

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

**Rolle des Mas-Rezeptors auf die Angiotensin-II-induzierte Druckantwort in
Nieren von Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bassam Ishak

2023

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Johannes Stegbauer

Zweitgutachter/in: PD Dr. Sebastian Temme

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Potthoff SA, Föhling M, Clasen T, Mende S, Ishak B, Suvorava T, Stamer S, Thieme M, Sivritas SH, Kojda G, Patzak A, Rump LC, Stegbauer J., (2014), Angiotensin-(1-7) Modulates Renal Vascular Resistance Through Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Apolipoprotein E-Deficient Mice. Hypertension (63) 265-72

Zusammenfassung

Dyslipidämie ist ein Risikofaktor für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion. Diese ist eine Vorstufe der Atherosklerose. Das Renin-Angiotensin-System mit der Achse Angiotensin-konvertierendes Enzym/Angiotensin II/ Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 trägt zur Entwicklung der endothelialen Dysfunktion durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Aktivierung von p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen bei. Die alternative Achse um Angiotensin-konvertierendes Enzym 2/Angiotensin-(1–7) scheint einen protektiven Einfluss zu haben. Unbekannt ist jedoch, ob Ang-(1–7) diese Gegenregulation über den Mas-Rezeptor vermittelt.

Apolipoprotein-E-defiziente Mäuse, ein Tiermodell für Dyslipidämie mit starker Neigung zu Atherosklerose, zeigen auf Ang II eine verstärkte Vasokonstriktion mit beeinträchtigter Gefäßfunktion. Die chronische Behandlung mit Ang-(1–7) verbessert die renale endotheliale Dysfunktion von ApoE(-/-)-Mäusen unter fettreicher Ernährung.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Mas-Rezeptors bei der Ang-(1–7)-vermittelten vasoprotektiven Wirkung zu untersuchen. Anhand von Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen konnte demonstriert werden, dass eine chronische Ang-(1–7)-Behandlung die Ang-II-vermittelte Druckantwort in isoliert perfundierten Nierenversuchen nicht reduzieren kann. Diese geht mit einer fehlenden Reduktion der 8-Isoprostan-Konzentration, ein Marker des oxidativen Stresses, im Urin einher. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die p38-MAP-Kinasen bei der vom Mas-Rezeptor vermittelten Regulation der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort eine wesentliche Rolle spielt. So ist die p38-MAPK-Aktivität im Nierencortex von ApoE(-/-)-Mäusen gegenüber Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen unter chronischer Ang-(1–7)-Behandlung deutlich reduziert.

Darüber hinaus hatte die chronische Ang-(1–7)-Behandlung weder bei ApoE(-/-)- noch bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen einen Effekt auf den systolischen Blutdruck und die Plasmakonzentrationen von Cholesterin und Triglyzeriden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die vasoprotektive Funktion von Ang-(1–7) am Mas-Rezeptor durch eine Steigerung der Stickstoffmonoxid-Konzentration (NO) vermittelt wird. Die pharmakologische Verhinderung der NO Bildung führt dazu, dass die Mas-Defizienz keinen zusätzlichen Effekt auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit eindeutig, dass die vasoprotektiven Effekte von Ang-(1–7) bei ApoE(-/-)-Mäusen über den Mas-Rezeptor vermittelt werden. Dabei scheint das Fehlen des Mas-Rezeptors mit einer erhöhten Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie einer gesteigerten Aktivierung der p38-Signalkaskade verbunden zu sein. Diese führen zu einer erhöhten Endotheldysfunktion und somit zu Progredienz der Atherosklerose.

Summary

Dyslipidemia is a risk factor for the development of endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction is a precursor of atherosclerosis. The renin-angiotensin system with the angiotensin converting enzyme/angiotensin II/angiotensin II receptor type 1 axis contributes to the development of endothelial dysfunction through the generation of reactive oxygen species and activation of p38 mitogen-activated protein kinases. The alternative axis involving angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7) appears to have a protective influence. However, it is unknown whether Ang-(1–7) mediates this counter regulation via the Mas receptor.

Apolipoprotein E-deficient mice, an animal model of dyslipidemia with a strong propensity for atherosclerosis, showed an increased Ang-induced renal pressor response. Chronic treatment with Ang-(1–7) ameliorates renal endothelial dysfunction in ApoE(-/-) mice on a high-fat diet. The aim of this work, was to verify the role of the Mas receptor in Ang-(1–7)-mediated vasoprotective effect.

The aim of this study was to verify the role of the Mas receptor in Ang-(1–7)-mediated vasoprotective effects. Using Mas(-/-)/ApoE(-/-) mice, it was demonstrated that chronic Ang(1–7) treatment cannot reduce the Ang II-mediated pressure response in isolated perfused kidney experiments, as already shown in ApoE(-/-) mice. This is accompanied by a lack of reduction in urinary 8-isoprostane concentration as a marker of oxidative stress. In addition, we demonstrated that p38 MAP kinases play an important role in Mas receptor-mediated regulation of the Ang II-induced renal pressure response. Thus, p38 MAPK activity in the renal cortex of ApoE(-/-) mice is significantly reduced compared to Mas(-/-)/ApoE(-/-) mice under chronic Ang (1–7) treatment.

Furthermore, chronic Ang (1-7) treatment had no effect on systolic blood pressure and plasma concentrations of cholesterol and triglycerides in either ApoE(-/-) or Mas(-/-)/ApoE(-/-) mice.

This study also demonstrated that the vasoprotective function of Ang-(1–7) at the Mas receptor is mediated by an increase in nitric oxide (NO) concentration. During inhibition of NO generation, Mas deficiency has no additional effect on the Ang II-induced renal pressure response.

In summary, this study clearly demonstrates that the vasoprotective effects of Ang-(1–7) in ApoE(-/-) mice are mediated via the Mas receptor. In this regard, the absence of the Mas receptor appears to be associated with increased levels of reactive oxygen species (ROS) and with increased activation of the p38 signaling cascade. These lead to increased endothelial dysfunction as well as progression of atherosclerosis.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der epidemiologische Zusammenhang zwischen Dyslipidämie und kardiovaskulären Erkrankungen.....	1
1.2	Die pathophysiologische Betrachtung: Der Weg zur endothelialen Dysfunktion.	1
1.3	ApoE(-/-)-Mäuse: Die geeigneten Tiermodelle.....	3
1.4	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	3
1.5	Angiotensin (1–7) und der Mas-Rezeptor.....	5
1.6	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen.....	8
1.7	Ziele der Arbeit.....	11
2	Methoden und Material.....	11
2.1	Versuchstiere.....	11
2.1.1	Tierstämme und Herkunft.....	11
2.1.2	Material für Tierbehandlung.....	12
2.1.3	Material für Tiernarkose.....	12
2.1.4	Voraussetzungen und Versuchsbedingungen.....	12
2.1.5	Versuchsreihen.....	12
2.1.6	Vorbereitung der osmotischen Pumpe.....	14
2.1.7	Implantation der osmotischen Pumpe.....	14
2.1.8	Nichtinvasive systolische Blutdruckmessungen.....	14
2.1.9	Quantifizierung der Konzentration von 8-Isoprostan, Nitrat und Kreatinin im Urin	15
2.1.10	Blutentnahme.....	15
2.2	Isoliert perfundierte Nieren.....	15
2.2.1	Material.....	15
2.2.2	Aufbau der Perfusionsanlage.....	17
2.2.3	Organentnahme und Nierenisolierung.....	18
2.2.4	Perfusionsablauf der isolierten Nieren.....	19
2.2.5	Angiotensin-II-induzierte renale Druckantwort.....	19
2.2.6	Die Auswertung.....	20
2.3	Proteinbiochemie – Immunoblotting: p38-MAPK und Phospho-p38-MAPK....	21
2.3.1	Material.....	21

2.3.2	Organentnahme und Proteinisolierung.....	23
2.3.3	Gelelektrophorese	23
2.3.4	Western Blot.....	24
2.3.5	Auswertung.....	24
2.4	Realtime quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	24
2.4.1	Material	24
2.4.2	Organentnahme	25
2.4.3	RNA-Isolierung.....	25
2.4.4	Der Weg aus der RNA in die komplementäre DNA	26
2.4.5	Polymerasekettenreaktion	26
2.4.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.4.7	Quantitative Realtime-PCR.....	27
2.5	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Basisuntersuchungen	28
3.1.1	Nichtinvasive Tail-Cuff-Blutdruckmessung.....	28
3.1.2	Cholesterol und Triglyzeride im Blutplasma.....	29
3.2	Der Effekt von Angiotensin (1–7)-Behandlung auf die renale Druckantwort im Modell der isoliert perfundierten Nieren.....	30
3.2.1	Chronische Ang-(1–7)-Behandlung.....	30
3.2.2	Akute Ang-(1–7)-Behandlung	32
3.3	Die Genexpression unter chronischer Ang-(1–7)-Behandlung	34
3.4	Akute p38-MAPK-Inhibition.....	35
3.5	Die p38-Phosphorylierung im Nierenkortex unter chronischer Ang-(1–7)-Behandlung.....	39
3.5.1	Western Blot.....	39
3.5.2	8-Isoprostan-Bestimmung im Urin	40
3.6	Die Interaktion von p38-Inhibition und NOS-Inhibition bei der renalen Druckantwort.....	41
4	Diskussion	44
4.1	Der Effekt von Ang-(1–7) bei Mas-Defizienz	44
4.2	Nichtinvasive Tail-Cuff-Blutdruckmessung.....	44
4.3	Fetteiche Ernährung und Dyslipidämie	45

4.4	Effekt von Ang-(1–7) auf die renale Druckantwort wird über den Mas-Rezeptor vermittelt	45
4.5	Ang-(1–7) inhibiert über den Mas-Rezeptor eine Aktivierung der p38-Signalkaskade	47
4.6	Eine p38-Inhibition reduziert NO-abhängig die Ang-II-induzierte renale Druckantwort.....	49
4.7	Schlussfolgerungen.....	50
5	Literaturverzeichnis	52

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Differenz
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
AD	Außendurchmesser
Akt	Proteinkinase B
Ang-(1–7)	Angiotensin (1–7)
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	Analysis of variance
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE(–/–)	Apolipoprotein-E-defizient/KO
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
AT2	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2
Bdkrb2	Bradykinin Rezeptor B2
c-Src	Cellular Sarcoma Tyrosinkinase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX-2	Cyclooxygenase-2
C57BL/6	congenic substrain black 6/mouse number 57
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurven
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
gDNA	Genomic deoxyribonucleic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK-3β	Glycogensynthasekinase-3β
HDL	High-density lipoprotein
KCl	Kaliumchlorid
KO	Knock-out
ID	Innendurchmesser

IL	Interleukin
L-NAME	L-Arginine Methyl Ester
LDL	Low-density lipoprotein
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Mas	mitochondrial Assembly 1
Mas(-/-)	Mas-defizient
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MrgD	Mas-related-G-Protein-Coupled-Receptor Type D
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
NAD[P]H	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-[Phosphate-]
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NOX2	NADPH oxidase 2
p38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PI3k	phosphoinositide 3-kinase
pM	Pikomolar
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SHP-2	Src homology region 2 domain-containing phosphatase
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VLDL	Very low-density lipoprotein
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
WD	Western Diet
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Eigene Darstellung.....	4
Abb. 2: Schematische Darstellung: Entstehungswege von Ang-(1–7)	6
Abb. 3 Ang-II-Dosis-Wirkungskurven bei ApoE(-/-)-Mäusen in Abhängigkeit von chronischer Ang-(1–7) Behandlung.....	7
Abb. 4: Schematische Darstellung: p38-Signalkaskade.....	9
Abb. 5: Behandlungsskizze der verschiedenen Mäusegruppen.....	13
Abb. 6: Aufbau der Perfusionsanlage.....	18
Abb. 7: Skizze einer isolierten Nierenperfusion mit Ang-II-DWK mit Gabe eines Inhibitors	20
Abb. 8: Systolische Blutdruckmessung verschiedener Mausgruppen	28
Abb. 9: Plasmakonzentration von Gesamtcholesterin und Triglyzeriden in mit Western Diet ernährten Mäusegruppen.....	29
Abb. 10: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen in Abhängigkeit von chronischer Ang-(1–7)-Behandlung.....	30
Abb. 11: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von chronischer Ang-(1–7)-Behandlung.....	31
Abb. 12: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei ApoE(-/-)-Mäusen mit akuter Ang-(1–7)-Behandlung.....	32
Abb. 13: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen mit akuter Ang-(1–7)-Behandlung.	33
Abb. 14: Realtime-PCR mit dem Vergleich der relativen Genexpression von AT1, AT2, Mas-Rezeptor und von ACE2.	34
Abb. 15: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei ApoE(-/-)-Mäusen mit akuter p38-Inhibition. 35	
Abb. 16: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)-Mäusen mit akuter p38-Inhibition. . 36	
Abb. 17: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen mit akuter p38-Inhibition.....	37
Abb. 18 Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Wildtyp-Mäusen mit akuter p38-Inhibition. ..	38
Abb. 19: Repräsentative <i>Western Blot</i> mit densitometrischer Auswertung aus dem Lysat der Nierenrinden zeigt das Phospho-p38/p38-MAPK-Verhältnis.	39
Abb. 20: Isoprostan/Kreatinin-Quotient im 24-Stunden-Sammelurin im Vergleich zwischen mehreren Versuchsreihen.	40
Abb. 21: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei ApoE(-/-)-Mäusen mit p38-MAPK-Inhibition und eNOS-Inhibition	41
Abb. 22: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen mit p38-MAPK-Inhibition und eNOS-Inhibition.....	42
Abb. 23: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)- und ApoE(-/-)-Mäusen unter SO-Synthase-Hemmung in Abhängigkeit von p38-MAPK-Inhibition.	43

1 Einleitung

1.1 Der epidemiologische Zusammenhang zwischen Dyslipidämie und kardiovaskulären Erkrankungen

Atherosklerose ist ein zentraler pathophysiologischer Faktor vieler kardiovaskulärer Erkrankungen und spielt weltweit eine bedeutende gesundheitliche Rolle. So führen atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen europaweit zu mehr als 4 Millionen Todesfällen pro Jahr (1). Zu den typischen kardiovaskulären Risikofaktoren zählen die arterielle Hypertonie, die Dyslipidämie, der Diabetes mellitus und der Nikotinkonsum. Obwohl die Hypertonie und die Dyslipidämie als unabhängige Risikofaktoren diagnostiziert und behandelt werden können, sind sie eng miteinander verbunden und treten häufig gleichzeitig auf. Sie führen gemeinsam zu atherosklerotischen vaskulären Veränderungen am Herz-Kreislauf-System und somit zur Funktionseinschränkung der Gefäße verschiedener Zielorgane. Diese Gefäßschäden werden durch eine Störung der endothelialen Funktion verursacht. Die endotheliale Dysfunktion geht mit erhöhtem oxidativem Stress sowie gesteigerten inflammatorischen Prozessen einher und wird durch das Renin-Angiotensin-System vermittelt (2).

Zur Dyslipidämie, auch Dyslipoproteinämie genannt, gehören u. a. die Erhöhung des Plasmaspiegels an Triglyceride und LDL-Cholesterin sowie niedrige Plasmaspiegel an HDL-Cholesterin. Neuere vom Fettstoffwechsel abhängige metabolische Risikofaktoren sind z. B. der kleine dichte LDL-Phänotyp, postprandiale Hyperlipidämie und das ApoB-Lipoprotein (3). Diese Parameter sind typische Kennzeichen zur Entwicklung des metabolischen Syndroms, da sie atherogen und proinflammatorisch am Gefäßendothel wirken(3). Daher gelten die Diagnostik und Behandlung der Dyslipidämie weiterhin als eine Priorität in der Primär- und Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen(1).

1.2 Die pathophysiologische Betrachtung: Der Weg zur endothelialen Dysfunktion

Das Gefäßendothel ist eine einschichtige Zellschicht, die die zum Lumen hineinragende Wandschicht aller Blut- und Lymphgefäße auskleidet. Diese Schicht bildet mit ihrer Glykokalyx die gesunde Gefäßbarriere und trägt durch verschiedene Interaktionen zu einer intakten Gefäßfunktion bei: Gefäßtonus, Integrität der Gefäßbarriere, Signaltransduktionen, Reparatur und Angiogenese, Hämostase, Metabolismus(4). Eine Störung der Endothelfunktion führt zur Manifestation lokaler und systemischer atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankungen(5).

Die Endotheldysfunktion geht mit der Initiierung einer atherosklerotischen Läsion einher. Die Anlagerung von Lipoproteinen an das Endothel induziert die Migration von zirkulierenden Monozyten aus der Blutbahn. Diese differenzieren sich zu Makrophagen und

entwickeln sich durch Aufnahme von Lipoproteinen weiter zu Schaumzellen. Diese wiederum rufen eine lokale Inflammation hervor. Aktivierte glatte Muskelzellen aus der Media beginnen einen Gewebeumbau und bilden eine fibromuskuläre Kappe mit einem nekrotischen lipidreichen Kern aus abgestorbenen Schaumzellen. Die Ränder der entstandenen Plaques bleiben hoch inflammatorisch, wodurch die Plaques vulnerabel werden und lädieren können (6, 7).

Die endotheliale Dysfunktion wird sowohl mit traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren als auch mit anderen genetischen oder erworbenen systemischen Erkrankungen assoziiert: Bluthochdruck, Hyperglykämie, Dyslipidämie, Umwelttoxine, genetische Erkrankungen, familiäre Anamnese, Adipositas, entzündliche Erkrankungen, multifaktorieller oxidativer Stress sowie Altern (8).

In den 1980er-Jahren wurde nachgewiesen, dass die acetylcholinabhängige Vasodilatation in einem intakten Endothel mittels EDRF (*Endothelium-derived relaxing factor*) bedingt ist. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass es sich bei EDRF biochemisch um Stickstoffmonoxid (NO) handelt (9, 10). Im Endothel wird L-Arginin mittels endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zu NO metabolisiert (11, 12). Die biologische Wirkung von NO wird durch die Stimulierung einer löslichen Guanylatcyclase vermittelt und resultiert in einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in vaskulären glatten Muskelzellen, die wiederum über die Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen zur Phosphorylierung weiterer Zielproteine und letztlich zur Vasodilatation führt (13, 14).

Endotheliales NO ist relevant für die Regulation des Vasotonus und des thrombogenen Verhaltens der Gefäße. Aufgrund einer NO-Defizienz fallen eNOS-Knock-out-Mäuse (eNOS-KO) mit Hypertension und erhöhtem Thromboserisiko auf und entwickeln auf interzellulärer Ebene eine erhöhte Leukozyten-Endothelien-Interaktion sowie gesteigerte Intimaproliferation (15, 16). An eNOS-KO/Apolipoprotein-E-KO-[ApoE(-/-)]-Mäusen ist eine schnellere Progredienz atherosklerotischer kardiovaskulärer Komplikationen zu beobachten (15). Hypercholesterinämie wiederum verschlechtert die eNOS-abhängige Vasodilatation. Die Arteria carotis von ApoE(-/-)-Mäusen zeigt eine verringerte acetylcholinabhängige Relaxierung sowie erhöhte Produktion von superoxiden Anionen (16).

Die Endotheldysfunktion ist daher als ein pathophysiologisches Korrelat vieler kardiovaskulärer Erkrankungen zu verstehen und bleibt ein wesentlicher Aspekt bei der Erforschung der Ursachen, Folgen und Behandlung dieser Erkrankungen.

1.3 ApoE(-/-)-Mäuse: Die geeigneten Tiermodelle

Die Maus als Versuchstier ist bereits länger in der Forschung etabliert. Gründe hierfür sind schnelle Reproduktion, einfache genetische Manipulation und dementsprechend rasche Reproduzierbarkeit der Daten(17). Mäuse sind jedoch resistent gegen atherosklerotische Veränderungen, da für den Cholesteroltransport in der Maus hauptsächlich *High Density Lipoprotein* (HDL) verantwortlich ist, während *Low Density Lipoprotein* (LDL) und *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) in kleinen Konzentrationen vorhanden sind (18).

Ein Tiermodell mit dem Potenzial zu Dyslipidämie und Atherosklerose sind die ApoE(-/-)-Mäuse. Apolipoprotein E ist ein plasmatisches Glykoprotein, das in der Leber, im Gehirn sowie ubiquitär durch Makrophagen und Monozyten produziert wird (19). Es fungiert als Ligand für LDL-Rezeptoren und ist am Transport von an Lipoproteine gebundenem Cholesterol und anderen Lipiden zwischen verschiedenen Körperzellen beteiligt. Eine mutierte Form von ApoE, die nicht an LDL-Rezeptoren binden kann, wird mit familiärer Hyperlipidämie vom Typ III in Verbindung gebracht, die durch hohen Plasmacholesterinspiegel und beschleunigte koronare Herzkrankheiten gekennzeichnet ist (20).

Ein Mangel an ApoE führt zu einem erhöhten Plasmaspiegel des Gesamtcholesterins, hauptsächlich VLDL- und Chylomikronen, die durch eine fettreiche oder westliche Ernährung vervierfacht werden. Diese Tiere zeigten bereits vermehrt atherosklerotische Veränderungen im arteriellen Gefäßsystem (21). ApoE(-/-)-Mäuse wurden 1992 entwickelt und bereits ausgiebig als Tiermodell beim Erforschen der Atherosklerose und weiterer Charakteristika des metabolischen Syndroms verwendet (22, 23).

Es gibt jedoch einige limitierende Faktoren bei der Verwendung von ApoE(-/-)-Mäusen. Apolipoprotein E wirkt proinflammatorisch und oxidativ und beeinflusst die Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMC). Diese Effekte treten unabhängig vom Plasmalipidspiegel auf (24). Außerdem führt der Mangel an ApoE im Tiermodell zu einem Anstieg des VLDL, wohingegen LDL im Lipidstoffwechsel als Hauptfaktor der Atherosklerose beim Menschen angesehen wird (21). Eine weitere bedeutende Limitierung ist das seltenere Auftreten von Plaquerupturen, Thrombosen und Thromboembolien im Tiermodell (25).

ApoE(-/-)-Mäuse erwiesen sich trotz dieser Einschränkungen als ein geeignetes Modell für die Erforschung der Gefäßfunktion.

1.4 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein komplexes endokrines System, bestehend aus Hormonen und Enzymen, die den Blutdruck sowie den Elektrolyte-Wasserhaushalt des Körpers reguliert (26).

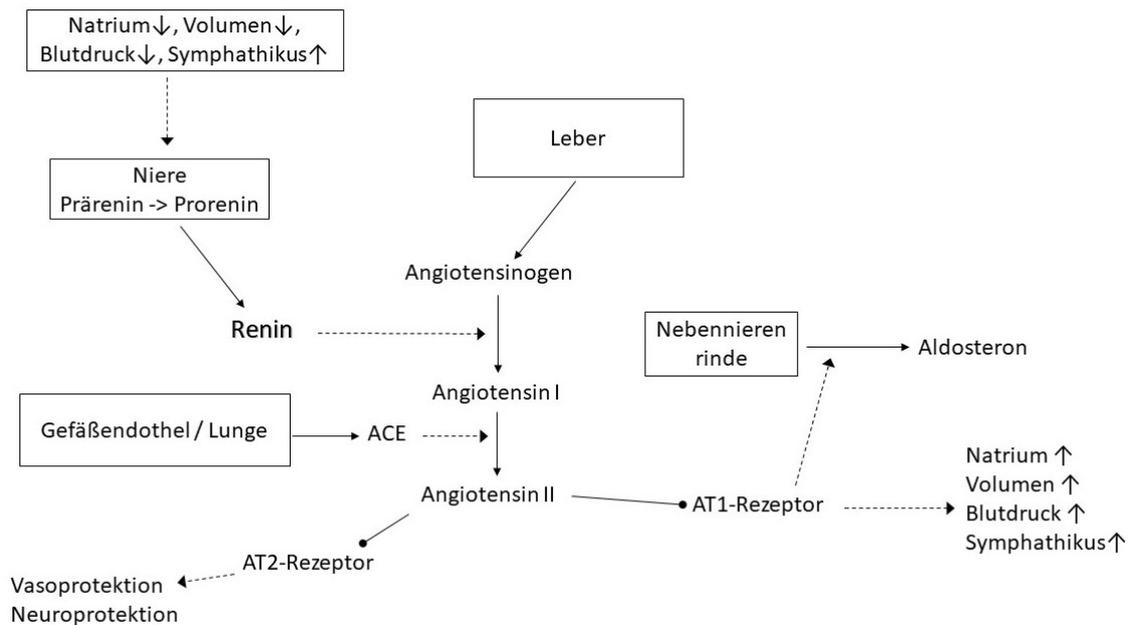


Abb. 1: Schematische Darstellung: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Eigene Darstellung

Renin wird als Präprorenin in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen synthetisiert und als Prorenin freigesetzt oder als Renin-Granula gespeichert und kontrolliert freigesetzt (27). Angiotensinogen wird in der Leber synthetisiert und in großen Mengen freigesetzt. Stimulanzen der Reninfreisetzung sind niedriger arterieller Blutdruck, Hypovolämie, Natriummangel und gesteigerter Sympathikotonus. Das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) wird im Kreislauf aus Angiotensinogen mithilfe von Renin konvertiert. Ang I wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) aus den Endothelzellen in das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) umgewandelt.

