

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

Bedeutung der Mitogen Aktivierten Protein Kinase (MAPK) p38 bei der Hypertonieentstehung

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

Vorgelegt von

Stefanie Stamer

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Johannes Stegbauer

Zweitgutachter: PD Dr. Sebastian Temme

Veröffentlichungen

2014 **Angiotensin- (1-7) modulates renal vascular resistance through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in apolipoprotein E-deficient mice**

Potthoff SA, Fähling M, Clasen T, Mende S, Ishak B, Suvorava T, Stamer S, Thieme M, Sivritas SH, Kojda G, Patzak A, Rump LC, Stegbauer J, Hypertension. 2014;63:265-272

2016 **Chronic p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves vascular function and remodeling in angiotensin II-dependent hypertension**

Potthoff SA, Stamer S, Grave K, Königshausen E, Sivritas SH, Thieme M, Mori Y, Wosnowski M, Rump LC, Stegbauer J, J Renin Angiotensin Aldosteron System 2016: I-II

Zusammenfassung

Bluthochdruck ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Hier nimmt das Renin-Angiotensin System mit seinem Hauptmetaboliten Angiotensin (Ang) II eine entscheidende Rolle ein. Ang II bindet an den Ang II Typ 1 Rezeptor (AT1R) und induziert dadurch eine Vasokonstriktion, eine Salz- und Wasserretention, Aldosteronfreisetzung sowie eine Sympathikusaktivierung, was letztendlich zu Bluthochdruck und Zielorganschäden führen kann. Am Gefäß führt die AT1R Aktivierung zur Vasokonstriktion, Gefäßhypertrophie und Inflammation und letztendlich zur Gefäßschädigung. Die zugrundeliegenden Signalkaskaden, die zur Vasokonstriktion und Gefäßschädigung führen sind noch nicht vollständig verstanden. Eine der dafür verantwortlichen Signalkaskaden könnte über die AT1R induzierte Aktivierung der Mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK) p38 aktiviert werden. Um deren Einfluss zu untersuchen, wurde die p38-MAPK in Mäusen sowohl medikamentös als auch genetisch ausgeschaltet. Im ersten Schritt wurden C57/Bl6 Wildtyp (WT) Mäuse mit dem p38-MAPK-Inhibitor BIRB 796 (50 mg/kg/Tag) und osmotischen Ang II Pumpen (1000 ng/kg/min) über 14 Tage versorgt. Die chronische p38-MAPK Inhibition führte zu einer abgeschwächten Blutdruckantwort, zu verbesserten renalen Gefäßfunktion und zu einer weniger stark ausgeprägten Gefäßhypertrophie.

Im zweiten Schritt wurden KISm22 α -Cre⁺ p38 α flox/flox (p38-MAPK Ko) Mäuse, bei denen p38 MAPK in VSMC's ausgeschaltet wurde, mit Cre⁻ p38 α flox/flox (Kontrolle) verglichen. Nachdem nachgewiesen wurde, dass die p38-MAPK erfolgreich aus VSMCs entfernt wurde, wurde die Blutdruckantwort auf Ang II über 14 Tage telemetrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Blutdruckantwort in den KI-SmKo signifikant niedriger war als in den Kontrollen. Interessanterweise entwickelten die KI-SmKo Tiere eine ausgeprägte Herzhypertrophie. Echokardiographisch bzw. immunhistochemisch zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Herzinsuffizienz und ein Herzfibrose. Auch die NO-abhängige Vasorelaxation war signifikant vermindert. Eine abschließende Erklärung für diese überraschenden Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit noch nicht gefunden werden. Es scheint aber so zu sein, dass die p38-MAPK eine elementare Rolle bei der Regulation der Herzfunktion unter hypertensiven Bedingungen spielt. Ebenso zeigen unsere Ergebnisse, dass die p38-MAPK für die Vasokonstriktion und zur Blutdruckregulation essenziell ist.

Summary

Hypertension is one of the most important risk factors of cardiovascular diseases. Among other mediators, hypertension is caused by angiotension II (Ang), which is a major metabolite of the renin- angiotensin system.

Ang II binds to the Ang II type receptor (AT1R) and promotes vasoconstriction, salt- and water retention, aldosterone release and sympathetic activation. All these mechanisms decisively lead to hypertension. Continuous vascular AT1R-activation results in vascular hypertrophy, inflammation and terminally to an irreparable vascular damage. Until now, the exact mechanisms are not completely understood yet.

One possible approach might be an AT1R induced activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) p38 as activation of p38-MAPK has been shown to induce vascular hypertrophy and inflammation. First investigations in mice with pharmaceutical inhibited p38-MAPK were followed by genetically modified mice with *knock out* of p38alpha-MAPK genes:

C57/Bl6 wild type (WT) mice were treated with the selective p38-MAPK inhibitor, called BIRB 796 (50 mg/kg/day). Furthermore, an implantation of osmotic minipumps with Ang II (1000 ng/kg/min) took place for 14 days. Compared to sham-treated mice, p38-MAPK-inhibition caused to a significantly lower blood pressure, an overall improved vascular function and a lower level of vessel hypertrophy in Ang II-infused WT mice.

In the second part of our study, we analyzed genetically altered KISm22 α -Cre+ p38 α flox/flox (p38-MAPK Ko) mice, in which the MAPK p38 was knocked out in vascular smooth muscle cells (VSMC). A comparison with a negative Cre-p38 α flox/flox control group was included. After proving that MAPK p38 was deleted from VSMC`s, we monitored blood pressure responses via telemetric surveillance for 14 days.

This analysis found a significant lower blood pressure response to Ang II in KI-SmKo compared to the control group. Interestingly the KI-SmKo control group developed a massive cardiac hypertrophy. This finding was verify by cardiac echography and immunohistochemical images which showed increased cardiac fibrosis in KI-SmKO compared to the negative control group. Moreover, the NO-dependent vasorelaxation was significantly reduced.

A final explanation for these surprising results could not be found in this investigation.

It appears, that p38-MAPK is an adjusting enzyme in regulation of heart function and hypertensive conditions. Our results also demonstrate, the essential function of p38-MAPK in terms of vasoconstriction and blood pressure regulation.

Abkürzungsverzeichnis

bpm	<i>beats per minute</i>	ACE 1/2	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
g	Gramm	Ang II	Angiotensin II
kg	Kilogramm	APA/APN	Aminopeptidase A/N
M	Molar	APS	Ammonium-Persulfat
mA	Milliamper	AT1/2-	Angiotensin II Typ 1/2-
mg	Milligramm	Rezeptor	Rezeptor
min	Minute	ATP	Adenosintriphosphat
ml	Milliliter	BSA	Bovines Serumalbumin
mM	Millimolar	cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule	COX	Cyclooxygenase
nM	Nanomolar	DAG	1,2-Diacylglycerine
µg	Mikrogramm	DHE	Dihydroethidine
µl	Mikroliter	DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
µM	Mikromolar	ECL	Elektrochemilumineszenz
ng	Nanogramm	EF	Ejektionsfraktion
rpm	<i>rounds per minute</i>	ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
std	Stunde	ET1	Endothelin1-Rezeptor
V	Volt	GSNO	S-Nitrosoglutathione
		HE	Hämatoxylin-Eosin
		Hsp27	<i>Heat Shock Protein 27</i>
		IP3	1,4,5-Triphosphat
		IRAP	<i>Insulin-responsive Aminopeptidase</i>
		JNK	<i>Stress-activated c-Jun N-terminal Kinase</i>
		KCl	Kaliumchlorid
		KG	Körpergewicht
		Ko	<i>knock out</i>
		L-Name	L-NG-Nitroarginine methylester

LPS	Lipopolysaccharid
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase
MK 2/3	MAP Kinase Aktivierte Proteinkinase 2/3
MLC	Myosinleichtkette
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MMP1+9	Matrix-Metalloproteinase 1+9
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pP38	Phospho P38
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RhoA-/Rho-Kinase	Rho assoziierte Protein-Kinase
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Temed	Tetramethylethylenediamine
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hypertonie allgemein.....	1
1.2	p38-MAPK allgemein.....	2
1.3	1.3 Angiotensin II Signalkaskaden	2
1.4	Tiermodell p38 α -MAPK <i>knock out</i>	6
1.5	Ziel der Arbeit.....	8
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Versuchstiere und Haltung	9
2.2	Narkose.....	9
2.3	Implantation von Angiotensin II Pumpen	9
2.4	Isoliert perfundierte Nieren	10
2.5	Bestimmung der renalen Druckantwort	14
2.5.1	Eingesetzte Lösungen und Medikamente	14
2.5.2	Versuchsablauf	15
2.5.3	Auswertung der DWKs	16
2.6	Renale Druckantwort unter Ang II	16
2.7	Herstellung histologischer Paraffinschnitte.....	17
2.8	Bestimmung von ROS in Aorten	18
2.9	Blutdruck- und Herzfrequenzmessung	19
2.9.1	Schwanzmanschettenplethysmographie	19
2.9.2	Telemetrie.....	19
2.10	Echokardiografie	20
2.11	Histologie der Herzen	20
2.12	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	20
2.12.1	Probenentnahme und -aufbereitung p38-MAPK Ko.....	20

2.12.2	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	22
2.12.3	Probenentnahme und -aufbereitung VSMCs	24
2.13	Statistik	25
2.14	Ethikgenehmigung/-votum	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Pharmakologische p38-MAPK Inhibition mit BIRB796 (50 mg/kg/Tag)	27
3.1.1	Effekte von p38-MAPK Inhibition auf Ang II vermittelte Hypertonie ...	27
3.1.2	Ang II induzierte Herzhypertrophie	28
3.1.3	Einfluss von p38-MAPK Inhibition auf die renale Druckantwort	29
3.1.4	Rolle vom p38-MAPK Inhibitor auf Ang II vermittelte Gefäßhypertrophie 31	
3.1.5	Zellversuche mit VSMC	32
3.2	VSMC spezifischer p38-MAPK <i>knock out</i>	33
3.2.1	Charakterisierung des Genotyps	33
3.2.2	Nachweis des p38-MAPK Ko durch Western Blot	33
3.2.3	Effekte von p38-MAPK Ko auf Ang II vermittelte Hypertonie	35
3.2.4	Ang II vermittelte ROS Produktion p38-MAPK Ko	37
3.2.5	Renale Druckantwort bei p38-MAPK Ko in isoliert perfundierter Niere 38	
3.2.6	Renaler Blutfluss bei Ang II Infusion	41
3.2.7	Ang II induzierte Herzfunktionseinschränkung und –hypertrophie	42
3.2.8	Ang II vermittelte Gefäßhypertrophie p38-MAPK Ko	45
3.2.9	Ang II induzierte Herzfibrose	46
3.2.10	Überlebenszeitkurve p38-MAPK Ko nach Ang II	48
4	Diskussion	49
4.1	Antwort und Schlüsselergebnis	49
4.2	Blutdruckentwicklung bei pharmakologischer Inhibition	49

4.3	Relaxation und Kontraktion bei der isoliert perfundierten Niere bei pharmakologischer Inhibition	50
4.4	Veränderung der Gefäßfunktion bei pharmakologischer Inhibition.....	53
4.5	Zusammenhang Ang II und p38-MAPK.....	54
4.6	Blutdruck- und Gewebsveränderungen bei p38 α -MAPK Ko.....	54
4.7	Veränderung der Gefäßfunktion bei p38 α -MAPK Ko und Kontrollen	56
4.8	Nierenrelaxation und -kontraktion bei p38 α -MAPK Ko	57
4.9	Renaler Blutfluss bei p38 α -MAPK Ko.....	60
4.10	Ausgeprägter Herzphänotyp bei p38 α -MAPK Ko.....	60
4.11	Selbstkritik.....	62
4.12	Antwort (take home message)	63
4.13	Ausblick.....	63
5	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	64
6	Literaturverzeichnis	66

1 Einleitung

1.1 Hypertonie allgemein

Hypertonie (Bluthochdruck) ist in der westlichen Welt einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfällen und Nierenfunktionsstörungen. Hypertonie erhöht damit die Morbidität und Mortalität von Menschen und ist somit sowohl bedeutend für den einzelnen Menschen, als auch für das gesamte Gesundheitssystem. Ein Großteil der Mechanismen, die zu Hypertonie führen ist noch unbekannt. Insbesondere die essentielle Hypertonie hat keine bisher bekannte strukturelle Ursache und ist deshalb nur medikamentös behandelbar. Aus diesem Grund ist es ein interessantes und vor allem relevantes Forschungsgebiet.

Einer der wenigen bisher ausführlicher untersuchten Mechanismen der Blutdruckregulation ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS). Hierbei scheint das Peptidhormon Angiotensin II (Ang II), das an den Angiotensin II Typ 1 (AT1) Rezeptor bindet und diesen aktiviert, der wichtigste Bestandteil der Signalkette zu sein. So konnten zahlreiche Studien zeigen, dass die Inhibition dieses Systems den Blutdruck reduziert und auch die kardiovaskuläre und renale Morbidität und Mortalität reduziert. In diesem Zusammenhang scheint die Existenz der Angiotensin 1 (AT1)-Rezeptors auf den Nierentubulusepithelzellen und den glatten Muskelzellen eine große Rolle zu spielen (1) (2).

Der AT1-Rezeptor, aktiviert durch Ang II, vermittelt seine Blutdruckeffekte über verschiedenste Mechanismen (53). Unter anderem kommt es hier zu einer Aktivierung der weiter unten in der Kaskade angesiedelte Mitogen-Aktivierte Protein Kinase p38 (p38-MAPK). Zusätzlich wird eine Gefäßhypertrophie über die Aktivität der p38-MAPK vermittelt. In dieser Dissertation wird untersucht, inwieweit die p38-MAPK-Aktivierung bzw. Inhibierung Blutdruck und Gefäßschädigung verursacht.

1.2 p38-MAPK allgemein

Die p38-MAPK gehört zur übergeordneten Familie der MAP Kinasen. Zu ihnen gehören des Weiteren noch die Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK) und die Stress-activated c-Jun N-terminal Kinase (JNK), die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden (3).

Die p38-MAPK ist eine Prolin-gesteuerte Serin/Threonin-Proteinkinase, von der es 4 Isoformen (α , β , γ und δ) gibt (4). Die Isoformen α und β sind omnipräsent, wobei die Inhibition der p38 α -MAPK-Isoform dazu führt, dass die p38-MAPK komplett inaktiviert wird (Hauptform). Bei einem genetischen Knock-out, bei dem in allen Zellen die p38 α -MAPK-Isoformen ausgeknockt werden, sterben solche genveränderten Mäuse *in utero* (5).

1.3 1.3 Angiotensin II Signalkaskaden

Einer der wichtigsten Mechanismen bei der Kontrolle des Blutdrucks ist die Kontraktion und Relaxation der glatten Muskelzellen, der *vascular smooth muscle cells* (VSMCs), in Gefäßwänden. Hier wirkt Ang II über den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT1) vasokonstriktorisch, führt also durch Muskelkontraktion zu einer Gefäßverengung und damit zur Blutdruckerhöhung (6). Dieser AT1-Rezeptor ist neben den VSMC auch im Gehirn, der Niere und im Herzen zu finden, alle Organe, die an der Blutdruckregulation beteiligt sind. Vor allem die Widerstandsgefäße in der Niere wirken über den AT1-Rezeptor regulatorisch auf die Höhe des Blutdrucks und spielen damit eine wichtige Rolle bei dessen möglicher Beeinflussung (7, 8).

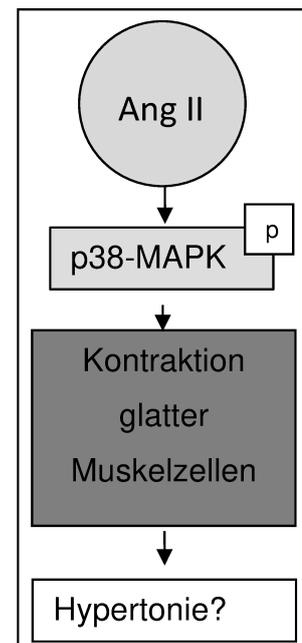
Es gibt zwei Hauptwege, wie es ins VSMCs zur Kontraktion kommt. Bei der ersten Möglichkeit wird der AT1-Rezeptor von Ang II aktiviert, dieser wiederum aktiviert die Phospholipase C, die Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat hydrolysiert und damit 1,4,5-Triphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerine (DAG) generiert. Wenn IP3 an seinen Rezeptor bindet wird Calcium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum der Muskelzelle freigesetzt und es findet eine Kontraktion der VSMC statt. Ebenso werden durch den Calcium-/Calmodulinkomplex über die Myosinleichtkettenkinasen (MLCK) die Myosin-Leichtketten (MLC) phosphoryliert (9).

Um die p38-MAPK als wichtigen Angriffspunkt einer Therapie zu verstehen wird im folgenden Abschnitt der für diese Arbeit relevante Weg der Ang II Signalkaskade beschrieben.

Die Vermutung ist, dass wie in Abb. 1.1 zu sehen, eine Aktivierung der p38-MAPK über Ang II in erster Linie zu einer Blutdrucksteigerung durch eine Kontraktion von glatten Muskelzellen führt. Dies findet wahrscheinlich durch Phosphorylierung der nachfolgenden Proteinkinasen MK2 und 3 sowie dem Heat Shock Protein 27 statt (10) (11). Ein weiterer Einfluss auf die Vasokonstriktion scheint beispielsweise über den Endothelin1-Rezeptor (ET1) stattzufinden. Eine Inhibition der p38-MAPK durch SB203580 führte zu einer reduzierten Vasokonstriktion in hypertensiven Ratten, vermutlich über eine ET1-Inhibition (61). Bisher wurden allerdings die Blutdruckveränderungen durch in vivo p38-MAPK-Aktivierung bzw. Deletion noch nicht gezeigt.

Abb. 1.1: Schematische Signalkette einer Aktivierung der p38-MAPK durch Ang II

Ang II führt durch Phosphorylierung der p38-MAPK zur Aktivierung dieser, daraufhin kommt zur Kontraktion der glatten Muskelzellen und dann zum Bluthochdruck.



Wie in den meisten biologischen Systemen wird diese Signalkette nicht nur von einem Signalstoff wie Ang II beeinflusst. Es gibt weitere Faktoren die die *reactive oxygen species* (ROS), die eine wichtige Rolle spielen, wie die Abb. 1.2 genauer erläutert.

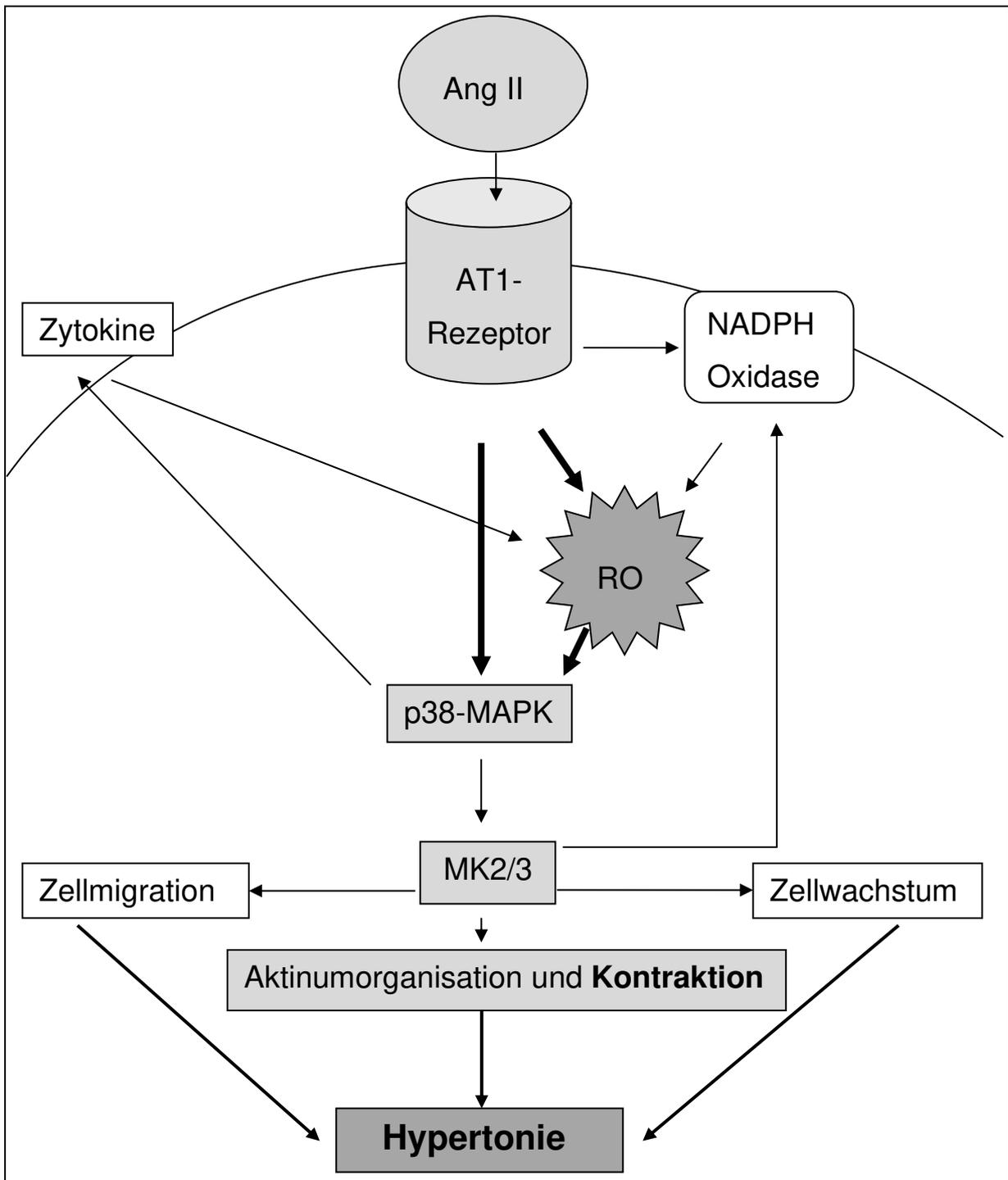


Abb. 1.2: Ang II Signalkaskade über die p38-MAPK

Ang II aktiviert den AT1-Rezeptor und dieser dann z.T. direkt die p38-MAPK, z.T. wird die Signalkaskade über ROS fortgeführt. Die p38-MAPK phosphoryliert MK2/3, was in der Endstrecke zu verschiedenen Prozessen wie Zellmigration, Zellwachstum und vor allem einer Kontraktion von VSMCs führt, also zur Blutdruckerhöhung. Des Weiteren werden rückkoppelnd über die p38-MAPK Zytokine aktiviert bzw. produziert und es wird über die NADPH-Oxidase eine weitere ROS-Produktion forciert

In Kombination mit einer p38-MAPK Aktivierung finden durch eine gleichzeitige zum Teil sich bedingende Aktivierung durch ROS weitere Vorgänge wie Zellmigration, Zytokinaktivierung und vor allem auch Zytokinproduktion statt (12-14). Dadurch können Gefäße weiter geschädigt werden, es kann zu Gefäßhypertrophie und chronische Entzündungsreaktionen im Zusammenhang mit hohem Blutdruck kommen (15, 16).

Dass die ROS eine wichtige Rolle spielen zeigt sich vor allem dadurch, dass die p38-MAPK eine Redox-sensitive Kinase ist, was bedeutet, dass sie, um überhaupt aktiviert zu werden, ROS in ihrer Umgebung braucht. Außerdem wird, wie in Abb. 1.2 ersichtlich, angestoßen durch die p38-MAPK im weiteren Verlauf der Signalkette die NADPH-Oxidase durch MK2 aktiviert (17).

