

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rolle der p38 MAPK bei der stärkeren Angiotensin II-Antwort
afferenter Arteriolen nach Hypoxie/Reoxygenierung,
Noradrenalin- sowie H₂O₂-Behandlung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Amira Al-Masri

aus Halle/Saale

Datum der Promotion: 05.06.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Zusammenfassung.....	7
2.1	Abstrakt	7
2.2	Abstract	8
3	Einleitung	9
3.1	Akutes Nierenversagen	9
3.2	Pathophysiologie des akuten Nierenversagens.....	10
3.2.1	Bedeutung von Ischämie / Hypoxie	10
3.2.2	Renale Vaskularisation und Perfusion.....	13
3.2.3	Endothel und Hypoxie	14
3.2.4	Vasokonstriktoren.....	15
3.2.5	p38 MAPK	18
3.2.6	Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies	19
3.3	Physiologie der Kontraktion glatter Muskelzellen	20
3.3.1	Calcium-abhängiger Signalweg.....	20
3.3.2	Calcium-unabhängiger Signalweg.....	21
3.3.2.1	Proteinkinase C-vermittelte Kontraktion.....	22
3.3.2.2	MLC ₂₀ -unabhängige Kontraktion.....	24
3.4	Hypothesen und Fragestellungen.....	24
4	Methoden und Materialien	26
4.1	Verwendete Materialien.....	26
4.2	Versuchstiere	26
4.3	Isolation präglomerulärer Gefäße.....	27
4.3.1	Eisenoxidperfusion für molekularbiologische Untersuchungen	27
4.3.2	Gefäßpräparation für Perfusionsexperimente.....	28

INHALTSVERZEICHNIS

4.4	Molekularbiologische Analysen	28
4.4.1	Behandlung der Proben für Hypoxie.....	28
4.4.2	Behandlung der Proben für H ₂ O ₂	29
4.4.3	Proteinbestimmung mit SDS-PAGE und Western Blot.....	29
4.4.3.1	Aufarbeitung der GefäÙe nach Hypoxie/Reoxygenierung.....	30
4.4.3.2	Aufbereitung der H ₂ O ₂ -behandelten GefäÙe.....	33
4.5	Perfusionsexperimente.....	34
4.5.1	Untersuchungen zu Hypoxieeffekten.....	34
4.5.2	Untersuchungen zu oxidativem Stress	34
4.6	Polymerase-Kettenreaktion	35
4.6.1	RNA-Präparation	35
4.6.2	Primeroptimierung	36
4.6.3	Expressionsanalysen der p38 MAPK-Isoformen	37
4.7	Datenerfassung und statistische Auswertung.....	39
5	Ergebnisse	40
5.1	Polymerase-Kettenreaktion	40
5.1.1	Expressionsanalysen der p38 MAPK-Isoformen in verschiedenen Geweben ..	40
5.1.2	Expressionsanalysen der p38 MAPK-Isoformen Expression in Arteriolen.....	40
5.2	Kontraktile Funktion afferenter Arteriolen	41
5.2.1	Hypoxie/Reoxygenierung	41
5.2.2	Perfusion nach Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid	45
5.3	Expression von p38 MAPK, MYPT1, MLC ₂₀ , Hsp27, MK-2.....	46
5.3.1	Hypoxie/Reoxygenierung und Noradrenalin	46
5.3.1.1	Verhalten der p38 MAPK	47
5.3.1.2	Verhalten der MLC ₂₀	48
5.3.1.3	Verhalten der MYPT1	49
5.3.2	Oxidativer Stress	49

INHALTSVERZEICHNIS

5.3.2.1	Verhalten der p38 MAPK	50
5.3.2.2	Verhalten der MLC ₂₀	50
6	Diskussion	52
6.1	Hypoxie/Reoxygenierung	52
6.2	Hypoxie/Reoxygenierung und Noradrenalin	55
6.3	p38 MAPK Signalwege.....	56
6.3.1	p38 MAPK	56
6.3.2	MYPT1	57
6.3.3	MLC ₂₀	58
6.4	Oxidativer Stress	60
6.5	p38 MAPK und oxidativer Stress	61
6.5.1	p38 MAPK	61
6.5.2	MLC ₂₀	62
7	Literaturverzeichnis	65
8	Eidesstattliche Versicherung	79
9	Lebenslauf	80
10	Danksagung.....	81

1 Abkürzungsverzeichnis

AKIN	Acute Kidney Injury Network
Ang II	Angiotensin II
ANV	akutes Nierenversagen
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F-12	Ham's F-12 Medium
g	Erdbeschleunigung ($1 \text{ g} = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen
Hsp27	Hitzeschockprotein, Molekulargewicht 27 kDa
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
M	Molar, entspricht mol/l
MAPK	mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MK-2	MAPK-aktivierte-Proteinkinase 2
MLC ₂₀	leichte Myosinkette, Molekulargewicht 20 kDa
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MYPT	Myosin phosphatase targeting protein, Untereinheit der MLCP
NA	Noradrenalin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
P-Hsp27	phosphorylierte Form des Hitzeschockproteins
P-MK-2	phosphorylierte Form der mitogen-aktivierte-Proteinkinase-aktivierten-Proteinkinase 2
P-MLC ₂₀	phosphorylierte Form der leichten Myosinkette
P-MYPT	phosphorylierte Form des Myosin phosphatase targeting proteins
P-p38	phosphorylierte Form von p38
PSS	physiologische Salzlösung
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage Kidney Disease (Stufen des akuten Nierenversagens)
RNA	Ribonukleinsäure
ROK	Rho Kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VSMC	glatte Muskelzellen von Gefäßen (vascular smooth muscle cells)

2 Zusammenfassung

2.1 Abstrakt

Ziel: Hypoxie mit Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie Aktivierung des sympathoadrenergen Systems sind wichtige Komponenten der Pathogenese des akuten Nierenversagens. Wir prüften die Hypothese, dass akute Hypoxie/Reoxygenierung mit Bildung von ROS die Antwort glatter Gefäßmuskelzellen von afferenten Arteriolen (AA) auf Angiotensin II (Ang II) erhöht und dass dies eine Aktivierung der p38 MAPK und MYPT1 sowie verstärkte Phosphorylierung der MLC₂₀ einschließt.

Methodik: Die kontraktile Funktion isolierter, perfundierter AA von C57BL/6 Mäusen wurde unter isotonischen Bedingungen untersucht. Zur Erzeugung einer Hypoxie wurden die Gefäße 60 Minuten mit 95 % N₂ und 5 % CO₂ begast. Die Reoxygenierungszeit (Begasung mit Carbogen) betrug 10 Minuten. Das ROS-Protokoll bestand aus 10 Minuten Perfusion mit H₂O₂ (10⁻⁵ mol/l) bzw. DMEM/F-12 als Kontrolle. In beiden Protokollen schlossen sich Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Ang II an. Die Expression der p38 MAPK, MLC₂₀ und MYPT1 bzw. deren Phosphorylierung wurden in präglomerulären Arteriolen von C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit Hypoxie bzw. Carbogen, auch in Kombination mit Noradrenalin (NA, 10⁻⁹ mol/l), untersucht.

Ergebnisse: Hypoxie/Reoxygenierung erhöhte die Ang II-Sensitivität, NA während Hypoxie oder während Kontrollbedingungen verstärkte die maximale Konstriktion. H₂O₂ verstärkte ebenfalls die Gefäßantwort auf Ang II (10⁻⁷ - 10⁻⁶ mol/l). Phosphorylierung der MLC₂₀ war nur nach Behandlung mit NA unter Kontrollbedingungen erhöht. Behandlung mit H₂O₂ verringerte sie im Vergleich zur Kontrolle. Die Phosphorylierung von p38 MAPK oder MYPT1 wurde durch keine der Bedingungen beeinflusst.

Schlussfolgerung: Hypoxie/Reoxygenierung, NA in niedriger Konzentration und H₂O₂ verstärken die Ang II-Antwort von AA. Die erhöhte Gefäßreaktivität kann für die Minderperfusion der Niere bei Hypoxie/Reoxygenierung bzw. Ischämie/Reperfusion verantwortlich sein. P38 MAPK und MYPT1 sind an der Vermittlung der Effekte möglicherweise nicht beteiligt.

2.2 Abstract

Aim: Hypoxia and generation of reactive oxygen species (ROS), as well as activation of the sympatho-adrenergic system are involved in the pathogenesis of acute kidney injury. We tested the hypothesis that acute hypoxia and ROS aggravate the response of vascular smooth muscle cells (VSMC) in afferent arterioles (AA) to angiotensin II (Ang II) and that this is accomplished by activating p38 MAPK, MYPT1 and increased phosphorylation of the MLC₂₀.

Methods: Isolated, perfused AA were investigated under isotonic conditions in C57BL/6 mice. Hypoxia was induced by bubbling the solution with 95 % N₂ and 5 % CO for 60 min. Vessels were re-oxygenated by application of 95 % O₂ and 5 % CO₂ (carbogen) for 10 min. The ROS protocol consisted of 10 min perfusion with H₂O₂ (10⁻⁵ mol/l) or DMEM/F-12 (control). Both protocols were followed by concentration-response curves for Ang II (10⁻¹² - 10⁻⁶ mol/l). The phosphorylation of p38 MAPK, MYPT1, and MLC₂₀ was examined in preglomerular vessels after treatment with hypoxia/re-oxygenation or carbogen, respectively, also in combination with norepinephrine (NE, 10⁻⁹ mol/l).

Results: Hypoxia/re-oxygenation increased the Ang II sensitivity. NE application during control conditions and also during hypoxia increased the maximum constriction of AA to Ang II. H₂O₂ also enhanced the vascular response to Ang II in the range of 10⁻⁷ - 10⁻⁶ mol/l. Phosphorylation of MLC₂₀ was only enhanced after NE treatment under control conditions. Treatment with H₂O₂ decreased it. The phosphorylation of p38 MAPK and MYPT1 was not influenced by any of the manipulations.

Conclusion: Hypoxia/re-oxygenation, H₂O₂, and NE increase the response of AA to Ang II. The enhanced vasoreactivity of AA may contribute to the reduced renal perfusion after hypoxia/re-oxygenation and ischemia/re-perfusion injury, respectively. It seems the p38 MAPK and MYPT1 are not involved in the mediation of the effect.

3 Einleitung

3.1 Akutes Nierenversagen

Das akute Nierenversagen (ANV) ist eine wichtige Erkrankung, der verschiedene pathophysiologische Vorgänge zugrunde liegen. Der klinische Ausgang hängt dabei von der zugrunde liegenden Erkrankung, Ausmaß und Dauer der Nierenfunktions-einschränkung sowie vom Ausgangszustand des Patienten ab (1). Bellomo et. al. haben im Jahr 2004 eine erste allgemeingültige Einteilung des ANV in fünf Stufen entwickelt: Risk, Injury, Failure, Loss und End-stage Kidney Disease, kurz RIFLE (2). Die Stadien R-F sind gekennzeichnet durch Veränderungen des Serumkreatinins und der Urinausscheidung, wohingegen L und E durch die Dauer des Nierenfunktionsverlusts definiert werden. Das Acute Kidney Injury Network (AKIN) hat diese Einteilung 2007 modifiziert und auf drei Stadien beschränkt, die mit den RIFLE-Stadien R-F korrelieren (3) (Abb. 1).

		RIFLE criteria		AKIN criteria			
		sCreatinine	Urine output criteria	sCreatinine	Urine output criteria		
Increasing severity	Risk	↑ sCrea × 1.5	< 0.5 ml/kg per h × 6 h	Stage 1	↑ sCrea × 1.5 or ↑ ≥ 0.3 mg/dl in sCrea	< 0.5 ml/kg per h × 6 h	
	Injury	↑ sCrea × 2	< 0.5 ml/kg per h × 12 h		Stage 2	↑ sCrea × 2	< 0.5 ml/kg per h × 12 h
	Failure	↑ sCrea × 3 or ≥ 0.5 mg/dl if baseline sCrea ↑ > 4.0 mg/dl	< 0.3 ml/kg per h × 24 h or anuria × 12 h			Stage 3	↑ sCrea × 3 or ↑ ≥ 0.5 mg/dl if baseline sCrea > 4.0 mg/dl
Outcome	Loss	Complete loss of renal function > 4 weeks		Patients who receive RRT are considered to have met stage 3 criteria, irrespective of the stage they are in at the time of RRT			
	End-stage	End-stage renal disease					

Abbildung 1: Stadieneinteilung des akuten Nierenversagens anhand der RIFLE- und AKIN-Kriterien (1). sCrea = Serumkreatinin. RRT = Nierenersatztherapie.

Die Zahlen zu Inzidenz und Mortalität des ANV divergieren sehr stark. So wurden Inzidenzraten von 1,9 % (4) bis 7,2 % (5) aller hospitalisierter Patienten und 2,2 % (6) bis 36,1 % (7) aller Patienten auf Intensivstationen berichtet. Der Anteil an Patienten mit ANV, die eine Nierenersatztherapie benötigten, reichte von 7,5 % (4) bis 80 % (8). Die Gesamtmortalität lag zwischen 21,3 % (4) und 60,3 % (8).

Ätiologisch wird das ANV danach eingeteilt, ob die Ursache den Nieren vor- bzw. nachgelagert oder in den Nieren selbst begründet ist. Eine Übersicht möglicher Ursachen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Mögliche Ursachen des akuten Nierenversagens nach Entstehungsort (1,4,9-11).

Prärenal	Renal	Postrenal
<ul style="list-style-type: none"> • Herzversagen • Leberdysfunktion, hepatorenales Syndrom • Hypovolämie z. B. bei septischem Schock, Diarrhoe, Fieber, Diuretikaüberdosierung 	<ul style="list-style-type: none"> • ischämisch, z. B. bei hämolytisch-urämischem Syndrom • toxisch, z. B. durch Kontrastmittel • Sepsis • chronische Nierenerkrankung 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlegung der ableitenden Harnwege, z. B. durch Retroperitonealfibrose, Uretersteine, Prostatahyperplasie

Klinisch äußert sich das ANV durch das Unvermögen der Nieren, stickstoffhaltige Abfallprodukte auszuscheiden und den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt aufrechtzuerhalten. Das Risiko, ein ANV zu entwickeln, kann u. a. durch die Einnahme nicht-steroidaler Antirheumatika, Diabetes mellitus und vorbestehende Niereninsuffizienz erhöht werden (9). Ursachen und auch Risikofaktoren des ANV sind weitestgehend bekannt. Damit können medizinische Maßnahmen zur Prävention gezielt durchgeführt werden. Ein wesentliches Problem ist nicht gelöst: Eine spezifische Behandlung des ANV ist noch nicht möglich, da die Pathogenese nicht umfassend bekannt ist (1). Die bisherigen Erkenntnisse zur Rolle von Hypoxie, vaskulären Faktoren und oxidativem Stress bei der Pathogenese des ANV sollen an dieser Stelle kurz erläutert werden.

3.2 Pathophysiologie des akuten Nierenversagens

3.2.1 Bedeutung von Ischämie / Hypoxie

Auf zellulärer Ebene bedeutet Hypoxie eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit aufgrund ungenügender konvektiver Sauerstoffzufuhr aus der Mikrozirkulation (12). Ischämie dagegen bezieht sich auf eine funktionell oder obstruktiv bedingte, reduzierte Blutzufuhr zu einem Gewebe (13). Ischämische Hypoxie bedeutet also eine unzureichende Sauerstoffversorgung eines Gewebes aufgrund einer mangelhaften Blutversorgung (14). Da insbesondere der Sauerstoffpartialdruck im Nierenmark schon

EINLEITUNG

unter physiologischen Bedingungen sehr niedrig ist, besteht für diesen Bereich der Niere eine erhebliche Vulnerabilität gegenüber Hypoxie und Ischämie (12,15). Die Konsequenz kann Organversagen durch Hypoxie sein (16). Ein ischämischer Schaden kann, statt in der gesamten Niere, auch nur in bestimmten mikrovaskulären Domänen lokalisiert sein (17).

Das Nierenmark und die kortikomedulläre Übergangszone reagieren besonders sensibel auf eine Reduktion der Sauerstoffzufuhr. In dieser Region bestehen aufgrund der Mikrozirkulationsarchitektur Sauerstoffshunts zwischen den ab- und aufsteigenden Vasa recta (Abb. 2) (18,19). Gleichzeitig erfordern der tubuläre Stoffaustausch (20) und die aerobe Glykolyse (21) einen hohen Sauerstoffbedarf (15). Veränderungen der intrarenalen Mikrozirkulation (22) und des Sauerstoffgleichgewichts (23,24) bilden daher wahrscheinlich die Hauptursache des ischämischen akuten Nierenversagens. Der Gegenstromaustausch von Sauerstoff wurde ebenfalls in den präglomerulären Gefäßen nachgewiesen und findet wahrscheinlich in den Interlobulararterien statt (25). Störungen des glomerulären Blutflusses können die peritubuläre Perfusion im Mark beeinflussen (26), da fast alle absteigenden Vasa recta den efferenten Arteriolen entspringen (19).

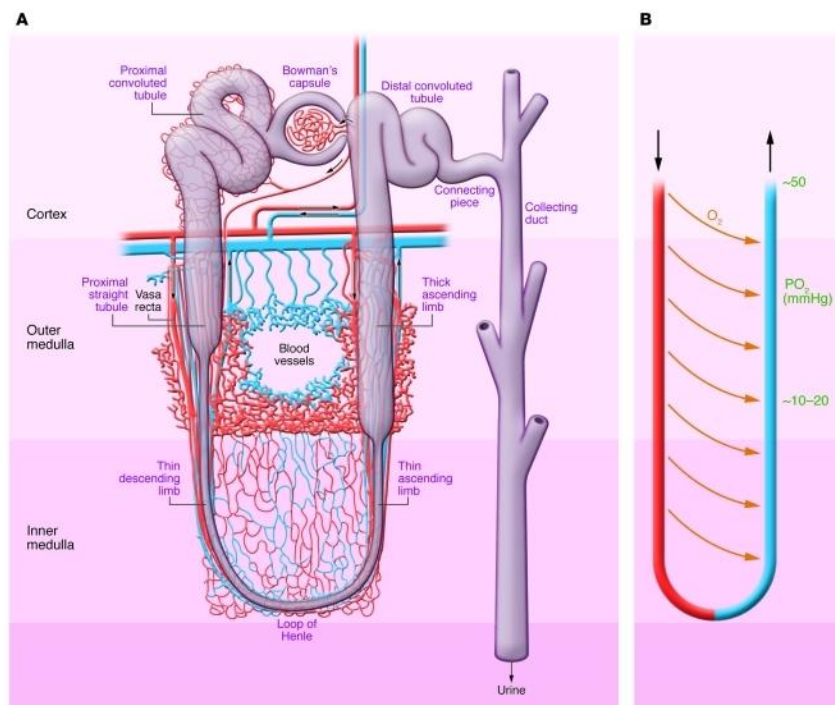


Abbildung 2: Aufbau eines Nephrons (A) mit Gegenstromstoffaustausch (B) zwischen den absteigenden und aufsteigenden Schenkeln der Henle-Schleife (27).

Schäden des Gefäßendothels zählen ebenfalls zu den Faktoren, die zu einer reduzierten Sauerstoffversorgung führen können. Das „no reflow“-Phänomen resultiert aus Endothelzellschäden mit erhöhter Endothelpermeabilität und Entwicklung eines interstitiellen Ödems, sowie einem Ungleichgewicht zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Mediatoren (12). Es kann nach dem ischämischen Ereignis zu strukturellen Schäden des Endothels und der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) kommen (28). In einem *in vivo* Rattenmodell wurde innerhalb von 24 Stunden nach einer akuten Ischämie ein hochgradiger Verlust von Adhäsionsverbindungen beobachtet (29). Dies führt zu parazellulärer Permeabilität und Austritt von Flüssigkeit aus dem Gefäßbett in das umliegende Gewebe. Endothelzellschwellung beeinträchtigt die Perfusion zusätzlich durch Verminderung des Gefäßlumens und Kompression der Kapillaren (12).

Eine wichtige Rolle beim ischämischen akuten Nierenversagen spielen auch die Epithelzellen des Tubulussystems. Ist die Perfusion der Niere reduziert, sind die Epithelzellen nicht mehr in der Lage, ausreichend Adenosintriphosphat (ATP) zu bilden. Der Verlust von ATP kann die Zellen beschädigen und zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führen. Am meisten betroffen sind die Epithelzellen des proximalen Tubulus und des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife. Durch den ischämiebedingten ATP-Verlust kommt es zu Störungen des Aktin-Zytoskeletts mit Unterbrechungen der tight junctions sowie von Adhäsionsmolekülen und Zell-Zell-Kontakten. Die Epithelzellen des proximalen Tubulus verlieren ihren apikalen Bürstensaum und die Mikrovilli lösen sich von der apikalen Zelloberfläche ab. Diese Veränderungen führen dazu, dass die Epithelzellen abflachen und ihre Polarität verlieren (17). Der ATP-Verlust führt außerdem dazu, dass sich die β -Integrine von der Basalmembran an die apikale Membran verlagern und sich die Tubuluszellen von der Basalmembran ablösen. Dies kann zu fokalen Dilatationen des proximalen Tubuluslumens und Exposition der Basalmembran führen (30,31). Nach einer akuten Ischämie wurde im Außenstreifen des äußeren Nierenmarks eine ausgeprägte Perfusionsminderung beobachtet, die auch nach dem Ischämieereignis fortbesteht. Nekrosen, die im Gegensatz zu Apoptosen selten in der Niere vorkommen, sind beschränkt auf diese hoch sensible Region des äußeren Marks (17).

Die ischämiebedingte Dysfunktion und Polaritätsveränderung der Epithelzellen des proximalen Tubulus führt zur Verlagerung der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase an die

apikale Membran. Dadurch kommt es zu einem bidirektionalen Natrium- und Wassertransport, was dazu führt, dass zelluläres Natrium in das Tubuluslumen zurückbefördert wird. Auf diese Weise entkoppeln ischämische Konditionen ATP-Verbrauch und effektiven transzellulären Natriumtransport voneinander. Eine hohe Natriumkonzentration im Filtrat führt im distalen Tubulus über Stimulation der Macula densa und Aktivierung des tubuloglomerulären Feedbacks zur Kontraktion afferenter Arteriolen. Die Folge ist eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (17,27).

3.2.2 Renale Vaskularisation und Perfusion

Die renale Mikrovaskulatur besteht aus einem Netzwerk von Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit einem Durchmesser von weniger als 150 μm (32). Die tonische Modulation der afferenten und efferenten Arteriolen und der absteigenden Vasa recta reguliert die renale Sauerstoffzufuhr und den medullären Blutfluss (12). Die Nierenrinde ist besonders gut durchblutet. Das Nierenmark erhält unter physiologischen Bedingungen einen deutlich geringeren Anteil des renalen Blutflusses (32,33). Der niedrige Blutfluss der den juxtamedullären Glomeruli entspringenden Vasa recta sowie die arteriovenösen Sauerstoffshunts zwischen den ab- und aufsteigenden Vasa recta begründen den niedrigen Sauerstoffpartialdruck des Nierenmarks. Er liegt bei ca. 20 mmHg, während der Partialdruck in der Rinde ca. 70 mmHg beträgt (34-36). Ist die kortikale Perfusion stark reduziert, kann dies zur Unterbrechung des medullären Blutflusses führen. Eine adäquate Gewebeoxygenierung hängt daher teilweise von der Aufrechterhaltung der medullären Perfusion durch eine adäquate kortikale Perfusion ab (12). Interessanterweise ist eine schwere, länger anhaltende Hypoperfusion nicht zwangsläufig mit einem dauerhaften Verlust der Nierenfunktion verbunden. In einer Studie wurde gezeigt, dass nach einer zweistündigen Reduktion des renalen Blutflusses um 80 % die Nierenfunktion innerhalb von acht Stunden ohne den Nachweis einer tubulären Nekrose auf normale Werte zurückkehrte (37).