Der Ang-II-Rezeptor Typ 1 (AT1) gehört als bedeutendster Ang-II-Rezeptor zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Membrandomänen und wird in VSMC, Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und in vielen Organen (Herz, Gehirn, Niere, Nebenniere) exprimiert. Die AT1-Rezeptoren sind an eine Vielzahl von intrazellulären Signalmolekülen gekoppelt, die an Phosphorylierungskaskaden beteiligt sind (28). Je nach Zelltyp bewirkt der Rezeptor eine spezifische Funktion, z. B. eine Kontraktion, Hypertrophie, Proliferation oder Apoptose (29).

Über den Ang-II-Rezeptor Typ-2 (AT2) entfaltet Ang II eine auf den Vasotonus eher gegenregulierende Wirkung, jedoch ist die Rolle des Rezeptors im Gesamtbild bisher weniger relevant (27). Beispielsweise führt eine AT2-Aktivierung NO-/cGMP-abhängig zu einer Vasodilatation sowie Natriurese. Zusätzlich führen AT2-Agonisten zu einer Aktivierung der Bradykinin-NO-cGMP-Kaskade und dementsprechend zu einem vasodilatatorischen Effekt (30, 31). Diese gegenregulierende vasoprotektive Wirkung wird

teilweise infrage gestellt (32). So ist eine AT2-Überexpression mit ventrikulärer Hypertrophie in Ratten sowie dilatativen Kardiomyopathien in Mäusen assoziiert (33, 34). Dem AT2 wird eine kardioprotektive sowie neuroregenerative Rolle zugeschrieben (35). Tatsächlich führt eine chronische Behandlung von ApoE(-/-)-Mäusen mit dem AT2-Agonisten CGP42112 unter fettreicher Ernährung zu einer Erhöhung der aortalen Vasorelaxation sowie Reduktion und Stabilisierung der atherosklerotischen Plaques (36).

Angiotensin II führt über den AT1 zu Vasokonstriktion, Natriumretention, Stimulation von Wasser und Salzaufnahme, Sympathikusaktivierung und Freigabe von Aldosteron aus der Nebennierenrinde (27). Die renale Wirkung des Aldosterons spielt eine große Rolle bei der Regulation des Natrium-Kalium-Haushaltes und des Blutdrucks (37). Der Signalweg ACE/Ang II/AT1 ist bereits gut im Rahmen der Hypertonieforschung erklärt worden. Viele Studien haben gezeigt, dass die Gabe von ACE-Hemmer und AT1-Blocker den Blutdruck in mehreren Tiermodellen sowie bei Menschen senkt (38).

Zudem hat Ang II eine große Wirkung auf die Entwicklung und Progredienz der endothelialen Dysfunktion. So verstärkt die durch chronische Ang-II-Behandlung induzierte Hypertonie die Entwicklung von Atherosklerose in ApoE(-/-)-Mäusen (39). Experimente in Tiermodelle zeigten bereits, dass Ang II die proinflammatorische Reaktion auf die Gefäße durch die Expression von Zytokinen und Chemokinen steigert (40). Zusätzlich führt die Aktivierung des AT1 zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Gefäßen (41). Als Beispiel ist die Aktivierung der Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-[Phosphate-]Oxidase (NAD[P]H-Oxidase) in Kulturen glatter Muskelzellen genannt (42). Über diese oxidative Wirkung wird die Endothelschädigung beschleunigt und die Endothelregeneration gehemmt, wodurch der Gefäßumbauprozess negativ beeinflusst wird (29, 43).

1.5 Angiotensin (1–7) und der Mas-Rezeptor

Das Heptapeptid Angiotensin (1–7) (Ang-(1–7)) ist ein weiterer RAAS-Vertreter, das durch Abspaltung von Phenylalanin aus Ang II mithilfe von der membrangebundenen Carboxypeptidase ACE2 entsteht (44). Ang-(1–7) wurde bereits 1988 als ein weiterer Angiotensinmetabolit beschrieben. So wurde es als Erstes im Hirnstamm von Hunden isoliert (45). Im selben Jahr ist bekannt geworden, dass Ang-(1–7) das antidiuretische Hormon (Vasopressin) im Ratten-Hypothalamus mit einer dem Ang II gleichwertigen Wirkungsstärke freisetzt (46).

Inzwischen sind weitere Entstehungswege des Ang-(1–7) innerhalb vom RAAS bekannt. Diese können teilweise Ang-II- und/oder ACE2-unabhängig ablaufen. Dabei spielen verschiedene Oligopeptidasen und Endopeptidasen eine zentrale Rolle (47–49) (Abb. 2).

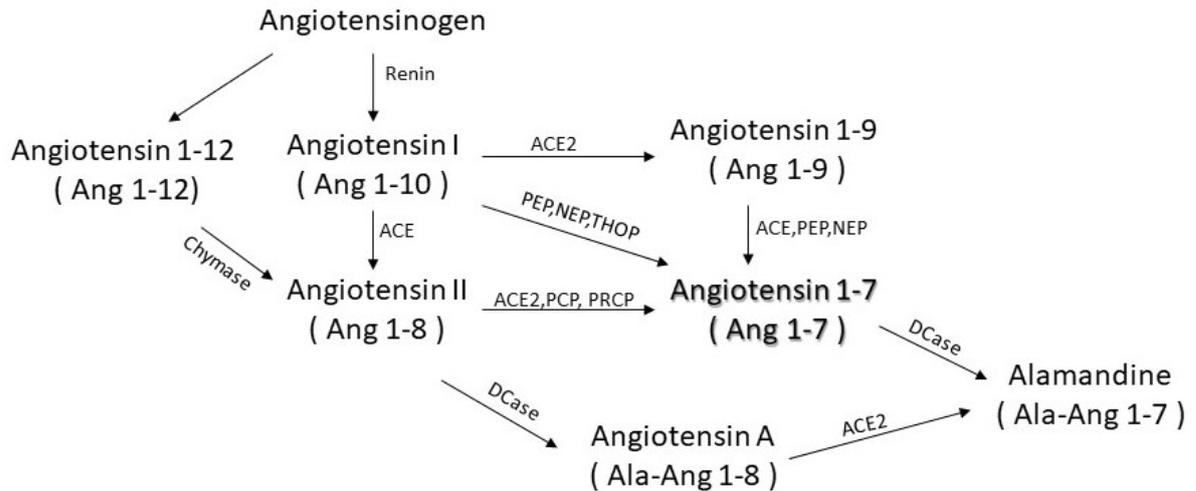


Abb. 2: Schematische Darstellung: Entstehungswege von Ang-(1–7)

ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym; ACE2: Angiotensin-konvertierendes Enzym 2; PRCP: Prolylcarboxypeptidase; PCP: Prolylcarboxyendopeptidase; NEP: Neutral Endopeptidase; PEP: Prolylendopeptidase; DCase: Decarboxylase; THOP: Thimet-Oligopeptidase. Angelehnt an Santos et al. 2018 (50).

Im Jahr 2003 wurde Ang-(1–7) als Ligand des Mas-Rezeptors, ein durch das Mas-Protoonkogen kodierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor, hervorgehoben (51). Das Mas-Protoonkogen wurde bereits 1986 sequenziert und sein Produkt als ein stark hydrophobes Protein aus 234 Aminosäuren mit insgesamt 7 transmembranären Domänen beschrieben (52).

Wird die Auswirkung von Ang-(1–7) über den Mas-Rezeptor durch *in-vitro*-/*in-vivo*-Versuche an Tiermodellen betrachtet, so erweist er sich als Gegenspieler zu Ang II.

Mas(-/-)-Mäuse weisen eine verstärkte kardiale Fibrose und Herzinsuffizienz, eine endotheliale Dysfunktion mit erhöhtem Blutdruck als Ausdruck von oxidativem Stress, eine Verschlechterung der Nierenfunktion mit glomerulärer Hyperfiltration, und fibrotischer Nephropathie auf (53, 54). Sie zeigen auch Zeichen des metabolischen Syndroms wie Dyslipidämie, erhöhte Glukosespiegel im Blutplasma, Insulinintoleranz und viszerale Adipositas (55, 56). Bei ApoE(-/-)-Mäusen wurde die Progression der Atherogenese durch eine Behandlung mit dem Mas-Rezeptor-Agonisten AVE 0991 nachweislich reduziert (57).

Unsere Arbeitsgruppe wiederum konnte demonstrieren, dass eine chronische Ang-(1–7) von ApoE(-/-) Mäuse zu einer Reduktion der Ang II induzierten renalen Druckantwort, und somit zu Verbesserung der endothelialen Dysfunktion führen kann (58).

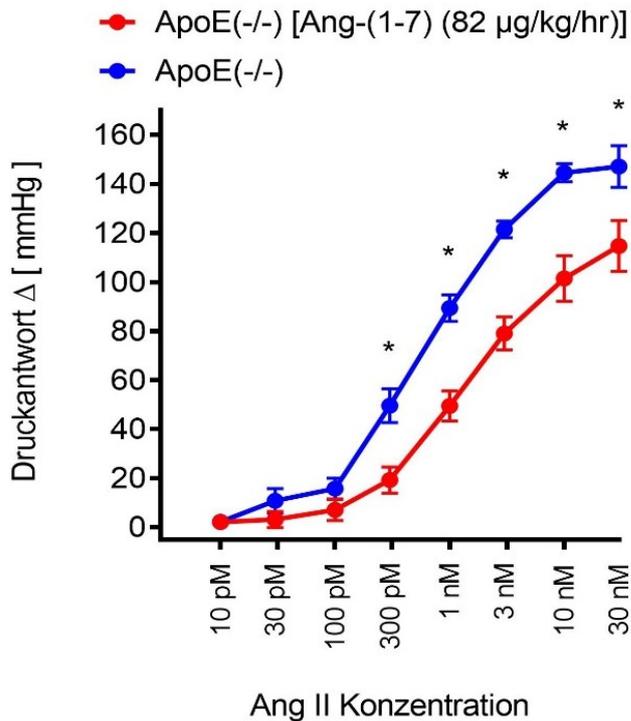


Abb. 3 Ang-II-Dosis-Wirkungskurven bei ApoE(-/-)-Mäusen in Abhängigkeit von chronischer Ang-(1-7) Behandlung.

Ang-II-Dosis-Wirkung-Kurve für mit Ang-(1-7) behandelte ApoE(-/-)-Mäuse: Eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung normalisiert die renale Druckantwort auf Ang II in ApoE(-/-)-Mäusen. ApoE(-/-) (n=14); ApoE(-/-) + Ang-(1-7) [82 µg/kg/h] (n=5). Ang II wurde alle 4 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert ± SD. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen ApoE(-/-) und ApoE(-/-) + Ang-(1-7) (*Two-way ANOVA* mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt, $P < 0,05$). Quelle: aus der medizinischen Doktorarbeit von Tilmann Clasen (59)

Ähnliche Beobachtungen wurden an transgenen Ratten mit Ang-(1-7)-Überexpression gemacht, die eine kardiovaskulär protektive Wirkung des Ang-(1-7) zeigten (60-62).

Bei diesem protektiven Effekt scheint wiederum ACE2 eine entscheidende Rolle zu haben. An ACE2-KO-Mäusen konnte bereits eine erhöhte Atherogenese mit verstärkter Reaktion auf proinflammatorische Stimuli gezeigt werden. Aus ACE2-KO-Mäusen isolierte Knochenmarksmakrophagen zeigten im Vergleich zu aus Wildtyp-Mäusen isolierten Makrophagen eine erhöhte proinflammatorische Reaktion auf Lipopolysaccharid und Ang II auf. Endothelzellen, die aus ACE2-KO-Mäusen isoliert wurden, zeigten auch eine erhöhte basale Aktivierung und eine erhöhte Entzündungsreaktion auf TNF- α (63).

Es wurde bereits viel über die intrazelluläre Ang-(1-7)-induzierte Signalvermittlung geforscht. Über eine gesteigerte NO-Freisetzung führt Ang-(1-7) zu einer Vasorelaxation. Diese NO-Synthese reguliert über eine Ang-(1-7)-Mas-PI3k/Akt-eNOS-Kaskade die Endothelfunktion. (64). Außerdem senkt Ang-(1-7) über den PI3k-Akt-GSK-3 β -Signalweg

die Insulinresistenz sowie die Hyperglykämie. Dieser Effekt wurde durch die chronische Ang-(1–7)-Behandlung von hyperglykämisch ernährten Ratten gezeigt (65). Der Ang-II-induzierten ROS-Expression in humanen Endothelzellen entgegnet Ang-(1–7), indem die Tyrosinkinase SHP-2 phosphoryliert wird. Diese wiederum interagiert mit der durch Ang II-aktivierten Tyrosinkinase c-Src und reduziert die basale Aktivität der NAD[P]H-Oxidase inhibiert (66). Zudem inhibiert Ang-(1–7) die mitogenaktivierte Proteinkinase(MAPK)-Signalkaskade in vielen Zellen, z. B. in Endothelzellen, VSMC und Kardiomyozyten (67, 68). Letztlich reduziert Ang-(1–7) einige inflammatorische Signale wie TGF- β /NF κ B sowie proinflammatorische Moleküle wie TNF- α , MCP-1, IL-8, IL-1 β und COX-2 (50).

Neben dem Mas-Rezeptor werden weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Wirkungsort für Ang-(1–7) postuliert. So wurde die durch Ang-(1–7)-Infusion verursachte Hypotension an anästhesierten Ratten durch den Bradykinin-Typ-2-Rezeptor-Antagonist Icatibant aufgehoben (69). Auch wird eine Ang-(1–7)-Wirkung über den AT₂ diskutiert, die eher auf einer Heterodimerization zwischen dem AT₂ und dem Mas-Rezeptor beruhen kann (70). Außerdem wird aktuell zunehmend eine Kolokalisation sowie eine gegenseitige Abhängigkeit der Rezeptoren nachgewiesen (71, 72).

In den letzten zwei Dekaden wurden weitere RAAS-Mitglieder entdeckt, deren Synthese mittels etlicher Peptidasen katalysiert wurde: Ang-(2–8) (Ang III), Ang-(3–8) (Ang IV), Ang A, Ang-(1–9), Ang-(1–12) (50). Ein neuerer Vertreter ist Ala¹-Ang-(1–7) (Alamandine) mit seinem eigenen Rezeptor, dem *Mas-related-G-Protein-Coupled-Receptor Type D* (MrgD), der eine Blutdruckreduktion sowohl in hypertensiven Ratten als auch in Mas(-/-)-Mäusen bewirkt (73). Neuerdings wird MrgD als Rezeptor für Ang-(1–7) akzeptiert. Eine akute Perfusion von Ang-(1–7) führt normalerweise zu einer Blutdrucksenkung in Wildtyp-Mäusen. Diese konnte an MrgD-KO-Mäusen nicht beobachtet werden (74).

Die Rolle des Mas-Rezeptors bei der Vermittlung der Ang-(1–7)-vermittelten vasoprotektiven Effekte war einer der Hauptaspekte dieser Arbeit und soll näher erklärt werden.

1.6 p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen

Die Ang-II-vermittelte Vasokonstriktion wird unter anderem über die Phosphorylierung von p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38-MAPK) gesteuert (75). Es ist bereits gezeigt worden, dass Ang-(1–7) die Ang-II-vermittelte Aktivierung der p38-Signalkaskade reduzieren kann, wie zuvor an Zellen des proximalen Tubulus sowie an vaskulären glatten Muskelzellen demonstriert worden war (76, 77). Die p38-MAPK sind eine der drei Hauptgruppen der MAPK.

Letztere sind eine Gruppe von über 20 bisher bekannten intrazellulären Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen, die in allen Eukaryoten nachgewiesen werden können (78,

79). Sie sind an der Lenkung zellulärer Reaktionen auf eine Vielzahl von Stimuli beteiligt, wie Mitogene, osmotischer Stress, Hitzeschock und proinflammatorische Zytokine. Außerdem regulieren sie Zellfunktionen, einschließlich Proliferation, Genexpression, Differenzierung, Mitose, Zellüberleben und Apoptose. Die Aktivierung der MAPK folgt durch einen dreifachen Kaskadenweg. Ein Stimulus aktiviert die MAP-Kinase-Kinase-Kinase, die wiederum die MAP-Kinase-Kinase aktiviert, die anschließend die MAP-Kinase aktiviert (80). Enzymatische Phosphorylierungen gelten als Voraussetzung dieser Kaskaden (81).

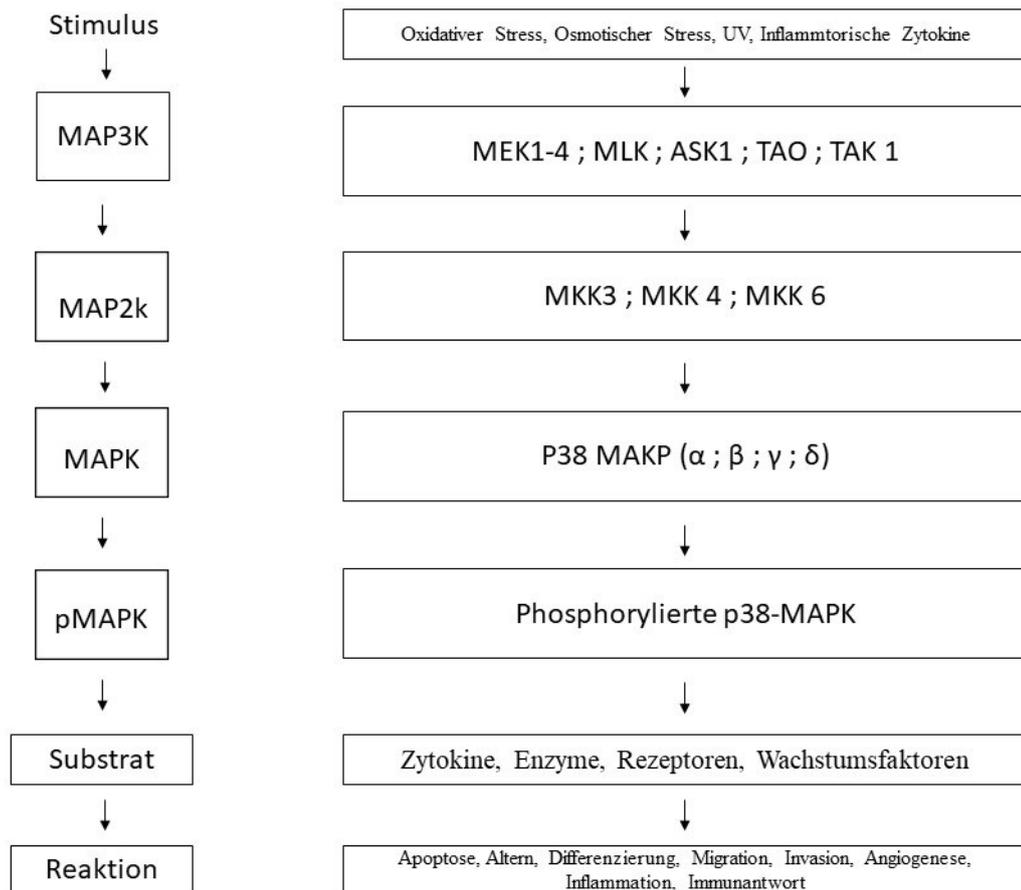


Abb. 4: Schematische Darstellung: p38-Signalkaskade

Die Gruppe der p38-MAPK besteht aus bisher vier bekannten Unterformen (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ) (82). Die Variante p38 α wurde zunächst als Tyrosin-Phosphoprotein in Extrakten von Zellen isoliert, die zuvor mit entzündlichen Zytokinen behandelt worden waren (83). Die p38-Aktivierung erfolgt durch die duale Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin auf der Aktivierungsschleife, die sich auf der Kinase-Subdomäne VIII befindet (83, 84). Die p38-Signalkaskade wird auch die Stress-aktivierte MAPK-Kaskade genannt, da sie von inflammatorischen Noxen (intrazellulär und extrazellulär) aktiviert wird (82). Reaktive Sauerstoffspezies und der oxidative Stress spielen dabei ebenfalls eine Rolle (83, 84). Die *Mitogen-activated protein kinase* 3 (MKK3) und 6 (MKK6) aktivieren selektiv die

p38-MAPK (85), die wiederum über etliche teils zellspezifische MKKK aktiviert werden. Außerdem sind bereits MKK-unabhängige Aktivierungswege beschrieben, z. B. mittels *AMP-activated Protein-Kinase*, wie zuvor an ischämischen MKK3-KO-Mäuseherzen gezeigt worden war (86), oder T-Zell-Rezeptor-vermittelt (87).

Die aktivierte p38-Kaskade hat eine vielfältige intra-/interzelluläre Wirkung auf Zellzyklus, Apoptose, Altern, Differenzierung, Migration, Invasion, Angiogenese, Inflammation und Immunantwort (82). Hierfür hat sie über 100 bekannte Substrate in verschiedenen Organen, darunter Transkriptionsfaktoren, Regulatorproteine, Nukleinsäure-Bindungsproteine, Kinasen sowie Strukturproteine, die u. a. als Zytokine, Enzyme, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren funktionieren (88).

Durch den oxidativen Stress erfahren vaskuläre glatte Muskelzellen eine Hypertrophie. Diese gesteigerte Zellaktivität ist ein Marker kardiovaskulärer Erkrankungen als Folge der Atherosklerose und der damit verbundenen arteriellen Hypertonie. Dieser Effekt wird über die p38-Signalkaskade durch Ang II am AT1 vermittelt (89).

Die Wirkung der p38-Signalkaskade auf die systemische und insbesondere renale Hämodynamik wurde bereits untersucht. Bei Ratten zeigte sich unter p38-Inhibition eine gesteigerte acetylcholinvermittelte Vasorelaxation an den renalen Widerstandsgefäßen (90). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Hemmung von p38-MAPK durch Antioxidantien den Ang-II-induzierten Sauerstoffverbrauch und die ROS-Bildung in VSMC reduziert (91). Einige Inhibitoren sind bereits bekannt. p38 α wird besonders wirksam durch das Pyridinimidazol (SB 203580) kompetitiv inhibiert (92). Dabei senkte SB203580 die Ang-II-induzierte p38-MAPK-Phosphorylierung in VSMC (93).

Eine Vorarbeit unserer Forschungsgruppe konnte bereits nachweisen, dass die p38-MAPK im Nierenkortex von ApoE(-/-)-Mäusen gegen Wildtyp-Mäuse verstärkt aktiviert ist, und dass eine Ang-(1-7)-Behandlung die p38-MAPK-Aktivität reduziert. Es wurde außerdem demonstriert, dass eine p38-Hemmung zu einer Normalisierung der erhöhten Vasoreaktivität in ApoE (-/-)-Mäusen führt. Dies lässt den Schluss zu, dass aktivierte p38-MAPK die erhöhte Gefäßreaktivität in renalen Widerstandsgefäßen unterhält und Ang-(1-7) den vasoprotektiven Effekt über eine Verminderung der p38-MAPK-Aktivität bewirkt (59).

In neueren Untersuchungen an atherosklerotischen Plaques in ApoE(-/-)-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Ang II über einen AT1/ROS/p38-Signalweg die Entstehung von Atherosklerose induziert. Dieser Effekt wurde durch AT1-Antagonisten und Antioxidantien vermindert(94). Die Interaktion von RAAS, insbesondere Ang-(1-7) und der p38-Signalkaskade ist ein spannender Gegenstand aktueller Forschung.

1.7 Ziele der Arbeit

In einer vorherigen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verstärkte Ang-II-induzierte Druckantwort in den Nierengefäßen von ApoE(-/-)-Mäuse mit einer Aktivierung der p38-Signalkaskade verläuft. Die chronische Behandlung dieser Tiere mit Ang-(1-7) (82 µg/kg/h) mittels einer subkutan implantierten osmotischen Pumpe über sechs Wochen schwächt die Ang-II-induzierte Druckantwort ab(59).

