

**Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-assoziierte Proteine:
Untersuchungen zur Lokalisation und Regulation von
Arap1 in der Niere**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATUR-
WISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Elisabeth Doblinger
aus Regensburg
im Jahr 2012

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 07.02.2012

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Hayo Castrop

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Das Renin-Angiotensin-System	5
1.1.1 Gewebespezifische Renin-Angiotensin-Systeme.....	6
1.1.2 Erweitertes Renin-Angiotensin-System	7
1.1.3 Effekte des Renin-Angiotensin-Systems.....	7
1.1.4 Regulation des Renin-Angiotensin-Systems.....	9
1.2 Angiotensin II–Rezeptoren	11
1.2.1 Der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor.....	11
1.2.2 Intrazelluläre Signaltransduktion nach Aktivierung des AT1-Rezeptors	12
1.2.3 Regulation des AT1-Rezeptors.....	15
1.3 Angiotensin II–Rezeptor–assoziierte Proteine	16
1.3.1 ATRAP	17
1.3.2 Arap1	17
1.3.3 Weitere Interaktionsproteine.....	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2 Methoden	20
2.1 Bestimmung der Arap1-mRNA-Expression durch quantitative Echtzeit-PCR....	20
2.2 Bestimmung der Arap1-Protein-Expression durch Western Blotting	20
2.3 Immunhistochemie	21
2.4 Menschliche Gewebeproben	22
2.5 Tierexperimente	22
2.5.1 Salzdiäten	22
2.5.2 Wassermangel	22
2.5.3 Unilaterale Nierenarterienstenose (<i>2-kidney-1-clip-model</i>)	22
2.5.4 Chronische Infusion von Angiotensin II mit Hilfe osmotischer Minipumpen.....	23
2.5.5 Behandlung mit dem AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan	23
2.5.6 Behandlung mit Hydralazin.....	23
2.5.7 <i>Cecal Ligation and Puncture (CLP)</i>	23
2.5.8 Injektion von Lipopolysacchariden (LPS)	24
2.6 <i>In-vitro</i> Experimente	24
2.6.1 Inkubation mit Angiotensin II.....	24
2.6.2 Koinkubation mit Angiotensin II mit Losartan und PD123319.....	24
2.6.3 Inkubation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	25
2.6.4 Inkubation mit Zytokinen.....	25
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Lokalisierung der Expression von Arap1 in der Maus und im Menschen	26

3.1.1	Expression von Arap1 auf mRNA-Ebene.....	26
3.1.2	Expression von Arap1 auf Proteinebene.....	27
3.2	Regulation der Expression von Arap1 in der Niere bei verschiedenen Aktivitätszuständen des Renin-Angiotensin-Systems	34
3.2.1	Expression von Arap1 bei hoher und niedriger Kochsalzaufnahme	34
3.2.2	Expression von Arap1 bei Wassermangel	35
3.2.3	Expression von Arap1 bei unilateraler Nierenarterienstenose.....	36
3.2.4	Expression von Arap1 bei chronischer Infusion von Angiotensin II	37
3.2.5	Expression von Arap1 bei Behandlung mit dem AT1 Rezeptor Antagonisten Losartan	39
3.3	Expression von Arap1 und arterieller Blutdruck	41
3.3.1	Expression von Arap1 bei eNOS-defizienten Mäusen	41
3.3.2	Expression von Arap1 bei Behandlung mit Hydralazin.....	42
3.4	Regulation der Expression von Arap1 in weiteren Organen.....	43
3.5	Regulation der Expression von Arap1 <i>in-vitro</i>	45
3.5.1	Expression von Arap1 in Gegenwart von Angiotensin II	45
3.5.2	Expression von Arap1 in Gegenwart von Angiotensin II-Rezeptor- Antagonisten und Angiotensin II	48
3.5.3	Expression von Arap1 bei Aktivierung der Proteinkinase C	50
3.6	Regulation der Expression von Arap1 in der Sepsis	51
3.6.1	Expression von Arap1 <i>in-vivo</i> nach CLP	52
3.6.2	Expression von Arap1 <i>in-vivo</i> nach Injektion von LPS	53
3.6.3	Expression von Arap1 <i>in-vitro</i> in Gegenwart von Zytokinen	56
3.6.4	Expression von Arap1 <i>in-vitro</i> in Gegenwart von Zytokinen und Angiotensin II	57
4	Diskussion	59
4.1	Lokalisation von Arap1	59
4.2	Regulation der Arap1-Expression.....	61
4.2.1	Wirkung von Angiotensin II auf die Arap1-Expression in der Niere	61
4.2.2	Wirkung des Blutdrucks auf die Arap1-Expression in der Niere	62
4.2.3	Wirkung von Angiotensin II auf die Arap1-Expression in weiteren Organen.....	63
4.2.4	Arap1 als Modulator der Oberflächenexpression des AT1-Rezeptors <i>in-vivo</i> ...	63
4.2.5	Mechanismen der Regulation der Arap1-Expression <i>in-vitro</i>	65
4.2.6	Rolle von Arap1 in pathologischen Situationen wie der Sepsis	66
4.2.7	Wirkung von Zytokinen auf die Arap1-Expression <i>in-vitro</i>	67
5	Zusammenfassung.....	68
	Danksagung.....	70
	Anhang A: Literaturverzeichnis	71
	Anhang B: Abbildungsverzeichnis	80

1 Einleitung

Die Entdeckung Renins Ende des 19. und die Beschreibung von Angiotensin in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts waren Meilensteine in der Erforschung der Blutdruckregulation [Basso, N. et al., 2001]. Nun kennt man das Renin-Angiotensin-System (RAS) als einen Regulationsmechanismus, der Blutdruck sowie Wasser- und Salzhaushalt im Körper steuert. Dieses Wissen verhalf der Medizin Substanzen zu entwickeln, die effektiv Bluthochdruck bekämpfen und auf diese Weise schwerwiegende Herz-Kreislauf-Erkrankungen verhindern. Die Vielzahl an neuen Erkenntnissen gewährt nun einen tieferen Einblick in die Funktion des Renin-Angiotensin-Systems. Gleichzeitig tritt immer mehr die Komplexität des Regulationssystems zu Tage. So stellt man fest, dass eine steigende Anzahl von Proteinen am Wirkmechanismus des Renin-Angiotensin-Systems beteiligt ist. Des Weiteren wird erkannt, dass die Effekte von Angiotensin II in verschiedenen Geweben lokal unabhängig vom systemischen RAS reguliert werden. Der Mechanismus hinter dieser lokalen Regulation ist noch weitgehend ungeklärt. Eine Rolle spielen möglicherweise Angiotensin-Rezeptor-assoziierte Proteine, die die Oberflächenexpression der Angiotensin II-Rezeptoren modulieren können.

1.1 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) stellt eine Kaskade von enzymatischen Reaktionen dar (Abbildung 1). Wie der Name schon sagt, beinhaltet dieses System zwei Hauptkomponenten: Renin und Angiotensin.

Renin ist eine Aspartyl-Proteinase [Dzau, V.J. et al., 1988], die in den juxtaglomerulären Zellen der Niere exprimiert und ins Plasma sezerniert wird. Durch die Spaltung des hepatischen Reninsubstrats Angiotensinogen produziert Renin ein inaktives Dekapeptid, Angiotensin I. Das Angiotensin I-konvertierende Enzym (ACE, *angiotensin I-converting enzyme*), das im Plasma und in der Gefäßwand kleiner Blutgefäße, in der Lunge, Niere und in anderen Organen lokalisiert ist, wandelt Angiotensin I durch Abspaltung von zwei Aminosäuren in das aktive Oktapeptid Angiotensin II um [Skeggs, L.T. et al., 1956].