Der Aufbau dieser Signalkette wird durch unterschiedlichste Studien gestützt. Es wurde gezeigt, dass auch bei erhöhter Ang II Zufuhr der Blutdruck und die Schäden an den Endorganen deutlich geringer waren, wenn die p38-MAPK medikamentös ausgeschaltet wurde. Bei einer Untersuchung von Park et al. (18) mit doppelt transgenen Ratten konnte gezeigt werden, dass wenn das humane Renin- und Ang II Gen vorhanden ist und die p38-MAPK medikamentös inhibiert ist der Durchschnittsblutdruck deutlich reduziert war und die Mortalität sank (18). Des Weiteren konnte durch Ausschalten der NADPH-Oxidase ein durch Ang II erwarteter Blutdruckanstieg deutlich abgemildert werden (19). Dies weist darauf hin, wie wichtig dieser Nebenweg über die NADPH-Oxidase und damit ROS für die Funktion verschiedener Signalkaskaden ist.

Als weiteren Hinweis auf die Bedeutung der p38-MAPK bei der Bluthochdruckentwicklung erbringen die Versuche von Ebrahimian *et al.*. Hier wurde bei Mäusen die in der Signalkaskade der p38-MAPK folgende MK2 (s. Abb. 1.2) genetisch ausgeschaltet. Dies führte im Tiermodell trotz Ang II Zufuhr zu einer deutlichen Blutdruckreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem zeigte sich in der Zellkultur von VSMCs dieser *knock out* Reihe eine verminderte Produktion von ROS und Entzündungsmediatoren (20).

Die Bedeutung der p38-MAPK als Angriffspunkt für neuartige Therapien wurde auch in einem Hypercholesterinämiemodell beim Menschen gezeigt. Cheriyan *et al.* (21) behandelten Patienten mit Hypercholesterinämie 28 Tage mit dem selektiven p38 α / β -MAPK-Inhibitor Losmapimod bzw. mit einem Placebo. Nach Ende des

Beobachtungszeitraumes wurde eine Reduktion des C-reaktiven Proteins um 57%, eine um 25% verstärkte vasodilatatorische Acetylcholinwirkung und eine Reduktion der Hsp27-Phosphorylierung um 45% beobachtet (an Tag 28, drei Stunden nach Medikamentengabe), jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (21).

1.4 Tiermodell p38 α -MAPK *knock out*

In diesem Modell soll die Bedeutung der p38-MAPK genauer eruiert werden. Die Hypothese ist, dass eine Inhibition der p38-MAPK das Gefäßsystem schützt und den Blutdruck senkt. Dazu wurden zuerst mit dem oralen pharmakologischen Inhibitor BIRB 796 (30 mg(kg/Tag) Versuche gemacht. BIRB 796 wurde Mäusen in Futterform über 2 Wochen verabreicht. Danach wurde über verschiedene Methoden wie z.B. die isoliert perfundierte Niere die Auswirkungen auf Blutdruck und Nierenfunktion untersucht.

Da eine pharmakologische Inhibition jedoch im biologischen System aufgrund der verschiedenen Einflüsse ihre Grenzen hat und vor allem die Organspezifität nur eingeschränkt beurteilbar ist sollte die p38-MAPK als zweiter Schritt bei Mäusen über einen genetischen *knock out* ausgeschaltet werden. Da es viele Hinweise gibt, dass die p38-MAPK vor allem in VSMCs wirkt, haben wir ein Tiermodell gewählt, welches diese selektiv in glatten Muskelzellen ausschaltet. Zudem ist es so, dass wenn die Hauptform p38 α -MAPK komplett genetisch ausgeschaltet wird, die Mäuse nicht lebensfähig sind und *in utero* sterben (5). Aus diesem Grund sollte die p38 α -MAPK nur in bestimmten Geweben ausgeschaltet werden. Um das zu gewährleisten wurde mit dem Cre-loxP System gearbeitet. Es wurden zwei Linien mit verschiedenen Eigenschaften ausgewählt, die durch Kreuzung die richtigen Eigenschaften für unsere Versuche hatten. Als erstes wurde eine Mauslinie ausgewählt, bei der zwei loxP-Domänen im p38 α -Gen im Bereich der ATP-Bindungsstelle zu finden sind, also ein gefloxtes p38 α -Allel haben (durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen hergestellt von Prof. Pasparakis, Genetisches Institut, Zentrum für molekulare Medizin der Universität zu Köln) (22).

Die zweite benötigte Linie exprimierte eine Cre-Rekombinase unter gewebespezifischer Promotorkontrolle vor allem in den VSMCs der Widerstandsgefäße. Hier wurde eine Mauslinie gewählt, bei der die Cre-Rekombinase im Bereich des Sm22 Locus integriert wurde (durch homologe Rekombination in

embryonalen Stammzellen durch Jackson Labs stock #006878) (23). Diese Mäuse exprimieren sowohl in den großen Gefäßen, als auch in den renalen Widerstandsgefäßen ausreichend Cre-Rekombinase. Durch Kreuzung beider Linien wurden Mäuse mit $p38\alpha^{\text{flox/flox}}$ -Allel gezüchtet, die bei Anwesenheit der Cre-Rekombinase in den Zielgebieten (große Gefäße und renale Widerstandsgefäße) einen $p38\alpha$ -MAPK *knock out* zeigen. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden die in Abb. 1.3 gezeigten *knock out* ($\text{KISm22}\alpha\text{-Cre}^+\text{p38}\alpha^{\text{flox/flox}}$) und Kontrolltiere ($\text{Cre}^-\text{p38}\alpha^{\text{flox/flox}}$) verwendet.

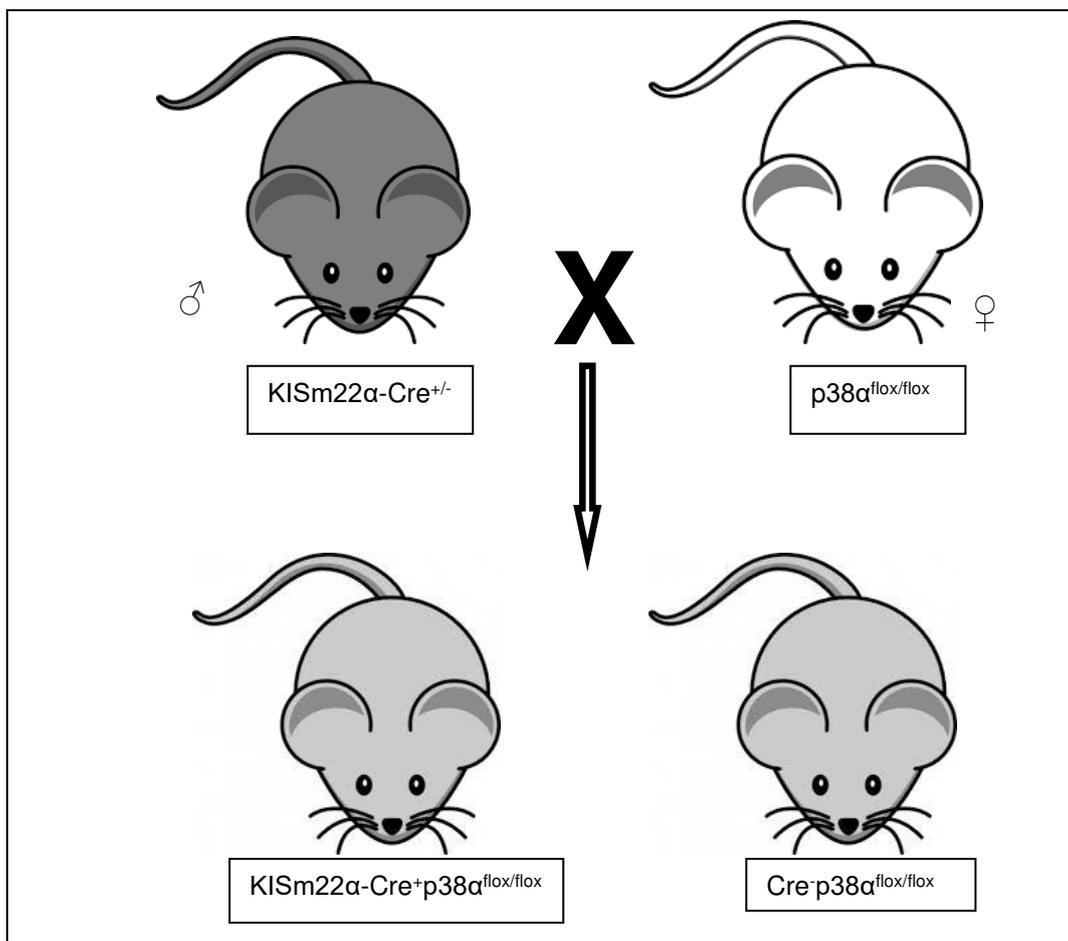


Abb. 1.3: Gewebespezifischer $p38$ -MAPK *knock out*

Verpaarung einer weiblichen $p38\alpha^{\text{flox/flox}}$ mit einer männlichen $\text{KISm22}\alpha\text{-Cre}^{+/-}$ Maus. Die F1 Generation sind entweder $\text{KISm22}\alpha\text{-Cre}^+\text{p38}\alpha^{\text{flox/flox}}$ ($p38$ *knock out* Mäuse), oder $\text{Cre}^-\text{p38}\alpha^{\text{flox/flox}}$ (Kontrollmäuse ohne *knock out*).

Mit diesem Tiermodell konnten die für diese Arbeit geplanten Versuche durchgeführt werden und untersucht werden, was es für Auswirkungen hat, wenn die $p38$ -MAPK in

spezifischen Geweben wie den großen Gefäßen und den Widerstandsgefäßen genetisch ausgeschaltet ist.

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurde untersucht in wie eine pharmakologische Inhibition der p38-MAPK vor Bluthochdruck und Bluthochdruck-assoziiierter Gefäßschädigung schützt. Des Weiteren wurden durch Versuche mit dem p38 α -MAPK *knock out* (KISm22 α -Cre+p38 α flox/flox), spezifischer *knock out* in glatten Muskelzellen, die Bedeutung der p38-MAPK in glatten Muskelzellen untersucht

Langfristig zielt die Forschung an der p38-MAPK darauf ab, die Bekämpfung der Volkskrankheit Bluthochdruck und der damit verbundenen Konsequenzen voranzutreiben und in der Zukunft eine Möglichkeit zu finden neue Behandlungswege einzuschlagen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden C57/Bl6 Tiere, KiSm22 α -Cre+ p38 α flox/flox (p38-MAPK Ko) und als Kontrolle Cre-p38 α flox/flox verwendet. Die Tiere (Männchen) waren acht bis zwölf Wochen alt. Die Haltung erfolgte bei freiem Zugang zu Futter und Wasser und geregelter Tag-Nacht-Rhythmus in der zentralen Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.2 Narkose

Die Narkoselösung bestand aus einer Mischung von 8 ml 0,9%igem NaCl (Fresenius), 1 ml 2%igem Xylazin (Rompun, Bayer) und 1 ml 100 mg/ml Ketaminhydrochlorid (Ketavet, Pfizer). Diese Lösung wurde gewichtsadaptiert (10 μ l/g KG) intraperitoneal appliziert. Zur Kontrolle der Narkosetiefe wurde der Flexorreflex der Hinterbeine auf seinen Ausfall getestet.

2.3 Implantation von Angiotensin II Pumpen

Um bei dem Tiermodell einen erhöhten Blutdruck zu erreichen und dessen Schädigungen zu simulieren, wurden den Mäusen für 14 Tage Ang II-Pumpen unter die Haut implantiert. Hierfür wurden die Maus narkotisiert und mit Augensalbe (zum Schutz vor Austrocknung) versorgt. Danach wurde sie im Nacken rasiert, der gesamte Bereich desinfiziert und die Haut mit einer Schere (gerade, 11,5 cm, Martin) im Nackenbereich eingeschnitten. Durch vorsichtige Präparation wurde die Haut von der Muskelschicht gelöst und die Mikro-osmotische Pumpe (Alzet, Modell 1002, 0,25 μ l/h; Angiotensin II Sigma Aldrich 1000 ng/kg/min) konnte durch den Schnitt an die linke Flanke geschoben werden. Nun wurde der Einschnitt mit drei Einzelknopfnähten (Johnson+Johnson, Ethicon-Vicryl 4-0) verschlossen und der Flüssigkeitsverlust durch 500 μ l NaCl ersetzt.

2.4 Isoliert perfundierte Nieren

Das *in vitro* Experiment der „Isoliert perfundierten Niere“ ermöglichte es, die Gefäßfunktion von Widerstandsgefäßen, welche besonders bei der Blutdruckregulation eine herausragende Rolle spielen, zu untersuchen, sowie Druckantworten auf Relaxations- und Kontraktionsmedikamente aufzuzeichnen. Hieraus kann man auf die Gefäßfunktion und schlussendlich auch auf die Nierenfunktion schließen.

Nachdem die Narkoselösung appliziert und eine ausreichende Tiefe erreicht wurde, wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Hierfür wurde erst die Haut nach zwei lateralen Einschnitten, danach die Muskulatur mit vier Mosquitoklemmen (Martin, 12,5 cm) aufgespannt.

Leber, Magen und Milz wurden mechanisch zur rechten Seite verlagert und das Lig. Phrenicocolicum wurde durchtrennt (Strabismus-Federschere, Martin, 11,5 cm) Unter dem Mikroskop (Motic, SMZ-168) wurde auf Höhe der linken Nebenniere kurz unterhalb des Zwerchfells eine Ligatur (Seraflex 5/0 USP, Serag Wiessner) um die Aorta gelegt. Die Darmeingeweide wurden nach rechts verlagert und mit einer Mosquitoklemme (Martin, gebogen, 12,5 cm) Aorta und V. Cava direkt oberhalb der Aortenbifurkation abgeklemmt. Der Blutfluss in Aorta und V. Cava wurde möglichst nah unterhalb des Abgangs der A. renalis sinister mit einer Mikrogefäßklemme (4 mm, Rebstock) unterbunden. Zwischen den beiden Klemmen wurde ohne relevanten Blutverlust die V. Cava abpräpariert, eine Ligatur gelegt (Abb. 2.1) und die Aorta mit einer Strabismus Federschere indiziert.



Abb. 2.1: Operationssitus

Eine Klemme ist oberhalb der Aortenbifurkation und eine Mikroklammer unterhalb der A. renalis sinister angebracht. Eine Ligatur ist um die Aorta gelegt und das präparierte Stück bereit für die Inzision.

Mit einem ca. 4 cm langen Schlauchstück (Innen-Ø 0,28 mm, Außen-Ø 0,61 mm, Portex, Fine Bore Polythene Tubing, Smith Medicals) wurde die Aorta kanüliert und der Schlauch mit der vorher gelegten Ligatur (Seraflex 5/0 USP, Serag Wiessner) befestigt.

Die Mikrogefäßklemme wurde entfernt und der Schlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Die auf 37°C erwärmte (Umwälzthermostat Haake DC10, Thermo Electron Cooperation) und mit Carbogen (95% O₂, 5% Co₂) angereicherte Krebs-Henseleit-Lösung aus dem Reservoir (HSE, s. Abb. 2.2) wurde mit einer Pumpe (Minipuls 2, Abimed Gilson) mit einer Perfusionsrate von 7,25 ml/min/g Niere angetrieben. Dadurch wurde das Blut ausgeschwemmt und eine Versorgung der Nieren mit O₂ und Nährstoffen sichergestellt. Um den Blutfluss vom Herzen in die abdominalen Organe zu unterbinden, wurde die am Anfang gelegte obere Ligatur zugezogen. Um den Perfusionsdruck auf die Niere zu entlasten und einen Abfluss zu schaffen, wurde die linke V. renalis inzidiert. Die Maus wurde durch Eröffnung beider V. jugularis und Durchtrennung des Rückenmarkes getötet.

Nun wurde mit einer anatomischen Pinzette die Kapsel der rechten Niere inzidiert und vorsichtig entfernt. Der Ureter wurde durchtrennt und die Niere von umliegendem Fettgewebe befreit. Die Nierenarterie wurde freigelegt, sodass sie in ihrem ganzen Verlauf gut sichtbar war. Eine Ligatur wurde um die Nierenarterie gelegt und eine zweite zwischen beiden Nierenarterienabgängen um die Aorta. Die Aorta wurde oberhalb der Mesenterialabgänge eingeschnitten und dem aortalen Verlauf folgend die rechte Nierenarterie mit einem Schlauchstück (Innen-Ø 0,28 mm, Außen-Ø 0,61 mm, Portex, Fine Bore Polythene Tubing, Smith Medicals) kanüliert. Das Schlauchstück wurde mit der ersten Ligatur befestigt und die zweite Ligatur um die Aorta zugezogen. Die rechte Niere konnte damit aus dem Situs entnommen-, in eine beheizte Glaskammer gehängt und dann an das Perfusionssystem angeschlossen werden. Anschließend wurde die linke Niere freipräpariert, eine Ligatur um die Arterie gelegt und diese durch einen kaudalen aortalen Zugang kanüliert. Nachdem der Schlauch befestigt wurde, wurde die linke Niere ebenfalls an das System angeschlossen, wodurch die Versorgung der Nieren mit Sauerstoff und Krebs-Henseleit-Lösung (Zusammensetzung s. Tabelle 2.2) gewährleistet war.

1x Krebs-Henseleit-Lösung in mMol/l

NaCl	118
KCl	4,7
MgSO ₄	0,45
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,03
Glucose	11,1
CaCl ₂	2,5
EDTA	0,067
Ascorbinsäure	0,07

Tabelle 2.2: Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Lösung

Der Druck mmHg am Port wurde mit einem Harvard Apparatus Aufnehmer bestimmt (HSE; Tam-A Transducer, Amplifier module) und mit dem Programm HSE BDAS BP (Ing. Büro Peter Kegler&Sigrid Guhr) aufgezeichnet.

Ein Schema des Perfusionssystems ist im folgenden Schaubild vereinfacht dargestellt (Abb. 2.3):

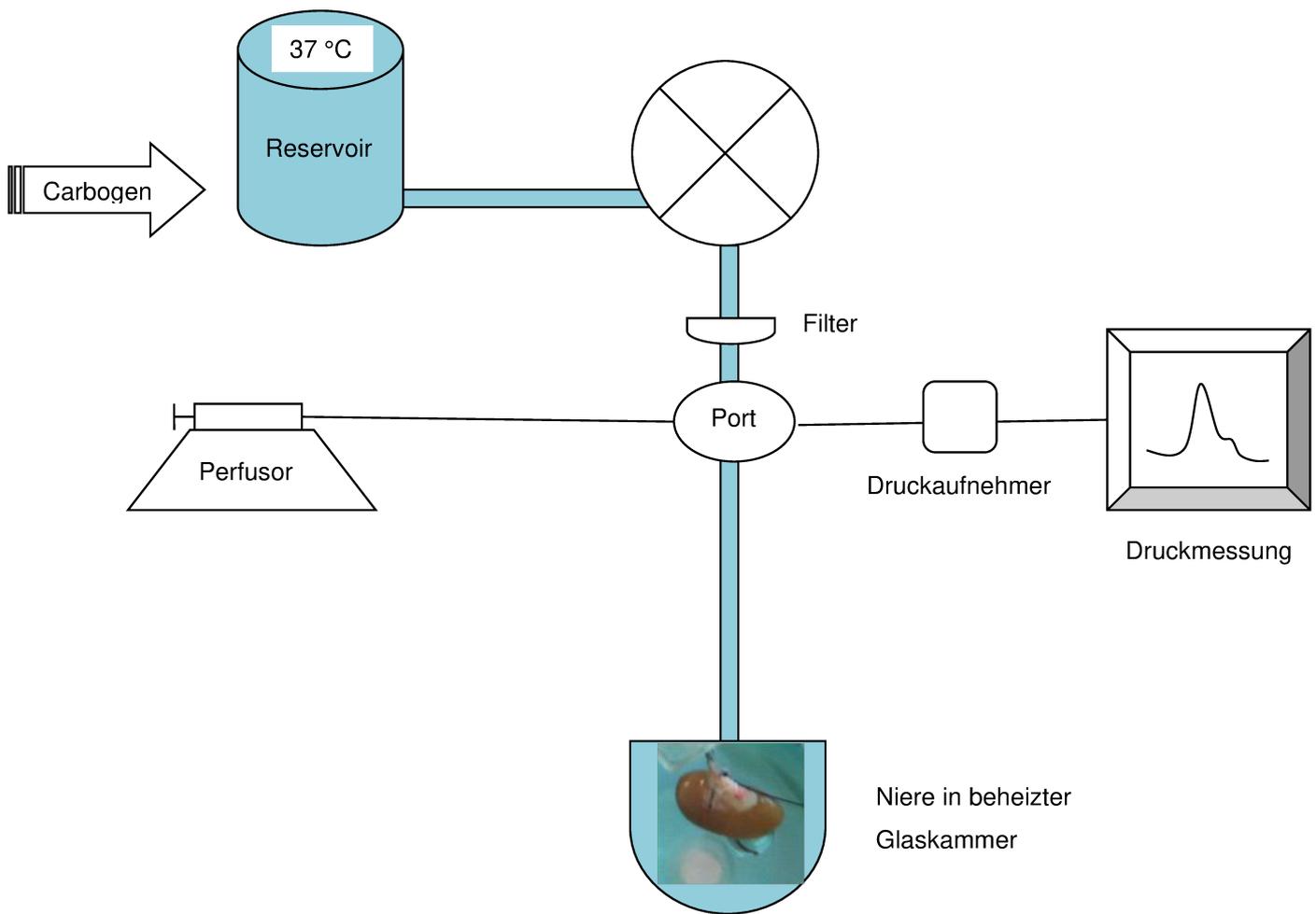


Abb. 2.3: Aufbau des Systems für die isoliert perfundierte Niere

Aus dem Reservoir gelangt über eine Rollenpumpe die auf 37° C aufgeheizte und mit Carbogen angereicherte Krebs-Henseleit-Lösung gefiltert zur Niere. Über einen Injektionsport wird über einen Druckaufnehmer der Druck (in mmHg) abgeleitet, der an diesem Punkt im System herrscht. Steigt der Druck in der Niere, staut sich die Perfusionsflüssigkeit und der Druck steigt parallel im System. Ebenso werden über den Port verschiedene Medikamente verabreicht. Dafür werden die Medikamente mit einer konstanten Pumprate von 0,158 $\mu\text{l}/\text{min}$ von einem Perfusor in das System gegeben. Über das letzte Verbindungsstück erreichen so die Krebs-Henseleit-Lösung und die Medikamente die Niere.

2.5 Bestimmung der renalen Druckantwort

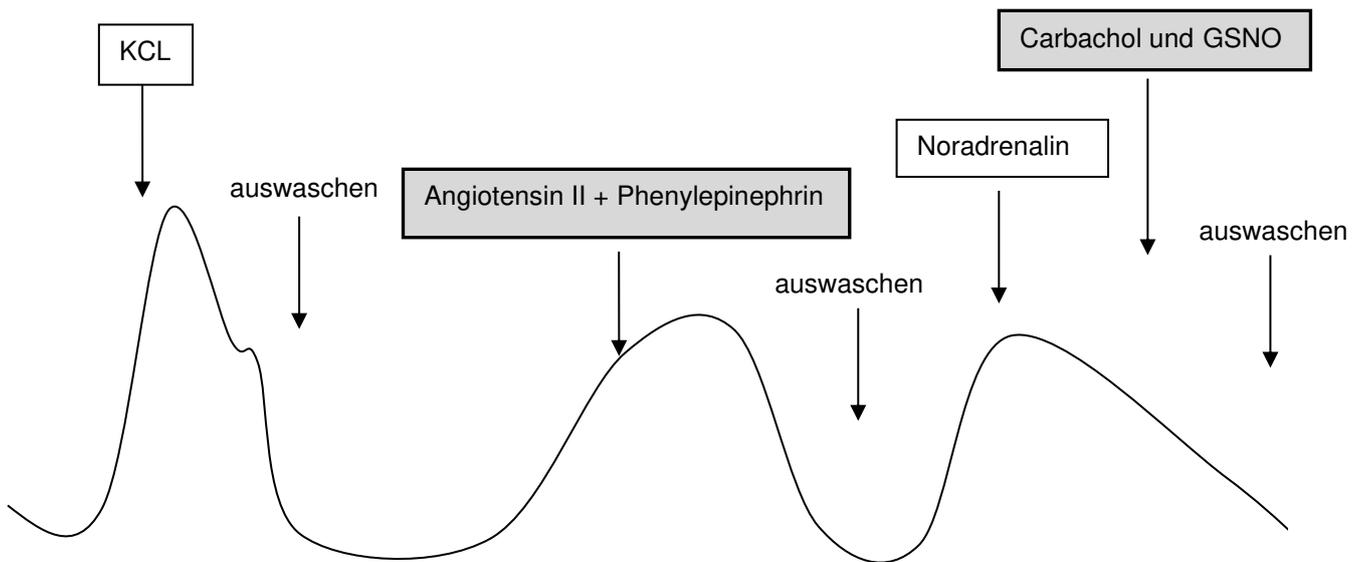
2.5.1 Eingesetzte Lösungen und Medikamente

In Tabelle 2.4 werden die Lösungen und Medikamente aufgezählt, die beim Versuchsaufbau der isoliert perfundierten Niere eingesetzt wurden.

