

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

DISSERTATION

Noradrenalin erhöht die Angiotensin II- Antwort von Interlobararterien der
Niere via p38 MAPK Aktivierung nach Hypoxie/ Reoxygenierung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Kaufmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Anteilserklärung/ eidesstattliche Versicherung	5
3.1 Eidesstattliche Versicherung	5
3.2 Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	6
4. Journal Summary List	8
5. Publikation	9
6. Lebenslauf	22
7. Publikationsliste	24
8. Danksagung	25

1. Zusammenfassung

Hypoxie, Aktivierung des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Systems sind wichtige Komponenten bei der Entstehung einer akuten Niereninsuffizienz. Bisher gibt es keine spezifische Therapie des akuten Nierenversagens. Dies beruht auf ungenügenden Kenntnissen der Pathophysiologie der Erkrankung. Wir gehen von der Hypothese aus, dass Aktivierung des sympathischen Nervensystems in Verbindung mit Ischämie/Hypoxie die renale Vasokonstriktion begünstigt. Wir etablierten ein experimentelles Modell akuter Hypoxie in renalen Arterien der Maus, um die Hypothese zu prüfen. Dabei wurden die Gefäßantworten bei Applikation vasokonstriktorischer Substanzen nach Hypoxie und Noradrenalingabe sowie kurzzeitiger Reoxygenierung getestet. Noradrenalingabe (10^{-9} mol/l) während der Hypoxie erhöhte die Gefäßreaktivität auf Angiotensin II deutlich. Es wurden Signalwege dieser Noradrenalinwirkung untersucht.

Wir verwendeten Interlobararterien von C57BL6-Mäusen und studierten sie unter isometrischen Bedingungen im Mulvany-Myograph. Agonisten und/oder Antagonisten adrenerger Rezeptoren wurden, je nach Protokoll, unter Kontrollbedingungen (95% O₂, 5% CO₂) oder Hypoxie (96% N₂, 5% O₂) für 60 Minuten appliziert. Nach einer Reoxygenierungszeit von 10 Minuten wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für konstriktorische Substanzen gemessen. Ein vergleichbares Protokoll führten wir in isolierten und perfundierten afferenten Arteriolen unter isotonischen Bedingungen durch. Phosphorylierungen der p38 MAPK und der Myosinleichtkette wurden mittels Western Blot untersucht. Die Expression von alpha- und beta- Rezeptor-Subtypen in Interlobararterien erfolgte unter Verwendung der real time PCR.

Hypoxie/Reoxygenierung vermindert die Angiotensin II-Antwort von Interlobararterien. Behandlung mit Noradrenalin während der Hypoxie erhöht die Angiotensin II-Antwort der Interlobararterien und als auch von afferenten Arteriolen. Noradrenalin- oder Endothelin-1-Konzentrations-Wirkungs-Kurven waren nach Hypoxie/Reoxygenierung und Noradrenalingabe dagegen unverändert. Noradrenalin-Behandlung allein hatte keinen Effekt auf die Angiotensin II-Antwort der Gefäße. Prazosin- oder Yohimbinbehandlung beeinflusste den Noradrenalineffekt bei Hypoxie/Reoxygenierung nicht signifikant. Dagegen verhinderte die Kombination beider Blocker oder auch von Propranolol diesen Effekt. Der beta3-Rezeptor-Agonist BRL37344 war ähnlich effektiv wie Noradrenalin bei Gabe während der Hypoxie. Allerdings war die beta-3-Rezeptor-Blockade in Bezug auf den Noradrenalineffekt wirkungslos. Die Phosphorylierung der

p38 MAPK als auch der Myosinleichtkette war nach Hypoxie/Reoxygenierung und Noradrenalinbehandlung deutlich erhöht. Der selektive p38 MAPK-Inhibitor SB202190 unterdrückte den Hypoxie/ Reoxygenierungs-Noradrenalin-Effekt.

Die Studie zeigt, dass Hypoxie/Reoxygenierung in Kombination mit Noradrenalin die Angiotensin II- Antwort in Interlobararterien und afferenten Arteriolen verstärkt. Dies könnte für die Entstehung eines akuten Nierenversagens von Bedeutung sein. Die Wirkung von Noradrenalin wird durch die kooperative Aktion von alpha1- und alpha2-Rezeptoren und möglicherweise von beta1- und beta2-Rezeptoren vermittelt. Die Beteiligung von beta3-Rezeptoren kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Der Signalweg, der zur Verstärkung der Angiotensin II-Antwort führt, schließt die Aktivierung von p38 MAPK ein.