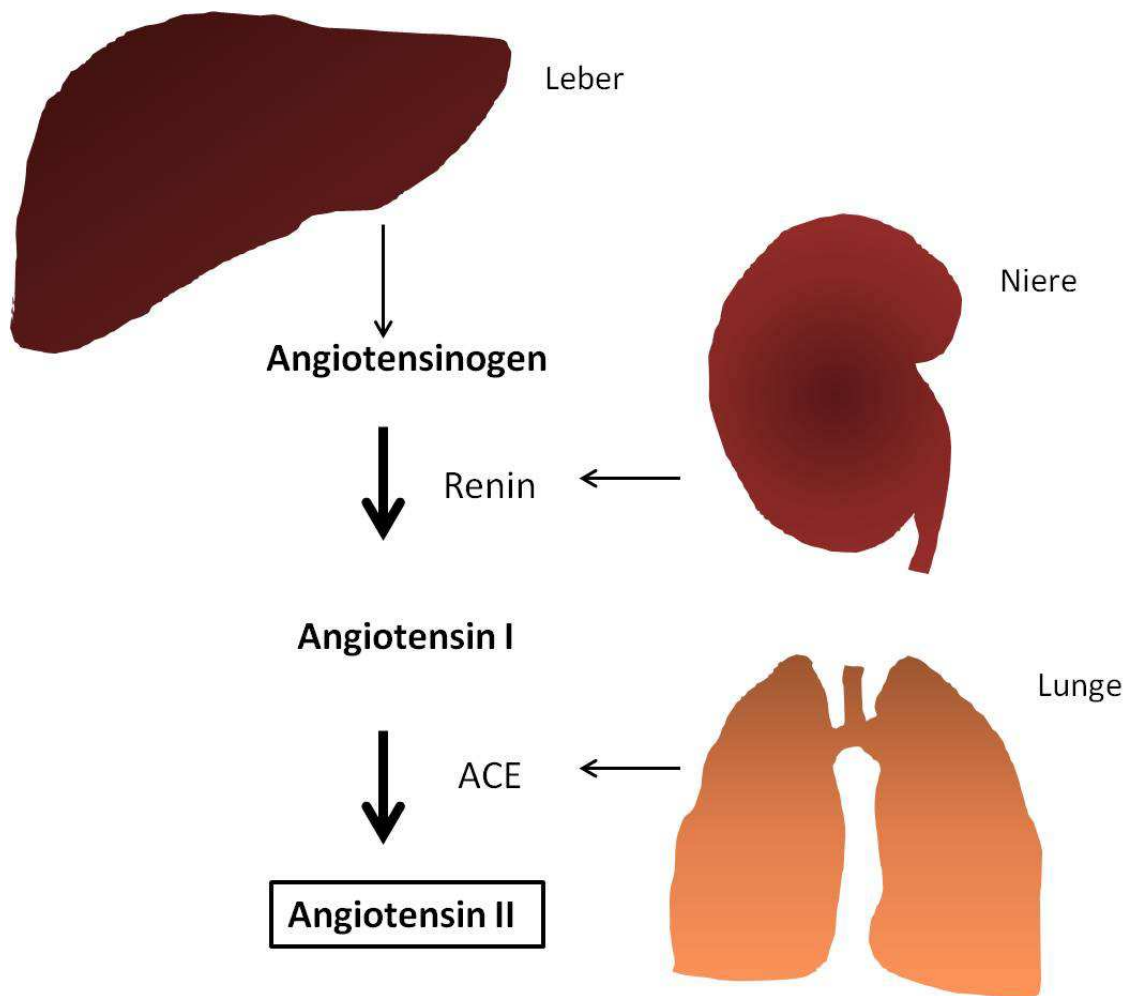


Abbildung 1: Übersicht über das klassische Renin-Angiotensin-System. ACE: Angiotensin I-konvertierendes Enzym (Angiotensin I-converting enzyme)

1.1.1 Gewebespezifische Renin-Angiotensin-Systeme

Angiotensin II ist verantwortlich für alle typischen Effekte des Renin-Angiotensin-Systems. Jedoch wird diese ursprüngliche Sicht des Renin-Angiotensin-System als ein endokriner und in sich abgeschlossener Regelkreislauf durch neue Erkenntnisse ergänzt und ausgeweitet. So wurde die Existenz verschiedener gewebespezifischer RAS nachgewiesen, die vom zirkulierenden RAS unabhängig sind [Bader, M. et al., 2010]. Diese lokalen RAS beinhalten alle RAS Komponenten und wurden bislang u.a. im Herz, den Blutgefäßen, in den Nieren, den Nebennieren, im Pankreas, im zentralen Nervensystem, in den Geschlechtsorganen, im Lymphsystem, im Auge und im Fettgewebe beschrieben [Thatcher, S. et al., 2009, Cuadra, A.E. et al., 2010, Vaajanen, A. et al., 2008].

1.1.2 Erweitertes Renin-Angiotensin-System

Außerdem wurden neue Elemente des RAS identifiziert (Abbildung 2). So bindet der Renin/Proreninrezeptor ((P)RR) Renin und Prorenin, ein Vorstufe des Renins. Die Funktion des (P)RRs ist noch weitgehend unklar. Man spricht ihm jedoch eine Rolle in der Embryonalentwicklung sowie in verschiedenen pathologischen Situationen (z.B. Bluthochdruck und Diabetes) zu [Nguyen, G. et al., 2010].

Neben ACE gibt es noch ein weiteres Angiotensin-konvertierendes Enzym, ACE2. Es katalysiert die Bildung von Ang-(1-9) und Ang-(1-7) aus Angiotensin I beziehungsweise Angiotensin II [Hamming, I. et al., 2007]. Angiotensin (1-7) bindet an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Mas und vermittelt Effekte wie Vasodilatation [Ferrario, C.M. et al., 1997]. Weitere Angiotensinpeptide stellen Angiotensin III, Angiotensin IV, Ang-(3-7) und Ang-(1-12) dar. Diese Angiotensinpeptide zeigen teilweise ähnliche jedoch auch gegensätzliche Effekte zu Angiotensin II [Savoia, C. et al., 2011].

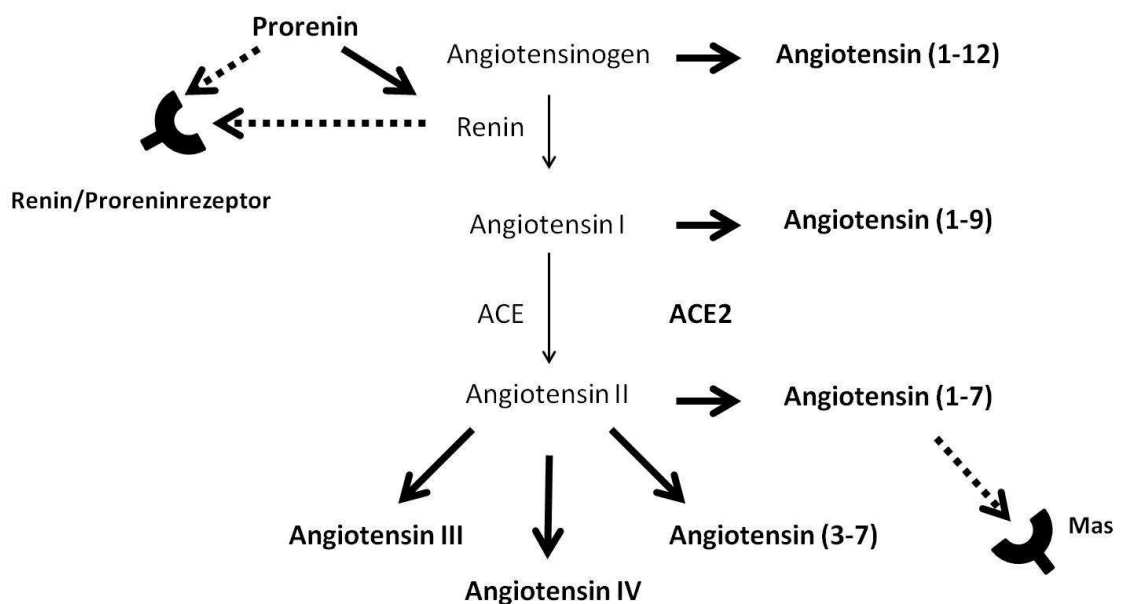


Abbildung 2: Überblick über neue Komponenten des RAS.

1.1.3 Effekte des Renin-Angiotensin-Systems

Angiotensin II spielt die Hauptrolle im zirkulierenden wie auch in lokalen RAS. Seine Wirkungen vermittelt es durch Aktivierung von Angiotensin II-Rezeptoren (siehe 1.2). Es wirkt direkt auf die glatten Gefäßmuskelzellen von Arteriolen und löst dort eine Vasokonstriktion aus. In der Niere führt eine Vasokonstriktion der efferenten Arteriole zu einer gesteigerten glomerulären Filtrationsrate (GFR). Als Folge der erhöhten Osmolarität des Plasmas wird mehr tubuläre Flüssigkeit in die peritubulären Gefäße rückresorbiert. Angiotensin II stimuliert den Natrium-Protonen-Antiporter und die

basolaterale Natrium-Kalium-ATPase im proximalen Tubulus [Geibel, J. et al., 1990]. Auf diese Weise wird die Natriumresorption gesteigert.

In der Nebenniere stimuliert es die Sekretion von Aldosteron, das den Austausch von Natrium gegen Kalium im Sammelrohr fördert. Dies führt ebenfalls zu einer gesteigerten Resorption von Wasser und Na^+ [Giacchetti, G. et al., 1996].

Angiotensin II verstärkt außerdem die Wirkung des Sympathikus durch Erhöhung der Noradrenalinfreisetzung [Saxena, P.R. et al., 1992].

Darüber hinaus bewirkt es die Stimulierung der Vasopressinsekretion im Hypophysenhinterlappen. Durch den Einbau von Aquaporinen in die apikale Plasmamembran der Sammelrohre kann Wasser in die Zirkulation reabsorbiert werden [Nielsen, S. et al., 2002]. Zusätzlich regt es die Durstzentren des Gehirns an [Culman, J. et al., 1995].

Letztendlich führen diese Effekte zu einem Anstieg des Blutvolumens und des peripheren Widerstands und damit zu einer Steigerung bzw. Stabilisierung des arteriellen Blutdrucks und zur Homöostase des Salzhaushalts [Velasquez, M.T. et al., 1996]. Die zentrale Aufgabe von Angiotensin II ist also nichts weniger als die Durchblutung lebensnotwendiger Organe bei sich ändernden physiologischen Bedingungen aufrechtzuerhalten.