Nach ischämischem Nierenversagen kommt es zu einer Reduktion der mikrovaskulären Dichte: Ratten zeigten 40 Wochen bzw. 7 Tage nach dem Ereignis eine Abnahme um ca. 30-50 % in Rinde und äußerem Mark (38,39). Dies deutet darauf hin, dass die renalen Gefäße keine vollständige Regenerationskapazität haben. Infolge verminderter Vaskularisierung werden Ischämie und Hypoxie begünstigt. Natrium-regulierende Reaktionen werden beeinträchtigt. Die Niere wird insgesamt für die Entwicklung einer

chronischen Nierenerkrankung oder arterieller Hypertonie prädisponiert (40). Sowohl in Tieren als auch in Menschen wurden vaskuläre Schäden und eine Unterbrechung des Blutflusses in peritubulären und glomerulären Kapillaren nach ischämischen akuten Nierenversagen beobachtet (41). In der postischämischen Niere ist vor allem der Blutfluss in den medullären Kapillaren vermindert (42).

Ein verminderter renaler Perfusionsdruck aufgrund eines gestiegenen renalen Venendrucks ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung eines akuten Nierenversagens bei Sepsis (43,44). Dadurch kann es zu einer frühen Reduktion der kortikalen Mikrozirkulation kommen. In der Folge nehmen der renale Gefäßwiderstand signifikant zu und der renale Blutfluss ab (44).

3.2.3 Endothel und Hypoxie

Das Gefäßendothel unterliegt deutlichen Veränderungen nach einer akuten Hypoxie. Es kommt unter anderem zum phänotypischen Übergang von Endothel zu Mesenchym oder Fibroblasten. Diese endothelial-mesenchymale Transition könnte eine Erklärung für den Verlust renaler Mikrogefäße und das Auftreten tubulointerstitieller Fibroblasten sein. Solche Veränderungen wurden in einem Zeitraum von 6 Stunden bis 7 Tage nach akuter Ischämie nachgewiesen (39). Bei der Entstehung von hypoxischen Endothelschäden spielen inflammatorische Komponenten eine Rolle. Durch die gestörte Barrierefunktion wird die Permeabilität erhöht, außerdem die vaskuläre Reaktivität auf Vasokonstriktoren erhöht (12).

Die endotheliale Dysfunktion wird als eine verminderte Vasorelaxation in Antwort auf Endothel-abhängige Vasodilatoren, wie zum Beispiel Acetylcholin, definiert. Diese Störung ist an der postischämischen Vasokonstriktion beteiligt (45). Vermutlich ist Stickstoffmonoxid (NO)-Mangel zu einem großen Teil daran beteiligt (46). Es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Vasokonstriktoren, dilatorischen Faktoren, insbesondere NO, und oxidativem Stress (12).

Studien zeigen, wie wichtig der Erhalt der Endothelfunktion für die Regeneration nach ANV ist. Die Infusion humaner Umbilikalvenen-Endothelzellen in die geschädigte Niere nach der Aufhebung der Ischämie schützte vor Funktionsverlust. Die NO-Produktion der applizierten Endothelzellen war hier der entscheidende Mechanismus für die Verbesserung der Nierenfunktion (47). In der Niere kommen alle drei Isoformen der

Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase (NOS)) vor: die endotheliale NOS (eNOS) in den Gefäßendothelien inklusive der Glomeruli, die induzierbare NOS (iNOS) in den glatten Gefäßmuskelzellen und Tubuluszellen und die neuronale NOS (nNOS) in Zellen der Macula densa (12,48).

NO wird als Antwort auf einen reduzierten Sauerstoffpartialdruck oder durch medulläre Vasokonstriktion nach z. B. Indometazin- oder Kontrastmittelgabe produziert und antagonisiert Angiotensin II-induzierte Konstriktionen (12,49). Die eNOS kann durch erhöhten Perfusionsdruck und Scherstress stimuliert werden, reguliert via Reduktion des renalen Gefäßwiderstandes den basalen Blutfluss in Cortex und Medulla und erhält damit die renale Sauerstoffzufuhr aufrecht (50-52). Funktionsverlust oder verminderte Expression der eNOS führt zu reduzierter kortikaler und medullärer Durchblutung und Oxygenierung (53). In eNOS-defizienten Mäusen zeigte sich die Endothel-abhängige, Acetylcholin-induzierte Relaxation deutlich abgeschwächt. Applikation von Nitroprussid-Natrium bewirkte dagegen eine ebenso starke Relaxation wie in Wildtyp-Mäusen. Gleichzeitig war der systolische Blutdruck in eNOS-defizienten Mäusen signifikant erhöht (54). Die Expression der iNOS wird in Mäusen mit Endothelin-1 (ET-1)-Überexpression hochreguliert und stellt auf diese Weise vermutlich wieder ein Gleichgewicht zwischen ET-1 und NO her. Der Blutdruck ist in diesen Tieren nicht verändert (55). Eine Hemmung der iNOS ist andererseits ein wirksamer Schutz vor renaler Hypoxie. Sie wird bei Ischämie vor allem in VSMC aktiviert (56). Die nNOS scheint bei der Desensibilisierung des tubuloglomerulären Feedbacks relevant zu sein. Die auf diese Weise vermehrte Flüssigkeitsausscheidung kann in der Folge zur Blutdrucksenkung führen (49,57).

3.2.4 Vasokonstriktoren

Zu den Substanzen, die einen konstringierenden Effekt auf Nierengefäße haben können, zählen u. a. ET-1, Adenosin (Ado), Angiotensin II (Ang II) und Noradrenalin (NA).

ET-1 bewirkt über eine stärkere Konstriktion der afferenten Nierenarteriolen eine GFR-Absenkung und eine Erhöhung des renalen Gefäßwiderstands (58). Die Rezeptoren für ET-1, der ET_A- und ET_B-Rezeptor, werden in den VSMC exprimiert, der ET_B-Rezeptor zusätzlich auch im Endothel präglomerulärer Gefäße (59). Applikation von ET-1 erzeugt

dosisabhängige Konstriktionen, die in afferenten Arteriolen nur durch den ET_A-Rezeptor vermittelt werden. In den efferenten Arteriolen ist die ET-1-Wirkung insgesamt schwächer und von beiden Rezeptoren abhängig. Diese verminderte Konstriktion kann durch die dilatierende ET-1-Wirkung via den endothelialen ET_B-Rezeptor erklärt werden. Dieser setzt NO frei und hat bei niedrigen ET-1-Konzentrationen eine höhere Affinität zu ET-1 als die glattmuskulären Rezeptoren. Es ist möglich, dass der ET_B-Rezeptor in den afferenten Arteriolen keine Funktion hat bzw. sich die vasokonstringierenden und vasodilatorischen Effekte der glattmuskulären und endothelialen Rezeptoren gegeneinander aufheben. In den afferenten Arteriolen ist eine stärkere Antwort auf ET-1 festzustellen (60). Daher kann eine Blockade des dort wirkenden ET_A-Rezeptors einen beeinträchtigten renalen Blutfluss deutlich verbessern (61).

Unter ischämischen und hypoxischen Bedingungen steigt die Ado-Konzentration im perivaskulären Gewebe um das 4- bis 5-fache (62,63). Ado bewirkt an afferenten Arteriolen eine Resensitivierung des kontraktiven Apparats für Ang II. Dieser Effekt wird weder über seine Rezeptoren A₁AR, A₂AR oder A₃AR noch über die purinergen P1- und P2-Rezeptoren vermittelt (62,64,65). Ado interagiert mit Ang II bei der Regulation des Gefäßwiderstandes und damit der Nierenperfusion. Der Ado-Einfluss auf die Ang II-Sensitivität der Gefäße wurde durch Blockade des bidirektionalen Adenosin-Transporters verhindert. Dies erklärt den Mechanismus der Ado-Wirkung nach Ausschluss von Ado- und ATP-Rezeptoren: Ado fällt vermehrt im Interstitium an, muss aber in die VSMC gelangen, um wirksam sein zu können. Die Resensitivierung des kontraktiven Apparats durch Erhöhung der Ca²⁺-Sensitivität ist vermutlich abhängig von der Proteinkinase C (PKC) und dem Rho Kinase (ROK)-Signalweg. Ado führt durch Ca²⁺-Sensibilisierung des Myosins zur vermehrten Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC₂₀) in präglomerulären Arteriolen. Die Erhöhung der Ca²⁺-Sensitivität wird gleichzeitig gefördert durch Hemmung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) durch das PKC-Substrat CPI-17 (65). Die Wirkung von Ado auf die Resensitivierung der glatten Gefäßmuskulatur ist dementsprechend in einer nicht Rezeptor-vermittelten, erhöhten Ca²⁺-Sensitivität begründet.

Ang II bestimmt den Tonus der renalen Gefäße. Seine Wirkung wird v. a. über den Ang II Typ 1-(AT₁)-, geringfügiger auch über den Typ 2-(AT₂)-Rezeptor vermittelt. Der AT₁-Rezeptor bewirkt eine Konstriktion der renalen Widerstandsgefäße (66) und

Dilatation der medullären Gefäße (67). Ang II kann über diesen Rezeptor auch zur Freisetzung von NO aus der in der Macula densa lokalisierten nNOS führen, denn über Vasokonstriktion, Volumenretention und Blutdrucksteigerung sensibilisiert es das tubuloglomeruläre Feedback (49,68). Die Ang II-Aktivität ist bei Ischämie erhöht. Dies führt zur Konstriktion afferenter Arteriolen und somit zur Absenkung der GFR, der Filtrationsfraktion und des renalen Plasmaflusses (69). Dauerhafte Stimulation der Gefäße mit Ang II bedingt aber wie bereits erwähnt eine Desensibilisierung des kontraktiven Apparats. Dies resultiert vermutlich aus Phosphorylierung und Endozytose der AT₁-Rezeptoren mit somit reduzierter Ca²⁺-Mobilisierung (70). Vor allem bei niedrigen Ang II-Konzentrationen wird die kontraktile Antwort nach Vorbehandlung mit Ado deutlich verstärkt. Im Bereich von 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁸ M Ang II wurde ein ausgeprägter Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration beobachtet (64). Konzentrationen niedriger als 10⁻¹⁰ M Ang II bewirkten keine Konstriktion, bei 10⁻⁸ M Ang II wurde bereits das Konstriktionsmaximum nachgewiesen (71). Der AT₁-Rezeptor aktiviert nach Ang II-Bindung heterotrimere G-Proteine, die den Rezeptor mit der Stimulation der Phospholipase C und D und Hemmung der Adenylylcyclase verbinden (72). Dies führt zur Aktivierung von Serin/Threonin-Kinasen, wie z. B. der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) p38. Über diesen Signalweg führt eine Applikation von Ang II zur 17-fachen Aktivität des p38 MAPK-Substrats MAPK-aktivierte-Proteinkinase 2 (MK-2) und zur signifikanten Phosphorylierungssteigerung des MK-2-Substrats Hitzeschockprotein-27 (Hsp27) in aortalen VMSC. Diese Effekte wurden durch einen p38 MAPK-Hemmer vollständig unterdrückt (73).

NA und Ang II interagieren bei der Kontrolle des Nierengefäßtonus. So wurde gezeigt, dass Unterbrechung des Sympathikus die Ang II-Effekte auf den renalen Blutfluss verminderte (74). In AT₁-Rezeptor-defizienten Mäusen war die Wirkung von NA deutlich reduziert (75). An NA-Effekten sind α₁- und α₂-adrenerge Rezeptoren beteiligt. Die Konstriktion afferenter Arteriolen wird jedoch hauptsächlich über den α₁-Rezeptor vermittelt. NA-Einfluss führt bei Ang II-Konzentration ab 10⁻¹¹ M zur Konstriktion, was ohne NA erst ab 10⁻⁹ M Ang II gezeigt werden konnte. Neben einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt NA die Phosphorylierung der p38 MAPK und steigert darüber die Ca²⁺-Sensitivität. Eine Vorbehandlung der Gefäße mit NA verstärkte die Ang II-induzierte Vasokonstriktion. Auf diese Weise können physiologische Ang II-Konzentrationen die renale Perfusion beeinflussen (71). In einer

anderen Studie konnte durch direkte NA-Injektion in die Nierenarterie von Ratten ein ischämisches akutes Nierenversagen ausgelöst werden (76). Afferente Nierennerven werden durch eine 45-minütige Ischämie aktiviert und bewirken eine reflektorische Aktivierung des efferenten renalen Sympathikus. Eine vorherige renale Denervierung konnte sowohl den Anstieg von Noradrenalin als auch von Kreatinin signifikant unterdrücken. Hypoxie und Noradrenalin tragen gemeinsam durch eine anhaltende Ischämie zur Aufrechterhaltung des akuten Nierenversagens bei (77).

3.2.5 p38 MAPK

Das Protein p38 MAPK spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen zur Kontraktion glatter Muskelzellen führenden Signalwegen. Sowohl ein p38 MAPK-Inhibitor als auch ein Knock-out der MK-2 verhinderte die Ado-vermittelte Resensitivierung in afferenten Arteriolen auf Ang II. Dies deutet darauf hin, dass Ado den p38/MK-2-Signalweg stimuliert (62,64). Hemmung der p38 MAPK hatte dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf den basalen Gefäßtonus oder Ang II-stimulierte Kontraktionen von Interlobararterien (65). Ang II kann über den AT₁-Rezeptor die p38 MAPK aktivieren. Eine maximale Antwort wurde bereits nach 5 Minuten beobachtet, innerhalb von 15 Minuten ging die p38 MAPK-Aktivität jedoch wieder auf Ruhenniveau zurück (73,78). Applikation eines intrazellulären Ca²⁺-Chelators potenzierte die basale und die Ang II-stimulierte Aktivität von p38 MAPK und verhinderte dessen schnelle Inaktivierung in Ang II-stimulierten Zellen. Dies deutet auf eine negative Regulierung von p38 MAPK durch eine Ca²⁺-abhängige Phosphatase hin. Inkubation von VSMC mit Antioxidantien schwächte die Ang II-abhängige p38 MAPK-Aktivierung ab (73). Zugabe von H₂O₂ stimulierte p38 MAPK dagegen deutlich, steigerte dessen Aktivität um das 6fache nach 15 Minuten und führte zur Vasokonstriktion (73,79).

Die p38 MAPK kann auch durch verschiedene weitere Agonisten und ihre spezifischen Rezeptoren stimuliert werden. NA bewirkt eine Phosphorylierung und somit Aktivierung von p38 MAPK über Kontrollniveau (73). Ebenso ist p38 MAPK an der ET-1-induzierten Konstriktion beteiligt (80). Eine durch einen α_1 -adrenergen Agonisten stimulierte Konstriktion wurde von einem p38 MAPK-Inhibitor jedoch nicht beeinflusst (73). Weiterhin wurde in Ado-behandelten Arterien eine verminderte p38 MAPK-Phosphorylierung festgestellt, wenn diese vorher ET-1 oder NA ausgesetzt waren.

Demzufolge gibt es vermutlich unterschiedliche intrazelluläre Signalwege für die ET-1- und NA-induzierte Aktivierung von p38 MAPK im Vergleich zu Ado und Ang II (64).

3.2.6 Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies

Der Begriff „reaktive Sauerstoffspezies (ROS)“ umfasst freie Radikale und reaktive Moleküle, die Sauerstoff enthalten. Zu diesen zählen u. a. das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (81). H_2O_2 ist das stabilste Radikal und kann frei durch Zellmembranen diffundieren (82). Die genannten ROS werden hauptsächlich im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette produziert (83), fallen aber auch bei Ischämie/Reperfusion durch Konversion des ATP-Degradierungsprodukts Hypoxanthin (84) oder durch die von Ang II aktivierte Nicotinamadenin-dinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase an (85,86). Das Superoxid-Radikal und seine Reduktionsprodukte OH^{\cdot} und H_2O_2 können u. a. durch Peroxidation von Membranlipiden Zellschäden verursachen (87). Um solche Schäden zu vermeiden, bedarf es freier Radikalfänger. Einige wichtige Radikale und zugehörige Radikalfänger sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Übersicht einiger freier Radikalfänger des Superoxid-Anions ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-Radikals (OH^{\cdot}) und von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (88,89).

Radikal	$O_2^{\cdot-}$	OH^{\cdot}	H_2O_2
Radikalfänger	Superoxiddismutase	Ascorbat, Mannitol, α -Tocopherol, Dimethylthiourea	Katalase, Glutathionperoxidase

Im Laufe einer renalen Ischämie kann die Versorgung mit diesen endogenen Radikalfängern erschöpfen. Die durch freie Radikale bewirkten Zellschäden werden noch verstärkt, wenn Gewebepfusion und Sauerstoffzufuhr wiederhergestellt sind. Applikation von Superoxiddismutase vor dem ischämischen Ereignis zeigte in Ratten eine deutliche Verminderung des funktionellen Schadens. Zudem verdoppelte sich die Inulin-Clearance und der renale Blutfluss wurde gesteigert. Der Schutz der Nierenfunktion durch Dimethylthiourea und Allopurinol, welches die ROS-Produktion durch Hemmung der Adeninnukleotiddegradierung verhindert, konnte durch einen deutlich abgeschwächten Plasmakreatininanstieg abgebildet werden (88).

Allein von der H_2O_2 zu H_2O umsetzenden Katalase ging kein wirksamer Schutz der Nierenfunktion nach Ischämie aus (88). Sowohl H_2O_2 als auch NO aktivieren in VSMC und Endothel direkt den p38 MAPK-Signalweg (90,91). Eine Behandlung von VSMC mit H_2O_2 führte dosisabhängig zur Phosphorylierung der p38 MAPK und zeigte dabei nach 10 und 120 Minuten ein Maximum bei 10^{-3} M H_2O_2 . Im zeitlichen Verlauf konnte ein deutlicher Anstieg der p38 MAPK-Phosphorylierung mit $2,5 \cdot 10^{-4}$ M H_2O_2 schon nach 5 Minuten beobachtet werden. Sowohl extra- und intrazelluläres Ca^{2+} als auch Calmodulin wiesen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der H_2O_2 -Effekte auf: Ca^{2+} -Chelatoren und ein Calmodulin-Inhibitor zeigten eine dosisabhängige Hemmung der H_2O_2 -induzierten p38 MAPK-Phosphorylierung. Inhibitoren der PKC, die ebenfalls zur Aktivierung von p38 MAPK führen kann, hatten dagegen keinen Einfluss (92). Das Substrat von p38 MAPK, die MK-2, hat eine hemmende Wirkung auf die Katalase und verstärkt auf diesem Weg die ROS-Produktion (86).

Studien konnten für H_2O_2 im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-3} M eine konzentrationsabhängige vasokonstringierende Wirkung in Koronar- und Mesenterialarterien nachweisen (93,94). Dieser Effekt war Endothel-unabhängig. Er ging mit Aktivierung von p38 MAPK und NADPH-Oxidase-vermittelter Superoxid-Produktion einher. Es wurde auch beobachtet, dass H_2O_2 vasodilatorisch wirkt. Dies wurde für Mesenterialarterien mit 1-50 μM H_2O_2 konzentrationsabhängig gezeigt und war unabhängig von NOS, Cyclooxygenase und Endothel (94). Eine Beteiligung von Ca^{2+} -aktivierten, spannungsgesteuerten sowie ATP-abhängigen K^+ -Kanälen bei der H_2O_2 -induzierten Vasorelaxation von zerebralen und Koronararterien wurde vorgeschlagen (95-97). Die beteiligten Signalwege sind noch unklar.

3.3 Physiologie der Kontraktion glatter Muskelzellen

3.3.1 Calcium-abhängiger Signalweg

Der bislang am besten untersuchte Signalweg ist die Agonisten-induzierte, Calcium/Calmodulin-vermittelte Phosphorylierung der MLC_{20} . Spezifische Agonisten wie Noradrenalin oder Ang II stimulieren andererseits G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (98) (Abb. 3, S. 21).

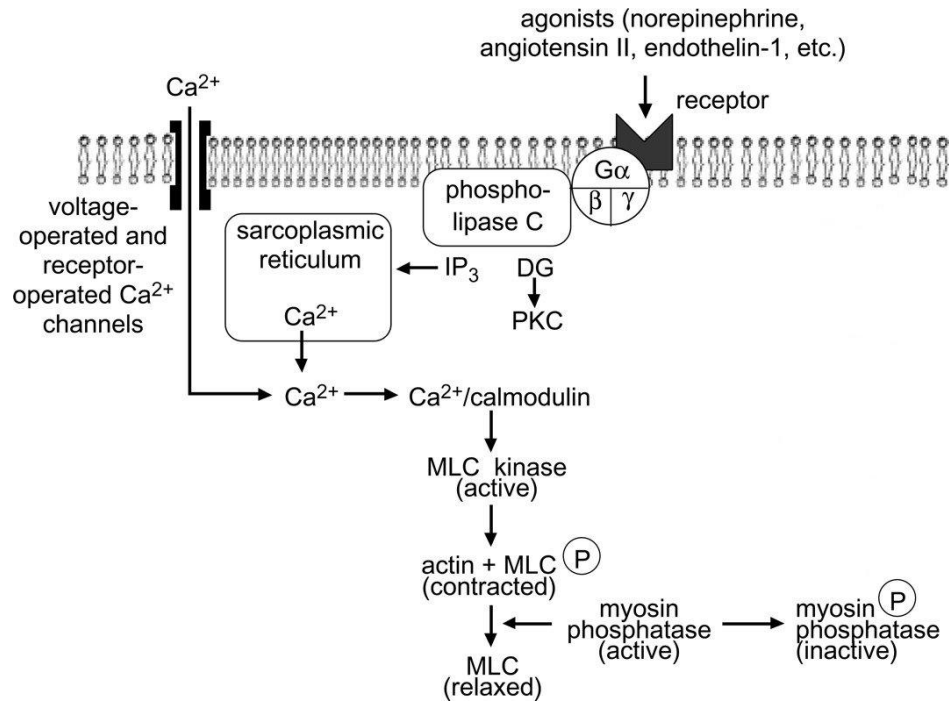


Abbildung 3: Regulation der Kontraktion glatter Muskelzellen ((98), leicht modifiziert). IP₃ = Inositol-1,4,5-trisphosphat. DG = Diacylglycerol. PKC = Proteinkinase C. MLC = leichte Myosinkette.

Dies führt zur Stabilisierung des Rezeptors und zur Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in die Untereinheiten G α und G $\beta\gamma$ (99), die die Phospholipase C (PLC) aktivieren. Die PLC hydrolysiert spezifisch das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und erzeugt die second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ bindet an Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums, welches daraufhin Ca²⁺ in das Zytosol freisetzt (100,101). Das freie Ca²⁺ bindet an Calmodulin, ein ubiquitäres Ca²⁺-Bindungsprotein, das dadurch eine Konformationsänderung erfährt und Interaktionsstellen exponiert (101). Eines der Zielproteine des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes ist die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), die durch Calmodulin aktiviert wird und zur Phosphorylierung der MLC₂₀ am Ser19 führt. Dadurch wird die molekulare Interaktion von Myosin mit Aktin ermöglicht. Nach ATP-Freisetzung durch die Myosin-ATPase wird der Querbrückenzyklus in Gang gesetzt und die Muskelzelle kontrahiert (98,101).