2. Summary

Hypoxia, activation of the sympathetic nervous system and of the renin-angiotensin-system are important components in the development of acute kidney injury (AKI). There is no specific therapy for AKI due to the incomplete knowledge of the pathophysiology of the disease. We hypothesize that the concerted action of the sympathetic nervous system and of hypoxia/ischemia constricts the renal vasculature. To test the hypothesis, we established a mouse model of acute hypoxia in interlobar arteries. We investigated the vessel response to vasoconstrictor substances after hypoxia- and norepinephrine- treatment and re-oxygenation. Norepinephrine (10⁻⁹ mol/l) during hypoxia significantly increased the responses of interlobar arteries to angiotensin II after re-oxygenation. Signalling pathways of this effect were investigated. Interlobar arteries of C57BL6- mice were used and their reactivity studied under isometric conditions (Mulvany-myograph). Vessels were treated with agonists and/or antagonists of adrenergic receptors under control (95% O₂, 5% CO₂) or hypoxic conditions (96% N₂, 5% O₂), respectively, for 60 min. After re-oxygenation of 10 min, concentration-response-curves were measured for constrictor agonists. We performed a similar protocol in isolated perfused, afferent arterioles under isotonic conditions. Myosin light chain- and p38 MAPK-phosphorylation were measured using Western blot technique. Alpha- and beta-receptor- mRNA-expression of interlobar arteries was determined using real time PCR.

Hypoxia/re-oxygenation decreased the angiotensin response of interlobar arteries. Norepinephrine treatment in addition to hypoxia/re-oxygenation increased the response in interlobar arteries and afferent arterioles. Noradrenalin- und endothelin-1- concentration-response curves were not changed after hypoxia/re-oxygenation + norepinephrine. Norepinephrine treatment without hypoxia/re-oxygenation did not influence the angiotensin II concentration-response curve. Prazosin and yohimbine during hypoxia did not change the norepinephrine effect on the angiotensin II response. The combination of prazosin and yohimbine or the treatment with propranolol reduced the norepinephrine effect. The beta3-receptor agonist BRL37344 mimicked the norepinephrine effect. A beta3-receptor blocker did not prevent the norepinephrine effect. Myosin light chain- and p38 MAPK-phosphorylation were increased after hypoxia/re-oxygenation and norepinephrine treatment. The selective p38 MAPK inhibitor SB202190 prevented the increase of the angiotensin II response after hypoxia/reoxygenation+ norepinephrine.

Summary

The study demonstrates that hypoxia/re-oxygenation in combination with norepinephrine strengthens the response to angiotensin II in afferent arterioles and interlobar arteries. This may be important for the pathogenesis of AKI. The effect of norepinephrine is mediated by the cooperative action of alpha1- and alpha2-receptors, and possibly by beta1- and beta2-receptors. The contribution of beta3-receptors cannot be excluded. The signalling, which leads to the enhancement of the angiotensin II induced constriction, involves the p38 MAPK.

3. Anteilerklärung/ eidesstattliche Versicherung

3.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jana Kaufmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Noradrenalin erhöht die Angiotensin II- Antwort von Interlobararterien der Niere via p38 MAPK Aktivierung nach Hypoxie/ Reoxygenierung“ selbstständig und ohne nicht offengelegter 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. Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben ist.

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

Datum

Unterschrift

3.2 Ausführliche Anteilsklärung an der erfolgten Publikation

Publikation: J. Kaufmann, P. Martinka, O. Moede, M. Sendeski, A. Steege, M. Fähling, M. Hultström, M. Gaestel, I. C. Moraes- Silva, T. Nikitina, Z.Z. Liu, O. Zavaritskaya, A. Patzak, Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/ re- oxygenation in renal interlobar arteries, Acta Physiol (Oxf), 213: 920-932, 2015

Experimenteller Teil:

