollen die Expression verschiedener Zytokinen untersuchten und zeigen konnten, dass in Hypertonie-Patienten die Serumkonzentration von IL-10 reduziert war [178]. Eine Herunterregulierung von IL-10 im Organismus scheint folglich Teil der modifizierten Signalwege bei der Entstehung der AngII-induzierten Hypertonie zu sein [177]. Allerdings zeigten Patienten in dieser Studie auch eine höhere Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , was in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden konnte. Dabei ist zu erwähnen, dass die untersuchten Zytokine nur auf systemischer Ebene untersucht wurden und nicht zusätzlich dazu auf lokaler Ebene in der Niere. In Tierversuchen mit AngII-behandelten Ratten konnte beispielsweise ein Anstieg des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  in der Niere gezeigt werden [179]. Auch in der vorliegenden Arbeit könnte es trotz systemisch konstanter Level der pro-inflammatorischen Zytokine zu einer vermehrten Freisetzung in der Niere gekommen sein. Um hierzu verlässliche Aussagen treffen zu können, müssten sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine in der Niere untersucht werden.

Ein weiterer Grund für die ausbleibende Freisetzung an pro-inflammatorischen Zytokinen in der Zirkulation könnte sein, dass die Freisetzung von Zytokinen in Abhängigkeit des jeweiligen Untersuchungszeitpunktes stark variiert, d.h. je nach Stadium der Hypertonie bzw. Stadium des damit verbundenen Nierenschadens unterschiedliche Zytokine freigesetzt werden. So wurde beispielsweise in einer Studie eine vermehrte Freisetzung von TNF- $\alpha$  als pro-hypertensives Zytokin erst in späten Stadien der Hypertonie detektiert [180]. Möglicherweise könnte man auch in den in dieser Arbeit untersuchten Tieren ein anderes Spektrum an freigesetzten Zytokinen nachweisen, hätte man zu einem anderen Zeitpunkt deren Freisetzung im Serum untersucht.

Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Daten schließen, dass eine Behandlung über 20 Wochen mit AngII zu einer erhöhten Infiltration von inflammatorischen Zellen in die Niere geführt hat und systemisch eine reduzierte Serumkonzentration von IL-10 begünstigt hat.

Eine vermehrte Infiltration von inflammatorischen Zellen und die damit verbundene Freisetzung von Zytokinen führt bekanntermaßen zur Bildung von interstitieller Fibrose [106]. Dies geschieht u.a. durch eine Aktivierung von Fibrozyten, die ruhende Form der Fibroblasten. Durch verschiedene Mediatoren wie Interleukine differenzieren diese Fibrozyten zu Fibroblasten [181] was in einer vermehrten Kollagen-Ablagerung resultiert.

Der erhöhte TSI-Wert nach AngII-Behandlung könnte ein Indiz für eine Nierenfibrose sein. Auch in vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit AngII zu einer signifikanten Erhöhung des TSI führt [93]. Der TSI bewertet sowohl das Einwandern von inflammatorischen Zellen, eine Atrophie der Basalmembran sowie die Bildung interstitieller Fibrose. Daher kann ein erhöhter TSI nicht eindeutig auf eine Fibrose zurückgeführt werden. Da der TSI-Wert nach AngII-Behandlung in unserem Fall jedoch deutlich erhöht ist, ist ein vermehrtes Vorkommen von interstitieller Fibrose wahrscheinlich. Zusätzlich unterstützt die gemessene und vermehrte Ablagerung von Kollagen im interstitiellen Raum der Niere nach AngII-Behandlung die Annahme einer AngII-induzierten Fibrose, die auch von anderen Studien bekannt ist [108-111].

Abschließend lässt sich also festhalten, dass eine Behandlung über 20 Wochen mit AngII zu einer erhöhten lokalen Inflammation führte, welche weiterhin zu einer vermehrten Bildung von interstitieller Fibrose führte.

### **5.3 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zur vermehrten Bildung von ROS in der Niere**

Oxidativer Stress gilt als Schlüsselkomponente in der Entwicklung von progressivem Nierenschaden [57]. Auch unter Hypertonie-Bedingungen kommt es zu einer vermehrten Produktion von ROS [100, 182]. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass ein überaktiviertes RAAS, sei es über Infusion von Ald oder AngII, *in vitro* und *in vivo* zu erhöhten ROS-Leveln führt [92, 93, 167, 183], was mit Daten aus anderen tierexperimentellen Versuchen übereinstimmt [92, 93, 167, 184].

Auch eine AngII-Dosisabhängigkeit und damit verbundene ansteigende Level von ROS konnten wir *in vivo* im Maus-Modell nachweisen [92]. Durch den Einsatz der NADPH-Oxidase Inhibitoren Apocynin und VAS2870 konnten wir auch zeigen, dass die Erhöhung von ROS bei einem überaktivierten RAAS über eine Aktivierung der

NADPH-Oxidase vonstattengeht [185]. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch erhöhte AngII-Konzentrationen konnte auch in anderen Studien bestätigt werden [186-188].

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine vermehrte Ausscheidung der oxidierten Lipide TBARS und 15-Isoprostan  $F_{2t}$  durch AngII festgestellt werden, sondern entgegen der Erwartungen sogar eine deutlich verringerte Ausscheidung. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu anderen Studien, in denen es zu einer erhöhten Ausscheidung von TBARS und 15-Isoprostan  $F_{2t}$  in AngII-infundierten Ratten kam [189, 190]. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass in keinem dieser Tiermodelle die Ausscheidung nach einer so langen Behandlungszeit untersucht wurde und somit möglicherweise auch der damit verbundene Nierenschaden nicht vergleichbar ist mit dem Schaden, den die Tiere durch unsere chronische Behandlung aufwiesen. So zeigten Whitehouse *et al.* in einer Studie, in der sie Katzen mit Nierenschäden unterschiedlicher Stadien untersuchten, dass es in diesen Tieren zu einer unterschiedlichen Ausscheidung an 15-Isoprostan  $F_{2t}$  in Abhängigkeit des jeweiligen Stadiums des Nierenschadens kam. Sie untersuchten Tiere, die laut International Renal Interest Society (IRIS) chronische Nierenschäden des Stadiums 1-4 aufwiesen, wobei 1 das Stadium mit dem geringsten und 4 das Endstadium des Nierenschadens repräsentiert. Bei den Tieren kam es zunächst zu einer erhöhten Ausscheidung von 15-Isoprostan  $F_{2t}$  im Stadium 1, diese Ausscheidung verringerte sich allerdings mit zunehmendem Nierenschaden, sodass Tiere im Stadium 3 und 4 eine signifikant verringerte 15-Isoprostan  $F_{2t}$  Ausscheidung verglichen mit gleichaltrigen Tieren ohne Nierenschaden im Urin zeigten [191]. Auch in einer humanen Studie mit 291 Patienten mit chronischen Nierenschaden und 3000 Menschen, die keinen Nierenschaden aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass es bei den Patienten zu einer signifikant verringerten Ausscheidung an Isoprostanen kam [192].

Die Berücksichtigung des jeweiligen Nierenschadens bei der Analyse der Ausscheidung von oxidierten Lipiden könnte auch eine Erklärung für die verringerte Ausscheidung von TBARS in unseren behandelten Tieren sein.

Karanovic *et al.* zeigten außerdem in einer Studie mit spontan hypertensiven Ratten, dass sich die Ausscheidung von TBARS zwischen Tieren mit und ohne Nierenschaden 6 Wochen nach Start der Beobachtungen nicht unterschied, unabhängig davon, welchen Grad des Nierenschadens die Tiere aufwiesen [193], während andere Studien nach einer kürzeren Beobachtungszeit eine erhöhte Ausscheidung von TBARS im Urin

## Diskussion

bei einem Nierenschaden nachweisen konnten [189, 190]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nach der kürzeren Behandlungszeit der Nierenschaden der Tiere noch nicht so groß war wie nach der 6-wöchigen Beobachtungszeit und die Tiere hier noch in der Lage waren, oxidierte Lipide vermehrt auszuscheiden.

Dies zeigt eine Problematik bei der Interpretation bzw. dem Vergleich der Ergebnisse, da die meisten Studien nicht unterscheiden, in welchem Stadium des Nierenschadens die Daten gesammelt wurden und somit keine Aussage getroffen werden kann, ob sich die Tiere in einem frühen oder sehr späten bzw. schweren Stadium der Nierenschädigung befanden. Möglicherweise haben gerade die Tiere in einem weit vorangeschrittenen Stadium des Nierenschadens Probleme, diese oxidierten Lipide auszuscheiden. Eine weitere Problematik ergibt sich außerdem allgemein bei Untersuchungen von Markern, die im Urin ausgeschieden werden. Wie bereits in vielen Publikationen diskutiert wurde, kann hierbei nie vollständig zwischen systemischem und lokalem oxidativen Stress in der Niere unterschieden werden, da die Ausscheidung der Marker über die Niere vonstattengeht [194, 195].

Um diese möglichen Fehlerquellen bei der Dateninterpretation zu vermeiden, wäre es deshalb wichtig, die Ausscheidung von oxidierten Lipiden mit Versuchen zu vergleichen, die Tiere mit ähnlichem Ausmaß an Nierenschaden untersuchen, was aufgrund mangelnder Datensätze nicht möglich war. Zum anderen sollte man die hier untersuchten Marker TBARS und 15-Isoprostan  $F_{2t}$  auch im Plasma untersuchen, um mögliche Probleme bei deren Ausscheidung über die Niere zu umgehen bzw. die ermittelten Konzentrationen besser miteinander vergleichen zu können.

Die Untersuchung von 3-Nitrotyrosin im Blut zeigte eine tendenzielle Erhöhung in den AngII-behandelten Tieren nach einem Behandlungszeitraum von 20 Wochen. In einer anderen von uns durchgeführten Studie, bei der Mäuse für 4 Wochen mit AngII behandelt wurden, ließ sich nach diesem kürzeren Zeitraum noch keine Veränderung von 3-Nitrotyrosin im Blut feststellen [167]. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Nitrierung der AS Tyrosin systemisch erst nach einer längeren Zeit, in welcher der Körper ROS ausgesetzt ist, stattfindet.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der systemischen ROS-Marker keine eindeutige Aussage über eine erhöhte systemische Produktion von ROS zulassen, da es möglicherweise zu Problemen bei der Ausscheidung dieser Marker über die Niere gekommen sein könnte.

Lokaler oxidativer Stress in der Niere wurde mithilfe des redoxsensitiven Fluorophors erfasst. In Anwesenheit von Superoxid wird DHE in seine oxidierte Form Ethidium umgewandelt, welche als rot fluoreszierender Farbstoff in die DNA interkaliert und sichtbar wird. In vorangegangenen tierexperimentellen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte eine AngII-vermittelte Erhöhung von ROS, gemessen mit DHE, gezeigt werden [92, 93, 167]. Auch nach unserem vergleichsweise längeren Behandlungszeitraum ließen sich in dieser Arbeit in den behandelten Tieren noch immer erhöhte Level an ROS detektieren. Da jedoch der Nachweis von ROS mittels des redoxsensitiven Farbstoffs DHE eher eine Momentaufnahme der gebildeten Superoxide widerspiegelt, wurde auch die Bildung von 3-Nitrotyrosin in der Niere überprüft. Hier zeigte sich eine vermehrte Bildung in der Niere der behandelten Tiere, wobei die Erhöhung nur in der Medulla statistisch signifikant war. Die vermehrte Bildung von 3-Nitrotyrosin in der Medulla wurde auch in einigen weiteren tierexperimentellen Studien gezeigt. So beschreiben beispielsweise Guo *et al.* eine vornehmliche Lokalisation von 3-Nitrotyrosin in AngII-behandelten Ratten im Sammelrohr [196]. Auch in Schweinen, in denen aufgrund eines kardiopulmonalen Bypasses Nierenschäden erzeugt wurden, war die Bildung von 3-Nitrotyrosin vermehrt im Sammelrohr zu finden, während sie im proximalen Tubulus oder im Glomerulum nicht so stark anstieg [197]. Eine Erklärung für diese vermehrte Bildung von 3-Nitrotyrosin in der Medulla der Niere könnte sein, dass die Aktivität der Stickstoffmonoxid-Synthase in diesem Bereich der Niere am stärksten ist [198]. Dadurch kann in der Medulla mehr Stickstoffmonoxid erzeugt werden, welches dann wiederum mit dem durch AngII-gebildeten Superoxid reagiert und so zu Peroxynitrit umgewandelt wird, was letztendlich die Nitrierung von Tyrosin zur Folge hat. Die abschließende Betrachtung der oxidativen Stress Marker lassen die Schlussfolgerung zu, dass es auf lokaler Ebene durch die AngII-Behandlung zu einem klaren Anstieg von ROS gekommen ist.