1.1.3.1 Das Renin-Angiotensin-System in der Sepsis

In speziellen pathologischen Situationen bleibt jedoch dieser Mechanismus wirkungslos. So ist die Sepsis eine lebensbedrohliche Erkrankung, die mit starkem arteriellen Blutdruckabfall durch Vasodilatation und akutem Nierenversagen einhergeht [Parillo, J.E. et al., 1993]. Trotz einer Hyperaktivierung des zirkulierenden Renin-Angiotensin-Systems reicht die Wirkung von Angiotensin II nicht aus, der Vasodilatation entgegenzuwirken [Schaller, M.D. et al., 1985].

Die Hintergründe dieser verminderten vaskulären Reaktivität sind Gegenstand intensiver Forschung. Die zu beobachtende starke Vasodilatation bei einem septischen Schock liegt einer gesteigerten Expression der induzierbaren Isoform der NO-Synthase (iNOS) zugrunde [Thiemermann, C. et al., 1997]. So kommt es zur Bildung hoher NO-Spiegel. NO bewirkt, dass Myosin dephosphoryliert wird, und verhindert so eine Muskelkontraktion [Surks, H.K. et al., 1999]. Außerdem stimuliert es die Kaliumkanäle in der Plasmamembran vaskulärer glatter Muskelzellen. Ein Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanal spielt dabei möglicherweise eine Schlüsselrolle. Die Öffnung dieses Kanals bewirkt eine Hyperpolarisierung der Zelle, die eine Vasokonstriktion nicht mehr möglich macht [Jaggar, J.H. et al., 2000]. Indes spielt NO nicht die einzige Rolle, denn iNOS-defiziente

Mäuse wurden nach LPS-Injektion ebenfalls hypotensiv [Hickey, M.J. et al., 1997; MacMicking, J.D. et al., 1995]. Auch Prostaglandine, speziell Prostacyclin, werden bei Sepsis vermehrt gebildet [Wang, P. et al., 2000]. Zusammen mit einer verstärkten Expression der Angiotensin II Typ 2-Rezeptoren (1.2) können sie die Gefäßerweiterung [Maquigussa, E. et al., 2010] verstärken. Große Bedeutung wird auch zunehmend Vasopressin, das vasokonstriktorisch wirkt, sowie der verminderten Expression des Vasopressinrezeptors (V_{1A} -Rezeptor) zugeschrieben [Schmidt, C. et al., 2008]. Der Verlust der vaskulären Reaktivität scheint also von vielen Faktoren beeinflusst zu werden.

1.1.3.2 Pathologische Effekte von Angiotensin II

Eine andere Problematik tritt ein, wenn Angiotensin II zu intensiv auf die Gewebe einwirkt und sie dabei schädigt. Nach Wiederherstellung des physiologischen Gleichgewichts des Blutdrucks sowie Salz- und Wasserhaushalts geht das Renin-Angiotensin-System normalerweise in einen eher inaktiven Zustand über und die Angiotensin-Spiegel sinken wieder. Wenn Gewebe jedoch chronisch den Wirkungen von Angiotensin II ausgesetzt sind, kann dies pathologische Folgen haben. Betroffen sind hauptsächlich die vaskulären Zellen, die das Angiotensin II des zirkulierenden RAS erreicht, jedoch auch die verschiedenen Gewebe mit lokalen RAS. Angiotensin II ruft dort oxidativen Stress, Entzündungsreaktionen, Veränderung der vaskulären Reaktivität, vaskuläres Remodeling, Fibrose und Hypertrophie hervor. All dies führt zu Erkrankungen wie Bluthochdruck, Arteriosklerose, Restenose, Herzinsuffizienz und chronischen Nierenversagen [Mehta, P.K. et al., 2007].

1.1.4 Regulation des Renin-Angiotensin-Systems

Um die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems genau den physiologischen Bedürfnissen anzupassen und gleichzeitig schädliche Auswirkungen zu vermeiden, gibt es verschiedene Regulationsmechanismen. Die Abspaltung von Angiotensin I aus Angiotensinogen durch Renin ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Bildung von Angiotensin II. Hauptsächlich durch die Höhe der Reninsekretion- und -synthese in den juxtaglomerulären Zellen lässt sich dieser Schritt steuern [Persson, P. et al., 2003].

So bestimmt die Kochsalzaufnahme die Höhe der Reninausschüttung. Über die Zellen der Macula densa (MD) wird die NaCl-Konzentration im tubulären Lumen detektiert und die Information an die juxtaglomerulären Zellen weitergeleitet. So führt eine Reduktion der tubulären NaCl-Konzentration zu einer vermehrten Reninsekretion [Skott, O. et al., 1987]. Als mögliche Mediatoren kommen die Prostaganoide PGE_2 und PGI_2 , Stickstoff-

monoxid (NO) und Adenosin bzw. ATP in Frage [Friis, U.G. et al, 2005; Schweda, F. et al., 2004; Johnson, R.A. et al., 1994; Persson, P.B. et al., 1993; Weihprecht, H. et al., 1990; Brown, R. et al., 2001]. Eine vermehrte Kochsalzaufnahme führt also zu einer Hemmung des RAS, während eine kochsalzarme Ernährung eine Stimulierung des RAS auslöst.

Der Blutdruck hat ebenfalls direkten Einfluss auf die Reninsynthese und -sekretion [Wagner, C. et al., 1998]. Er spiegelt sich im renalen Perfusionsdruck wider. Eine Reduktion desselben steigert die Reninsynthese und -sekretion. Die glatten Gefäßmuskulzellen und Endothelzellen der Blutgefäße vermitteln dies über verschiedene Faktoren wie NO, Adenosin bzw. ATP, Endotheline, Prostanoiden sowie über den noch nicht identifizierten Barorezeptor [Hackenthal, E. et al., 1990].

Weiterhin werden die reninbildenden, juxtaglomerulären Zellen durch die Aktivierung von β_1 -adrenergen Rezeptoren, die sich auf benachbarten sympathischen Nervenendigungen befinden, zur Reninsekretion stimuliert [DiBona, G.F. et al., 2000]. Damit fördert auch der Sympathikus mit Hilfe von Adrenalin und Noradrenalin eine Aktivierung des RAS.

Viele weitere Signalmoleküle können die Reninsekretion beeinflussen. Allen voran inhibiert Angiotensin II selbst durch eine direkte negative Rückkopplung die Synthese und Ausschüttung von Renin. Angiotensin II bindet dabei an Angiotensin II Typ 1-Rezeptoren der JG-Zellen. Auch Vasopressin, Aldosteron und die natriuretischen Peptide ANP und BNP (*atrial natriuretic peptide*, *brain natriuretic peptide*) spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Reninsynthese und -sekretion [Hackenthal, E. et al., 1990; Castrop, H. et al., 2010].

Auf der Ebene der Reninsynthese- und -sekretion kann die Aktivität des systemischen RAS den physiologischen Gegebenheiten angepasst werden. Auf eine erhöhte Reninsekretion folgt zwangsweise eine vermehrte Bildung von Angiotensin II in der Zirkulation. Alle Gewebe, die Angiotensin II-Rezeptoren exprimieren, nehmen diesen veränderten Angiotensin II-Spiegel wahr. Sie sind also alle im gleichen Ausmaß den Auswirkungen schwankender Angiotensinkonzentrationen ausgesetzt. Damit ist durch die Regulation der Reninsekretion zwar eine Steuerung des RAS im gesamten Organismus sichergestellt, die Möglichkeit einzelner Gewebe auf diese Schwankungen im Einklang ihrer Aufgaben zu reagieren, ist jedoch nicht gegeben. Eine lokale Regulierung des RAS spielt sich auf der Ebene der Angiotensin II-Rezeptoren (siehe 1.2) ab.

1.2 Angiotensin II–Rezeptoren

Die Wirkungen von Angiotensin II werden durch Angiotensin II-Rezeptoren (AT-Rezeptoren) vermittelt. Durch die Entwicklung von spezifischen Nichtpeptid-Antagonisten wurde die Unterscheidung von mindestens zwei Angiotensin II-Rezeptor-Subtypen ermöglicht. Der Angiotensin II Typ1 (AT1) - Rezeptor besitzt eine hohe Affinität für Biphenylimidazole wie Losartan, der Angiotensin II-Typ 2 (AT2)-Rezeptor für Tetrahydroimidazopyridine wie PD123319. Beide gehören zur gleichen Superfamilie, den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [deGasparo, M. et al., 1995]. Sie unterscheiden sich jedoch in vielerlei Hinsicht. Während der AT1-Rezeptor die in 1.1 beschriebenen Effekte von Angiotensin II vermittelt und damit in der Relevanz für das RAS im Vordergrund steht, erfüllt der AT2-Rezeptor wichtige Aufgaben bereits während der Embryonalentwicklung [Grady, E.F. et al., 1991]. Nach der Geburt verringert sich die Expression des AT2-Rezeptors stark und der AT1-Rezeptor wird der vorherrschende Subtyp [Horiuchi, M. et al., 1999]. Der AT2-Rezeptor gewinnt jedoch in pathologischen Situationen (z.B. Bluthochdruck, Diabetes, Herz- und Nierenerkrankungen) an Bedeutung [Ohkubo, N. et al., 1997; Bautista, R. et al., 2001]. Grundsätzlich scheint er die vom AT1-Rezeptor vermittelten Effekte entgegenzuwirken [Steckelings, U.M. et al., 2005].