Medikament	Hersteller
Diclofenac	Sigma Aldrich
L-Name (N-Nitro-L-Arginine)	Sigma Aldrich
Noradrenalin (L-Norepinephrine bitartrate salt monohydrate)	Sigma Aldrich
Angiotensin II	Sigma Aldrich
Phenylephrin (R-Phenylephrine hydrochloride)	Sigma Aldrich
Carbachol (Carbamoylcholine chloride)	Sigma Aldrich
GSNO (S-Nitroso-L-Gluthatione)	Enzo Life Sciences

Tabelle 2.4: Angewendete Medikamente bei der isoliert perfundierten Niere

2.5.2 Versuchsablauf



In Abb. 2.5 ist der Ablauf des Perfusionsversuches dargestellt. Nachdem die Nieren sich auf einen Basisdruck (mmHg) eingependelt hatten, wurde ein Funktionstest mit 1 M KCl-Lösung durchgeführt. Hierbei wurde die Lösung über einen Injektionsport mit einem Perfusor (Harvard Apparatus 11 Plus) und einer Perfusionsrate von 0,158 $\mu\text{l}/\text{min}$ zugegeben, bis eine Vollkontraktion der Nieren erreicht wurde. Dann wurde die KCl-Perfusion beendet.

Als die KCl-Wirkung beendet war, der Basisdruck wieder erreicht wurde, wurde ein Perfusor mit neutraler Krebs-Henseleit-Lösung angeschlossen, um eine *Baseline* festzusetzen. Anschließend wurde einer Niere in aufsteigender Konzentration Ang II (0,01 nM bis 30 nM), der anderen Niere aufsteigend Phenylephrin (0,001 μM bis 30 μM) mit gleichbleibender Perfusionsrate von 0,158 $\mu\text{l}/\text{min}$ zugeführt. Jede Konzentration wurde 4 min zugegeben. Nach der jeweils letzten Konzentration wurde wieder der Neutralperfusor angeschlossen und gewartet, bis die *Baseline* erneut erreicht wurde. Um eine Kontraktion der Niere hervorzurufen, wurde ein frisches

Reservoir mit 1 μM Noradrenalin und 10 μM Diclofenac (um eine Wirkung über die gefäßeigene COX auszuschließen) angeschlossen. Nachdem der Druckanstieg beendet war und sich eine neue *Baseline* gebildet hatte, wurde mit der zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK), einer Relaxationskurve, begonnen. Hierfür wurde einer Niere Carbachol (0,01 μM bis 30 μM) und der anderen Niere (über das Reservoir L-Name 100 μM) GSNO (0,01 μM bis 30 μM) über den Perfusor in aufsteigender Konzentration zugeführt.

2.5.3 Auswertung der DWKs

Für die Ang II und Phenylephrin DWKs wurde als *Baseline* der Grunddruck der Niere (aufgezeichneter Druck im Port vor der Niere ohne Medikamentengabe) und der dazukommende Druck, der durch den Perfusor entsteht, genommen. Wenn sich die Nierengefäße durch ein Medikament z.B. kontrahieren, steigt damit der Druck im System vor der Niere und kann durch den Druckaufnehmer registriert werden. Um den Druckanstieg, der durch jede Medikamentengabe entsteht zu ermitteln, wurde die Baseline vom maximal gemessenen Druck (in mmHg) abgezogen (Anstieg = max. Druck - Baseline). Bei den Relaxations-DWKs wurde als *Baseline* wieder der Grunddruck der Niere plus Neutralperfusor genommen. Dann wurde der Druck in der Niere bei Gabe von Noradrenalin plus Neutralperfusor gewählt und davon die Differenz errechnet ($\Delta = \text{Noradrenalin} - \text{Baseline}$). Hiervon wurde dann der prozentuale Druckabfall durch jede Konzentration errechnet.

2.6 Renale Druckantwort unter Ang II

Um zu untersuchen, wie sich der Blutdruck und der renale Druck unter akuter Ang II-Zufuhr verhalten, wurden akute Perfusionsversuche durchgeführt. Hierfür wurden MAPK P38 Ko-Tiere und Kontrollen gewichtsadaptiert mit Xylazin/Ketamin, wie schon beschrieben, intraperitoneal appliziert, narkotisiert und auf eine 38° C warme Wärmeplatte gelagert. Nun erfolgte der Hautschnitt vom Mandibulum bis zum Sternum in längsverlaufender Richtung und nach Durchtrennung der Muskulatur die Darstellung der A. carotis dextra und deren Separation vom N. vagus. Die A. carotis dextra wurde nach kranial mit einer Ligatur verschlossen und nach Setzen einer

Bulldog-Klemme mit einem Polyethylenschlauch kanüliert, sodass über einen Druckfühler nach Öffnen der Klemme eine invasive Blutdruckmessung möglich war. Als zweiter Schritt wurde die V. jugularis dextra präpariert und nach Verschluss des kranialen Zuflusses durch eine Ligatur hier ebenfalls ein Polyethylenschlauch implantiert, zur Verhinderung einer Thrombose erfolgte eine Spülung mit einer isotonen Kochsalzlösung (0,32ml/Kg/min). Nach Anlage beider Perfusionsschläuche wurde das Versuchstier gedreht und die jeweils linke Niere nach Hautschnitt, Durchtrennung der Muskulatur und Resektion der Nierenkapsel freigelegt und aus dem Körper herausluxiert. Die A. renalis wurde herauspräpariert und mit einer Ultraschallsonde versehen (Perivascular Flow Probe). Danach wurde die Niere wieder nach retroperitoneal zurückverlagert und die Wundhöhle mit isotoner Kochsalzlösung aufgefüllt. Nach Stabilisierung des Blutdrucks und der renalen Perfusion konnte nun über den Katheter in der V. jugularis Ang II in aufsteigender Konzentration (0,001 μ M bis 10 μ M) und als Kontrolle 10 μ M Noradrenalin appliziert werden. Die Blutdruckanstiege und die Verringerung des renalen Blutflusses wurden jeweils als Abweichung von der Baseline (in mmHg) ausgewertet.

2.7 Herstellung histologischer Paraffinschnitte

Von den perfundierten Mäusen wurde die thorakale Aorta entnommen, in PBS (Dulbecco) vom umliegenden Fettgewebe mit zwei Feinpinzetten (gebogen, 10,5 cm, Martin) freipräpariert und in Biopsie-Kassetten (Dia-Path) gelegt. Die Fixierung erfolgte über Nacht in 10%igem neutral gepuffertem Formalin (Richard-Allan Scientific). Danach wurden die Proben nach dem Protokoll in Tabelle 2.3 behandelt:

Entwässerungsreihe	1 h	Ethanol 70%	Merck
	1h	Ethanol 80%	Merck
	1h	Ethanol 96%	Merck
	1h	Ethanol 100%	Merck
	Über Nacht	Ethanol 100%	Merck
Paraffinierungsreihe	1h	Xylol I	Merck
	1h	Xylol II	Merck
	1h	Paraffin I	Merck
	1h	Paraffin II	Merck

Tabelle 2.6 : Entwässerungs- und Paraffinierungsreihe für histologische Schnitte

Auf einer Gießstation (Leica EG 1120) wurden die Aorten aufrecht in mit flüssigem Paraffin (Merck) gefüllten Edelstahl-Einbettschälchen (Dia Path) gestellt. Danach wurde der Kassettenboden (der Biopsie-Kassette) aufgesetzt und die Paraffinblöckchen auf einer Kühlplatte (Medite COP30) auf -18 °C runtergekühlt.

Die festen Blöckchen wurden in ein Schneidegerät (Leica, Jung Histoslides 2000) eingespannt und auf 1 µm Dicke geschnitten. Die Schnitte wurden zum Entrollen in ein Wasserbad (PFM medical WB 1000) gelegt und konnten dann auf einen Objektträger (Marienfeld, Superior, 76x26x1mm) gezogen werden. Über Nacht wurden sie in einem 37°C Wärmeschrank getrocknet und vom Institut für Pathologie des Uniklinikums Düsseldorf, Moorenstraße 5, nach HE gefärbt.

Mit dem Programm ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) konnte nun das Verhältnis der Mediadicke zum Aortenlumen bestimmt werden. Damit konnte man bestimmen, ob eine Gefäßhypertrophie vorhanden war.

2.8 Bestimmung von ROS in Aorten

Um zu untersuchen, ob es Unterschiede der ROS Menge in p38-MAPK Ko und Kontrollen gibt, wurden Aorten entnommen und als Labor Kooperation mit Tatsiana Suvorava (in der Pharmakologie der Universität Düsseldorf, Universitätsstraße 1)

analysiert. Hier wurden die Expressionslevel der NADPH Enzymfamilie in Aortenlysaten als Vergleich von p38-MAPK Ko-Tieren und Kontrolltieren bestimmt.

2.9 Blutdruck- und Herzfrequenzmessung

2.9.1 Schwanzmanschettenplethysmographie

Zur Messung des systolischen Blutdruckes und der Herzfrequenz bei mit einem p38-MAPK Inhibitors (BIRB 796; 30 mg/kg/Tag) behandelten Tieren wurde die Schwanzmanschettenplethysmographie (Softron BP-98A, Tokyo, Japan) verwendet. Die Maus wurde in eine Stoffrolle gewickelt und dann in eine beheizte Röhre gesetzt. Dann wurde die Manschette des Messgerätes über den Schwanz bis zur Wurzel gezogen und der Blutdruck jeweils zehn Mal direkt aufeinanderfolgend gemessen. Diese Werte wurden dann gemittelt. Die Messung wurde einmal täglich vier Tage vor Pumpenimplantation und dann sieben Tage nach Pumpenimplantation durchgeführt.

2.9.2 Telemetrie

Im Unterschied zu den Vorversuchen wurde die Blutdruckbestimmung als Goldstandartmethode mit einer invasiven Messung über einen Telemetriekatheter durchgeführt.

Hierfür wurde die Maus gewichtsadaptiert narkotisiert, der Kehlenbereich rasiert und mit 70% Isopropanol desinfiziert. Zudem wurden die Augen mit Salbe geschützt. Die linke A. carotis wurde freigelegt und kaudal mit einer Mikrogefäßklemme (4 mm, Rebstock) abgeklemmt. Die A. carotis wurde indiziert, der Polyethylenschlauch des Katheters (DSI PhysioTel PA-C10 Pressure Transmitter) eingeführt und mit drei Ligaturen (Seraflex 5/0 USP, Serag Wiessner) fixiert. Der Schlauch wurde dann subkutan an der linken Flanke entlanggeführt und der Katheter an die linke Abdomenseite gelegt. Der Einschnitt wurde mit Einzelknopfnähten (Johnson+Johnson, Ethicon-Vicryl 4-0) verschlossen. Am nächsten Tag wurde der Katheter mit Hilfe eines Magneten aktiviert und die einzeln im Käfig sitzenden Mäuse auf die passenden *Receiver*-Platten (DSI Physio Tel Receiver) gesetzt. Mit dem *DSI*

Data Acquisition and Analysis System wurde alle 20 min systolischer und diastolischer Blutdruck, sowie die Herzfrequenz bestimmt.

2.10 Echokardiografie

Um die Auswirkungen der p38-MAPK *knock out* (Ko) auf die Herzfunktion der Mäuse zu bestimmen, führten wir in Kooperation mit Katharina Bottermann in der Herz-Kreislaufphysiologie des Uniklinikums Düsseldorf (Universitätsstraße 1) Echokardiografien der Mäuse durch. Dieses geschah vor einer Ang II Pumpenimplantation und an Tag zwei und sieben nach Implantation. Hierbei wurden die Ventrikelmasse, das systolische und diastolische Volumen, sowie die Ejektionsfraktion bestimmt.

2.11 Histologie der Herzen

Um Gewebeveränderungen (v.a. Fibrose) im Herz- und Skelettmuskel zu detektieren, führten wir in Kooperation mit der Herz-Kreislaufphysiologie des Uniklinikums Düsseldorf (Universitätsstraße 1) histologische Färbungen mit dem Farbstoff Sirius Red durch. Hierbei wurden von den echokardiografierten Tieren nach Organentnahmen für die isoliert perfundierte Niere das Herz entnommen, gewogen und aufgearbeitet (65).

2.12 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

2.12.1 Probenentnahme und -aufbereitung p38-MAPK Ko

Um den p38-MAPK Ko nachzuweisen, wurden einem p38-MAPK Ko-Tier und einem Kontrolltier Gewebeproben von Aorta, Herz, Niere, Leber, Skelettmuskel und ZNS. Hierfür wurden die Mäuse gewichtsadaptiert mit Ketaminhydrochlorid und Xylazin narkotisiert. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht wurde, wurde die Maus durch Eröffnung beider V. jugularis und Durchtrennung des Rückenmarkes euthanasiert. Das Tier wurde mit 70%igem Isopropanol desinfiziert. Nach Eröffnung des Thorax und Abdomens mit einer Schere (Martin, 11,5 cm) wurde die Aorta

freipräpariert und im gesamten Verlauf (Aortenbogen bis zur Bifurkation) herausgelöst. In kalter, mit 95% O₂, 5% CO₂ begaster Krebs-Henseleit-Lösung wurde sie vom umliegenden Fettgewebe befreit und in 37°C warmes Medium (Dulbecco's MEM, Biochrom AG) gelegt. Ebenso wurde der Herzapex, ein Teil der Leber, der obere linke Nierenpol, ein Stück der Oberschenkelskelettmuskulatur und ein Teil der linken Gehirnhemisphäre entnommen und in 37°C warmes Medium gelegt. Zur Aktivierung der p38-MAPK wurden auf 1 ml begastes Medium 5 µg LPS (Sigma Aldrich) gegeben und 30 Minuten inkubiert. Nachdem die Proben mit 4 °C kaltem PBS Dulbecco (Biochrom AG) gewaschen wurden, wurden sie in ein Eppendorf *Tube* (2 ml) auf Eis mit 500 µl 1%igem Triton Lysis Puffer (s. Tabelle 2.7) gegeben

1% Triton Lysis Puffer	20 mM Tris pH 7.5
	150 mM NaCl
	1% Triton X-100
	1 mM EDTA
	1 mM Na ₃ VO ₄ (Natrium-ortho-vanadat)
	1 Tbl. Complete Mini® (Roche)

Tabelle 2.7: Zusammensetzung 1%iger Triton Lysis Puffer

Nach Zugabe von jeweils 2,2 µl PMSF (10 mM in 100% Isopropanol, Sigma Aldrich) wurden die Proben im Eiswasserbad mit einem *Tissue Ruptor* (Quiagen) homogenisiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf *Tube* überführt. Nun wurden 30 µl Lysat mit 10 µl 4x Laemmli-Probenpuffer (s. Tabelle 2.8) versetzt und dann für 5 min bei 95°C gekocht (Thermomixer comfort v. Eppendorf).

4x Laemmli-Probenpuffer gelöst in Aqua dest.	200 mM Tris HCl pH 6,8
	8% SDS
	40% Glycerol
	0,58 mM Bromphenolblau (Natriumsalz)
	Auf 400 µl Laemmli-Probenpuffer kommen 100 µl DTT (Dithiothreitol, 1 M)

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des Laemmli-Probenpuffers

2.12.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

In der folgenden Tabelle 2.9 sind die Zusammensetzungen der Trenn- und Sammelgele für die Gelelektrophorese aufgeführt.

Für zwei Trenngele	Für zwei Sammelgele
3 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese Gel 30, Roth)	0,535 ml Acrylamid 30 % (Rotiphorese Gel 30, Roth)
1,5 ml Aqua dest.	1,135 ml Aqua dest.
4,5 ml Trenngelpuffer (pH 8.8)	1,665 ml Sammelgelpuffer (pH 6.9)
90 µl APS 10 % (Ammonium-Persulfat, Roth)	40 µl APS 10 % (Ammonium-Persulfat, Roth)
15 µl Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) 99 % (Roth)	5 µl Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) 99% (Roth)

Tabelle 2.9: Zusammensetzung 10%iger Polyacrylamidgele

Die benutzten Puffer und Lösungen zur Durchführung der Western Blots sind in Tabelle 2.10 erläutert.

Trenngelpuffer	360 mM Tris HCl; 1140 mM Tris Base; 0,4 % SDS
Sammelgelpuffer	484 mM Tris HCl; 16 mM Tris Base; 0,4 % SDS
Laufpuffer	191,8 mM Glycin; 23,9 mM Tris Base; 3,5 mM SDS
Transferpuffer	270,3 mM Glycin; 90,9 mM Tris Base; 20% Methanol
Waschpuffer	12,9 mM Tris pH 7,5; 129 mM NaCl; 0,13% Tween 20
BSA 5%	Bovines Serum Albumin (Sigma Aldrich) in Waschpuffer
ECL Lösung a)	17 ml Aqua dest.; 100 mM Tris (pH 8,5); 88 µl Coumarinsäure 90mM; 200 µl Luminol 250 µM
ECL Lösung b)	18 ml Aqua dest.; 100 mM Tris (pH 8,5); 12 µl H ₂ O ₂ 30%

Tabelle 2.10: Zusammensetzung der benötigten Puffer und Lösungen

Die Deletion der p38-MAPK in glatten Muskelzellen wurde mittels Western Blot im Herz und Aorta gezeigt. Als Kontrolle dienten Niere-, Leber-, ZNS- und Muskelgewebe. Beim Western Blot Komplex wird zusammengefasst, ein Proteinmix aus einer Gewebeprobe der Proteingröße nach durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt und durch Antikörperreaktionen gefärbt.

Zur Auftrennung wurde das oben beschriebene Lysat der Gewebeproben auf ein Polyacrylamid-Gel geladen. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung (30 min 70V; 1:30 h) wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt (Bio-Rad, Power-Pac Universal). Die aufgetrennten Proteine wurden im *Tank-Blot-System* über 2h bei 200mA auf eine proteinbindende Nitrocellulose-Membran (Transfer-Membran Immobilon®, Millipore) übertragen und die Membran zur Vermeidung unspezifische Antikörperbindungen über Nacht in ein 5 %iges BSA gelegt.

In der folgenden Tabelle 2.11 sind alle benötigten primären und sekundären Antikörper aufgeführt.

	Antikörper	Konz.	Inkubation	Hersteller
Primär- antikörper	Anti-P38 α	1:750	über Nacht	Cell Signaling
	Anti-pP38	1:1300	Über Nacht	Cell Signaling
	Anti- β -Actin	1:5000	45 min	Sigma Aldrich
	Anti-gapDh IgG	1:200	1 h	Santa Cruz
Sekundär- antikörper	ECL Anti-rabbit IgG Horseradish	1:10000	1 h	GE Healthcare UK limited
	Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunglobulines	1:10000	1 h	Dako

Tabelle 2.11: Benötigte Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot

Zur Darstellung wurden zwei mit derselben Proteinprobe beladene Membranen mit dem primären Antikörper pp38 bzw. p38 α über Nacht bei 4°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ECL IgG Anti-rabbit bei Raumtemperatur auf die Membranen gegeben und 1 h inkubiert, während der die Bindung an den Primärantikörper erfolgte. Im Anschluss wurden die Membranen mit ECL Western Blotting Substrat inkubiert. Durch Chemilumineszenzreaktionen wurden die mit ECL benetzten Membranen durch einen Imager (FluorChem® FC2, Alpha Innotech) entwickelt und die Proteinbanden sichtbar gemacht. Zur Quantifizierung der Proteinmenge pro Bande fand im Folgenden eine Antikörpermarkierung mit β -Actin (45 min) bzw. gapDh (1 h) als primären Antikörper statt. Der sekundäre Antikörper war hierbei ein Anti-Mouse-Antikörper (1 h).

2.12.3 Probenentnahme und -aufbereitung VSMCs

Um zu untersuchen, ob durch Stimulation mit Ang II mehr p38 und pp38 nachweisbar war, wurden Ratten-VSMCs (A7r5; Institut für Physiologie, Universität Bonn) in Kultur

genommen. Dafür wurden die Zellen in einem *Sixwell* (Cell Culture Plate 3506, Corning Incorporated) bei 37 °C mit 5% CO₂ in einem Wärmeschrank (Hera cell 150, Thermo Scientific, Heraeus instruments) kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Medium (Dulbecco's MEM *high glucose* 4,5 g/L Glucose, 1% Penicillin/Streptomycin Biochrom AG, 10% FCS Biochrom AG) gewechselt, bis eine ausreichend hohe Zellzahl erreicht war. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Medium entfernt und die Zellen stattdessen mit Hungermedium (Dulbecco's MEM 1 g/L Glucose) versorgt. Nun wurde ein *Well* unter einer Sterilbank (Hera safe Thermo Scientific, Hereaus instruments) als Kontrolle mit Aqua dest. inkubiert. Jeweils ein *Well* wurde 5 min, 10 min, 30 min und 60 min mit Ang II 100 nM stimuliert. Nach der Stimulation wurde die Reaktion durch eine Spülung mit 4°C kaltem PBS Dulbecco (Biochrom AG) beendet. Nachdem das PBS abgesaugt wurde, wurden 500 µl 1%iger Triton Lysis Puffer (s. Tabelle 2.4) mit 2,2 µl PMSF (10 mM in 100% Isopropanol, Sigma Aldrich) gemischt und jeweils 50 µl auf jedes *Well* gegeben. Nun wurde mit einem Schaber das *Well* ausgekratzt und der gesamte Inhalt in jeweils ein Eppendorf *Tube* (2 ml) gegeben. Die Proben wurden 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zeit wurden sie bei 14.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf *Tube* überführt. Nun wurden 30 µl Lysat mit 10 µl 4x Laemmli-Probenpuffer (s. Tabelle 2.5) versetzt und dann für 5 min bei 95°C gekocht (Thermomixer comfort v. Eppendorf).

Die weiteren Schritte, Gelelektrophorese, Western Blot und Antikörpernachweisreaktion s. Material Methoden Kapitel 2.10.2.

2.13 Statistik

Mit n wurden die Anzahl der Experimente aufgeführt, wobei ein Experiment bei den Versuchen mit der isoliert perfundierten Niere als eine Niere zählt.

Bei der Auswertung wurden jeweils statistische Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Die Grafiken wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) erstellt.

Wir verwendeten den Students T-Test um die Mittelwerte zweier Gruppen mit Gaußscher Normalverteilung zu vergleichen. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit der Gaußschen Normalverteilung verwendeten wir die one-way ANOVA gefolgt vom Bonferroni-Korrektur Post-Hoc-Test. Zur Analyse von Unterschieden von Dosis-Wirkungs-Kurven verwendeten wir die two-way ANOVA für wiederholte Messungen ebenfalls gefolgt vom Bonferroni-Korrektur Post-Hoc-Test. Hierbei galt eine *P-value* $p < 0,05$ als signifikant.