### **5.4 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu DNA-Schäden in der Niere**

Durch die AngII-Behandlung kommt es in den Tieren zu erhöhten Level an ROS in der Niere. Ob diese erhöhten ROS nun von Abwehrmechanismen abgefangen werden

## Diskussion

konnten oder auf DNA-Ebene Schäden hervorrufen konnten, sollte mit der Untersuchung von DNA-Schadensmarkern geklärt werden.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass es durch die AngII-Behandlung in den Tieren zu einem deutlichen Anstieg von 8-OxodG, sowohl systemisch (8-OHdG) als auch lokal im Cortex der Niere, gekommen ist. Diese vermehrte Bildung von 8-OxodG durch ein überaktiviertes RAAS, entweder durch Infusion von AngII in Mäusen oder durch Infusion von Ald in Ratten, konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden [92, 183, 185] und wird auch von humanen Studien gestützt, in denen auch vermehrt 8-OHdG im Urin von hypertensiven Patienten detektiert werden konnte [76].

Allerdings konnte in der Medulla sowohl der Kontroll-, als auch der behandelten Tiere in allen Bildausschnitten je nur eine 8-OxodG-positive Zelle gefunden werden. Diese hohe Diskrepanz zwischen Cortex und Medulla war in diesem Ausmaß nicht zu erwarten, v.a. unter der Berücksichtigung, dass in der Medulla der behandelten Tiere sehr wohl DNA-Schäden in Form von  $\gamma$ H2AX gefunden werden konnte, wenn auch in keinem statistisch relevanten Unterschied verglichen mit den Kontroll-Tieren. Es ist also daher unwahrscheinlich, dass es in der Medulla allgemein zu einer erhöhten antioxidativen Abwehr kam. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied an 8-OxodG-positiven Zellen zwischen dem Cortex und der Medulla könnte sein, dass speziell die Reparatur von 8-OxodG in der Medulla verstärkt ist. Diese Vermutung wird von einer Studie von Tsuruya *et al.* gestützt, in der in Ratten eine signifikante Erhöhung der OGG1 (8-Oxoguanine Glycosylase 1) -mRNA-Expression in der äußeren Medulla, verglichen mit dem Cortex, aufwies. Speziell im proximalen Tubulus der Tiere konnte nur eine sehr schwache mRNA-Expression von OGG1 detektiert werden [199]. OGG1 ist als DNA-Glykolase Teil der Basenexzisionsreparatur und speziell verantwortlich für die Reparatur von 8-OxodG [200]. Eine erhöhte Genexpression von OGG1 ist laut anderen Studien auch mit einer erhöhten Aktivität des OGG1-Proteins verbunden [201].

Widersprüchlich dazu sind allerdings Ergebnisse über eine verstärkte Lokalisation von OGG1 im Cortex von Ratten [202]. Um in dieser Arbeit eine sichere Aussage über eine mögliche vermehrte Reparatur von 8-OxodG in der Medulla treffen zu können, müsste die Aktivität von OGG1 in unserem Tiermodell in der Niere untersucht werden.

Zusätzlich zu der eben beschriebenen Basenmodifikation können ROS auch zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA führen. In dieser Arbeit konnte eine deutlich

erhöhte Phosphorylierung von H2AX im Cortex der AngII-behandelten Tiere nachgewiesen werden. Auch in der Medulla der behandelten Tiere ist die Tendenz eines Anstiegs von  $\gamma$ H2AX zu erkennen. Diese Beobachtungen zu einer erhöhten Bildung von  $\gamma$ H2AX in der Niere durch ein überaktiviertes RAAS konnten bereits in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden [92, 94, 203].

Es lässt sich abschließend also festhalten, dass die zuvor gemessenen erhöhten Level an ROS wahrscheinlich auch zu vermehrten DNA-Schäden in der Niere der behandelten Tiere geführt haben.

### **5.5 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu Mutationen in der Niere**

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse sind jedoch nur Marker bzw. Hinweise für oxidativen Stress bzw. DNA-Schäden, welche aber theoretisch von der Zelle abgewehrt bzw. durch nachfolgende Reparaturmechanismen wieder behoben werden können. Um nun unserer Hypothese eines mutagenen Potentials von AngII zu folgen, wurde die Mutationsfrequenz in Konsequenz der AngII-Behandlung in der Niere untersucht. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit mit Big Blue®-Ratten gearbeitet, die integriert in ihrem Genom das bakterielle, nicht transkribierte *lacI* tragen, das als Target-Gen für Mutationen *in vivo* dient.

#### **5.5.1 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu einer Erhöhung der Mutationsfrequenz (MF) in der Niere**

In den AngII-behandelten Tieren konnte eine, im Vergleich zu den Kontroll-Tieren, dreifach erhöhte MF detektiert werden. Die basale Frequenz in Kontroll-Tieren stimmt sowohl überein mit der Frequenz, die in der DNA aus der Niere in anderen Big Blue®-Ratten gefunden wurde [204-206], als auch mit der Frequenz, die in der DNA aus der Niere in Big Blue®-Mäusen detektiert wurde [207, 208]. Die Frage, die sich nun stellte, war, ob eine Verdreifachung der MF ausreicht, um in Tieren im weiteren Verlauf tatsächlich Nierentumore induzieren zu können. Hierfür kann vergleichend auf einige andere Studien mit Big Blue®-Ratten zurückgegriffen werden. So konnte beispielsweise in einer Studie von Yamaguchi *et al.* gezeigt werden, dass es bei einer Behandlung von Ratten mit Kaliumbromat in Konzentrationen, die erwiesenermaßen karzinogen sind, auch zu einer Verdreifachung der MF in der Niere kam [209]. Auch in

einer Ratten-Studie, in der die Tiere mit Aristolochiasäure behandelt wurden, konnte eine Verdreifachung der MF in der Niere der Tiere beobachtet werden. Auch die dort verwendeten Konzentrationen an Aristolochiasäure rufen Nierentumore hervor [206]. In diesen Studien konnte allerdings nicht die tatsächliche Bildung von Tumoren beobachtet werden. Da aber in den eben angeführten Studien mit Konzentrationen gearbeitet wurden, die nachweislich zu Nierentumoren führten, ist der Grund hierfür vermutlich eher, dass der Zeitpunkt, zu dem die Mutationen untersucht wurden, für die Beobachtung einer Tumorbildung, wie auch in der vorliegenden Arbeit, zu früh war.

Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen Mutationen in den einzelnen Nierenzelltypen unterschieden. Da sich renale Karzinomen vorwiegend aus dem proximalen Tubulus entwickeln [26] und auch in dieser Arbeit DNA-Schäden vorwiegend im Cortex detektiert werden konnte, wäre es interessant, ob auch die MF in diesen Nierenarealen erhöht ist. Allerdings konnte hier aus Gründen der experimentellen Durchführbarkeit bei der Isolation der DNA nicht zwischen den einzelnen Zelltypen unterschieden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die hier verwendete AngII-Konzentration eine Verdreifachung der MF induzierte. Durch den Vergleich mit Daten aus der Literatur zu ähnlichen Mutationsfrequenzanalysen kann diese Erhöhung der MF als potenziell Tumor-induzierend eingestuft werden [206].

### **5.5.2 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu einer Veränderung des Mutationsspektrums in der Niere**

Nicht nur die Anzahl an detektierten Mutationen änderte sich durch die AngII-Behandlung, sondern auch das Mutationsspektrum. Allerdings war in unseren Kontroll-Tieren auch ein leicht verändertes Mutationsspektrum zu finden, als es in einigen anderen Publikationen beschrieben wird. Diese Publikationen beschreiben G → A Transitionen als die am häufigsten detektierte spontane Mutation in der Niere, gefolgt von Einzelbasendeletionen und G → T Transversionen [204-206, 208, 209]. Aber auch zwischen diesen Publikationen ist eine hohe Varianz im Mutationsspektrum der unterschiedlichen Studien zu finden. In unseren Kontroll-Tieren waren, anders als in den oben aufgeführten Publikationen, etwas mehr Deletionen als G → A Transitionen zu finden. Da aber hier von drei detektierten Deletionen und zwei detektierten G → A Transitionen die Rede ist, kann aufgrund der geringen Anzahl nicht von einem

## Diskussion

gravierenden Unterscheid gesprochen werden. Ein deutlicher Unterschied im Mutationsspektrum konnte jedoch zwischen Kontroll- und AngII-behandelten Tieren gezeigt werden. Von besonderer Bedeutung war hier, dass nur in den AngII-behandelten Tieren G → T Transversionen zu finden waren, nicht aber in den Kontroll-Tieren. Diese Art der Mutation ist ein Resultat der nicht-reparierten Basenmodifikation 8-OxodG [130]. Auch in der bereits erwähnten Publikation von Yamaguchi *et al.*, in der Big Blue®-Ratten mit Kaliumbromat behandelt wurden, konnte durch die Behandlung vermehrt G → T Transversionen beobachtet werden, die auch mit der erhöhten Bildung von 8-OxodG in der Niere in Verbindung gebracht wurden [209].

Betrachtet man die Verteilung der einzelnen Mutationen in *lacI*, so kann gesagt werden, dass alle detektierten Mutationen über das gesamte Gen verteilt waren. Es konnten keine Mutationen innerhalb eines Tieres an der gleichen Stelle des Gens gefunden werden, wodurch eine klonale Expansion und somit eine Erhöhung der Mutationsfrequenz durch sogenannte Siblings ausgeschlossen werden konnte. Die Mutationen haben sich also unabhängig voneinander in den Zellen manifestiert. Aus diesem Grund kann in dieser Arbeit auch der Begriff „Mutationsfrequenz“ mit dem Begriff „Mutanten-Frequenz“ gleichgesetzt werden.

Es ist allerdings zu erwähnen, dass von den 10 in den Kontroll-Tieren detektierten mutierten Pfus nur in 7 und von den 34 in den AngII-behandelten Tieren detektierten mutierten Pfus nur in 17 Mutationen im *lacI* durch die Sequenzierung nachgewiesen werden konnten. Zwei von den 34 mutierten Pfus aus den behandelten Tieren konnten nicht sequenziert werden, da hier scheinbar die DNA von zwei unterschiedlichen Pfus zusammen isoliert wurde und somit keine eindeutige Sequenz detektiert werden konnte. Warum in den anderen 18 Pfus trotz eindeutiger Blaufärbung im Mutations-Assay und anschließender Verifizierung durch Isolierung und Neu-Ausplattierung keine Mutation in *lacI* gefunden werden konnte, bleibt trotz intensiver Recherche weiterhin ungeklärt. In einer Publikation von Bol *et al.* war auch zu finden, dass lediglich 56 % der detektierten mutierten Pfus sequenziert wurden [204]. Ob es hier auch zu Problemen beim Sequenzieren kam oder lediglich nur eine gewisse Anzahl an Pfus sequenziert werden sollte, wurde hier allerdings nicht eindeutig beschrieben.

Es könnte argumentiert werden, dass Mutationen in den blauen und somit potentiell mutierten Pfus nicht *in vivo* in den Ratten entstanden sind, sondern sich als *ex vivo* Mutationen erst später bei Replikation in *E.coli* manifestierten. Dies würde in sogenannten Mosaik Plaques resultieren, in denen nicht-mutierte DNA aus dem Tier

vermischt mit mutierter DNA vorliegt, welche sich bei der Replikation in *E.coli* im Genom manifestieren konnte. Diese Mosaik-Plaques erscheinen dann zwar als blaue Pfus, weisen aber teilweise weiße Bereiche auf. Das hieße folglich, die gemessene Mutationsfrequenz wäre kein Resultat von tatsächlich vermehrten Mutationen durch die Behandlung von AngII in den Tieren, sondern erst durch spätere Events außerhalb des Tiers entstanden. Dies kann in unserem Fall allerdings ausgeschlossen werden, da sich diese Mosaik-Plaques durch anschließendes Isolieren der Pfus mittels sogenanntem Replating in schwächeren Verdünnungen gut vermeiden lassen. Da dieses Replating wiederholt durchgeführt wurde und die Pfus immer als klar blaue Pfus, und somit als mutiert bestätigt werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier nicht um Artefakte handelte sondern tatsächlich um Pfus, die durch im Tier mutierte DNA blau wurden.