Aufbauend darauf soll in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit Ang-(1-7) über den Mas-Rezeptor die Aktivierung der p38-Signalkaskade reguliert. Für die Fragestellung wurde eine Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Maus gezüchtet und die renale Druckantwort unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Durch eine fettreiche Ernährung mittels *Western Diet* soll die Dyslipidämie in den Vergleichsgruppen gestärkt werden. Die renale Druckantwort wird *ex vivo* im Modell der isoliert perfundierten Niere untersucht. Durch den Vergleich von Mas(-/-)/ApoE(-/-)- und Wildtyp-Mausmodellen aus aktuellen und vorherigen Arbeiten werden folgende Fragen beantwortet:

- Wie ist der Einfluss einer chronischen Ang-(1-7)-Behandlung auf den systolischen Blutdruck, den Plasmalipidspiegel, die renale Druckantwort *ex vivo*, die Genexpression von AT1, AT2, Mas, ACE2 im Nierenparenchym sowie messbare Marker des oxidativen Stresses im Urin der verschiedenen Tiermodelle?
- Wie wirkt die Abwesenheit des Mas-Rezeptors auf die renale Druckantwort unter p38-Inhibition und wie auf die p38-Phosphorylierung im Nierenparenchym?
- Welchen Effekt hat eine eNOS-Inhibition auf die reduzierte renale Druckantwort unter p38-Inhibition? Wie ist dieser Effekt unter Mas-Rezeptor-Defizienz?

2 Methoden und Material

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Tierstämme und Herkunft

Es wurden verschiedene Stämme verwendet. Alle Mäuse haben einen C57BL6-Hintergrund. Als Kontrollgruppe dienen Wildtyp-Mäuse. Außerdem waren mehrere Knock-out-Stämme notwendig. Im Einzelnen wurden verwendet:

- Wildtyp, WT (Harlan, Holland)

- ApoE(-/-), interne Tierstammnummer 1043 (gezüchtet in der Tierversuchsanlage, Düsseldorf)

- Mas(-/-), interne Tierstammnummer 1344 (zur Verfügung gestellt von Prof. Michael Bader, MDC Berlin)

- Mas(-/-)/ApoE(-/-), interne Tierstammnummer 1346 (gezüchtet in der Tierversuchsanlage, Düsseldorf)

2.1.2 Material für Tierbehandlung

- Tierkäfige: Typ III Makrolon-Polycarbonat (Bioscape, Castrop-Rauxel, Deutschland)
- Metabolische Käfige (Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland)
- Osmotische Minipumpe: Model 1004 (Alzet, Cupertino, USA)
- Ang-(1–7) (Bachem, Bubendorf, Schweiz)
- Western Diet (Sniff, Soest, Deutschland)
- Blutdruckmessgerät: BP-98A (Softron, Tokyo, Japan)

2.1.3 Material für Tiernarkose

- Xylazin 2 %[®] 20 mg/ml (AniMedica, Frankfurt, Deutschland)
- Ketavet[®] 100 mg/ml (Pfizer, Berlin, Deutschland)
- NaCl 0,9 % (Braun, Melsungen, Deutschland)

2.1.4 Voraussetzungen und Versuchsbedingungen

Die Versuche wurden mit der Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2023.A250 durchgeführt. Die Versuchsgenehmigung für die Teilnahme des Autors wurde per Sondergenehmigungsantrag erteilt. Ebenso absolvierte der Autor dieses Promotionsvorhabens den versuchstierkundlichen Kurs für Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises. Die Projekte wurden bei der Tierversuchsanlage mit der Projektnummer G250/12 für chronische Behandlungsmethoden eingetragen.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Versuchsmethoden inkl. Materialbeschaffung wurden anhand von standardisierten Protokollen der Arbeitsgruppe für experimentelle Nephrologie der Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte nach den Richtlinien der Tierversuchsanlage in Düsseldorf, in dazu verwendeten Käfigen unter Einhaltung eines zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. In den Räumlichkeiten herrschte eine konstante Temperatur von ca. 21 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 45 %. Die Mäuse erhielten alle Wasser und wurden je nach Versuchsgruppe entweder mit Standardfutter der Tierversuchsanlage oder mit einem speziellen Nahrungsmittel ernährt. Bei diesem handelte es sich um Western Diet (42 % Fett, 0,15 % Cholesterin). Je nach Intervention wurden subkutan osmotische Pumpen implantiert (Alzet, CA, U.S.A.). Diese waren wie geplant entweder mit Ang-(1–7) oder nur mit NaCl 0,9 % befüllt.

2.1.5 Versuchsreihen

Der Versuchsaufbau umfasste Tiere im Alter von 6 Wochen, die über einen Zeitraum von insgesamt 12 Wochen mit dem lipidreichen *Western Diet* gefüttert wurden. Anschließend wurden die Tiere über einen Zeitraum von insgesamt 6 Wochen entweder mit subkutanen osmotischen Ang-(1–7)-Pumpen oder mit kochsalzhaltigen Minipumpen versorgt. Urinproben und Blutdruckmessungen wurden durchgeführt. Im Alter von 18 Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Dabei wurden Blutproben entnommen. Die Nieren wurden entweder für akute Perfusionen oder für Protein- und RNA-Isolierungen entnommen.

Folgende Tierstämme wurden verwendet:

1. Wildtyp
2. ApoE(-/-)
3. Mas(-/-)/ApoE(-/-)
4. Mas(-/-) – hier erfolgte keine Implantation von osmotischen Minipumpen.

Folgende Nierenperfuisionsversuche wurden im Einzelnen durchgeführt:

- Isoliert perfundierte Niere mit Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) und SB203580-Inhibitionsversuch (spezifischer p38-Inhibitor) für alle Mäusestämme
- Isolierte perfundierte Niere mit Ang-II-DWK und akuter Ang-(1–7)-Gabe in steigender Konzentration für ApoE(-/-) und Mas(-/-)/ApoE(-/-)
- Isolierte perfundierte Niere, vorbehandelt mit L-Arginine Methyl Ester (L-NAME, NO-Synthase-Inhibitor), anschließend Ang-II-DWK mit SB203580-Inhibitionsversuch für ApoE(-/-) und Mas(-/-)/ApoE(-/-)

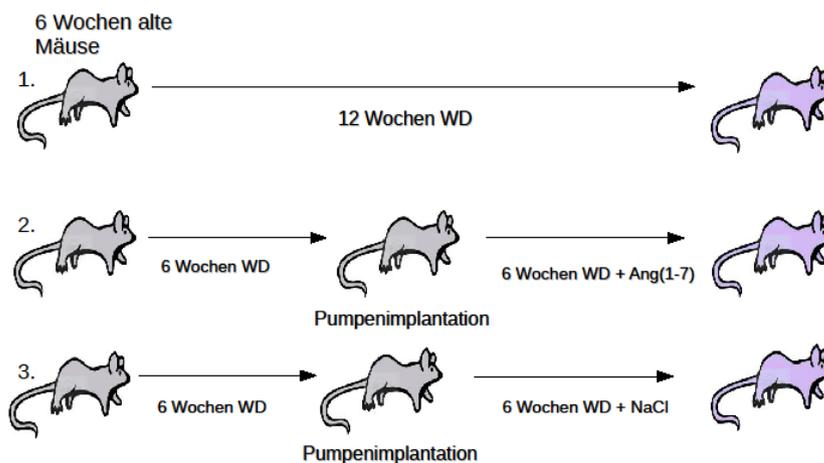


Abb. 5: Behandlungsskizze der verschiedenen Mäusegruppen

Alle Mäuse sind zu Beginn 6 Wochen alt. Im Alter von 18 Wochen erfolgt die Organentnahme oder der Perfusionsversuch 1.: Alle vier Mäusestämme werden 12 Wochen mit *Western Diet* (WD) ernährt; 2.: Wildtyp, ApoE(-/-), Mas(-/-)/ApoE(-/-) erhalten für 6 Wochen Western Diet und für weitere 6 Wochen Western Diet und Ang-(1–7) über osmotische Minipumpe; 3.: Wildtyp, ApoE(-/-), Mas(-/-)/ApoE(-/-) erhalten für 6 Wochen Western Diet und für weitere 6 Wochen Western Diet und Kochsalzlösung über osmotische Minipumpen.

2.1.6 Vorbereitung der osmotischen Pumpe

Als subkutane Applikationsform von Ang-(1–7) oder NaCl wurden osmotische Minipumpen (Alzet, USA; Model 1004) verwendet. Diese haben eine Gesamtkapazität von 100 µl und gewährleisten eine konzentrationsstabile Applikation von 82 µg/kg/h über eine Gesamtzeit von 4 Wochen. Die Minipumpen wurden am Vortag der Implantation gewichtsadaptiert mit Ang-(1–7) oder Kochsalzlösung befüllt. Da die Tiere für eine Gesamtzeit von 6 Wochen mit einer funktionstüchtigen Pumpe gehalten wurden, mussten die Pumpen nach 3 Wochen ersetzt werden, um die Applikationsrate aufrechtzuerhalten. Dies galt auch für Kontrolltiere, die mit kochsalzhaltigen Minipumpen versorgt wurden.

2.1.7 Implantation der osmotischen Pumpe

Die Implantation aller Pumpen erfolgte im Operationsbereich der Tierversuchsanlage nach dem gleichen Protokoll. Nach einer intraperitonealen Anästhesie mit Xylazin (5 mg/kg) und Ketamin (100 mg/kg) wurde der Rücken des Tiers mit Isopropanol 70 % desinfiziert und befeuchtet. Danach wurde unter sterilen Bedingungen ein ca. 7 mm langer horizontaler Schnitt distal der Nackenregion gesetzt. Dann wurde mithilfe einer sterilen Pinzette ein ca. 3 bis 4 cm langer subkutaner Kanal am seitlichen Bereich des Rückens nach kaudal stumpf präpariert. Der Kanal diente als eine Höhle zum Schutz der osmotischen Pumpe. Diese wurde anschließend durch den Schnitt in die präparierte Höhle hineingeschoben. Dann wurde der Schnitt mit einer kontinuierlichen intrakutanen Naht verschlossen und das Tier wurde im Anschluss auf einer Wärmeplatte bis zum Aufwachen beobachtet. An den darauffolgenden Tagen wurden die Mäuse hinsichtlich der Wundsituation und der Position der Pumpe kontrolliert, um perioperative Komplikationen auszuschließen.

2.1.8 Nichtinvasive systolische Blutdruckmessungen

Die Blutdruckmessung erfolgte durch eine nichtinvasive *Tail-Cuff*-Sphygmomanometrie mithilfe eines BP-98A (Softron, Japan). Dabei wird das Tier in die Herstellertasche eingewickelt, die anschließend in einem Thermorohr positioniert wird, um die Körperwärme der Maus zu erhalten. Die Blutdruckmessung funktioniert oszillatorisch, indem sie durch die entstehende Pulsationsamplitude abgeschätzt wird. Die Manschette am Schwanz wird automatisch mit Luft aufgepumpt, sodass der Blutfluss eingestellt wird. Das Gerät kann bei Entlastung die Pulsationsamplituden oszillatorisch messen und daraus den systolischen und den diastolischen Blutdruckwert abschätzen. Bei der wachen versuchsgewohnten Maus beträgt die physiologische Herzfrequenz 400 bis 500 Schläge pro Minute. Diese wird am Bildschirm angezeigt und gilt als Voraussetzung für eine adäquate Messung. Um die Tiere an diesen Messversuch zu gewöhnen und Artefakte durch Bewegungen aufgrund der zugefügten Stresssituation zu vermeiden, wurden Blutdruckmessungen an vier aufeinanderfolgenden Tagen erprobt. Diese Ergebnisse wurden verworfen. Danach wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen die Blutdruckmessungen durchgeführt. Dabei wurde die Blutdruckmessung zehnmal pro

Sitzung gemessen und dokumentiert. Für die Auswertung wurde der systolische Durchschnittswert aller Messungen einschließlich Standardabweichung verwendet.

2.1.9 Quantifizierung der Konzentration von 8-Isoprostan, Nitrat und Kreatinin im Urin

Die Isoprostane sind prostaglandinähnliche Verbindungen, die durch Oxidationsreaktion essenzieller Fettsäuren, vorrangig Arachidonsäure, aus Membranphospholipiden gebildet werden. Da diese Oxidation durch freie Sauerstoffradikale und nicht durch Enzyme katalysiert wird, werden die Isoprostane auch nichtklassische Eicosanoide genannt. Diese Verbindungen gelten als Marker für den oxidativen Stress in Tier- und menschlichen Modellen und besitzen zudem biologische Aktivität als Entzündungsmediatoren (95).

Die Tiere wurden hierfür in metabolische Käfige (Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg) gesetzt und anschließend wurde über eine Gesamtdauer von 12 Stunden Urin gesammelt. Während dieser Zeit wurden die Tiere mit Wasser und Nahrung versorgt. Der Urin wurde in Trichtern gesammelt und seine Gesamtmenge (in μl) ermittelt. Anschließend wurde der Urin für 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert und in mehreren Portionen aliquotiert. Eine Portion aus 100 μl und eine aus 150 μl wurden an das Zentrallabor der Universitätsklinik Düsseldorf verschickt, um jeweils die Konzentration von Nitrat und Kreatinin zu ermitteln. Zu einer Portion aus 99,5 μl wurde eine Mischung aus 0,5 μl Butylhydroxytoluol und Ethanol (1:50) gegeben. Kolorimetrisch (Cayman Chemical Company) wurde dann die 8-Isoprostan-Konzentration gemessen und in einem Quotienten zu Kreatinin berechnet.

2.1.10 Blutentnahme

Während der Präparation der Maus unter Narkose zum Zweck der Organentnahme für weitere Versuche wurde mit einer Kanüle Blut aus der unteren Hohlvene entnommen und in Eppendorf-Tuben gegeben. Das Blut wurde mit Heparin antikoaguliert und dann für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Anschließend wurde Blutplasma isoliert, beschriftet und an das Zentrallabor der Universitätsklinik Düsseldorf versendet, um die Konzentration von Gesamtcholesterin und Triglyzeriden zu bestimmen.

2.2 Isoliert perfundierte Nieren

2.2.1 Material

2.2.1.1 Technische Geräte und Werkzeuge

- Datenerfassungs- und Analysesystem: Powerlab (AD Instruments, Sydney, Australien)
- Anatomische Pinzetten: fein, gebogen, 10,5 cm (KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Doppelwand-Glasbehälter (Harvard Apparatus, Holliston, USA)
- Druckaufnehmer: APT 300 (Harvard Apparatus, Holliston, USA)

- Kleine Pinzette (Aesculab AG, Tuttlingen, Deutschland)
- Software: LabChart Version 5 (AdInstrumente Europe, Oxford, UK)
- Mikroskop: Olympus CO11 (Olympus, Tokyo, Japan)
- Mini-Gefäßclip (KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Moskitoklemme: gebogen, 12,5 cm (KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Perfusor: Harvard Pump 11Plus Dual Syringe (Harvard Apparatus, Holliston, USA)
- Pinzetten: fein, gebogen, 10,5 cm (KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Peristaltikpumpe: Minipuls 2 (Gilson, Middleton, USA)
- Präparierschere (KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Pumpenschlauch (Gilson, Middleton, USA)
- Stechmembran (Gilson, Middleton, USA)
- Strabismus-Federschere: gerade, 11,5 cm (KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland)
- Wärmebad mit Pumpe: Umwälzthermostat DC10-P5/U (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.2.1.2 Hilfsmaterial

- Combifix Adapter Luer (Braun, Melsung, Deutschland)
- Fine Bore Polythene Schlauch: ID 0,28 mm AD 0,61 mm (Smiths medical, Grasbrunn, Deutschland)
- Fine Bore Polythene Schlauch: ID 0,58 mm AD 0,96 mm (Smiths medical, Grasbrunn, Deutschland)
- Injekt 10 ml / Luer Solo (Braun, Melsung, Deutschland)
- Kanülen 21 G × 1 ½" Ø 0,8 mm x 38 mm grün (Smiths medical, Grasbrunn, Deutschland)
- Kanülen 27 G x ½" Ø 0,4 × 12 mm weiß (Braun, Melsung, Deutschland)
- Kanülen Sterican 23 G × 1" Ø 6 × 25 mm blau (Braun, Melsung, Deutschland)
- Kanülen Sterican 26 G x ½" Ø 0,45 × 12 mm braun (Braun, Melsung, Deutschland)
- Karbogengas (5 % CO₂; 95 % O₂)
- Omnifix-F Tuberculin 0,01 ml – 1 ml/Luer Solo (Braun, Melsung, Deutschland)
- Polyethylenschlauch: ID 0,28 mm AD 0,61 mm (Portex, Kent, UK)
- Polyethylenschlauch: ID 0,40 mm AD 0,80 mm (Portex, Kent, UK)
- Seidenfaden: Seraflex 5/0 100 m (Serag Wiessner, Naila, Deutschland)
- Silikonschlauch: ID 1,00 mm AD 3,00 mm (VWR, Darmstadt, Deutschland)

- Silikonschlauch: ID 1,52 mm Wanddicke 0,86 mm Tygon R3607 (Liquid Scan, Überlingen, Deutschland)
- Silikonschlauch: ID 2,00 mm AD 4,00 mm (VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Sterilfilter Filtropur S 0,45 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Verbindungsstück mit Injektionsport Luer Lock (Braun, Melsung, Deutschland)

2.2.1.3 Reagenzien

- Ang II human > 93 % (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)
- Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- SB 203580 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ang-(1–7) (Bachem, Bubendorf, Schweiz)
- L-NAME (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland)

2.2.1.4 Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung

- D-Glucose Monohydrate (Fluka, St.Gallen, Schweiz), 2,175 g/l
- Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,35 g/l
- Kaliumhydrogenphosphat (J.T.Baker, Deventer, Niederlande), 0,14 g/l
- Kalziumchlorid (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland), 0,37 g/l
- L(+)-Ascorbinsäure (Riedel-deHaen, Seeize, Deutschland), 0,012 g/l
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,201 g/l
- Natriumchlorid (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 6,895 g/l
- Natriumhydrogencarbonat (J.T.Baker, Deventer, Niederlande), 2,1 g/l
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Titriplex III (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,0249 g/l

2.2.2 Aufbau der Perfusionsanlage

Eine Voraussetzung für den Perfusionsversuch ist die Wahl einer Elektrolytlösung, die einem physiologischen Puffersystem ähnelt. Als erprobte Methode gilt die Verwendung einer Krebs-Henseleit-Lösung. Um die Funktion des Bikarbonat-Puffers zu erhalten, wurde die Lösung kontinuierlich mit Karbogen (Mischung aus 95 % O₂ und 5 % CO₂) begast. Außerdem wurde sie in einer Doppelglaskammer auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde die Krebs-Henseleit-Lösung mittels einer Peristaltikpumpe mit einer fix eingestellten Geschwindigkeit (dadurch wird eine konstante Flussgeschwindigkeit von 7.2 ml/min/g sichergestellt) über ein Schlauchsystem durch einen Filter eingeführt, um letztlich die angehängte Nierenarterie und das Nierenparenchym zu perfundieren. Um den

kontinuierlichen Perfusionsdruck zu messen, wurde nach dem Filter ein Druckabnehmer zwischengeschaltet, über den im weiteren Verlauf des Versuchs ein Perfusor angeschlossen werden kann. Mit dessen Hilfe ist die Applikation von Pharmaka (z. B. Ang II) möglich.

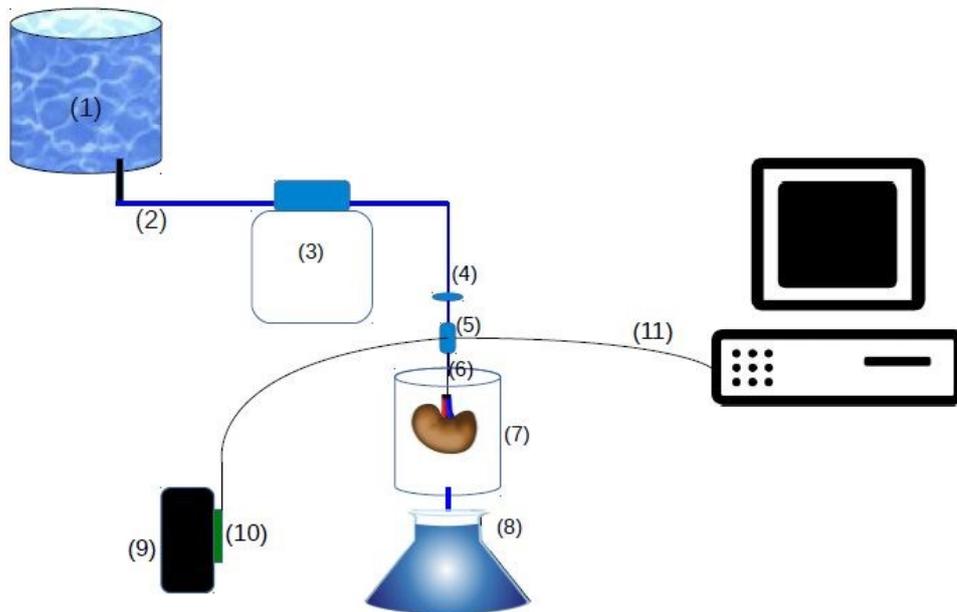


Abb. 6: Aufbau der Perfusionsanlage

(1) Doppelwandreservoir, gefüllt mit Krebs-Henseleit-Lösung; (2) Silikonschlauch; (3) Peristaltikpumpe; (4) Filter; (5) Druckaufnehmer mit Injektionsport; (6) Kanülierschlauch; (7) Doppelwandreservoir; (8) Auffangbehälter; (9) Perfusor; (10) Perfusorspritze; (11) Datenauswertungssystem mit Bildschirm

2.2.3 Organentnahme und Nierenisolierung

Grundbedingungen einer komplikationslosen Organentnahme sind unter anderem eine wirksame Anästhesie, scharfes Operationsbesteck sowie ein Lichtmikroskop mit ausreichender Beleuchtung des Operationsgebiets.

Zur Anästhesie wurden intraperitoneal Xylazin (5 mg/kg) und Ketamin (100 mg/kg) injiziert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe mittels Schmerzreaktion wurde die ventrale Rumpfoberfläche mit Isopropanol 70 % befeuchtet. Dann folgte mit einer Präparierschere ein medianer Längsschnitt durch die Linea alba. Das Fell wurde mittels stumpfer Pinzetten vom Peritoneum abgetrennt und nach lateral stumpf präpariert. Ein Entlastungsschnitt wurde auf halber Höhe der medianen Schnittstelle durchgeführt und die dabei entstandenen Lappen wurden zur besseren Sicht auf die Bauchhöhle umgeklappt und fixiert. Dann wurden die Oberbauchorgane inklusive Leber und Magen mit einem Tupfer nach lateral mobilisiert, um die Sicht auf beide Nieren und ihre Gefäße zu ermöglichen. Eine Schlinge aus Seidenfaden wurde um die Aorta abdominalis oberhalb der rechten Nierenarterie sowie unterhalb der linken Nierenarterie gelegt. Dann wurde die Aorta oberhalb der iliakalen Bifurkation geklemmt. Kranial der Klemme wurde mithilfe einer Strabismusschere in die Aorta inzidiert. Durch die Inzision wurde ein Polyethylenschlauch

eingeführt, der mit der bereits umliegenden Schlinge fixiert wurde. Dann wurden die Jugularvenen eröffnet und die Maus wurde durch eine Exartikulation im Okzipitalgelenk euthanasiert. Die Aorta wurde nun durch die epigastrische Schlinge verschlossen und die Vena cava eröffnet, um einen Abfluss zu gewährleisten. Im Anschluss wurde die Aorta abdominalis mit der Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert und durch einen unmittelbaren Farbumschlag des Gefäßes und des renalen Parenchyms auf eine adäquate Kanülierung der Aorta und Perfusion der Nieren kontrolliert.

Anschließend wurde die Aorta für eine freie Sicht auf den Abgang der renalen Gefäße vom umliegenden Fettgewebe befreit, die Nierenarterien wurden beidseits dargestellt und mit einer lockeren Ligatur aus Seidenfaden umschlungen. Die Aorta wurde gegenüber von den abgehenden Nierenarterien inzidiert und mit einem Polyethylenschlauch kanüliert. Die Ligaturen wurden beidseits zugeschnürt. Dann wurden die Nieren vom umliegenden Fettgewebe sowie der Nierenkapsel befreit, proximal der Ligatur von der Aorta getrennt und am vorbereiteten Perfusionssystem aufgehängt.

Als Kontrolle war sofort ein steiler Anstieg des Perfusionsdrucks zu beobachten, der von einer langsamen Senkung gefolgt wurde. Zunächst tropfte es sichtbar blutig aus den Nierenvenen, bis das gesamte Nierenparenchym durch die Perfusionslösung ausgewaschen worden war.