3.3.2 Calcium-unabhängiger Signalweg

Somlyo und Somlyo (102) stellten in einem Übersichtsartikel Erkenntnisse zu Signalwegen der Ca²⁺-Sensibilisierung und -Desensibilisierung dar. Das Verhältnis der

Aktivitäten von MLCK zu MLCP ist der hauptsächliche Bestimmungsfaktor der Ca^{2+} -Sensitivität von Myosin. Die wesentlichen Regulatoren der Ca^{2+} -Sensitivität sind die MLCK und der RhoA/ROK-Signalweg. Unter physiologischen Bedingungen agieren Ca^{2+} -Freisetzung, -Einstrom und -Sensibilisierung gemeinsam.

RhoA ist eine monomere GTPase mit einem Molekulargewicht von 20 kDa. Sie wird durch Agonisten wie Katecholamine, Endothelin und Angiotensin an der Zellmembran nach Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) aktiviert und aktiviert die Serin/Threonin-Kinase ROK. Nach Bindung von $\text{GTP}\cdot\text{RhoA}$ durchläuft die ROK eine Konformationsänderung mit anschließender Autophosphorylierung.

Der Hauptmechanismus der Ca^{2+} -Sensitivierung liegt in der Hemmung der MLCP. Die aktivierte ROK hemmt die MLCP durch Phosphorylierung der MYPT1 am Thr696. Wenn diese Phosphorylierungsstelle konstitutiv phosphoryliert wird, kann die MYPT1 zusätzlich durch das ROK- und PKC-Substrat CPI-17 am Thr853 phosphoryliert werden. Die PKC ist kein notwendiger Bestandteil des ROK-Signalweges. Die Mechanismen beider Enzyme laufen zusammen und führen gemeinsam zur Hemmung der Dephosphorylierung der MLC_{20} .

Die Ca^{2+} -Desensibilisierung wird durch Agonisten wie ROK-Inhibitoren, CPI-17-Inhibitoren und NO vermittelt. NO führt über Stimulation der Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zur Aktivierung der Proteinkinase G (PKG). Diese hemmt den RhoA/ROK-Signalweg. Wie dies abläuft, ist bisher nicht umfassend geklärt. Möglicherweise dephosphoryliert die PKG den $\text{GTP}\cdot\text{RhoA}$ -Komplex oder verhindert die Bindung von RhoA an die ROK. Diese RhoA/ROK-Inhibierung stellt den wichtigsten Mechanismus der Desensibilisierung durch cGMP dar.

3.3.2.1 Proteinkinase C-vermittelte Kontraktion

Die PKC ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren Subklassen der neuen (nPKC) und der atypischen (aPKC) PKCs keine Ca^{2+} -Bindungsstelle enthalten und somit Ca^{2+} -unabhängig sind (103). Exzitatorische Agonisten führen wie unter 3.3.1. ausgeführt zur Freisetzung von DAG (Abb. 3, S. 21), welches die nPKC aktiviert (104-106). Diese führt zur Phosphorylierung von p38 MAPK. Über welchen Signalweg dies in VSMC geschieht, ist bisher nicht bekannt. Die p38 MAPK aktiviert die MK-2, die direkt Hsp27 phosphoryliert (104). Hsp27 aktiviert die ZIP Kinase, doch der Mechanismus ist auch

hier nicht geklärt (101). Die ZIP Kinase hat keine Calmodulin-Bindungsstelle, führt also über einen Ca^{2+} -unabhängigen Weg zur Kontraktion (107). Dabei gibt es zwei Mechanismen:

Die ZIP Kinase ist in der Lage, die MLC_{20} direkt sowohl am Ser19 als auch am Thr18 zu phosphorylieren. Dabei hat sie im Gegensatz zur MLCK keine Präferenz für eine der Phosphorylierungsstellen (107). Die aktivierte MLC_{20} führt dann wie unter 3.3.1. beschrieben zur Aktivierung der Myosin-ATPase und zur Kontraktion.

Außerdem führt die ZIP Kinase zur Hemmung der MLCP durch MYPT1-Phosphorylierung am Thr696 (107,108) und zur Aktivierung des Proteins CPI-17 (109). CPI-17 ist ein Inhibitor der PP1c-Untereinheit der MLCP (101) (Abb. 4). Sowohl die Phosphorylierung der MYPT1 als auch der PP1c führt zur Hemmung der MLCP und damit zur Kontraktion auch bei konstanten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen (103,110) (Abb. 4).

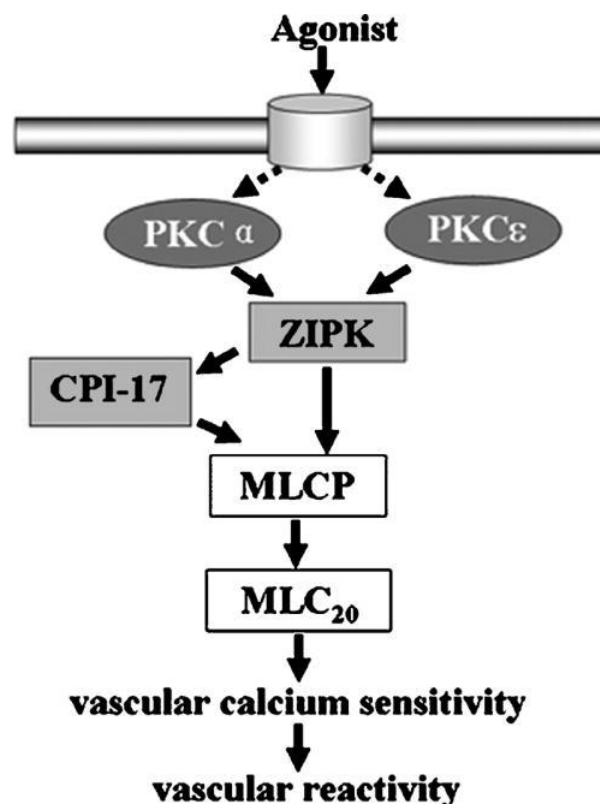


Abbildung 4: Signalweg der PKC-vermittelten MLC_{20} -Phosphorylierung in glattmuskulären Zellen unter Hypoxie (111). Die Autoren zeigten eine Kontraktion durch die klassische, calciumabhängige PKC- α und die neue, calciumunabhängige PKC- ϵ über Aktivierung der ZIP Kinase, Inhibition der MLCP durch ZIP Kinase und CPI-17 und Aktivierung der MLC_{20} . ZIPK = ZIP Kinase.

3.3.2.2 MLC₂₀-unabhängige Kontraktion

In einer aktuellen Studie konnte ein zur VSMC-Kontraktion führender Signalweg nachgewiesen werden, der weder von Ca²⁺ noch von der PKC abhängig ist. Dabei führt p38 MAPK über Phosphorylierung von Hsp27 direkt zur Aktivierung der Myosin-ATPase, die Energie in Form von ATP für die Durchführung des Querbrückenzyklus der Myofilamente liefert. Gleichzeitig bewirkt p38 MAPK die Dephosphorylierung von Caldesmon, einem Regulatorprotein der Myofilamente (112,113). Im inaktiven, unphosphorylierten Zustand kann Caldesmon die Myosin-ATPase nicht hemmen. Dies trägt zur Aufrechterhaltung der Kontraktilität bei (112) (Abb. 5).

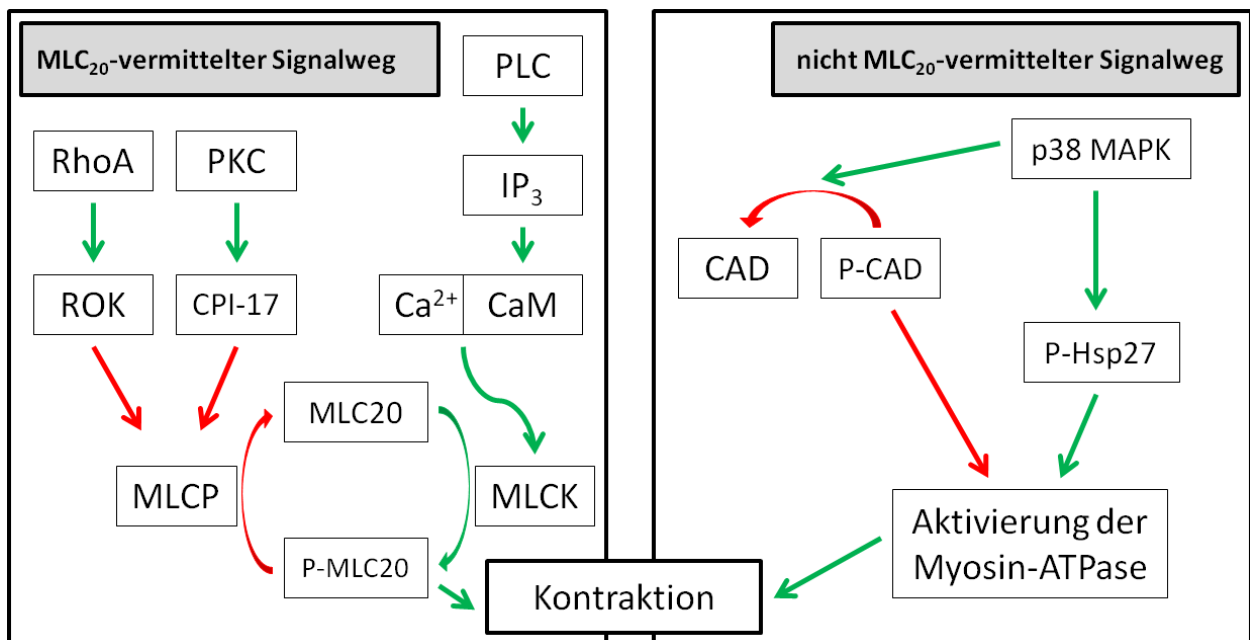


Abbildung 5: MLC₂₀- und nicht-MLC₂₀-vermittelte Mechanismen, die zur Gefäßmuskelkontraktion führen (eigene Darstellung nach (112)). CaM = Calmodulin. CAD = Caldesmon. Grüne Linien = Aktivierung. Rote Linien = Hemmung.

3.4 Hypothesen und Fragestellungen

Präglomeruläre Gefäße, insbesondere die afferenten Arteriolen, tragen zu einem großen Teil zum Gefäßwiderstand der Niere bei und sind deshalb ein wichtiger Bestandteil der vaskulären Komponente in der Pathogenese des akuten Nierenversagens. Bisher sind keine Studien über die Auswirkungen von Hypoxie, einem entscheidenden Faktor im akuten Nierenversagen, auf die Arteriolenfunktion bekannt. Es soll deshalb der Einfluss akuter Hypoxie in funktionellen Experimenten an isolierten

Arteriolen untersucht werden. Wir nehmen an, dass akute Hypoxie zu einer verstärkten Antwort auf Ang II führt und dies dann zum „no reflow“ Phänomen beiträgt.

H₂O₂ als Vertreter der ROS und Indikator für oxidativen Stress kann bei Hypoxie/Reoxygenierung verstärkt gebildet werden und damit ein potentieller Faktor in der Genese des akuten Nierenversagens sein. H₂O₂ zeigte dosisabhängig sowohl vasokonstringierende als auch vasodilatorische Effekte auf Arterien. Seine Wirkung auf die präglomerulären Gefäße ist nicht bekannt. Wir testen deshalb, ob H₂O₂ die Ang II-vermittelte Antwort afferenter Arteriolen beeinflusst.

In weiteren Experimenten prüfen wir die Rolle von p38 MAPK bei Hypoxie- und H₂O₂-induzierten Effekten auf die afferenten Arteriolen. P38 MAPK wird durch verschiedene Formen von Stress, darunter hypoxischem und oxidativem Stress, aktiviert.

Wir prüfen die Hypothese, dass p38 MAPK und MLC₂₀ durch diese beiden Stressoren in afferenten Arteriolen aktiviert wird.

4 Methoden und Materialien

4.1 Verwendete Materialien

In den Experimenten wurden folgende Chemikalien, Pharmaka, Puffer- und Nährlösungen verwendet:

- von Biochrom AG, Berlin:

bi-distilliertes Wasser, Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

- von Carl Roth GmbH, Karlsruhe:

Aceton (C_3H_6O), Angiotensin II ($C_{50}H_{71}N_{13}O_{12}$), Ammoniumpersulfat (APS) ($H_8N_2O_8S_2$), Bovines Serumalbumin (BSA), Coomassie Blau R-250 ($C_{45}H_{45}N_3NaO_7S_2$), Essigsäure ($C_2H_4O_2$), Ethanol (C_2H_6O), Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O$), Glycin ($C_2H_5NO_2$), Isopropanol (C_3H_8O), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Magnesiumsulfat Heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$), Mercaptoethanol (C_2H_6OS), Methanol (CH_4O), Natriumchlorid (NaCl), Natriumdodecylsulfat (SDS) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), Natriumhydroxid (NaOH), Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$), 4x RotiLoad (#K929.1), Tetramethylethylendiamin (TEMED) ($C_6H_{16}N_2$), Tris ($C_4H_{11}NO_3$), Trichloressigsäure (TCA) ($C_2HCl_3O_2$), Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$)

- von Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt:

DMEM/F-12, Nuklease-freies Wasser, SYBR® Safe

- von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München:

Eisenoxid (Fe_3O_4), D-(+)-Glucose ($C_6H_{12}O_6$), Noradrenalin ($C_8H_{11}NO_3$)

- Weitere:

Bløk Chemiluminescent Blocker (#WBAVDCH01, Merck Millipore, Darmstadt), Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden)

4.2 Versuchstiere

Es wurden männliche Mäuse des Stammes C57BL/6 (Charles River Laboratories, Sulzfeld im Grabfeld) mit einem Körpergewicht von 22-34 g zur Evaluation von Hypoxieeffekten auf die Konstriktion afferenter Arteriolen verwendet. Die Versuchstiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité am Campus Mitte in einem

zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und mit Pressfutter und Wasser *ad libitum* versorgt. Beim Umgang mit den Tieren sowie bei der Tötung wurde das Tierschutzgesetz vom 18.05.2006, herausgegeben vom Bundesministerium der Justiz, berücksichtigt. Die Empfangsbestätigung des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit über die Anzeige zur Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken vom 24.02.2006 lag vor (Aktenzeichen T003/06). Die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ wurden beachtet.

4.3 Isolation präglomerulärer Gefäße

4.3.1 Eisenoxidperfusion für molekularbiologische Untersuchungen

Die Versuchstiere wurden durch Isofluran betäubt und durch zervikale Translokation getötet. Danach erfolgte die Organperfusion mit der Eisenoxidlösung (114): Aorta und Vena cava inferior wurden unterhalb des Nierenarterienabgangs abgeklemmt und dann oberhalb der Abbindung durchtrennt. Das Gefäßsystem wurde mit 50 ml PBS mittels Katheter im linken Ventrikel gespült. Anschließend erfolgte die Perfusion mit der Eisenoxidlösung (Zusammensetzung: 0,5 g Eisen(II,III)-oxid, 0,5 g BSA, ad 50 ml PBS). Unmittelbar nach der Perfusion wurden die Nieren entnommen. Die Kapsel wurde abgetrennt, die Nieren in eine auf Eis gekühlte Petrischale mit 120 µl PBS überführt und für vier Minuten mit einer Apollo-Klinge (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zerkleinert. Danach wurden 15 ml PBS hinzugefügt und die Suspension siebenmal durch eine Spritzenkanüle mit einem Außendurchmesser von 0,9 mm gepresst. Anschließend wurde ein Magnet an den Boden der Petrischale gehalten, sodass sich das perfundierte, eisenoxidhaltige Gewebe von der Lösung trennen ließ und der Überstand verworfen werden konnte. Daraufhin wurden erneut 15 ml PBS dazugegeben und die Lösung siebenmal durch eine Kanüle mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm gepresst. Die Lösung wurde zur Auswaschung der Tubuli ein zweites Mal mit Hilfe des Magneten aufgetrennt. Um die perfundierten Arteriolen auch von den kleineren glomerulären Gefäßen zu trennen, wurde das erhaltene Sediment in 5 ml PBS resuspendiert und durch ein Sieb mit einem 80 µm Maschennetz (Verseidag-Techfab GmbH, Geldern-Walbeck) gepresst. Die präglomerulären Gefäße verblieben dabei als Rückstand im Sieb, wohingegen die Kapillaren und der größte Teil der Glomeruli aufgrund ihrer geringeren Größe durch das Sieb wanderten und verworfen wurden. Mit einem

Papiertuch wurde das Sieb von unten getrocknet, bevor die Arteriolen vorsichtig vom Sieb abgenommen und in ein Eppendorfgefäß mit 500 µl einer Mischung aus TCA und Aceton (1+9 v/v) überführt wurden.

4.3.2 Gefäßpräparation für Perfusionsexperimente

Zur Gewinnung präglomerulärer Arteriolen für Perfusionsversuche wurden Mäuse mit Isofluran betäubt und durch zervikale Translokation getötet. Die Nieren wurden entnommen und entlang der kortikomedullären Achse aufgetrennt. Die afferenten Arteriolen und die zugehörigen Glomeruli wurden bei 4°C mit Hilfe geschliffener Pinzetten präpariert und in eine thermoregulierte Kammer eines invertierten Mikroskops (Axiovert 100, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) überführt. Zur Präparation der Arteriolen sowie für deren nachfolgende Untersuchung in der Kammer wurde DMEM/F-12 mit 0,1 % BSA (w/v) verwendet. Für die Perfusion der Arteriolen wurde DMEM/F-12 mit 1 % BSA (w/v) angereichert (115).

4.4 Molekularbiologische Analysen

4.4.1 Behandlung der Proben mit Hypoxie/Reoxygenierung

Zur Evaluation von Hypoxieeffekten auf die Expression von Proteinen, welche in den Signalwegen für Kontraktion und Erschlaffung glatter Gefäßmuskelzellen von Bedeutung sind, wurden die durch Eisenoxidperfusion gewonnenen präglomerulären Gefäße in vier Gruppen mit jeweils zehn bis zwölf Versuchstieren aufgeteilt (Tab. 3). Dafür wurden jeweils beide Nieren eines Versuchstieres zu einer Probe vereinigt.

Tabelle 3: Protokoll für die Behandlung der durch Eisenoxidperfusion gewonnenen präglomerulären Gefäße.

Testgruppe	Testsubstanz	Begasung	Reoxygenierung bei 95 % O ₂ + 5 % CO ₂	10 ⁻⁸ M Ang II
Carbogen (Kontrolle)	–	95 % O ₂ + 5 % CO ₂	+	+
Carbogen	10 ⁻⁹ M NA	95 % O ₂ + 5 % CO ₂	+	+
Hypoxie	–	95 % N ₂ + 5 % CO ₂	+	+
Hypoxie	10 ⁻⁹ M NA	95 % N ₂ + 5 % CO ₂	+	+

Ang II = Angiotensin II. NA = Noradrenalin.

Ein Teil der Proben diente als Kontrolle und wurde mit Carbogen behandelt. Hierfür wurden die Arteriolen für 70 Minuten bei Raumtemperatur unter 95 % O₂ und 5 % CO₂ in 1 ml physiologischer Salzlösung (PSS) inkubiert (Zusammensetzung PSS: 25 mM NaHCO₃, 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,18 mM MgSO₄ • 7 H₂O, 1,18 mM KH₂PO₄, 6,05 mM Glucose, 27 µM Na₂(EDTA) • 2 H₂O, pH 7,27). Die Proben der Testgruppe „Carbogen + NA“ wurden zunächst für 60 Minuten in Carbogen (95 % O₂ + 5 % CO₂) mit 1 ml PSS und 10⁻⁹ M Noradrenalin inkubiert, bevor sie für weitere 10 Minuten reoxygeniert wurden. Die Inkubation der Testgruppe „Hypoxie“ erfolgte für 60 Minuten bei 95 % N₂ und 5 % CO₂ in 1 ml PSS, bevor auch diese Proben bei 95 % O₂ und 5 % CO₂ für 10 Minuten reoxygeniert wurden. In der Testgruppe „Hypoxie + NA“ erfolgte erst eine sechzigminütige Inkubation bei 95 % N₂ und 5 % CO₂ in 1 ml PSS und 10⁻⁹ M Noradrenalin, gefolgt von einer zehnminütigen Reoxygenierung. Abschließend wurden alle Probensuspensionen für 5 Minuten mit 10⁻⁸ M Ang II inkubiert, gefolgt von einer einminütigen Zentrifugation bei ca. 12.100 g. Die Überstände der Proben wurden vollständig entfernt und die Zellpellets in 500 µl einer Mischung aus TCA und Aceton (1+9 v/v) überführt und bei -20°C eingefroren.

4.4.2 Behandlung der Proben mit oxidativem Stress

Um den Effekt von oxidativem Stress auf die Proteinexpression zu untersuchen, wurden die durch Eisenoxidperfusion isolierten Arteriolen in eine Petrischale mit 5 ml einer zuvor mit Carbogen begasten PSS (Zusammensetzung s. 4.4.1) gegeben. Die Arteriolen der Testgruppe wurden für 10 Minuten mit 10⁻⁵ M H₂O₂ unter Carbogenbegasung inkubiert. Anschließend wurden sie für 5 Minuten mit 10⁻⁷ M Ang II behandelt. Die Proben der Kontrollgruppe wurden für 10 Minuten ohne H₂O₂ mit Carbogen begast und für weitere 5 Minuten mit 10⁻⁷ M Ang II behandelt. Anschließend wurde ein Magnet an den Boden der Petrischale gehalten, um die Lösung aufzutrennen und den Überstand vollständig zu entfernen. Die eisenoxidhaltigen Proben wurden in 500 µl einer Mischung aus TCA und Aceton (1+9 v/v) überführt und bei -20°C eingefroren.