2.14 Ethikgenehmigung/-votum

Aktenzeichen vom Landesamt und TVA O68/08 und G216/08

Animal Care Committee Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen 8.87-50.10.34.08.216)

3 Ergebnisse

3.1 Pharmakologische p38-MAPK Inhibition mit BIRB796 (50 mg/kg/Tag)

3.1.1 Effekte von p38-MAPK Inhibition auf Ang II vermittelte Hypertonie

Um die Wirkung des p38-MAPK-Inhibitors BIRB 796 (50 mg/kg/Tag) zu testen, wurden C57/Bl6 Tiere eine Woche mit dem Inhibitor BIRB gefüttert. Zum Vergleich wurde eine zweite Gruppe C57/Bl6 parallel mit einem Placebo versorgt. In den zwei Tagen vor Implantation einer Ang II Pumpe wurde zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied im Blutdruck gemessen (Abb. 3.1) (Placebo 118,8 +/- 6,1 mmHg; BIRB 121,3 +/- 5,1 mmHg). Eine bzw. zwei Wochen nach Implantation stieg der Blutdruck bei den mit Placebo versorgten Mäusen signifikant stärker an (Woche 1: Placebo 158,5 +/- 8,2 mmHg; BIRB, 149,6 +/- 8,5 mmHg, ; Woche 2: Placebo, 163 +/- 14,1 mmHg; BIRB, 149,8 +/- 16,9 mmHg, jeweils $p < 0,05$).

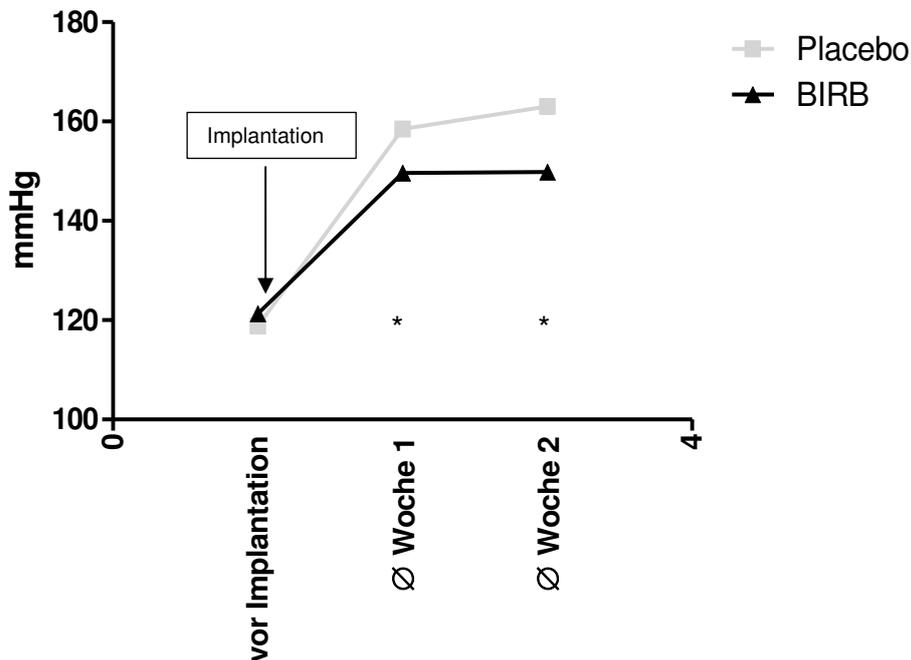


Abb. 3.1: Blutdruckentwicklung unter BIRB

Blutdruck vor bzw. eine und zwei Wochen nach Implantation von Ang II Pumpen. Placebo und BIRB jeweils n=6, *p<0,05.

3.1.2 Ang II induzierte Herzhypertrophie

Um zu untersuchen, ob Blutdruckdifferenzen nach Ang II Pumpenimplantation Auswirkungen auf die Entwicklung der Hypertonie-induzierten Herzhypertrophie hatten, wurden den Tieren die Herzen entnommen und das Herzgewicht gemessen. Sie wurden mit dem Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt und ausgewertet. Wie in Abb. 3.2 zu sehen, unterscheiden sich die Herzgewichte nicht signifikant. Bei denen mit BIRB behandelten Tieren betrug es im Durchschnitt 5,1 +/- 0,6 mg/g KG und bei den Placebo-Tieren 5,2 +/- 0,6 mg/g KG.

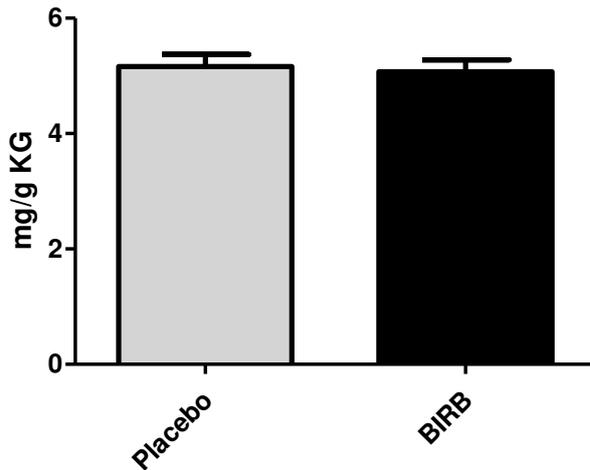


Abb. 3.2: Herzgewichte nach Ang II Behandlung

Es ist der Durchschnitt von Herzgewichten nach zwei Wochen Ang II Behandlung (1000 ng/kg/min) im Verhältnis zum Körpergewicht (in mg/g KG) zu sehen. Placebo und BIRB jeweils n=8

3.1.3 Einfluss von p38-MAPK Inhibition auf die renale Druckantwort

Um die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der VSMCs im Hypertoniemodell zu untersuchen, wurde die renale Druckantwort ex vivo bestimmt. Die Frage war, ob die p38-MAPK Inhibition zu einer Verbesserung der Gefäßfunktion führt. Hierfür wurden im Modell der isoliert perfundierten Niere die endothel- bzw. glattmuskulärinduzierte Gefäßrelaxation durch Carbachol und GSNO sowie die Gefäßkontraktion durch Ang II untersucht.

Initial wurde durch Gabe von Noradrenalin eine Vorkontraktion herbeigeführt. Danach wurde wie in Abb. 3.3 zu sehen Carbachol zur Stimulierung der endothelabhängigen Relaxation gegeben. Carbachol wurde dabei in aufsteigender Konzentration (0,01 bis 30 μ M) gegeben (s. Material Methoden 2.5.1). Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo- und BIRB-Behandlung. Bei GSNO (0,01 bis 30 μ M), zur direkten Herbeiführung einer glattmuskulären Relaxation, relaxierten die mit BIRB behandelten Nierengefäße deutlich besser. Bei der GSNO-Konzentration 1 μ M liegt die Kontraktion bei den Placebo-Tieren bei 59,5 +/- 17,5% und bei BIRB-Behandlung bei 44,6 +/- 9,3%. Die durch GSNO induzierte glattmuskuläre Relaxation ist durch die Behandlung mit BIRB also deutlich verbessert. Die Nierengefäße dilatieren unter der BIRB-Behandlung damit deutlich stärker.

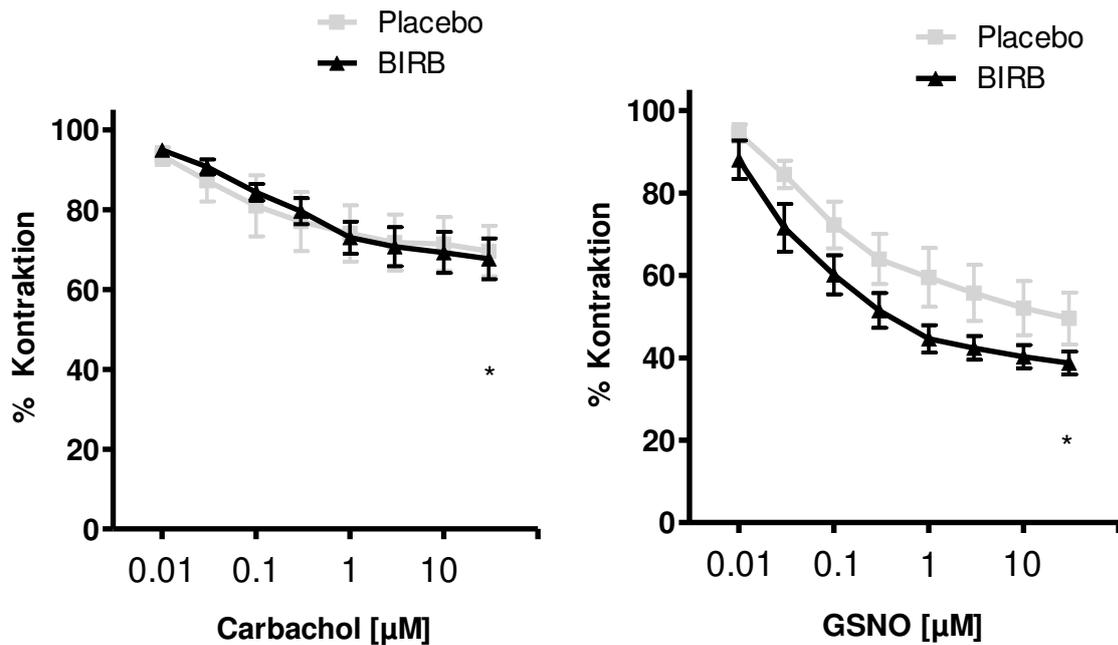


Abb. 3.3: Druckantwort isoliert perfundierter Niere auf GSNO und Carbachol Es erfolgte in aufsteigender Konzentration nach Vorkontraktion mit Noradrenalin bei einer Niere jeweils die Gabe von Carbachol (0,01 bis 30 μM), bei der anderen Niere von GSNO (0,01 bis 30 μM) für jeweils 4 min. Auswertung in %. Carbachol Placebo n=4, BIRB n=7; GSNO Placebo n=6, BIRB n=8; *p<0,05

Des Weiteren führt die medikamentöse herbeigeführte p38-MAPK Inhibition zu einer signifikant abgeschwächten Ang II induzierten Druckantwort in der isoliert perfundierten Niere. Bei der Konzentration 30 nm liegt die Druckantwort bei den BIRB-Tieren nur bei 96,3 +/- 56,3 mmHg, während sie bei den Kontrolltieren bei 171,7 +/- 45,1 mmHg deutlich höher ausfällt.

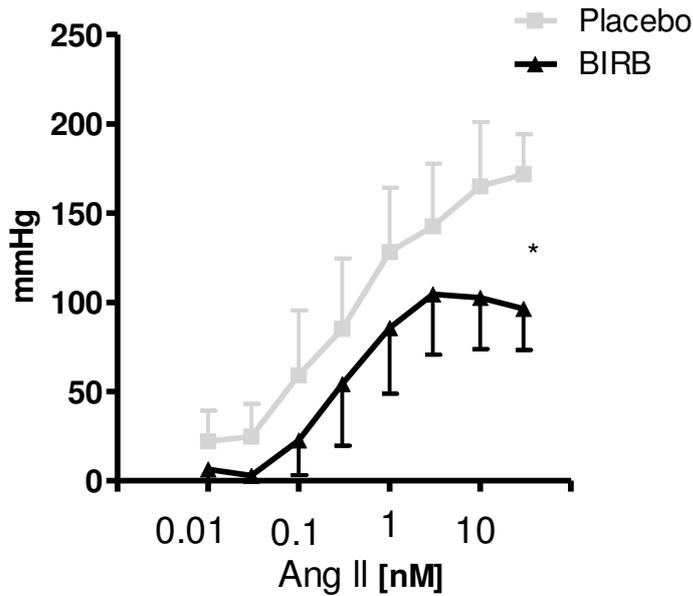


Abb. 3.4: Druckantwort isoliert perfundierten Niere durch Ang II Gabe Es erfolgte bei aufsteigender Konzentration die Gabe von Ang II (0,01 bis 30 nM). Auswertung in mmHg. Placebo n=4, BIRB n=6; *p<0,05

Bei der Auswertung der KCL- und Noradrenalininduzierten Druckantwort zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, wie in Abb. 3.5 gezeigt wird. Bei Placebo und BIRB Behandlung war die renale Druckantwort ähnlich.

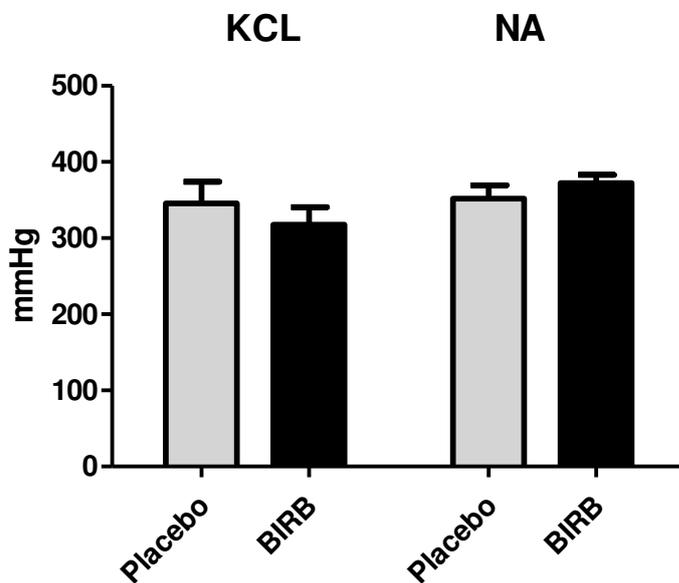


Abb. 3.5: Renale Druckantwort auf KCl und NA Druckantwort von Placebo und BIRB auf Gabe von KCl und NA in mmHg. Placebo n=11; BIRB n=16

3.1.4 Rolle vom p38-MAPK Inhibitor auf Ang II vermittelte Gefäßhypertrophie

Da die p38-MAPK eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Gefäßhypertrophie spielt, haben wir die Auswirkungen des Bluthochdrucks auf die Gefäßhypertrophie

analysiert. Dabei wurden den Tieren nach Versuchsende die Aorta entnommen. Nach Paraffinierung und Färbung nach HE erfolgte die Auswertung der *Luminal Media Ratio*.

Wie in Abb. 3.6 zu sehen, zeigte sich hier eine vergrößerte *Luminal Media Ratio* von $0,65 \pm 0,19$ bei den mit Placebo versorgten Mäusen. Bei den mit BIRB behandelten Tieren betrug diese im Durchschnitt $0,46 \pm 0,06$.

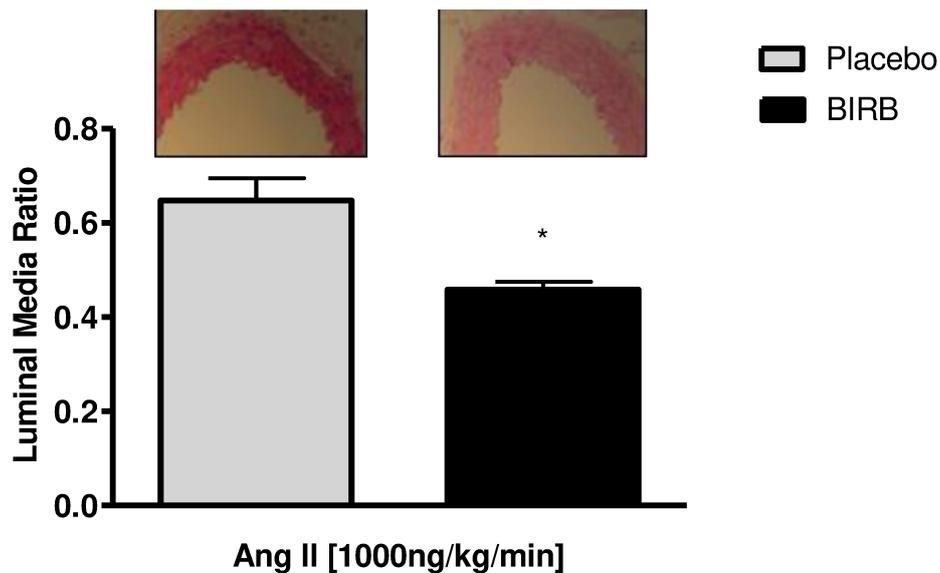


Abb. 3.6: Berechnung der *Intima Media Ratio* Vergrößerte Ratio bei Placebo Tieren nach Behandlung mit BIRB/Placebo und 14 Tagen Ang II Pumpe. Placebo n=16, BIRB n=14; *p<0,01

3.1.5 Zellversuche mit VSMC

Um zu untersuchen, ob durch Stimulation mit Ang II mehr p38-MAPK und nachfolgend im Signalweg auch pp38-MAPK nachweisbar ist, wurden Ratten VSMC in Kultur genommen. Die Zellen wurden mit 100 nM Ang II stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 5, 10, 30 und 60 min. Außerdem wurde ein *Well* als Kontrolle nicht mit Ang II behandelt. Bis auf die Kontrolle erscheint bei allen Stimulationszeiten in Abb. 3.7 eine vergleichbare Bande.

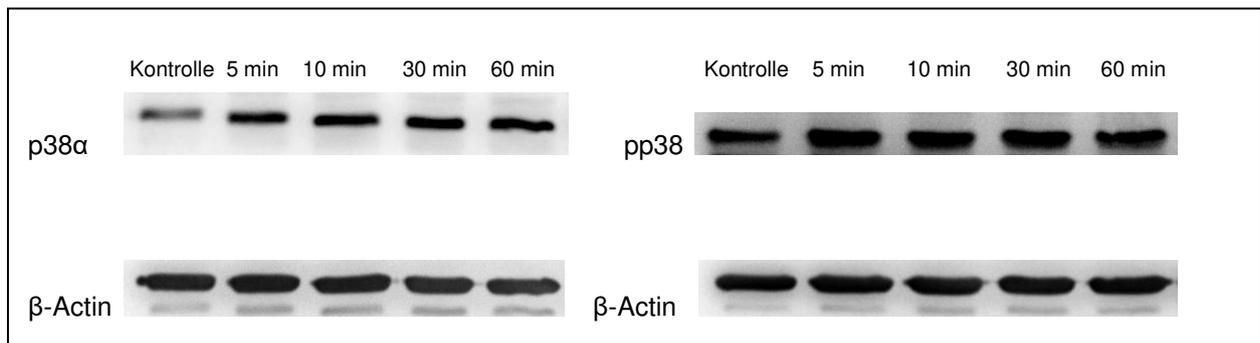


Abb. 3.7: Stimulation von VSMC mit Ang II VSMC (Rattenstammzellen) aus Passage 21. Stimulation mit Ang II 100nM für 5, 10, 30 und 60 min. Zudem eine Kontrolle ohne Ang II Stimulation. Aufbereitet durch Western Blot und anschließend Antikörpermarkierung mit P38 α und pP38. Zur Quantifizierung der Proteinmenge Zweifärbung mit β -Actin.

3.2 VSMC spezifischer p38-MAPK *knock out*

3.2.1 Charakterisierung des Genotyps

Eine Charakterisierung des in dieser Arbeit genutzten Modells ist in der Einleitung im Abschnitt 1.4 dargestellt.

3.2.2 Nachweis des p38-MAPK Ko durch Western Blot

Der erfolgreich funktionierende p38 α -MAPK Ko in den entsprechenden Organen (Aorta und Herz) wurde mithilfe von Western Blots gezeigt. In der folgenden Abb. 3.8 sieht man den erfolgreichen p38-MAPK Ko in den VSMCs und in den glatten Muskelzellen Herzens. Trotz Stimulation mit 5 μ g LPS lässt sich bei den p38-MAPK Ko Mäusen kein p38-MAPK nachweisen.

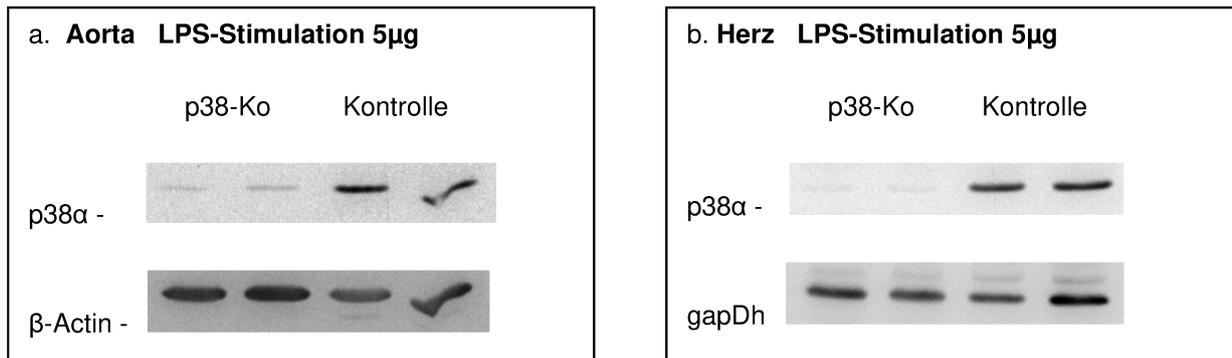


Abb. 3.8: Nachweis des p38-MAPK Ko in Aorta und Herz Abb. a. Aorta und Abb. b. Herz. LPS-Stimulation 5µg Erste Färbung mit dem p38α-MAPK-Antikörper und zur Quantifizierung der eingesetzten Probe eine Nachfärbung mit β-Aktin (Aorta) und gapDh (Herz).

Da p38-MAPK in anderen Zellen nicht ausgeschaltet sein sollte, wurden Kontrollproben von Niere, Leber, ZNS und Muskel analysiert. Wie in Abb. 3.9 dargestellt, zeigte sich, dass p38-MAPK sowohl in p38-MAPK Ko als auch in Kontrolltieren exprimiert wird (als Kontrolle ZNS, da hier kein p38-MAPK vorhanden ist).

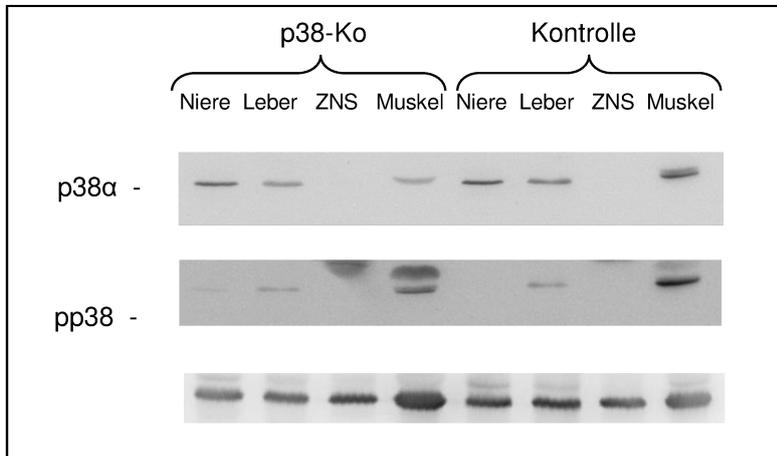


Abb. 3.9: Nachweis des nicht erfolgten Ko von p38-MAPK in Niere, Leber und Muskel Im ZNS ist kein p38-MAPK vorhanden. In der Abbildung ist eine Färbung mit p38α-MAPK und eine mit pp38-MAPK zu sehen. Als zweiter Antikörper zur Quantifizierung der Proben ist gapDh angewendet worden.

3.2.3 Effekte von p38-MAPK Ko auf Ang II vermittelte Hypertonie

Da die Blutdruckbestimmung mittels invasiver Telemetrie der Goldstandard ist, wurde diese Methode im Hauptversuch genutzt, um die Blutdruckentwicklung bei p38-MAPK Ko Mäusen und Kontrollmäusen zu bestimmen. Es wurden systolischer und diastolischer Grundblutdruck gemittelt und der Puls bestimmt. Bis vierzehn Tage nach Implantation einer Ang II Pumpe wurden die Werte erfasst (s. Material Methoden 2.7.2). Wie in der Abb. 3.10 zu sehen ist, hatten p38-MAPK Ko Mäuse mit $111,6 \pm 6,1$ mmHg einen höheren mittleren arteriellen Druck (MAD) als die Kontrollmäuse mit $101,5 \pm 7,2$ mmHg (Tag vier). Die Druckdifferenz blieb konstant, bis die Ang II Pumpen implantiert wurden. Der Blutdruck der Kontrolltiere stieg im Mittel auf $134,6 \pm 6,1$ mmHg an Tag 13 an. Dagegen verzeichneten die p38-MAPK Ko Mäuse nach einem kurzen Druckanstieg einen massiven Abfall vom MAD weit unter den gemessenen Grunddruck bis auf minimal $81,7 \pm 14,2$ mmHg an Tag elf. Passend dazu war der Puls präoperativ bei beiden Gruppen nahezu identisch. Jedoch steigt er bei p38-MAPK Ko bis Stunde acht deutlich an und fällt dann signifikant ab. Dagegen steigt der Puls bei den Kontrollen im selben Zeitraum, bis er in Stunde 30 seinen höchsten Wert erreicht (Details s. unten).