2.2.4 Perfusionsablauf der isolierten Nieren

Die Nierenperfusion wurde mit der Krebs-Henseleit-Lösung bei konstanter Flussgeschwindigkeit von 7,25ml/min/g mittels einer planetengetriebenen Perfusionspumpe aufrechterhalten. Über einen zwischengeschalteten Perfusor mit einer konstanten Flussrate von 0,158ml/min sollten dem Perfusionsversuch Pharmaka hinzugefügt werden. Zusätzlich wurde über diesen Perfusor Krebs-Henseleit-Lösung gegeben, bis der basale Perfusionsdruck nach einer Erholungsphase der Nierenarterien erreicht und ermittelt werden konnte. Alle Pharmaka wurden mit der gleichen Flussrate von 0,158ml/min gegeben. Um die Vasoreaktivität der renalen Arterien zu überprüfen, wurde 0,001 M Kaliumchlorid (KCl) über den Perfusor gegeben. Darunter kommt es zu einer Depolarisierung der renalen glatten Gefäßmuskulatur und einem steilen Anstieg des Perfusionsdrucks. Nach Erreichen des maximalen Perfusionsdrucks unter KCl wurde dessen Perfusion abgesetzt und erneut durch Krebs-Henseleit-Lösung ersetzt. Der basale Perfusionsdruck sollte nach einer kurzen Auswaschphase wieder erreicht werden. Es wurden nur Perfusionsversuche mit einem Druckanstieg unter KCl-Gabe von mindestens 60 mmHg über den basalen Perfusionsdruck in die Auswertung einbezogen.

2.2.5 Angiotensin-II-induzierte renale Druckantwort

Hierfür wurde die Niere nach der oben genannten Erholungsphase mit einem Pharmakon behandelt, der der Perfusionslösung im zuständigen Doppelkammerreservoir hinzugegeben wird. Eine der beiden Nieren wurde dabei mit einem Pharmakon, z. B.

SB203580 (5 μM) oder Ang-(1–7) (1 μM) oder L-NAME (0,3 mM), für 15 Minuten behandelt. Anschließend folgte eine Perfusionsreihe mit einer aufsteigenden Ang-II-Konzentration. Hierfür wurden beide Nieren über die externen Perfusoren mit einer Ang-II-haltigen Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Die Flussrate lag, wie bekannt, konstant bei 0,158ml/min. Sodann wurde Ang II in aufsteigender Konzentration nacheinander für ca. 4 bis 5 Minuten gegeben. Nach jeder Konzentration wurde nahtlos zur höheren gewechselt.

Folgende Konzentrationen mussten dann jeweils in durchnummerierten Plastikspritzen bereitliegen: 1. Ang II (10 pM); 2. Ang II (30 pM); 3. Ang II (100 pM); 4. Ang II (300 pM); 5. Ang II (1 nM); 6. Ang II (3 nM); 7. Ang II (10 nM); 8. Ang II (30 nM).

Konzentrationsabhängig war ein Anstieg des Perfusionsdrucks zu beobachten: die Ang-II-induzierte Druckantwort. Nach dem Abschluss der Konzentrationsreihe wurde wieder auf eine Ang-II-freie Plastikspritze gewechselt, die nur Krebs-Henseleit-Lösung enthielt und es wurde gewartet, bis sich der Perfusionsdruck wieder auf dem Ausgangsniveau stabilisiert hat. Dieser Druckwert entspricht bei erfolgreicher Ausführung dem basalen Perfusionsdruck. Durch Entfernung der Niere aus dem fixierten Polyethylenschlauch wird es ferner möglich, den Widerstand im gesamten Perfusionssystem (bestehend aus Schläuchen, Filter und zwischengeschaltetem Druckabnehmer) zu bestimmen. Dieser muss jedem basalen Perfusionsdruck vor Beginn des Behandlungsversuchs entsprechen.

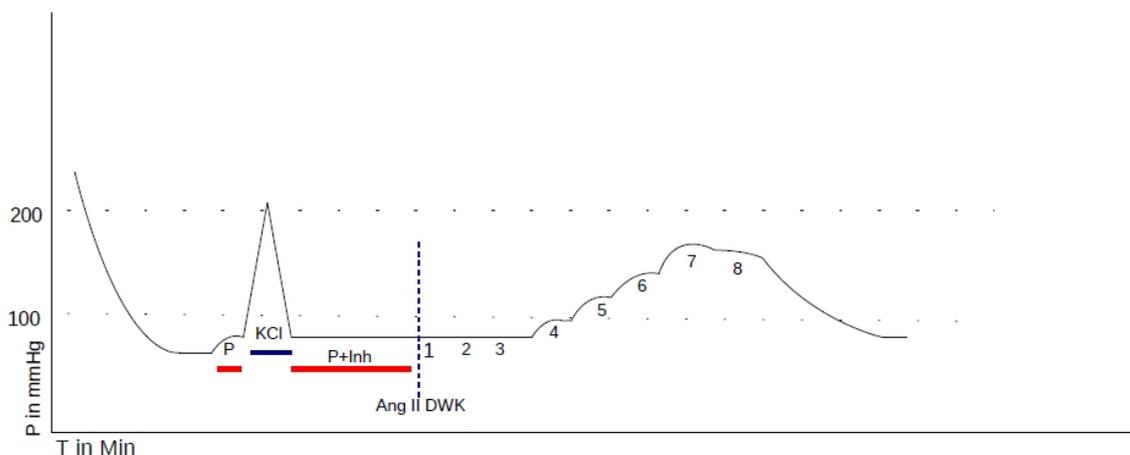


Abb. 7: Skizze einer isolierten Nierenperfusion mit Ang-II-DWK mit Gabe eines Inhibitors

P: Perfusordruck; T: Zeit in Minuten KCl: Kaliumkontraktionsversuch; P+Inh: Pharmakongabe; Ang-II-DWK 1–8: Kontraktion mit Ang II der folgenden Konzentrationen 10 pM bis 30 nM

2.2.6 Die Auswertung

Bei den Ang-II-DWK wurden jeweils die acht oben genannten Konzentrationen nach dem maximalen Anstieg der renalen Druckantwort eingelesen. Diese wurden dann jeweils vom

basalen Perfusionsdruck abgezogen. Schließlich wurde für die Druckdifferenz der gesamten Versuchsreihe der Durchschnittswert mit jeweiliger Standardabweichung ermittelt.

2.3 Proteinbiochemie – Immunoblotting: p38-MAPK und Phospho-p38-MAPK

2.3.1 Material

2.3.1.1 Antikörper

- Rabbit p38 MAP Kinase Antibody (Cell Signalling Technology, Danvers, USA), 1:750
- Rabbit Phospho-p38 MAPK (Thr10/Tyr182) Antibody (Cell Signalling Technology, Danvers, USA), 1:1300
- Donkey ECL Anti-rabbit IgG, HRP-Linked F (ab')₂ (GE Healthcare, Chicago, USA), 1:15000 für p38
- Donkey ECL Anti-rabbit IgG, HRP-Linked F (ab')₂ (GE Healthcare, Chicago, USA), 1:12000 für p-p38
- Rabbit anti-β-actin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), 1:2000

2.3.1.2 Gele und Puffer

2.3.1.2.1 Triton 1 % Lysepuffer

- Complete mini (Roche, Basel, Schweiz), 1 Tablette
- EDTA 0,5M (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,1 ml
- H₂O destilliert, 71,4 ml
- KCl 3M (Merck, Darmstadt, Deutschland), 2,5 ml
- Na₃VO₄ 1mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 500 µl
- Tris pH 7,5 1M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1 ml
- Triton X-100 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 5 ml

2.3.1.2.2 Trenngel

- Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 3 ml
- Destilliertes H₂O, 2,535
- Tris HCl 2M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,81 ml
- Tris Base 2M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2,265 ml
- Sodium dodecyl sulfate 20 % (Biomol, Hamburg, Deutschland), 0,09 ml
- Ammoniumpersulfate 10 % (Biomol, Hamburg, Deutschland), 0,09 ml

- Temed (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,015 ml

2.3.1.2.3 Sammelgel

- Ammoniumpersulfate 10 % (Biomol, Hamburg, Deutschland), 0,040 ml
- Destilliertes H₂O, 2,35045 ml
- Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,535 ml
- Sodium dodecyl sulfate 20 % (Biomol, Hamburg, Deutschland), 0,0333 ml
- Temed (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,005 ml
- Tris Base 2M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,01332 ml
- Tris HCl 2M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,40293 ml

2.3.1.2.4 Transferpuffer

- Destilliertes H₂O, 2 Liter
- Glycin (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 28,8 g
- Methanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 400 ml
- Trizma Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 6 g

2.3.1.2.5 Protein-Waschpuffer

- Natriumchlorid 5M (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 340 ml
- Tris Base 1 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 170 ml
- Tween® 20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 17 ml

2.3.1.3 Geräte

- Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Blotter: Trans-Blot®, SD (BIORAD, Hercules, USA)
- Mini-Protean® Tetra System: (BIORAD, Hercules, USA)
- Kamera: FluorChem® Western Blot Imaging (Cell Biosciences, Santa Clara, USA)
- Powersupply: PowerPac Universal (BIORAD, Hercules, USA)
- SafeSeal Reagiergefäß 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Shaker: HS 260 (IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland)
- Software: AlphaEase® FC Software (Alpha Innotech Cooperation, San Leandro, USA)
- Thermostat: Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Lettland)
- Tissue Ruptor (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Zentrifuge: Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.3.1.4 Reagenzien

- Bovines Serum Albumin 5 %, proteasefrei, pH 7,0 (Prolabo®, Radnor, USA)
- Chemilumineszenz: Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche, Basel, Schweiz)
- Nitrocellulosemembran: 0,45 µm Porengröße (Protran®, Whatman, Dassel, Deutschland)
- *Phosphate-buffered-Saline*-Lösung (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Probenpuffer: Lämmli 2× Konzentrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteinmarker: Broad Range (New England BioLabs, Ipswich, USA)

2.3.2 Organentnahme und Proteinisolierung

Zunächst erfolgte die oben beschriebene Operation zur Darstellung der Nieren. Die Perfusion der Aorta abdominalis erfolgte mit *Phosphate-buffered Saline* und nicht, wie üblich, mit Krebs-Henseleit-Lösung. Nach einem Farbumschlag des Nierenparenchyms und der Blutausschwemmung durch die renalen Venen erfolgte die Freipräparation der Nieren. Hierbei wurden sie beckennah von den Gefäßen und dem Harnleiter abgetrennt. Außerdem wurden die Nieren vom umliegenden Fettgewebe und von der Kapsel befreit und anschließend in eine sterile Petrischale gelegt. Zur Weiterverarbeitung des Parenchyms sollte diese eisgekühlt sein.

Zunächst wurden die Nierenpole mit einem sterilen Skalpell abgetrennt. Dann wurde das Nierenbecken abgetrennt und entsorgt. Ein Nierenpol wurde nun weiter in 6 gleich große Stücke geschnitten und in einem sterilen, mit 200 µl gefüllten *Tissueprotector* 2 ml Eppendorf-Safe-Lock-Tubes aufbewahrt.

Mittels *Tissue Ruptor* wurde das Gewebe zerkleinert und anschließend für 10 Minuten bei 15000g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde inzwischen abpipettiert und dem Gewebe wurde Triton-1 %-Lysispuffer hinzugefügt. Dann wurde wieder für 30 Minuten zentrifugiert und schließlich das Lysat in einen neuen sterilen Eppendorf-Behälter umgesetzt.

2.3.3 Gelelektrophorese

Für eine Analyse von Proteinmischungen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE) nach Lämmli verwendet. Das Trenngel und das Sammelgel (10 % SDS) wurden zwischen die Glasplatten gegossen. Die Probenaschen für die Probenbeladung wurden mithilfe eines Plastikkamms erstellt. Die Glasplatten wurden in vorbereitete Trennkammern eingespannt, die bereits mit dem Laufpuffer geladen waren. Zunächst wurde den Proteinmischungen *Lämmli Sample Buffer* zugegeben, woraufhin die Probenaschen mit 15 µg und die Markertasche mit 10 µl beladen wurden. Anschließend wurde die Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine Sammelphase (70 V über 30 min), in der die Proteinmischung fokussiert wurde, dann folgte

eine Trennphase (20 mA über 90 min), in der die Proteinmischungen entsprechend ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt wurden.

2.3.4 Western Blot

Der Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran wurde mithilfe von *Western Blot* durchgeführt. Hierfür wurde eine Blotkassette benötigt, bestehend aus 2 Schwämmen, 2 Filterpapieren, dem Trenngel und einer Nitrozellulosemembran. Die Kassette wurde in eine mit Transferpuffer befüllten Kammer getaucht. Das Trenngel wurde auf die Nitrozellulosemembran gelegt und diese wird in die Blotkassette zwischen 2 Filterpapiere und 2 Schwämme eingespannt. Der Blotvorgang dauerte 50 Minuten bei einer Spannung von 12 Volt. Mithilfe eines Protein-Waschpuffers (Albumin 5 %) wurden alle freien und unspezifischen Bindungsstellen auf der Blotmembran blockiert. Die Gelmembran wurde darin für 12 Stunden bei 4 °C auf einem Shaker mit 50 Hz inkubiert.

Für den Proteinnachweis wurde die Membran mit einem Primärantikörper bei 4 °C auf einem Schüttler für 12 Stunden bei 50 Hz inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit Protein-Waschpuffer auf einem Schüttler bei 80 Hz gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Dann wurde die Membran mit Antikörpern gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase oder gegen Alpha-Actin 60 Minuten lang bei 20 °C und 50 Hz auf dem Schüttler inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Zur Signalverstärkung wurde die Membran mit den Sekundärantikörpern auf dem Schüttler bei 20 °C und 50 Hz für 60 Minuten inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Zur Markierung des Sekundärantikörpers wurde Meerrettich-Peroxidase verwendet, um damit eine Chemilumineszenz-Reaktion herbeizurufen. Dafür wurde die Membran in einem abgedunkelten Raum mit der Peroxidase für eine Minute inkubiert. Mehrere Bilder wurden entwickelt. Die Belichtungszeit betrug 5 Minuten, die Blende F 1,8.

2.3.5 Auswertung

Die detektierten Proteinbanden wurden mithilfe der Software Alpha-Ease betrachtet und densitometrisch ausgewertet. Dabei wird die Proteinbande mit der GAPDH-Bande (Housekeeping Gene) der gleichen Membran auf Dichteunterschied verglichen.

2.4 Realtime quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

2.4.1 Material

2.4.1.1 Reagenzien

- SYBR Green (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 1,5 % (w/v) in Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer (TAE)

- TAE-Puffer: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA

2.4.1.2 Kits

- Rneasy-Plus-Mini-Kit für die RNA-Isolierung (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- QuantiTect-Kit für die reverse Transkription (Qiagen, Hilden, Deutschland) für

2.4.1.3 Primer

- 18S rRNA (QuantiTect Primer Assays, Qiagen, Hilden, Deutschland) Cat-N° QT00324940
- Mas: forward: TTGTGGGCAGCAGTAAGAAGA, reverse: ATGGATACAGTGTTGCCGTTG
- ACE2: forward: TCTGGGCAAACCTCTATGCTGA, reverse: TGATGGGCTGTCAAGAAGTTG
- AT2: forward: ACCTGCATGAGTGTCGATAGGT, reverse: CTGACATCCCGGAAATAAAATG
- AT1a: forward: GCTTGGTGGTGATCGTCACC, reverse: GGGCGAGATTTAGAAGAACG

2.4.1.4 Technische Geräte

- 7300 Realtime PCR-System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Elektrophoresegerät: PowerPac Universal (Bio Rad Laboratories, Hercules, USA)
- ELISA Platten Reader: Spectramax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)
- Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Potter S Tissue Homogenisator (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Tissue Ruptor (Qiagen, Hilden, Deutschland)

2.4.2 Organentnahme

Ziel der Untersuchung war die Quantifizierung der Genexpression für Ang-II-1a-Rezeptor AT2, ACE2 und Mas. Dabei wurden die Nierenrindenproben auf die relative Genexpression (mRNA) analysiert.

Parallel zur Organentnahme bei der Isolierung von Proteinen wurden kleine Fragmente des Nierenparenchyms steril in einer RNAase-Hemmer-Lösung aufbewahrt.

2.4.3 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem *RNA Micro Kit* (Qiagen, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers bei Raumtemperatur durchgeführt. Sie wird hier verkürzt dargestellt. Das Gewebe wurde gemäß Herstellerangaben denaturiert und mit *Tissue Ruptor* (Qiagen)

homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine gDNA-Säule übertragen und zentrifugiert, dann mit 600 µl Ethanol 70 % vermischt und auf eine *Rneasy* Mini-Säule übertragen. Die isolierte RNA an der Säule wurde in mehreren Zwischenschritten mit Pufferlösungen (*Rneasy* Micro Kit, Qiagen, Deutschland) gewaschen. Die Silicon-Gel-Membran wurde im Anschluss getrocknet, um die RNA von ihr abzulösen.

2.4.4 Der Weg aus der RNA in die komplementäre DNA

Mittels der reversen Transkriptase wurde aus der isolierten RNA die komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) hergestellt. Auch dieser Schritt erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (*QuantiTect*-Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) und wird daher vereinfacht dargestellt.

Für die reverse Transkription wurde jeder Probe aus 800 ng RNA 12 µl RNAase-freies Wasser und 2 µl *gDNA Wipeout Buffer* hinzugegeben. Die Probe wurde nun inkubiert (3 min bei 42 °C) und danach auf Eis abgekühlt. Der Mischung wurden 6 µl RT-Mastermix (beinhaltet 1 µl Reverse Transkriptase, 4 µl RT-Buffer und 1 µl RT-Primer-Mix) hinzugefügt. Zuletzt wurde sie inkubiert (25 min bei 42 °C, anschließend für 3 min bei 95 °C in einem Eppendorf *Thermocycler*). Um die Menge der isolierten cDNA zu ermitteln, wurde die Konzentration mit einem Photometer bestimmt. In die Messküvette wurde eine Mischung aus 1 µl cDNA und 69 µl HPLC-Wasser gegeben. Das Absorptionsmaximum wurde bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer ermittelt.

2.4.5 Polymerasekettenreaktion

In einem 200-µl-Reaktionsgefäß waren jeweils enthalten: 2 µl 10-fach-Puffer (Qiagen), 0,4 µl dNTP, je 0,2 µl Primer, 0,12 µl Hot Star Taq (Qiagen), 16,78 µl HPLC-Wasser, 0,5 µl Probe (cDNA). Dann wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem *Thermocycler* (Eppendorf) wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:

1. Initialdenaturierung für 15 Minuten bei 95 °C
2. Denaturierung für 30 Sekunden bei 95 °C
3. Hybridisierung für 30 Sekunden bei 58 °C
4. Elongation für 30 Sekunden bei 72 °C
5. Verlängerung für 5 Minuten bei 72 °C

Die Schritte 2 bis 4 wurden 40-mal wiederholt.

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 2 % Agarosegel mit einem TRIS-Acetat-EDTA-Puffer als Laufpuffer verwendet. Außerdem diente Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zur UV-Licht-gesteuerten Detektion.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde durch Anlegen einer Spannung von 90 V durchgeführt. Mithilfe eines *Imagers* (Alpha Innotech) erfolgte die Dokumentation.

2.4.7 Quantitative Realtime-PCR

Das verwendete Mastermix, mit einem Volumen von 19 μ l je 1 μ l cDNA-Probe angesetzt, enthielt 10 μ l *SYBR Green* (Qiagen), 8,5 μ l HPLC-Wasser und 0,5 μ l Primer. Die gesamte Menge 20 μ l, zweimal angefertigt, wurde in 96-Well-Platten (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) gegossen. Zu Normierung der gesuchten Zielgenkonzentrationen wurde S18 rRNA als endogenes Haushaltsgen verwendet.

Die Realtime(RT)-PCR führte ein ABI PRISM 7300 (Applied Biosystem, Waltham, USA) nach folgendem Betriebsprogramm aus:

1. Initialer Denaturierungsvorgang für 15 min bei 95 °C
2. Denaturierung für 15s bei 95 °C
3. Hybridisierung für 30s bei 58 °C
4. Elongation für 34s bei 72 °C
5. Detektion für 34s bei 79 °C

Die Schritte 2 bis 5 wurden 40-mal wiederholt.

Die mRNA-Expression wurde demnach relativ quantifiziert. Die gewonnenen Daten wurden mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode analysiert und anschließend mit *one-way ANOVA* und Bonferroni Post-hoc-Test ausgewertet.

2.5 Statistische Auswertung

Zur Statistischen Auswertung und Erstellung der Abbildungen wurde Graphpad Prism (Dotmatics, Boston, USA) verwendet. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben (n=Anzahl der Tiere). Die Normalverteilung der Stichproben wurde mithilfe von Shapiro-Wilk-Test überprüft. Für den Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen mit Normalverteilung wurde der ungepaarte T-Test verwendet. Vergleiche von mehr als zwei Gruppen mit Normalverteilung wurden mit *one-way-ANOVA* und Bonferroni Post-hoc-Test analysiert. Daten von mehr als zwei Gruppen ohne bestandenen Shapiro-Wilk-Vortest wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließend mit dem *Dunn's multiple-comparison-Test* analysiert. Unterschiede zwischen den Dosis-Wirkungs-Kurven wurden durch *two-way-ANOVA* und Bonferroni Post-hoc-Test analysiert. Wahrscheinlichkeitsniveaus von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Falls zutreffend wird ein höheres Niveau der statistischen Signifikanz angegeben ($p < 0,01$, $p < 0,001$). Die Anzahl der Experimente (n) bezieht sich auf die Anzahl der Mäuse oder die Anzahl der einzelnen Proben.

3 Ergebnisse

3.1 Basisuntersuchungen

3.1.1 Nichtinvasive Tail-Cuff-Blutdruckmessung

Der Einfluss einer chronischen Ang-(1–7)-Behandlung auf den systolischen Blutdruck wurde an Mas(-/-)/ApoE(-/-) und ApoE(-/-)-Mäusen untersucht. Um den Effekt des Mas-Rezeptors auf den arteriellen Blutdruck zu untersuchen, wurden Mas(-/-)/ApoE(-/-) mit ApoE(-/-)-Tieren verglichen. Dafür wurde der durchschnittliche systolische Blutdruckwert herangezogen. Hierbei zeigte sich kein Effekt der chronischen Ang-(1–7)-Behandlung auf den systolischen Blutdruck. Es bestand kein signifikanter Unterschied im durchschnittlichen systolischen Blutdruckwert zwischen Mas(-/-)/ApoE(-/-) und ApoE(-/-)-Tieren, sowohl mit als auch ohne chronische Ang-(1–7)-Behandlung.

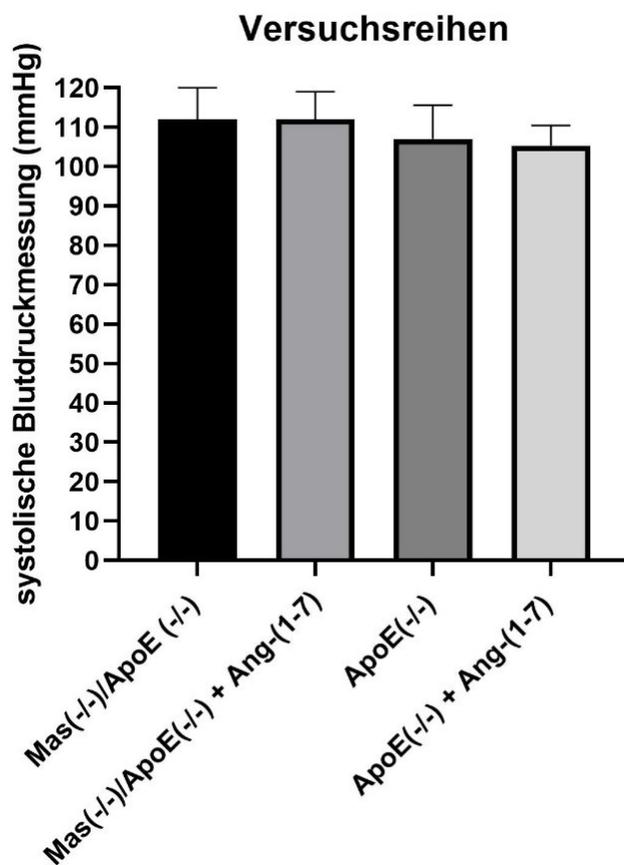


Abb. 8: Systolische Blutdruckmessung verschiedener Mausgruppen

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den systolischen Blutdrücken der vier Mausgruppen. Ermittelte Mittelwerte für verschiedene Mausgruppen nach Ernährung mit *Western Diet* für 12 Wochen. Ang-(1–7) = Tiere wurden mit osmotischen Ang-(1–7)-Minipumpen für 6 Wochen behandelt (82 µg/kg/h). Die Balken zeigen Mittelwerte in mmHg ± SD. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=8); Mas(-/-)/ApoE(-/-) + Ang-(1–7) (n=10); ApoE(-/-) (n=7); ApoE(-/-) (n=7); ApoE(-/-) + Ang-(1–7) (n=4). 112 ± 8 vs. 112 ± 7 vs. 107 ± 8 vs. 105 ± 4. One-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt.