1.2.1 Der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor

Der AT1-Rezeptor wird im Menschen von einem auf Chromosom 3 lokalisierten Gen kodiert. In Nagetieren gibt es wiederum zwei Subtypen des AT1-Rezeptors, AT1a und AT1b, deren Gene sich auf Chromosom 17 bzw. 2 befinden. Die AT1a- bzw. AT1b-Rezeptoren zeigen die gleichen pharmakologischen und funktionellen Eigenschaften und stimmen in 90% ihrer cDNA-Sequenz überein. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Gewebeverteilung. In der Niere stellt der AT1a-Rezeptor die vorwiegende Form dar [Gasc, J.M. et al., 1994].

Folgende Gewebe und Organe exprimieren AT1-Rezeptoren: glatte Gefäßmuskelzellen, Leber, Niere, Herz, Lunge, Nebenniere, Hypophyse, Gehirn und Fettgewebe [deGasparo, M. et al., 1995; Cassis, L.A. et al., 1996]. In der Niere ist der AT1-Rezeptor in den proximalen und distalen Tubuli, kortikalen und medullären Sammelrohren, den glatten Gefäßmuskelzellen der arteriellen Blutgefäße, den glomerulären Mesangialzellen und Podozyten sowie in der Macula densa lokalisiert [Harrison-Bernard, L.M. et al., 1997].

Der AT1-Rezeptor besteht bei Menschen und Nagetieren aus 359 Aminosäuren, daraus berechnet sich ein Molekulargewicht von 41 kDa. Er besitzt sieben α -helikale

Transmembrandomänen. Der N-terminale Teil des AT1-Rezeptors befindet sich extrazellulär, während das C-terminale Ende ins Zytosol der Zelle ragt. Die extrazelluläre Domänen (N-Terminus und α -helikale Domänenabschnitte) beinhalten drei theoretische N-Glykosylierungsstellen und zwei Disulfidbrücken zur Stabilisierung der Struktur. Angiotensin II bindet an den AT1-Rezeptor durch Interaktion mit der N-terminalen Domäne, der ersten sowie dritten extrazellulären Schleife und Teile der Transmembrandomäne [deGasparo, M. et al., 1995]. Das intrazelluläre carboxyterminale Ende ist durch zahlreiche Serin-, Threonin- und Tyrosinreste prädestiniert für Phosphorylierungen durch die Proteinkinase C (PKC). Das C-terminale Ende spielt damit eine große Rolle bei der Signaltransduktion sowie Regulierung der Rezeptoraktivität im Rahmen der Internalisierung, der Desensibilisierung und des Trafficking [Guo, D.F. et al., 2001; Griendling, K.K. et al., 1996].

1.2.2 Intrazelluläre Signaltransduktion nach Aktivierung des AT1-Rezeptors

Die Bindung von Angiotensin II an den AT1-Rezeptor kann die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege auslösen, die schließlich zu den genannten Antworten in den Geweben führen (Abbildung 3).

Vasokonstriktorische Reaktionen werden hauptsächlich über an das C-terminale Ende gekoppelte G_{q11} -Proteine vermittelt [Brock, T.A. et al., 1985; Griendling, K.K. et al., 1986]. Diese aktivieren die Phospholipase C, die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) katalysiert. IP_3 regt die Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern an, was zur Aktivierung verschiedener Calmodulin-abhängiger Enzyme führt. Diese lösen durch Anregung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLKK) eine Phosphorylierung der leichten Myosinketten aus, die die Interaktion von Myosin mit Aktin verstärkt. Auf diese Weise kommt es in den glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Vasokonstriktion [Yan, C. et al., 2003]. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird auch direkt über die Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen erreicht. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt neben Vasokonstriktion zur Stimulierung der Aldosteronproduktion und -sekretion [Apfeldorf, W.J. et al., 1988]. Des Weiteren hemmt die Anregung eines weiteren AT1-Rezeptor-gekoppelten G-Proteins (G_{i0}) die Adenylylzyklase. Dadurch entsteht weniger cAMP, ein wichtiger *second messenger*, der Vasodilatation vermittelt. Die Fähigkeit zur Gefäßerweiterung wird in Folge dessen gestört. Dies erhöht den Grad der Vasokonstriktion.

Nicht abschließend geklärt ist der Signalmechanismus, der die Natriumresorption durch Angiotensin II über die Stimulierung des Na^+/H^+ -Antiporter und der Na^+-K^+ -ATPase

vermittelt. Es wird diskutiert, ob die Proteinkinase C eine stimulierende oder inhibierende Rolle spielt und ob die Phospholipase C sowie die Adenylylzyklase die Natriumresorption erhöhen kann [Thekkumkara, T.J. et al., 1998; Horrie, S. et al., 1992; Tse, C. et al., 1993; Middleton, J.P. et al., 1993; Douglas, J.G. et al., 1990; Schelling, J.R. et al., 1994; Carraro-Lacroix, L.R. et al., 2006].

Der durch G-Proteine vermittelte Signalweg fördert auch das Zellwachstum. DAG aktiviert die Proteinkinase C. Die durch G_{q11} -Proteine ebenfalls stimulierte Phospholipase D hält die Aktivierung der Proteinkinase C aufrecht. Diese ist am Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg beteiligt, der Wachstumsfaktoren anregt [Tsuda, T. et al., 1993]. Weitere Signalwege, die Wachstumsfaktoren aktivieren, werden von Angiotensin II angeschaltet. Über Tyrosinphosphorylierungen werden Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinasen mobilisiert, darunter die *Extracellular signal regulated kinase* (ERK1/2), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) sowie die p38-Mitogenaktivierte Proteinkinase (p38MAPK). Sie sorgen für eine gesteigerte Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und c-Fos. Ein weiterer Signalweg ist die Aktivierung von Januskinasen (JAK2) durch den AT1-Rezeptor. Sie regen wiederum STAT-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*) an, die die Transkription von Wachstumsgenen initiieren können [Marre-ro, M.B. et al., 1995]. Über Transaktivierung des *Epidermal growth factor*-Rezeptors (EGFR) regt Angiotensin II ebenfalls Signalwege an, die Wachstumsfaktoren stimulieren [Kagiyama, S. et al., 2002]. Die verstärkte Aktivierung der Wachstumsfaktoren hat letztendlich Veränderungen in der Zelldifferenzierung, Proliferierung, Migration und Adhäsionseigenschaften zur Folge [Sugden, P.H. et al., 1997; Taniyama, Y. et al., 2004]. Mögliche Folgen sind Krankheiten wie Bluthochdruck und Gefäßschädigungen.