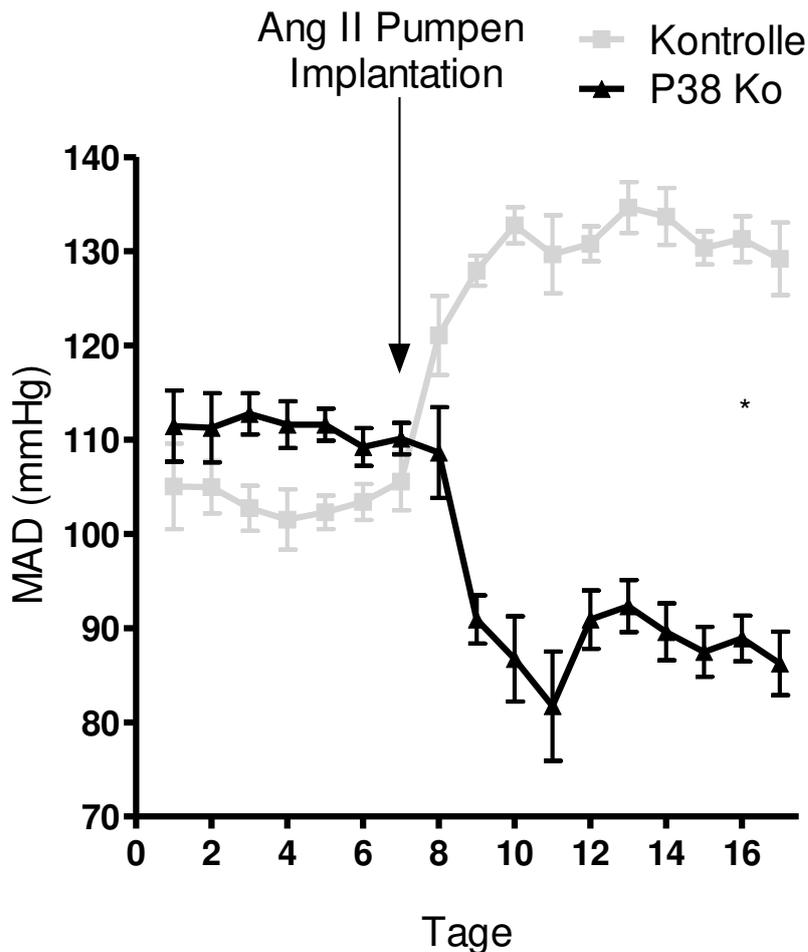


Abb. 3.10: Zusammenfassung MAD vor und nach Ang II Implantation Zu sehen ist der MAD in mmHg sieben Tage vor Implantation einer Ang II Pumpe (1000 ng/kg/min) und zehn Tage nach Implantation. Der Druck der Kontrolltiere ist vorher niedriger, steigt dann aber deutlich an. Bei den p38-MAPK Ko ist der Grunddruck höher, fällt danach aber innerhalb eines Tages erheblich unter den Grunddruck. Kontrolle n=5; P38 Ko n=6; *p<0,0001

Um den Ablauf des massiven Blutdruckabfalls bei p38-MAPK Ko weiter zu untersuchen, wurden MAD (Abb. 3.11 a.) und Puls (Abb. 3.11 b.) in Stunden nach Ang II Implantation ausgewertet. Hier zeigt sich, dass bei p38-MAPK Ko der MAD schon nach vier und der Puls schon nach acht Stunden zu sinken beginnt. Von Stunde vier bis elf sinkt der MAD von 131 +/- 14 auf 96 +/- 10 mmHg und fällt weiter, während er bei Kontrolltieren schwankt, aber im Mittel bei 125 +/- 22 mmHg (Tag sieben) bleibt. Der Puls sinkt bei p38-MAPK Ko von Stunde acht (599 +/- 51 bpm) bis 20 (463 +/- 96 bpm) und fällt weiter. Dagegen steigt der Puls bei den Kontrollen im selben Zeitraum

von 524 +/- 53 auf 526 +/- 38 bpm, bis er in Stunde 30 seinen höchsten Wert von 593 +/- 55 bpm erreicht.

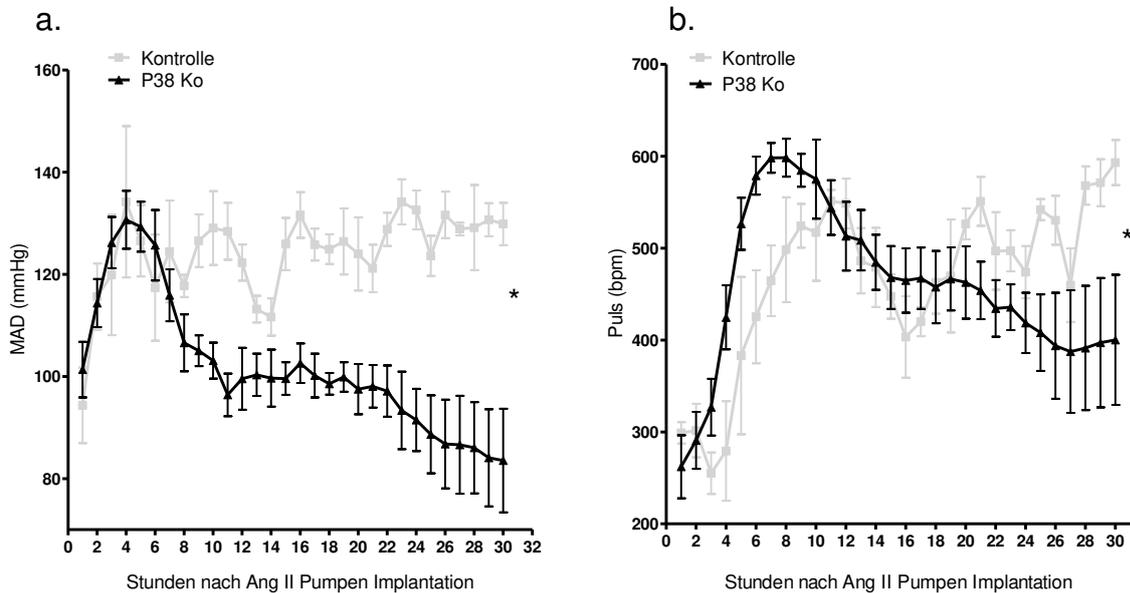


Abb. 3.11: MAD und Puls bei p38-MAPK Ko in Stunden Die Abbildungen zeigen den gemessenen MAD in mmHg (a.) und den Puls in bpm (b.) in Stunden nach Implantation von Angiotensin II Pumpen (1000 ng/kg/min). Nach der Implantation steigen sowohl MAD, als auch Puls an. Doch während die Kontrollen weiter steigen, sinkt bei den p38-MAPK Ko nach vier Stunden der MAD und nach acht Stunden auch der Puls. Kontrolle n=5; P38 Ko n=6; *p<0,0001

3.2.4 Ang II vermittelte ROS Produktion p38-MAPK Ko

Um die Produktion von ROS in Gefäßen zu untersuchen, wurden Aorten von Tieren nach 14 tägiger Behandlung mit Ang II (1000 ng/kg/min) entnommen. Nach Verstärkung mit Lucigenin wurden mittels Chemilumineszenz die Impulse (mg/min) aufgezeichnet. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und p38-MAPK Ko feststellbar.

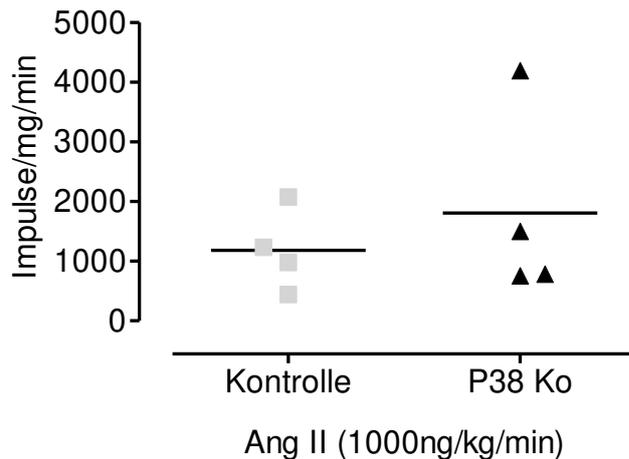


Abb. 3.12: ROS-Produktion in Aorten 14 Tage nach Implantation von Ang II Pumpen (1000 ng/kg/min). In Aorten von Kontrolle und p38-MAPK Ko wurden mittels Lucigenin verstärkter Chemiluminescence ROS Impulse in mg/min gemessen. Jeweils n=4

3.2.5 Renale Druckantwort bei p38-MAPK Ko in isoliert perfundierter Niere

Um die renale Druckantwort bei Kontrolltieren und p38-MAPK Ko zu messen, wurden die Nieren freipräpariert und nach dem Protokoll in Kapitel 2.5 (Material Methoden) vorbereitet. Es wurden sowohl Tiere ohne Ang II Pumpe, als auch mit Ang II Pumpe (1000 ng/kg/min) perfundiert.

Wie in Abb. 3.13 zu sehen ist, wurden zunächst Tiere ohne Pumpenimplantation perfundiert. Um die Kontraktion der Nierengefäße zu untersuchen, wurde Ang II (0,01 bis 30 nM) und PE (0,001 bis 30 μ M) in aufsteigender Konzentration verabreicht. Unter Normalbedingungen (ohne Pumpenimplantation) schienen sowohl die Nierengefäße der Kontroll-, als auch die Nierengefäße der p38-MAPK Ko Tiere gleichermaßen zu kontrahieren. Die Perfusion mit Ang II (Abb. 3.14 a.) lässt keine signifikante Differenz erkennen. Einzig die Perfusion mit PE (Abb. 3.14 b.) zeigt eine bessere Kontraktionsfähigkeit bei den Kontrolltieren an. So zeigte sich bei einer PE Konzentration von 3 μ M bei den Kontrolltieren ein Durchschnittswert von 225 mmHg, bei den p38-MAPK Ko ein Wert von 131 mmHg. Außerdem reagierten die Kontrolltiere schon bei 0,3 μ M, während die p38-MAPK Ko Tiere erst bei 1 μ M einen Druckanstieg verzeichneten.

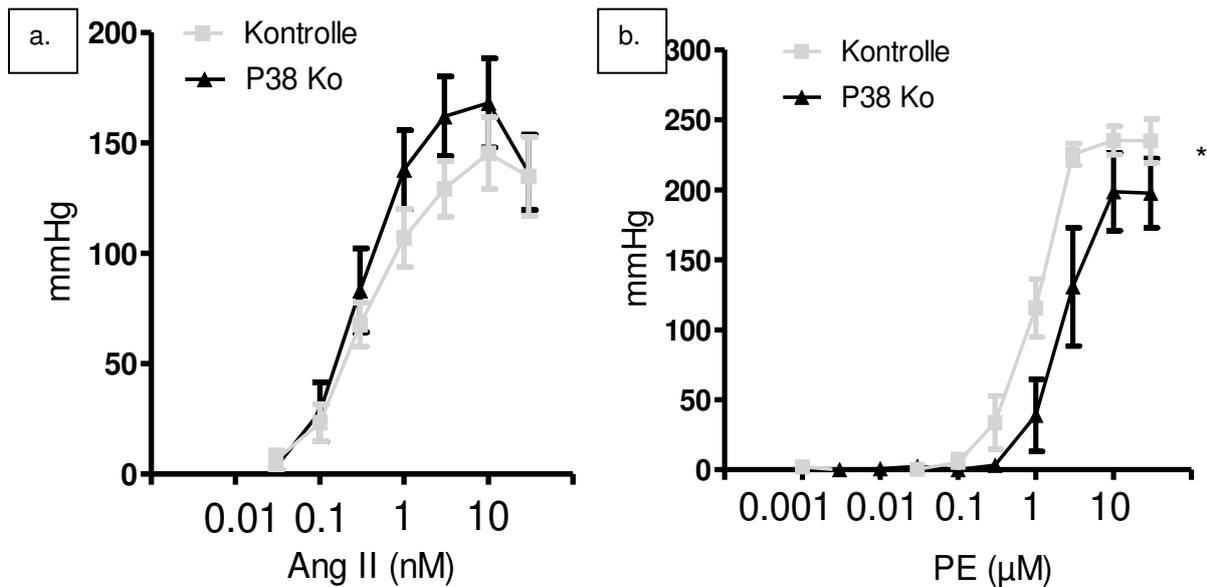


Abb. 3.13: Kontraktions-DWK ohne Pumpenimplantation **Abb. a.** zeigt eine Ang II DWK in mmHg mit Konzentrationen von 0,01 bis 30 nM. **Abb. b.** zeigt ebenfalls eine Kontraktions-DWK in mmHg, PE wurde in aufsteigender Konzentration von 0,001 bis 10 µM verabreicht. Nur bei der PE DWK ist ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und p38-MAPK-Tieren zu erkennen. Ang II Kontrolle n=7, P38 Ko n=7; PE Kontrolle n=7, P38 Ko n=5; *p<0,01

Um die Relaxationsfähigkeit zu untersuchen, wurden Carbachol und GSNO (jeweils 0,01 bis 30 µM) ebenfalls in aufsteigender Konzentration infundiert. Unter Normalbedingungen (ohne Pumpenimplantation) schienen sowohl die Nierengefäße der Kontroll-, als auch die Nierengefäße der p38-MAPK Ko Tiere gleichermaßen zu relaxieren. Wie in Abb. 3.13 zu sehen ist, zeigt die Relaxationskurven unter Carbachol-Zugabe keinen signifikanten Unterschied. Die Relaxationskurve von GSNO war auf Grund einer zu hohen Standardabweichung nicht verwertbar.

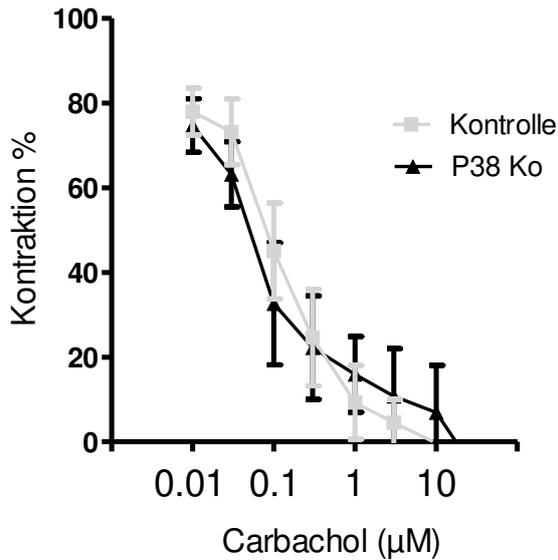


Abb. 3.14: Relaxations-DWK ohne Pumpenimplantation Die Abb. stellt graphisch die noch mögliche Druckantwort in % bei Gabe von Carbachol dar (0,01 bis 30 µM). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und p38-MAPK Ko-Tieren zu erkennen. Carbachol Kontrolle n=5, p38-MAPK Ko n=3; Die GSNO-DWK hat eine zu hohe Standardabweichung und ist nicht verwertbar.

Des Weiteren wurde das Verfahren der isoliert perfundierten Niere bei Kontrolle und p38-MAPK Ko Tieren nach Implantation einer Ang II Pumpe (1000 ng/kg/min) angewendet. Wie schon im Versuch ohne Pumpenimplantation zeigte sich auch hier bei ANG II Gabe (0,01 bis 30 nM) kein signifikanter Unterschied bei der Druckantwort (Abb. 3.15 a.). Wie in Abb. 3.15 b. dargestellt, relaxierten die Kontrolltiere bei GSNO Zugabe (0,01 bis 30 µM) dagegen besser. So zeigte die Druckantwort bei der Konzentration 3 µM bei der Kontrolle einen Wert von 38,4 +/- 19,6% und bei p38-MAPK Ko einen Wert von 72,1 +/- 23,4%.

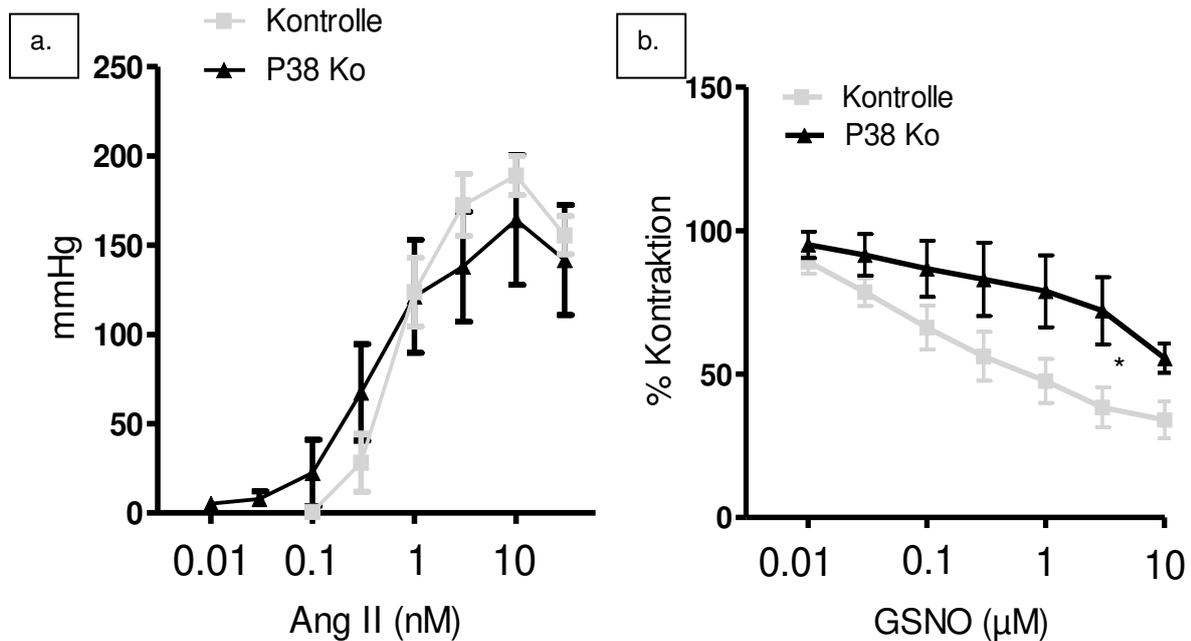


Abb. 3.15: Relaxations-und Kontraktions-DWK nach Pumpenimplantation (1000 ng/kg/min) Abb. a. zeigt eine Ang II DWK (0,01 bis 30 nM) in mmHg. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und p38-MAPK Ko erkennbar. In Abb. b. wird eine GSNO DWK (0,01 bis 30 μM) in % gezeigt. Die Kontrolltiere relaxieren signifikant besser als die p38-MAPK Ko Tiere. Ang II Kontrolle n=7, P38 Ko n=5; GSNO Kontrolle n=8, P38 Ko n=4; *p<0,05

3.2.6 Renaler Blutfluss bei Ang II Infusion

Um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Gefäßkontraktion nach Ang II-Gabe zwischen Kontrolltieren und p38-MAPK Ko Tieren bestehen, wurden akute Perfusionsversuche mit Ang II gemacht. Beim Blutdruck in Abb. 3.16 a. zeigten sich bei der akuten Gabe von Ang II (0,01 bis 10 μg/kg KG) keine signifikanten Unterschiede in der Blutdruckantwort. Des Weiteren wurde bei diesen Tieren die Änderung der renale Druckantwort bei akuter Ang II Infusion (0,01 bis 30 μg/kg KG) gemessen. In Abb. 3.16 b. zeigt sich bei den p38-MAPK Ko Tieren eine geringere Druckantwort durch die Gabe von Ang II. Bei 0,3 μg/kg KG sinkt der renale Blutfluss bei den Kontrollen auf 75,5 +/- 11,1%, dagegen bei den p38-MAPK Ko auf 55,6 +/- 5,1%.

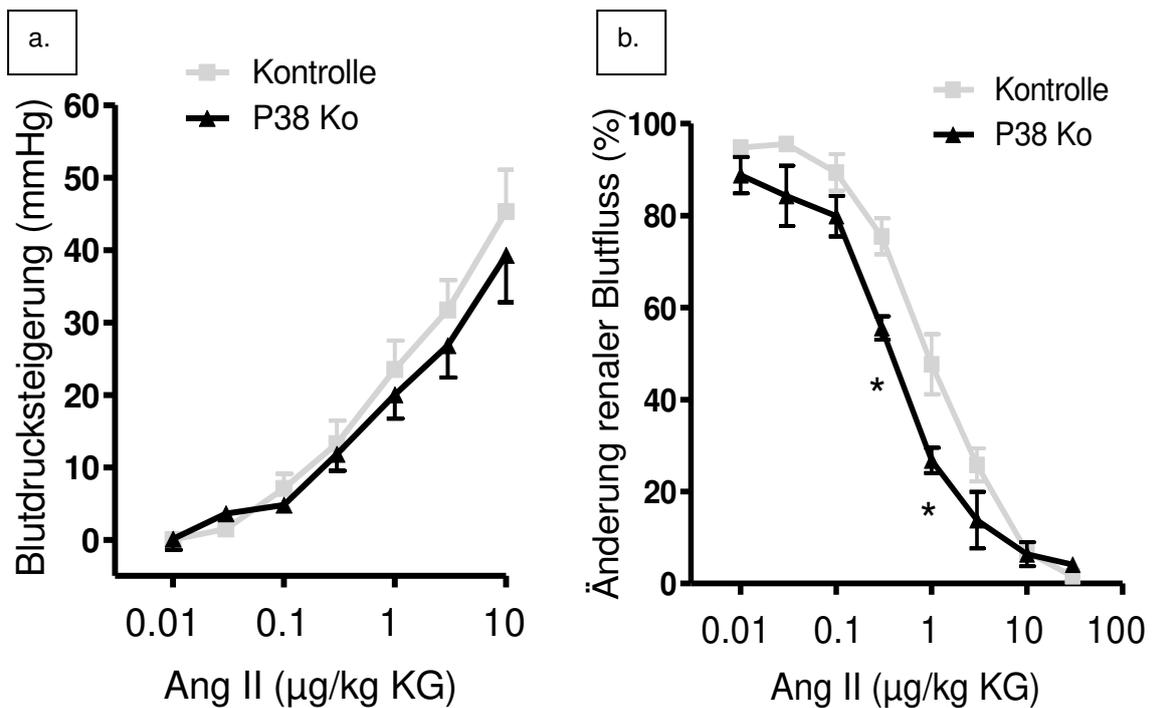


Abb. 3.16: Systemischer Blutdruck und renaler Blutfluss bei Ang II Infusion In Abb. a wird die Blutdrucksteigerung in mmHg durch akute Infusion von Ang II (0,01 bis 10 µg/kg KG) gezeigt. In Abb. b die Änderung des renales Blutflusses in % durch akute Gabe von Ang II (0,01 bis 30 µg/kg KG). a. Kontrolle n=10, p38-MAPK Ko n=8; b. Kontrolle n=8, p38-MAPK Ko n=4; *p<0,01

3.2.7 Ang II induzierte Herzfunktionseinschränkung und –hypertrophie

Die p38-MAPK Ko Mäusen waren nach Implantation von Ang II Pumpen im Vergleich zu den Kontrolltieren weniger vital und zeigten einen reduzierten Allgemeinzustand. Da das entnommene Herz von diesen Tieren deutlich dilatiert wirkte und im Vergleich zum KG signifikant schwerer war (s. Abb. 3.17), wurden in Zusammenarbeit mit der Herz- und Kreislaufphysiologie Düsseldorf Echokardiografien durchgeführt.