- Vorbereitung der experimentellen Arbeiten einschließlich Herstellen von Lösungen, Tierbehandlung;
- Durchführung von 90% der isometrischen Messungen im Mulvany- Myographen einschließlich Präparation der renalen Arterie und Einspannen in den Myographen;
- Festlegung und Optimierung der Protokolle;
- Pro Versuch: Normalisierung und Testung der Funktion mit KCl
 - Versuchsreihen zur Festlegung des optimalen Versuchsablaufes, wobei die Länge der Hypoxiephase jeweils geändert wurde (10 Minuten Hypoxie, 20 Minuten Hypoxie, 30 Minuten Hypoxie, 60 Minuten Hypoxie);
 - Versuchsreihen mit verschiedenen Dosis- Wirkungs- Kurven (Angiotensin II, Noradrenalin, Endothelin-1);
 - Versuchsreihen mit 60 Minuten Normoxie oder Hypoxie und einzelne oder kombinierte Gabe verschiedener vasoaktiver Substanzen (Adenosin, Noradrenalin, Prazosin, Yohimbin, Propanolol, SB 202190, BRL 37344);
- Bereitstellen von Arterien, die für die Untersuchung der Expression und/oder Phosphorylierung von Proteinen mit Hilfe von Western Blots dienen;
- Durchführung eines Teils der Western Blots.

Auswertung

- Aufarbeitung der Daten der isometrischen Messungen in Excel-Tabellen mit graphischer Darstellung der Daten;
- Graphische Darstellung der Daten der PCRs und Western Blots.

Statistik

- Aufarbeitung der Daten für die statistische Auswertung;
- Durchführung von statistischen Test (nach Brunner) zum Vergleich der Konzentrations- Wirkungs- Kurven.

Diskussion

- Diskussion der Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen an Interlobararterien und afferenten Arteriolen sowie der Ergebnisse der Rezeptorexpressionsanalyse, der Phosphorylierungsstudien und p38 MAPK Signalwegmanipulation mit den beteiligten Kollegen.

Konkrete Arbeiten bei der Manuskriptentstehung:

- Selbstständige schriftliche Darlegung von Methoden und Ergebnissen;
- Vorlage von Einleitung und Diskussion, Endfassung in Zusammenarbeit mit Mentor.

Unterschrift der Doktorandin

4. Journal Summary List

admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR?RQ=LIST_SUMMARY_JOURNAL&cursor=1

Nature Methods | Kidney International | eUn, das akademisch... | vessephysiology@gm...

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]

WELCOME | HELP

Journal Summary List

Journals from: **subject categories: PHYSIOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 81)

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

2013 JCR Science Edition

[Journal Title Changes](#)

Page 1 of 5

Ranking is based on your journal and sort selections.

JCR Data (j)

Page 1 of 5

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <small>(linked to journal information)</small>	ISSN	JCR Data (j)					Eigenfactor [®] Metrics (i)		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	PHYSIOL-REV	0031-9333	23974	29.041	35.456	4.486	35	9.8	0.04161	13.875
<input type="checkbox"/>	2	ANNUL-REV-PHYSIOL	0066-4278	8246	14.696	18.785	6.300	30	10.0	0.01583	7.850
<input type="checkbox"/>	3	J-PINEAL-RES	0742-3098	6136	7.812	5.961	2.011	88	5.9	0.00750	0.919
<input type="checkbox"/>	4	PHYSIOLOGY	1548-9213	2656	5.645	8.387	2.176	34	5.7	0.00887	3.329
<input type="checkbox"/>	5	J-MAMMARY-GLAND-BIOL	1083-3021	2245	5.000	6.163	1.000	32	7.3	0.00519	2.034
<input type="checkbox"/>	6	EXERC-SPORT-SCI-REV	0091-6331	2200	4.818	5.504	0.889	27	9.0	0.00403	1.764
<input type="checkbox"/>	7	J-GEN-PHYSIOL	0022-1295	8002	4.570	4.142	1.725	91	>10.0	0.01136	1.758
<input type="checkbox"/>	8	J-PHYSIOL-LONDON	0022-3751	47233	4.544	5.021	1.368	386	>10.0	0.06245	1.827
<input type="checkbox"/>	9	ACTA-PHYSIOL	1748-1708	2835	4.251	3.695	0.844	128	3.6	0.01043	1.019
<input type="checkbox"/>	10	AM-J-PHYSIOL-ENDOC-M	0193-1849	20258	4.088	5.037	0.701	284	7.6	0.03950	1.667
<input type="checkbox"/>	11	AM-J-PHYSIOL-LUNG-C	1040-0605	13603	4.041	4.338	0.654	182	7.7	0.02115	1.167
<input type="checkbox"/>	12	AM-J-PHYSIOL-HEART-C	0363-6135	32958	4.012	4.046	0.614	352	8.5	0.05303	1.285
<input type="checkbox"/>	13	REV-PHYSIOL-BIOCH-P	0303-4240	767	3.900	5.467	1.000	5	>10.0	0.00044	1.754
<input type="checkbox"/>	14	J-CELL-PHYSIOL	0021-9541	17398	3.874	3.825	1.387	269	6.6	0.03598	1.157
<input type="checkbox"/>	15	AM-J-PHYSIOL-GASTR-L	0193-1857	14610	3.737	3.853	0.722	205	7.6	0.02810	1.238
<input type="checkbox"/>	16	INT-J-BEHAV-NUTR-PHY	1479-5868	3291	3.675	4.807	0.305	141	4.0	0.01341	1.505
<input type="checkbox"/>	17	AM-J-PHYSIOL-CELL-PH	0363-6143	18064	3.674	3.952	1.081	222	7.9	0.03312	1.324
<input type="checkbox"/>	18	CELL-PHYSIOL-BIOCHEM	1015-8987	3886	3.550	3.309	0.359	270	3.5	0.01128	0.790
<input type="checkbox"/>	19	AM-J-PHYSIOL-REG-I	0363-6119	21416	3.529	3.502	0.527	277	8.9	0.03470	1.114
<input type="checkbox"/>	20	J-APPL-PHYSIOL	8750-7587	42489	3.434	4.193	0.723	393	>10.0	0.04704	1.296