4.4.3 Proteinbestimmung mit SDS-PAGE und Western Blot

Das Verfahren der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung und dadurch dem Nachweis von Proteinen eines Gemisches. Bei der PAGE wird ein Polyacrylamidgel gebildet, das die Proteine abhängig von Molekular-

gewicht, Ladung und Konformation mehr oder weniger stark zurückhält. Der Zusatz von SDS als anionisches Detergenz dient zur Überdeckung der Eigenladung der Proteine und zur Zerstörung der nativen Proteinkonformation. Dadurch werden die Proteingemische in der SDS-PAGE nur noch aufgrund der Größe der einzelnen Proteine aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit bleibt nur bei konstantem pH-Wert gleich, kann aber zusätzlich durch die elektrische Feldstärke beeinflusst werden. In einem alkalischen pH-Bereich haben alle Proteine eine negative Nettoladung unterschiedlicher Höhe, sodass sie im elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung Anode wandern. Sie können anschließend mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und nach Markierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Zusammensetzung der Puffer und Gele:

<u>Puffer 1:</u>	<u>Puffer 2:</u>	<u>Lysispuffer:</u>
750 mM Tris	250 mM Tris	25 mM Tris
0,2 % SDS	0,2 % SDS	200 mM Glycin
→ pH 8,8	→ pH 6,8	1 % SDS
<u>Trenngel:</u>	<u>Sammelgel:</u>	<u>Laufpuffer (Laemmli):</u>
1 ml H ₂ O	2,6 ml H ₂ O	25 mM Tris
2 ml Polyacrylamid	1 ml Polyacrylamid	250 mM Glycin
3 ml Puffer 1	3,75 ml Puffer 2	0,1 % SDS
50 µl APS	75 µl APS	
5 µl TEMED	13,5 µl TEMED	
<u>TBS-T:</u>	<u>Blockierungslösung:</u>	<u>Blottingpuffer:</u>
20 mM Tris	5 % BSA	25 mM Tris
150 mM NaCl	in TBS-T (w/v)	200 mM Glycin
0,1 % Tween 20		0,05 % SDS
		20 % Methanol

4.4.3.1 Aufarbeitung der Gefäße nach Hypoxie/Reoxygenierung

Die Proben wurden vor der weiteren Aufarbeitung zunächst kurz zentrifugiert und das Aceton/TCA-Gemisch abgenommen. Als Nächstes wurde das TCA mittels dreimaligen Waschens der Proben auf Eis mit je 500 µl Aceton für drei Minuten entfernt. Das Probengewebe wurde dann im offenen Eppendorfgefäß luftgetrocknet. Die Proben

wurden mit jeweils 100 µl Lysispuffer versetzt und für 50 Minuten bei 95°C und bei ca. 103 g im Thermoschüttler inkubiert (Thermomixer® comfort, Eppendorf AG, Hamburg). Alle zehn Minuten und einmal zum Schluss wurden die Proben dabei kurz bei ca. 12.100 g zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg). Dadurch setzte sich das Bindegewebe am Boden der Eppendorfgefäße ab. Der Überstand wurde abgenommen, um die Proteinkonzentration in den löslichen Bestandteilen der Proben messen zu können. Dies erfolgte durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ (NanoDrop 8000, PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Für die Gelelektrophorese wurde ein 10%iges SDS-Gel gegossen und die Gelplatten gemäß Herstellerangaben in den Gießstand (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingesetzt. Das Gel wurde mit Isopropanol beschichtet, um Unebenheiten der Geloberfläche zu vermeiden. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel über das Trenngel gegossen und ein Kamm für die späteren Probentaschen eingesetzt. Die Gelplatten wurden nach Polymerisation des Sammelgels in die Elektrophoresekammer eingesetzt, der Laufpuffer hinzugegeben und die Kämmen gezogen. Die entstandenen Geltaschen wurden vorsichtig ausgespült. Für die Proben wurden Ansätze aus jeweils 75 µg Proteinextrakt und bi-distilliertem Wasser pipettiert. Diese Proben wurden mit 4x RotiLoad versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, bevor sie abgekühlt in die Geltaschen pipettiert wurden. Die Elektrophorese der Proteinextrakte erfolgte für 15 Minuten bei 80 V und anschließend für 100 Minuten bei 100 V. Währenddessen wurden Hybond™-P Membranen (Amersham-Pharmacia, Freiburg) zur Aktivierung kurz in Methanol geschwenkt, dann jeweils 5 Minuten in bi-distilliertem Wasser inkubiert und in Blottingpuffer äquilibriert. Danach erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membranen mittels Western Blot in einer Transferzelle (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit Blottingpuffer für 50 Minuten bei 100 V. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie-Blau-Lösung (0,25 % Coomassie Blau R-250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) gefärbt, um zu kontrollieren, ob Proteinmengen im Gel verblieben sind. Die Membranen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % BSA in TBS-T (w/v) inkubiert, um eventuelle unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C, wenn nicht anders angegeben unter Zusatz von 1 % BSA (TBS-T, w/v).

Verwendete Primärantikörper:

- Cell Signaling Technology, Niederlande:
 - Anti-Hsp27 Kaninchen Antikörper (#2442, Verdünnung 1:1.000)
 - Anti-MK Kaninchen Antikörper (#3042, Verdünnung 1:1.000)
 - Anti-MLC2 Kaninchen Antikörper (#3672, Verdünnung 1:1.000)
 - Anti-MYPT1 Kaninchen IgG Antikörper (#2634, Verdünnung 1:1.000)
 - Anti-p38 Kaninchen Antikörper (#9212, Verdünnung 1:1.000)
 - pSer82 anti-Hsp27 Kaninchen Antikörper (#2401, Verdünnung 1:1.000)
 - pThr334 anti-MK2 Kaninchen IgG Antikörper (#3007, Verdünnung 1:1.000)
 - pThr696 anti-MYPT1 Kaninchen IgG Antikörper (#5163, Verdünnung 1:1.000)
 - pThr853 anti-MYPT1 Kaninchen IgG Antikörper (#4563, Verdünnung 1:1.000)

- Acris Antibodies GmbH, Herford:
 - pSer19/20 Anti-MLC Kaninchen Antikörper (#R1535P, Verdünnung 1:1.000)
 - Anti- α -Actin Kaninchen Antikörper (#AB5694, Verdünnung 1:10.000)
 - Anti- α -Actin Kaninchen Antikörper (#NB600-531, Verdünnung 1:2.000)

- weitere:
 - pThr180/182 Anti-p38 Kaninchen Antikörper (#506119, Calbiochem, Bad Soden, Verdünnung 1:1.000)
 - Anti-Actin Antikörper (#PA1-16889, Thermo Fisher Scientific GmbH, Verdünnung 1:10.000 in 10 % B10k Chemiluminescent Blocker (TBS-T, v/v))

Die Membranen wurden anschließend dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit dem Zweitantikörper (donkey anti-rabbit IgG Antikörper, HRP #sc-2317, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Verdünnung 1:50.000) in 2,5 % BSA (TBS-T, w/v) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Danach erfolgten drei weitere Waschschriffe mit TBS-T für je 10 Minuten. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System (RPN2132, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) verwendet. Detektion und Filmentwicklung wurden laut Herstellerangaben durchgeführt. Eine Peroxidase-vermittelte Chemolumineszenzreaktion bewirkt dabei die Schwarzfärbung des Röntgenfilms proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers. Das Maß der Schwärzung hängt

damit also von der Menge des in der Probe enthaltenen Proteins ab. Die entwickelten Filme wurden eingescannt und mit Hilfe des Programms ImageJ (Version 1.44p, National Institutes of Health, USA) densitometrisch ausgewertet.

Zur Datennormierung sowie als Lade- und Transferkontrolle wurden die Membranen gestrippt und mit Anti- α -Actin gegengefärbt, da das hier untersuchte α 2-Actin in glatten Muskelzellen nachweisbar und für diese spezifisch ist. Hierfür wurden die Membranen für 5 Minuten mit bi-destilliertem Wasser gewaschen, anschließend kurz in Methanol reaktiviert und erneut für 5 Minuten mit bi-destilliertem Wasser gewaschen. Danach schloss sich eine Inkubation in 0,2 M NaOH an. Die unspezifischen Bindungen wurden erneut für eine Stunde in 5 % BSA (in TBS-T, w/v) blockiert, gefolgt von einem dreimaligen Waschvorgang in TBS-T. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in Anti- α -Actin-Antikörper (#AB5694, Acris Antibodies GmbH, S. 32) inkubiert. Die weiteren Verfahrensschritte bis hin zur Filmentwicklung erfolgten wie bereits oben beschrieben.

4.4.3.2 Aufbereitung der H₂O₂-behandelten Gefäße

Die mit 10^{-5} M H₂O₂ behandelten Gefäße wurden wie unter 4.4.3.1. beschrieben lysiert und die Proteinkonzentrationen gemessen. Für die SDS-PAGE wurden Ansätze aus 30 μ g Protein und bi-destilliertem Wasser mit 4x RotiLoad versetzt. Die Gelelektrophorese und der Western Blot wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die mit den Proteinen beladenen Membranen wurden mit den unter 4.4.3.1. aufgeführten Primärantikörpern für die phosphorylierten und unphosphorylierten Isoformen der p38 MAPK und der MLC₂₀ inkubiert. Anschließend wurde wie o. g. verfahren: Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit TBS-T erfolgte die einstündige Inkubation mit dem bereits erwähnten Zweitantikörper, nach nochmaligem Waschen die entsprechende Detektion und Filmentwicklung. Die Membranen wurden ebenfalls nach der Detektion gestrippt und zur Normierung mit einem Anti-Actin-Antikörper (#PA1-16889, Thermo Fisher Scientific GmbH, S. 32) gegengefärbt.

4.5 Perfusionsexperimente

4.5.1 Untersuchungen zu Hypoxieeffekten

Zur Evaluation des direkten Effekts von Hypoxie auf die Konstriktion afferenter Arteriolen wurde PSS (115 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM K₂HPO₄, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄ und 5,5 mM Glukose) für 10 Minuten mit einem Gemisch aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ begast, sodass ein Sauerstoffpartialdruck von < 1 Torr erreicht wurde. Die Arteriolen mit ihrem zugehörigen Glomerulus wurden bei Raumtemperatur für 60 Minuten in 10 ml Lösung bei ständiger Begasung mit dem hypoxischen Gasgemisch inkubiert. Für die Untersuchungen zur Wirkung von Hypoxie in Kombination mit Noradrenalin erfolgte die Inkubation in einer hypoxischen PSS mit Zusatz von 10⁻⁹ M Noradrenalin. In Kontrollgefäßen erfolgte die Begasung mit Carbogen. Die nächsten Schritte waren für alle Gefäße identisch: Nach der einstündigen Inkubation im Medium erfolgte eine zehnminütige Reoxygenierung unter Raumatmosphäre. Zeitgleich wurden die Arteriolen in der Kammer fixiert und perfundiert. Das Medium war hier DMEM/F-12, mit Raumluft äquilibriert und mit HEPES gepuffert. Es wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Ang II (10⁻¹² M bis 10⁻⁶ M) gemessen. Die Arteriolen wurden videomikroskopisch dargestellt und Bilder für die spätere Auswertung gespeichert. Mit der Standardsoftware ImageJ (Version 1.46) wurde der Durchmesser von Lumen und Endothel der Arteriolen ausgemessen. Diese Messungen wurden mit Hilfe des Programms Gnumeric (Version 1.12.15, The GNOME Project) ausgewertet.

4.5.2 Untersuchungen zu oxidativem Stress

Der direkte Einfluss von oxidativem Stress auf die Konstriktion präglomerulärer Gefäße wurde untersucht, indem die Gefäße nach der Präparation perfundiert und 10 Minuten mit 10⁻⁵ M H₂O₂ behandelt wurden. Dann erfolgte die Messung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Ang II (10⁻¹² M bis 10⁻⁶ M) in Anwesenheit von H₂O₂. Die Kontrollgefäße wurden ebenfalls für 10 Minuten mit DMEM/F-12 perfundiert, die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Ang II (10⁻¹² - 10⁻⁶ M) wurde erstellt. Die Gefäßreaktionen wurden wie unter 4.5.1. dokumentiert und ausgewertet.

4.6 Polymerase-Kettenreaktion

4.6.1 RNA-Präparation

Für Analysen der p38 MAPK-Expression mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden Gewebeproben aus Nierenarteriolen, Nieren, Lunge, Pankreas, Testis, Oberschenkelmuskulatur sowie Groß-, Mittel- und Zwischenhirn von Mäusen (s. 4.2) verwendet. Aus diesen wurde die Ribonukleinsäure (RNA) mittels RNeasy Mini Kit isoliert (#74104, Qiagen, Hilden). Dazu wurden 30 g der Proben mit einem Gemisch aus 500 µl Puffer RLT und 5 µl Mercaptoethanol versetzt. Zur Auftrennung und Homogenisierung des Gewebes wurde diese Suspension für zweimal 20 Sekunden im FastPrep® FP120 (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe) bei einer Geschwindigkeit von 4,0 m/s inkubiert. Das entstandene Lysat wurde für 3 Minuten bei 24°C und ca. 12.100 g zentrifugiert. Anschließend wurde es als Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt und durch Pipettieren vermischt. Die Probe wurde dann in ein in einem 2 ml Sammelgefäß befindliches RNeasy Spin-Röhrchen überführt und für eine Minute bei ca. 7.150 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde abgenommen und die Probe zur Reinigung von DNase mit einem Gemisch aus 10 µl DNase 1 Stammlösung und 70 µl Puffer RDD (RNase-freies DNase-Set #79254, Qiagen, Hilden) für 15 Minuten bei 24°C inkubiert. Anschließend wurde 350 µl Puffer RW1 hinzugegeben und die Lösung für eine Minute bei ca. 7.150 g zentrifugiert, um die DNase 1 vollständig auszuwaschen. Der Durchfluss wurde abgenommen und das RNeasy Spin-Röhrchen in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Der Puffer RPE wurde mit Ethanol verdünnt (1+4 v/v) und 500 µl dieses Gemisches zur Probe hinzugegeben. Die Lösung wurde erneut für eine Minute bei ca. 7.150 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden erneut 500 µl des Gemisches aus Puffer RPE und Ethanol zur Probe gegeben und für zwei Minuten bei ca. 7.150 g zentrifugiert, um die Röhrchenmembran zu trocknen und zu verhindern, dass Ethanol in die RNA-Elution gelangt. Der Durchfluss wurde erneut entfernt und das Sammelgefäß gewechselt. Um den Puffer RPE zu entfernen, wurde die Probe für 5 Minuten bei ca. 12.100 g zentrifugiert. Das RNeasy Spin-Röhrchen wurde anschließend in ein 1,5 ml Sammelgefäß gesetzt. Auf die Mitte der Röhrchenmembran wurden 15 µl RNase-freies Wasser gegeben und die Probe für eine Minute bei ca. 12.100 g zentrifugiert.

4.6.2 Primeroptimierung

Zunächst sollte die optimale Annealingtemperatur für die Primer der vier p38 MAPK-Isoformen gefunden werden. Davon wurden 12 Ansätze aus jeweils 2 µg RNA in 10 µl RNA-Lösung (RNA + nuklease-freies Wasser, w/v) zu 10 µl RT Master Mix (Zusammensetzung s. Tab. 4, S. 38) in PCR Tubes gegeben, um daraus cDNA zu synthetisieren. Die PCR Tubes wurden anschließend im T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) inkubiert. Zur Transkription der cDNA wurde folgendes Protokoll angewandt: Annealing für 10 Minuten bei 25°C, Elongation für 120 Minuten bei 37°C, Enzyminaktivierung für 5 Minuten bei 85°C und schließlich Abkühlung auf 4°C. Für die PCR wurden Ansätze, jeweils bestehend aus PCR-Ansatz 1 (Tab. 4, S. 38) und 50 ng cDNA, in PCR Tubes pipettiert. Es wurde folgendes Protokoll angewandt: Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C, 38 Annealing-Zyklen bei 95°C, X°C und 72°C für je 30 Sekunden, Elongation bei 72°C für 10 Minuten und schließlich Abkühlung auf 4°C. Für die Temperatur X des Annealings wurden für die 12 Ansätze unterschiedliche Temperaturen zwischen 50,0°C und 66,5°C eingestellt. Die Proben wurden anschließend mit 6x Orange DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, das SYBR® Safe 1:10 in TBE enthielt. Die Elektrophorese erfolgte für 25 bis 30 Minuten bei 100 V.

Für die PCR wurden folgende Primer verwendet:

Primer	Genbank Acc.- Nummer	Sequenz 5' – 3'	Produktgröße
MAPK11 vorwärts	NM_011161.5	GTGGCCACACGGTGGTACCG	223 bp
MAPK11 rückwärts		TCCGGGCATGCTCCGAGGAT	
MAPK12 vorwärts	NM_013871.3	CGCAAGCCCTCAGGCTGTGA	324 bp
MAPK12 rückwärts		GCCGTGAAGCTCCGAGCCAA	
MAPK13 vorwärts	NM_011950.2	CGGGCTATGTGGTGACCCGC	315 bp
MAPK13 rückwärts		GCAGGTCTGCAGCTTGCGGA	
MAPK14 vorwärts	NM_011951.3	TCACAGGGACCTAAAGCCCAGCA	297 bp
MAPK14 rückwärts		AGCTCAGCCCCTGGGGTTCC	

Nach der Gelelektrophorese aller Proben der vier Primer imponierte für alle Isoformen ein starkes Signal im Bereich von 60,8°C (Abb. 6 - 9, S. 37). Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden PCR-Versuche zur Expressionsanalyse in Arteriolen eine Annealingtemperatur von 60°C gewählt.

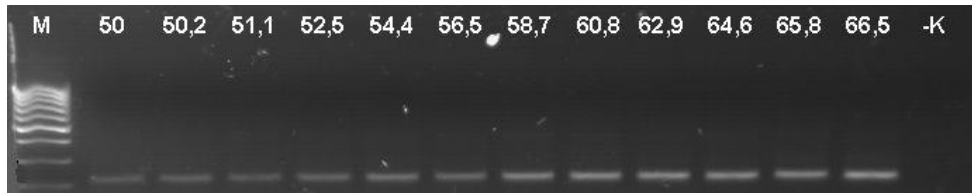


Abbildung 6: PCR mit Primer der MAPK 11 zur Optimierung der Annealingtemperatur für die nachfolgenden Untersuchungen. M Marker, -K Negativkontrolle. Zahlangaben in °C.

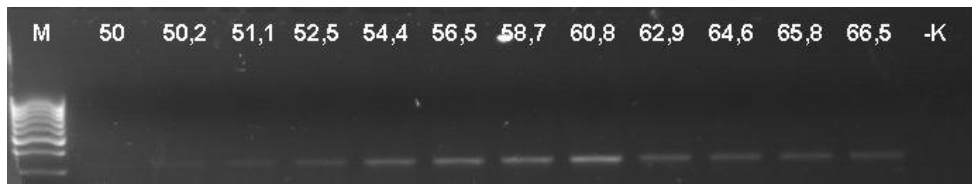


Abbildung 7: PCR mit Primer der MAPK 12 zur Optimierung der Annealingtemperatur für die nachfolgenden Untersuchungen. M Marker, -K Negativkontrolle. Zahlangaben in °C.

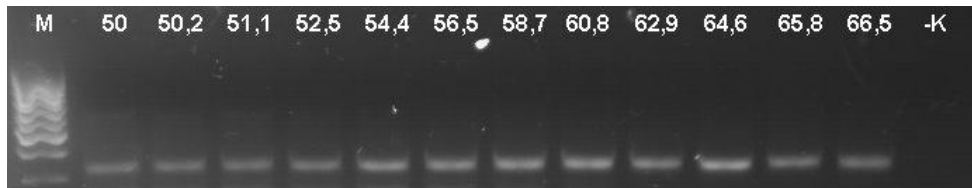


Abbildung 8: PCR mit Primer der MAPK 13 zur Optimierung der Annealingtemperatur für die nachfolgenden Untersuchungen. M Marker, -K Negativkontrolle. Zahlangaben in °C.

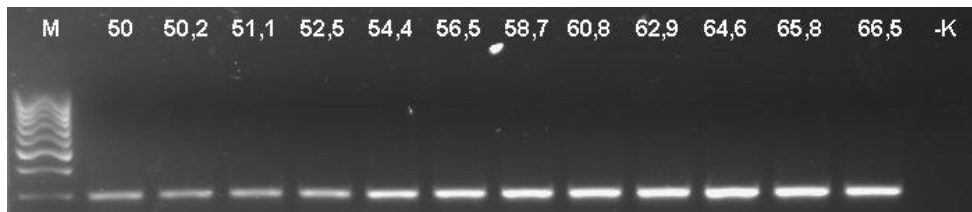


Abbildung 9: PCR mit Primer der MAPK 14 zur Optimierung der Annealingtemperatur für die nachfolgenden Untersuchungen. M Marker, -K Negativkontrolle. Zahlangaben in °C.

4.6.3 Expressionsanalysen der p38 MAPK-Isoformen

Für Expressionsanalysen der p38-Isoformen MAPK11-14 in verschiedenen Geweben, wurden RNA-Proben von männlichen Mäusen des Stammes C57BL/6 (s. 4.2) aus

METHODEN UND MATERIALIEN

Niere, Testis, Oberschenkelmuskulatur, Lunge, Pankreas sowie Hirn gewonnen. Davon wurden jeweils 2 µg RNA in 10 µl RNA-Lösung (RNA + nuklease-freies Wasser, w/v) zu 10 µl RT Master Mix (Tab. 4) in PCR Tubes gegeben, um daraus cDNA zu synthetisieren. Die PCR Tubes wurden anschließend im Thermocycler inkubiert. Zur Transkription der cDNA wurde folgendes Protokoll angewandt: Annealing für 10 Minuten bei 25°C, Elongation für 120 Minuten bei 37°C, Enzyminaktivierung für 5 Minuten bei 85°C und schließlich Abkühlung auf 4°C. Von der gewonnenen cDNA wurden jeweils 50 ng auf die PCR-Ansätze pipettiert (s. PCR-Ansatz 2, Tab. 4). Das PCR-Programm lautete wie folgt: initiale Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase für 5 Minuten bei 95°C, 35 Annealing-Zyklen für jeweils 30 Sekunden bei 95°C, 58°C und 72°C, schließlich Elongation für 10 Minuten bei 72°C und Abkühlung auf 4°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit 6x Orange DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel mit SYBR® Safe aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 15 Minuten bei 100 V durchgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzungen des RT Master Mixes zur cDNA-Transkription und der Ansätze für die PCRs zur Expressionsanalyse der p38 MAPK-Isoformen in verschiedenen Geweben der Maus.

<u>RT Master Mix:</u>	<u>PCR-Ansatz 1:</u>	<u>PCR-Ansatz 2:</u>
• 2 µl 10x RT Buffer	• 2,5 µl 10x Puffer Y	• 2,5 µl 10x Puffer Y
• 0,8 µl 25x 100 mM dNTP Mix	(20 mM MgCl ₂)	(20 mM MgCl ₂)
• 2 µl 10x RT Random Primers	• 1 µl 5 mM dNTPs	• 1 µl 5 mM dNTPs
• 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase	• 0,25 µl Taq-Polymerase	• 0,25 µl Taq-Polymerase
• 1 µl RNase Inhibitor	• 1 µl 10 pM Primer-Mix	• 1 µl 10 pM Primer-Mix
• 3,2 µl nuklease-freies Wasser	• 18,75 µl nuklease-freies Wasser	• 15,25 µl nuklease-freies Wasser

Zur Analyse der p38 MAPK-Expression in Arteriolen wurden zunächst 12 µg RNA in 12 µl RNA-Lösung (RNA + nuklease-freies Wasser, w/v) mit 8 µl RT Master Mix (Tab. 4) in PCR Tubes gegeben, um die cDNA zu synthetisieren. Die PCR Tubes wurden im Thermocycler inkubiert. Zur Transkription der cDNA wurde folgendes Protokoll angewandt: Annealing für 10 Minuten bei 25°C, Elongation für 120 Minuten bei 37°C, Enzyminaktivierung für 5 Minuten bei 85°C und Abkühlung auf 4°C. Die Ansätze für die PCR bestanden aus dem zweifachen Ansatz 1 (Tab. 4) und 50 ng cDNA aus der Nierenarteriole. Das PCR-Programm lautete wie folgt: initiale Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase für 5 Minuten bei 95°C, 38 Annealing-Zyklen für jeweils

30 Sekunden bei 95°C, 60°C und 72°C, schließlich Elongation für 10 Minuten bei 72°C und Abkühlung auf 4°C. Die PCR-Produkte wurden anschließend ebenfalls mit jeweils 6x Orange DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel mit SYBR® Safe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 100 Volt.

4.7 Datenerfassung und statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung dienten die Programme SPSS (Version 22), Gnumeric (Version 1.12.15) sowie R (Version 2.8.1). Die densitometrischen Messwerte aus den molekularbiologischen Experimenten, erhoben mit dem Programm ImageJ (Version 1.44p), wurden zunächst auf gemessene Werte von α -Actin aus denselben Versuchen normalisiert und anschließend mittels Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Aufgrund der Stichprobenmenge von $n = 10-12$ wurde keine Normalverteilung angenommen. Wurde das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erreicht, schloss sich als Post-hoc-Test der Mann-Whitney-U-Test an.

Zur Auswertung der Perfusionsexperimente wurde zunächst der Brunner-Test durchgeführt, eine nicht parametrische ANOVA für abhängige Stichproben. Zum paarweisen Vergleich wurde auch hier nach Erreichen des o. g. Signifikanzniveaus der Mann-Whitney-U-Test als Post-hoc-Analyse herangezogen.