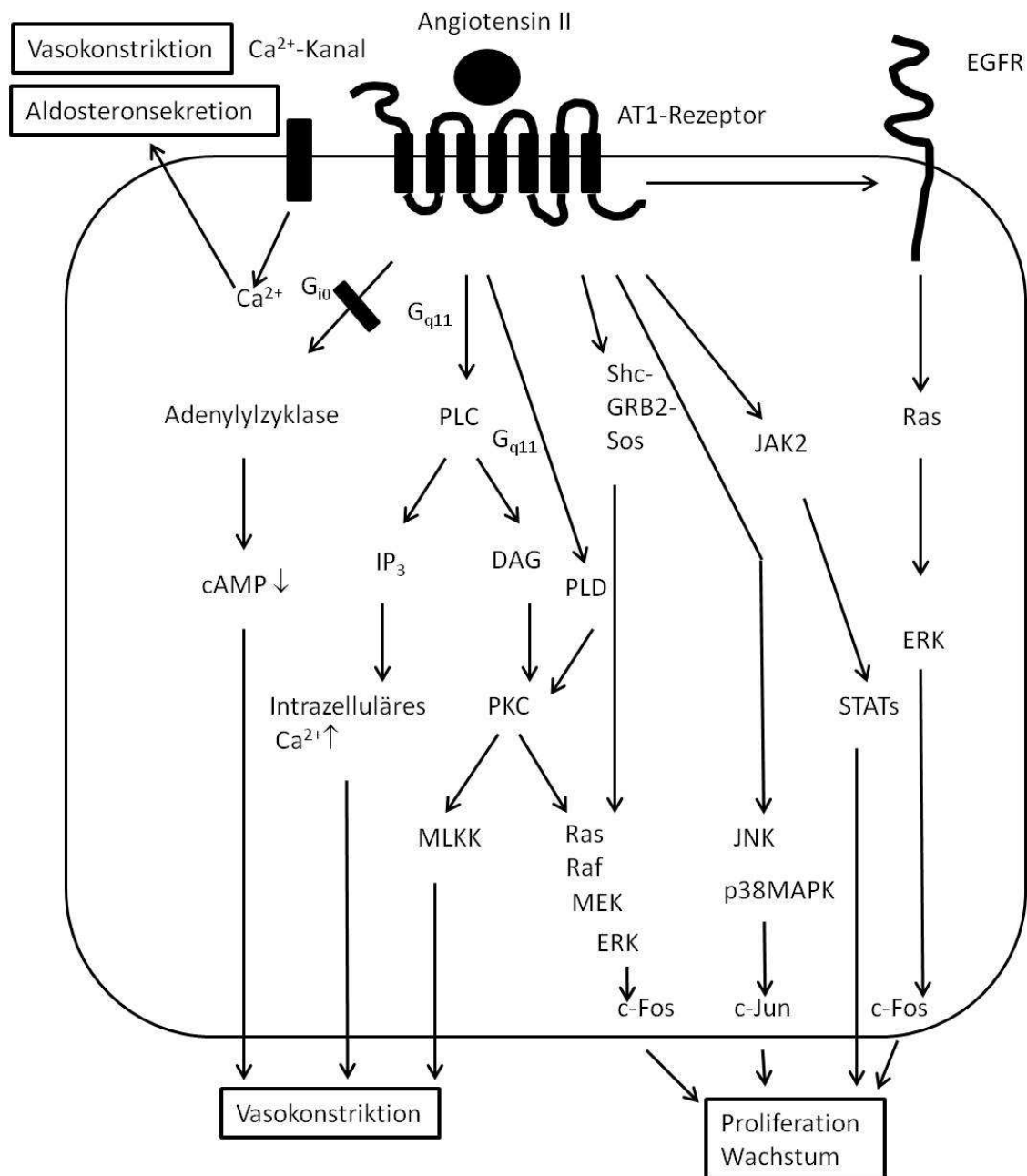


Abbildung 3: Intrazelluläre Signaltransduktion nach Aktivierung des AT1-Rezeptors. G_{q11}: G-Protein mit Phospholipase C als Effektor; G_{i0}: inhibitorisches G-Protein; PLC: Phospholipase C; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; IP₃: Inositoltrisphosphat; DAG: Diacylglycerin; PKC: Proteinkinase C; MLKK: Myosin-Leichte-Ketten-Kinase; MEK: Mitogen-aktivierte Kinase Kinase; ERK: *Extracellular signal regulated kinase*; PLD: Phospholipase D; Shc-GRB2-Sos: Proteinkomplex mit *Src homology and collagen, growth factor receptor-bound 2* und *Son of Sevenless*; JNK: c-Jun N-terminale Kinase; p38-MAPK: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; JAK: Januskinase; STAT: *signal transducers and activators of transcription*; EGFR: *epidermal growth factor-Rezeptor*; c-Fos, c-Jun: Transkriptionsfaktoren im Zellkern.

1.2.3 Regulation des AT1-Rezeptors

Die zentrale Bedeutung der AT1-Rezeptoren bewirkt, dass eine Regulation ihrer Aktivität tiefgreifende Auswirkungen auf das RAS zur Folge hat. Da sie darüber hinaus die wichtigsten letzten Stellglieder des RAS darstellen, birgt eine Regulierung auf Ebene der AT1-Rezeptoren die Möglichkeit, die Wirkung von Angiotensin II gezielt in den einzelnen Geweben zu modulieren, statt die Konzentration von Angiotensin II der gesamten Zirkulation zu verändern. Auf diese Weise haben Gewebe die Fähigkeit, unabhängig voneinander und je nach Bedarf, auf Angiotensin II zu reagieren, und so auch schädliche Folgen aufgrund chronischer Einwirkung von Angiotensin II zu vermeiden.

Dabei steht die Desensibilisierung der Zelle für Angiotensin II im Mittelpunkt. Diese Mechanismen spielen sich sowohl transkriptionell, posttranskriptionell, aber auch posttranslational ab. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Genexpression von AT1-Rezeptoren. So bewirkt die orale Salzaufnahme eine Modulation der Rezeptorexpression, die womöglich in Abhängigkeit der Gewebeart variabel sein kann [Schmid, C. et al., 1997; Lehoux, J.G. et al., 1993]. Ein zentraler Regulator ist Angiotensin II selbst, jedoch spielen auch mehrere Wachstumsfaktoren eine Rolle [Gunther, S. et al., 1982; Guo, D.F. et al., 1994]. Insgesamt beeinflussen sie die Syntheserate der AT1-Rezeptoren und damit die Rezeptordichte.

Posttranskriptionell kann die Stabilität der mRNA vermindert werden, es wurde gezeigt, dass auch hier Angiotensin II und Wachstumsfaktoren wie EGF mitwirken [Nickenig, G. et al., 1994].

Große Bedeutung hat die posttranslationale Regulierung des AT1-Rezeptors, denn sie ermöglicht oft eine unmittelbarere Reaktion auf sich ändernde äußere Bedingungen. Ein erster Schritt ist häufig, wie bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) üblich, die Phosphorylierung des C-terminalen Teils des AT1-Rezeptors. Nach Bindung von Angiotensin II phosphorylieren GPCR-Kinasen (GRK 2 und 5) sowie die PKC vor allem Serinreste des intrazellulären C-terminalen Abschnitts des Rezeptors. Dies hat zur Folge, dass G-Proteine nicht mehr an die betroffenen Sequenzen koppeln können und so die Signaltransduktion unterbrochen wird [Oppermann, M. et al., 1996, Smith, R.D. et al., 1998]. Damit sind die AT1-Rezeptoren zwar noch auf der Zelloberfläche exprimiert, die Wirkung von Angiotensin II wird aber nicht mehr ins Zellinnere weitergeleitet.

Ein weiteres Phänomen, das für GPCRen typisch ist, ist die Internalisierung nach Bindung des Liganden (Abbildung 4). So bewirkt Angiotensin II die Endozytose des AT1-Rezeptors. Dabei wird der gesamte Agonist-Rezeptor-Komplex ins Innere der Zelle aufgenommen. Dies geschieht über *Clathrin-coated* Vesikel. Bindungsmotive für

Adaptorproteine, die eine clathrin-vermittelte Endozytose ermöglichen, wurden im C-terminalen Abschnitt und in der dritten intrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors identifiziert [Hunyady, L. et al., 1994; Thomas, W.T. et al., 1995]. Dieser Komplex dissoziiert daraufhin. Angiotensin II erreicht die Lysosomen und wird abgebaut, während der AT1-Rezeptor wieder zur Plasmamembran zurücktransportiert wird. Internalisierung und Rücktransport stehen dabei in einem Gleichgewicht [Hein, L. et al., 1997]. Auf diese Weise ist die Oberflächenexpression der AT1-Rezeptoren modulierbar. Ob der Internalisierung eine Dimerisierung der AT1-Rezeptoren vorausgeht, ist noch nicht geklärt [Guo, D.F. et al., 2001]. Im Rahmen der Internalisierung, die bei AT2-Rezeptoren unbekannt ist, ist es möglich, die Zahl der aktiven Rezeptoren in der Plasmamembran zu steuern und so die Wirkintensität von Angiotensin II unmittelbar zu beeinflussen. In mehreren Studien wurden rezeptor-assoziierte Proteine mit solchen Regulatoreigenschaften in Verbindung gebracht (siehe 1.3).

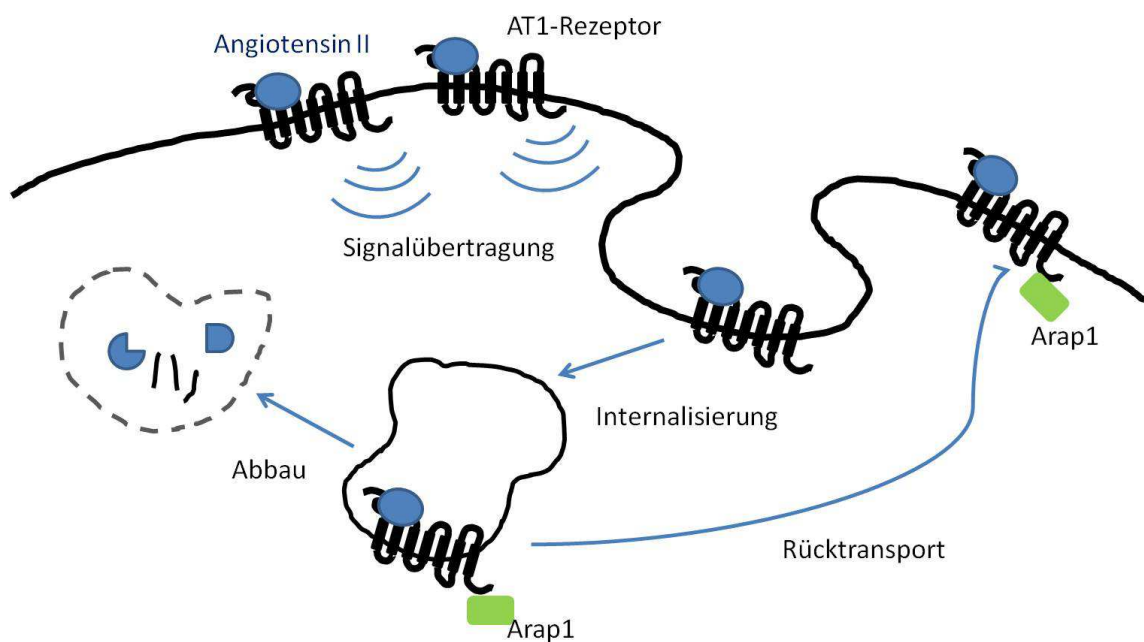


Abbildung 4: Schema zur Internalisierung des AT1-Rezeptors mit Beispiel eines Rezeptor-assoziierten Proteins (Arap1, siehe 1.3.2).