Journals 1 - 20 (of 81)

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Page 1 of 5

5. Publikation

J. Kaufmann, P. Martinka, O. Moede, M. Sendeski, A. Steege, M. Fähling, M. Hultström, M. Gaestel, I. C. Moraes- Silva, T. Nikitina, Z.Z. Liu, O. Zavaritskaya, A. Patzak

Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/ re- oxygenation in renal interlobar arteries

Acta Physiol (Oxf), 213: 920-932, 2015

Impact factor: 4,251

<http://dx.doi.org/10.1111/apha.12457>

6. Lebenslauf

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

7. Publikationsliste

J. Kaufmann, P. Martinka, O. Moede, M. Sendeski, A. Steege, M. Föhling, M. Hultström, M. Gaestel, I. C. Moraes-Silva, T. Nikitina, Z.Z. Liu, O. Zavaritskaya, A. Patzak, Noradrenaline enhances angiotensin II responses via p38 MAPK activation after hypoxia/ re- oxygenation in renal interlobar arteries, *Acta Physiol, (Oxf)*, 213: 920-932, 2015

Impact-factor: 4,251

Posterpräsentation

J. Kaufmann, M. Föhling, M. Sendeski, A E. G Persson, P. B Persson, and A. Patzak: Norepinephrine increases the Responsiveness of Interlobar Arteries to Angiotensin II in a Hypoxia/ Reperfusion Model. Renal Week of ASN, San Diego, 2009

Abstrakt:

A., Patzak, M. Föhling, M. Sendeski, P.B. Persson, and **J. Kaufmann**: Norepinephrine increases the angiotensin II response of interlobar in a hypoxia/ reperfusion model. *FASEB J* 17, 2011, 25:665.23

8. Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. med. Andreas Patzak, der das Projekt angeregt, begleitet und unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Pontus B. Persson danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Experimente im Institut für Vegetative Physiologie.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Herrn Dr. Mauricio Sendeski und Herrn Dr. Peter Martinka für die Unterstützung bei den funktionellen Untersuchungen, Frau Ulrike Neumann und Herrn Dr. Andreas Steege sowie Herrn Prof. Michael Fähling für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Analysen, Frau Olivia Moede für die Expressionsuntersuchungen der adrenergen Rezeptoren, sowie Yvonne Amoneit, Dr. Michael Hultström, Prof. Matthias Gaestel, Dr. Ivana C. Moraes-Silva, Tatiana Nikitina, Dr. Zhi Zhao Liu, und Dr. Olga Zavaritskaya für ihre wissenschaftlichen und praktischen Arbeiten im Rahmen des Projektes und der Fertigstellung des Artikels.

Meinen Eltern und meinem Ehemann danke ich für die motivierenden Worte und die konstruktive Kritik bei der Arbeit an der Dissertationsschrift.