Es kann also festgehalten werden, dass die AngII-Behandlung nicht nur die MF allgemein erhöht hat, sondern auch zu einem veränderten Mutationsspektrum zwischen den beiden Tiergruppen führte und G → T nur in AngII-behandelten Tieren zu finden war. Alle detektierten Mutationen waren außerdem unabhängig voneinander und sind somit nicht über klonale Expansion entstanden.

### **5.6 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration führt zu einem Anstieg an apoptotischen und proliferierenden Zellen in der Niere**

Als typische Kennzeichen von Krebszellen zählen u.a. eine abnormale Proliferation sowie eine gesteigerte Apoptoseresistenz der Zellen [117]. Um diese Charakteristika zu untersuchen, wurden die Nieren auf proliferierende sowie apoptotische Zellen hin untersucht. Die Hypothese war hierbei, dass es in Nierenzellen der AngII-behandelten Tiere zu einer erhöhten Apoptose-Resistenz kommt, wodurch Zellen mit DNA-Schäden weiter überleben und sich möglicherweise sogar teilen. Diese Hypothese wird u.a. dadurch gestützt, dass in vorangegangenen Untersuchungen in Tieren mit einem überaktivierten RAAS eine erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung festgestellt wurde [94] [93]. NF- $\kappa$ B übt als Transkriptionsfaktor eine pro-Überlebens-Funktion für Zellen aus, wodurch sich Zellen vermehrt der Apoptose entziehen können [139]. Eine konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B kann folglich zu einer Verringerung der Apoptose und damit verbunden einer Zunahme der Zellzahl führen [140, 141]. Diese vermehrte Proliferation konnte bereits in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bei einem

## Diskussion

überaktivierten RAAS gezeigt werden [138], eine erhöhte Apoptose-Resistenz der Zellen konnte bisher nur bedingt gezeigt werden, da in vorherigen Arbeiten sowohl eine verringerte [138], als auch eine erhöhte [92] Anzahl apoptotischer Zellen gezeigt wurde.

In den AngII-behandelten Tieren konnten eindeutig sowohl mehr apoptotische, als auch mehr proliferierende Zellen detektiert werden. Interessant war nun, um welchen Zelltyp es sich bei den apoptotischen, bzw. den proliferierenden Zellen handelte. Da die meisten Nierenzellkarzinome aus proximalen Tubuluszellen entstehen, ist dieser Nierenzelltyp für unsere Untersuchungen von besonderer Bedeutung [26, 210]. Deshalb wurde untersucht, ob es sich bei den apoptotischen bzw. proliferierenden Zellen um Zellen des proximalen Tubulus handelte. Es zeigte sich, dass die detektierten apoptotischen Zellen nicht Teil des proximalen Tubulus waren. Somit blieb trotz einer verstärkt detektierten Apoptose in den behandelten Tieren die ursprüngliche Hypothese bestehen, dass sich Zellen, insbesondere Zellen des proximalen Tubulus, nicht zwangsläufig der Apoptose unterziehen müssen, selbst wenn sie einen DNA-Schaden aufweisen. Es ist jedoch weiterhin unklar, um welchen Zelltyp es sich bei den apoptotischen Zellen handelte. Möglicherweise könnten hier infiltrierende Zellen (Makrophagen, Fibroblasten usw.) betroffen sein. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Anzahl infiltrierender Zellen (mittels HE- und anti-CD68-Färbung) in den AngII-behandelten Tieren gezeigt werden. Eine erhöhte Infiltration von Makrophagen ist mit einer AngII-induzierten Bildung von Fibrose bereits beschrieben [47, 99]. Dies erlaubt die Überlegung, ob es sich bei den detektierten apoptotischen Zellen um diese infiltrierende Zellen handeln könnte. Um einer übersteigerten Immunantwort entgegenzuwirken, werden Makrophagen nachgewiesenermaßen relativ schnell der Apoptose unterzogen [174]. Außerdem konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass es sich bei der Mehrzahl apoptotischer Zellen in der Niere u.a. um Makrophagen handelt [135]. Um dies jedoch zu bestätigen, sollte eine Doppelfärbung von apoptotischen sowie infiltrierenden Zellen durchgeführt werden, die aufgrund experimenteller Schwierigkeiten bisher nicht möglich war.

Bei der Untersuchung proliferierender Zellen im proximalen Tubulus zeigte sich, dass viele der proliferierenden Zellen tatsächlich Zellen des proximalen Tubulus waren. Allerdings kam es in den AngII-behandelten Tieren zu keiner erhöhten Proliferation im proximalen Tubulus im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Hier wäre es nun interessant, zu untersuchen, ob sich unter den proliferierenden Zellen im proximalen Tubulus der

AngII-behandelten Tiere auch um Zellen mit DNA-Schäden finden. Dies würde die Hypothese unterstützen, dass Zellen des proximalen Tubulus mit DNA-Schäden nicht nur überleben, sondern auch proliferieren können. Dadurch könnten sich DNA-Schäden bei nachfolgender Zellteilung als Mutationen manifestieren, was mit der detektierten Erhöhung der Mutationsfrequenz in den AngII-behandelten Tieren übereinstimmen würde.

Da in den AngII-behandelten Tieren aber allgemein mehr proliferierende Zellen detektiert werden konnten, stellte sich die Frage, wie differenzierte Epithelzellen der Niere in der Lage sind, in diesem Ausmaß zu proliferieren. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass in den Zellen eine epithelial-mesenchymale Transition aktiviert wurde, wodurch die Zellen einen mesenchymalen Charakter annehmen und dadurch wieder vermehrt proliferieren können, wie im folgenden Kapitel diskutiert.

Der Ursprung der detektierten proliferierenden Zellen, welche nicht Teil des proximalen Tubulus sind, bleibt zu untersuchen. Auch hierbei könnte es sich um infiltrierende Zellen wie Makrophagen und Fibroblasten handeln. Diese vermehrte Proliferation von infiltrierenden Zellen in Tieren mit einem überaktivierten RAAS konnte bereits gezeigt werden [211, 212].

Abschließend lässt sich folglich festhalten, dass AngII zwar zu einer vermehrten Apoptose geführt hat, hierbei aber nicht Zellen des proximalen Tubulus betroffen waren. Weiterhin hat die Behandlung von AngII in der gesamten Niere zu einer erhöhten Proliferation geführt, von der auch Zellen des proximalen Tubulus betroffen waren. Die Anzahl proliferierender Zellen im proximalen Tubulus unterschied sich jedoch zwischen beiden Gruppen nicht.

### **5.7 Eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration induziert eine Erhöhung der mesenchymalen Marker in der Niere**

Die epithelial-mesenchymale Transition beschreibt einen Prozess, in welchem sich differenzierte Epithelzellen dedifferenzieren und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dadurch erlangen die Zellen eine verstärkte Proliferations- und Migrationsfähigkeit, eine erhöhte Apoptoseresistenz und produzieren vermehrt ECM-Komponenten, die wiederum zur Bildung von fibrotischem Gewebe führen können [142, 143].

## Diskussion

Auch in dieser Arbeit konnte mithilfe verschiedener mesenchymaler und epithelialer Marker ein möglicher Beginn einer EMT nach AngII-Behandlung beobachtet werden. So zeigte sich auf Protein-Ebene eine deutliche Erhöhung der Expression der mesenchymalen Marker Fibronectin und Vimentin im Cortex und eine tendenzielle Erhöhung in der Medulla.

Die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin auf Protein-Ebene wurde nicht in der ganzen Niere untersucht, sondern lediglich im distalen Tubulus. In Versuchen zu dieser Arbeit und auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von E-Cadherin in der Niere nicht in jedem Zelltyp stattfindet. So wurde in einer Studie von Lee *et al.* gezeigt, dass E-Cadherin im proximalen Tubulus und im Glomerulus von Schweinen nicht exprimiert ist, wohl aber vermehrt im distalen Tubulus [166]. Auch in Nierenzellen von Ratten konnte eine dominante Expression von E-Cadherin im distalen Tubulus nachgewiesen werden, während im proximalen Tubulus nur eine sehr schwache Expression zu finden war [213]. Da auch in dieser Arbeit eine Expression von E-Cadherin im proximalen Tubulus nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression von E-Cadherin nur in den distalen Tubuluszellen untersucht. Da wie bereits erwähnt, bei der Entwicklung von renalen Zellkarzinomen besonders der proximale Tubulus von Interesse ist, müsste ein weiterer epithelialer Marker untersucht werden, welcher auch im proximalen Tubulus exprimiert wird. E-Cadherin wird jedoch als klassischer Marker bei Untersuchungen zur EMT verwendet, weshalb auch hier nicht auf die Untersuchungen dieses Markers verzichtet wurde. Es zeigte sich, dass es durch die Behandlung mit AngII zu einer tendenziellen Abnahme von E-Cadherin im distalen Tubulus kam. Eine mögliche Erklärung dafür, dass es nicht zu einer signifikanten Abnahme des epithelialen Markers kam, könnte wie bereits erwähnt sein, dass viele der Zellen den kompletten Prozess der Transition noch nicht abgeschlossen haben und weiterhin epitheliale Charakteristiken zeigen. Dies könnte dafür sprechen, dass die Zellen tatsächlich über eine Transition von Epithelzellen einen mesenchymalen Phänotyp erlangt haben und nicht von infiltrierenden Zellen mesenchymalen Ursprungs abstammen und deshalb mesenchymale und epitheliale Marker exprimieren [142, 143]. Als epithelialer Marker wurde auf mRNA-Ebene die Expression von ZO-1 untersucht. Dieser epitheliale Marker wird laut Literaturangaben im Gegensatz zu E-Cadherin ubiquitär in Epithelzellen der Niere exprimiert [214]. Hier zeigte sich durch die AngII-Behandlung keine Veränderung der Expression im Cortex oder der Medulla. Da jedoch eine mRNA mehrmals abgelesen werden kann, ist es

## Diskussion

durchaus möglich, dass sich trotz gleicher mRNA-Expression die Expression auf Protein-Ebene durch eine AngII-Behandlung verändert. Aufgrund fehlender Verfügbarkeit geeigneter Antikörper konnte ZO-1 allerdings nur auf mRNA-Ebene, nicht auf Protein-Ebene untersucht werden. Dies erschwert den direkten Vergleich mit dem auf Protein-Ebene untersuchten epithelialen Marker E-Cadherin.

Die zwei auf Protein-Ebene untersuchten mesenchymalen Marker Fibronectin und Vimentin zeigten eine deutlich erhöhte Expression im Cortex der AngII-behandelten Tiere. Auch auf RNA-Ebene konnte eine tendenzielle Erhöhung des mesenchymalen Markers Fibronectin im Cortex und der Medulla der behandelten Tiere nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich auf mRNA-Ebene eine große Standardabweichung zwischen den Individuen, weshalb hier keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Da aber auf Protein-Ebene eine erhöhte Expression von Fibronectin detektiert werden konnte, kann hier trotz fehlender statistischer Signifikanz von einer Erhöhung des mesenchymalen Markers Fibronectin gesprochen werden.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass es zu einer post-transkriptionellen Regulation im Prozess der EMT kommt und es konnten bereits microRNAs identifiziert werden, die in dieser Regulation eine wichtige Rolle spielen [215]. Diese microRNAs haben beispielsweise Transkriptionsfaktoren als Target, die bei der EMT eine wichtige Rolle spielen, aber auch einige der mRNAs von Proteinen, die während der EMT aktiviert werden, konnten als Zielstruktur von microRNAs identifiziert werden. So konnte die mRNA des epithelialen Markers E-Cadherin als Target einer post-transkriptionellen Regulation in Krebszellen identifiziert werden [216]. Diese post-transkriptionelle Regulation lässt auch Spekulationen darüber zu, ob die Expression von ZO-1 auf Protein-Ebene in den AngII-behandelten Tieren, anders als auf mRNA-Ebene, möglicherweise doch verändert sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der auf Protein- und RNA-Ebene detektierten Zunahme der mesenchymalen Marker und der tendenziellen Abnahme des epithelialen Markers E-Cadherin eine möglicherweise beginnende Aktivierung der EMT nach chronischer AngII-Behandlung gezeigt werden konnte. Diese Aktivierung der EMT könnte auch eine mögliche Erklärung für die vorher detektierte erhöhte Proliferation in der Niere sein.