1.3 Angiotensin II–Rezeptor–assoziierte Proteine

Wie bereits oben ausgeführt, ist der C-terminale intrazelluläre Abschnitt des AT1-Rezeptors eine für die Funktion zentrale Domäne, mit der zahlreiche Signalproteine der Zelle wechselwirken. Aus diesem Grund suchen viele Forschergruppen nach weiteren Interaktionspartnern. Mittlerweile sind mit Hilfe der Yeast-2-Hybrid-Technik einige neue

Angiotensin II-Rezeptor-assoziierte Proteine entdeckt worden. Die Funktion von ATRAP (AT1-Rezeptor-assoziiertes Protein), Arap1 (Angiotensin II-Rezeptor-assoziiertes Protein 1), GABARAP (γ -Aminobuttersäure [GABA] Rezeptor-assoziiertes Protein), EP24.15 (EC 3.4.24.15., thimet Oligopeptidase) und CD74 (invariante Kette) ist Gegenstand intensiver Forschung.

1.3.1 ATRAP

ATRAP ist eines der am besten charakterisierten unter den AT1-Rezeptor-assoziierten Proteinen. Es ist ein kleines 18 kDa-Transmembranprotein und bindet an 20 Aminosäuren (Reste 339-359) des C-terminalen Abschnitts des AT1-Rezeptors [Daviet, L. et al., 1999; Mogi, M. et al., 2009]. ATRAP wird in vielen Geweben exprimiert, wie in der Aorta, im Herz, in der Lunge und vor allem in der Niere. Hier kolokalisiert ATRAP und der AT1-Rezeptor hauptsächlich in den proximalen Tubuli des Kortex [Tsurumi, Y. et al., 2006; Oppermann, M. et al., 2010]. Es konnte gezeigt werden, dass ATRAP als negativer Regulator der AT1-Rezeptor-vermittelten Reaktionen wirkt [Lopez-Illasaca, M. et al., 2003]. Indem es die Internalisierung des Rezeptors ins Zytosol antreibt, verringert es die Zahl der aktiven Rezeptoren an der Zelloberfläche und reduziert auf diese Weise die Wirkung von Angiotensin II auf die Zelle [Cui, T.X. et al., 2000]. *In-vitro* konnte dargestellt werden, dass durch die vermehrte Internalisierung die Aktivierung von Signalmolekülen (z.B. MAPK, c-fos) gehemmt und das Zellwachstum reduziert wird. Auf diese Weise kann ATRAP die durch chronische Einwirkung von Angiotensin II ausgelösten Folgen wie vaskuläres Remodeling und Hypertrophie entgegenwirken [Tanaka, Y. et al., 2005; Azuma, K. et al., 2007]. Diese Funktionen konnten auch *in-vivo* mit Hilfe einer transgenen Mauslinie bewiesen werden [Oshita, M.I. et al., 2006]. Des Weiteren wurde durch Untersuchung einer ATRAP-defizienten Mauslinie geklärt, dass ATRAP im tubulären System in der Niere die Salzreabsorption durch die Interaktion mit dem AT1-Rezeptor moduliert und damit den Volumenstatus sowie Blutdruck kontrolliert [Oppermann, M. et al., 2010]. Wie genau ATRAP die Internalisierung des AT1-Rezeptors katalysiert, wird derzeit erforscht.

1.3.2 Arap1

Guo et al. identifizierte ein weiteres Angiotensin II-Rezeptor-assoziiertes Protein, Arap1. Es besteht aus 493 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 57 kDa. Arap1 zeigt in einem Abschnitt (Reste 95 bis 202) eine große Sequenzübereinstimmung mit dem Hefeprotein PEP12. PEP12 wirkt als Transportmittel für Proteine zwischen Golgi und den Vakuolen [Becherer, K.A. et al., 1996; Darsow, T. et al., 1998]. Zwischen den Aminosäureresten 319 und 359 findet die Bindung des AT1-Rezeptors

statt. Mit Hilfe einer Radioligand-Bindungsstudie wurde *in-vitro* gezeigt, dass Arap1 in Gegenwart von Angiotensin II die AT1-Rezeptordichte in der Plasmamembran erhöht. Dabei ist die Internalisierung des Rezeptors nicht gestört. Stattdessen scheint Arap1 das Gleichgewicht zwischen Internalisierung und Rücktransport zur Plasmamembran in Richtung Rücktransport zu verschieben. Auch durch immunzytochemische Färbungen konnte veranschaulicht werden, dass bei Überexpression von Arap1 der AT1-Rezeptor nach Bindung von Angiotensin II und Internalisierung schneller wieder zur Plasmamembran wandert als in Abwesenheit von Arap1 [Guo, D.F. et al., 2003]. Transgene Mäuse, die Arap1 im proximalen Tubulus überexprimieren, leiden an Bluthochdruck und Nierenhypertrophie [Guo, D.F. et al., 2006]. Dies impliziert, dass Arap1 als positiver lokaler Regulator des Renin-Angiotensin-Systems wirken könnte und damit einen Gegenspieler zu ATRAP darstellt. Arap1 wird zwar in der Niere exprimiert, allerdings ist nicht geklärt, ob Arap1 im proximalen Tubulus lokalisiert ist.

1.3.3 Weitere Interaktionsproteine

Weitere AT1 Rezeptor-assoziierte Proteine sind GABARAP und EP24.15. GABARAP soll die AT1-Rezeptordichte in der Plasmamembran ebenfalls positiv beeinflussen [Cook, J. et al., 2008]. EP24.15 spielt möglicherweise eine Rolle bei der Dissoziation von Angiotensin II und AT1-Rezeptor nach deren Internalisierung als Agonist-Rezeptor-Komplex (siehe 1.2) [Shivakumar, B.R. et al., 2005]. Ein weiteres Protein, CD74, interagiert mit dem C-terminalen Teil des AT1-Rezeptors. Es soll in den Transport des AT1-Rezeptors aus dem ER eingreifen, und kann bereits durch Störung des Sekretionsweges des AT1-Rezeptors die Rezeptordichte der Plasmamembran beeinflussen [Szaszák, M. et al., 2008]. Genauere Klärung der Lokalisierung und funktionellen Relevanz dieser Proteine wird noch erwartet.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Da bei einer Steigerung der Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems, beispielsweise aufgrund eines verminderten renalen Perfusionsdrucks oder Salz Mangels, vermehrt Renin über die JG-Zellen in die Zirkulation abgegeben wird, sind alle Gewebe, die Angiotensin II-Rezeptoren exprimieren, hohen Angiotensin II-Spiegeln ausgesetzt. Trotzdem reagieren nicht alle Gewebe gleich stark auf eine Erhöhung der Angiotensin II-Konzentration in der Zirkulation. So führt eine salzreduzierte Diät trotz erhöhter Reninsekretion und damit hoher Plasma-Angiotensin II-Spiegeln nicht zu einer Erhöhung des Blutdrucks [Oliverio, M.I. et al., 2000]. Folglich muss es in den verschiedenen Geweben Mechanismen geben, die die Wirkintensität von Angiotensin II unabhängig

und lokal steuern können. Im Hinblick auf die schädlichen Auswirkungen bei chronischer Angiotensin II-Einwirkung auf Gewebe, sind solche Systeme unverzichtbar. Angiotensin II Rezeptor-assoziierte Proteine könnten durch ihren Einfluss auf die Oberflächenexpression der AT1-Rezeptoren für eine lokale Regulation des RAS relevant sein. Darunter hat auch Arap1 das Potential als lokaler Regulator des RAS zu wirken. Arap1 kann *in-vitro* die AT1-Rezeptordichte erhöhen und auf diese Weise die Reaktion der Zelle auf Angiotensin II intensivieren. Mit dieser Eigenschaft könnte es als Gegenspieler zu ATRAP gelten, das die Oberflächenexpression der AT1-Rezeptoren verringert.

Ziel dieser Arbeit ist zu klären, ob Arap1 tatsächlich für die lokale Regulation des Renin-Angiotensin-Systems, über die Steuerung der Oberflächenexpression der AT1-Rezeptoren einer Zelle, *in-vivo* relevant ist. Dazu soll die Lokalisierung von Arap1, mit Fokus auf die Niere, bestimmt werden. Weiterhin soll überprüft werden, ob die Expression von Arap1 reguliert wird und im möglichen Zusammenhang mit der Aktivität des RAS steht. Des Weiteren soll die Expression von Arap1 in der Sepsis, als Beispiel einer pathologischen Situation untersucht werden, in der die Regulationsmechanismen des RAS wirkungslos bleiben.