3.1.2 Cholesterol und Triglyzeride im Blutplasma

Zur Untersuchung des Effekts chronischer Ang-(1-7)-Behandlung auf die Lipidplasmaspiegel wurden Wildtyp-Mäuse und ApoE(-/-)-Mäuse herangezogen. Um die Wirkung Effekt des Mas-Rezeptors zu untersuchen, wurden Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäuse in die Betrachtung aufgenommen.

Die chronische Ang-(1-7)-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Konzentration von Gesamtcholesterin und Triglyzeriden im jeweiligen Tiermodell (Wildtyp, ApoE(-/-)- und Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäuse). Unter fettreicher Ernährung mit *Western Diet* hatten ApoE(-/-)- und Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Plasmakonzentration an Cholesterol und Triglyzeriden.

Nennenswert ist, dass die Cholesterol- und Triglyzeridspiegel bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen niedriger ausfällt als bei ApoE(-/-)-Mäusen, unabhängig von der chronischen Ang-(1-7)-Behandlung.

	WT	WT + Ang-(1-7)	ApoE(-/-)	ApoE(-/-) + Ang-(1-7)	Mas(-/-)/ApoE(-/-)	Mas(-/-)/ApoE(-/-) + Ang-(1-7)
Cholesterol (mg/dl)	120,50 ± 40,44*	134,33 ± 44,59*	1825,67 ± 42,45	1637,75 ± 624,21	1401,00 ± 450,76	1164,96 ± 198,95**
Triglyzeride (mg/dl)	27,33 ± 20,68#	34,14 ± 26,64#	252,67 ± 95,87	218,00 ± 64,63	109,55 ± 78,48##	105,62 ± 64,38###

Abb. 9: Plasmakonzentration von Gesamtcholesterin und Triglyzeriden in mit Western Diet ernährten Mäusegruppen

Kein signifikanter Unterschied durch die chronische Behandlung mit Ang-(1-7) bei allen drei Mäusestämmen. Alle Tiere erhielten für 12 Wochen *Western Diet*. WT = Wildtyp (n=6); WT + Ang-(1-7) (n=6); ApoE(-/-) (n=4); ApoE(-/-) + Ang-(1-7) (n=4); Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=11); Mas(-/-)/ApoE(-/-) + Ang-(1-7) (n=13). Ang-(1-7) = Tiere wurden mit osmotischen Ang-(1-7)-Minipumpen für 6 Wochen behandelt (82 µg/kg/h). * **P < 0,001** signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und sowohl ApoE(-/-)- als auch Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Gruppen unabhängig von der Ang-(1-7)-Behandlung. ** **P < 0,01** signifikanter Unterschied zwischen ApoE(-/-) und Mas(-/-)/ApoE(-/-)+Ang-(1-7). # **P < 0,001** signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und ApoE(-/-). ## **P < 0,01** signifikanter Unterschied zwischen ApoE(-/-) und Mas(-/-)/ApoE(-/-). ### **P < 0,05** signifikanter Unterschied zwischen ApoE(-/-)+Ang-(1-7) und Mas(-/-)/ApoE(-/-)+Ang-(1-7). One-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt.

3.2 Der Effekt von Angiotensin (1–7)-Behandlung auf die renale Druckantwort im Modell der isoliert perfundierten Nieren

3.2.1 Chronische Ang-(1–7)-Behandlung

Bei der chronischen Behandlung von ApoE(-/-)-Mäusen mit Ang-(1–7) konnte bereits in einer vorherigen Arbeit unserer Forschungsgruppe eine signifikante Reduzierung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort nachgewiesen werden. (siehe Kapitel 1.5 Abb. 3)

Die durch chronische Ang-(1–7)-Behandlung nachgewiesene Reduktion der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort wurde in Abwesenheit des Mas-Rezeptors untersucht. In Nieren von Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen hat Ang-(1–7) keinen signifikanten Effekt auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort gezeigt.

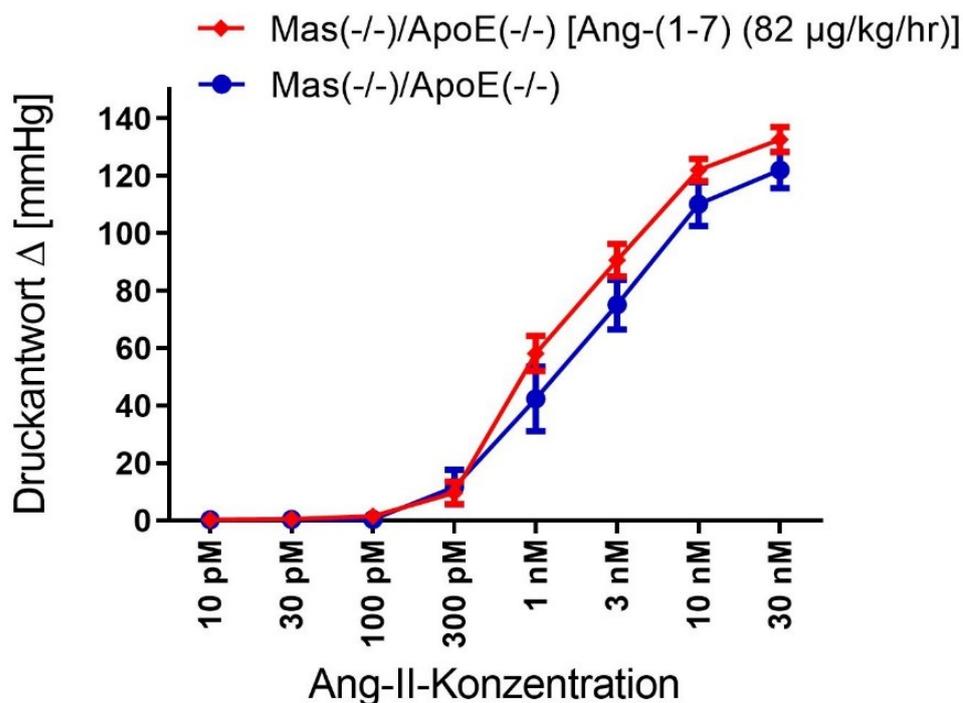


Abb. 10: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen in Abhängigkeit von chronischer Ang-(1–7)-Behandlung.

Die chronische Behandlung mit Ang-(1–7) über Minipumpen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=9); Mas(-/-)/ApoE(-/-) + Ang-(1–7) (n=9). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert ± SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=9) vs. Mas(-/-)/ApoE(-/-) + Ang-(1–7) (n=9). (Mittelwert in mmHg ± SD): $1 \times 10^{-11} M$ ($0,25 \pm 1,04$ vs. $0,3 \pm 1,06$); $3 \times 10^{-11} M$ ($0,375 \pm 2,2$ vs. $0,5 \pm 1,08$); $1 \times 10^{-10} M$ ($0,375 \pm 1,41$ vs. $1,6 \pm 2,84$); $3 \times 10^{-10} M$ ($11,6 \pm 18,07$ vs. $9,7 \pm 11,49$); $1 \times 10^{-9} M$ ($42,37 \pm 33,93$ vs. $58,2 \pm 18,46$); $3 \times 10^{-9} M$ ($75,12 \pm 25,9$ vs. $90,7 \pm 16,92$); $1 \times 10^{-8} M$ ($110,12 \pm 23,08$ vs. $122,1 \pm 11,69$); $3 \times 10^{-8} M$ ($122 \pm 19,27$ vs. $132,7 \pm 13,08$).

Außerdem diente eine mit Ang-(1-7) chronisch behandelte Wildtyp-Versuchsreihe als Kontrolle. Hier konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Effekt auf die renale Druckantwort gezeigt werden.

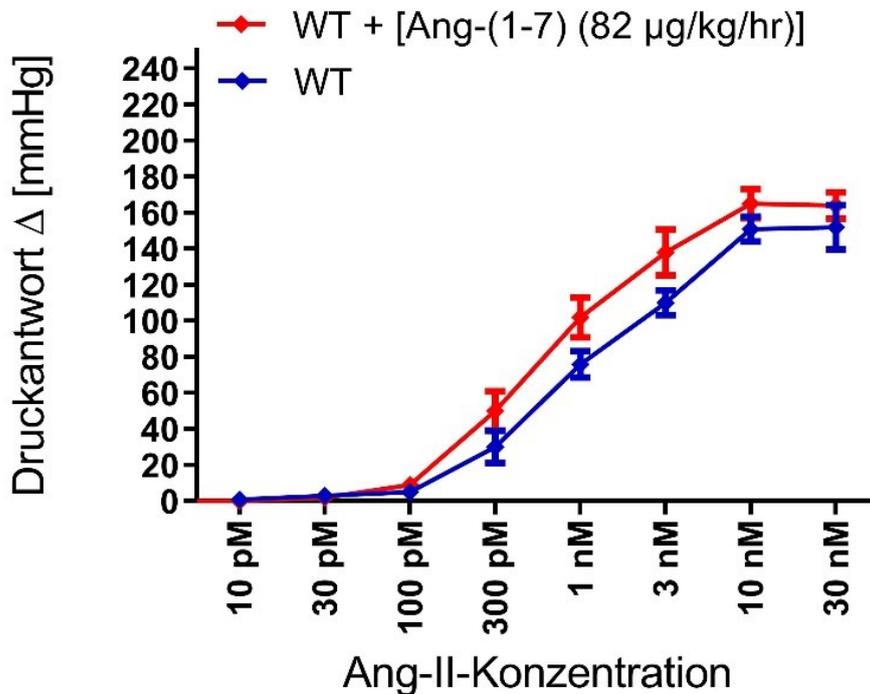


Abb. 11: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von chronischer Ang-(1-7)-Behandlung.

Die chronische Behandlung mit Ang-(1-7)-Minipumpen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort. WT (n=6); WT + Ang-(1-7) (n=6). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert ± SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. WT (n=6); WT + Ang-(1-7) (n=6). (Mittelwert in mmHg ± SD): 1×10^{-11} M (1 ± 2 vs. 0 ± 2); 3×10^{-11} M (3 ± 2 vs. 2 ± 1); 1×10^{-10} M (5 ± 3 vs. 9 ± 6); 3×10^{-10} M (30 ± 22 vs. 50 ± 27); 1×10^{-9} M (70 ± 18 vs. 102 ± 27); 3×10^{-9} M (110 ± 17 vs. 138 ± 31); 1×10^{-8} M (151 ± 17 vs. 165 ± 20); 3×10^{-8} M (152 ± 30 vs. 164 ± 18).

3.2.2 Akute Ang-(1-7)-Behandlung

Um den Effekt einer unmittelbaren Gabe von Ang-(1-7) auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort zu ermitteln, wurde in einem Versuchsmodell jeweils eine der beiden Nieren für 15 Minuten mit $1\mu\text{M}$ Ang-(1-7) vorbehandelt. Bei der folgenden Ang-II-Perfusionsreihe, konnte kein signifikanter Einfluss der akuten Ang-(1-7)-Behandlung auf die renale Ang-II-induzierte Druckantwort bei ApoE(-/-)-Mäusen gezeigt werden.

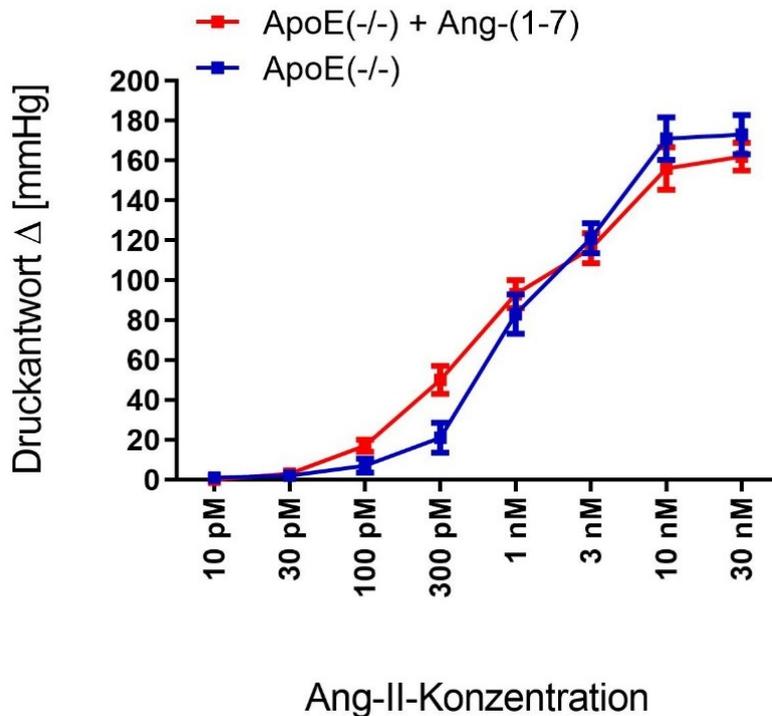


Abb. 12: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei ApoE(-/-)-Mäusen mit akuter Ang-(1-7)-Behandlung.

Die akute Gabe von Ang-(1-7) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort. ApoE(-/-) (n=5); ApoE(-/-) + Ang-(1-7)(n=5). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert \pm SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. ApoE(-/-) + Ang-(1-7) (n=5) vs. ApoE(-/-) (n=5) (Mittelwert in mmHg \pm SD): 1×10^{-11} M (0 \pm 0 vs. 1 \pm 1); 3×10^{-11} M (3 \pm 3 vs. 2 \pm 3); 1×10^{-10} M (17 \pm 7 vs. 7 \pm 8); 3×10^{-10} M (50 \pm 16 vs. 21 \pm 17); 1×10^{-9} M (93 \pm 16 vs. 83 \pm 22); 3×10^{-9} M (116 \pm 17 vs. 121 \pm 17); 1×10^{-8} M (156 \pm 24 vs. 171 \pm 24); 3×10^{-8} M (162 \pm 16 vs. 173 \pm 22).

Der Effekt akuter Ang-(1-7)-Behandlung bei Abwesenheit des Mas-Rezeptors wurde durch eine Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Versuchsreihe untersucht. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Ang-II-induzierten Druckantwort.

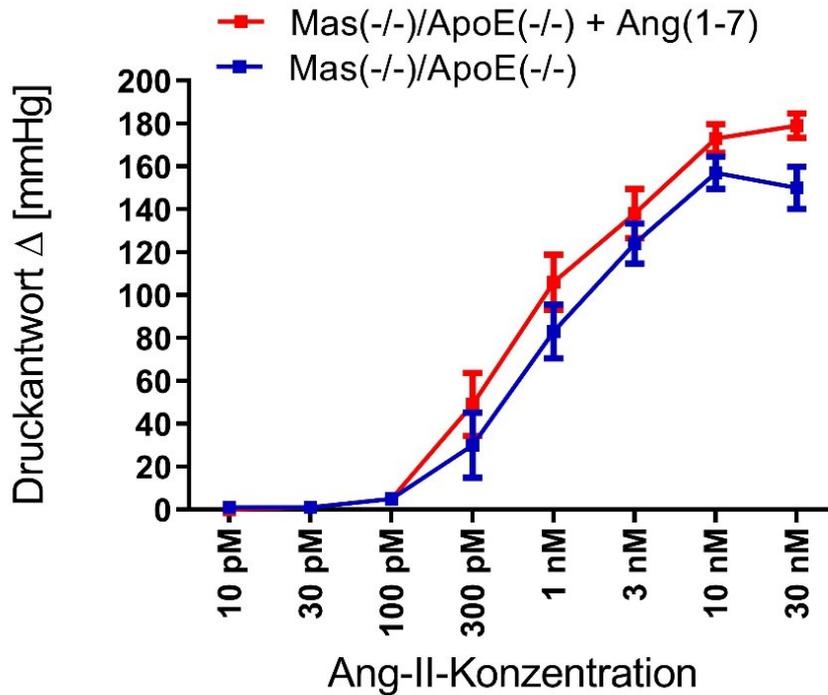


Abb. 13: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen mit akuter Ang-(1-7)-Behandlung.

Die akute Gabe von Ang-(1-7) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=5); Mas(-/-)/ApoE(-/-) + Ang-(1-7) (n=5). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert ± SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=5); Mas(-/-)/ApoE(-/-) + Ang-(1-7) (n=5). (Mittelwert in mmHg ± SD): 1×10^{-11} M (1 ± 1 vs. 0 ± 1); 3×10^{-11} M (1 ± 2 vs. 1 ± 0); 1×10^{-10} M (5 ± 6 vs. 5 ± 6); 3×10^{-10} M (30 ± 34 vs. 49 ± 33); 1×10^{-9} M (83 ± 28 vs. 106 ± 29); 3×10^{-9} M (124 ± 21 vs. 138 ± 26); 1×10^{-8} M (157 ± 17 vs. 173 ± 15); 3×10^{-8} M (150 ± 22 vs. 179 ± 13).

3.3 Die Genexpression unter chronischer Ang-(1-7)-Behandlung

Mittels PCR wurde der Effekt der chronischen Ang-(1-7)-Behandlung auf die Expression von verschiedenen Rezeptoren und Enzymen des RAAS untersucht. Dabei wurde die Genexpression des Mas-Rezeptors, AT1 und AT2 und von ACE2 im Nierenparenchym mittels einer quantitativen PCR bestimmt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Genexpression zwischen Wildtyp- und ApoE(-/-)-Mäusen. Außerdem führte die Ang-(1-7)-Behandlung zu keinem Expressionsunterschied in Nieren von ApoE(-/-)-Mäusen.

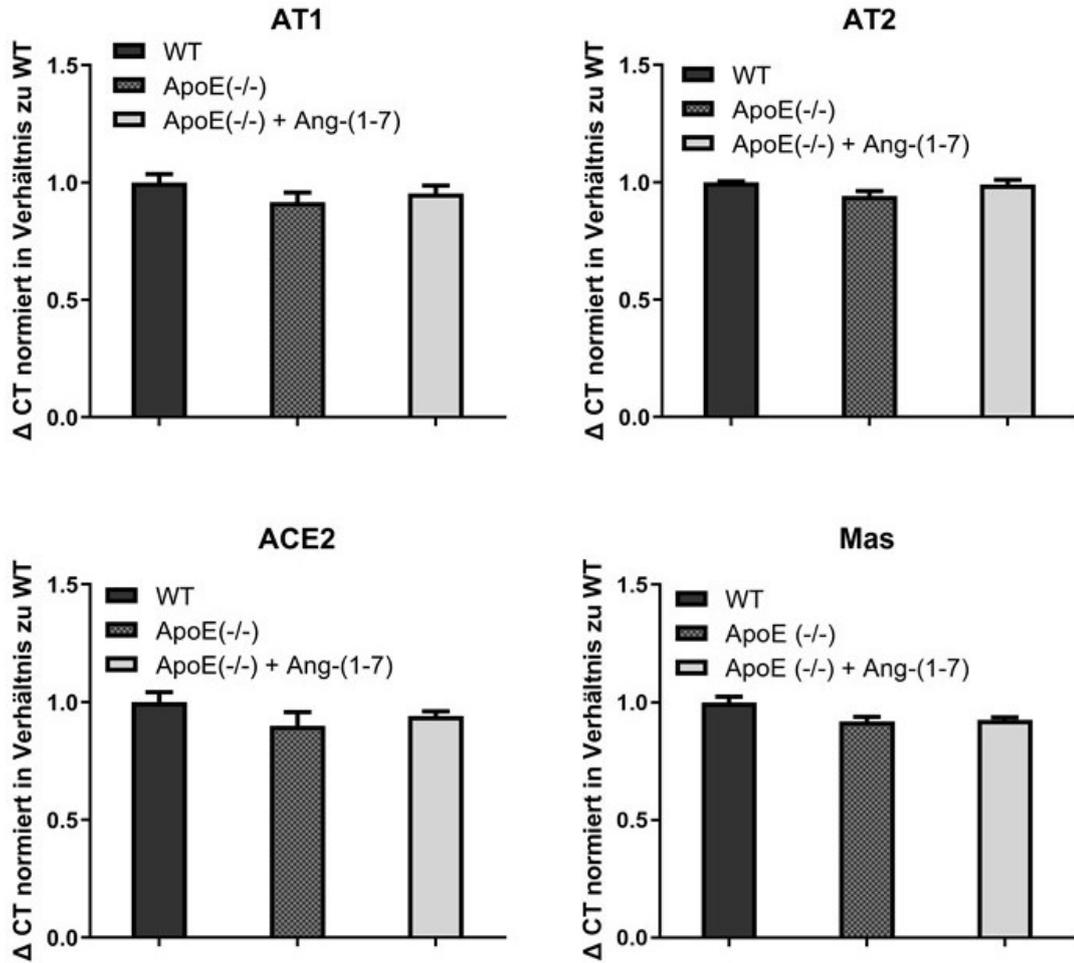


Abb. 14: Realtime-PCR mit dem Vergleich der relativen Genexpression von AT1, AT2, Mas-Rezeptor und von ACE2.

Kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von AT1, AT2, ACE2 und Mas zwischen den drei Versuchsgruppen. Delta Delta CT normiert zu 18s Expression in WT. WT (n=4); ApoE(-/-) (n=4); ApoE(-/-) + Ang-(1-7) (n=4). One-way ANOVA und Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. WT vs. ApoE(-/-) vs. ApoE(-/-) + ApoE(-/-) + Ang-(1-7). Mittelwert normiert zu WT ± SD. AT1: 1,00 ± 0,071 vs. 0,92 ± 0,08 vs. 0,95 ± 0,07. AT2: 1,00 ± 0,01 vs. 0,94 vs. 0,99 ± 0,04. ACE2: 1,00 ± 0,08 vs. 0,90 ± 0,17 vs. 0,94 ± 0,04. Mas: 1 ± 0,05 vs. 0,92 ± 0,041 vs. 0,925 ± 0,02

3.4 Akute p38-MAPK-Inhibition

Der Effekt einer p38-MAPK auf die renale Ang-II-induzierte Druckantwort wurde durch die Gabe des spezifischen p38-Inhibitors (SB203580 5 μ M) in isoliert perfundierten Nieren untersucht. Dabei reduzierte sich die Ang-II-induzierte Druckantwort in ApoE(-/-)-Mäusen signifikant.

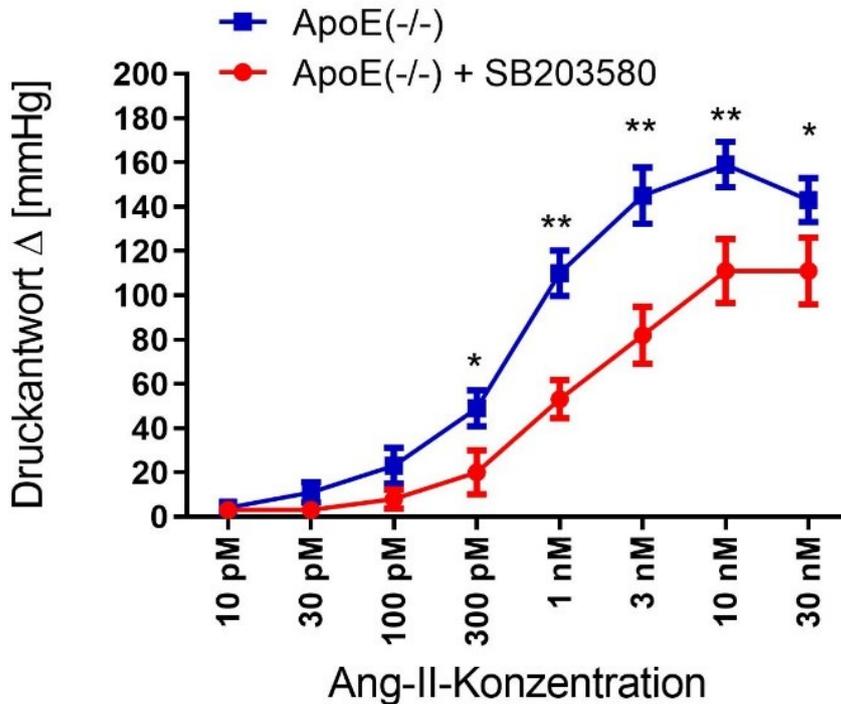


Abb. 15: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei ApoE(-/-)-Mäusen mit akuter p38-Inhibition.

Die akute p38-Inhibition führte zu einer signifikanten Reduzierung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort. ApoE(-/-) (n=10); ApoE(-/-) + SB203580 (n=8). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert \pm SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$. ApoE(-/-) (n=10) vs. ApoE(-/-) + SB203580 (n=8): (Mittelwert in mmHg \pm SD): 1×10^{-11} M (4 \pm 4 vs. 3 \pm 4); 3×10^{-11} M (11 \pm 13 vs. 3 \pm 4); 1×10^{-10} M (23 \pm 23 vs. 8 \pm 6); 3×10^{-10} M (49 \pm 23 vs. 20 \pm 14); 1×10^{-9} M (110 \pm 29 vs. 53 \pm 12); 3×10^{-9} M (145 \pm 36 vs. 82 \pm 18); 1×10^{-8} M (159 \pm 29 vs. 111 \pm 20); 3×10^{-8} M (143 \pm 28 vs. 111 \pm 21).