### **5.7.2 Eine erhöhte AngII-Konzentration führt zur Aktivierung einer EMT in Nierenzellen: Vergleich chronische und akute Behandlung**

Vergleichend zu den bereits diskutierten Effekten nach chronischer AngII-Behandlung wurde die Aktivierung einer EMT auch nach einer kürzeren, akuten Behandlung mit Ald in Nierenzellen von Ratten untersucht. Diese beiden Behandlungen sind nicht zu 100 % miteinander vergleichbar, da die Tiere in dem chronischen Versuch mit AngII behandelt wurden, während sie in dem kürzeren akuten Versuch mit Ald behandelt wurden. Jedoch sind sowohl AngII, als auch Ald Effektor-Hormone des RAAS für die Regulation des Blutdrucks verantwortlich und induzieren bei Infusion im Tier eine Hypertonie. Auch konnten wir bereits zeigen, dass es durch eine AngII-Infusion in Mäusen auch zu erhöhten Ald-Konzentrationen kommt [93].

Um für einen Vergleich bezüglich einer zeitabhängigen Aktivierung der EMT nicht erneut einen separaten Tierversuch mit einer AngII-Behandlung in Ratten durchführen zu müssen, wurde mit Material dieses bereits durchgeführten Tierversuchs gearbeitet. Bei der Untersuchung der mesenchymalen Markerproteine konnte in dem akuten Ald-Versuch kein Unterschied in der Expression von Fibronectin oder Vimentin beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde hier auf die Untersuchung von epithelialen Markern verzichtet, da der ausbleibende Anstieg von mesenchymalen Markern die Aktivierung einer EMT bereits ausschließen lässt.

Dies könnte damit erklärt werden, dass eine EMT erst nach einer gewissen Behandlungszeit aktiviert wird. So beschreiben Liu *et al.* in einer Studie die EMT als adaptive Antwort von Epithelzellen auf chronischen Stress oder einer chronischen Verletzung des Gewebes. Laut deren Beobachtungen sind viele Faktoren für die Aktivierung bzw. Regulation einer EMT während einer Nierenschädigung nötig, wie beispielsweise die Ausschüttung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren über einen längeren Zeitraum [217].

In den Ald-behandelten Tieren in dem akuten Versuch wie auch in den AngII-behandelten Tieren in dem chronischen Versuch wurde durch die Behandlung in allen Tieren eine Hypertonie erzeugt und auch die beobachteten Endorganschäden sind zwischen beiden Versuchen vergleichbar [94]. Es kann deshalb vermutet werden, dass der entscheidende Unterschied zwischen diesen beiden Versuchen der Zeit-Faktor ist, warum in den AngII-behandelten Tieren vermutlich eine EMT ausgelöst werden konnte, während dies in den Ald-behandelten Tieren nicht der Fall war.

### **5.7.3 Mögliche Signalkaskaden einer AngII-induzierten epithelial-mesenchymalen Transition**

Der genaue Signalweg, über den die EMT Typ 2 ausgelöst wird, ist nicht vollständig aufgeklärt, allerdings scheint eine Ausschüttung von TGF- $\beta$  als Schlüsselfaktor bei der Aktivierung zu agieren. Wie in 1.6.3 aufgeführt, könnte eine TGF- $\beta$ -induzierte EMT über die Aktivierung von MAPK (ERK1/2) vonstattengehen [158]. Eine Beteiligung von AngII an dieser Signalkaskade ist wahrscheinlich, da erhöhte AngII-Konzentrationen zum einen zu einer Aktivierung von TGF- $\beta$  führen [112-114], zum anderen konnten wir bereits in Vorarbeiten zu dieser Arbeit zeigen, dass eine erhöhte Konzentration von Ald *in vitro* und *in vivo* zu einer Aktivierung von MAPK (Ras/Raf/MEK und ERK1/2) führt [138]. Zwar wurde eine erhöhte Expression von Ald in dieser Arbeit nicht explizit untersucht, da AngII aber auch zu erhöhten Konzentrationen von Ald führt, kann vermutet werden, dass es auch in dieser Arbeit durch die erhöhte Konzentration von AngII zu einer Aktivierung von MAPK, vermittelt über erhöhte Konzentrationen von Ald, kam. Die in Abbildung 6 aufgeführte Signalkaskade über eine Aktivierung von MAPK downstream von TGF- $\beta$  könnte folglich auch in den hier beschriebenen AngII-behandelten Tieren aktiviert sein.

Es ist also wahrscheinlich, dass die mögliche AngII-induzierte Aktivierung der EMT über eine Aktivierung von TGF- $\beta$  und damit einer Aktivierung von MAPK vonstattengeht.

### **5.7.4 Beweis für die Existenz einer epithelial-mesenchymalen Transition**

Trotz aller Studien zur EMT gibt es in der Forschung weiterhin Kritiker, die die Existenz einer EMT *in vivo* anzweifeln. Als Grund für diesen Zweifel beschreiben sie, dass in vielen *in vivo* Studien nicht klar unterschieden werden kann, ob die vermeintlich dedifferenzierte Zelle tatsächlich epithelialen Ursprungs ist, oder ob es sich um einen infiltrierten Fibroblasten mesenchymaler Herkunft handelt [218]. Diese Kritiken können allerdings v.a. durch zwei Beobachtungen widerlegt werden: So konnten Iwano *et al.* mithilfe von Klonierungsexperimenten in Mäusen den Ursprung von Fibroblasten in der Niere klären. Hierfür wurde eine Nierenfibrose mittels eines UUO (unilateral urinary obstruction, unilaterale Obstruktion der Harnleiter) in einem Maus-Modell induziert und Tubuluszellen (mittels eines  $\gamma$ GT-Promotor) mit LacZ markiert. Es zeigte sich, dass viele degenerierte Tubuluszellen sowohl LacZ-positiv, d.h. tubulären Ursprungs waren,

## Diskussion

als auch FSP1 (Fibroblast-Specific Protein 1) -positiv waren. FSP1 ist, wie aus dem Namen bereits ersichtlich, ein spezifischer Marker für Fibroblasten. Iwano *et al.* konnten mit dieser Studie nachweisen, dass in ihrem Maus-Model sogar 36 % der Fibroblasten aus einer Transition von Tubuluszellen entstanden sind und nicht von infiltrierenden Zellen abstammen [148].

Zusätzlich konnte auch in einigen anderen Publikationen gezeigt werden, dass Zellen oft gleichzeitig mesenchymale, als auch epitheliale Marker exprimieren [142]. Diese parallel stattfindende Expression beschreibt wohl ein intermediäres Stadium, bei dem eine Zelle vermutlich noch nicht vollständig ihre epithelialen Eigenschaften verloren, aber bereits einen mesenchymal-ähnlichen Phänotyp angenommen hat [142, 143] [143]. Auch in dieser Arbeit kam es zu einer deutlichen Hochregulierung von mesenchymalen Markern (Vimentin und Fibronectin), während der epitheliale Marker E-Cadherin nur tendenziell herunterreguliert war. Es könnte folglich sein, dass sich viele Zellen in diesem intermediären Stadium befanden und den Prozess der EMT (noch) nicht vollständig abgeschlossen haben. Hier wäre allerdings noch zu untersuchen, ob die exprimierten mesenchymalen und epithelialen Marker tatsächlich von der gleichen Zelle exprimiert werden.

Abschließend lässt sich folglich festhalten, dass die bisherige Datenlage, trotz einiger Diskussionspunkte, für eine Existenz der EMT *in vivo* spricht.

## 6. Zusammenfassung

Epidemiologische Studien beschreiben ein erhöhtes Nierenkrebsrisiko für Hypertonie-Patienten. Eine mögliche Ursache für dieses erhöhte Krebsrisiko könnten Veränderungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) sein, wie sie in vielen Hypertonie-Patienten auftreten. Das RAAS ist eine hormonelle Kaskade zur Regulation des Blutdrucks. Eine pathologische Überaktivierung des RAAS wie sie z.B. bei einer Hypertonie vorkommt geht mit erhöhten Konzentrationen des aktiven Peptids Angiotensin II (AngII) einher. Neben seiner Funktion als Vasokonstriktor induziert AngII weitere Signalkaskaden, die beispielsweise zu gesteigerter Proliferation oder zu Inflammation führen. So konnten wir *in vitro* und *in vivo* bereits zeigen, dass eine erhöhte AngII-Konzentration zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und DNA-Schäden führt. Sind Zellen nicht in der Lage, diese DNA-Schäden zu reparieren, könnten diese sich bei anschließender Zellteilung als Mutationen in der DNA manifestieren. Mutationen sind für die Entstehung von Krebs von großer Bedeutung, da diese oft Veränderungen der Zellbiologie zur Folge haben, was im weiteren Verlauf dazu führen kann, dass sich Zellen unkontrolliert vermehren, invasieren und metastasieren.

Ziel dieser Arbeit war es nun, zu untersuchen, ob bzw. inwieweit eine chronisch erhöhte AngII-Konzentration tatsächlich zu dem beschriebenen erhöhten Nierenkrebsrisiko von Hypertonie-Patienten beiträgt. Hierfür wurden wichtige Parameter untersucht, die als Voraussetzung für eine Krebs-Initiierung angesehen werden können, wie eine erhöhte Anzahl an Mutationen sowie eine Aktivierung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und eine vermehrte Proliferation in der Niere. Für die Mutationsfrequenz-Analysen wurden transgene Big Blue®-Ratten für 20 Wochen mittels osmotischer Minipumpen mit 400 µg / kg x Tag AngII behandelt, was einem chronischen Behandlungszeitraum entspricht. Diese Ratten trugen integriert in ihr Genom das *LacI*-Gen, welches als Zielgen für die spätere Mutations-Analyse dienen sollte. Im Laufe der 20 Wochen wurde jede Woche mittels nicht-invasiver Blutdruckmessung der Blutdruck der Tiere ermittelt. Die chronische Behandlung mit AngII führte zu einem erhöhten Blutdruck und einer histopathologischen Veränderung der Glomeruli und des Tubulussystems, was sich auch in einer verschlechterten Nierenfunktion, gemessen über eine erhöhte Albumin-Ausscheidung, widerspiegelte.

## Zusammenfassung

Außerdem konnte eine erhöhte lokale Inflammation, verbunden mit einer verstärkten Fibrose in der Niere gezeigt werden. Auf systemischer Ebene konnte eine gesteigerte Produktion von ROS nicht zweifelsfrei bestätigt werden, jedoch auf lokaler Ebene in der Niere. Damit verbunden konnten auch vermehrt oxidative DNA-Schäden in Form von spezifischen Basenmodifikationen und Doppelstrangbrüchen detektiert werden. Die chronische AngII-Behandlung resultierte außerdem in einer erhöhten Mutationsfrequenz in der Niere. Die anschließende Sequenzierung der Mutationen zeigte, dass nur die AngII-behandelten Tiere G → T Transversionen aufwiesen, welche typisch sind für nicht reparierte oxidative DNA-Basenmodifikationen (hier: 8-OxodG).