Alle angegebenen Daten werden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Polymerase-Kettenreaktion

5.1.1 Expressionsanalysen der p38 MAPK-Isoformen in verschiedenen Geweben

Die Expression der p38-Isoformen MAPK11-14 wurde mittels PCR untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle vier Isoformen im Nierengewebe exprimiert wurden (Abb. 10). Die MAPKs 11, 13 und 14 konnten ebenfalls in testikulärem Gewebe, die MAPKs 11, 12 und 14 in Hirngewebe nachgewiesen werden.

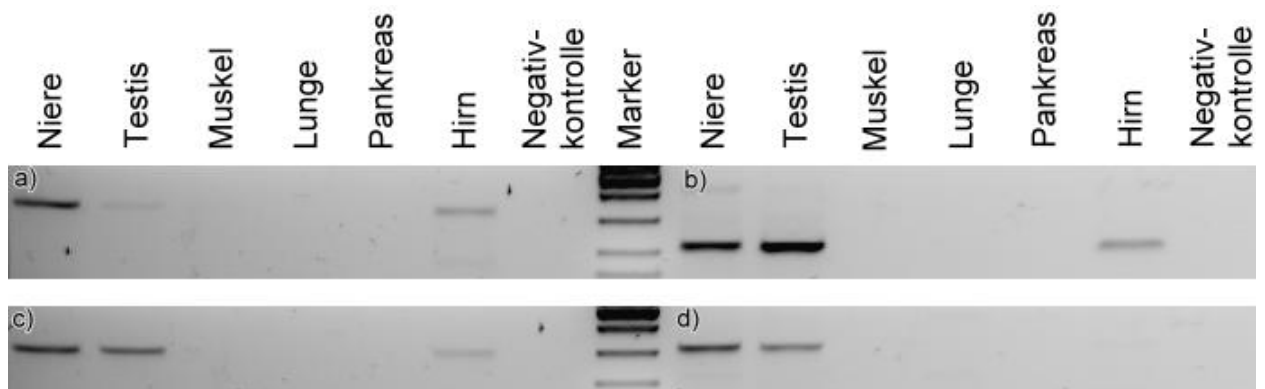


Abbildung 10: PCR zur Untersuchung der Expression der vier p38 MAPK-Isoformen in verschiedenen Geweben der Maus. a) MAPK 12. b) MAPK 11. c) MAPK 14. d) MAPK 13.

5.1.2 Expressionsanalysen der p38 MAPK-Isoformen Expression in Arteriolen

Um nachzuweisen, dass alle Isoformen auch in den Arteriolen exprimiert werden, wurde eine weitere PCR mit cDNA aus den präglomerulären Gefäßen einer C57BL/6 Maus durchgeführt. Hierzu wurden alle Isoformen untersucht und entsprechende Negativkontrollen durchgeführt. Wie in Abbildung 11 (S. 41) zu sehen ist, konnten alle Isoformen in Arteriolen nachgewiesen werden.

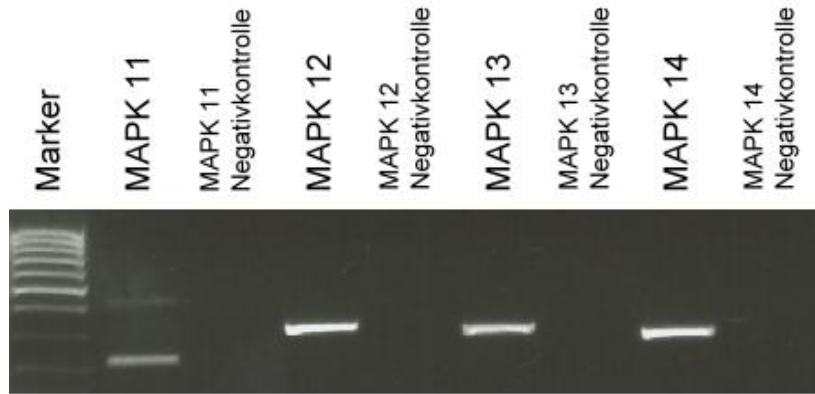


Abbildung 11: PCR zur Untersuchung der Expression der vier p38 MAPK-Isoformen in Arteriolen der Maus.

5.2 Kontraktile Funktion afferenter Arteriolen

5.2.1 Hypoxie/Reoxygenierung

Um den Einfluss von Hypoxie/Reoxygenierung auf die Konstriktion präglomerulärer Gefäße zu untersuchen, wurde in afferenten Arteriolen nach 60 Minuten Hypoxie und 10 Minuten Reoxygenierung eine Ang II-Konzentrations-Wirkungs-Kurve gemessen (Abb. 12, S. 42).

ERGEBNISSE

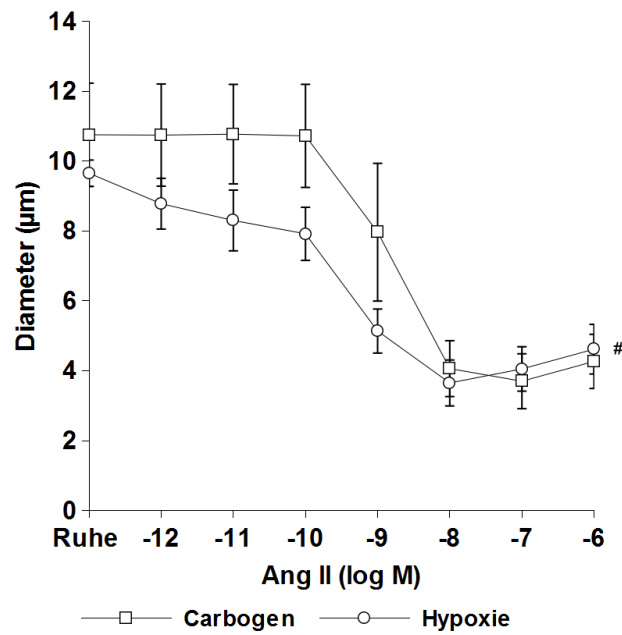


Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Ang II nach Behandlung mit Carbogen (Kontrollbedingungen) und Hypoxie. Die Kurven Carbogen und Hypoxie unterscheiden sich signifikant (Brunner-Test, # $p < 0,05$).

Wie in Abbildung 13 (S. 43) zu sehen ist, reagieren die Arteriolen nach Hypoxie/Reoxygenierung sensitiver auf Ang II-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen.

Inwiefern Noradrenalin auf die Konstriktion unter Carbogenbegasung bzw. Hypoxie wirkt, sollte beurteilt werden, indem präglomeruläre Gefäße während der Hypoxie bzw. während entsprechender Kontrollbedingungen zusätzlich mit einer nicht-konstriktorischen Konzentration von 10^{-9} M Noradrenalin behandelt wurden.

ERGEBNISSE

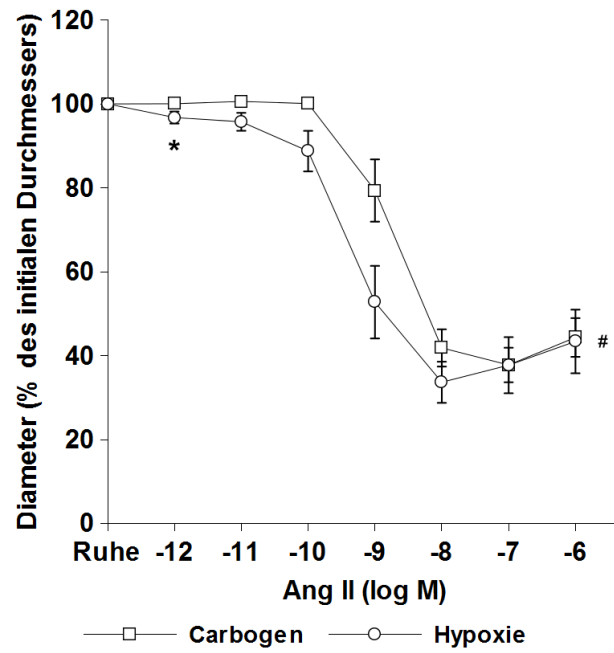


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für relative Durchmesser nach Behandlung mit Carbogen (Kontrollbedingungen) und Hypoxie/Reoxygenierung. Die Kurven Carbogen und Hypoxie unterscheiden sich signifikant (Brunner-Test, # $p < 0,05$). Post-hoc-Test: * $p < 0,05$.

ERGEBNISSE

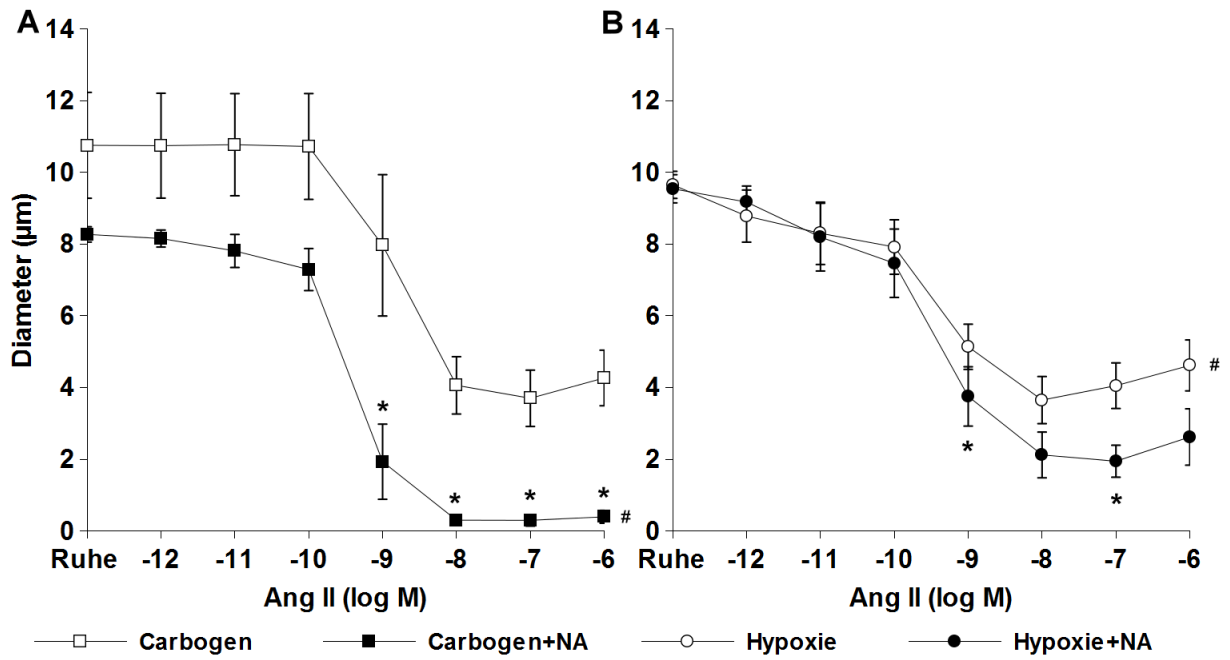


Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Ang II. A) Konstriktion unter Kontrollbedingungen (Carbogen) und Carbogenbegasung + Inkubation mit 10^{-9} M Noradrenalin (Carbogen+NA). B) Konstriktion unter Behandlung mit Hypoxie/Reoxygenierung (Hypoxie) und zusätzlich 10^{-9} M Noradrenalin (Hypoxie+NA). Folgende Kurven unterscheiden sich signifikant: Carbogen vs. Carbogen+NA; Carbogen vs. Hypoxie (Brunner-Test, # $p < 0,05$). Post-hoc-Test: * $p < 0,05$. Carbogen $n=8$. Carbogen+NA $n=6$. Hypoxie $n=10$. Hypoxie+NA $n=8$.

Abbildung 14 A zeigt eine konzentrationsabhängige Änderung des Gefäßdurchmessers. Maximale Effekte werden bei Konzentrationen von 10^{-8} M bis 10^{-6} M erreicht. Im Bereich von höheren Ang II-Konzentration ($\geq 10^{-9}$ M) wird die Konstriktion auf Ang II durch Noradrenalin-Behandlung signifikant stärker sowohl unter hypoxischen als auch Kontrollbedingungen (Abb. 14 A + B). Die Ausgangsdurchmesser der Arteriolen unterscheiden sich im Vergleich der Gruppen nicht signifikant.

ERGEBNISSE

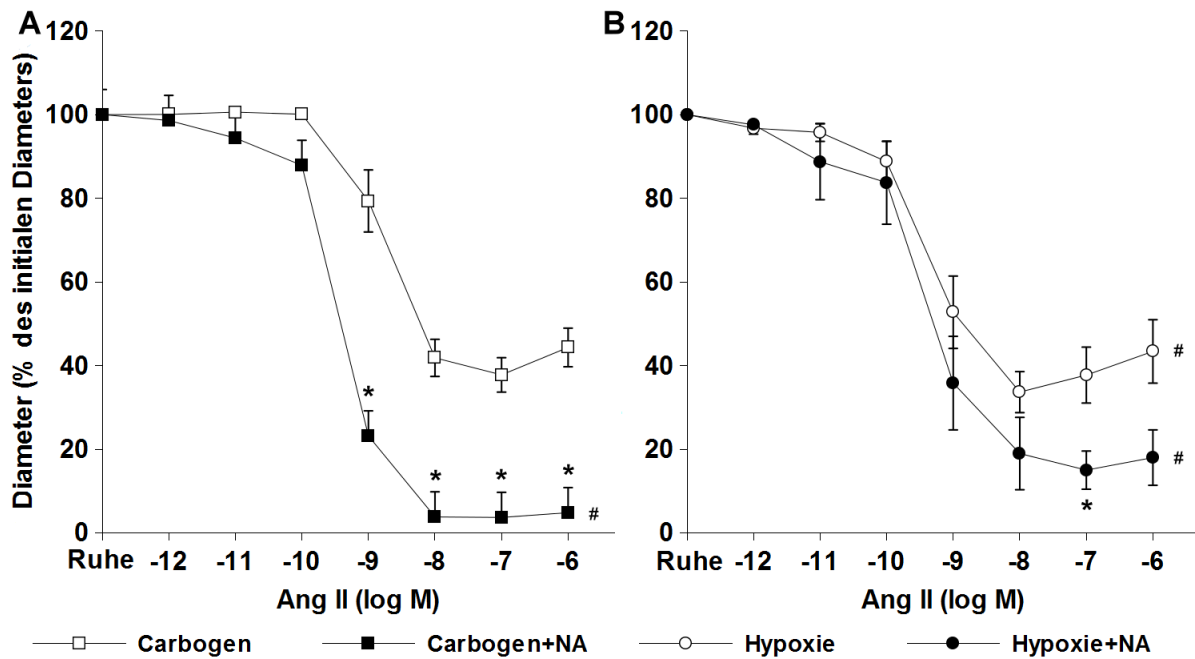


Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für relative Durchmesser. A) Konstriktion nach Carbogenbelegung (Kontrolle) und Carbogenbelegung + Inkubation mit 10^{-9} M Noradrenalin (Carbogen+NA). B) Konstriktion unter Behandlung mit Hypoxie (Hypoxie) und zusätzlich 10^{-9} M Noradrenalin (Hypoxie+NA). Die Kurven zeigen jeweils signifikante Unterschiede (Brunner-Test, # p < 0,05). Post-hoc-Test: * p < 0,05. Carbogen n=7. Carbogen+NA n=6. Hypoxie n=8. Hypoxie+NA n=6.

Abbildung 15 A zeigt, dass die relative Gefäßkonstriktion der „Carbogen+NA“-Testgruppe für Messungen bei 10^{-9} M bis 10^{-6} M Ang II signifikant stärker ausgeprägt ist als unter Kontrollbedingungen oder nach Inkubation in Hypoxie. Behandlung der Gefäße mit NA unter Carbogenbelegung führt bei $\geq 10^{-8}$ M Ang II dazu, dass die Gefäßlumen fast vollständig verschlossen sind.

Die Konstriktion nach Inkubation mit Hypoxie + NA ist, wie in Abbildung 15 B gezeigt, stärker als unter Hypoxie.

5.2.2 Perfusion nach Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid

In einem weiteren Perfusionsexperiment sollte der Einfluss von oxidativem Stress vermittelt durch Wasserstoffperoxid auf die Ang II-induzierte Konstriktion afferenter Arteriolen untersucht werden. Nach zehnmütiger luminaler Behandlung mit 10^{-5} M H_2O_2 erfolgte die Messung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Ang II unter

ERGEBNISSE

Anwesenheit von H₂O₂. Die Kontrollgefäße wurden 10 Minuten in DMEM/F-12 ohne H₂O₂ gehalten und dann die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Ang II gemessen.

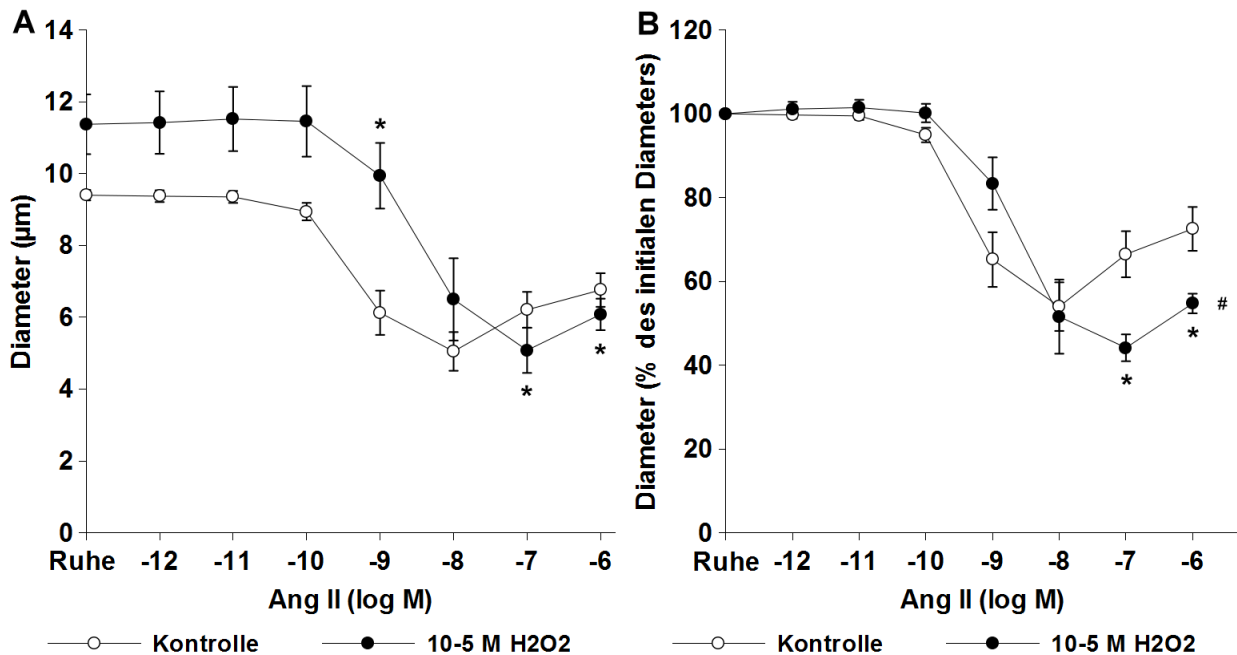


Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Ang II mit und ohne Behandlung mit 10⁻⁵ M H₂O₂. A) Absolute Gefäßdurchmesser in µm. B) Relative Gefäßdurchmesser bezogen auf den Ausgangsdurchmesser vor Perfusionsbeginn. Die Kurven Kontrolle und H₂O₂ unterscheiden sich signifikant (Brunner-Test, # p < 0,05). Post-hoc-Test: * p < 0,05. Kontrolle n=20. H₂O₂ n=5.

Abbildung 16 zeigt, dass H₂O₂ die Ang II-induzierte Konstriktion im Bereich höherer Ang II-Konzentrationen verstärkt.

5.3 Expression von p38 MAPK, MYPT1, MLC₂₀, Hsp27, MK-2

5.3.1 Hypoxie/Reoxygenierung und Noradrenalin

Der Effekt von Hypoxie und NA auf die Expression von p38 MAPK, MYPT1, MLC₂₀, Hsp27 und MK-2 wurde untersucht, indem nach Eisenoxidperfusion gewonnene Arteriolen in Hypoxie und/oder Noradrenalin inkubiert wurden. Die Proteinexpression wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Zu den untersuchten Proteinen gehören p38 MAPK, MLC₂₀, Hsp27, MK-2 einschließlich ihrer phosphorylierten Formen sowie die MYPT1 und zwei an unterschiedlichen Aminosäuren phosphorylierte Formen der MYPT1 (pThr696, pThr853). Die Western

Blots der Proteine Hsp27, P-Hsp27, MK-2 und P-MK-2 konnten nicht zuverlässig ausgewertet werden, sodass auf die Darstellung der Ergebnisse dieser Proteine verzichtet werden muss.

5.3.1.1 Verhalten der p38 MAPK

Die Expression von p38 MAPK und seiner phosphorylierten Form P-p38 MAPK zeigte unter den vier untersuchten Bedingungen ähnliches Verhalten (Abb. 17). Die p38 MAPK wurde unter den Versuchsbedingungen Noradrenalin und/oder Hypoxie nicht verstärkt exprimiert. Es erfolgte auch keine vermehrte Phosphorylierung nach diesen Behandlungen.

Sowohl die p38 MAPK als auch ihre phosphorylierte Form P-p38 MAPK zeigten Tendenzen für eine Proteinmengenerhöhung unter Carbogen + NA und Hypoxie. Diese sind nicht signifikant, korrelieren aber mit der in den Perfusionsexperimenten gemessenen verstärkten Arteriolenkonstriktion.

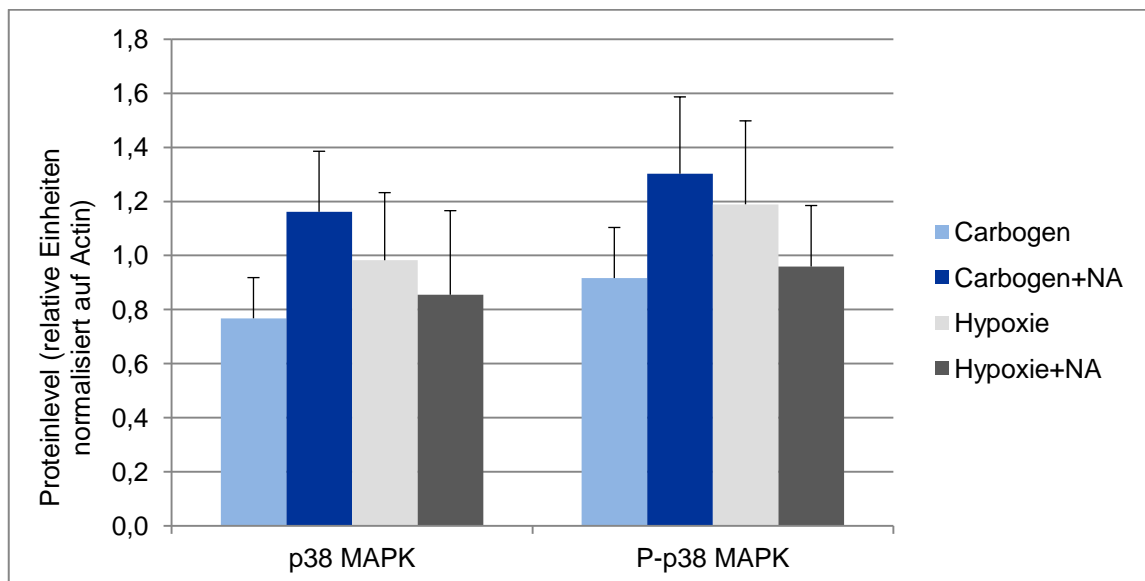


Abbildung 17: Proteinexpressionslevel von p38 MAPK und seiner phosphorylierten Form P-p38 MAPK nach SDS-PAGE und Western Blot der entsprechend vorbehandelten Arteriolen. Carbogen n=10, Carbogen+NA n=10, Hypoxie n=11, Hypoxie+NA n=12.