Um die Rolle des Mas-Rezeptors bei der p38-vermittelten renalen Druckantwort zu untersuchen, wurden isolierte Nierenperfusionsversuche aus Mas(-/-)-Mäusen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass die p38-Inhibition ab einer Ang-II-Dosierung von 1 nM die Ang-II-induzierte Druckantwort signifikant abschwächt, jedoch nicht so stark wie bei ApoE(-/-)-Mäusen.

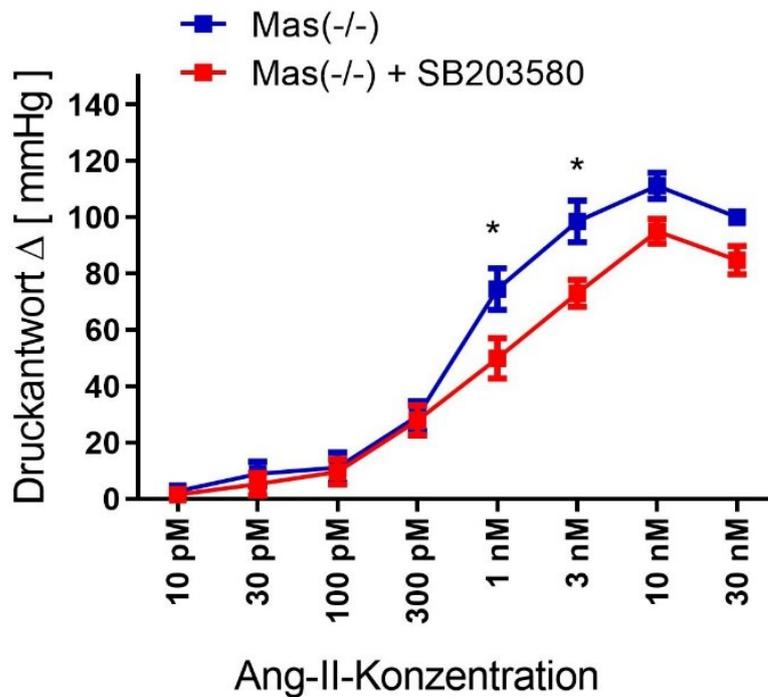


Abb. 16: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)-Mäusen mit akuter p38-Inhibition.

Die akute p38-Inhibition führte zu einer signifikanten Reduzierung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort bei einer Ang-II-Konzentration von 1 nM und 3 nM. Mas(-/-) Kontrolle (n=9); Mas(-/-) + SB203580 (n=8). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert \pm SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. * = $P < 0.05$. Mas(-/-) (n=9) vs. Mas(-/-) + SB203580 (n=8): Mittelwert in mmHg \pm SD: normiert zu 3×10^{-8} M. 1×10^{-11} M ($2,8 \pm 2,5$ vs. $1,6 \pm 5,5$); 3×10^{-11} M ($8,9 \pm 13,4$ vs. $5,3 \pm 11,5$); 1×10^{-10} M ($11,2 \pm 16,1$ vs. $9,7 \pm 13,0$); 3×10^{-10} M ($29,5 \pm 15,8$ vs. $27,9 \pm 14,9$); 1×10^{-9} M ($74,5 \pm 22,3$ vs. $49,9 \pm 20,4$); 3×10^{-9} M ($98,6 \pm 22,1$ vs. $73,1 \pm 13,7$); 1×10^{-8} M ($111,2 \pm 14$ vs. $95 \pm 12,4$); 3×10^{-8} M (100 vs. $84,8 \pm 14,06$).

Der gleiche Versuchsaufbau mit Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen zeigte einen ähnlichen statistisch signifikanten Effekt wie bei den vorherigen ApoE(-/-)-Versuchsreihen. Auch hier wurde der SB203580 in gleicher Konzentration verwendet.

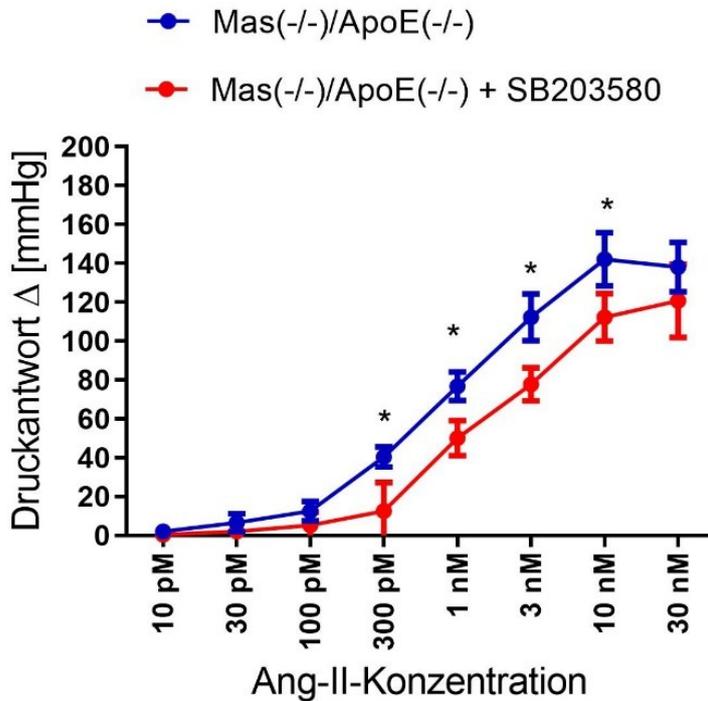


Abb. 17: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen mit akuter p38-Inhibition.

Die akute p38-Inhibition führte zu einer signifikanten Reduzierung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=5); Mas(-/-)/ApoE(-/-) + SB203580 (n=5). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert ± SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. * = $P < 0.05$. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=5) vs. Mas(-/-)/ApoE(-/-) + SB203580 (n=5). (Mittelwert in mmHg ± SD): 1×10^{-11} M (2 ± 1,8 vs. 0,4 ± 1,6); 3×10^{-11} M (6,6 ± 10,5 vs. 2 ± 2,2); 1×10^{-10} M (12,6 ± 11,2 vs. 5,2 ± 5,5); 3×10^{-10} M (40,4 ± 11,4 vs. 12 ± 11,7); 1×10^{-9} M (76,8 ± 16,5 vs. 50 ± 7,3); 3×10^{-9} M (112,2 ± 27 vs. 77,8 ± 6,9); 1×10^{-8} M (142 ± 30,6 vs. 112,2 ± 9,9); 3×10^{-8} M (138 ± 28,3 vs. 120,8 ± 15,26).

Als Kontrolle zu vorherigen Ergebnissen wurde eine WT-Versuchsreihe durchgeführt. Hier war die abschwächende Wirkung der p38-Inhibition auf die Ang-II-induzierte Druckantwort nicht nachweisbar.

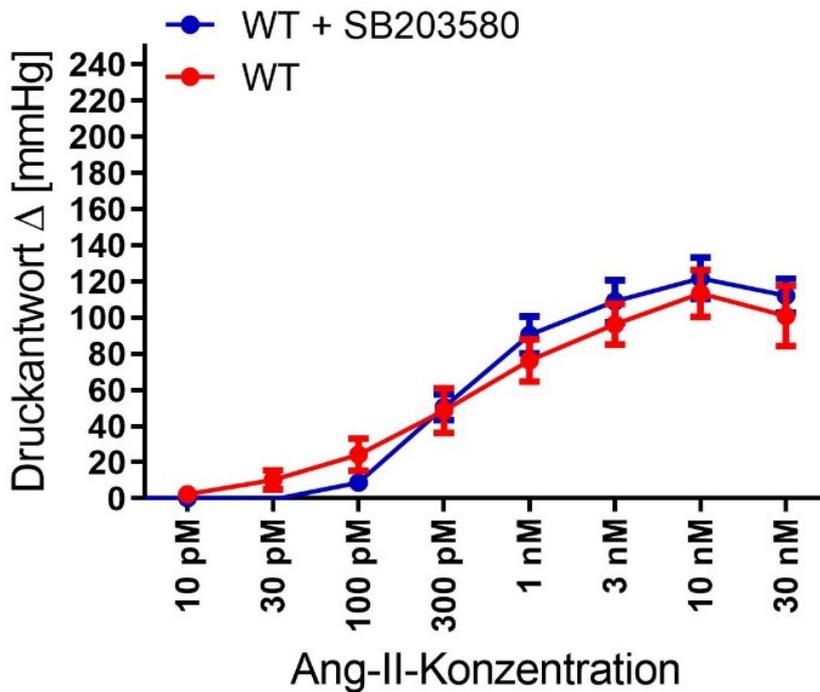


Abb. 18 Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Wildtyp-Mäusen mit akuter p38-Inhibition.

Die akute p38-Inhibition führte nicht zu einer signifikanten Reduzierung der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort. WT (n=9); WT + SB203580 5 (n=10). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert \pm SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. WT (n=9) vs. WT + SB203580 5 (n=10): (Mittelwert in mmHg \pm SD): 1×10^{-11} M (2,3 \pm 4,1 vs. 0,2 \pm 2,9); 3×10^{-11} M (10,3 \pm 11,9 vs. 0,7 \pm 3,2); 1×10^{-10} M (24,3 \pm 20,9 vs. 8,8 \pm 12,3); 3×10^{-10} M (48,6 \pm 28,5 vs. 50,5 \pm 26,3); 1×10^{-9} M (76,3 \pm 27,1 vs. 90,6 \pm 38,1); 3×10^{-9} M (96,3 \pm 26,2 vs. 109 \pm ,43,9); 1×10^{-8} M (113,4 \pm 30,2 vs. 121,9 \pm 42,9); 3×10^{-8} M (100,8 \pm 32,5 vs. 112,1 \pm 34,8).

3.5 Die p38-Phosphorylierung im Nierenkortex unter chronischer Ang-(1-7)-Behandlung

3.5.1 Western Blot

Die Phosphorylierung von p38 geht mit einer größeren Aktivität der MAPK-Kinase einher. Der Phosphorylierungsgrad von p38, also das Verhältnis aus phosphoryliertem zu unphosphoryliertem p38 im Nierenkortex, wird z. B. durch den oxidativen Stress erhöht. Somit ist die Endotheldysfunktion mit einer gesteigerten Aktivierung der p38-Signalkaskade assoziiert. Um die Rolle des Mas-Rezeptors bei der Phosphorylierung von p38 im Nierenkortex zu evaluieren, wurde der Phosphorylierungsgrad mittels *Western Blot* im Nierenkortex von ApoE(-/-)- und Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen quantifiziert und miteinander verglichen. Eine chronische Behandlung mit Ang-(1-7) reduzierte den Aktivitätsgrad der p38-MAP-Kinase in ApoE(-/-)-Mäusen signifikant stärker als in der Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Vergleichsgruppe.

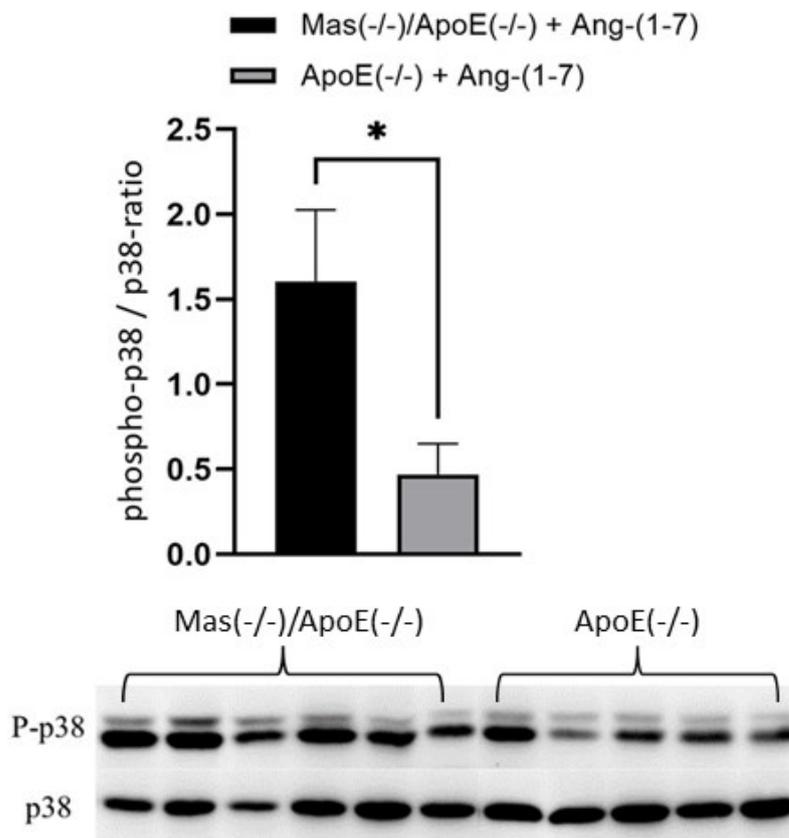


Abb. 19: Repräsentative *Western Blot* mit densitometrischer Auswertung aus dem Lysat der Nierenrinden zeigt das Phospho-p38/p38-MAPK-Verhältnis.

Der Phosphorylierungsgrad bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen war signifikant höher als in ApoE(-/-)-Mäusen nach chronischer Ang-(1-7)-Behandlung. ApoE(-/-) (n=5); Mas(-/-)ApoE(-/-) (n=6). Verhältnis von Phospho-p38 und p38, densitometrisch ermittelt und zu β -Actin normiert. Jeder Balken zeigt den Mittelwert \pm SEM. Ungepaarter t-Test wurde durchgeführt. $P < 0,05$. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen. Mas(-/-)ApoE(-/-) (n=6) vs. ApoE(-/-) (n=5); $1,605 \pm 0,42$ vs. $0,47 \pm 0,08$

3.5.2 8-Isoprostan-Bestimmung im Urin

Als Marker für den oxidativen Stress wurde die Isoprostankonzentration im Sammelurin bestimmt. Eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung reduzierte die Isoprostankonzentration im Urin von ApoE(-/-)-Versuchstieren signifikant, jedoch nicht in Mas(-/-)/ApoE(-/-)- und Wildtyp-Versuchstieren.

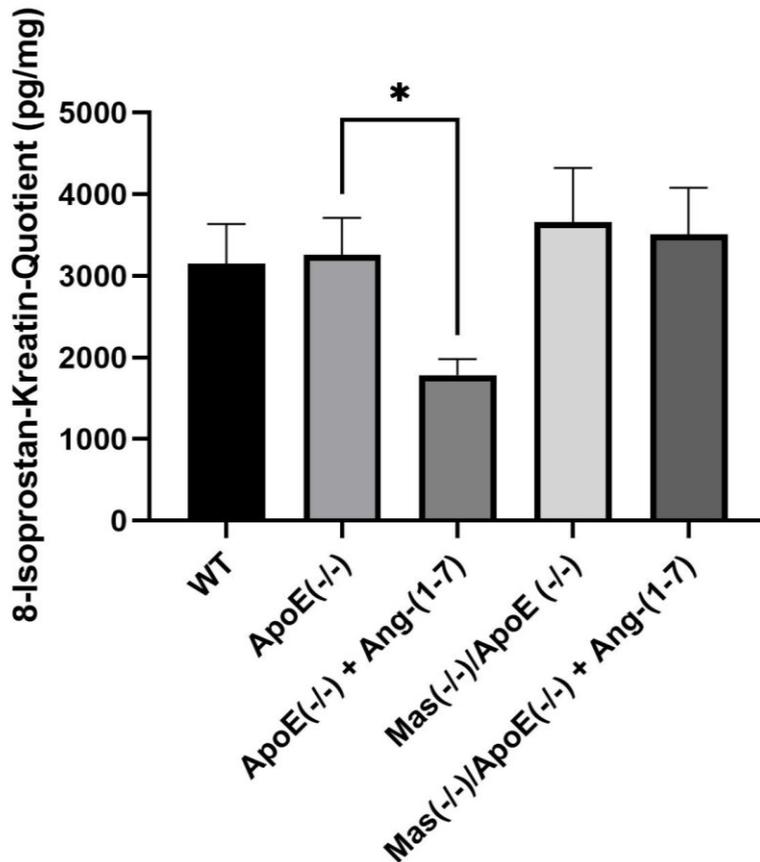


Abb. 20: Isoprostan/Kreatinin-Quotient im 24-Stunden-Sammelurin im Vergleich zwischen mehreren Versuchsreihen.

Die chronische Ang-(1-7)-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der 8-Isoprostankonzentration im Urin von ApoE(-/-)-Mäuse. Es zeigte sich keinen Unterschied durch die Ang-(1-7)-Behandlung von Mas(-/-)/ApoE(-/-)- im Vergleich zu unbehandelten Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen. Alle Tiere erhielten für 12 Wochen *Western Diet*. WT = Wildtyp (n=9); ApoE(-/-) (n=10); ApoE(-/-)+Ang-(1-7) (n=9); Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=8); Mas(-/-)/ApoE(-/-)+Ang-(1-7) (n=10). Ang-(1-7) = Tiere wurden mit osmotischen Ang-(1-7)-Minipumpen für 6 Wochen behandelt (82 µg/kg/h). Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple-Comparison-Test wurden durchgeführt. * $P < 0,05$. WT vs. ApoE(-/-) vs. ApoE(-/-)+Ang-(1-7) vs. Mas(-/-)/ApoE(-/-) vs. Mas(-/-)/ApoE(-/-)+ Ang-(1-7). Mittelwert des Isoprostan-Kreatinin-Quotienten in pg/mg ± SEM: 3148 ± 488 vs. 3258 ± 452 vs. 1786 ± 194 vs. 3656 ± 666 vs. 3508 ± 574.

3.6 Die Interaktion von p38-Inhibition und NOS-Inhibition bei der renalen Druckantwort

Die NO-Freisetzung mittels eNOS kann durch L-NAME inhibiert werden. Durch die Hemmung der NO-Synthase ist die endothelabhängige Vasodilatation eingeschränkt und dadurch erhöht sich die Ang-II-vermittelte Vasokonstriktion. Ang II aktiviert die p38-Signalkaskade über eine Steigerung der ROS. Die Inhibition der p38-Signalkaskade führt wiederum zu einer Reduktion der Ang-II-induzierten Vasokonstriktion.

Mittels L-NAME sollte überprüft werden, ob die Wirkung einer p38-Inhibition (SB203580) auf die Ang-II-abhängige renale Druckantwort durch eine endotheliale NO-Produktion vermittelt wird.

Im Tiermodell von ApoE(-/-)-Mäusen zeigte sich, dass die akute Vorbehandlung mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME den signifikanten Effekt des p38-Inhibitors SB203580 auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort aufhebt.

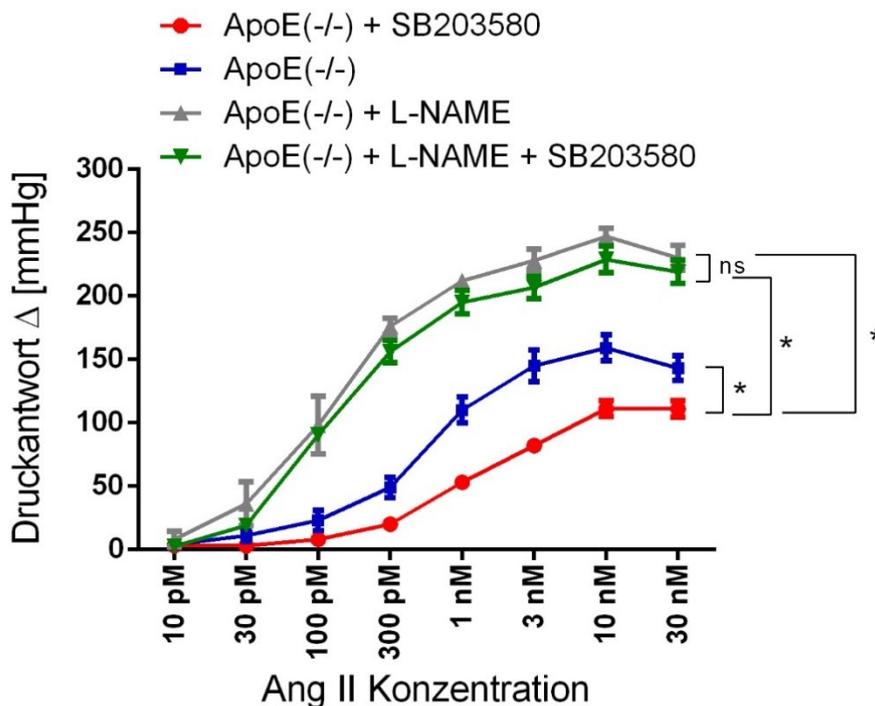


Abb. 21: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei ApoE(-/-)-Mäusen mit p38-MAPK-Inhibition und eNOS-Inhibition

Die eNOS-Inhibition hob die reduzierende Wirkung der p38-Inhibition auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort in ApoE(-/-)-Mäuse auf. ApoE(-/-) (n=10); ApoE(-/-) + SB203580 (n=8); ApoE(-/-) + L-NAME (n=5); ApoE(-/-) + L-NAME + SB203580 (n=5). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert \pm SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. ns = statistisch nicht signifikant; * = $P < 0.01$. ApoE(-/-) (n=10) vs. ApoE(-/-) + SB203580 (n=8) vs. ApoE(-/-) + L-NAME (n=5) vs. ApoE(-/-) + L-NAME + SB203580 (n=5). Mittelwert in mmHg \pm SD: 1×10^{-11} M (4 \pm 4 vs. 3 \pm 4 vs. 8 \pm 14 vs. 2,5 \pm 4); 3×10^{-11} M (11 \pm 13 vs. 3 \pm 4 vs. 36 \pm 39 vs. 19 \pm 10); 1×10^{-10} M (23 \pm 23 vs. 8 \pm 6 vs. 98 \pm 51 vs. 90 \pm 13); 3×10^{-10} M (49 \pm 23 vs. 20 \pm 14 vs. 176 \pm 15 vs. 156 \pm 20); 1×10^{-9} M (110 \pm 29 vs.

53±12 vs. 212±13 vs. 195±21); 3×10⁻⁹ M (145±36 vs. 82±18 vs. 228±20 vs. 206±20); 1×10⁻⁸ M (159±29 vs. 111±20 vs. 247±15 vs. 228±24); 3×10⁻⁸ M (143±28 vs. 111±21 vs. 230±22 vs. 219±21).

Die Interaktion zwischen der p38-Signalkaskade und NO-Freisetzung sollte außerdem unter Mas-Rezeptor-Defizienz untersucht werden. In einer Versuchsreihe mit Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen, zeigte sich ein ähnlicher Effekt der NO-Synthase-Hemmung auf die Ang-II-induzierte Vasoreaktion. Der vasorelaxierende Effekt des p38-Inhibitors wurde unabhängig vom Mas-Rezeptor erreicht.