Außerdem zeigten die AngII-behandelten Tiere eine vermehrte Anzahl proliferierender sowie apoptotischer Zellen. Da sich Nierenkrebs vorwiegend aus proximalen Tubuluszellen entwickelt, war dieser Zelltyp bei den Proliferations- bzw. Apoptoseanalysen von besonderer Bedeutung. Um aufzuklären, ob Zellen des proximalen Tubulus vermehrt proliferieren bzw. sich in gesteigertem Maße der Apoptose entziehen können, wurde eine Co-Lokalisation von proliferierenden bzw. apoptotischen Zellen mit Zellen des proximalen Tubulus untersucht. Hier konnten sowohl in den AngII-behandelten, als auch in den Kontroll-Tieren proliferierende, aber keine apoptotischen Zellen detektiert werden. Zuletzt wurde untersucht, ob in den behandelten Tieren der Prozess der EMT aktiviert wurde. Dieser Prozess wird unter fibrotischen Bedingungen aktiviert, ist aber auch für die Entwicklung von Krebszellen von enormer Wichtigkeit. Durch diesen Prozess erlangen Epithelzellen einen mesenchymalen Charakter, der es ihnen erlaubt, vermehrt zu proliferieren und zu invasieren. In den AngII-behandelten Tieren konnte ein Expressionsanstieg an mesenchymalen Markern detektiert werden, während der untersuchte epitheliale Marker leicht abnahm. Dies erlaubt die Mutmaßung, dass in diesen Tieren der Prozess der EMT induziert wurde. Vergleichend dazu konnte in einem anderen Tiermodell, in dem auch über ein überaktiviertes RAAS Hypertonie erzeugt wurde, nach einem Behandlungszeitraum von vier Wochen keine Veränderung der EMT-Markerproteine gezeigt werden. Dies deutet auf einen Zeit-abhängigen Faktor bei der Aktivierung der EMT, vermittelt von einem überaktivierten RAAS, hin.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in dieser Arbeit durch die chronische AngII-Behandlung eine erhöhte Produktion von ROS mit vermehrten DNA-Schäden, eine gesteigerte Mutationsfrequenz und Proliferationsrate sowie eine

## Zusammenfassung

verstärkte Expression mesenchymaler Marker in der Niere gezeigt werden konnte. All dies unterstreicht ein mögliches Krebs-initiierendes Potenzial chronisch erhöhter AngII-Konzentrationen und könnte zu dem erhöhten Nierenkrebsrisiko von Hypertonie-Patienten beitragen.

### 7. Summary

Epidemiological studies found a higher risk of kidney cancer in hypertensive patients. One possible explanation for this increased cancer risk could be changes in the renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS), as seen in many hypertensive patients. The RAAS is a hormonal cascade that is responsible for regulating the blood pressure. Under pathological conditions such as hypertension, an overactivation of RAAS often occurs, accompanied with increased concentrations of the active peptide angiotensin II (AngII). Apart from its function as a vasoconstrictor, a higher concentration of AngII induces several further signaling cascades leading, for example, to increased proliferation or inflammation. We recently have shown the potential of increased AngII concentrations to enhance the production of ROS and DNA damage *in vitro* and *in vivo*. If cells are not able to repair these DNA damages, they can result in a DNA mutation in a subsequent cell division. Mutations are very important for the development of cancer, as they often lead to changes in cell functions, which enable the cells to proliferate, invade and metastasise in an uncontrolled manner.

The aim of this study was to investigate whether or to what extent a chronically increased AngII concentration actually contributes to the described increased renal cancer risk of hypertension patients. For this purpose, important parameters were investigated that may be considered as prerequisites for cancer initiation, such as an increased number of mutations, as well as activation of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and increased proliferation in the kidney. For the mutation frequency analyses, Big Blue® rats were treated for 20 weeks with 400 µg / kg x day AngII via osmotic minipumps, which corresponds to a chronic treatment period. These rats carried the *LacI*-gene integrated into their genome, which acts as target gene for the following mutation analysis. During the 20 weeks the blood pressure was measured non-invasively every week. The chronic treatment with AngII raised the blood pressure and led to histopathological changes of glomeruli and tubuli, reflecting an impaired kidney function, which was measured via an increased albumin excretion. Furthermore, an increased local inflammation associated with enhanced fibrosis in the kidney could be demonstrated. While locally in the kidney oxidative stress was significantly increased, systemically only tendencies could be found. Associated with this, augmented oxidative DNA-damage in form of specific base modifications and

## Summary

double-strand breaks could be detected. The chronic AngII treatment also resulted in an increased mutation frequency in the kidney. Subsequent sequencing of the mutations revealed that only the AngII-treated animals had G → T transversions typical of unrepaired oxidative DNA base modifications (in this case: 8-OxodG). Additionally, the AngII-treatment resulted in a higher number of proliferating as well as apoptotic cells. Since renal cancer predominantly develops from proximal tubules cells, this cell type was of particular interest in the proliferation and apoptosis analyses. In order to clarify whether cells of the proximal tubulus proliferate or to a greater extent escape apoptosis, a co-localization of proliferating or apoptotic cells with cells of the proximal tubulus was investigated. Here, both in the AngII-treated and in the control animals proliferating, but no apoptotic cells were detected. Finally, it was investigated whether the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT) was activated in the treated animals. The process of EMT is known to be activated under fibrotic conditions but is also of great importance for the development of cancer cells. By this process, epithelial cells gain mesenchymal characteristics which allows them to enhance their potential of proliferation and invasion. In the AngII-treated animals an increased expression of mesenchymal markers could be detected while the studied epithelial marker slightly decreased. This allows the assumption that the process of EMT has been activated in these animals. In comparison, in another animal model of RAAS-induced hypertension, no change in the EMT marker proteins could be demonstrated after a treatment period of 4 weeks. This indicates a time-dependent factor in the activation of EMT mediated by an overactivated RAAS.

In summary, chronic angiotensin treatment has been shown to increase the production of ROS, raise DNA damage, mutation frequency and proliferation rate, and increase expression of mesenchymal markers in the kidney. All this emphasises a possible cancer-initiating potential of chronically elevated AngII concentrations which could contribute to the increased risk of renal cancer in hypertensive patients.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

|                              |                                    |
|------------------------------|------------------------------------|
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | Superoxid-Anion                    |
| OH <sup>•</sup>              | Hydroxyl-Radikal                   |
| °C                           | Grad Celsius                       |
| µg                           | Mikrogramm                         |
| 8-OHdG                       | 8-Hydroxydesoxyguanosin            |
| 8-OxodG                      | 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin |
| A                            | Avidin                             |
| ABC                          | Avidin-Biotin-Komplex              |
| ACE                          | Angiotensin Converting Enzyme      |
| ACE2                         | Angiotensin Converting Enzyme 2    |
| Ald                          | Aldosteron                         |
| AMP                          | Amplifikation                      |
| AngI                         | Angiotensin I                      |
| AngII                        | Angiotensin II                     |
| AS                           | Aminosäure                         |
| AT1R                         | Angiotensin II-Rezeptor Typ 1      |
| AT2R                         | Angiotensin II-Rezeptor Typ 2      |
| B                            | Biotin                             |
| BSA                          | Bovine serum albumin               |
| Bzw.                         | Beziehungsweise                    |
| C                            | Cytosin                            |
| Ca <sup>2+</sup>             | Kalzium                            |
| CKD                          | Chronische Nierenerkrankungen      |
| d.h.                         | Das heißt                          |
| DAB                          | Diaminobenzidin                    |
| DAG                          | Diacylglycerol                     |
| DAPI                         | 4',6-Diamidin-2-phenylindol        |
| dH <sub>2</sub> O            | Destilliertes Wasser               |
| DHE                          | Dihydroethidium                    |
| DNA                          | Desoxyribonukleinsäure             |
| E.coli                       | Escherichia coli                   |
| ECM                          | Extrazellulärmatrix                |

## Abkürzungsverzeichnis

|                               |                                                  |
|-------------------------------|--------------------------------------------------|
| EGF                           | Epidermal Growth Factor                          |
| ELISA                         | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                |
| EMT                           | Epithelial-mesenchymale Transition               |
| ERK1/2                        | Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2       |
| EtOH                          | Ethanol                                          |
| FGF-2                         | Fibroblast Growth Factor 2                       |
| Fibro                         | Fibronektin                                      |
| FITC                          | Fluorescein isothiocyanate                       |
| FSP-1                         | Fibroblast-Specific Protein 1                    |
| G                             | Guanin                                           |
| GM-CSF                        | Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| G <sub>q</sub>                | G-Protein-gekoppelten Rezeptoren                 |
| GSI                           | Glomeruloskleroseindex                           |
| H                             | Stunde                                           |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                               |
| HCl                           | Salzsäure                                        |
| HCIO                          | Hypochlorige Säure                               |
| HE                            | Hämatoxylin-Eosin                                |
| HGF                           | Hepatocyte Growth Factor                         |
| HOCl                          | Hypochlorige Säure                               |
| HRP                           | Meerrettichperoxidase                            |
| ICAM-1                        | Intercellular Adhesion Molecule 1                |
| IL-1 / 6 / 10 / 17            | Interleukin-1 / 6 / 10/ 17                       |
| IP3                           | Inositol-4,5-triphosphat                         |
| JAK                           | Januskinase                                      |
| kb                            | Kilobasen                                        |
| Kg                            | Kilogramm                                        |
| lacI                          | Gen für Lac-Repressor                            |
| M                             | Mol/l                                            |
| MAPK                          | Mitogen-aktivierende Proteinkinase               |
| MET                           | Mesenchymal-epitheliale Transition               |
| MF                            | Mutationsfrequenz                                |
| mg                            | Milligramm                                       |
| min                           | Minuten                                          |
| mM                            | Millimolar                                       |

## Abkürzungsverzeichnis

|                      |                                                                  |
|----------------------|------------------------------------------------------------------|
| MMPs                 | Matrix-Metalloproteasen                                          |
| mRNA                 | Messenger RNA                                                    |
| MSI                  | Mesangiolyseindex                                                |
| NaCl                 | Natriumchlorid                                                   |
| NADPH                | Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate                      |
| NF- $\kappa$ B       | Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| nm                   | Nanometer                                                        |
| NO                   | Stickstoffmonoxid                                                |
| NOS                  | Stickstoffmonoxid-Synthase                                       |
| Nox1 / 2 / 3 / 4 / 5 | NADPH-Oxidase 1 / 2 / 3 / 4 / 5                                  |
| O <sub>2</sub>       | Sauerstoff                                                       |
| OGG1                 | 8-Oxoguanine Glycosylase 1                                       |
| ONOO <sup>-</sup>    | Peroxynitrit                                                     |
| PAS                  | Periodic-Acid-Schiff-Färbung                                     |
| PBS                  | Phosphat-gepufferte Salzlösung                                   |
| PCNA                 | Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen                               |
| PCR                  | Polymerase-Kettenreaktion                                        |
| Pfu                  | Plaque Forming Units                                             |
| pg                   | Pikogramm                                                        |
| PKC                  | Phosphokinase C                                                  |
| PLC                  | Phospholipase C                                                  |
| RAAS                 | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System                              |
| RAG1                 | Recombination Activating Gene 1                                  |
| RAS                  | Renin-Angiotensin-System                                         |
| RNA                  | Ribonukleinsäure                                                 |
| ROS                  | Reaktive Sauerstoffspezies                                       |
| RT                   | Raumtemperatur                                                   |
| SA-PE                | Streptavidin-Phycoerythrin                                       |
| SEM                  | Standardfehler                                                   |
| SNP                  | Single Nucleotide Polymorphisms                                  |
| SOD                  | Superoxiddismutase                                               |
| sog.                 | Sogenannte                                                       |
| STAT                 | Signal Transducers and Activators of Transcription               |
| T                    | Thymin                                                           |
| TBARS                | Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen                           |

## Abkürzungsverzeichnis

|               |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------|
| TdT           | Terminal desoxynucleotidyl Transferase                |
| TGF- $\beta$  | Tumor Growth Factor $\beta$                           |
| TMB           | Tetramethylbenzidin                                   |
| TNB           | Tris-gepuffertes Blockingreagenz                      |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor $\alpha$                           |
| Tris          | Trishydroxymethylaminomethan                          |
| TRITC         | Tetramethylrhodaminisothiocyanat                      |
| TSI           | Tubulointerstitieller Schädigungsindex                |
| U             | Units                                                 |
| u.a.          | Unter anderem                                         |
| UUO           | Unilateral Urinary Obstruction                        |
| UV-Licht      | Ultraviolettes Licht                                  |
| v.a.          | Vor allem                                             |
| VCAM-1        | Vascular Cell Adhesion Molecule 1                     |
| Vim           | Vimentin                                              |
| Vs.           | Versus                                                |
| WGA           | Weizenlektin                                          |
| WHO           | Weltgesundheitsorganisation                           |
| X-Gal         | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid |
| z.B.          | Zum Beispiel                                          |
| ZO-1          | Zonula Occludens                                      |
| $\alpha$ -SMA | Alpha Smooth Muscle Actin                             |
| $\gamma$ H2AX | Phosphoryliertes Histon H2AX                          |