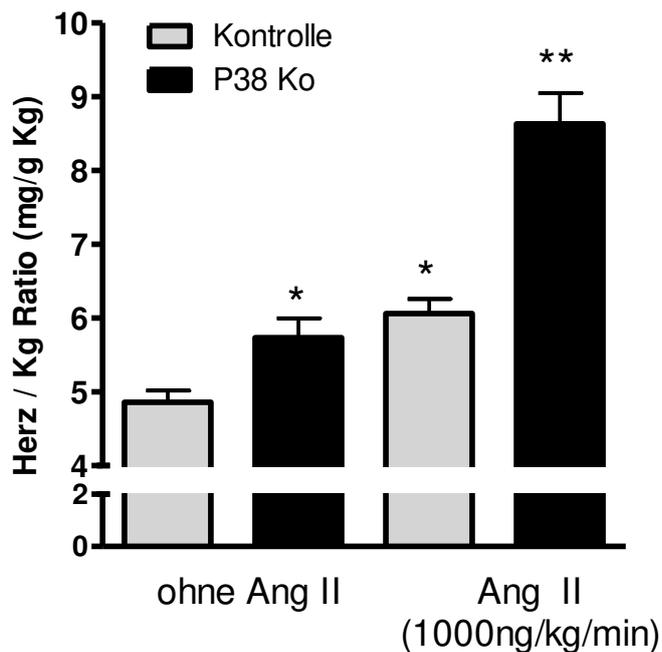


Abb. 3.17: Herz-/Körpergewicht

Dargestellt ist das Verhältnis vom Herzgewicht zum Körpergewicht in mg/g Kg bei p38-MAPK Ko und Kontrolle. Einmal ohne Ang II und einmal nach Implantation von Ang II Pumpen (1000 ng/kg/min). Vor Implantation Kontrolle n=14, p38-MAPK Ko n=13; nach Implantation Kontrolle n=6, p38-MAPK Ko=7; *p<0,05; **p<0,001

Unter Inhalationsnarkose wurden Echokardiografien durchgeführt. Hierbei wurden enddiastolisches (in μl), endsystolisches Volumen (in μl), die Ejektionsfraktion (EF) in % und die Masse des linken Ventrikels (in mg) bestimmt. Dies geschah jeweils vor Pumpenimplantation und an Tag zwei, sieben und 14 nach Implantation einer Ang II Pumpe (1000 ng/kg/min).

Bei der Auswertung wurde festgestellt, dass sich das endsystolische und enddiastolische Volumen, die EF und die Ventrikelmasse bei p38-MAPK Ko und Kontrolltieren vor Implantation kaum unterschieden. Doch wie in Abb. 3.18 zu sehen, ist schon zwei Tage nach Implantation der Ang II Pumpe ein extrem signifikanter Unterschied ($p<0,001$) beim endsystolischen/enddiastolischen Volumen und der EF messbar. Die Differenz bei der Ventrikelmasse ist nicht signifikant.

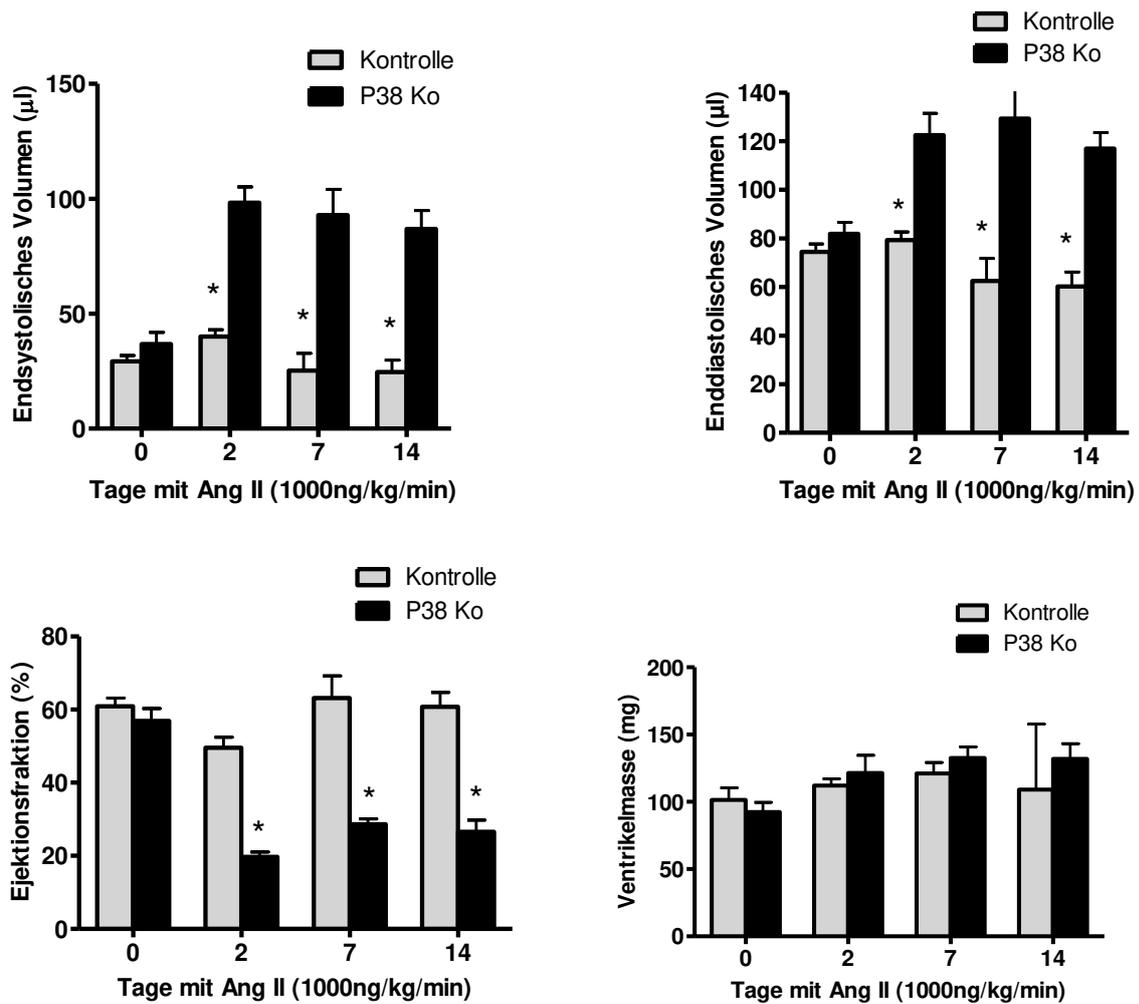


Abb. 3.18: Enddiastolisches/-systolisches Volumen, EF und Ventrikelmasse bei Echokardiografie Gezeigt wird endsystolisches und enddiastolisches Volumen (in µl), die EF (in %) und die Ventrikelmasse (in mg) im Vergleich von Kontrolle mit p38-MAPK Ko. Die Abb. zeigt die Entwicklung der Herzleistung vor Implantation, sowie zwei, sieben und 14 Tage nach Implantation einer Ang II Pumpe (1000 ng/kg/min). *p<0.001

Zur Veranschaulichung sind in folgender Abb. 3.19 Echobilder von jeweils einer Kontrollmaus und einer p38-MAPK Ko dargestellt. Das Herz der p38-MAPK Ko Maus (Abb. 3.19 b.) wirkt deutlich balloniert im Vergleich zum Kontrolltier (Abb. 3.19 a.).

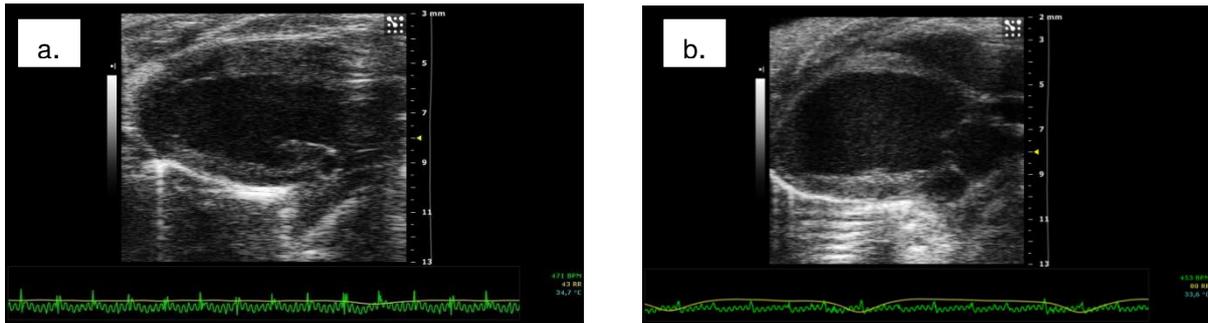


Abb. 3.19: Echokardiografie eines Kontroll- und eines p38-MAPK Ko Tieres a.: Herz eines Kontrolltieres zu sehen. b.: Herz eines p38-MAPK Ko. Der Maßstab in mm ist an der rechten Seite angegeben. Im unteren Bereich sind Blutdruck- (BPM, grün) und Pulskurve (RR, gelb) zu sehen.

3.2.8 Ang II vermittelte Gefäßhypertrophie p38-MAPK Ko

Wie bei den Vorversuchen wurde auch hier das Verhältnis der Media zum Lumen berechnet. Es zeigte sich bei der Lumen Media Ratio wieder, dass die Media bei Kontrolltieren einen größeren Durchmesser hatte. Sie lag nach Ang II Pumpen Implantation bei $0,62 \pm 0,27$, während sie bei den p38-MAPK Ko Tieren bei $0,41 \pm 0,06$ liegt. Dieser Unterschied ist in der folgenden Abb. 3.20 a. verdeutlicht. Des Weiteren ist in Abb. 3.20 b. der absolute Durchmesser von Intima und Media in μm zu sehen.

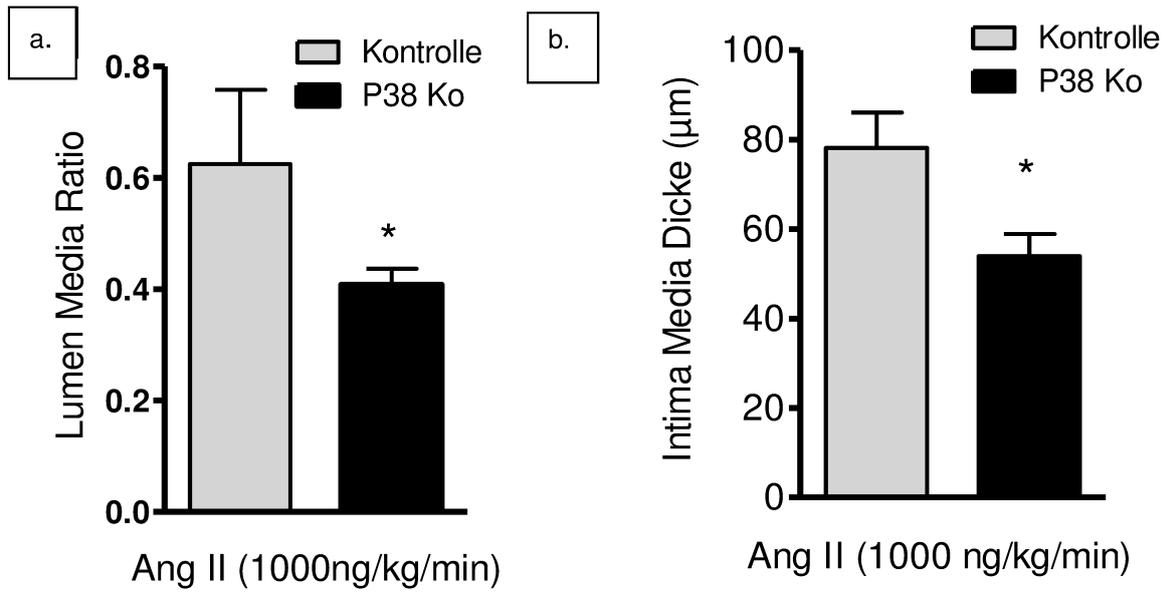
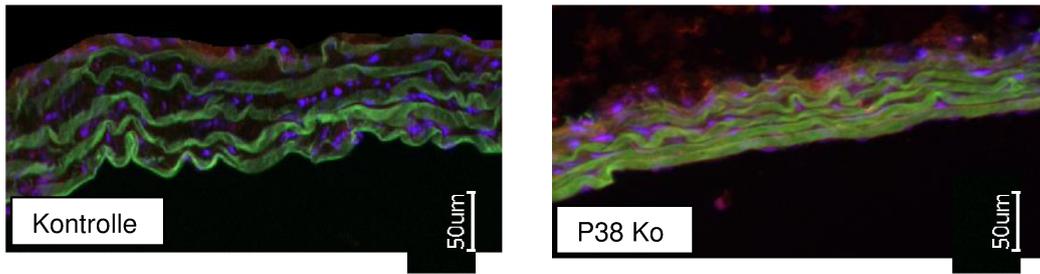


Abb. 3.20: Lumen Media Ratio p38-MAPK Ko Zu sehen ist das Verhältnis von Mediadicke zum Lumen (a.) nach Implantation von Ang II Pumpen bei Kontrolle (n=4) und bei p38-MAPK Ko Mäusen (n=4). Zudem ist die absolute Dicke von Intima/Media in µm in Abb. b. dargestellt. *p<0,05 Als Färbebeispiel darüber Fotos von Kontroll- und p38-MAPK Ko-Aorten mit dem Maßstab von 50 µm.

3.2.9 Ang II induzierte Herzfibrose

Um den Fibrosegrad im Herzen zu untersuchen, wurden p38-MAPK Ko- und Kontrollmäusen nach Ang II Pumpen-Implantation die Herzen entnommen. Nach Aufbereitung und Färbung mit Sirius Red (s. Material Methoden) wurden die Schnitte mikroskopisch untersucht und fotografiert. Die Färbung wurde im Labor der Herz- und Kreislaufphysiologie des Uniklinikums Düsseldorf vorgenommen. In Abb. 3.21 a. ist das Herz einer Kontrollmaus und in b. das Herz einer p38-MAPK Ko Maus jeweils in Übersicht und Detail zu sehen. Die Sirius Red Färbung zeigte bei dem p38-MAPK Ko Tier einen signifikant höheren kardialen Fibrosegrad an. Zwischen den

Kardiomyozyten hatte sich vor allem im mittleren Bereich des Herzmuskels vermehrt
 Bindegewebe gebildet und damit die Zellstruktur im Herzen verändert.

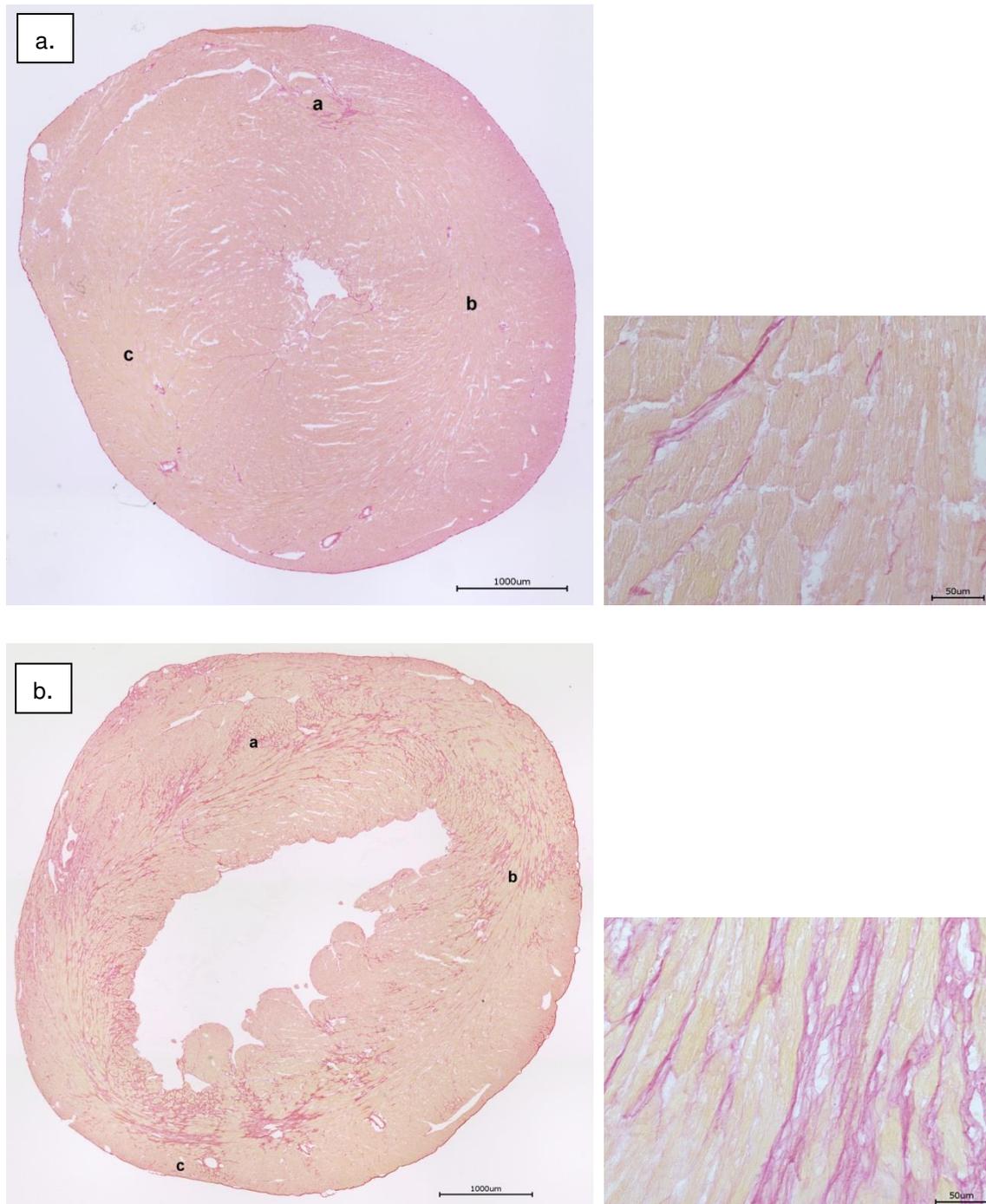


Abb. 3.21: Kardiale Fibrose nach Ang II Pumpen Implantation Dargestellt sind histologische Schnitte von Kontrolle und p38-MAPK Ko Herzen oberhalb des Apex. Die Schnitte wurden mit Sirius Red gefärbt, um damit Bindegewebsvermehrung nachzuweisen. a. zeigt das Herz einer Kontrolle und b. das Herz eines p38-MAPK Ko jeweils in Übersicht und Detail. Die Detailaufnahme entspricht bei beiden der mit b markierten Stelle in der Übersicht. Länge des Maßstabalkens entspricht bei der Übersichtsaufnahme 1000 µm und bei der Detailaufnahme 50 µm.

3.2.10 Überlebenszeitkurve p38-MAPK Ko nach Ang II

Um die Letalität im Vergleich von Kontrollen und p38-MAPK Ko zu untersuchen, wurde eine Überlebenszeitkurve erstellt. Nach Implantation einer Ang II Pumpe (1000 ng/kg/min) wurde aufgezeichnet, wie viele Tiere bis zum geplanten Versuchsende überlebten. Wenn die Tiere verstarben, wurden der jeweilige Tag aufgezeichnet und in die Kurve eingearbeitet. Wie in Abb. 3.22 dargestellt gab es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Überleben von Kontrollen und p38-MAPK Ko. Am letzten Versuchstag (Tag 14) lebten noch 81% der Kontrolltiere. Dagegen hatten nur 57% der p38-MAPK Ko Tiere das geplante Versuchsende erreicht.

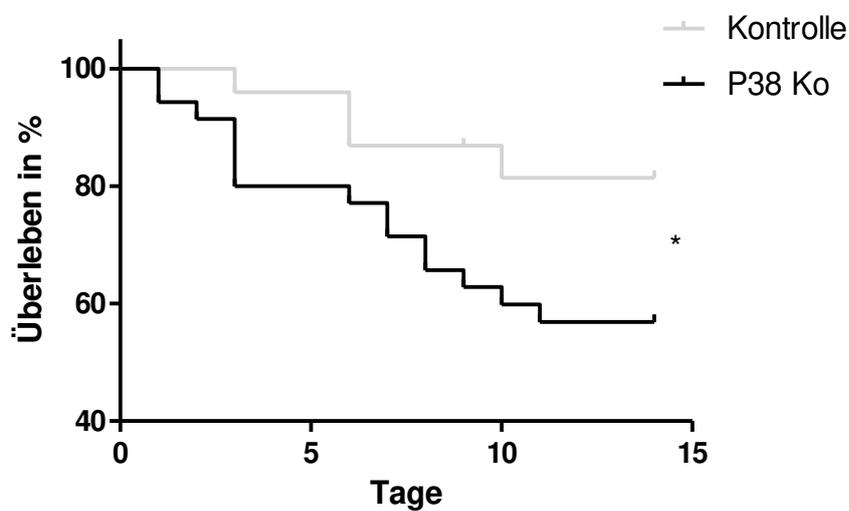


Abb. 3.22: Überlebenszeitkurve p38-MAPK Ko Nach Implantation einer Ang II Pumpe (1000 ng/kg/min) Überleben von Kontrollen und p38-MAPK Ko in %. Am letzten Versuchstag (Tag 14) lebten noch 81% der Kontrolltiere und 57% der p38-MAPK Ko. Kontrolle n=25; p38-MAPK Ko n=31; *p<0,05

4 Diskussion

4.1 Antwort und Schlüsselergebnis

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition der p38 α -MAPK vor zu hohem Blutdruck schützt und vor Gefäßschädigung schützt.

Des Weiteren wurde durch einen *knock out* der p38 α -MAPK gezeigt, dass p38 α -MAPK ein wichtiger Bestandteil bei der Blutdruckregulation ist. Interessanterweise spielt die p38 α -MAPK auch eine große Bedeutung für die Herzfunktion. Diese ist in dem verwendeten p38-MAPK KO-Modell deutlich eingeschränkt.

4.2 Blutdruckentwicklung bei pharmakologischer Inhibition

Hypertonie, aber keine Hypertrophie unter Ang II (+/- BIRB)

Um zu untersuchen, wie sich Blutdruck und Herzgewebe unter Blockade der p38-MAPK bei experimenteller Hypertonie verhalten, wurde die p38-MAPK bei Mäusen medikamentös inhibiert und Hypertonie durch chronische Infusion von Ang II mittels einer osmotischen Pumpe über 14 Tage induziert. Als Kontrolle wurden Tiere mit einem Placebo gefüttert und ebenfalls eine Ang II Pumpe eingesetzt.

Bei der täglichen Messung des Blutdrucks zeigten sich anfangs vergleichbare Werte, doch schon einen Tag nach Beginn der chronischen Ang II Infusion mittels osmotischer Minipumpe stieg der Blutdruck in der behandelten und der Placebogruppe an. Die chronisch mit dem p38-MAPK Inhibitor behandelten Tiere zeigten jedoch einen signifikant niedrigeren Blutdruck als die Kontrolltiere.

Der Blutdruck bei Tieren und Menschen ist multifaktoriell beeinflusst und wird über verschiedene, auch Ang II unabhängige Mechanismen, geregelt. Die Ang II gebundene AT1-Rezeptor-Aktivierung kann verschiedene Signalwege aktivieren, z.B. den RhoA-/Rho-Kinase-Weg, die dann zur Vasokonstriktion führen (28-30). Sparks et al. (8) zeigte, dass der AT1-Rezeptor in glatten Muskelzellen der Nierengefäße essenziell für die Entwicklung der Ang II gebundenen Hypertonie ist, wobei der genaue Mechanismus der Signalkaskade bisher nicht vollständig untersucht ist.

Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass in beiden Gruppen ein Anstieg des Blutdrucks zu verzeichnen ist (9). Jedoch scheint zusammenfassend eine Inhibition der p38-MAPK dazu zu führen, dass ein relevanter Weg, welcher durch die Aktivierung des AT1 Rezeptors induziert wird, zu einem gewissen Teil abgeschwächt ist. Ebenso hat Park et al. gezeigt, dass wenn die p38-MAPK medikamentös inhibiert ist der Durchschnittsblutdruck deutlich reduziert war und die Mortalität sank (18). Die signifikanten Unterschiede im Blutdruck nach einer und zwei Wochen mit bis zu 13 mmHg Differenz bei Kontroll- und behandelten Tieren weisen auf die Bedeutsamkeit dieses Bestandteils des RAAS hin. Ein so großer Einfluss der p38-MAPK bedeutet einen neuen Angriffspunkt für Hypertonietherapeutika.

Nach 14 Tagen wurden den untersuchten Tieren nach der letzten Messung die Herzen entnommen und nach Entleerung derselben das Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht ermittelt. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Man könnte erwarten, dass bei den mit dem Placebo behandelten Tieren durch den erhöhten Blutdruck das Herzgewicht erhöht ist, da es einer stärkeren Belastung ausgesetzt war, was normalerweise zur Hypertrophie führt und eine Behandlung mit dem p38-MAPK-Inhibitor z.B. in der Aorta zu einer reduzierten Hypertrophie führt. Denn es wurde in bisherigen Studien gezeigt, dass die p38-MAPK ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der Herz- und Gefäßhypertrophie ist (31, 33, 62) und damit ein entscheidend für das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse ist (32).

4.3 Relaxation und Kontraktion bei der isoliert perfundierten Niere bei pharmakologischer Inhibition

Bei der isoliert perfundierten Niere bessere Relaxation bei mit dem p38-MAPK Inhibitor behandelten Tieren, besseres Ansprechen von Placebo Tieren auf Ang II.

Mit dem Modell der isoliert perfundierten Niere wurden Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der Nieren (-gefäße) nach einer zweiwöchigen chronischen Ang II Infusion mittels osmotischen Pumpe und Therapie mit einem p38-MAPK Inhibitor (BIRB 796) bzw. Placebo untersucht.

Die DWKs, induziert durch Carbachol und GSNO, zeigten ein unterschiedliches Ansprechen. Bei der endothel-abhängigen Vasorelaxation induziert durch Carbachol waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellbar. Im Gegensatz dazu zeigte die glattmuskulär-induzierte Vasorelaxation durch GSNO eine signifikant bessere Relaxation bei den mit dem Inhibitor behandelten Tieren.

Warum gab es in den beiden Gruppen keine Unterschiede in der Reaktion auf Carbachol? Mit Carbachol wird die endothel-abhängige Vasodilatation (NO-Entstehung im Endothel) überprüft. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen darauf hinzuweisen, dass p38-MAPK keinen relevanten Einfluss auf die endothel-abhängige NO-Generation spielt, sondern eher die NO-Verwertung bzw. den NO-Abbau beeinflusst.

In anderen Arbeiten und Gefäßen, konnte allerdings auch gezeigt werden, dass eine p38-MAPK-Inhibition die Expression von NADPH-Oxidase-Untereinheiten reduziert und damit die ROS-Produktion reduziert (34 und 35). Damit wird vermehrt NO freigesetzt, das ein Kennzeichen für endotheliale Dysfunktion ist (36). Bei einer großen Menge ROS kann über NO durch die Produktion von Peroxynitrit die Vasokonstriktion gefördert werden. In der vorliegenden Arbeit scheint dies jedoch keine signifikanten Auswirkungen zu haben.

Anders ist das bei GSNO, dieses ist ein NO-Donor, man überprüft die glattmuskuläre Vasorelaxation, (24) und GSNO ist einbezogen in vielfältige Prozesse wie Zytokin- und Chemokinproduktion (25). Das bedeutet, dass GSNO einige Angriffspunkte in der Signalkaskade der p38-MAPK wie die ROS und die Entzündungsmediatoren hat. Möglicherweise läuft die glattmuskuläre Vasodilatation auch über den Weg der Phosphodiesterase 1 oder noch wahrscheinlicher Phosphodiesterase 5 ab. Es konnte gezeigt werden, dass es nach akuter Ang II Infusion und eine Hemmung der Phosphodiesterase 5 mit Sildenafil zu einer Blutdruckreduktion und vermehrten Nierendurchblutung kommt (63). Inwieweit die p38-MAPK in diesen Weg eingeschaltet ist, ist nicht geklärt. Jedoch gibt es einige Ansatzpunkte wie die ROS, die erklären können, warum eine p38-MAPK Inhibition hier auch über GSNO Einflüsse auf die glattmuskuläre Vasodilatation hat. Zudem reduziert die p38-MAPK-Inhibition die MLC (20)-Phosphorylierung in Widerstandsgefäßen (34). Dies resultiert dann in einer reduzierten Kontraktilität der VSMCs und kann damit die Effekte von GSNO in Anwesenheit der p38-MAPK verstärken.

Ein Erklärungsansatz ist hier, dass durch die medikamentöse Inhibition der p38-MAPK der Blutdruck niedriger war. Durch eine reduzierte Phosphorylierung der p38-MAPK waren die Produktion von ROS signifikant reduziert (gemessen am 8-Isoprostan im Urin (42)). Dadurch wurden die Nieren (-gefäße) geschützt und einer deutlich geringeren Belastung ausgesetzt.

Die DWK von Ang II zeigte des Weiteren in den Versuchen eine deutlich bessere Kontraktion der Nieren (-gefäße) bei Placebo Tieren. Durch die medikamentöse Inhibition der p38-MAPK wurde ein Schlüsselprotein in der Signalkaskade Ang II → p38-MAPK → MK 2/3 → Kontraktion (s. Abb. 1.2) ausgeschaltet, was schon im vorigen Versuch durch den erniedrigten Blutdruck bei chronischer Ang II Zufuhr angedeutet wurde. Es entspricht also den Erwartungen, dass nicht behandelte Tiere mit einer stärkeren Kontraktion auf die Gabe von Ang II reagieren. Hierbei darf man aber auch nicht vergessen, dass alle Tiere vor den Perfusionen schon 14 Tage chronisch mit Ang II behandelt wurden. Die Frage ist, inwieweit das Auswirkungen auf die Kontraktions-DWK mit Ang II hat. Da allerdings beider Gruppen denselben Konzentrationen ausgesetzt waren, sind die Ergebnisse trotzdem vergleichbar, wenn auch keiner Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Bei der Auswertung der Reaktion der renalen Widerstandsgefäße beider Gruppen auf KCL und NA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass Ang II selektiv die p38-MAPK im Gefäß aktiviert und dadurch das Ausmaß der Vasokonstriktion moduliert wird. Zusammenfassend scheint die p38-MAPK-Signalkaskade ein entscheidender Signalweg bei der renalen Vasokonstriktion und mitverantwortlich für die Entstehung von Ang II-induzierter Hypertonie zu sein (8).

4.4 Veränderung der Gefäßfunktion bei pharmakologischer Inhibition

Deutliche Gefäßhypertrophie bei Placebo Tieren nach 14 Tagen Ang II Zufuhr.

Nachdem den Tieren 14 Tage Ang II zugeführt wurde und der Versuch mit der isoliert perfundierten Niere beendet wurde, wurden den Tieren die Aorten genommen, diese paraffiniert und mit HE gefärbt. Hier wurde dann das Verhältnis der Gefäßmedia zum Lumen berechnet und ausgewertet.

Hier zeigte sich, dass die Placebo Tiere eine im Vergleich zu den mit dem Inhibitor behandelten Tieren deutlich verdickte Aortenwand hatten. Scheinbar hat der ausgeprägt erhöhte Blutdruck in den 14 Tagen zu einer Gefäßhypertrophie geführt, es ist bekannt, dass chronische Hypertension strukturelle Veränderungen in der Zusammensetzung der Aortenwand und zu einer Hypertrophie führt (38). *In vitro* wurde schon gezeigt, dass VSMCs durch Aktivierung der p38-MAPK hypertrophieren (39), zudem zeigten wir in unserer Arbeitsgruppe *in vivo* und per qPCR aus Aortengewebe, dass MMP-1 und MMP-9 in den mit dem p38-MAPK behandelten Inhibitor deutlich reduziert waren (42). Diese beiden sind bei hoher Expression mit Hypertrophie und Sklerose der Aortenwand vergesellschaftet (40 und 41). MMP-1 zeigt sich hier als stark in den vaskulären Umbau eingebunden (43 und 44), während MMP-9 (durch das RAAS aktiviert (45 und 46)) unter anderem den TGF- β Signalweg anstößt und damit u.a. für die Entstehung von Fibrose und Gefäßwandversteifung verantwortlich ist (47-50). Da auch die mit dem p38-MAPK Inhibitor behandelten Tieren nicht normoton waren ist die Diskrepanz zwischen generell unbehandelten Tieren und der Placebogruppe wahrscheinlich noch deutlich stärker. Dies wurde im Umfang dieser Arbeit nicht weiter untersucht, jedoch sind die Auswirkungen auf die Gefäße nach nur 14 Tagen im Vergleich schon sehr eindrücklich.

4.5 Zusammenhang Ang II und p38-MAPK

Stimulation von VSMC in der Zellkultur zeigt p38 α -MAPK und pp38-MAPK Erhöhung nach Stimulation mit Ang II.

Um eine verstärkte Expression von p38 α -MAPK und pp38-MAPK nach Ang II Stimulation zu beweisen, wurden ergänzend VSMC von embryonalen Rattenstammzellen jeweils 5, 10, 30 und 60 min mit Ang II behandelt und eine Kontrolle ohne Stimulation untersucht.

Sowohl p38 α -MAPK, als auch pp38-MAPK waren nach Stimulation mit Ang II deutlich im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Allerdings zeigten sich keine Unterschiede bei den verschiedenen Stimulationszeiten. Man hätte erwarten können, dass eine längere Stimulation auch eine verstärkte Expression bewirkt. Die Ergebnisse scheinen aber eher darauf hinzuweisen, dass eine Aktivierung zumindest innerhalb einer Stunde das gleiche Level an p38 α -MAPK und pp38-MAPK hervorruft und es zumindest in diesem Setting keine wahrnehmbaren Schwankungen gibt.

4.6 Blutdruck- und Gewebsveränderungen bei p38 α -MAPK Ko

Die Ergebnisse beim p38-MAPK Ko bestätigen die Ergebnisse mit dem medikamentösen Inhibitor BIRP bzgl. Blutdruck und es wird gezeigt, dass die p38-MAPK in VSMCs eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulation spielt.

Wie in den Vorversuchen wurden auch den p38 α -MAPK Ko Tieren Ang II Pumpen eingesetzt, die über 14 Tage eine konstante Ang II Menge abgaben. Zur Messung des Blutdrucks wurden den Tieren sieben Tage vorher Telemetriekatheter implantiert, die als Goldstandardmethode alle 20 min. den arteriellen/systolischen Blutdruck, sowie den Puls bestimmten. Hier zeigte sich bei den Ko Tieren vor Implantation ein etwas höherer Blutdruck als bei den Kontrolltieren und nach der Implantation im Vergleich zu den Kontrolltieren ein rascher Abfall des Blutdrucks. Die Kontrolltiere reagierten wie erwartet mit einem Anstieg nach Ang II Gabe und hielten dieses Niveau dann.

Es ist bekannt, dass der wichtigste Mechanismus bei der Kontrolle des Blutdrucks die Kontraktion und Relaxation der VSMCs ist. Hier wirkt das in dieser Arbeit untersuchte Ang II unter anderem über den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT1) vasokonstriktorisch und führt damit zur Blutdruckerhöhung (6). Hier sind vor allem die renalen Widerstandsgefäße der Hauptbeeinflussungspunkt (8).

Neben dem AT1-Rezeptor (der in dieser Arbeit nicht medikamentös oder genetisch beeinflusst wurde) ist die Signalkaskade über die p38-MAPK relevant, diese wurde medikamentös und genetisch ausgeschaltet und die Ergebnisse verglichen. *In vivo* muss man jedoch auch immer beachten, dass diese Phänomene nicht isoliert untersucht werden können, da in biologischen Systemen die Signalketten nicht nur von einem Signalstoff wie Ang II beeinflusst werden (es gibt andere Faktoren wie die ROS (34), die auch zu weiteren Veränderungen wie z.B. Zellmigration und vor allem auch Zytokinproduktion führen (12-14)).

Um auf die Ergebnisse zurückzukommen hat Park et al. gezeigt, dass wenn die p38-MAPK medikamentös inhibiert ist der Durchschnittsblutdruck deutlich reduziert war und die Mortalität sank (18), dies zeigte sich auch in den vorliegenden Daten. Da zum Vergleich der Wirksamkeit der *knock out* der p38-MAPK bisher nicht wie in dieser Art durchgeführt wurde, kann hier nur näherungsweise Literatur hinzugezogen werden. Ebrahimian et al. hat bei Mäusen, die in der Signalkaskade der p38-MAPK folgende MK2 genetisch ausgeschaltet. Dies führte im Tiermodell trotz Ang II Zufuhr zu einer deutlichen Blutdruckreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (20).

In der ROS-Produktion war kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und p38-MAPK Ko feststellbar. Es wurde allerdings nur eine geringe Fallzahl (jeweils n=4) gemessen und hier war die Streuung groß. Zudem wurde das gesamte Aortengewebe untersucht und die Ergebnisse können dadurch beeinflusst werden.

Es zeigte sich in der *knock out*-Reihe von Ebrahimian et al. in der Zellkultur von VSMCs eine verminderte Produktion von ROS und Entzündungsmediatoren (20).

Die im Endeffekt massiven und so nicht erwarteten Blutdruckabfälle bei den p38-MAPK Ko Tieren werden in Abschnitt 4.10 diskutiert.

4.7 Veränderung der Gefäßfunktion bei p38 α -MAPK Ko und Kontrollen

Gefäßhypertrophie bei Kontrolltieren nach 14 Tagen Ang II, kein signifikanter Unterschied bei der ROS Produktion von p38 α -MAPK Ko und Kontrolle.

Wie in den Vorversuchen mit medikamentöser Inhibition der p38-MAPK durch BIRB 796 wurde die Dicke der Aortengefäßwand von p38 α -MAPK Ko und Kontrolltieren verglichen. Hier zeigte sich dasselbe Ergebnis, die Gefäßwand der Kontrolltiere war nach 14 Tagen chronischer Ang II Zufuhr im Vergleich deutlich verbreitert. Dies erklärt sich unter anderem durch die in der Literatur beschriebene Hochregulation von MMP-1 und MMP-9 mit den nachfolgenden Signalkaskaden, die unter anderem zu einer Entzündungsreaktion führen (43,44, 47-50). Da die p38 α -MAPK Ko Tiere bei diesen Versuchen jedoch keinen erhöhten Blutdruck, sondern im Gegenteil nach Ang II Zufuhr eher hypoton waren kann man diese Entzündungsreaktionen hier eher nicht erwarten. Die durch die Herzinsuffizienz verursachte Hypotonie bei den p38 α -MAPK Ko könnte hier zudem die Aortenwand geschützt haben (32). Wie die Gefäße dieser Tiere auf einen erhöhten Druck reagiert hätten, ob hier wie im Herzen Fibrose zugenommen hätte, oder es eine Malfunktion gegeben hätte kann unter diesen Umständen nicht beurteilt werden.

Da ROS wichtig für die Aktivierung der p38 α -MAPK sind und diese wiederum rückkoppelnd von ihr beeinflusst werden (Einleitung Abb. 1.2) wurde die Produktion von ROS in p38 α -MAPK Ko und Kontrolltieren nach 14 Tagen Ang II Zufuhr untersucht. Es war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Man hätte erwartet, dass bei den Ko Tieren deutlich weniger ROS produziert wird, da eine wichtige Signalkaskade ausgeschaltet ist (34). Allerdings war erstens die n-Zahl mit jeweils vier Tieren zu niedrig, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Zweitens zeigen unter anderem Tsutsui et al., dass bei einer Herzinsuffizienz die ROS-Produktion deutlich zunimmt (51). Inwieweit also die unerwartet hohen ROS-Werte bei den p38-MAPK KO auf die begleitende Herzinsuffizienz zurückzuführen sind, oder einem anderen Mechanismus unterliegen ist fraglich. Als weiterer Faktor sind ROS in viele biologische Prozesse involviert (27) und es ist schwierig die Auswirkungen einer nicht funktionierenden Signalkaskade auf das gesamte System zu untersuchen.

Kardakaris et al. zeigten, dass bei Mäusen, in denen p38-MAPK im Endothel und in den Makrophagen ausgenockt ist überraschenderweise keine Veränderungen im Hinblick auf eine abnehmende Atherosklerose zu finden sind. Erwartet wurde hier eine geringere Plaquebildung und Atherosklerose, auch durch reduzierte ROS, dies schein bei einem endothelabhängigen p38-MAPK Ko aber nicht so zu sein. Hier muss allerdings auch bedacht werden, dass sie Mäuse zudem einen Apolipoprotein E *knock out* hatten (64). Dieses Beispiel wird herangezogen, um die komplexen Zusammenhänge und der unterschiedlichen Systeme und deren Einflussnahme zu zeigen.

4.8 Nierenrelaxation und -kontraktion bei p38 α -MAPK Ko

Keine signifikanten Relaxationsunterschiede bei Perfusionsversuchen ohne vorherige chronische Ang II Behandlung, aber bessere Kontraktion nach PE Gabe bei Kontrolltieren. Nach chronischer Ang II Zufuhr relaxieren Kontrolltiere signifikant besser als p38 α -MAPK Ko, kein Unterschied bei der Ang II DWK.

Um zu untersuchen, wie sich der *knock out* der p38 α -MAPK auf die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der Nierengefäße auswirkt wurden bei p38-MAPK Ko und Kontrolltieren im System der isoliert perfundierten Niere DWK durchgeführt. Damit die Aussagefähigkeit der Ergebnisse deutlicher ist wurden sowohl Tiere ohne vorherige Behandlung mit Ang II, als auch Tiere nach 14 Tagen chronischer Ang II Behandlung untersucht.

Im ersten Teil ohne chronische Ang II Behandlung zeigten sich keine Unterschiede in der Relaxationsfähigkeit von p38-MAPK Ko und Kontrollen nach Gabe von Carbachol und GSNO. Ebenso war keine signifikante Differenz bei der Reaktion auf Ang II sichtbar, jedoch zeigte sich bei der Gabe von PE eine frühere und deutlichere Kontraktion bei den Kontrolltieren. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die MAPK P38 wie Tsang et al. zeigt durch PE aktiviert wird (52). Beim MAPK P38 Ko kann dieser Weg nachvollziehbar nicht oder nur eingeschränkt wirken.

Es scheint so, dass ohne chronische Ang II Zufuhr sich die Reaktion auf die getesteten Medikamente mit Ausnahme von PE nicht unterscheidet.

Diese Ergebnisse sind schwierig mit der Auswertung der Inhibitorversuche zu vergleichen, da diese nur mit vorheriger Behandlung durchgeführt wurden. Der p38-MAPK Ko hat in diesem Fall ohne Bluthochdruckentwicklung (Kontrolltiere) bzw. Auslösung der Veränderungen am Herzen (*knock out*) durch chronische Ang II Zufuhr sichtbar keine messbaren Auswirkungen auf die Relaxationsfähigkeit der Nierengefäße. Dies könnte daran liegen, dass es zu keiner Vorschädigung durch die arterielle Hypertonie gekommen ist. Ohne die andauernde hypertone Kreislauftsituation kann man die Hypothese aufstellen, dass der p38-MAPK Ko keine protektiven Auswirkungen hat. Die Schädigung über die ROS-Produktion, Zytokinproduktion und Sklerose wie bereits mehrfach gezeigt, findet hier keine Anwendung (36, 47-50).

Dass die Kontraktion nach der Ang II DWK keine signifikante Differenz zeigt, ist überraschend. Man würde erwarten, dass durch den p38 α -MAPK diese Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger kontrahieren, da bei den p38-MAPK Ko Tieren dieser wichtige Signalweg nicht angelegt ist und sie weniger auf die Ang II Gabe reagieren. Dies zeigte sich auch in den Vorversuchen mit dem Inhibitor (auch wenn hier chronisch mit Ang II vorbehandelt wurde). Allerdings bedeutet der *knock out*, dass die p38 α -MAPK gar nicht erst angelegt wurde. Also wurden wahrscheinlich von Anfang an Ausweich- und Parallelmechanismen hochreguliert, um den täglichen Anforderungen an die Blutdruckregulation gerecht zu werden. Allein das RAAS hat laut Li et al. mehrere Signalwege, über die es Effekte neben einer AT1 Rezeptoraktivierung vermitteln kann (53).

Wenn der Weg über die p38-MAPK nicht möglich ist, wäre zu untersuchen, ob hier anderen Mechanismen gesteigert wirken, da sie schon von Geburt an deutlich relevanter waren. In diesem Fall kann es also gut sein, dass die Kontraktion zwar ähnlich aussieht, aber auf Zellebene einer ganz anderen Ursache zuzuordnen ist.

Um vergleichbare Ergebnisse mit den Inhibitorversuchen zu bekommen, wurden DWK an Tieren mit 14 Tagen chronischer Ang II Behandlung vorgenommen. Wie schon in den Versuchen ohne Vorbehandlung, war kein signifikanter Unterschied bei der Reaktion auf die Ang II Gabe feststellbar. Hier ist gleichfalls die naheliegende Erklärung, dass parallel ablaufende Mechanismen den Ausfall der p38 α -MAPK kompensieren. Die signifikant bessere Relaxation nach Gabe von GSNO bei Kontrolltieren steht dagegen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Inhibitorversuche,

bei diesen war es umgekehrt. Nach den Ergebnissen der Blutdruckmessungen sind die Kontrolltiere einem hohen Blutdruck ausgesetzt, die p38-MAPK Ko Tiere nicht (durch den ausgeprägten Herzphänotyp), deshalb würde man erwarten, dass die Nierengefäße der p38-MAPK Ko Tiere eher geschützt wären und sogar besser relaxieren würden (wie bei den Inhibitorversuchen). Dass das Gegenteil der Fall ist verwundert, da es ohne vorherige chronische Ang II Zufuhr in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede bei den Relaxations-DWK gab. Nun war der Blutdruck bei den p38-MAPK Ko Tieren durch den Herzphänotyp jedoch nicht normal, sondern sogar deutlich unter normal. Ebenso war der Puls unter der normalen Frequenz. Es könnte also durch den niedrigen Druck, so Wanic-Kossowska et al., und die verringerte Herzfrequenz zu einer Hypoxie und Schädigung unter anderem des Gewebes gekommen sein, was die Relaxationsfähigkeit der Nierengefäße einschränken würde. Zudem kommt es bei chronischer Hypotonie paradoxerweise zur Freisetzung von Vasodilatoren wie z.B. NO (54). Die Blutgefäße hätten also schon deutlich dilatiert sein können und damit kaum noch eine Relaxation ermöglichen können. Um dieses genauer darzustellen wären weitere Funktionsversuche und Gewebsuntersuchungen nötig, die im Umfang dieser Arbeit nicht möglich waren.

Bei den Versuchen mit den p38 α -MAPK Ko gab es das Problem, dass sich der Allgemeinzustand der Tiere vor allem nach Implantation von Ang II Pumpen rapide verschlechterte. Wie in Abb. 3.22 zu erkennen ist, haben diese Tiere eine deutlich erhöhte Mortalität, nur 57% erreichten das geplante Versuchsende (im Vergleich dazu 81% der Kontrolltiere). Dieses muss berücksichtigt werden, da die besonders kranken Tiere gar nicht in die Ergebnisse einfließen konnten. Die Morbidität und Mortalität nach chronischer Ang II Zufuhr machte es schwierig, ausreichend Tiere für die verschiedenen DWK der isoliert perfundierten Niere vor allem nach Pumpenimplantation zu erhalten. Aus diesem Grund musste die Anzahl der zu untersuchenden Medikamente reduziert werden, damit eine signifikante Anzahl erreicht werden konnte.