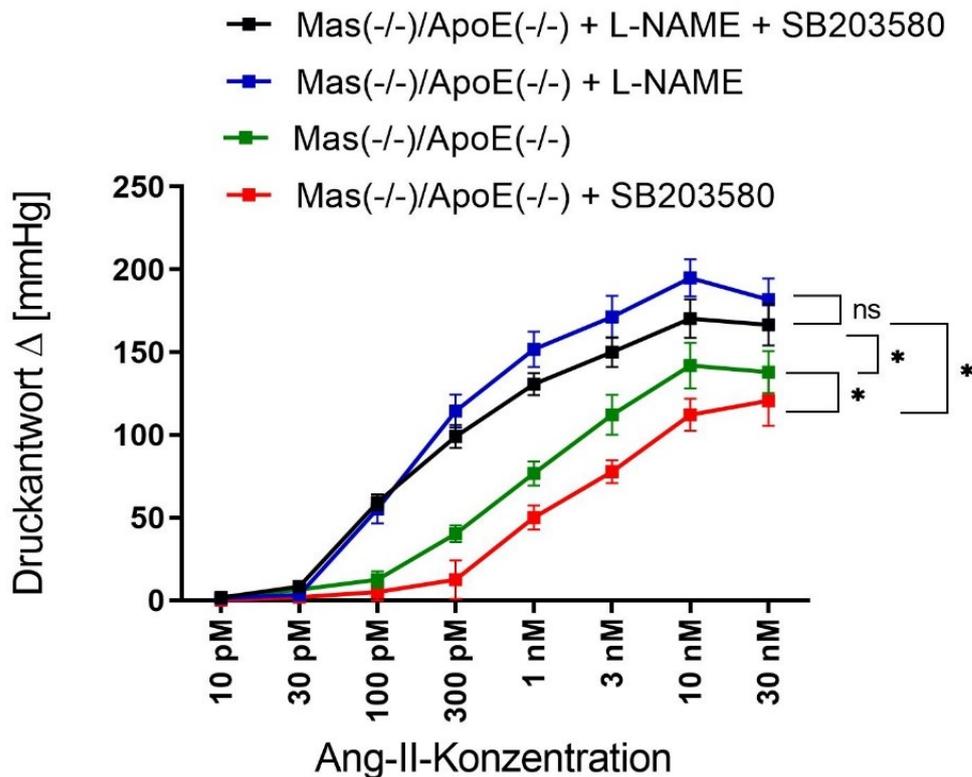


Abb. 22: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen mit p38-MAPK-Inhibition und eNOS-Inhibition

Die eNOS-Inhibition hob die reduzierende Wirkung der p38-Inhibition auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort in Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäuse auf. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=5); Mas(-/-)/ApoE(-/-) + SB203580 (n=5); Mas(-/-)/ApoE(-/-) + L-NAME (n=7); ApoE(-/-) + L-NAME + SB203580 (n=5). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert ± SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. ns = statistisch nicht signifikant; * = **P<0.01**. Mas(-/-)/ApoE(-/-) (n=5) vs. Mas(-/-)/ApoE(-/-) + SB203580 (n=5) vs. Mas(-/-)/ApoE(-/-) + L-NAME (n=7) vs. ApoE(-/-) + L-NAME + SB203580 (n=5). Mittelwert in mmHg ± SD: 1×10⁻¹¹ M (2±1,8 vs. 0,4±1,6 vs. 1±1 vs. 2±4); 3×10⁻¹¹ M (6,6±10,5 vs. 2±2,2 vs. 4±2 vs. 9±3); 1×10⁻¹⁰ M (12,6±11,2 vs. 5,2±5,5 vs. 55±19 vs. 58±9); 3×10⁻¹⁰ M (40,4±11,4 vs. 12±11,7 vs. 115±22 vs. 99±13); 1×10⁻⁹ M (76,8±16,5 vs. 50±7,3 vs. 115±22 vs. 130±12); 3×10⁻⁹ M (112,2±27 vs. 77,8±6,9 vs. 171±28 vs. 147±18); 1×10⁻⁸ M (142±30,6 vs. 112,2±9,9 vs. 195±25 vs. 165±25); 3×10⁻⁸ M (138±28,3 vs. 120,8±15,26 vs. 182±29 vs. 160±27).

Beim direkten Gruppenvergleich zwischen ApoE(-/-)- und Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen unter der eNOS-Inhibition mittels L-NAME zeigte sich, dass die Ang-II-induzierte renale Druckantwort in der Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Gruppe niedriger ausfiel als in der ApoE(-/-)-Gruppe.

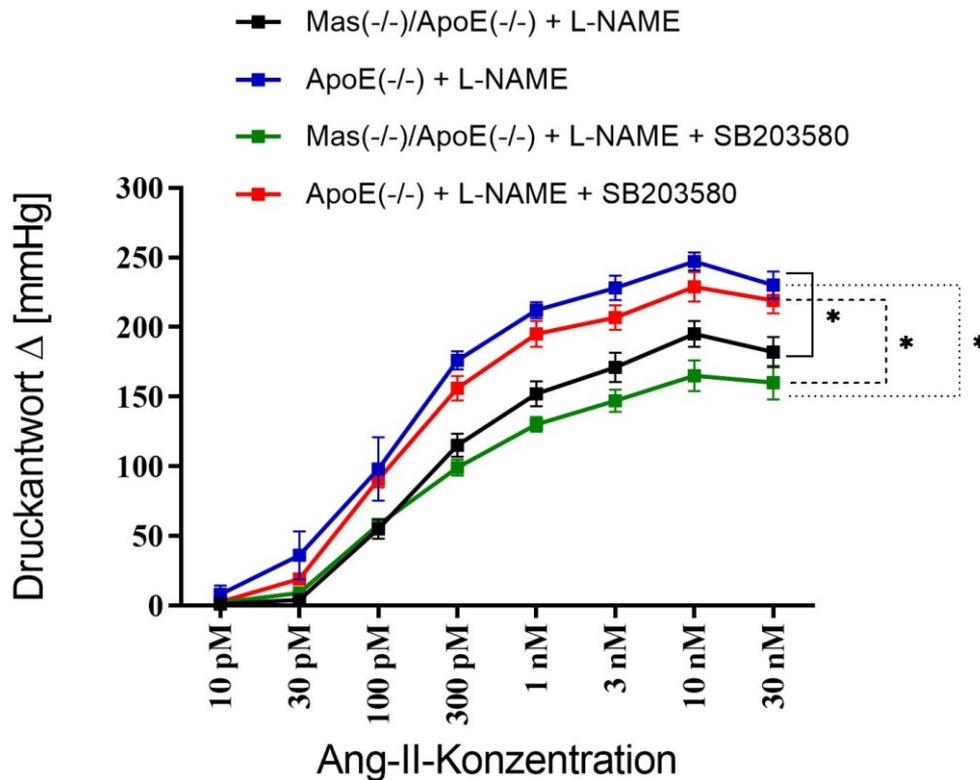


Abb. 23: Ang-II-Dosis-Wirkungs-Kurven bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)- und ApoE(-/-)-Mäusen unter SO-Synthase-Hemmung in Abhängigkeit von p38-MAPK-Inhibition.

Unter eNOS-Inhibition war die Ang-II-induzierte renale Druckantwort in Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen niedriger als in ApoE(-/-)-Mäusen. Mas(-/-)/ApoE(-/-) + L-NAME (n=7); ApoE(-/-) + L-NAME + SB203580 (n=5); ApoE(-/-) + L-NAME (n=5); ApoE(-/-) + L-NAME + SB203580 (n=5). Ang II wurde alle 5 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurde jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert \pm SD. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test wurden durchgeführt. * = $P < 0,01$. Rohdaten aus den Abbildungen 22 und 23 zu entnehmen.

4 Diskussion

4.1 Der Effekt von Ang-(1–7) bei Mas-Defizienz

Die endotheliale Dysfunktion geht mit reduzierter NO-Bioverfügbarkeit ein und wurde bereits als Ursache für die Entwicklung von Atherosklerose bei ApoE(-/-)-Mäusen beschrieben (96). Diese Tiere entwickeln durch eine fettreiche Ernährung eine Dyslipidämie, die die endotheliale Dysfunktion beschleunigt, indem die endothelabhängige und NO-vermittelte Vasorelaxation reduziert wird. Die chronische Behandlung mit Ang-(1–7) verbessert die renale endotheliale Funktion dieser Mäuse, indem sie über eine Aktivierung des Mas-Rezeptors die NO-Bioverfügbarkeit erhöht (97). Um die vasoprotektive Rolle des Mas-Rezeptors bei der endothelialen Dysfunktion zu bestätigen, wurde eine Mas-defiziente ApoE(-/-)-Maus zum Vergleich herangezogen.

4.2 Nichtinvasive Tail-Cuff-Blutdruckmessung

Die ApoE(-/-)-Maus ist ein zentrales Tiermodell zur Erforschung der endothelialen Dysfunktion. Durch den Vergleich mit Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit die durch den Mas-Rezeptor vermittelte Auswirkung von Ang-(1–7) auf die Entwicklung von Gefäßschädigung und arterieller Hypertonie untersucht. Eine chronische Ang-(1–7)-Behandlung zeigte keinen Effekt auf die systolische Blutdruckmessung, sowohl an ApoE(-/-)- als auch an Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen. Der fehlende Effekt einer chronischen Ang-(1–7)-Behandlung auf den Blutdruck von ApoE(-/-)-Mäusen der C57Bl/6-Linie wurde bereits mehrfach beschrieben (97, 98). Hierfür liegt noch keine vollständig gesicherte Erklärung vor. Ein möglicher Ansatz zum Verständnis könnte sein, dass Ang-(1–7) nur eine blutdrucksenkende Wirkung bei Tiermodellen mit schwerer Hypertonie hat und bei normotensiven Tieren begrenzt wirksam zu sein scheint (99, 100). Der durchschnittliche systolische Blutdruck der Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Gruppe war zwar höher als in der ApoE(-/-)-Gruppe, jedoch nicht statistisch signifikant. In der Literatur sind die Ergebnisse für Mas-defiziente Tiermodelle eher inkonsistent (101). Bei Mas(-/-)-Mäusen einer anderen Linie (FVB/N) konnten bereits höhere Blutdruckmessungen verglichen mit Wildtyp-Mäusen gezeigt werden (102, 103). In anderen Arbeiten wiederum konnte kein Unterschied festgestellt werden (104).

Eine methodische Erklärung ist, dass die nichtinvasive *Tail-Cuff*-Blutdruckmessung verglichen mit invasiven hämodynamischen Messungen nicht sensitiv genug für kleine Blutdruckunterschiede ist. Denkbar ist auch ein Zusammenhang mit dem Alter und dem genetischen Hintergrund der Mäuse.

Der in der vorliegenden Arbeit fehlende Einfluss einer Ang-(1–7)-Behandlung auf den arteriellen Blutdruck ermöglicht es, die Wirkung chronischer Ang-(1–7) Behandlung auf die renale Druckantwort unabhängig von einer vorbestehenden Hypertonie bzw. einem hypertonieinduzierten Gefäßschaden zu betrachten.

4.3 Fettreiche Ernährung und Dyslipidämie

Die vasoprotektive Wirkung von Ang-(1–7) ist bereits gut etabliert (105). Dieser Effekt wird durch die Reduktion von Superoxiden und Erhöhung des endothelialen NO über den Mas-Rezeptor vermittelt (64, 106, 107). Auf zellulärer Ebene wurde bereits demonstriert, dass Ang-(1–7) den Ang-II-induzierten Cholesterol-Efflux aus Makrophagen reduziert und dass dieser Effekt über die Inhibition einer p38-Signalkaskade vermittelt wird (108).

Es wurde bereits in einer vorherigen Arbeit unserer Arbeitsgruppe dargestellt, dass die chronische Ang-(1–7)-Behandlung über 6 Wochen keinen Einfluss auf die Konzentration von Gesamtcholesterin und Triglyzeriden im Blutplasma von ApoE(-/-)-Mäusen unter einer zwölfwöchigen fettreichen Ernährung hat (97). Unter den gleichen Bedingungen wurden nun neben Wildtyp- und ApoE(-/-)-Mäusen zusätzlich Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäuse behandelt. Wie erwartet, entwickelten ApoE(-/-)- sowie Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäuse eine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren statistisch signifikant höhere Blutplasmakonzentrationen von Cholesterol und Triglyzeriden.

Die chronische Ang-(1–7)-Behandlung konnte jedoch zu keiner statistisch messbaren Reduktion der Blutplasmaspiegel an Cholesterol und Triglyzeriden führen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Literatur. So konnte eine orale Aufnahme von Ang-(1–7) kombiniert mit fettreicher Nahrung sowohl an Sprague-Dawley-Ratten als auch an FVB/N-Mäusen eine signifikante Reduktion der Plasmaspiegel an Triglyzeriden und Cholesterol zeigen (109–111). Unterschiede im Studiendesign können hier ausschlaggebend gewesen sein, wie z.B. Art der Applikation (oral versus subkutan), Dauer der Applikation (8 versus 12 Wochen), unterschiedliche genetische Linien, sowie gemischte Geschlechter.

Bemerkenswert ist der niedrigere Spiegel an Triglyzeriden in der Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Gruppe verglichen mit der ApoE(-/-)-Gruppe. Das steht in Widerspruch zu anderen Versuchsreihen, bei denen unter Standardernährung Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäuse verglichen mit ApoE(-/-)-Mäusen höhere Blutplasmaspiegel an Triglyzeriden und Cholesterol aufwiesen (112).

Es kann zusammengefasst werden, dass die Ang-(1–7)-abhängige Verbesserung der Endothelfunktion bei ApoE(-/-)-Mäusen in unserer Arbeit unabhängig vom Lipidprofil erreicht wurde.

4.4 Effekt von Ang-(1–7) auf die renale Druckantwort wird über den Mas-Rezeptor vermittelt

In einer vorherigen Arbeit unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass die chronische Behandlung mit Ang-(1–7) die renale Druckantwort in ApoE(-/-)-Mäusen normalisierte. Dieser Effekt scheint durch die Aktivierung des Mas-Rezeptors vermittelt zu sein, da D-Ala-Ang-(1–7), ein spezifischer Mas-Rezeptorantagonist, die Wirkung von Ang-(1–7) wieder aufhob (97). Um diesen vom Mas-Rezeptor abhängigen Effekt weiter zu untersuchen, haben wir eine vergleichbare Versuchsreihe an Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen etabliert. Die

chronische Ang-(1-7)-Behandlung konnte die Ang-II-induzierte renale Druckantwort nicht mehr normalisieren. Dieses Ergebnis spricht eindeutig dafür, dass Ang-(1-7) seine vasoprotektiven Effekte über den Mas-Rezeptor vermittelt.

Eine Ang-(1-7)-Behandlung führt zu einer eNOS-Aktivierung mit erhöhter NO-Produktion, wie bereits an Mäuse-Kardiomyozyten gezeigt werden konnte. Die erhöhte NO-Produktion konnte durch den Mas-Antagonisten A-799 aufgehoben werden. In Mas(-/-)-Kardiomyozyten konnte Ang-(1-7) wiederum keine Erhöhung der NO-Produktion bewirken (113).

In der allgemeinen Forschungsmeinung wird von einem vasodilatativen Effekt einer Ang-(1-7)-Behandlung ausgegangen. Begleitend tritt ein erhöhter Blutfluss, u. a. in den Nieren, auf (50). Im Einzelnen waren die hämodynamischen Effekte einer akuten Ang-(1-7)-Infusion in hypertensiven Schadenmodellen, z. B. in spontan hypertensiven Ratten, geschwächt. Dabei wird angenommen, dass die Ang-II/AT1-Kaskade überwiegt (114). Unsere Arbeit zeigte, dass die akute Ex-vivo-Inkubation für 15 Minuten mit 1µM Ang-(1-7) keinen Einfluss auf die Ang-II-induzierte Druckantwort an der isoliert perfundierten Niere von sowohl ApoE(-/-)- als auch Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen hatte. Es ist bekannt, dass Ang-(1-7) langfristig die Expression von NADPH-Oxidase und somit die ROS-Produktion reduziert und dadurch den chronischen Umbau der Gefäße verhindert. Außerdem erhöht Ang-(1-7) die Expression von eNOS. Die endotheliale Funktion und die Fähigkeit zur adäquaten Vasorelaxation bleiben aufgrund einer intakten NO-Bioverfügbarkeit erhalten (97). Daher gehen wir von einem eher langfristigen vasoprotektiven/atheroprotektiven Effekt der Ang-(1-7)-Behandlung, als von einer akuten vasorelaxierenden Wirkung aus, wie unsere Arbeitsgruppe nachweisen konnte (115, 116).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen gibt es Hinweise dafür, dass Ang-(1-7) eine relative Rezeptoraffinität zum AT1/AT2 hat und seine dem Ang II antagonistische Funktion teilweise auch über den AT2 entfalten kann (120). So wird eine Kolo-kalisierung sowie Heterodimerisierung von Mas und AT2 als potenzielle molekulare Erklärung für die Blutdruckregulation durch Ang-(1-7) diskutiert (72). Da der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Effekt von Ang-(1-7) vollständig in der Mas(-/-)-Maus nicht mehr nachweisbar war, gehen wir davon aus, dass der Mas-Rezeptor der bedeutendste Wirkungsort für Ang-(1-7) ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Genexpression von AT1, AT2, Mas und ACE2 aus dem Nierenparenchym von Wildtyp- und ApoE(-/-)-Mäusen mittels PCR quantifiziert. Die Genexpression war in der ApoE(-/-)-Versuchsreihe gegenüber der Wildtyp-Gruppe nicht verändert. Eine weitere Gruppe von ApoE(-/-)-Mäusen wurde mit Ang-(1-7) chronisch behandelt. Die chronische Ang-(1-7)-Behandlung in ApoE(-/-)-Mäusen führte ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der Genexpression. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie an Wildtyp- und Mas(-/-)-Mäusen, die zeigen konnte, dass eine chronische Behandlung mit Ang-(1-7) keine Veränderung an der Genexpression

von ACE, AT1 und Mas, jedoch eine Überexpression von ACE2 und AT2 bewirkt hat. Ein ähnlicher Effekt wurde durch den AT1-Antagonisten Azilsartan erreicht (117).

4.5 Ang-(1–7) inhibiert über den Mas-Rezeptor eine Aktivierung der p38-Signalkaskade

Bei Hypertonie führt Ang II über eine Steigerung der ROS zu einer Aktivierung der p38-MAPK und damit einhergehend zu einer Verschlechterung der endothelialen Funktion. Durch die fettreiche Ernährung erfahren ApoE(-/-)-Mäuse eine gesteigerte ROS-vermittelte endotheliale Dysfunktion sowie erhöhte Ang-II-induzierte vaskuläre Kontraktilität. Diese erhöhte Kontraktilität entsteht u. a. durch die Phosphorylierung von MAP-Kinasen der p38-Signalkaskade (93, 90).

Durch die chronische Ang-(1–7)-Behandlung wurde die Konzentration von 8-Isoprostan, einem Marker für renalen oxidativen Stress, im Urin von ApoE(-/-)-Mäusen reduziert. Anhand von Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen konnte durch eine chronische Ang-(1–7)-Behandlung aufgrund der Mas-Rezeptor-Defizienz keine Reduktion der 8-Isoprostan-Konzentration im Urin festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die zeigen, dass die Urinkonzentration an 8-Isoprostan bei Mas(-/-)-Mäusen erhöht war (118). Die Reduktion der Konzentration an 8-Isoprostan unter einer Behandlung mit Ang 1–7 kann durch A-779, einen Mas-Rezeptor-Antagonisten, aufgehoben werden (119). Dieses Ergebnis bestätigt, dass chronische Ang-(1–7)-Behandlung die ROS-Konzentration in ApoE(-/-)-Mäusen über den Mas-Rezeptor reduziert.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits darstellen, dass eine akute p38-Inhibition mittels SB203580 die Ang-II-induzierte renale Druckantwort in ApoE(-/-)-Mäusen signifikant reduziert. In Wildtyp-Tieren ist diese reduzierte renale Druckantwort nicht nachweisbar, da die p38-vermittelte Vasokonstriktion bei diesen Tieren wahrscheinlich eine geringe Rolle spielt. Durch eine Mas-Rezeptor-Defizienz soll der Einfluss des Mas-Rezeptors auf den verstärkenden Effekt der p38-MAPK bei der Ang-II-induzierten Druckantwort untersucht werden.

In einer vorherigen Promotionsarbeit unserer Arbeitsgruppe konnte belegt werden, dass der Phosphorylierungsgrad von p38 im Nierenkortex von ApoE(-/-)-Mäusen signifikant höher als bei Wildtyp-Mäusen ist. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass dieser Phosphorylierungsgrad im Nierenkortex durch die chronische Ang-(1–7)-Behandlung von ApoE(-/-)-Mäusen gesenkt werden kann (58). Anhand von einer weiteren Vergleichsgruppe konnte diese reduzierte Phosphorylierung im Nierenkortex von Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterstützt unsere Beobachtung, dass die vasoprotektive Wirkung von Ang-(1–7) hauptsächlich über den Mas-Rezeptor vermittelt wird.

An Mas(-/-)-Mäusen konnte der p38-Inhibitor erst in den höheren Ang-II-Konzentrationen eine statistisch signifikante Reduktion der renalen Druckantwort zeigen, während bei Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen der reduzierende Effekt ähnlich signifikant ausfiel wie bei ApoE(-/-)-Mäusen.

Die Dyslipidämie bei ApoE-Defizienz verstärkt die endotheliale Dysfunktion so stark, dass diese auch bei Abwesenheit des Mas-Rezeptors in Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen von einer p38-Inhibition profitiert und zu einer reduzierten Ang-II-vermittelten Druckantwort führt. Die p38-MAPK-Signalkaskade ist, wie bereits beschrieben, ein komplexer intrazellulärer Signaltransduktionsweg mit vielen Zwischenschritten. Diese Signalkaskade kann auch ohne die Mitwirkung des Mas-Rezeptors weitergeleitet werden.

Es ist bekannt, dass die p38-Signalkaskade eine Rolle bei der Verstärkung der vaskulären Kontraktilität durch eine Modellierung der Actin-Myosin-Interaktion in VSMC bewirkt (120). In einer Studie an VSMC wurde die vasoprotektive Rolle von Ang-(1–7) am Mas-Rezeptor bei der Unterdrückung der ROS-abhängigen MAPK-Signalwege festgestellt. Es zeigte sich, dass die durch Ang II erhöhte Phosphorylierung von verschiedenen MAPK in VSMC durch einen AT1-Antagonisten (Losartan) blockiert wurde und weniger durch einen Mas-Antagonisten (A-779). In der gleichen Studie wurde außerdem herausgefunden, dass die Blockade des AT1, aber nicht des Mas-Rezeptors, offensichtlich die durch Ang-II-induzierte Proliferation, Migration und Entzündungsreaktionen in VSMC verringerte (121). Diese anhand von Zellkulturexperimenten dargestellten Ergebnisse zur inferioren Rolle des Mas-Rezeptors bei der Unterdrückung der MAPK lassen sich nur limitiert auf *in-vivo/ex-vivo-Untersuchungen* am gesamten Organ übertragen, da dort weitere interzelluläre Interaktionen nicht ausgeschlossen sind.

Anhand von Zellkulturexperimenten mit vaskulären Endothelzellen wurde gezeigt, dass Ang II die Expression von VCAM-1, einem Indikator-Protein früher atherosklerotischer Veränderungen, steigert, während die alleinige Behandlung mit Ang-(1–7) keinen Effekt auf die VCAM-1-Expression hatte. In Anwesenheit signifikant wirksamer Ang-II-Konzentrationen konnte Ang-(1–7) die Ang-II-induzierte VCAM-1-Expression reduzieren. Dieser Effekt konnte wiederum mittels Mas-Antagonisierung aufgehoben werden (122).

Ang-(1–7) wirkt außerdem auf zahlreiche Ang-II-vermittelte Signalkaskaden wie ERK1/2, c-Src, NAD(P)H-Oxidase, SHP-2, Nox2/ROS, PI3K/NO ebenso wie auf die p38-Signalkaskade (66, 64, 123). So wird sowohl die Signalkaskade über c-Src als auch SHP-2 durch den spezifischen Mas-Antagonisten A-779 inhibiert (66). Es kann zusammengefasst werden, dass Ang-(1–7) über den Mas-Rezeptor neben der p38-Signalkaskade weitere Signalkaskaden beeinflusst, die die Effekte von Ang II auf die Gefäßfunktion abschwächen können.

4.6 Eine p38-Inhibition reduziert NO-abhängig die Ang-II-induzierte renale Druckantwort

Die endotheliale Dysfunktion geht mit einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit einher. Ang II kann über den AT1 die NAD(P)H-Oxidase aktivieren, die wiederum die ROS-Produktion in den Gefäßen von ApoE(-/-)-Mäusen unter fettreicher Ernährung steigert (124). Übermäßige Konzentration an ROS vermindert auf mehreren Wegen die Bioverfügbarkeit von Stickstoffoxid, indem dieses zu Nitrite oder Peroxynitrite oxidiert oder die Funktion der eNOS entkoppelt, die dann die ROS-Konzentration weiter erhöht (125).

Oxidativer Stress steigert die Aktivierung von MAPK, u. a. der p38-Signalkaskade, die wiederum die ROS-Wirkung über die Expression von NAD(P)H-Oxidasen verstärken (126). Dadurch sinkt die NO-Bioverfügbarkeit. In unserer Arbeit zeigte eine p38-Inhibition eine Reduktion der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort bei sowohl ApoE(-/-)-Mäusen als auch Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen. Die durch p38-Inhibition reduzierte Druckantwort in unserer Versuchsreihe wurde auch in Abwesenheit des Mas-Rezeptors erreicht.

Durch die akute Behandlung mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME zeigten wir, dass die Ang-II-induzierte renale Druckantwort bei ApoE(-/-)-Mäusen signifikant gesteigert und dadurch NO-abhängig ist. Die gesteigerte Vasokonstriktion ist durch das Fehlen von NO erklärbar. Durch den Anstieg der renalen Druckantwort unter eNOS-Inhibition bestätigten wir die tatsächliche Anwesenheit physiologischer Konzentration von Stickstoffmonoxid in unseren Versuchen an isoliert perfundierten Nieren. Außerdem zeigte sich anhand einer Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Versuchsreihe, dass die eNOS-Inhibition auch in Abwesenheit des Mas-Rezeptors signifikant die Ang-II-induzierte renale Druckantwort steigert.