## 9. Literaturverzeichnis

1. who. *The top 10 causes of death*. 2018; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. Emberson, J.R., et al., *Re-assessing the contribution of serum total cholesterol, blood pressure and cigarette smoking to the aetiology of coronary heart disease: impact of regression dilution bias*. *Eur Heart J*, 2003. **24**(19): p. 1719-26.
3. Lopez, A.D., et al., *Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data*. *Lancet*, 2006. **367**(9524): p. 1747-57.
4. He, F.J. and G.A. MacGregor, *Blood pressure is the most important cause of death and disability in the world*. *European Heart Journal Supplements*, 2007. **9**(suppl\_B): p. B23-B28.
5. Oparil, S., M.A. Zaman, and D.A. Calhoun, *Pathogenesis of Hypertension*. *Annals of Internal Medicine*, 2003. **139**(9): p. 761-776.
6. Kearney, P.M., et al., *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data*. *Lancet*, 2005. **365**(9455): p. 217-23.
7. Grossman, E., et al., *Is there an association between hypertension and cancer mortality?* *Am J Med*, 2002. **112**(6): p. 479-86.
8. Colt, J.S., et al., *Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans*. *Epidemiology*, 2011. **22**(6): p. 797-804.
9. Weikert, S., et al., *Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition*. *Am J Epidemiol*, 2008. **167**(4): p. 438-46.
10. Znaor, A., et al., *International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality*. *Eur Urol*, 2015. **67**(3): p. 519-30.
11. Meyer, P., *Increased intracellular calcium: from hypertension to cancer*. *J Hypertens Suppl*, 1987. **5**(4): p. S3-4.
12. Hamet, P., *Cancer and hypertension: a potential for crosstalk?* *J Hypertens*, 1997. **15**(12 Pt 2): p. 1573-7.
13. George, A.J., W.G. Thomas, and R.D. Hannan, *The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks*. *Nature Reviews Cancer*, 2010. **10**: p. 745.
14. Schmieder, R.E., et al., *Renin-angiotensin system and cardiovascular risk*. *Lancet*, 2007. **369**(9568): p. 1208-19.
15. Deckers, I.A., et al., *Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. 1104-16.
16. Yim, H.E. and K.H. Yoo, *Renin-Angiotensin system - considerations for hypertension and kidney*. *Electrolyte Blood Press*, 2008. **6**(1): p. 42-50.
17. Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz, *Physiology of local renin-angiotensin systems*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(3): p. 747-803.
18. Ichihara, A., et al., *Renal renin-angiotensin system*. *Contrib Nephrol*, 2004. **143**: p. 117-30.
19. Atlas, S.A., *The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition*. *J Manag Care Pharm*, 2007. **13**(8 Suppl B): p. 9-20.
20. Ferrario, C.M., *Role of Angiotensin II in Cardiovascular Disease — Therapeutic Implications of More Than a Century of Research*. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 2006. **7**(1): p. 3-14.
21. Carey, R.M. and H.M. Siragy, *Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(3): p. 261-71.
22. Ferrario, C.M., *Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2006. **7**(1): p. 3-14.
23. Satou, R., H. Penrose, and L.G. Navar, *Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure*. *Curr Hypertens Rep*, 2018. **20**(12): p. 100.
24. Mancia, G., et al., *2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. *J Hypertens*, 2007. **25**(6): p. 1105-87.
25. Wallace, M.A., *Anatomy and physiology of the kidney*. *Aorn j*, 1998. **68**(5): p. 800, 803-16, 819-20; quiz 821-4.
26. Tomita, Y., *Early renal cell cancer*. *International Journal of Clinical Oncology*, 2006. **11**(1): p. 22-27.

## Literaturverzeichnis

27. Funder, J.W., *New biology of aldosterone, and experimental studies on the selective aldosterone blocker eplerenone*. Am Heart J, 2002. **144**(5 Suppl): p. S8-11.
28. Muller, D.N., et al., *Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin II*. Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 1): p. 98-104.
29. Campbell, D.J., *Circulating and tissue angiotensin systems*. J Clin Invest, 1987. **79**(1): p. 1-6.
30. Engeli, S., R. Negrel, and A.M. Sharma, *Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system*. Hypertension, 2000. **35**(6): p. 1270-7.
31. Gomez, R.A., et al., *Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney*. Am J Physiol, 1988. **254**(4 Pt 2): p. F582-7.
32. Ingelfinger, J.R., et al., *In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system*. J Clin Invest, 1990. **85**(2): p. 417-23.
33. Douglas, J.G., *Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex*. Am J Physiol, 1987. **253**(1 Pt 2): p. F1-7.
34. Ingelfinger, J.R., et al., *Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: autocrine ANG II feedback*. Am J Physiol, 1999. **276**(2): p. F218-27.
35. Kobori, H., L.M. Harrison-Bernard, and L.G. Navar, *Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension*. Hypertension, 2001. **37**(5): p. 1329-35.
36. Nishiyama, A., D.M. Seth, and L.G. Navar, *Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats*. Hypertension, 2002. **39**(1): p. 129-34.
37. Davisson, R.L., et al., *Novel mechanism of hypertension revealed by cell-specific targeting of human angiotensinogen in transgenic mice*. Physiol Genomics, 1999. **1**(1): p. 3-9.
38. Kaschina, E. and T. Unger, *Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function*. Blood Press, 2003. **12**(2): p. 70-88.
39. Yan, C., et al., *Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(1): p. 26-36.
40. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
41. Force, T. and J.V. Bonventre, *Growth factors and mitogen-activated protein kinases*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 152-61.
42. Hsueh, W.A., R.E. Law, and Y.S. Do, *Integrins, adhesion, and cardiac remodeling*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 176-80.
43. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1005-28.
44. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. **74**(6): p. 1141-8.
45. Kranzhofer, R., et al., *Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(7): p. 1623-9.
46. Pueyo, M.E., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 645-51.
47. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Cardiovascular and Renal Diseases*. Pharmacological Reviews, 2000. **52**(1): p. 11-34.
48. Schmieder, R.E., et al., *Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1304-9.
49. Brunner, H.R. and H. Gavras, *Angiotensin blockade for hypertension: a promise fulfilled*. Lancet, 2002. **359**(9311): p. 990-2.
50. Jandeleit-Dahm, K.A., et al., *Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes*. J Hypertens, 2005. **23**(3): p. 463-73.
51. Siamopoulos, K.C. and R.G. Kalaitzidis, *Inhibition of the renin-angiotensin system and chronic kidney disease*. Int Urol Nephrol, 2008. **40**(4): p. 1015-25.
52. Karalliedde, J. and G. Viberti, *Evidence for renoprotection by blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and diabetes*. J Hum Hypertens, 2006. **20**(4): p. 239-53.
53. Coresh, J., et al., *Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(1): p. 1-12.
54. *Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia)*. Lancet, 1997. **349**(9069): p. 1857-63.
55. Brenner, B.M., et al., *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 861-9.

## Literaturverzeichnis

56. Ruggenenti, P., et al., *Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN)*. *Kidney Int*, 1998. **53**(5): p. 1209-16.
57. Burns, W.C. and M.C. Thomas, *Angiotensin II and its role in tubular epithelial to mesenchymal transition associated with chronic kidney disease*. *Cells Tissues Organs*, 2011. **193**(1-2): p. 74-84.
58. Border, W.A. and N.A. Noble, *Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis*. *Hypertension*, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 181-8.
59. 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.
60. Panth, N., K.R. Paudel, and K. Parajuli, *Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease*. *Adv Med*, 2016. **2016**: p. 9152732.
61. Zuo, L., et al., *Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015. **214**(3): p. 329-48.
62. Fridovich, I., *Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 18515-7.
63. Napoli, C. and L.J. Ignarro, *Nitric oxide and atherosclerosis*. *Nitric Oxide*, 2001. **5**(2): p. 88-97.
64. Kryston, T.B., et al., *Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis*. *Mutat Res*, 2011. **711**(1-2): p. 193-201.
65. Giustarini, D., et al., *Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2009. **46**(5-6): p. 241-81.
66. Nishino, T., et al., *Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase*. *Febs j*, 2008. **275**(13): p. 3278-89.
67. Seshiah, P.N., et al., *Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators*. *Circ Res*, 2002. **91**(5): p. 406-13.
68. Geiszt, M., *NADPH oxidases: new kids on the block*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(2): p. 289-99.
69. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension*. *Histochem Cell Biol*, 2004. **122**(4): p. 339-52.
70. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
71. Krata, N., et al., *Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause or the Consequence?* *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2018. **66**(3): p. 211-220.
72. Small, D.M., et al., *Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease*. *Nephrology (Carlton)*, 2012. **17**(4): p. 311-21.
73. Beckman, J.S., *Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite*. *Chem Res Toxicol*, 1996. **9**(5): p. 836-44.
74. Barregard, L., et al., *Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(18): p. 2377-91.
75. Delaney, S., et al., *Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA*. *Free Radic Res*, 2012. **46**(4): p. 420-41.
76. Ohtsubo, T., et al., *Accumulation of 8-oxo-deoxyguanosine in cardiovascular tissues with the development of hypertension*. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(6): p. 760-9.
77. Altieri, F., et al., *DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(5): p. 891-937.
78. Bonner, W.M., et al., *GammaH2AX and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(12): p. 957-67.
79. Romanowski, A., J.R. Murray, and M.J. Huston, *Effects of hydrogen peroxide on normal and hypertensive rats*. *Pharm Acta Helv*, 1960. **35**: p. 354-7.
80. Nishiyama, A., et al., *Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats*. *Hypertension*, 2004. **43**(4): p. 841-8.
81. Viridis, A., et al., *Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress*. *Hypertension*, 2002. **40**(4): p. 504-10.
82. Dobrian, A.D., et al., *Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity*. *Hypertension*, 2004. **43**(1): p. 48-56.
83. Higashi, Y., et al., *Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(25): p. 1954-62.
84. Lip, G.Y., et al., *Oxidative stress in malignant and non-malignant phase hypertension*. *J Hum Hypertens*, 2002. **16**(5): p. 333-6.
85. Lavi, S., et al., *The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans*. *Hypertension*, 2008. **51**(1): p. 127-33.

## Literaturverzeichnis

86. Cottone, S., et al., *Endothelin-1 and F2-isoprostane relate to and predict renal dysfunction in hypertensive patients*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(2): p. 497-503.
87. 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.
88. 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.
89. Rodrigo, R., et al., *Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(10): p. 625-34.
90. Duffy, S.J., et al., *Treatment of hypertension with ascorbic acid*. Lancet, 1999. **354**(9195): p. 2048-9.
91. Darko, D., et al., *Lack of effect of oral vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in Type II diabetes*. Clin Sci (Lond), 2002. **103**(4): p. 339-44.
92. 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.
93. 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.
94. Queisser, N., et al., *Blood pressure has only minor influence on aldosterone-induced oxidative stress and DNA damage in vivo*. Free Radic Biol Med, 2013. **54**: p. 17-25.
95. Curtis, C.D., D.L. Thorngren, and A.M. Nardulli, *Immunohistochemical analysis of oxidative stress and DNA repair proteins in normal mammary and breast cancer tissues*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 9.
96. Nowsheen, S., et al., *Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues*. Mutat Res, 2009. **674**(1-2): p. 131-6.
97. Oka, K., et al., *DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(3): p. 246-52.
98. Wei, Z., et al., *Differential phenotypes of tissue-infiltrating T cells during angiotensin II-induced hypertension in mice*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114895.
99. Idris-Khodja, N., et al., *Dual opposing roles of adaptive immunity in hypertension*. Eur Heart J, 2014. **35**(19): p. 1238-44.
100. Agita, A. and M.T. Alsagaff, *Inflammation, Immunity, and Hypertension*. Acta Med Indones, 2017. **49**(2): p. 158-165.
101. Hahn, A.W., et al., *Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II*. FEBS Lett, 1994. **347**(2-3): p. 178-80.
102. Venegas-Pont, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha antagonist etanercept decreases blood pressure and protects the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus*. Hypertension, 2010. **56**(4): p. 643-9.
103. Guzik, T.J., et al., *Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction*. J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2449-60.
104. Dinh, Q.N., et al., *Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 406960.
105. Satou, R., et al., *Costimulation with angiotensin II and interleukin 6 augments angiotensinogen expression in cultured human renal proximal tubular cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(1): p. F283-9.
106. Koo, J.W., *Renal interstitial fibrosis and Angiotensin inhibition*. Electrolyte Blood Press, 2006. **4**(1): p. 35-43.
107. Strutz, F., *Novel aspects of renal fibrogenesis*. Nephrol Dial Transplant, 1995. **10**(9): p. 1526-32.
108. Guo, G., et al., *Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha to the development of renal fibrosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(5): p. F777-85.
109. Ishidoya, S., et al., *Delayed treatment with enalapril halts tubulointerstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy*. Kidney Int, 1996. **49**(4): p. 1110-9.
110. Matsumoto, K., et al., *Prevention of renal damage by angiotensin II blockade, accompanied by increased renal hepatocyte growth factor in experimental hypertensive rats*. Hypertension, 1999. **34**(2): p. 279-84.
111. Satoh, M., et al., *Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(2): p. 317-25.
112. Ruperez, M., et al., *Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 1937-47.