2 Methoden

2.1 Bestimmung der Arap1-mRNA-Expression durch quantitative Echtzeit-PCR

Für die Isolierung der RNA aus den Organen der Maus und den glomerulären Mesangialzellen der Ratte wurde Trizol (peqGold TriFast, peqlab) verwendet. Um die Expression von Arap1 in den Nierenzonen zu untersuchen, wurden sowohl Mausnieren als auch humane Nieren mikrodissiziert. Dabei wurde die Niere in Kortex, äußere Medulla äußerer Streifen, äußere Medulla innerer Streifen und innere Medulla unterteilt. RNA aus Nieren eNOS-defizienter Mäuse wurde von Boye Jensen (Institut für Medizinische Biologie, Physiologie und Pharmakologie, Universität Süddänemark, Odense, Dänemark) bereitgestellt. Nach reverser Transkription (M-MLV-RT, Invitrogen) wurde die komplementäre DNA (cDNA) für die quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt. Dafür wurde das Light-Cycler System von Roche (Roche, Mannheim, Deutschland) mit verschiedenen Primern (siehe unten) eingesetzt. Die Arap1-mRNA-Expressionsdaten wurden anschließend an die β -Aktin oder GAPDH mRNA Expression normiert. Folgende Oligonukleotid-Primer wurden verwendet: Maus/Ratte Arap1 sense 5'-ccagaaagcgagtactataagctgc-3'; Maus Arap1 antisense 5'-cttagtggaaggtgtggggttg-3'; Ratte Arap1 antisense 5'-cttaatggaaagtgtggggttg-3'; Mensch Arap1 sense 5'-gtgactcctttacatggcacaac-3'; Mensch Arap1 antisense 5'-cttagtggaaggtgtggggttcgg-3'; β -Aktin sense 5'-ccgccctaggcaccagggtg-3'; β -Aktin antisense 5'-ggctggggtgtgaaggtctcaaa-3'; GAPDH sense 5'-tcattgacctcaactacat-3'; GAPDH antisense 5'-gaggggccatccacagtctt-3'.

2.2 Bestimmung der Arap1-Protein-Expression durch Western Blotting

Durch Western Blotting wurde Arap1-Protein in der Niere und in den glomerulären Mesangialzellen bestimmt und quantifiziert. Die Durchführung erfolgte nach einem Standardprotokoll. Das Gesamtprotein aus der Niere wurde durch Homogenisierung mit RIPA Puffer (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% NP40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS), der kurz vor Gebrauch mit 0,1 M PMSF versetzt wurde, gewonnen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand bei -80°C gelagert. Um aus den kultivierten glomerulären Mesangialzellen Gesamtprotein zu isolie-

ren, wurden nach zwei Waschschritten mit PBS die Zellen in RIPA Puffer/0,1 M PMSF aufgenommen. Darin wurden die Zellen eine Stunde lang bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch zwei Zentrifugationsschritte bei 4°C gewaschen. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden über die BCA (*bicinchoninic acid*)-Methode bestimmt (BCA Protein assay Kit, Pierce), mit BSA als Standard. Es wurden 200 µg des Gesamtproteins der Mausniere und 25 µg des Gesamtproteins aus glomerulären Mesangialzellen auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Elektrophorese wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (Transfer-Blot Transfer Medium, Biorad). Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubation über Nacht in TBS-Puffer mit Magermilch blockiert. Schließlich wurde die Membran mit dem anti-Arap1 Antikörper (AF1444, R&D systems, 1:500) 2 Stunden inkubiert und weitere 2 Stunden mit einem sekundären an eine Peroxidase gekoppelten anti-goat Antikörper (donkey anti-goat IgG, Santa Cruz, 1:2000). Mit Hilfe des ECL-Western Blotting-Substrats (Pierce) wurde das Arap1-Protein detektiert und auf einen Röntgenfilm abgebildet. Die Proteinmenge wurde über die Quantifizierung der Bandenstärke mit der Software Bio1D (Vilber Lourmat) bestimmt.

2.3 Immunhistochemie

Für die Lokalisierung von Arap1-Protein durch Immunhistochemie wurden Gewebeschnitte der Maus und des Menschen verwendet. Zur Fixierung des Mausgewebes wurden narkotisierte Mäuse mit 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS über die abdominale Aorta perfundiert. Die Organe wurden entnommen und in Paraffin eingebettet. Schließlich wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt und entparaffiniert. Die Schnitte wurden in 1% BSA/PBS blockiert und anschließend über Nacht mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet und in 10% Horse serum/1% BSA/PBS verdünnt: rabbit anti-Arap1 IgG (HPA040933, Atlas Antibodies, 1:1000), goat anti-Desmin IgG (sc7559, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), mouse anti- α -Aktin IgG (1144, Immunotech, 1:200), goat anti-CD31 IgG (AF 3628, R&D systems, 1:100), chicken anti-renin IgG (Davids Biotechnology, 1:400) und goat anti-aquaporin-2 IgG (sc-9882, Santa Cruz Biotechnology, 1:200). Zur Detektion wurden die Schnitte mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (Cy2-, Cy5-, TRITC-konjugierte anti-rabbit, anti-goat, anti-mouse bzw. anti-chicken IgGs, Dianova, 1:400) inkubiert. Für die Analyse wurde ein Axiovert 200M Mikroskop (Zeiss) verwendet. Als Negativkontrolle wurden Schnitte ohne primären Antikörper gefärbt.

2.4 Menschliche Gewebeproben

Das untersuchte menschliche Nierengewebe stammte aus Patienten, die einer einseitigen Nephrektomie aufgrund eines Nierentumors unterzogen wurden. Das Gewebe selbst war nicht vom Tumor befallen. Alle Patienten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an Studien ab. Vor der Operation wurden sie weder durch Chemotherapie noch Bestrahlung behandelt. Die Patienten waren zwischen 50 und 75 Jahre alt. Die Nutzung des humanen Nierengewebes wurde durch die Ethikkommission in Süddänemark bewilligt (approval # 20010035). Die Nieren wurden in der Abteilung für Urologie entnommen und sofort an die Abteilung für Klinische Pathologie des Universitätsklinikums Odense transportiert. Der Transport dauerte 15 bis 20 Minuten, währenddessen wurden die Proben gekühlt. Anschließend wurden die Nieren mikrodissiziert. Alternativ wurden das Gewebe in Paraffin eingebettet und in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte nach Entparaffinierung in Natriumcitratpuffer (pH 6) 15 Minuten bei 95°C demaskiert.

2.5 Tierexperimente

Die folgenden Experimente wurden mit männlichen Wild-Typ-Mäusen im Alter von 8 bis 10 Wochen durchgeführt. Sie sollten einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Regulierung der Arap1-Expression und verschiedenen Aktivitätszuständen des Renin-Angiotensin-Systems aufklären. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob und wie die Expression von Arap1 in der Sepsis reguliert wird.

2.5.1 Salzdiäten

Eine Gruppe von sechs Mäusen bekam 7 Tage lang Futter mit entweder hohen (4% NaCl [w/w]) oder niedrigen Salzgehalt (0,02% NaCl [w/w], Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest), während eine Kontrollgruppe Standardfutter (0,6% NaCl [w/w]) erhielt.

2.5.2 Wassermangel

Mäuse hatten 48 Stunden lang keinen Zugang zu Wasser. Die Kontrollgruppe war hingegen mit ausreichend Wasser versorgt (n = 6).

2.5.3 Unilaterale Nierenarterienstenose (*2-kidney-1-clip-model*)

Mäusen (n = 6) wurde, wie in Schweda et al. (2009) beschrieben, eine unilaterale Nierenarterienstenose zugefügt. Nach Narkotisierung mit Sevofluran wurde den Mäusen die linke Niere freigelegt. Die Nierenarterie wurde von der Nierenvene und umliegen-

den Gewebe befreit. Mit einem Silberclip (0,11 mm Innendurchmesser) wurde der Blutfluss durch die Nierenarterie reduziert. Die gleiche Prozedur wurde mit den sham-operierten Mäusen durchgeführt, nur ohne Einsatz eines Clips. Nach 20 Stunden wurden die Nieren entnommen.

2.5.4 Chronische Infusion von Angiotensin II mit Hilfe osmotischer Minipumpen

Mäusen wurde chronisch Angiotensin II über osmotische Minipumpen (model 1002, Alzet, Charles River) verabreicht. Die osmotischen Minipumpen wurden mit in Trägerlösung (Vehikel: 300 mM NaCl, 1 mM Eisessig) gelösten Angiotensin II (2 µg/min/kg Angiotensin II, Sigma-Aldrich) befüllt. Des Weiteren wurden osmotischen Minipumpen mit Lösungsmittel ohne Angiotensin II befüllt. Die Pumpen wurden subkutan unter Sevoflurannarkose Mäusen implantiert (n = 10). Die Funktion der osmotischen Minipumpen wurde durch Blutdruckmessung mit Hilfe eines *tail-cuff* Manometers kontrolliert.

2.5.5 Behandlung mit dem AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan

Eine Gruppe von 5 Mäusen wurden über 7 Tage hinweg mit dem AT1-Rezeptorantagonisten Losartan behandelt. Dafür wurde Losartan ins Trinkwasser gegeben (30 mg/kg/d, Sigma-Aldrich). Eine Kontrollgruppe bekam reines Leitungswasser.

2.5.6 Behandlung mit Hydralazin

Mäuse bekamen über das Trinkwasser den Vasodilator Hydralazin verabreicht. Dazu wurde 3 Tage lang täglich Wasser mit Hydralazin (50 mg/kg/d) bereitgestellt. Eine Kontrollgruppe trank Leitungswasser ohne Zusätze (n = 4).