5.3.1.2 Verhalten der MLC₂₀

Die regulatorische leichte Kette des Myosins, MLC₂₀, führt nach Phosphorylierung durch die MLCK zur Kontraktion der glatten Muskelzellen und nach Dephosphorylierung zur Relaxation (116,117). Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Aktivität der MLC₂₀ zeigten, dass die unphosphorylierte Form nach Inkubation mit Noradrenalin unter Carbogenbegasung signifikant stärker exprimiert wird. Für die MLC₂₀ gilt zudem, dass die Expression unter Carbogen + NA signifikant stärker ist als unter Hypoxie (Abb. 18).

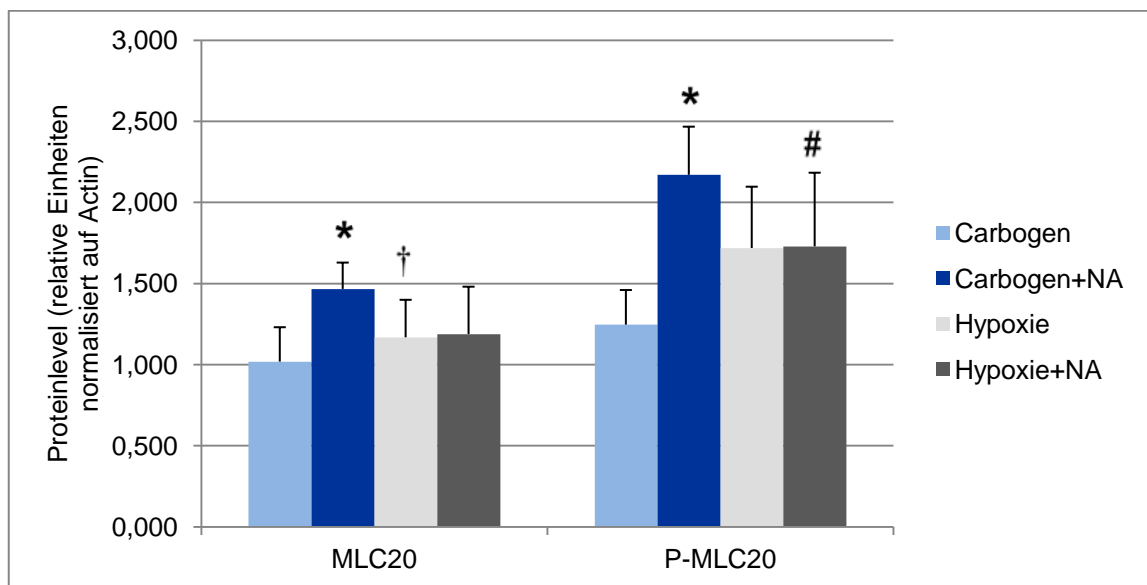


Abbildung 18: Proteinexpressionslevel der MLC₂₀ sowie der phosphorylierten MLC₂₀ (P-MLC₂₀) nach SDS-PAGE und Western Blot der entsprechend vorbehandelten Arteriolen. MLC₂₀: Carbogen+NA vs. Carbogen: * p < 0,05. Hypoxie vs. Carbogen+NA: † p < 0,05. P-MLC₂₀: Carbogen+NA vs. Carbogen: * p < 0,01. Hypoxie+NA vs. Carbogen+NA: # p < 0,05. Carbogen n=10. Carbogen+NA n=10. Hypoxie n=11. Hypoxie+NA n=12.

Die phosphorylierte Form P-MLC₂₀ wird ebenso wie die unphosphorylierte Form nach Inkubation mit Noradrenalin unter Carbogenbegasung signifikant stärker exprimiert. Ihre Aktivität ist unter Carbogen + NA ebenfalls signifikant höher als unter Hypoxie + NA (Abb. 18).

5.3.1.3 Verhalten der MYPT1

Die MYPT1 ist als regulative Untereinheit der MLCP an der Kontraktion glatter Muskelzellen beteiligt. Phosphorylierung der MYPT1 sowohl am Thr696 als auch am Thr853 deaktiviert die MLCP und trägt somit zur Kontraktion bei (118,119).

Die Untersuchungen der MYPT1 sowie der zwei phosphorylierten Formen P-MYPT1 (pThr853) und P-MYPT1 (pThr696) ergaben keine signifikanten Ergebnisse (Abb. 19).

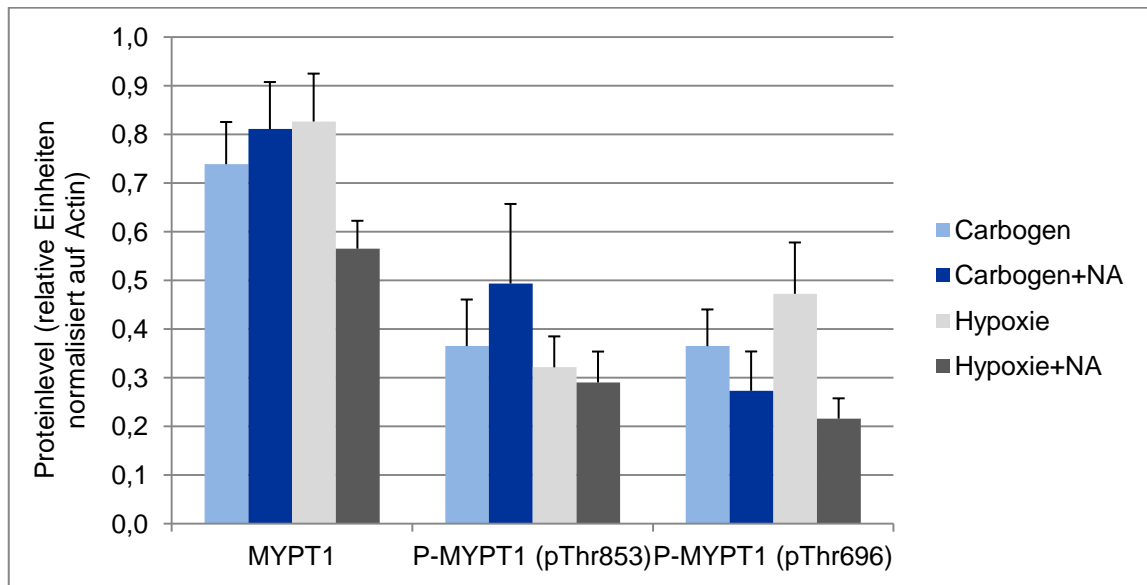


Abbildung 19: Proteinexpressionslevel der MYPT1 und ihrer phosphorylierten Formen P-MYPT1 (pThr853 bzw. pThr696) nach SDS-PAGE und Western Blot der entsprechend vorbehandelten Arteriolen. Carbogen n=10. Carbogen+NA n=10. Hypoxie n=11. Hypoxie+NA n=12.

5.3.2 Oxidativer Stress

Der Effekt von oxidativem Stress auf die Expression bestimmter für die Kontraktion von VSMC relevanter Proteine wurde untersucht, indem durch Eisenoxidperfusion isolierte Arteriolen unter Carbogenbegasung zunächst mit 10^{-5} M H_2O_2 und anschließend mit 10^{-7} M Ang II inkubiert wurden. Die Proteinexpression wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Untersucht wurden die Proteine p38 MAPK und MLC_{20} . Auf die Expressionsanalyse und Auswertung der MK-2, dessen Substrat Hsp27 sowie der MYPT1 wurde aufgrund methodischer Schwierigkeiten mit eingeschränkter Verwertbarkeit verzichtet.

5.3.2.1 Verhalten der p38 MAPK

Für die unphosphorylierte und phosphorylierte Form der p38 MAPK ergab sich jeweils keine signifikant verstärkte Expression unter Versuchsbedingungen (Behandlung mit 10^{-5} M H_2O_2) im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Ebenfalls zeigte sich keine vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK (Abb. 20).

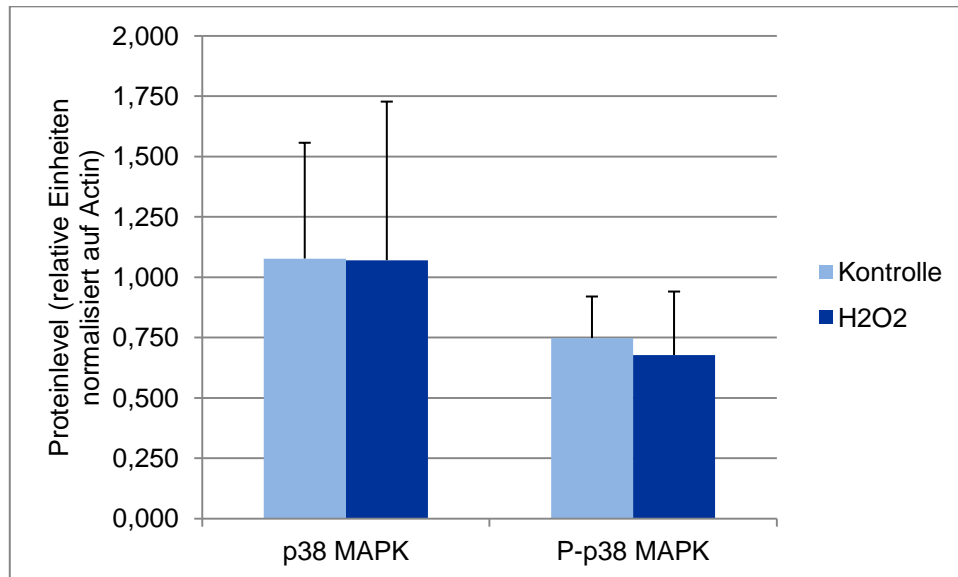


Abbildung 20: Proteinexpressionslevel von p38 MAPK und seiner phosphorylierten Form P-p38 MAPK nach SDS-PAGE und Western Blot der entsprechend vorbehandelten Arteriolen. P38 MAPK: Kontrolle n=5, H_2O_2 n=5. P-p38 MAPK: Kontrolle n=5, H_2O_2 n=4.

5.3.2.2 Verhalten der MLC₂₀

Für die phosphorylierte und unphosphorylierte Form der MLC₂₀ zeigte sich ebenso jeweils kein Unterschied in der Expression unter Einfluss von oxidativem Stress im Vergleich zu Kontrollbedingungen.

Unter Einwirkung von 10^{-5} M H_2O_2 war die phosphorylierte MLC₂₀ allerdings deutlich reduziert verglichen mit der unphosphorylierten MLC₂₀ in der Behandlungsgruppe (Abb. 21, S. 51).

ERGEBNISSE

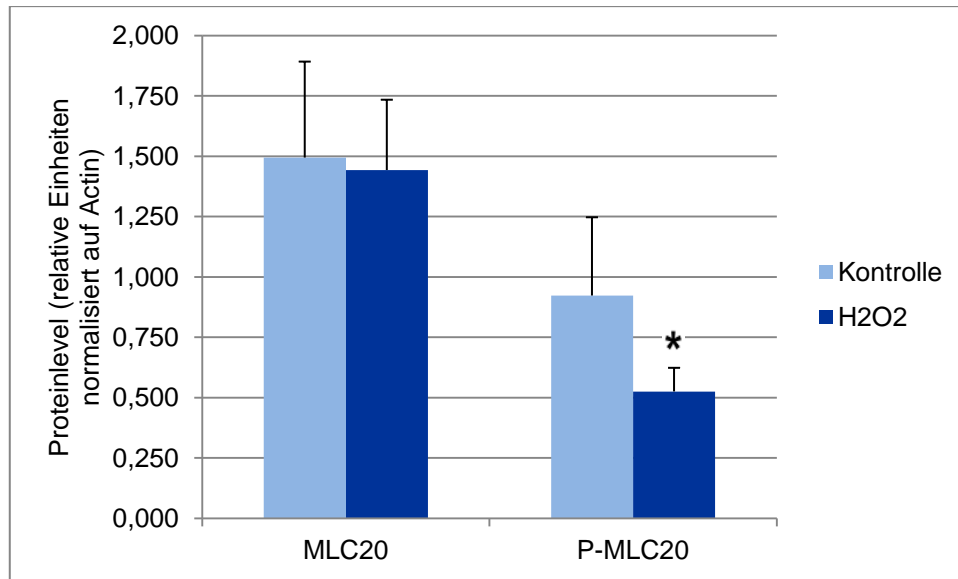


Abbildung 21: Proteinexpressionslevel der MLC₂₀ sowie der phosphorylierten MLC₂₀ (P-MLC₂₀) nach SDS-PAGE und Western Blot der entsprechend vorbehandelten Arteriolen. Kontrolle n=5, H₂O₂ n=5. H₂O₂(P-MLC₂₀) vs. H₂O₂(MLC₂₀): * p < 0,01.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung akuter Hypoxie/Reoxygenierung, kombiniert mit Noradrenalingabe, und oxidativen Stresses auf die Angiotensin II-Antwort afferenter Arteriolen zu untersuchen. Wir prüften die Hypothese, dass sowohl Hypoxie/Reoxygenierung als auch Applikation von H_2O_2 zu verstärkter Reaktivität von Arteriolen führen. Die p38 MAPK reagiert auf verschiedene Stressoren und kann die Kontraktilität von Gefäßen beeinflussen. Wir haben deshalb Signalwege einer p38 MAPK-Aktivierung untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Noradrenalin in nicht-konstriktorischer Konzentration unter Kontrollbedingungen und Hypoxie die Angiotensin II-Antwort afferenter Arteriolen verstärkt. Dieser Effekt ist unter Kontrollbedingungen signifikant größer. Wasserstoffperoxid-vermittelter oxidativer Stress bewirkt eine signifikante Verstärkung der Angiotensin II-Antwort auf Noradrenalin bei höheren Konzentrationen von Angiotensin II.

Die Phosphorylierung der p38 MAPK war in den glatten Muskelzellen präglomerulärer Gefäße nach Hypoxie/Reoxygenierung mit oder ohne Noradrenalin nicht signifikant verändert. Die MLC_{20} pSer19/20 ist nach Noradrenalin- bzw. Hypoxie mit Noradrenalininkubation stärker phosphoryliert. Unter Einfluss von H_2O_2 dagegen zeigen die Blots eine geringere Phosphorylierungsstärke. Die unphosphorylierte MLC_{20} ist in unseren Untersuchungen nach Noradrenalin- bzw. Hypoxiebehandlung stärker dargestellt. Ob dies in einer verstärkten Expression begründet ist, ist allerdings fraglich und soll im Weiteren diskutiert werden.

6.1 Hypoxie/Reoxygenierung

Hypoxie, gefolgt von einer Reoxygenierung mit Carbogen, bewirkt eine verstärkte Angiotensin II-Antwort in unseren Experimenten mit isoliert perfundierten afferenten Arteriolen der Maus. Dieser funktionelle Befund spricht für eine posthypoxische bzw. postischämische Konstriktion präglomerulärer Gefäße der Niere. Dieses Verhalten der afferenten Arteriolen könnte das bekannte „no reflow“-Phänomen in posthypoxischen bzw. postischämischen Nieren erklären. Dabei kommt es z. B. nach Etablierung des systemischen Blutdrucks zu keiner Reperfusion der Niere aufgrund erhöhten renalen

Widerstandes (120). Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die afferenten Arteriolen einen wichtigen Beitrag zu diesem Phänomen leisten können. Diese verstärkte renale Vasokonstriktion als Folge von Hypoxie ohne Reoxygenierung wurde in verschiedenen anderen Studien mit anderen Methoden beobachtet. Hollenberg et al. (121) konnten bei gesunden Probanden durch intraarterielle Adrenalininjektion ebenso wie bei Patienten mit intrarenalem akuten, ischämischen Nierenversagen eine starke Konstriktion der Aa. arcuatae und Interlobararterien beobachten. Brabrand et al. (122) beobachteten bei Ferkeln, die mit 8 % Sauerstoff beatmet wurden, eine starke Konstriktion kortikaler Gefäße. Dies war mit einem erhöhten Widerstandsindex und einer verlängerten arteriovenösen Durchgangszeit verbunden. Bei Ratten demonstrierten Arendshorst et al. (123) nach einstündiger totaler, unilateraler Ischämie einen verdoppelten Gefäßwiderstand der betroffenen Niere. Der Gefäßwiderstand wurde indirekt aus der arteriovenösen Druckdifferenz und dem renalen Blutfluss bestimmt und war sowohl in den afferenten als auch den efferenten Arteriolen erhöht. Andere Studien zeigten bei Patienten mit akutem, ischämischem Nierenversagen eine ausgeprägte postschämische GFR-Reduktion mit einer Verminderung des Blutflusses überwiegend im renalen Cortex (124-126). Eine weitere Untersuchung wies bei Ratten 4 und 8 Wochen, nachdem sie für 60 Minuten einer totalen Ischämie mittels bilateralen Nierenarterienverschlusses ausgesetzt waren, einen deutlichen Anstieg des mittleren arteriellen Drucks nach Applikation einer Schwellendosis von Angiotensin II nach (38). Nach einer 30-tägigen Phase von chronisch-intermittierender Hypoxie mit 10%igem Sauerstoff beobachteten Guo et al. (127) eine verstärkte Angiotensin II-induzierte Konstriktion von Rattenaorten ohne vermehrte Expression des AT₁-Rezeptors. Demgegenüber stehen andere Beobachtungen, denen zufolge die Expression des AT₁-Rezeptors sowohl nach chronisch-intermittierender (128,129) als auch nach anhaltender Hypoxie (129) in den Gefäßen erhöht ist. In einer weiteren Studie kehrte eine Blockade der Angiotensin II-Wirkung durch Enalapril, einen Inhibitor des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, und Candesartan, einen AT₁-Rezeptor-Antagonist, die Hypoxieeffekte in Rattennieren um (130): Nach schrittweiser Reduktion des Sauerstoffanteils während der Beatmung der Versuchstiere von 21 % auf 10 % kam es zu einem Abfall des kortikalen Sauerstoffpartialdrucks und des renalen Blutflusses. Die Applikation nicht-hypotensiver Dosen der o. g. Pharmaka stellte die Ausgangswerte wieder her.

Die Mechanismen der aufgeführten Beobachtungen sind bisher nicht vollständig geklärt. Die starke Konstriktion der präglomerulären Gefäße resultiert aus aktiver Vasokonstriktion durch Tonuserhöhung der glatten Gefäßmuskelzellen. Mechanische Faktoren wie Ödeme, Wandveränderungen und Obstruktionen und metabolische Ursachen wie Azidose und Methämoglobinämie wurden ausgeschlossen (124,125,131). Der ausgeprägte GFR-Abfall mit Verminderung der kortikalen Perfusion wurde mit einer Abnahme des effektiven Filtrationsdrucks begründet (123,126,132). Erhöhter Druck in der Bowman-Kapsel aufgrund tubulärer Obstruktion durch Zelltrümmer oder gesunkener Perfusionsdruck der Kapillaren durch Aktivierung des tubuloglomerulären Feedbacks mit stärkerer Konstriktion der afferenten Arteriolen kommen als Ursache in Frage (132). Andere Autoren vermuteten eine Aktivierung des Sympathikus als Ursache der hochgradigen Vasokonstriktion (122). In einer anderen Studie wurde eine ischämiebedingte erhöhte Sympathikusaktivität mit Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems als Ursache lokaler Vasokonstriktion vermutet (121). Basile et al. (133) beobachteten eine erhöhte Angiotensin II-Sensibilität von Arterien nach ischämischem akutem Nierenversagen und vermuteten als Ursache eine postischämisch erhöhte Aktivität inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 sowie der iNOS und von Endothelin-1.

In unseren Untersuchungen wurde mit 95 % Stickstoff + 5 % Kohlendioxid begast und damit eine noch strengere Hypoxie erzeugt (< 1 %) als in den erwähnten Studien, die mit 8 % bzw. 10 % Sauerstoff arbeiteten (122,127,130). In unseren Experimenten erfolgte die Hypoxie unter *in vitro*-Bedingungen und damit sind systemische oder lokale Effekte ischämischen bzw. hypoxischen Gewebes ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der Studien, die sowohl eine vermehrte präglomeruläre Vasokonstriktion als auch eine verstärkte Angiotensin II-Antwort der Gefäße nach Hypoxie bzw. Ischämie nachwiesen, unterstützen unsere Befunde. Die präglomeruläre Vasokonstriktion kann auch durch eine verstärkte Angiotensin II-Antwort der Gefäße bedingt sein. Tubuläre Obstruktionen oder eine Aktivierung des tubuloglomerulären Feedbacks (123,126,132) und des Sympathikus (121,122) können wir in unserem Modell nicht beurteilen. Wir haben jedoch versucht, durch Noradrenalingabe eine Aktivierung des Sympathikus zu simulieren. Die erhöhte Angiotensin II-Antwort ist unseren Ergebnissen zufolge wie von anderen Autoren vorgeschlagen (124,125,131) auf eine aktive Vasokonstriktion auf Angiotensin II zurückzuführen. Durch die isolierte Betrachtung der präglomerulären Gefäße wurde in unseren Untersuchungen der

Einfluss anderer renaler und extrarenaler Faktoren vollständig ausgeschlossen. Eine gesteigerte Konstriktion präglomerulärer Gefäße nach Hypoxie/Reoxygenierung ist demzufolge allein durch gefäßeigene Mechanismen erklärbar.

6.2 Hypoxie/Reoxygenierung und Noradrenalin

Unser Interesse lag außerdem in der Frage, wie Noradrenalin als Transmitter des sympathischen Nervensystems zusätzlich auf den schon vorhandenen Effekt von Hypoxie, die Gefäßantwort auf Angiotensin II zu verstärken, wirken könnte. Dazu haben wir zunächst die Wirkung von Noradrenalin ohne Hypoxie untersucht, indem wir präglomeruläre Gefäße unter Normoxie mit Angiotensin II behandelten. Es zeigte sich, dass Noradrenalin allein bereits die Angiotensin II-Antwort von Gefäßen steigert.

Die Interaktion von Noradrenalin und Angiotensin II wurde bereits mehrfach untersucht, jedoch meist mit einer anderen Fragestellung als in der vorliegenden Arbeit. Zunächst wurden als Wirkungsort der sympathisch vermittelten Vasokonstriktion die Interlobar- und Interlobulararterien sowie die afferenten und efferenten Arteriolen identifiziert (134,135). Eine Noradrenalin-vermittelte Steigerung der Angiotensin II-Antwort wurde unseres Wissens bisher nur in afferenten Arteriolen gezeigt (135,136). Der Interaktion von Angiotensin II und Noradrenalin zugrunde liegende Mechanismen sind in Studien untersucht worden. Es gibt Hinweise auf gemeinsame intrazelluläre, calciumabhängige Signalwege, die zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration und somit zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen führen (136-138), als auch eine erhöhte Calciumsensitivität der glatten Gefäßmuskelzellen (71). Letztere Studie zeigte eine stärkere Phosphorylierung der MLC_{20} und der MYPT1, ohne dass die Calciumtransienten vergrößert waren. Dies weist auf Erhöhung der Calciumsensitivität unter diesen experimentellen Bedingungen hin.