## Literaturverzeichnis

113. Chen, L., et al., *Influence of connective tissue growth factor antisense oligonucleotide on angiotensin II-induced epithelial mesenchymal transition in HK2 cells*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(8): p. 1029-36.
114. 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.
115. Wolf, G. and E.G. Neilson, *Angiotensin II as a renal growth factor*. J Am Soc Nephrol, 1993. **3**(9): p. 1531-40.
116. Ruiz-Ortega, M. and J. Egido, *Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts*. Kidney Int, 1997. **52**(6): p. 1497-510.
117. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
118. Harris, C.C., *p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective*. Carcinogenesis, 1996. **17**(6): p. 1187-98.
119. Bouck, N., V. Stellmach, and S.C. Hsu, *How tumors become angiogenic*. Adv Cancer Res, 1996. **69**: p. 135-74.
120. Sporn, M.B., *The war on cancer*. Lancet, 1996. **347**(9012): p. 1377-81.
121. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
122. Klymkowsky, M.W. and P. Savagner, *Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe*. Am J Pathol, 2009. **174**(5): p. 1588-93.
123. Corcos, D., *Unbalanced replication as a major source of genetic instability in cancer cells*. Am J Blood Res, 2012. **2**(3): p. 160-9.
124. Pellman, D., *Cell biology: aneuploidy and cancer*. Nature, 2007. **446**(7131): p. 38-9.
125. Ionov, Y., et al., *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis*. Nature, 1993. **363**(6429): p. 558-61.
126. Al-Tassan, N., et al., *Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors*. Nat Genet, 2002. **30**(2): p. 227-32.
127. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 761, 763.
128. *Mutation*, in eLS.
129. Freese, E., *THE DIFFERENCE BETWEEN SPONTANEOUS AND BASE-ANALOGUE INDUCED MUTATIONS OF PHAGE T4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1959. **45**(4): p. 622-33.
130. Viel, A., et al., *A Specific Mutational Signature Associated with DNA 8-Oxoguanine Persistence in MUTYH-defective Colorectal Cancer*. EBioMedicine, 2017. **20**: p. 39-49.
131. Sanz, A.B., et al., *Mechanisms of renal apoptosis in health and disease*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(9): p. 1634-42.
132. Nouwen, E.J., et al., *Hyperplasia, hypertrophy, and phenotypic alterations in the distal nephron after acute proximal tubular injury in the rat*. Lab Invest, 1994. **70**(4): p. 479-93.
133. Thomas, G.L., et al., *Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(9): p. 2216-26.
134. Klahr, S., G. Schreiner, and I. Ichikawa, *The progression of renal disease*. N Engl J Med, 1988. **318**(25): p. 1657-66.
135. Aizawa, T., et al., *Different effects of angiotensin II and catecholamine on renal cell apoptosis and proliferation in rats*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 645-53.
136. Chatterjee, P.K., et al., *Selective antagonism of the AT1 receptor inhibits angiotensin II stimulated DNA and protein synthesis in primary cultures of human proximal tubular cells*. Kidney Int, 1997. **52**(3): p. 699-705.
137. 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.
138. Queisser, N., et al., *Aldosterone activates the oncogenic signals ERK1/2 and STAT3 via redox-regulated mechanisms*. Mol Carcinog, 2017.
139. Li, X. and G.R. Stark, *NFkappaB-dependent signaling pathways*. Exp Hematol, 2002. **30**(4): p. 285-96.
140. Sethi, G., B. Sung, and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(1): p. 21-31.
141. Naugler, W.E. and M. Karin, *NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 19-26.
142. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.

## Literaturverzeichnis

143. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
144. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. Acta Anat (Basel), 1995. **154**(1): p. 8-20.
145. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol, 2006. **172**(7): p. 973-81.
146. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1429-37.
147. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. Development, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
148. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
149. Chen, J., J.K. Chen, and R.C. Harris, *Angiotensin II induces epithelial-to-mesenchymal transition in renal epithelial cells through reactive oxygen species/Src/caveolin-mediated activation of an epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(5): p. 981-91.
150. Carvajal, G., et al., *Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation*. Kidney Int, 2008. **74**(5): p. 585-95.
151. Burns, W.C., et al., *Angiotensin II mediates epithelial-to-mesenchymal transformation in tubular cells by ANG 1-7/MAS-1-dependent pathways*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **299**(3): p. F585-93.
152. Rodrigues-Diez, R., et al., *Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways*. Pharm Res, 2008. **25**(10): p. 2447-61.
153. Bravo, J., et al., *Vimentin and heat shock protein expression are induced in the kidney by angiotensin and by nitric oxide inhibition*. Kidney Int Suppl, 2003(86): p. S46-51.
154. Chen, H., et al., *Novel RAS inhibitor 25-O-methylalisol F attenuates epithelial-to-mesenchymal transition and tubulo-interstitial fibrosis by selectively inhibiting TGF-beta-mediated Smad3 phosphorylation*. Phytomedicine, 2018. **42**: p. 207-218.
155. Jinde, K., et al., *Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(4): p. 761-9.
156. Rastaldi, M.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 137-46.
157. Peinado, H., et al., *Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2827-39.
158. Rhyu, D.Y., et al., *Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(3): p. 667-75.
159. Manickam, N., et al., *RhoA/Rho kinase mediates TGF-beta1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **307**(2): p. F159-71.
160. Almquist, M., et al., *Metabolic factors and risk of thyroid cancer in the Metabolic syndrome and Cancer project (Me-Can)*. Cancer Causes Control, 2011. **22**(5): p. 743-51.
161. Ferrario, C.M. and W.B. Strawn, *Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2006. **98**(1): p. 121-8.
162. el Nahas, A.M., et al., *Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring*. Kidney Int, 1991. **40**(1): p. 29-34.
163. 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.
164. Dyaico, M.J., et al., *The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats*. Mutat Res, 1994. **307**(2): p. 461-78.
165. Farabaugh, P.J., *Sequence of the lacI gene*. Nature, 1978. **274**(5673): p. 765-9.
166. Lee, S.Y., et al., *Expression of E-cadherin in pig kidney*. J Vet Sci, 2013. **14**(4): p. 381-6.
167. Zimnol, A., et al., *Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice develop angiotensin II-induced oxidative stress and DNA damage without blood pressure increase*. Am J Physiol Renal Physiol, 2017. **313**(6): p. F1264-f1273.
168. Whitworth, J.A., *2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension*. J Hypertens, 2003. **21**(11): p. 1983-92.
169. Strutz, F. and G.A. Muller, *Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage*. Kidney Blood Press Res, 1999. **22**(1-2): p. 71-80.

## Literaturverzeichnis

170. Lea, W.B., et al., *Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt*. *Kidney Int*, 2009. **75**(9): p. 936-44.
171. Delanaye, P., E. Cavalier, and H. Pottel, *Serum Creatinine: Not So Simple!* *Nephron*, 2017. **136**(4): p. 302-308.
172. Fujimoto, T., et al., *Excretions of urinary albumin and various proteins increase in hypertension*. *Blood Press*, 2008. **17**(5-6): p. 270-3.
173. Pushpakumar, S., et al., *Toll-like Receptor 4 Deficiency Reduces Oxidative Stress and Macrophage Mediated Inflammation in Hypertensive Kidney*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 6349.
174. Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard, *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. *Nature*, 2013. **496**: p. 445.
175. Lalani, I., K. Bhol, and A.R. Ahmed, *Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1997. **79**(6): p. 469-83.
176. Kassin, M., et al., *Interleukin-10 released by CD4(+)CD25(+) natural regulatory T cells improves microvascular endothelial function through inhibition of NADPH oxidase activity in hypertensive mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2534-42.
177. Lima, V.V., et al., *Interleukin-10 limits increased blood pressure and vascular RhoA/Rho-kinase signaling in angiotensin II-infused mice*. *Life Sci*, 2016. **145**: p. 137-43.
178. Mirhafez, S.R., et al., *An imbalance in serum concentrations of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in hypertension*. *J Am Soc Hypertens*, 2014. **8**(9): p. 614-23.
179. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney*. *Kidney Int Suppl*, 2002(82): p. S12-22.
180. Zhang, J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha produced in the kidney contributes to angiotensin II-dependent hypertension*. *Hypertension*, 2014. **64**(6): p. 1275-81.
181. Borthwick, L.A., T.A. Wynn, and A.J. Fisher, *Cytokine mediated tissue fibrosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1832**(7): p. 1049-60.
182. Narayan, K.M., M.K. Ali, and J.P. Koplan, *Global noncommunicable diseases--where worlds meet*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(13): p. 1196-8.
183. Queisser, N., et al., *Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-kappaB-activation in kidney tubule cells*. *Mol Carcinog*, 2011. **50**(2): p. 123-35.
184. 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.
185. Queisser, N., et al., *Aldosterone activates transcription factor Nrf2 in kidney cells both in vitro and in vivo*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **21**(15): p. 2126-42.
186. Feliers, D., et al., *Angiotensin II stimulation of VEGF mRNA translation requires production of reactive oxygen species*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(4): p. F927-36.
187. Gill, P.S. and C.S. Wilcox, *NADPH oxidases in the kidney*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(9-10): p. 1597-607.
188. Sachse, A. and G. Wolf, *Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(9): p. 2439-46.
189. Gordish, K.L. and W.H. Beierwaltes, *Chronic resveratrol reverses a mild angiotensin II-induced pressor effect in a rat model*. *Integr Blood Press Control*, 2016. **9**: p. 23-31.
190. Pech, V., et al., *Oxidant stress and blood pressure responses to angiotensin II administration in rats fed varying salt diets*. *Am J Hypertens*, 2006. **19**(5): p. 534-40.
191. Whitehouse, W., et al., *Urinary F2-Isoprostanes in Cats with International Renal Interest Society Stage 1-4 Chronic Kidney Disease*. *J Vet Intern Med*, 2017. **31**(2): p. 449-456.
192. Upadhyay, A., et al., *Inflammation, kidney function and albuminuria in the Framingham Offspring cohort*. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(3): p. 920-6.
193. Karanovic, D., et al., *Effects of Single and Combined Losartan and Tempol Treatments on Oxidative Stress, Kidney Structure and Function in Spontaneously Hypertensive Rats with Early Course of Proteinuric Nephropathy*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0161706.
194. 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.
195. Wu, J.H., et al., *Effects of alpha-tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes*. *Clin Chem*, 2007. **53**(3): p. 511-9.
196. Guo, W., et al., *Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(4): p. H1396-403.
197. Dhein, S., et al., *Organ-protective effects on the liver and kidney by minocycline in small piglets undergoing cardiopulmonary bypass*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2015. **388**(6): p. 663-76.