Unter der Wirkung der eNOS-Inhibition mittels L-NAME konnte eine akute p38-Inhibition keine signifikant messbare Vasorelaxation erzielen. Die Druckniveaus unter gleichzeitiger Behandlung mit L-NAME und SB203580 waren signifikant höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe und tendenziell niedriger als unter alleiniger eNOS-Hemmung. Dieser Effekt spricht dafür, dass die Inhibition der p38-Signalkaskade ihren vasorelaxierenden Effekt ohne NO nicht vermitteln kann.

Die Abwesenheit des Mas-Rezeptors in unserer Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Versuchsreihe hatte keinen Effekt auf die durch L-NAME gesteigerte renale Druckantwort in Vergleich zu den ApoE(-/-)-Mäusen. In einer anderen Studie reduzierte Ang-(1-7) zwar die Ang-II-abhängige Produktion von superoxiden Anionen, die alleinige Ang-(1-7)-Behandlung konnte jedoch die Spiegel an superoxiden Anionen nicht reduzieren (127). Interessanterweise konnte in der gleichen Arbeit die durch Ang-(1-7) reduzierte Ang-II-vermittelte Produktion von Superoxiden mit einer gleichzeitigen Behandlung mittels L-NAME nicht verändert werden, sodass eine vom eNOS-Inhibitor unabhängige Komponente beim Ang-(1-7)-Wirkmechanismus angenommen wird.

Es lässt sich also festhalten, dass eine p38-Inhibition eine reduzierte renale Druckantwort in der isoliert perfundierten Niere durch eine Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit erreicht. Da bereits bekannt ist, dass eine Aktivierung des Mas-Rezeptors mit einem Anstieg von NO einhergeht, bestärkt dieses Ergebnis die Annahme, dass Ang-(1–7) die Bioverfügbarkeit von NO über den Mas-Rezeptor erhöht. Fehlt NO vollständig aufgrund einer Synthesehemmung durch einen eNOS-Inhibitor, so kann eine Mas-Defizienz keinen zusätzlichen Effekt auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort haben. Die vasokonstriktorische Wirkung einer eNOS-Inhibition lässt sich also auch bei Mas-Defizienz beobachten.

4.7 Schlussfolgerungen

Durch die Verwendung der Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäuse ist es gelungen, den Einfluss des Mas-Rezeptors auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort zu untersuchen. Der Mas-Rezeptor gilt als der Hauptwirkungsort für Ang-(1–7), obwohl Interaktionen und teilweise synergistische Wirkungen an weiteren Rezeptoren wie AT1 sowie AT2 beschrieben wurden. Durch die Abwesenheit des Mas-Rezeptors war es möglich, die vasoprotektiven Funktionen von Ang-(1–7) in Abhängigkeit vom Rezeptor zu verifizieren.

Unter einer chronischen Ang-(1–7)-Behandlung bei ApoE(-/-)-Mäusen konnten wir keine Veränderung des systolischen Blutdrucks feststellen. Der durchschnittliche systolische Blutdruck unterschied sich nicht zwischen Wildtyp-Tieren und Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen. Die fehlende Blutdruckabweichung war eine Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der renalen Druckantwort im Rahmen der später durchgeführten isoliert perfundierten Nierenversuche.

Außerdem zeigte eine chronische Ang-(1–7)-Behandlung keinen signifikanten Effekt auf die Lipidspiegel nach fettreicher Ernährung sowohl bei ApoE(-/-)- als auch Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen. Der Plasmaspiegel von Triglyzeriden und Cholesterol war jedoch gegenüber Wildtyp-Mäusen erhöht. Dieser Befund ist nützlich für die Erforschung der Folgen der Atherosklerose auf das kardiovaskuläre System in künftigen Arbeiten.

Bei ApoE(-/-)-Mäusen sind mehrere vasoprotektive Wirkungen einer chronischen Ang-(1–7)-Behandlung nachgewiesen worden. Diese Effekte waren in Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen aufgehoben. So führte die chronische Ang-(1–7)-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort in isoliert perfundierten Nierenversuchen. Diese vasoreaktive Reduktion wird als Normalisierung der endothelialen Dysfunktion gedeutet und fehlte unter gleichen Versuchsbedingungen in Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen.

Eine chronische Ang-(1–7)-Behandlung führte außerdem zu einer Reduktion der 8-Isoprostan-Konzentration im Urin von ApoE(-/-)-Mäusen. In Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen

ließ sich unter chronischer Ang-(1–7)-Behandlung keine verminderte 8-Isoprostan-Konzentration nachweisen.

Die p38-Signalkaskade spielt eine wesentliche Rolle bei der Ang-II-induzierten Vasokonstriktion. Unter chronischer Ang-(1–7)-Behandlung ist im Nierenkortex von ApoE(-/-)-Mäusen eine reduzierte Aktivierung der p38-MAPK festgestellt worden. Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäuse wiesen hierunter eine statistisch signifikante höhere Aktivierung der p38-Signalkaskade gegenüber ApoE(-/-)-Mäusen auf. Unter p38-Inhibition konnte die Reduktion der Ang-II-induzierten renalen Druckantwort in Mas(-/-)-Mäusen nicht im gleichen Ausmaß statistisch signifikant nachgewiesen werden, wie dies in ApoE(-/-)-Mäusen bereits deutlich gezeigt werden konnte. Dieses Ergebnis spricht für die Rolle des Mas-Rezeptors bei der Hemmung der p38-MAPK-Aktivität.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die abgeschwächte Ang-II-vermittelte Vasokonstriktion unter p38-Inhibition durch NO vermittelt wird. So führt eine eNOS-Inhibition zu einer Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit und zu einer Aufhebung des abschwächenden Effektes einer p38-Inhibition auf die Ang-II-vermittelte renale Druckantwort in ApoE(-/-)- und Mas(-/-)/ApoE(-/-)-Mäusen. In vollständiger Abwesenheit von NO hat eine Mas-Defizienz keinen zusätzlichen vasoreaktiven Effekt auf die Ang-II-induzierte renale Druckantwort. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die vasoprotektive Funktion von Ang-(1–7) am Mas-Rezeptor von einer Erhöhung der NO-Konzentration abhängt.

Zusammenfassend beweisen diese Experimente, dass eine gesteigerte p38-MAPK-Aktivität die Ang-II-induzierte Druckantwort in den Nierenarterien von ApoE(-/-)-Mäusen erhöht. Die chronische Ang-(1–7)-Behandlung reduziert diese Reaktion. Ang-(1–7) verbessert die endotheliale Dysfunktion durch Reduktion der p38-MAPK-Aktivität und normalisiert dabei NO-abhängig die Gefäßfunktion.

Eine Mas-Rezeptor-Defizienz hebt die vorteilhaften Wirkungen von Ang-(1–7) auf die Gefäßfunktion auf. Dies weist auf die vasoprotektive Rolle des Mas-Rezeptors im hypercholesterinämischen ApoE(-/-)-Tiermodell hin. Somit könnte der Mas-Rezeptor perspektivisch ein vielversprechendes Objekt in der Erforschung der Atherosklerose mit Hinblick auf ein besseres Verständnis zur Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen werden.

5 Literaturverzeichnis

1. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2019; 290:140–205.
2. Tuñón J, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tarín N, Egido J. Common pathways of hypercholesterolemia and hypertension leading to atherothrombosis: the need for a global approach in the management of cardiovascular risk factors. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3(4):521–6.
3. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients* 2013; 5(4):1218–40.
4. Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X et al. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacol Rev* 2021; 73(3):924–67.
5. Gimbrone MA, García-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2013; 22(1):9–15.
6. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420(6917):868–74.
7. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(5):1262–75.
8. Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1(3):183–98.
9. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789):373–6. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6253831/>.
10. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(24):9265–9.
11. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333(6174):664–6.
12. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267(22):15274–6.
13. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983; 52(3):352–7.

14. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 2010; 62(3):525–63.
15. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 2001; 104(4):448–54. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11468208/>.
16. d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice. *Stroke* 2001; 32(11):2658–64.
17. Scopus preview - Scopus - Document details - Apolipoprotein E and atherosclerosis; 2022 [cited 2022 May 27]. Available from: URL: https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0034087291&origin=inward&txGid=255dae79ffd238449334b278eb41004c&featureToggles=FEATURE_NEW_DOC_DETAILS_EXPORT:1.
18. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(6):1006–14.
19. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11(3):243–51.
20. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240(4852):622–30.
21. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71(2):343–53.
22. Emini Veseli B, Perrotta P, Meyer GRA de, Roth L, van der Donckt C, Martinet W et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 2017; 816:3–13.
23. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(10):4471–5.
24. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S156-61.
25. Smith JD, Breslow JL. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med* 1997; 242(2):99–109.
26. Nehme A, Zouein FA, Zayeri ZD, Zibara K. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *J Cardiovasc Dev Dis* 2019; 6(2).
27. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med* 2019; 33(2):363–82.

28. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993; 87(6):1816–28.
29. Wassmann S, Nickenig G. Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease. *J Hypertens Suppl* 2006; 24(1):S15-21.
30. Tsai EJ, Kass DA. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther* 2009; 122(3):216–38.
31. Carey RM, Jin X, Wang Z, Siragy HM. Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT2) angiotensin receptor. *Acta Physiol Scand* 2000; 168(1):65–71.
32. Ranjit A, Khajehpour S, Aghazadeh-Habashi A. Update on Angiotensin II Subtype 2 Receptor: Focus on Peptide and Nonpeptide Agonists. *Mol Pharmacol* 2021; 99(6):469–87.
33. D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension* 2005; 46(6):1347–54.
34. Xu J, Sun Y, Carretero OA, Zhu L, Harding P, Shesely EG et al. Effects of cardiac overexpression of the angiotensin II type 2 receptor on remodeling and dysfunction in mice post-myocardial infarction. *Hypertension* 2014; 63(6):1251–9.
35. Namsolleck P, Recarti C, Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Curr Hypertens Rep* 2014; 16(2):416. Available from: URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11906-013-0416-6>.
36. Kljajic ST, Widdop RE, Vinh A, Welungoda I, Bosnyak S, Jones ES et al. Direct AT₂ receptor stimulation is athero-protective and stabilizes plaque in apolipoprotein E-deficient mice. *Int J Cardiol* 2013; 169(4):281–7.
37. Szttechman D, Czarzasta K, Cudnoch-Jedrzejewska A, Szczepanska-Sadowska E, Zera T. Aldosterone and mineralocorticoid receptors in regulation of the cardiovascular system and pathological remodelling of the heart and arteries. *J Physiol Pharmacol* 2018; 69(6).
38. Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(8):621–36.
39. Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* 2001; 103(3):448–54.
40. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflam* 2014; 2014:689360.
41. Nickenig G, Harrison DG. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002; 105(3):393–6.
42. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74(6):1141–8.

43. Becher UM, Endtmann C, Tiyerili V, Nickenig G, Werner N. Endothelial damage and regeneration: the role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Curr Hypertens Rep* 2011; 13(1):86–92.
44. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87(5):E1-9.
45. Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension* 1988; 11(2 Pt 2):I153-7.
46. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(11):4095–8.
47. Pereira MGAG, Souza LL, Becari C, Duarte DA, Camacho FRB, Oliveira JAC et al. Angiotensin II-independent angiotensin-(1-7) formation in rat hippocampus: involvement of thimet oligopeptidase. *Hypertension* 2013; 62(5):879–85.
48. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J* 2004; 383(Pt 1):45–51.
49. Allred AJ, Diz DI, Ferrario CM, Chappell MC. Pathways for angiotensin-(1---7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279(5):F841-50.
50. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* 2018; 98(1):505–53.
51. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, Buhr I de et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(14):8258–63.
52. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986; 45(5):711–9.
53. Pinheiro SVB, Ferreira AJ, Kitten GT, da Silveira KD, da Silva DA, Santos SHS et al. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int* 2009; 75(11):1184–93.
54. Silveira KD, Barroso LC, Vieira AT, Cisalpino D, Lima CX, Bader M et al. Beneficial effects of the activation of the angiotensin-(1-7) MAS receptor in a murine model of adriamycin-induced nephropathy. *PLoS One* 2013; 8(6):e66082.
55. Santos SHS, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AVM, Pôrto LCJ, Alvarez-Leite JI et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemetic metabolism. *Diabetes* 2008; 57(2):340–7.

56. Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension* 2008; 51(2):574–80.
57. Toton-Zuranska J, Gajda M, Pyka-Fosciak G, Kus K, Pawlowska M, Niepsuj A et al. AVE 0991-angiotensin-(1-7) receptor agonist, inhibits atherogenesis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61(2):181–3.
58. Potthoff SA, Föhling M, Clasen T, Mende S, Ishak B, Suvorava 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(2):265–72.
59. Tilman Clasen. Angiotensin-(1-7) normalisiert die gesteigerte vaskuläre Reaktivität in ApoE-defizienten Mäusen durch Regulation der p38 MAP-Kinase [Dissertation]. Heinrich-Heine-Universität; 2016.
60. Santos RAS, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga ANG, Almeida AP de, Campagnole-Santos MJ et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* 2004; 17(3):292–9.
61. Ferreira AJ, Pinheiro SVB, Castro CH, Silva GAB, Silva ACSE, Almeida AP et al. Renal function in transgenic rats expressing an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein. *Regul Pept* 2006; 137(3):128–33.
62. Santos SHS, Braga JF, Mario EG, Pôrto LCJ, Da Rodrigues-Machado MG, Murari A et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(5):953–61.
63. Thomas MC, Pickering RJ, Tsorotes D, Koitka A, Sheehy K, Bernardi S et al. Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. *Circ Res* 2010; 107(7):888–97.
64. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 2007; 49(1):185–92.
65. Giani JF, Mayer MA, Muñoz MC, Silberman EA, Höcht C, Taira CA et al. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(2):E262-71.
66. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RAS, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension* 2007; 50(6):1093–8.
67. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(4):H1560-6.
68. Zhu Z, Zhong J, Zhu S, Liu D, van der Giet M, Tepel M. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40(5):693–700.

69. Abbas A, Gorelik G, Carhini LA, Scicli AG. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension* 1997; 30(2 Pt 1):217–21.
70. Leonhardt J, Villela DC, Teichmann A, Münter L-M, Mayer MC, Mardahl M et al. Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension* 2017; 69(6):1128–35.
71. Patel SN, Ali Q, Samuel P, Steckelings UM, Hussain T. Angiotensin II Type 2 Receptor and Receptor Mas Are Colocalized and Functionally Interdependent in Obese Zucker Rat Kidney. *Hypertension* 2017; 70(4):831–8.
72. Patel S, Hussain T. Dimerization of AT2 and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep* 2018; 20(5):41.
73. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res* 2013; 112(8):1104–11.
74. Tetzner A, Gebolys K, Meinert C, Klein S, Uhlich A, Trebicka J et al. G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension* 2016; 68(1):185–94.
75. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(2):H741-51.
76. Su Z, Zimpelmann J, Burns KD. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int* 2006; 69(12):2212–8.
77. Wu J-G, Tang H, Liu Z-J, Ma Z-F, Tang A-L, Zhang X-J et al. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular remodelling in rat jugular vein grafts via reduced ERK1/2 and p38 MAPK activity. *The Journal of international medical research* 2011; 39(6):2158–68. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22289531/>.
78. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radzlejewska E, Morgenbesser SD et al. ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65(4):663–75.
79. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75(1):50–83.
80. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22(2):153–83.
81. Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt CA, Ebert D, Geppert TD et al. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* 1993; 268(7):5097–106.

82. Martínez-Limón A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, Nadal E de. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2020; 21(6).
83. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265(5173):808–11.
84. Enslen H, Brancho DM, Davis RJ. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J* 2000; 19(6):1301–11.
85. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Dérijard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996; 16(3):1247–55.
86. Li J, Miller EJ, Ninomiya-Tsuji J, Russell RR, Young LH. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart. *Circ Res* 2005; 97(9):872–9.
87. Rudd CE. MAPK p38: alternative and nonstressful in T cells. *Nat Immunol* 2005; 6(4):368–70.
88. Canovas B, Nebreda AR. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22(5):346–66.
89. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. 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(24):15022–9.
90. Komers R, Schutzer W, Xue H, Oyama TT, Lindsley JN, Anderson S. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on blood pressure, renal hemodynamics, and renal vascular reactivity in normal and diabetic rats. *Transl Res* 2007; 150(6):343–9.
91. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Tamaki T. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens Res* 2001; 24(3):251–61.
92. Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235(3):533–8.
93. 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. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(2):C494-9.
94. Zhang Y, Wang Y, Zhou D, Zhang L-S, Deng F-X, Shu S et al. Angiotensin II deteriorates advanced atherosclerosis by promoting MerTK cleavage and impairing efferocytosis through the AT1R/ROS/p38 MAPK/ADAM17 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2019; 317(4):C776-C787.
95. Chandra M, Panchatcharam M, Miriyala S. Biomarkers in ROS and Role of Isoprostanes in Oxidative Stress. In: Ahmad R, editor. *Free Radicals and Diseases*. Erscheinungsort nicht ermittelbar: IntechOpen; 2016.

96. d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC et al. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(6):1017–22.
97. Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I, Mergia E, Clasen T, Friedrich S et al. Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoproteinE-deficient mice. *Br J Pharmacol* 2011; 163(5):974–83.
98. Yang J, Sun Y, Dong M, Yang X, Meng X, Niu R et al. Comparison of angiotensin-(1-7), losartan and their combination on atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* 2015; 240(2):544–9.
99. Gomes ERM, Lara AA, Almeida PWM, Guimarães D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ et al. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension* 2010; 55(1):153–60.
100. Rentzsch B, Todiras M, Iliescu R, Popova E, Campos LA, Oliveira ML et al. Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension* 2008; 52(5):967–73.
101. Jiang F, Yang J, Zhang Y, Dong M, Wang S, Zhang Q et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11(7):413–26.
102. Rabello Casali K, Ravizzoni Dartora D, Moura M, Bertagnolli M, Bader M, Haibara A et al. Increased vascular sympathetic modulation in mice with Mas receptor deficiency. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2016; 17(2):1470320316643643.
103. Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgerit J, Bader M et al. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens* 2008; 2(6):418–24. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20409925/>.
104. Walther T, Wessel N, Kang N, Sander A, Tschöpe C, Malberg H et al. Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(1):1–9.
105. Silva GM, França-Falcão MS, Calzerra NTM, Luz MS, Gadelha DDA, Balarini CM et al. Role of Renin-Angiotensin System Components in Atherosclerosis: Focus on Ang-II, ACE2, and Ang-1-7. *Front Physiol* 2020; 11:1067.
106. Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(8):1606–13.
107. Pignone A, Del Rosso A, Brosnihan KB, Perfetto F, Livi R, Fiori G et al. Reduced circulating levels of angiotensin-(1--7) in systemic sclerosis: a new pathway in the dysregulation of endothelial-dependent vascular tone control. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(10):1305–10.

108. Yang H-Y, Bian Y-F, Xiao C-S, Liang B, Zhang N, Gao F et al. Angiotensin-(1-7) stimulates cholesterol efflux from angiotensin II-treated cholesterol-loaded THP-1 macrophages through the suppression of p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling. *Mol Med Rep* 2015; 12(1):1387–92.
109. Oral Angiotensin-(1–7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-κB in rats fed with high-fat diet; 2022 [cited 2022 Sep 19]. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978113002015?via%3Dihub>.
110. Feltenberger JD, Andrade JMO, Paraíso A, Barros LO, Filho ABM, Sinisterra RDM et al. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Hypertension* 2013; 62(2):324–30.
111. Santos SHS, Andrade JMO, Fernandes LR, Sinisterra RDM, Sousa FB, Feltenberger JD et al. Oral Angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-κB in rats fed with high-fat diet. *Peptides* 2013; 46:47–52.
112. Silva AR, Aguilar EC, Alvarez-Leite JI, da Silva RF, Arantes RME, Bader M et al. Mas receptor deficiency is associated with worsening of lipid profile and severe hepatic steatosis in ApoE-knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013; 305(11):R1323-30.
113. Dias-Peixoto MF, Santos RAS, Gomes ERM, Alves MNM, Almeida PWM, Greco L et al. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 2008; 52(3):542–8.
114. Barry EF, O'Neill J, Abdulla MH, Johns EJ. The renal excretory responses to acute renal interstitial angiotensin (1-7) infusion in anaesthetised spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2021; 48(12):1674–84. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34375480/>.
115. Yang G, Istas G, Höges S, Yakoub M, Hendgen-Cotta U, Rassaf T et al. Angiotensin-(1-7)-induced Mas receptor activation attenuates atherosclerosis through a nitric oxide-dependent mechanism in apolipoproteinE-KO mice. *Pflugers Arch* 2018; 470(4):661–7. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29352340/>.
116. Stegbauer J, Thatcher SE, Yang G, Bottermann K, Rump LC, Daugherty A et al. Mas receptor deficiency augments angiotensin II-induced atherosclerosis and aortic aneurysm ruptures in hypercholesterolemic male mice. *J Vasc Surg* 2019; 70(5):1658-1668.e1.
117. Ohshima K, Mogi M, Nakaoka H, Iwanami J, Min L-J, Kanno H et al. Possible role of angiotensin-converting enzyme 2 and activation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin-(1-7) in improvement of vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension* 2014; 63(3):e53-9.
118. Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgerit J, Bader M et al. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens* 2008; 2(6):418–24.

119. Zaman A, Banday AA. Angiotensin (1-7) protects against renal ischemia-reperfusion injury via regulating expression of NRF2 and microRNAs in Fisher 344 rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2022; 323(1):F33-F47.
120. Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT. Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(6):H1899-907.
121. Zhang F, Ren X, Zhao M, Zhou B, Han Y. Angiotensin-(1-7) abrogates angiotensin II-induced proliferation, migration and inflammation in VSMCs through inactivation of ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways. *Sci Rep* 2016; 6(1):34621. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/srep34621>.
122. Zhang F, Ren J, Chan K, Chen H. Angiotensin-(1-7) regulates Angiotensin II-induced VCAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(2):642–6.
123. Xiao X, Zhang C, Ma X, Miao H, Wang J, Liu L et al. Angiotensin-(1-7) counteracts angiotensin II-induced dysfunction in cerebral endothelial cells via modulating Nox2/ROS and PI3K/NO pathways. *Exp Cell Res* 2015; 336(1):58–65.
124. Doran DE, Weiss D, Zhang Y, Griendling KK, Taylor WR. Differential effects of AT1 receptor and Ca²⁺ channel blockade on atherosclerosis, inflammatory gene expression, and production of reactive oxygen species. *Atherosclerosis* 2007; 195(1):39–47.
125. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 2010; 459(6):923–39.
126. Goettsch C, Goettsch W, Muller G, Seebach J, Schnittler H-J, Morawietz H. Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 MAPK in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380(2):355–60.
127. Polizio AH, Gironacci MM, Tomaro ML, Peña C. Angiotensin-(1-7) blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production. *Pharmacol Res* 2007; 56(1):86–90.

Danksagung

Zuallererst bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Lars Christian Rump, der mir den Zugang in die experimentelle Nephrologie ermöglicht hat. Ein außerordentlicher Dank geht an Univ. Prof. Dr. med. Johannes Stegbauer, der mein Projekt über all die Jahre entscheidend betreut und bis zum Erfolg gestaltet hat. Vor allem danke ich ihm für die Geduld, die er für mich vom ersten Tag bis zur Abgabe bei jeder Fragestellung erbracht hat. Während meiner Arbeit im Labor hatte vor allem Herr PD. Dr. med. Sebastian Potthoff mich durch die verschiedenen Schritte der tierexperimentellen Forschung begleitet. Ohne seine Unterstützung hätte ich meine Arbeitsergebnisse nicht erreichen können. Für zufriedenstellende Ergebnisse benötigte ich eine nachhaltige Einarbeitung in die Welt und Vielfalt der experimentellen Arbeit. Daher geht ein besonderer Dank an die Hauptsäulen der experimentellen Nephrologie: Blanka Duvnjak, Christina Schwandt, und Nicola Nuhr, die tagtäglich für meine Arbeitssicherheit, die Materiallogistik, die technischen Mittel, und das richtige *Know-How* im Labor gesorgt haben. Auch danke ich Ihnen, dass ich unter ihrer Anleitung die Arbeit an *Western Blot* sowie RT PCR in mein Projekt implementieren durfte.

Ich danke allen Mitstreitende für jeden Tipp und Trick im Laboralltag und für die fachliche und moralische Unterstützung. Zum Schluss danke ich alle Freunde, Verwandte, Arbeitskolleg*Innen, sowie Mitarbeiter*Innen des Medical Research School Düsseldorf, die mich jahrelang ermutigt haben die Promotionsarbeit erfolgreich abzuschließen.