Noradrenalinapplikation mit Hypoxie/Reoxygenierung verstärkte ebenfalls die Angiotensin II-Antwort. Dieser Verstärkungseffekt war in den untersuchten kleinen, kortikalen Gefäßen jedoch signifikant schwächer als unter Normoxie. Man könnte hieraus ableiten, dass die sympathische Aktivierung bei Hypoxie nur eine untergeordnete Rolle bei der Reaktion afferenter Gefäße spielt. Kaufmann et al. fanden ebenfalls eine deutliche Verstärkung der Angiotensin II-Antwort unter Einfluss von Hypoxie und Noradrenalin (135). Das Protokoll entsprach dem der vorliegenden Arbeit

(Inkubation der präparierten Gefäße mit 95 % N₂ und 5 % O₂ und 10⁻⁹ M Noradrenalin für eine Stunde, anschließend Perfusion). Kaufmann et al. verwendeten Interlobargefäße der Maus. Diese zeigen eine verhältnismäßig schwache Antwort auf Angiotensin II. Diese wurden isometrisch gemessen, während die Arteriolen in der vorliegenden Arbeit unter isotonischen Bedingungen arbeiteten. Die Ergebnisse beider Studien weisen auf unterschiedliche funktionelle Antworten großer und kleiner arterieller Nierengefäße unter Kontrollbedingungen sowie bei Hypoxie/Reoxygenierung und Noradrenalingabe hin. Eine weitere Studie, die den Sympathikuseinfluss unter Hypoxie untersucht hat, zeigte deutlich angestiegene prä- und postglomeruläre Gefäßwiderstände, eine vermehrte renale Vasokonstriktion sowie einen reduzierten glomerulären Ultrafiltrationskoeffizienten (139). Die Messungen erfolgten an Kaninchen, die eine Stunde mit 10 % bzw. 14 % Sauerstoff beatmet wurden. Die Ergebnisse führten die Autoren allerdings nur auf eine Reflexaktivierung des Sympathikus zurück und schlossen direkte Hypoxieeffekte auf die renale Mikrovaskulatur aus, da alle Variablen nach Ende der Hypoxie rasch auf Kontrollniveau zurückkehrten und alle beobachteten Reaktionen durch renale Denervation aufgehoben werden konnten.

Unsere Arbeit zeigt, dass Noradrenalin die Angiotensin II-Antwort der präglomerulären Gefäße verstärkt. Der Einfluss von Noradrenalin ist unter Kontrollbedingungen deutlich größer als unter Hypoxie. Ob p38 MAPK Signalwege und eine Sensitivierung des kontraktilen Apparats für Calcium eine Rolle spielen, kann mit den Phosphorylierungsdaten nicht endgültig geklärt werden.

6.3 p38 MAPK Signalwege

Wir prüften die Hypothese, dass die p38 MAPK durch Hypoxie/Reoxygenierung aktiviert wird und zur Verstärkung der Angiotensin II-Antworten der Gefäße via Calciumsensitivierung beiträgt. Dazu wurden Expressionsuntersuchungen von Proteinen des hypothetischen Signalweges durchgeführt.

6.3.1 p38 MAPK

Die Unterschiede in den Phosphorylierungsstärken der p38 MAPK, gemessen mittels Western Blot, waren nicht signifikant.

Studien, die die Interaktion von Hypoxie, Noradrenalin und Angiotensin II mit p38 MAPK in präglomerulären Gefäßen untersuchten, sind uns nicht bekannt. Park et al. studierten die Expression der MAPKs in der gesamten Niere nach bilateraler Ischämie bis zu 30 Minuten (140). Sie fanden eine maximale Aktivierung der p38 MAPK nach 30 Minuten. Ob diese postischämische Aktivierung vor allem auf die glattmuskulären Gefäßzellen oder auf Tubulusepithel o.a. zurückzuführen ist, bleibt unklar. Andere Studien wiesen nach bis zu 3-stündiger Hypoxie eine ausgeprägte Aktivierungssteigerung der p38 MAPK in Pulmonalisarterien bzw. pulmonalarteriellen glattmuskulären Zellen nach (141,142). Karamsetty et al. beschrieben zudem, dass die p38 MAPK die anhaltende Phase der hypoxischen Vasokonstriktion vermittelt (142). Dies wurde von weiteren Untersuchungen bestätigt, die in Pulmonalisarterien eine endothelunabhängige Rolle der p38 MAPK in der späten Phase der Vasokonstriktion nach ungefähr 30 Minuten und ein Aktivitätsmaximum der MAPK an Tag sieben nach Beginn einer Versuchsreihe an Ratten in einer Hypoxiekammer nachwiesen (143,144).

Die Ergebnisse zur Aktivierung der p38 MAPK durch Hypoxie in Pulmonalarterien sind überzeugend. Welsh et al. veröffentlichten eine Übersicht mit Daten, die sie zuvor in Fibroblasten pulmonaler und systemischer Gefäße mehrerer Spezies erhoben hatten (145). Sie zeigten sowohl für Ratten als auch für Menschen, dass die p38 MAPK nach Hypoxie in pulmonalen Gefäßen aktiviert wird, jedoch nicht in großen Leitungsgefäßen. Dies deutet darauf hin, dass von pulmonalen Gefäßen nicht auf systemische bzw. präglomeruläre Gefäße geschlossen werden kann. Es ist daher sinnvoll, andere methodische Zugänge für die Untersuchung der Proteinphosphorylierungen in präglomerulären Gefäßen zu testen.

6.3.2 MYPT1

Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Expression und Phosphorylierung der MYPT1 unter Einfluss von Hypoxie und Noradrenalin erbrachten keine signifikanten Ergebnisse.

Lai et al. konnten eine stärkere Phosphorylierung der MYPT1 (pThr696) bei Noradrenalinvorbehandlung und nachfolgender Angiotensin II-Gabe im Vergleich zu alleiniger Angiotensin II-Gabe in afferenten Arteriolen zeigen (71). Dies korrelierte mit einer erhöhten Vasoreaktivität auf Angiotensin II unter diesen Bedingungen. Die

Autoren verwendeten allerdings abweichende Konzentrationen (10^{-4} M Noradrenalin, 10^{-11} M Angiotensin II) und Expositionszeiten (jeweils 10 Minuten, Vgl. 4.4.1). Außerdem arbeiteten sie unter Raumatmosphäre statt Carbogen und Hypoxie. Teoh et al. fanden in Rattenaorten und humanen glattmuskulären Zellen der Aorta gesteigerte Proteinlevel der MYPT1 nach 16- und 48-stündiger Exposition mit Hypoxie (146). Effektoren bzw. zugrunde liegende Mechanismen wurden nicht untersucht. Andere Studien prüften die Wirkung von 1-100 Minuten Hypoxie (15-23 Torr) auf pulmonale Arterien und glattmuskuläre Zellen pulmonaler Arterien von Ratten (147,148). Sie wiesen eine vermehrte MYPT1 mit konsekutiver Hemmung der MLCP und vermehrter MLC_{20} -Phosphorylierung nach. Die Gesamtproteinmenge der MYPT1 war unverändert. Beide Studien führten die Phosphorylierung der MYPT1 auf die durch Hypoxie aktivierte Rho Kinase zurück. Auch Chen et al. zeigten in Koronararterien von Schweinen eine gesteigerte MYPT1-Phosphorylierung nach Hypoxie (25-30 Torr) in Kombination mit einem vasokonstriktorischem Thromboxan A_2 -Rezeptor-Antagonist (149). Ein Inhibitor der Rho Kinase verhinderte hier den hypoxischen Effekt. Die Ergebnisse dieser Studien weisen darauf hin, dass pulmonale hypoxische Vasokonstriktion Signalwege via MYPT1 einschließt.

In Koronararterien von Schweinen fanden Wardle et al. nach 10- bis 20-minütiger Hypoxie mit 100 % N_2 eine Hemmung der MYPT1-Phosphorylierung und verminderte MLC_{20} -Aktivierung, die mit Vasorelaxation einherging (150,151). Als Mediator dieses Hypoxieeffekts identifizierten sie die Rho Kinase. Über welchen Mechanismus die Rho Kinase die hypoxische Relaxation vermittelt, ist bislang unbekannt. Die Autoren vermuten allerdings eine Ca^{2+} -desensibilisierende Reaktion (151).

6.3.3 MLC_{20}

Unsere Untersuchungen zur Regulation der MLC_{20} durch Noradrenalin und Hypoxie/Reoxygenierung zeigten unter Noradrenalineinwirkung stärkere Banden für das unphosphorylierte Protein und auch für die phosphorylierte Form. Nach Hypoxie/Reoxygenierung, auch in Kombination mit Noradrenalin, waren diese Effekte nicht nachweisbar.

Eine hemmende Wirkung von Hypoxie auf eine zuvor durch Noradrenalin induzierte, vermehrte Phosphorylierung der MLC_{20} dokumentierten weitere Studien ebenfalls nach

48-stündiger Hypoxie in Rattenaorten (146,152). Nach 40-minütiger totaler renaler Ischämie in Ratten und anschließender Reoxygenierung über 24 Stunden *in vivo* wiesen auch Wang et al. eine verminderte MLC₂₀-Phosphorylierung nach. Dies ging mit einer Reduktion von unphosphorylierter MLC₂₀ und MLC₂₀-mRNA einher (153).

Einen Anstieg der MLC₂₀-Phosphorylierung wurde von anderen Autoren in Pulmonalarterien und Karotiden sowie Aorten von Ratten nach bis zu einstündiger, akuter oder chronisch-intermittierender Hypoxie demonstriert (127,148,154,155). Sie zeigten jedoch in beiden Gefäßtypen eine rapide Verminderung der MLC₂₀-Aktivierung, sodass die gemessenen Werte innerhalb von 10 Minuten unter das Ausgangsniveau fielen (155). Die von Guo et al. (127) gemessene erhöhte Angiotensin II-Sensibilität der glatten Muskelzellen von Rattenaorten geht ihnen zufolge auf eine hypoxiebedingt vermehrte Phosphorylierung von MLCK und MYPT1 zurück (127).

Eine stärkere Aktivierung der MLC₂₀ durch Hypoxie wurde in Pulmonalarterien und Karotiden nach chronisch-intermittierender Hypoxie demonstriert. Man könnte annehmen, dass akute Hypoxie allein als Stimulus einer Phosphorylierung nicht genügt. Ergebnisse unseres und anderer Labore (146,152,153), die eine Phosphorylierungshemmung durch Hypoxie zeigten, unterstützen diese Annahme.

Sollte Hypoxie tatsächlich die Phosphorylierung der MLC₂₀ durch Noradrenalin inhibieren, erklärt dies allerdings nicht die durch Noradrenalin erhöhte Menge an unphosphorylierter MLC₂₀ in unseren Untersuchungen bzw. die verminderte Menge an MLC₂₀ und MLC₂₀-mRNA in den Experimenten von Wang et al. (153). Die Autoren homogenisierten jedoch die gesamte Niere als Probe. Ihre Ergebnisse umfassen demzufolge nicht allein die präglomerulären, sondern auch die größeren Gefäße und vor allem Tubuli. Sie erklären die verringerte Expression der MLC₂₀ mit einer Störung des Aktin-Zytoskeletts infolge akuten, ischämischen Nierenversagens.

In unseren molekularbiologischen Untersuchungen zu Carbogen + Noradrenalin ist die phosphorylierte MLC₂₀ im Vergleich zur unphosphorylierten um etwa das 1,5-fache erhöht. Die Phosphorylierung verstärkt sich nach Noradrenalingabe signifikant. Auch die unphosphorylierte Form lässt sich hier verstärkt nachweisen. Dies lässt sich anhand unserer Daten schwer interpretieren. Es sind weitere Untersuchungen über Transkriptions- und Translationsaktivität sowie posttranslationelle Kontrolle des Proteins nötig.

Es wurde bereits von anderen Autoren beschrieben, dass die Phosphorylierung der MLC_{20} nach einer Stimulation innerhalb von 3 Sekunden ihr Maximum erreichen und innerhalb von 30 Sekunden auf Ruhenniveau zurückgehen kann, während die Kraft beibehalten wird (102). In den Perfusionsexperimenten konnten wir signifikant stärkere Konstriktionen in allen Versuchsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigen. Für die Versuchsbedingung Carbogen + Noradrenalin ging das mit einem vermehrten Nachweis der MLC_{20} bzw. der Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle einher. Möglicherweise verhindert die recht große individuelle Variabilität der Messwerte des Western Blots eine statistische Absicherung der Unterschiede für die anderen Versuchsbedingungen.

6.4 Oxidativer Stress

Hypoxie/Reoxygenierung können zur verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führen (16). Wir haben deshalb die Effekte von H_2O_2 , einem populären Vertreter der Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies, auf die Funktion von afferenten Arteriolen untersucht.

In den Experimenten zeigte sich, dass H_2O_2 in hohen Konzentrationen (10^{-7} bis 10^{-6} M H_2O_2) die Angiotensin II-Antwort der Arteriolen verstärkt. Bagi et al. untersuchten die Angiotensin II-Antwort von Arteriolen des Musculus gracilis (156). Nach einer ersten Gefäßperfusion mit 10^{-9} bis 10^{-7} M Angiotensin II und anschließender Auswaschung wurden die Gefäße mit 10^{-7} M H_2O_2 behandelt und erneut mit steigenden Angiotensin II-Konzentrationen perfundiert. Im zweiten Perfusionsdurchgang waren die Konstriktionen auf Angiotensin II deutlich verstärkt. Eine mögliche Ursache der erhöhten Gefäßreagibilität ist eine Veränderung der Angiotensin-Rezeptoren unter der Einwirkung oxidativen Stresses. Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und einer bei Patienten mit arterieller Hypertonie oft beobachteten AT_1 -Rezeptor-Hyperreagibilität wurde in weiteren Studien geprüft (157,158). Sie zeigten in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) mit AT_1 -Rezeptor-Expression nach Stimulation mit $2 \cdot 10^{-6}$ M bis $4 \cdot 10^{-4}$ M H_2O_2 (157,158) und 10^{-9} M Ang II (157) eine vermehrte Aggregation der AT_1 -Rezeptoren. Es ist demzufolge möglich, dass H_2O_2 schon allein über die beschriebene Induktion der Clusterbildung von AT_1 -Rezeptoren die Angiotensin II-Antwort verstärkt.

Fellner und Arendshorst, die ebenfalls die Wirkung von H_2O_2 auf die Angiotensin II-Stimulation afferenter Arteriolen untersuchten, zeigten, dass die Calciumantwort auf $3 \cdot 10^{-7}$ M Angiotensin II nach Vorbehandlung mit 10^{-5} und 10^{-6} M H_2O_2 im Vergleich zur Kontrolle ohne H_2O_2 abgeschwächt war (159). Sowohl eine Stimulation mit 10^{-7} M H_2O_2 als auch mit Katalase zeigten keinen Effekt. Eine Behandlung der Gefäße mit Tempol, einem Enzym ähnlich der Superoxiddismutase, oder dem NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor Apocynin führte zu einem deutlich abgeschwächten Calciumanstieg nach Angiotensin II-Stimulation. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass nicht H_2O_2 , sondern Superoxid an der Vermittlung der Angiotensin II-Antwort beteiligt ist und H_2O_2 in Konzentrationen von 10^{-6} M oder höher dilatorisch wirkt (159).

Torrecillas et al. sahen eine vollständige Hemmung der Calciumantwort auf 10^{-6} M Angiotensin II durch Katalase (160). Dies spricht für eine Beteiligung von H_2O_2 an der Vermittlung der Angiotensin II-Antwort.

6.5 p38 MAPK und oxidativer Stress

Wir untersuchten, inwieweit die p38 MAPK an der von uns beobachteten Verstärkung der Angiotensin II-Antwort afferenter Arteriolen auf H_2O_2 beteiligt sein könnte. Dazu wurden isolierte Arteriolen mit H_2O_2 stimuliert und die Phosphorylierung des Proteins mittels Western Blot gemessen.

6.5.1 p38 MAPK

Die Expression der p38 MAPK wurde in Nierenarteriolen nach einer zehnmütigen Stimulation mit 10^{-5} M H_2O_2 und einer fünfminütigen Behandlung mit 10^{-7} M Angiotensin II untersucht. Die p38 MAPK war nach H_2O_2 -Behandlung und Angiotensin II-Stimulation nicht stärker phosphoryliert als in der unbehandelten Kontrollgruppe.

Dies steht im Gegensatz zu Befunden von Cascino et al. (79), die Karotiden von Ratten perivaskulär mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Angiotensin II + Katalase bzw. Superoxiddismutase bzw. dem p38 MAPK-Inhibitor SB203580 behandelten. Sie entdeckten, dass Angiotensin II die p38 MAPK über H_2O_2 aktiviert. Dies führt zu einer vaskulären Dysfunktion mit stark beeinträchtigter Relaxation auf die Agonisten Acetylcholin und Nitroprussid-Natrium. Katalase hemmte vollständig die Angiotensin II-induzierte Phosphorylierung der p38

MAPK. Gabe von Superoxiddismutase, ein Enzym, welches Superoxid zu H_2O_2 umwandelt, hatte zudem eine Verstärkung der Angiotensin II-induzierten Schädigung zur Folge. Auch Viedt et al. zeigten in Zellen von Rattenaorten eine ROS-abhängige Aktivierung der p38 MAPK durch Angiotensin II (78). Das Maximum der p38 MAPK-Aktivität war innerhalb von 5 Minuten erreicht, bereits nach 15 Minuten sanken die Werte wieder auf Basalniveau.

Touyz (97) stellte in einem Übersichtsartikel dar, dass die p38 MAPK kein direktes Substrat von ROS ist. Vielmehr seien vorgeschaltete Modulatoren der MAPK direkte ROS-Substrate, wie MAPK-Kinasen oder Tyrosinkinase. Der Autor beschrieb jedoch auch die Aktivierung der Rho Kinase durch ROS (97). Von anderen Autoren wurde bereits gezeigt, dass die Rho Kinase über die MYPT1 die MLC_{20} aktiviert und so zur glattmuskulären Kontraktion führt (147,148,150,151). Welche Rolle die p38 MAPK in diesem Signalweg spielt, ist bislang unklar. In allen Studien, die einen Zusammenhang zwischen ROS und der p38 MAPK herstellen, wird ebenfalls übereinstimmend darauf hingewiesen, dass der Signalweg nicht vollständig bekannt ist.

In unserer Studie wurden die p38 MAPK und die phosphorylierte P-p38 MAPK nach der Behandlung mit H_2O_2 in einem Verhältnis von ungefähr 1:1 bestimmt. Auch das spricht eher gegen eine Aktivierung der p38 MAPK unter unseren Versuchsbedingungen. Wir erwarteten eine Aktivierung, da p38 MAPK auf Stresssituationen, wie z. B. oxidativen Stress reagiert. Möglicherweise unterliegt die Aktivierung einer Dynamik. Viedt et al. beobachteten eine Absenkung der p38 MAPK-Aktivität auf Basalniveau nach Stimulation mit entsprechender Aktivitätserhöhung in einem Zeitbereich, welcher der Dauer unseres Versuchs entsprach (78).

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die H_2O_2 -induzierte Verstärkung der Angiotensin II-Antwort von afferenten Arteriolen eine Beteiligung der p38 MAPK nicht einschließt.

6.5.2 MLC_{20}

Wir bestimmten die Expression der MLC_{20} in glatten Muskelzellen der Nierenarteriolen nach einer zehnmütigen Stimulation mit 10^{-5} M H_2O_2 , gefolgt von einer fünfminütigen Behandlung mit 10^{-7} M Angiotensin II. Dieses Protokoll entsprach im Wesentlichen dem Vorgehen bei der Behandlung von isoliert perfundierten Arteriolen mit H_2O_2 . Es zeigte

DISKUSSION

sich, dass in der mit H_2O_2 behandelten Gruppe die Proteinmenge der MLC_{20} im Vergleich zur phosphorylierten P- MLC_{20} deutlich höher war bzw. die Phosphorylierung nach H_2O_2 -Behandlung annahm. Das deutet darauf hin, dass es zur Blockierung der Phosphorylierung der MLC_{20} kam. Palen et al. (161) untersuchten den Einfluss von H_2O_2 und Angiotensin II auf die Phosphorylierung der MLC_{20} in humanen glattmuskulären Zellen der Arteria renalis. Für die fünfminütige Behandlung mit 10^{-5} M H_2O_2 wiesen sie eine signifikante Hemmung der MLC_{20} -Phosphorylierung nach, wohingegen 10^{-7} M Angiotensin II über 5 Minuten zur Erhöhung der MLC_{20} -Phosphorylierung führte. Vorbehandlung der Zellen mit $5 \cdot 10^{-5}$ M H_2O_2 und anschließende Stimulation mit 10^{-7} M Angiotensin II resultierte erneut in einer deutlich erniedrigten Phosphorylierung der MLC_{20} (Abb. 22).

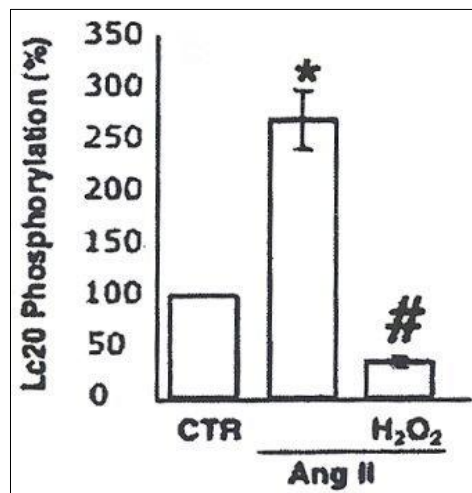


Abbildung 22: MLC_{20} (Lc20)-Phosphorylierung relativ bezogen auf Kontrolle (CTR) ((161), leicht modifiziert). Humane VSMC wurden mit 100 nM Angiotensin II (und 50 μM H_2O_2) für 5 Minuten behandelt. Angiotensin II vs. Kontrolle: * $p < 0,05$. H_2O_2 + Angiotensin II vs. Kontrolle: # $p < 0,05$.

In der Studie von Palen et al. zeigte sich jedoch auch ein starker Anstieg der MLC_{20} -Phosphorylierung unter Einwirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ M H_2O_2 und Hinzugabe von 60 mM Kaliumchlorid (161). Auch in einem Übersichtsartikel von Ardanaz und Pagano (162) werden verschiedene Studien angeführt, die zeigten, dass eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration mit einer kontrahierenden Wirkung von H_2O_2 einhergeht. Die kann Ca^{2+} -abhängig oder -unabhängig sein. H_2O_2 kann bei erniedrigter Kaliumkanalaktivität relaxierend, also vasodilatatorisch wirken (162). Santiago et al. fanden in ihren Perfusionsexperimenten an Koronar- und Mesenterialarterien ebenfalls unterschiedliche

H₂O₂-Effekte und vermuteten, dass dies vom Redoxstatus der Gefäßwand abhängig ist (93). Torrecillas et al. beobachteten allerdings eine direkte kontraktionsstimulierende Wirkung von H₂O₂ (160). In glattmuskulären Zellen von Rattenaorten zeigten sie, dass Katalase zur vollständigen Hemmung der MLC₂₀-Phosphorylierung, induziert durch Angiotensin II, führt. Katalase hatte nachweislich keinen Effekt auf die IP₃-Synthese, verhinderte aber den Angiotensin II-induzierten Ca²⁺-Anstieg in den Zellen. Auch in Aortenringen inhibierte Katalase die Konstriktion als Antwort auf Angiotensin II (160). AbdAlla et al. konnten in HEK-Zellen neben einer ausgeprägten Senkung des Angiotensin II-induzierten Ca²⁺-Anstiegs auch eine Verminderung der IP₃-Bildung durch Angiotensin II beobachten (158). Diese Studienergebnisse weisen darauf hin, dass H₂O₂ für die glattmuskuläre Kontraktion nach Angiotensin II-Exposition notwendig ist.

Es stellt sich die Frage, warum in unseren Versuchen eine deutlich verminderte Phosphorylierung der MLC₂₀ zu beobachten war, obwohl die Kontraktion verstärkt war.

Verschiedene andere Studien zeigen auch überraschenderweise keine enge Korrelation von MLC₂₀-Phosphorylierung und glattmuskulärer Kontraktion (112,163,164). Allerdings sind die Ursachen und Mechanismen dieses Verhaltens nicht bekannt.