## Literaturverzeichnis

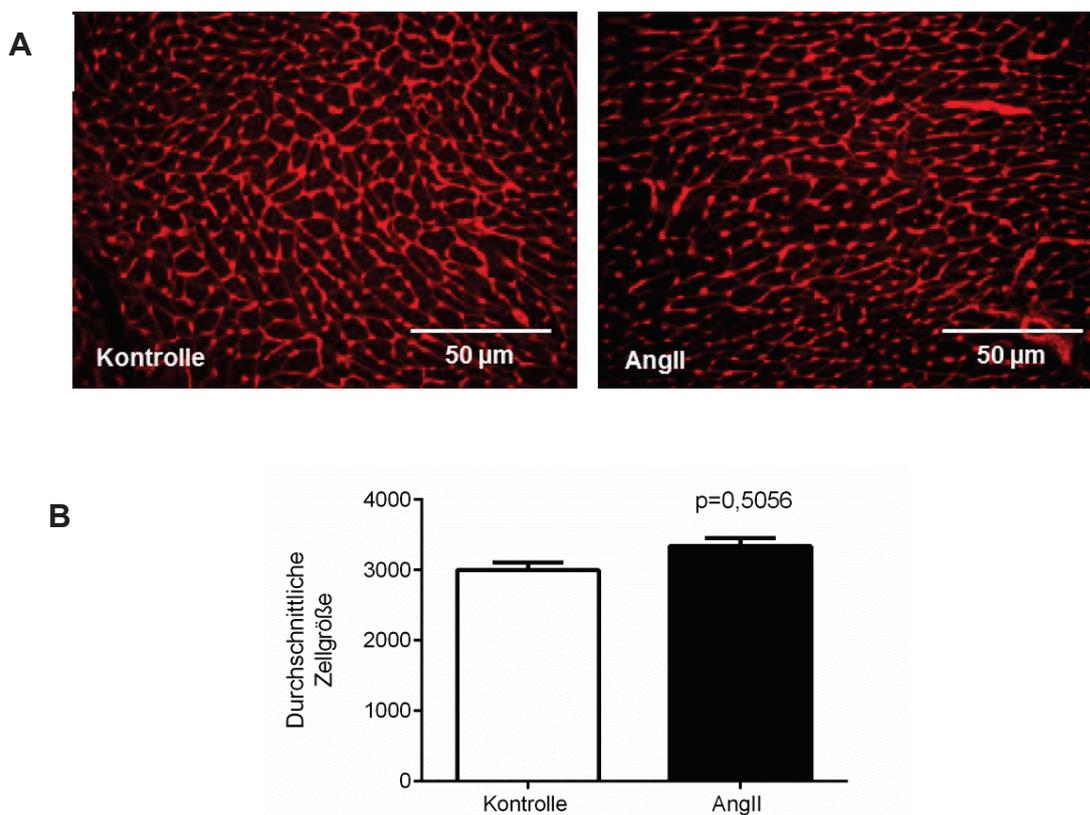
198. Zou, A.P. and A.W. Cowley, Jr., *Nitric oxide in renal cortex and medulla. An in vivo microdialysis study.* Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 2): p. 194-8.
199. Tsuruya, K., et al., *Accumulation of 8-oxoguanine in the cellular DNA and the alteration of the OGG1 expression during ischemia-reperfusion injury in the rat kidney.* DNA Repair (Amst), 2003. **2**(2): p. 211-29.
200. Rosenquist, T.A., D.O. Zharkov, and A.P. Grollman, *Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7429-34.
201. Kim, H.N., et al., *Changes in DNA 8-hydroxyguanine levels, 8-hydroxyguanine repair activity, and hOGG1 and hMTH1 mRNA expression in human lung alveolar epithelial cells induced by crocidolite asbestos.* Carcinogenesis, 2001. **22**(2): p. 265-9.
202. Habib, S.L., et al., *Tuberin haploinsufficiency is associated with the loss of OGG1 in rat kidney tumors.* Mol Cancer, 2008. **7**: p. 10.
203. Queisser, N., et al., *Aldosterone induces fibrosis, oxidative stress and DNA damage in livers of male rats independent of blood pressure changes.* Toxicol Appl Pharmacol, 2014. **280**(3): p. 399-407.
204. Bol, S.A., et al., *Mutational analysis of the liver, colon and kidney of Big Blue rats treated with 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline.* Carcinogenesis, 2000. **21**(1): p. 1-6.
205. Yang, H., B.W. Glickman, and J.G. de Boer, *Sex-specific induction of mutations by PhIP in the kidney of male and female rats and its modulation by conjugated linoleic acid.* Environ Mol Mutagen, 2002. **40**(2): p. 116-21.
206. Chen, L., et al., *Mutations induced by carcinogenic doses of aristolochic acid in kidney of Big Blue transgenic rats.* Toxicol Lett, 2006. **165**(3): p. 250-6.
207. de Boer, J.G., et al., *Spectrum of mutations in kidney, stomach, and liver from lacI transgenic mice recovered after treatment with tris(2,3-dibromopropyl)phosphate.* Environ Mol Mutagen, 1996. **28**(4): p. 418-23.
208. Prtenjaca, A., et al., *Relatively high rates of G:C --> A:T transitions at CpG sites were observed in certain epithelial tissues including pancreas and submaxillary gland of adult big blue(R) mice.* Environ Mol Mutagen, 2014. **55**(1): p. 51-63.
209. Yamaguchi, T., et al., *Lack of mutagenic and toxic effects of low dose potassium bromate on kidneys in the Big Blue rat.* Mutat Res, 2008. **652**(1): p. 1-11.
210. Muglia, V.F. and A. Prando, *Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings.* Radiol Bras, 2015. **48**(3): p. 166-74.
211. Huang, L.L., et al., *Aldosterone induces kidney fibroblast proliferation via activation of growth factor receptors and PI3K/MAPK signalling.* Nephron Exp Nephrol, 2012. **120**(4): p. e115-22.
212. Chen, H., et al., *Eplerenone-mediated aldosterone blockade prevents renal fibrosis by reducing renal inflammation, interstitial cell proliferation and oxidative stress.* Kidney Blood Press Res, 2013. **37**(6): p. 557-66.
213. Prozialeck, W.C., P.C. Lamar, and D.M. Appelt, *Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron.* BMC Physiol, 2004. **4**: p. 10.
214. Siliciano, J.D. and D.A. Goodenough, *Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells.* J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 1): p. 2389-99.
215. Lamouille, S., et al., *Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs.* Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(2): p. 200-7.
216. Ma, L., et al., *miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis.* Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 247-56.
217. Liu, Y., *New Insights into Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis.* Journal of the American Society of Nephrology, 2010. **21**(2): p. 212-222.
218. Kriz, W., B. Kaissling, and M. Le Hir, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy?* J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 468-74.

## 10. Anhang

### 10.1 Ergänzende Abbildungen

#### WGA-Färbung des Herzens zur Bestimmung der durchschnittlichen Zellgröße

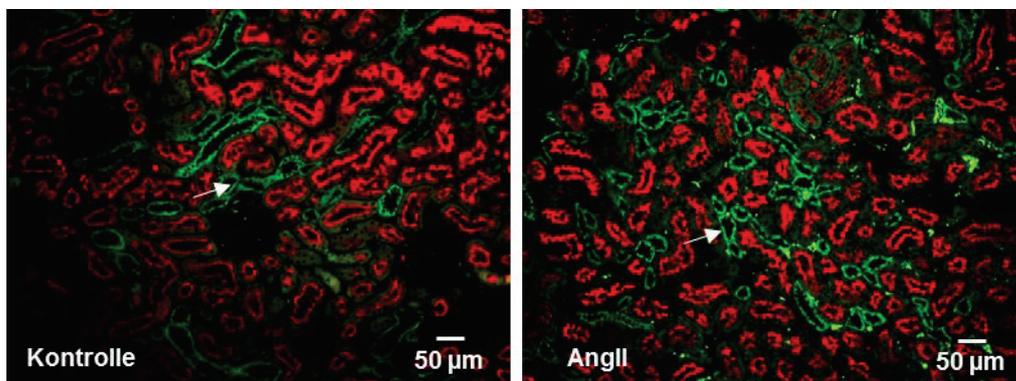
Wie in 4.1.2 aufgeführt, zeigen die AngII-behandelten Tiere ein höheres relatives Herzgewicht als die Kontroll-Tiere, was auf eine Hypertrophie des Herzens schließen lässt. Eine WGA-Färbung zur Bestimmung der durchschnittlichen Zellgröße im Herzen unterstützte diese Vermutung, da die AngII-behandelten Tiere verglichen mit den Kontroll-Tieren tendenziell vergrößerte Zellen aufwiesen (Abbildung 38 A und B).



**Abbildung 38: WGA-Färbung des Herzens zur Bestimmung der durchschnittlichen Zellgröße von Angiotensin II-infundierter und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung. A:** Zu sehen sind repräsentative Bilder der Fluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten des Herzens in einer 1000-fachen Vergrößerung. **B:** Quantifizierung der durchschnittlichen Zellgröße, ausgewertet mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. AngII = Angiotensin II-behandelte Tiere, WGA = Weizenlektin (Wheat germ agglutinin); n = 10.

## Doppelfärbung von E-Cadherin und CD13 in der Niere zur Bestimmung der Lokalisation von E-Cadherin

E-Cadherin wird in der Niere von Wirbeltieren nicht gleichermaßen in allen Zelltypen exprimiert. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zunächst die Lokalisation von E-Cadherin im proximalen Tubulus mittels Doppelfärbung mit CD-13, einem Marker für proximale Tubuluszellen, untersucht. Es zeigte sich, dass E-Cadherin nicht im proximalen Tubulus der Tiere exprimiert wurde (Abbildung 39).



**Abbildung 39: E-Cadherin-CD13-Doppelfärbung zur Expressionsanalyse des epithelialen Markers E-Cadherin im proximalen Tubulus in der Niere von Angiotensin II-infundierten und Kontroll-Tieren nach 20-wöchiger Behandlung.** Zu sehen sind repräsentative Bilder der Fluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten der Niere aus dem Cortex, aufgenommen in einer 200-fachen Vergrößerung. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf die fehlende Co-Lokalisation von E-Cadherin mit CD13. Angll = Angiotensin II-behandelte Tiere; n = 10.

### 10.2 Publikationsliste von Erst-Autorenschaften

Aus Prioritätsgründen wurden Teile dieser Arbeit bereits unter folgendem Titel publiziert:

Hartmann C, Schulz I, Epe B, Schupp N (2019) Angiotensin II-induced hypertension increases the mutation frequency in rat kidney. Archives of Toxicology 93(7):2045-2055

#### **Auflistung des Eigenanteils an der Publikation:**

Schreiben:

Mitverfassen des Methodenteils, der Ergebnisse und der Diskussion

Abbildungen:

## Anhang

Durchführung der zu Abbildung 1, 2 und 3 zugehörigen Experimente sowie Auswertung der Ergebnisse und Erstellen der Abbildungen

### Tabellen:

Tabelle 2: Durchführung mit Kerstin De Mezzo der zu Tabelle 2 zugehörigen Experimente sowie Auswertung der Ergebnisse

Tabelle 3: Durchgeführt am Institut für Pharmazie und Biochemie in Mainz von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Epe

## 11. Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Fritz und Frau PD Dr. Nicole Schupp für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Toxikologie anfertigen zu dürfen.

Vielen Dank Nicole für deine tolle Betreuung, dein offenes Ohr und dafür, dass du mir auch in schlechten Phasen immer das Gefühl gegeben hast, dass wir das schon hinkriegen.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Stark aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Bernd Epe und Frau Ina Schulz vom Institut für Pharmazie und Biochemie in Mainz für die Durchführung des Mutations-Assays und für die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie in Düsseldorf für die schöne Zeit in den letzten vier Jahren. Ein ganz besonderer Dank geht hier an Stephi Pohlmann für ihre geduldige Hilfe bei unseren Tierversuchen und Kerstin De Mezzo für ihre Hilfe bei den Experimenten.

Vor allem bei einigen Toxis möchte ich mir hier noch (in alphabetischer Reihenfolge) bedanken:

Andi, als einstimmig gewählter Makro-Manager hast du unzählige Stunden vor meinem altersschwachen PC verbracht. Danke dir für deine Unterstützung, deine Geduld und deine Art, die mich auch in den verzweifeltsten Situationen noch zum Lachen bringt.

Änna, danke, dass du mich so wundervoll in Düsseldorf willkommen geheißen hast und selbst bei den dämlichsten Aktionen immer mit mir und nur ganz selten über mich gelacht hast.

Kat, egal ob im Labor, bei Weiterbildungen oder in der Altstadt: Danke dir, dass du mir mit deiner hilfsbereiten und einzigartigen Art zur Seite gestanden hast!

Remus, danke für deine fachliche und emotionale Unterstützung sowohl im Labor, als auch daneben. Durch dein „just do it“ hast du mir in vielen Lebenslagen geholfen!

## Danksagung

Danke auch den Bio-Bienen Annemarie, Jasmin und Mari für eure Hilfe bei den Korrekturen der Arbeit, eure emotionale und fachliche Unterstützung und v.a. danke für eure wunderbare Freundschaft, auf die ich mich immer verlassen kann!

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie: Danke für eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht und dafür, dass ihr mir immer wieder zeigt, was wirklich zählt und dass es wichtigere Dinge gibt, als ein erfolgreiches Experiment.

Widmen möchte ich diese Arbeit – wie fast alles in meinem Leben – meiner Oma.

## **12. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

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

Ich habe keine vorherigen erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 11.08.2019

Christina Hartmann