4.9 Renaler Blutfluss bei p38 α -MAPK Ko

Deutlichere Reduktion des renalen Blutflusses bei p38 α -MAPK Ko im akuten Perfusionsversuch.

Um vor allem den renalen Blutfluss in vivo zu bestimmen, wurden bei p38 α -MAPK Ko und Kontrolltieren akute Perfusionsversuche mit einer aufsteigenden Ang II DWK gemacht. Hier zeigte sich keine Blutdruckdifferenz zwischen beiden Gruppen. Dagegen wurde der renale Blutfluss bei den p38 α -MAPK Ko Tieren signifikant deutlicher gedrosselt als bei den Kontrollen. Das bedeutet, dass die Widerstandsgefäße der p38 α -MAPK Ko Tiere eine verstärkte Reaktion auf die Infusion von Ang II zeigten. Dies ist auf den ersten Blick überraschend, da man eine reduzierte Antwort auf Ang II durch den Wegfall der über p38 α -MAPK laufenden Kaskade erwarten würde. Es scheint so zu sein, dass es bei einer kurzfristigen Gabe von Ang II zu einer überschießenden Reaktion darauf kommt. Da der Weg der Signalkaskade über die p38 α -MAPK blockiert ist sind wahrscheinlich parallele Kaskaden hochreguliert (s. Abschnitt 4.8, 53) und zeigen vor allem bei akuter Gabe von Ang II eine stärkere Kontraktion. So zeigen z.B. Bonnet et al., allerdings in Mesenterialgefäßen, eine deutliche Hochregulation von AT₂-Rezeptoren nach der Infusion von Ang II (55). Zudem wurde gezeigt, dass eine Ang II- Zufuhr die Gefäßpermeabilität unter Normalbedingungen erhöhen kann, während sie diese während einer Entzündungsreaktionen verringern (vermutlich über den AT₂-Rezeptor vermittelt, 56). An diesen Beispielen sieht man die variablen Einflüsse auf dieses System. Dazu kommt, dass es nicht möglich ist diesen Versuch unendlich lang durchzuführen ohne Einbußen bei der Qualität der Ergebnisse zu haben. Aus diesem Grund kann in diesem Setting leider nicht untersucht werden was passieren würde, wenn man die Ang II Infusion über längere Zeit konstant aufrechterhält.

4.10 Ausgeprägter Herzphänotyp bei p38 α -MAPK Ko

Ausgeprägte Herzinsuffizienz nach chronischer Ang II-Perfusion bei p38 α -MAPK Ko

In den akuten Perfusionsversuchen bei den p38-MAPK Ko-Tieren zeigte sich wie oben schon erwähnt ein gering höherer Grundblutdruck und die Tiere reagierten mit einem

massiven Blutdruck- und Pulsabfall auf die Implantation der Ang II Pumpe. Diese Reaktionen waren so ausgeprägt, dass die Tiere deutlich geschwächt, antriebslos und in einem reduzierten Allgemeinzustand erschienen.

Da die Ergebnisse signifikant waren und nach Versuchsende bei den entnommenen Herzen eine Dilatation des Herzmuskels auffällig war, sowie eine Zunahme des Herzgewichtes im Vergleich zum Körpergewicht wurde als mögliche Ursache bei den p38 α -MAPK Ko ein Problem mit der Herzfunktion vermutet.

Bei einer weiteren Gruppe wurden daraufhin in regelmäßigen Abständen Echokardiographien durchgeführt. Vor der Implantation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede von Kontrollen und p38-MAPK Ko Tieren, nach Ang II Pumpen Implantation stieg jedoch schon bei der ersten Messung das enddiastolische und endsystolische Volumen an und die Ejektionsfraktion sank. Es kam also zu einer globalen Herzinsuffizienz. Wie in Abb. 3.14 ersichtlich ballonierte das Herz der Ko Tiere und war nicht mehr in der Lage eine ausreichende Auswurfleistung zu erbringen. Die Frage ist, wie es so schnell zu einer Herzinsuffizienz kommen konnte. Normal ist das ein Prozess, der sich über Monate und Jahre hinzieht (58). Da bei den Kontrolltieren nichts dergleichen passierte und auch bei der Behandlung mit dem Inhibitor im Beobachtungszeitraum so etwas nicht auftrat, scheint es eine direkte Korrelation mit dem Ko der p38 α -MAPK zu geben.

Es wurde festgestellt, dass die in diesen Versuchen ausgeschaltete p38 α -MAPK die Hauptisoform im Herzen ist (26). Da die medikamentöse Inhibition nicht zu einer Herzinsuffizienz geführt hat ist ein Erklärungsansatz, dass p38 α -MAPK in der embryologischen Entwicklung des Herzens eine Rolle spielt. So ist die p38-MAPK und ihre Unterformen in multiple Vorgänge im Herzmuskel verantwortlich. Die p38s-MAPK ist u.a. eingebunden in die Regulation der Apoptose, Myozytenproliferation und Hypertrophie (57). Inwieweit nun die anderen Isoformen durch den p38 α -MAPK Ko hochreguliert sind muss untersucht werden.

Der anfangs im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Blutdruck könnte dadurch verursacht worden sein, dass parallele Blutdruckkontrollmechanismen durch den Ausfall der p38 α -MAPK hochreguliert sind (53). Bei einer massiven Beanspruchung des Ang II-Weges scheinen diese Mechanismen jedoch nicht zu reichen und es scheint strukturelle Änderungen im Herzmuskel durch die Ang II Zufuhr zu geben. Wie diese

Änderungen aussehen und welcher Mechanismus zu dieser Funktionsstörung des Herzens führt konnte im Umfang dieser Arbeit nicht herausgearbeitet werden. Allerdings konnte festgestellt werden, dass es in den Herzen der p38 α -MAPK Ko Tieren eine deutliche Fibrosezunahme gab (Ergebnisse 2.3.4). Zwischen den Kardiomyozyten der p38-MAPK Ko Tiere fand sich im Vergleich zu den Kontrolltieren vermehrt Bindegewebe. Bindegewebe hat eine gänzlich andere Struktur als Muskelzellen und ist bei weitem nicht so dehnbar wie diese, es ist außerdem nicht in der Lage zu kontrahieren (59). Dieses Gewebe kann also wahrscheinlich der erhöhten Belastung durch die Blutdruckerhöhung nicht gerecht werden und die Struktur des Herzmuskels nicht erhalten, es ist zusammenfassend ein Marker für Herzinsuffizienz

Ein Schwachpunkt ist, dass es keine Vergleiche mit den Herzen von p38 α -MAPK Ko Tieren vor Pumpen-Implantation gibt, deshalb kann nicht eingeordnet werden, ob diese Veränderungen schon vorher angelegt waren, oder erst durch die Behandlung mit Ang II auftraten. Nichtsdestotrotz führt der p38 α -MAPK Ko in der Zusammenschau der Ergebnisse zu Veränderungen im Herzen, die wir nicht erwartet hatten, bisher nicht bekannt waren und die weiter auf ihren genauen Entstehungsmechanismus hin untersucht werden sollten.

4.11 Selbstkritik

Ein Schwachpunkt dieser Arbeit ist die zum Teil geringe Anzahl der Experimente. Dies liegt vor allem daran, dass bei den p38 α -MAPK Ko Tieren der ausgeprägte Herzphänotyp auftrat, der so nicht zu erwarten war. Dies führte dazu, dass es eine hohe Letalität in dieser Gruppe gab. Dennoch konnten bei vielen Versuchen signifikante Ergebnisse erreicht werden, die in Folgeprojekten weiter untersucht und ergänzt werden müssen. Bei den nicht signifikanten Ergebnissen steht die Frage im Raum, inwieweit andere Prozesse zum Beispiel im Herzen von dem p38 α -MAPK Ko beeinflusst werden. Schließlich konnte im Umfang dieses Projekts nicht geklärt werden welche Rolle die p38 α -MAPK in der Embryonalentwicklung spielt.

4.12 Antwort (take home message)

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Bedeutung der p38 α -MAPK bei der Bluthochdruckentwicklung gezeigt werden und dass eine pharmakologische Inhibition zum Schutz der Nieren und der Gefäße eine vielversprechende Möglichkeit ist. Zudem konnte durch den p38 α -MAPK Ko ein Hinweis darauf gegeben werden, wie relevant die p38 α -MAPK außerdem für die Herzfunktion ist.

4.13 Ausblick

In Folgeprojekten soll nun untersucht werden, inwieweit der Herzphänotyp dadurch verursacht wurde, dass die p38 α -MAPK schon in der Embryonalzeit ausgeschaltet war. Dafür ist eine induzierbare Cre-Maus geplant, bei der die p38 α -MAPK erst zum gewählten Zeitpunkt genetisch ausgeschaltet wird. Hier werden sich dann auch weitere Blutdruckversuche und Versuche mit der isoliert perfundierten Niere anschließen, um weiter zu untersuchen, ob ein induzierter p38 α -MAPK Ko die Nierenfunktion schützt.

Des Weiteren gibt es u.a. eine vor kurzem erschienene Studie, die die Hypothese aufstellt, dass SARS-CoV-2 eine Hochregulation der p38-MAPK bewirkt und damit zu einer überschießenden Immunreaktion führt. Dies ist insbesondere in der aktuellen Situation ein weiterer interessanter und zu untersuchender Ansatz der p38-MAPK Inhibition (60).

5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Signalkette einer Aktivierung der p38-MAPK durch Ang II

Abb. 1.2: Ang II Signalkaskade über die p38-MAPK

Abb. 1.3: Gewebespezifischer p38-MAPK *knock out*

Abb. 2.1: Operationssitus

Tabelle 2.2: Zusammensetzung Krebs-Henseleit-Lösung

Abb. 2.3: Aufbau des Systems für die isoliert perfundierte Niere

Tabelle 2.4: Angewendete Medikamente bei der isoliert perfundierten Niere

Abb. 2.5: Versuchsablauf der isoliert perfundierten Niere

Tabelle 2.6 : Entwässerungs- und Paraffinierungsreihe für histologische Schnitte

Tabelle 2.7: Zusammensetzung 1%iger Triton Lysis Puffer

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des Laemmli-Probenpuffers

Tabelle 2.9: Zusammensetzung 10%iger Polyacrylamidgele

Tabelle 2.10: Zusammensetzung der benötigten Puffer und Lösungen

Tabelle 2.11: Benötigte Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot

Abb. 3.1: Blutdruckentwicklung unter BIRB

Abb. 3.2: Herzgewichte nach Ang II Behandlung

Abb. 3.3: Druckantwort isoliert perfundierter Niere auf GSNO und Carbachol

Abb. 3.4: Druckantwort isoliert perfundierten Niere durch Ang II Gabe

Abb. 3.5: Renale Druckantwort auf KCl und NA

Abb. 3.6: Berechnung der *Intima Media Ratio*

Abb. 3.7: Stimulation von VSMC mit Ang II

Abb. 3.8: Nachweis des p38-MAPK Ko in Aorta und Herz

Abb. 3.9: Nachweis des nicht erfolgten Ko von p38-MAPK in Niere, Leber und Muskel

Abb. 3.10: Zusammenfassung MAD vor und nach Ang II Implantation

Abb. 3.11: MAD und Puls bei p38-MAPK Ko in Stunden

Abb. 3.12: ROS-Produktion in Aorten

Abb. 3.13: Kontraktions-DWK ohne Pumpenimplantation

Abb. 3.14: Relaxations-DWK ohne Pumpenimplantation

Abb. 3.15: Relaxations- und Kontraktions-DWK nach Pumpenimplantation

Abb. 3.16: Systemischer Blutdruck und renaler Blutfluss bei Ang II Infusion

Abb. 3.17: Herz-/Körpergewicht

Abb. 3.18: Enddiastolisches/-systolisches Volumen, EF und Ventrikelmasse bei Echokardiografie

Abb. 3.19: Echokardiografie eines Kontroll- und eines p38-MAPK Ko Tieres

Abb. 3.20: Lumen Media Ratio p38-MAPK Ko

Abb. 3.21: Kardiale Fibrose nach Ang II Pumpen Implantation

Abb. 3.22: Überlebenszeitkurve p38-MAPK Ko

6 Literaturverzeichnis

1. Gurley SB, Riquier-Brison AD, Schnermann J, Sparks MA, Allen AM, Haase VH, et al. AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell metabolism*. 2011;13(4):469-75.
2. Berl T. Review: renal protection by inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2009;10(1):1-8.
3. Liu Y, Guyton KZ, Gorospe M, Xu Q, Lee JC, Holbrook NJ. Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free radical biology & medicine*. 1996;21(6):771-81.
4. Keesler GA, Bray J, Hunt J, Johnson DA, Gleason T, Yao Z, et al. Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein expression and purification*. 1998;14(2):221-8.
5. Heinrichsdorff J, Luedde T, Perdiguero E, Nebreda AR, Pasparakis M. p38 alpha MAPK inhibits JNK activation and collaborates with I κ B kinase 2 to prevent endotoxin-induced liver failure. *EMBO reports*. 2008;9(10):1048-54.
6. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological reviews*. 1993;45(2):205-51.
7. Lai EY, Martinka P, Fahling M, Mrowka R, Steege A, Gericke A, et al. Adenosine restores angiotensin II-induced contractions by receptor-independent enhancement of calcium sensitivity in renal arterioles. *Circulation research*. 2006;99(10):1117-24.
8. Sparks MA, Parsons KK, Stegbauer J, Gurley SB, Vivekanandan-Giri A, Fortner CN, et al. Angiotensin II type 1A receptors in vascular smooth muscle cells do not influence aortic remodeling in hypertension. *Hypertension*. 2011;57(3):577-85.
9. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):366-73.
10. Srinivasan R, Forman S, Quinlan RA, Ohanian J, Ohanian V. Regulation of contractility by Hsp27 and Hic-5 in rat mesenteric small arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294(2):H961-9.

11. Gunst SJ, Zhang W. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;295(3):C576-87.
12. Staiculescu MC, Foote C, Meininger GA, Martinez-Lemus LA. The role of reactive oxygen species in microvascular remodeling. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(12):23792-835.
13. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994;372(6508):739-46.
14. Yang Y, Parsons KK, Chi L, Malakauskas SM, Le TH. Glutathione S-transferase-micro1 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and oxidative stress. *Hypertension*. 2009;54(6):1360-8.
15. Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, et al. Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(2):C494-9.
16. Rocic P, Seshiah P, Griendling KK. Reactive oxygen species sensitivity of angiotensin II-dependent translation initiation in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(38):36973-9.
17. Chan SH, Hsu KS, Huang CC, Wang LL, Ou CC, Chan JY. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circulation research*. 2005;97(8):772-80.
18. Park JK, Fischer R, Dechend R, Shagdarsuren E, Gapeljuk A, Wellner M, et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition ameliorates angiotensin II-induced target organ damage. *Hypertension*. 2007;49(3):481-9.
19. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(10):2449-60.
20. Ebrahimian T, Li MW, Lemarie CA, Simeone SM, Pagano PJ, Gaestel M, et al. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in angiotensin II-induced inflammation and hypertension: regulation of oxidative stress. *Hypertension*. 2011;57(2):245-54.

21. Cheriyan J, Webb AJ, Sarov-Blat L, Elkhawad M, Wallace SM, Maki-Petaja KM, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase improves nitric oxide-mediated vasodilatation and reduces inflammation in hypercholesterolemia. *Circulation*. 2011;123(5):515-23.
22. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(26):15712-7.
23. Zhang J, Zhong W, Cui T, Yang M, Hu X, Xu K, et al. Generation of an adult smooth muscle cell-targeted Cre recombinase mouse model. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(3):e23-4.
24. Quintana AB, Rodriguez JV, Scandizzi AL, Guibert EE. The benefit of adding sodium nitroprusside (NPNa) or S-nitrosoglutathion (GSNO) to the University of Wisconsin solution (UW) to prevent morphological alterations during cold preservation/reperfusion of rat livers. *Annals of hepatology*. 2003;2(2):84-91.
25. Corti A, Franzini M, Scataglini I, Pompella A. Mechanisms and targets of the modulatory action of S-nitrosoglutathione (GSNO) on inflammatory cytokines expression. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;562:80-91.
26. Dingar D, Merlen C, Grandy S, Gillis MA, Villeneuve LR, Mamarbachi AM, et al. Effect of pressure overload-induced hypertrophy on the expression and localization of p38 MAP kinase isoforms in the mouse heart. *Cellular signalling*. 2010;22(11):1634-44.
27. Caliceti C, Nigro P, Rizzo P, Ferrari R. ROS, Notch, and Wnt signaling pathways: crosstalk between three major regulators of cardiovascular biology. *BioMed research international*. 2014;2014:318714.
28. Nishimura A, Sungipp C, Tozaki-Saitoh H, et al. Purinergic P2Y6 receptors heterodimerize with Angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension. *SCI Signal* 2016; 9: 7.
29. Carbone ML, Bregeon J, Devos N, et al. Angiotensin II activates the RhoA exchange factor Arhgef 1 in humans, *Hypertension* 2015; 65: 1273-1278
30. Ravarotto V, Pagnin E, Maiolino G, et al. The blocking of angiotensin II Type 1 receptor and RhoA/Rho kinase activity in hypertensive patients: Effect of Olmesartan medoxomil and implication with cardiovascular-renal remodeling. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2015; 16: 1245-1250

31. Wu J, Thabet SR; Kirabo A, et al. Inflammation mechanical stretch promote aortic stiffening in hypertension through activation of p38 mitogen activated protein kinase. *Circulat Res* 2014; 114: 616-625
32. Vlachopoulos C, Aznaouridis K and Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: A systemic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 1318-1327
33. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, et al. P38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998; 273: 15022-15029
34. Potthoff SA, Fahling M, Clasen T, et al. Angiotensin (1-7) modulates renal vascular resistance through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension* 2014; 63: 265-272
35. Bao W, Behm DJ, Nerurkar SS, et al. Effects of p38 MAPK inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage and superoxide anion production. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 49: 362-368
36. Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I, et al. Chronic treatment with angiotensin- (1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Br Pharmacol* 2011; 163: 974-983
37. Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 2004; 109: 1795-1801
38. Owens AP III, Subramanian V, Moorlegheh JJ, et al. Angiotensin II induces a region-specific hyperplasia of the ascending aorta through regulation of the inhibitor of differentiation 3. *Circulat Res* 2010; 106: 611-619
39. Griendling KK, Berk BC, Ganz P, et al. Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle phosphoinositide metabolism. State of the art lecture. *Hypertension* 1987; 9: III 181-185
40. McNulty M, Mahmud A, Spiers P, et al. Collagen Typ I degradation is related to arterial stiffness in hypertensive and normotensive subjects. *J Hum Hypertens* 2006; 20: 867-873
41. Castro MM, Rizzi E, Prado CM, et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biol* 2010; 29: 194-201

42. Potthoff SA, Stamer S, Grave K, Königshausen E, et al. Chronic p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves vascular function and remodeling in angiotensin II-dependent hypertension. *JRAAS* 2016
43. Cortez DM, Feldmann MD, Mummidi S, et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK-dependent and ERK 1/2 dependent C/EBP-beta, NF kappaB und AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circulat Physiol* 2007; 293: H3356-3365
44. Wu Y, Zhu L, Liu L, et al. Interleukin-17A stimulates migration of periodontal ligament fibroblasts via p38 MAPK/NF kappaB-dependent MMP-1 expression. *J Cellul Physiol* 2014; 229: 292-299
45. Dange MC, Agarwal AK and Kalraiya RD. Extracellular galactin-3 induces MMP9 expression via activation p38 MAPK pathway via lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP1). *Molec Cellul Biochem* 2015; 404: 79-86
46. Gilet A, Zou F, Boeumenir m, et al. Aldosterone up-regulates MMP-9 and MMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK 1/2 and P13K pathways. *Exp Cell Res* 2015; 331: 152-163
47. Chiaou YA, Ramirez TA, Zamilpa R, et al. Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice. *Cardiovasc Res* 2012; 96: 444-455
48. Dayer C and Stamenkovic I Recruitment of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) to the fibroblast cell surface by lysylhydroxylase-3 (LH3) triggers TGF-beta activation and fibroblast differentiation. *J Biolog Chem* 2015; 290: 13763-13778
49. Yao J, Xiong M, Tang B, et al. Simvastatin attenuates pulmonary vascular remodelling by down-regulation matrix metalloproteinase-1 and -9 expression in carotid artery-jugular vein shunt pulmonary hypertension model in rats. *Eur J Cardiothoracic Surg* 2012; 42: e121-7
50. Thomas AC and Newby AC Effect of matrix metalloproteinase-9 knockout on vein graft remodelling in mice. *J Vascular Res* 2010; 47: 299-308
51. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S Oxidative stress and heart failure. *J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(6): H2181-90.
52. Tsang M, Rabkin SW p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is activated by noradrenaline and serves a cardioprotective role, whereas adrenaline induces p38 MAPK dephosphorylation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(8): e12-9

53. Li XC, Zhang J, Zhuo J The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. *Pharmacol Res* 2017; 125(Pt A): 21-38
54. Wanic-Kossowska M, Czekalski S Hypotonia in renal failure patients undergoing dialysis therapy. *Pol Arch Med Wewn* 2007; 117(4): 58-63
55. Bonnet F, Cooper M, Carey R, et al. Vascular expression of angiotensin type 2 receptor in the adult rat: influence of angiotensin II infusion. *J Hypertens* 2001; 19(6): 1075-81
56. Ereso A, Ramirez R, Sadjadi J, et al. Angiotensin II type 2 receptor provides an endogenous brake during inflammation-induced microvascular fluid leak. *J Am Coll Surg* 2007; 205(4): 527-33
57. Yokota T, Wang Y p38 MAP kinases in the heart. *Gene* 2016 Volume 575, Issue 2, Part 2: 369-376
58. Dick S, Epelman S Chronic Heart Failure and Inflammation: What Do We Really Know? *Circ Res* 2016; 119(1): 159-76
59. González A, Schelbert E, Díez J, et al. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(15): 1696-1706
60. Grimes J, Grimes K p38 MAPK inhibition: A promising therapeutic approach for COVID-19. *J Mol Cell Cardiol* 2020 Jul; 144: 63-65
61. Seongchun K, Lian Hua F, Bokyoung K et al. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* 2004 Jun; 95(2): 267-72
62. Kojonazarov B, Novoyatleva T, Boehm M, et al. p38MAPK Inhibition Improves Heart Function in Pressure-Loaded Right Ventricular Hypertrophy. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017 Nov; 57 (5): 603-614
63. Thieme M, Sivritas S, Mergia E, et al. Phosphodiesterase 5 inhibition ameliorates angiotensin II-dependent hypertension and renal vascular dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017 Mar 1; 312 (3): F474-F481
64. Kardakaris R, Gareus R, Xanthoulea S, et al. Endothelial and macrophage-specific deficiency of P38 α MAPK does not affect the pathogenesis of atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ mice. *PLoS One.* 2011; 6(6):e21055

65. Hering L, Rahman M, Hoch H, et al. α 2A-Adrenoreceptors Modulate Renal Sympathetic Neurotransmission and Protect against Hypertensive Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2020 Apr; 31(4):783-798

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere meinen Betreuern PD Dr. med. Johannes Stegbauer und Prof. Dr. med Lars Christian Rump, durch die ich viel selbstständig arbeiten durfte, aber dabei jederzeit gut angeleitet und begleitet wurde.

Das Team der experimentellen Nephrologie war jederzeit zur Stelle und sie haben mich durch so manche Höhen und Tiefen begleitet. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Hier möchte ich insbesondere Blanka Duvnjak und Christina Schwandt danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. med, Henning Hoch, Dr. med Sema Sivritas, Dr. med. Susanne Mende und meinen getreuen Doktorandenkollegen. Ihr habt vieles leichter gemacht.

Auf jeden Fall möchte ich meine Familie und meine Freunde nicht vergessen, die immer zu mir gehalten haben und auch wenn ich kurz vorm Aufgeben war immer wieder dafür gesorgt haben, dass diese Arbeit nun hier steht.

Düsseldorf den 19.07.2021