7 Literaturverzeichnis

1. Singbartl K, Kellum JA. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. *Kidney Int* 2012;81:819-25.
2. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:R204-12.
3. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11:R31.
4. Liangos O, Wald R, O'Bell JW, et al. Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:43-51.
5. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2002;39:930-6.
6. Singh TB, Rathore SS, Choudhury TA, et al. Hospital-acquired acute kidney injury in medical, surgical, and intensive care unit: A comparative study. *Indian J Nephrol* 2013;23:24-9.
7. Bagshaw SM, George C, Bellomo R, et al. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1569-74.
8. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005;294:813-8.
9. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996;334:1448-60.
10. Chugh KS, Jha V, Sakhuja V, et al. Acute renal cortical necrosis--a study of 113 patients. *Ren Fail* 1994;16:37-47.
11. Norman RW, Mack FG, Awad SA, et al. Acute renal failure secondary to bilateral ureteric obstruction: review of 50 cases. *Can Med Assoc J* 1982;127:601-4.
12. Legrand M, Mik EG, Johannes T, et al. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med* 2008;14:502-16.
13. Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BMC Med* 2011;9:11.

14. Scheufler KM. Tissue oxygenation and capacity to deliver O₂ do the two go together? *Transfus Apher Sci* 2004;31:45-54.
15. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med* 1995;332:647-55.
16. Föhling M. Cellular oxygen sensing, signalling and how to survive translational arrest in hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;195:205-30.
17. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:189-200.
18. Pallone TL, Robertson CR, Jamison RL. Renal medullary microcirculation. *Physiol Rev* 1990;70:885-920.
19. Pallone TL, Silldorff EP, Turner MR. Intrarenal blood flow: microvascular anatomy and the regulation of medullary perfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;25:383-92.
20. Rosen S, Epstein FH, Brezis M. Determinants of intrarenal oxygenation: factors in acute renal failure. *Ren Fail* 1992;14:321-5.
21. Cohen JJ. Is the function of the renal papilla coupled exclusively to an anaerobic pattern of metabolism? *The American journal of physiology* 1979;236:F423-33.
22. Hörbelt M, Lee SY, Mang HE, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F688-95.
23. Pan Y, Mansfield KD, Bertozzi CC, et al. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 2007;27:912-25.
24. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, et al. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002;73:493-9.
25. Schurek HJ, Jost U, Baumgärtl H, et al. Evidence for a preglomerular oxygen diffusion shunt in rat renal cortex. *The American journal of physiology* 1990;259:F910-5.
26. Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, et al. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int Suppl* 2005:S46-51.
27. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011;121:4210-21.
28. Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, et al. Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *J Clin Invest* 1998;101:2054-64.

29. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, et al. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F191-8.
30. Zuk A, Bonventre JV, Brown D, et al. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *The American journal of physiology* 1998;275:C711-31.
31. Solez K, Morel-Maroger L, Sraer JD. The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine (Baltimore)* 1979;58:362-76.
32. Le Dorze M, Legrand M, Payen D, et al. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* 2009;15:503-8.
33. Janssen WM, Beekhuis H, de Bruin R, et al. Noninvasive measurement of intrarenal blood flow distribution: kinetic model of renal ¹²³I-hippuran handling. *The American journal of physiology* 1995;269:F571-80.
34. O'Connor PM, Kett MM, Anderson WP, et al. Renal medullary tissue oxygenation is dependent on both cortical and medullary blood flow. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F688-94.
35. Johannes T, Mik EG, Ince C. Dual-wavelength phosphorimetry for determination of cortical and subcortical microvascular oxygenation in rat kidney. *J Appl Physiol (1985)* 2006;100:1301-10.
36. Leong CL, Anderson WP, O'Connor PM, et al. Evidence that renal arterial-venous oxygen shunting contributes to dynamic regulation of renal oxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1726-33.
37. Saotome T, Ishikawa K, May CN, et al. The impact of experimental hypoperfusion on subsequent kidney function. *Intensive Care Med* 2010;36:533-40.
38. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, et al. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F887-99.
39. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, et al. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300:F721-33.
40. Pechman KR, De Miguel C, Lund H, et al. Recovery from renal ischemia-reperfusion injury is associated with altered renal hemodynamics, blunted pressure

natriuresis, and sodium-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297:R1358-63.

41. Schmitz V, Schaser KD, Olschewski P, et al. In vivo visualization of early microcirculatory changes following ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation. *Eur Surg Res* 2008;40:19-25.

42. Vetterlein F, Pethö A, Schmidt G. Distribution of capillary blood flow in rat kidney during postischemic renal failure. *The American journal of physiology* 1986;251:H510-9.

43. Esch JJ, Salvin JM, Thiagarajan RR, et al. Acute kidney injury after Fontan completion: Risk factors and outcomes. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2015.

44. Bouglé A, Duranteau J. Pathophysiology of sepsis-induced acute kidney injury: the role of global renal blood flow and renal vascular resistance. *Contrib Nephrol* 2011;174:89-97.

45. Molitoris BA, Sandoval R, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 2002;30:S235-40.

46. Guan Z, Gobé G, Willgoss D, et al. Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F619-28.

47. Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, et al. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F1140-9.

48. Mundel P, Bachmann S, Bader M, et al. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 1992;42:1017-9.

49. Patzak A, Lai E, Persson PB, et al. Angiotensin II-nitric oxide interaction in glomerular arterioles. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32:410-4.

50. Pittner J, Wolgast M, Casellas D, et al. Increased shear stress-released NO and decreased endothelial calcium in rat isolated perfused juxtamedullary nephrons. *Kidney Int* 2005;67:227-36.

51. Mattson DL, Meister CJ. Renal cortical and medullary blood flow responses to L-NAME and ANG II in wild-type, nNOS null mutant, and eNOS null mutant mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R991-7.

52. Legrand M, Almac E, Mik EG, et al. L-NIL prevents renal microvascular hypoxia and increase of renal oxygen consumption after ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F1109-17.

53. Brezis M, Heyman SN, Dinour D, et al. Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys. *J Clin Invest* 1991;88:390-5.
54. Quaschnig T, Voss F, Relle K, et al. Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:730-40.
55. Hocher B, Schwarz A, Slowinski T, et al. In-vivo interaction of nitric oxide and endothelin. *Journal of hypertension* 2004;22:111-9.
56. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2002;61:862-71.
57. Ollerstam A, Pittner J, Persson AE, et al. Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1997;99:2212-8.
58. Vuurmans JL, Boer P, Koomans HA. Effects of endothelin-1 and endothelin-1-receptor blockade on renal function in humans. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2742-6.
59. Fellner SK, Arendshorst WJ. Endothelin A and B receptors of preglomerular vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2004;65:1810-7.
60. Schildroth J, Rettig-Zimmermann J, Kalk P, et al. Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:779-89.
61. Ohno A, Naruse M, Kato S, et al. Endothelin-specific antibodies decrease blood pressure and increase glomerular filtration rate and renal plasma flow in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 1992;10:781-5.
62. Martinka P, Lai EY, Föhling M, et al. Adenosine increases calcium sensitivity via receptor-independent activation of the p38/MK2 pathway in mesenteric arteries. *Acta Physiol (Oxf)* 2008;193:37-46.
63. Kloor D, Delabar U, Muhlbauer B, et al. Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine. *Biochemical pharmacology* 2002;63:809-15.
64. Patzak A, Lai EY, Föhling M, et al. Adenosine enhances long term the contractile response to angiotensin II in afferent arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R2232-42.

65. Lai EY, Martinka P, Fahling M, et al. Adenosine restores angiotensin II-induced contractions by receptor-independent enhancement of calcium sensitivity in renal arterioles. *Circ Res* 2006;99:1117-24.
66. Arendshorst WJ, Brannstrom K, Ruan X. Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. *J Am Soc Nephrol* 1999;10 Suppl 11:S149-61.
67. Duke LM, Widdop RE, Kett MM, et al. AT(2) receptors mediate tonic renal medullary vasoconstriction in renovascular hypertension. *British journal of pharmacology* 2005;144:486-92.
68. Liu R, Persson AE. Angiotensin II stimulates calcium and nitric oxide release from Macula densa cells through AT1 receptors. *Hypertension* 2004;43:649-53.
69. Kastner PR, Hall JE, Guyton AC. Control of glomerular filtration rate: role of intrarenally formed angiotensin II. *The American journal of physiology* 1984;246:F897-906.
70. Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent progress in hormone research* 1996;51:319-51; discussion 52-3.
71. Lai EY, Föhling M, Ma Z, et al. Norepinephrine increases calcium sensitivity of mouse afferent arteriole, thereby enhancing angiotensin II-mediated vasoconstriction. *Kidney Int* 2009;76:953-9.
72. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, et al. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 1997;29:366-73.
73. Meloche S, Landry J, Huot J, et al. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H741-51.
74. Pelayo JC, Ziegler MG, Blantz RC. Angiotensin II in adrenergic-induced alterations in glomerular hemodynamics. *The American journal of physiology* 1984;247:F799-807.
75. Park S, Bivona BJ, Harrison-Bernard LM. Compromised renal microvascular reactivity of angiotensin type 1 double null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F60-7.
76. Conger JD, Robinette JB, Hammond WS. Differences in vascular reactivity in models of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1991;39:1087-97.
77. Fujii T, Kurata H, Takaoka M, et al. The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Eur J Pharmacol* 2003;481:241-8.

78. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000;20:940-8.
79. Cascino T, Csanyi G, Al Ghouleh I, et al. Adventitia-derived hydrogen peroxide impairs relaxation of the rat carotid artery via smooth muscle cell p38 mitogen-activated protein kinase. *Antioxidants & redox signaling* 2011;15:1507-15.
80. Kwon S, Lee WJ, Fang LH, et al. Mitogen-activated protein kinases partially regulate endothelin-1-induced contractions through a myosin light chain phosphorylation-independent pathway. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 2003;65:225-30.
81. McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & redox signaling* 2006;8:1775-89.
82. Oya-Ohta Y, Ochi T, Komoda Y, et al. The biological activity of hydrogen peroxide. VI. Mechanism of the enhancing effects of L-histidine: the role of the formation of a histidine-peroxide adduct and membrane transport. *Mutation research* 1995;326:99-107.
83. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-16.
84. Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970;245:4053-7.
85. Li N, Zhang G, Yi FX, et al. Activation of NAD(P)H oxidase by outward movements of H⁺ ions in renal medullary thick ascending limb of Henle. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F1048-56.
86. Ebrahimian T, Li MW, Lemarie CA, et al. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in angiotensin II-induced inflammation and hypertension: regulation of oxidative stress. *Hypertension* 2011;57:245-54.
87. Kellogg EW, 3rd, Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 1975;250:8812-7.
88. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984;74:1156-64.

89. Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, et al. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* 1980;492:91-119.
90. Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995;77:29-36.
91. Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem* 1996;271:19705-9.
92. Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Distinct roles of Ca²⁺, calmodulin, and protein kinase C in H₂O₂-induced activation of ERK1/2, p38 MAPK, and protein kinase B signaling in vascular smooth muscle cells. *Antioxidants & redox signaling* 2004;6:353-66.
93. Santiago E, Contreras C, Garcia-Sacristan A, et al. Signaling pathways involved in the H₂O₂-induced vasoconstriction of rat coronary arteries. *Free radical biology & medicine* 2013;60:136-46.
94. Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *Journal of hypertension* 2005;23:571-9.
95. Wei EP, Kontos HA, Beckman JS. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *The American journal of physiology* 1996;271:H1262-6.
96. Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *The American journal of physiology* 1998;275:H1283-9.
97. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxidants & redox signaling* 2005;7:1302-14.
98. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education* 2003;27:201-6.
99. Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, et al. Cell-Surface Receptors Transactivation Mediated by G Protein-Coupled Receptors. *International journal of molecular sciences* 2014;15:19700-28.
100. Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005;85:757-810.

101. Harnett KM, Biancani P. Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. *Am J Med* 2003;115 Suppl 3A:24S-30S.
102. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003;83:1325-58.
103. Laher I, Zhang JH. Protein kinase C and cerebral vasospasm. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2001;21:887-906.
104. Larsen JK, Yamboliev IA, Weber LA, et al. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *The American journal of physiology* 1997;273:L930-40.
105. Newton AC, Johnson JE. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochimica et biophysica acta* 1998;1376:155-72.
106. Gailly P, Gong MC, Somlyo AV, et al. Possible role of atypical protein kinase C activated by arachidonic acid in Ca²⁺ sensitization of rabbit smooth muscle. *The Journal of physiology* 1997;500 (Pt 1):95-109.
107. Niiron N, Ikebe M. Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 2001;276:29567-74.
108. Borman MA, MacDonald JA, Muranyi A, et al. Smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase induces Ca²⁺ sensitization via myosin phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 2002;277:23441-6.
109. MacDonald JA, Eto M, Borman MA, et al. Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett* 2001;493:91-4.
110. Hirano K, Hirano M, Kanaide H. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi* 2004;40:219-36.
111. Xu J, Yang G, Li T, et al. Involvement of Cpi-17 and zipper-interacting protein kinase in the regulation of protein kinase C- α , protein kinase C- ϵ on vascular calcium sensitivity after hemorrhagic shock. *Shock* 2010;33:49-55.
112. Liu L, Yang G, Zhu Y, et al. Role of non-MLC20 phosphorylation pathway in the regulation of vascular reactivity during shock. *J Surg Res* 2014;187:571-80.

113. Adam LP, Haeberle JR, Hathaway DR. Phosphorylation of caldesmon in arterial smooth muscle. *J Biol Chem* 1989;264:7698-703.
114. Chaudhari A, Kirschenbaum MA. A rapid method for isolating rabbit renal microvessels. *The American journal of physiology* 1988;254:F291-6.
115. Liu ZZ, Viegas VU, Perlewitz A, et al. Iodinated contrast media differentially affect afferent and efferent arteriolar tone and reactivity in mice: a possible explanation for reduced glomerular filtration rate. *Radiology* 2012;265:762-71.
116. Aksoy MO, Murphy RA, Kamm KE. Role of Ca²⁺ and myosin light chain phosphorylation in regulation of smooth muscle. *The American journal of physiology* 1982;242:C109-16.
117. Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:342-56.
118. Murányi A, Derkach D, Erdodi F, et al. Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett* 2005;579:6611-5.
119. Feng J, Ito M, Ichikawa K, et al. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274:37385-90.
120. Johnston WH, Latta H. Glomerular mesangial and endothelial cell swelling following temporary renal ischemia and its role in the no-reflow phenomenon. *The American journal of pathology* 1977;89:153-66.
121. Hollenberg NK, Epstein M, Rosen SM, et al. Acute oliguric renal failure in man: evidence for preferential renal cortical ischemia. *Medicine (Baltimore)* 1968;47:455-74.
122. Brabrand K, de Lange C, Emblem KE, et al. Contrast-enhanced ultrasound identifies reduced overall and regional renal perfusion during global hypoxia in piglets. *Investigative radiology* 2014;49:540-6.
123. Arendshorst WJ, Finn WF, Gottschalk CW. Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Circ Res* 1975;37:558-68.
124. Lauson HD, Bradley SE, Cournand A, et al. The Renal Circulation in Shock. *J Clin Invest* 1944;23:381-402.
125. Pedersen F, Ladefoged J. Renal hemodynamics in acute renal failure in man measured by intra-arterial injection. External counting technique with xenon-133 and I-131-albumin. *Scandinavian journal of urology and nephrology* 1973;7:187-95.

126. Myers BD, Miller DC, Mehigan JT, et al. Nature of the renal injury following total renal ischemia in man. *J Clin Invest* 1984;73:329-41.
127. Guo XL, Deng Y, Shang J, et al. ERK signaling mediates enhanced angiotensin II-induced rat aortic constriction following chronic intermittent hypoxia. *Chinese medical journal* 2013;126:3251-8.
128. Lam SY, Liu Y, Ng KM, et al. Upregulation of a local renin-angiotensin system in the rat carotid body during chronic intermittent hypoxia. *Experimental physiology* 2014;99:220-31.
129. Shang J, Yang YY, Guo XL, et al. Ang II type 1 receptor expression in rat aorta exposed to chronic intermittent hypoxia: effects of p38MAPK and ERK1/2 signaling. *Chinese medical journal* 2013;126:3264-9.
130. Norman JT, Stidwill R, Singer M, et al. Angiotensin II blockade augments renal cortical microvascular pO₂ indicating a novel, potentially renoprotective action. *Nephron Physiology* 2003;94:p39-46.
131. Epstein M, Berk DP, Hollenberg NK, et al. Renal failure in the patient with cirrhosis. The role of active vasoconstriction. *Am J Med* 1970;49:175-85.
132. Ramaswamy D, Corrigan G, Polhemus C, et al. Maintenance and recovery stages of postischemic acute renal failure in humans. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F271-80.
133. Basile DP, Donohoe DL, Phillips SA, et al. Enhanced skeletal muscle arteriolar reactivity to ANG II after recovery from ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R1770-6.
134. Edwards RM. Segmental effects of norepinephrine and angiotensin II on isolated renal microvessels. *The American journal of physiology* 1983;244:F526-34.
135. Kaufmann J, Martinka P, Moede O, et al. Norepinephrine enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/re-oxygenation in renal interlobar arteries. *Acta Physiol (Oxf)* 2015.
136. Ichihara A, Inscho EW, Imig JD, et al. Role of renal nerves in afferent arteriolar reactivity in angiotensin-induced hypertension. *Hypertension* 1997;29:442-9.
137. Satoh S, Itoh T, Kuriyama H. Actions of angiotensin II and noradrenaline on smooth muscle cells of the canine mesenteric artery. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 1987;410:132-8.

138. Thai TL, Fellner SK, Arendshorst WJ. ADP-ribosyl cyclase and ryanodine receptor activity contribute to basal renal vasomotor tone and agonist-induced renal vasoconstriction in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F1107-14.
139. Denton KM, Shweta A, Anderson WP. Preglomerular and postglomerular resistance responses to different levels of sympathetic activation by hypoxia. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:27-34.
140. Park KM, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem* 2001;276:11870-6.
141. Ruchko M, Gillespie MN, Weeks RS, et al. Putrescine transport in hypoxic rat main PSMCs is required for p38 MAP kinase activation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2003;284:L179-86.
142. Karamsetty MR, Klinger JR, Hill NS. Evidence for the role of p38 MAP kinase in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2002;283:L859-66.
143. Morrell ED, Tsai BM, Wang M, et al. p38 mitogen-activated protein kinase mediates the sustained phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction and plays a role in phase I vasodilation. *J Surg Res* 2006;134:335-41.
144. Jin N, Hatton N, Swartz DR, et al. Hypoxia activates jun-N-terminal kinase, extracellular signal-regulated protein kinase, and p38 kinase in pulmonary arteries. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000;23:593-601.
145. Welsh D, Mortimer H, Kirk A, et al. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in hypoxia-induced vascular cell proliferation: an interspecies comparison. *Chest* 2005;128:573S-4S.
146. Teoh H, Zacour M, Wener AD, et al. Increased myofibrillar protein phosphatase-1 activity impairs rat aortic smooth muscle activation after hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1182-9.
147. Wang Z, Lanner MC, Jin N, et al. Hypoxia inhibits myosin phosphatase in pulmonary arterial smooth muscle cells: role of Rho-kinase. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2003;29:465-71.
148. Knock GA, Snetkov VA, Shaifta Y, et al. Role of src-family kinases in hypoxic vasoconstriction of rat pulmonary artery. *Cardiovascular research* 2008;80:453-62.

149. Chen Z, Zhang X, Ying L, et al. cIMP synthesized by sGC as a mediator of hypoxic contraction of coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;307:H328-36.
150. Wardle RL, Gu M, Ishida Y, et al. Ca²⁺-desensitizing hypoxic vasorelaxation: pivotal role for the myosin binding subunit of myosin phosphatase (MYPT1) in porcine coronary artery. *The Journal of physiology* 2006;572:259-67.
151. Wardle RL, Gu M, Ishida Y, et al. Rho kinase is an effector underlying Ca²⁺-desensitizing hypoxic relaxation in porcine coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H23-9.
152. Zacour ME, Teoh H, Halayko AJ, et al. Mechanisms of aortic smooth muscle hyporeactivity after prolonged hypoxia in rats. *J Appl Physiol (1985)* 2002;92:2625-32.
153. Wang X, Tao T, Ding R, et al. Kidney protection against ischemia/reperfusion injury by myofibrillogenesis regulator-1. *American journal of nephrology* 2014;39:279-87.
154. Murray TR, Chen L, Marshall BE, et al. Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1990;3:457-65.
155. Zhao Y, Rhoades RA, Packer CS. Hypoxia-induced pulmonary arterial contraction appears to be dependent on myosin light chain phosphorylation. *The American journal of physiology* 1996;271:L768-74.
156. Bagi Z, Erdei N, Koller A. High intraluminal pressure via H₂O₂ upregulates arteriolar constrictions to angiotensin II by increasing the functional availability of AT₁ receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H835-41.
157. Sungkaworn T, Lenbury Y, Chatsudthipong V. Oxidative stress increases angiotensin receptor type I responsiveness by increasing receptor degree of aggregation using image correlation spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta* 2011;1808:2496-500.
158. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, et al. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature medicine* 2001;7:1003-9.
159. Fellner SK, Arendshorst WJ. Angiotensin II, reactive oxygen species, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F1012-9.

160. Torrecillas G, Diez-Marques ML, Garcia-Escribano C, et al. Mechanisms of cGMP-dependent mesangial-cell relaxation: a role for myosin light-chain phosphatase activation. *Biochem J* 2000;346 Pt 1:217-22.
161. Palen DI, Ouhtit A, Belmadani S, et al. Hydrogen peroxide acts as relaxing factor in human vascular smooth muscle cells independent of map-kinase and nitric oxide. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2006;11:2526-34.
162. Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Experimental biology and medicine* 2006;231:237-51.
163. Su X, Smollock EM, Marcel KN, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase modulates vascular smooth muscle contraction by calcium and myosin light chain phosphorylation-independent and -dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H657-66.
164. Lee HM, Won KJ, Kim J, et al. Endothelin-1 induces contraction via a Syk-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat aortic smooth muscle. *Journal of pharmacological sciences* 2007;103:427-33.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Amira Al-Masri, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Rolle der p38 MAPK bei der stärkeren Angiotensin II-Antwort afferenter Arteriolen nach Hypoxie/Reoxygenierung, Noradrenalin- sowie H₂O₂-Behandlung" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Arbeit unterstützt und maßgeblich zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben.

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Andreas Patzak für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten. Seine ständige Ansprechbarkeit und vielfältigen Anregungen zu methodischen und thematischen Problemstellungen erleichterten den gesamten Prozess enorm.

Herrn Prof. Dr. Michael Fähling danke ich für seine Betreuung bei den Untersuchungen zur Auswirkung oxidativen Stresses und seine wertvollen Hinweise bei neu aufgetretenen methodischen Fragestellungen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Andrea Perlewitz bedanken, die mich mit großer Sorgfalt in die molekularbiologischen Untersuchungsverfahren eingearbeitet hat und mir auch bei der Literaturrecherche eine große Unterstützung war. Auch Frau Dr. Zhizhao Liu gebührt ein großer Dank für ihre Zuarbeit im Rahmen der Perfusionsexperimente.

Bei Frau Andrea Gerhardt und Frau Ursula Kastner möchte ich mich für die medizintechnische Unterstützung und Korrekturen des Manuskripts bedanken.

Abschließend bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, Songül, Franziska und Karim, die mir zwar weder inhaltlich noch methodisch helfen konnten, mir allerdings in einer sehr schweren Zeit zur Seite standen und somit ebenfalls einen bedeutenden Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit haben.