2.5.7 Cecal Ligation and Puncture (CLP)

In Mäusen wurde nach Höcherl et al. (2010) durch CLP Sepsis induziert. Dabei wurden Mäuse mit Sevofluran narkotisiert, der Blinddarm freigelegt und eine seidene Ligatur nahe der Blinddarmspitze angelegt. Der Blinddarm wurde mit einer 18-gauge Nadel punktiert, so dass der Inhalt freigesetzt wurde. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse sham-operiert. Dabei wurden die Mäuse der gleichen Prozedur ohne CLP unterzogen. Nach Vernähen der Wunde wurde den Mäusen subkutan 1 ml Kochsalzlösung injiziert. Außerdem erhielten sie 0,05 mg/kg Buprenorphin subkutan. Nach 6, 12 bzw. 20-24 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Organe entnommen (n = 4).

2.5.8 Injektion von Lipopolysacchariden (LPS)

Mäusen wurde LPS aus *Escherichia coli* (10 mg/kg, Sigma) injiziert. Nach 3, 6 bzw. 12 Stunden wurden die Tiere getötet und die Organe entnommen. Die Kontrollgruppe bestand aus unbehandelten Tieren ($n = 3$).

2.6 *In-vitro* Experimente

Zur genaueren Analyse der Mechanismen, die für die Regulation der Arap1-Expression verantwortlich sind, wurden Experimente mit kultivierten glomerulären Mesangialzellen der Ratte durchgeführt. Die Zelllinie wurde von Dr. Eberhard (Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main) bereitgestellt. Sie exprimieren endogen Arap1 sowie die Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2. Die Zellen wurden wie in Pfeilschifter et al. (1991) beschrieben kultiviert. Für das Medium wurde RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH) mit 10% Kälberserum (FCS, Invitrogen), Penicillin-Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml, Biochrom) und 0,66 U/ml Insulin (Sigma-Aldrich) versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur RNA-Isolierung wurden die Zellen in 12er-Wells, für die Proteingewinnung in 6er-Wells ausgesät. Einen Tag vor den Versuchen wurde das Medium ausgetauscht und mit RPMI 1640 mit 0,5% FCS, 0,66 U/ml Insulin ohne Penicillin-Streptomycin ersetzt.

2.6.1 Inkubation mit Angiotensin II

Um den Effekt von Angiotensin auf die Arap1-Expression in den kultivierten glomerulären Mesangialzellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit 0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ und 10⁻⁴ mol/L Angiotensin II (Sigma-Aldrich) versetzt. Nach unterschiedlicher Inkubationsdauer (0 bis 16 Stunden) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Trizol (peqGold TriFast, peqlab) aufgenommen und bei -80°C bis zum Gebrauch (2.1) aufbewahrt ($n = 6$). Zur Proteinpräparation wurden die Zellen in RIPA-Puffer aufgenommen (siehe 2.2).

2.6.2 Koinkubation mit Angiotensin II mit Losartan und PD123319

Für die Identifizierung des Angiotensin-Rezeptors, der über Angiotensin II die Expression von Arap1 reguliert, wurden die Rezeptorantagonisten für den AT1-Rezeptor Losartan (10⁻⁴ M, Sigma-Aldrich) und den AT2-Rezeptor PD 123319 (10⁻⁶ M, Sigma-Aldrich) eingesetzt. Sie wurden 45 Minuten vor der Zugabe von Angiotensin II (10⁻⁴ bzw. 10⁻⁵ M) zu den Zellen gegeben. Als Kontrollen wurden Zellen weder mit Angiotensin II noch mit Losartan oder PD 123319 sowie Zellen nur mit Angiotensin II

(10^{-4} bzw. 10^{-5} M) inkubiert. Nach zwanzig Stunden wurden die Zellen geerntet ($n = 6$) (siehe 2.6.1).

2.6.3 Inkubation mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat ist ein Aktivator der Proteinkinase C. Um eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase C aufzuklären, wurden Mesangialzellen mit 10^{-7} und 10^{-5} M PMA (Sigma-Aldrich) für 20 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden Zellen mit Angiotensin II versetzt (10^{-6} M). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen ($n = 6$).

2.6.4 Inkubation mit Zytokinen

Um die Wirkung von Zytokinen auf die Arap1-Expression *in-vitro* zu untersuchen, wurden Zellen mit einem Zytokin-Mix versetzt. Dabei wurden ein Gemisch von 50 ng/ml Interleukin-1 β (IL-1 β), 100 ng/ml Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und 100 ng/ml Interferon- γ (INF- γ) verwendet ($n = 12$). In einem weiteren Experiment wurden die oben aufgeführten Zytokine separat zu den Zellen pipettiert ($n = 4$). Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen. Die Zellen wurden nach 20 Stunden geerntet.

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisierung der Expression von Arap1 in der Maus und im Menschen

3.1.1 Expression von Arap1 auf mRNA-Ebene

Um die Organverteilung der Arap1-Expression in der Maus auf mRNA-Ebene zu analysieren, wurde die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR verwendet. Arap1 wurde in verschiedenen Organen der Maus exprimiert (Abbildung 5). Dabei stellte das Herz den Ort mit höchster Arap1-Expression dar, gefolgt von den Nieren und der thorakalen sowie abdominalen Aorta. Weitere Organe mit geringerer Arap1-Expression waren die Nebennieren, die Leber, die Lunge, die Hoden, die Milz und der Skelettmuskel. Noch etwas geringer fiel die Expression im Gehirn und im Darm aus.

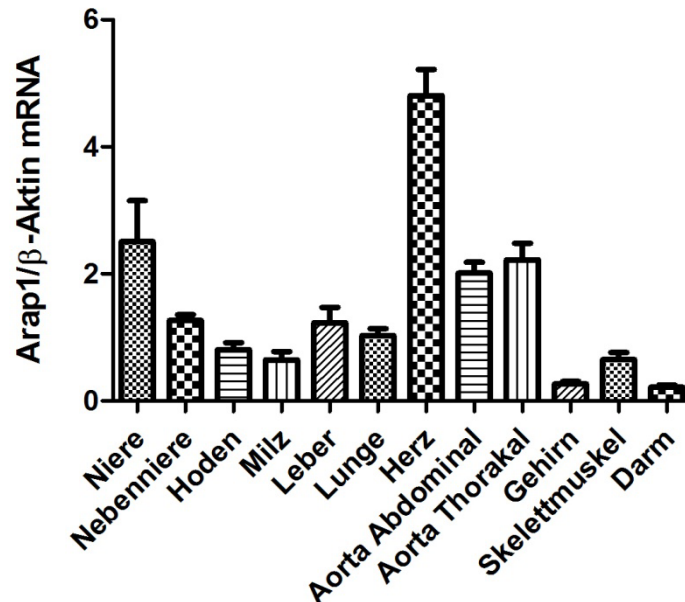


Abbildung 5: Arap1-mRNA-Expression in verschiedenen Organen der Maus. Daten wurden durch Anwendung der quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt und sind als relative Werte im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 5$).

Für eine genauere Lokalisierung der renalen Expression, wurden Nieren mikrodissiziert und die Arap1-Expression in den Nierenzonen vermessen. Dabei zeig-

te sich ein Gradient mit abfallender Expressionsrate entlang der kortiko-medullären Achse. So war die Expression im Kortex um $59\pm 4\%$ höher als im äußeren Streifen der äußeren Medulla, um $40\pm 10\%$ höher als im inneren Streifen der äußeren Medulla und $130\pm 7\%$ höher als in der inneren Medulla (Abbildung 6).

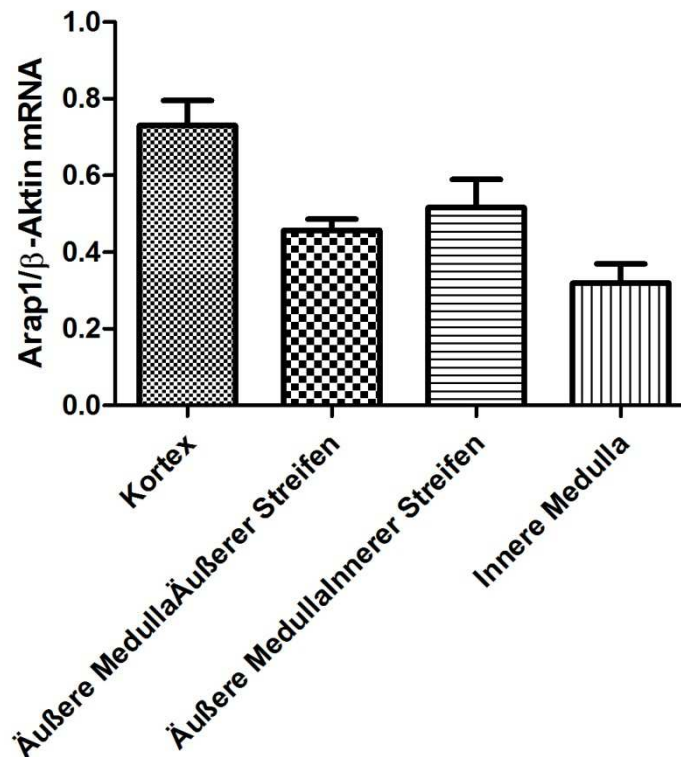


Abbildung 6: Arap1-mRNA-Expression in mikrodisssezierten Nierenzonen der Maus. Daten wurden durch quantitative Echtzeit-PCR bestimmt und sind als relative Werte im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 5$).

In humanen Nieren konnte Arap1-mRNA ebenfalls in allen Nierenzonen detektiert werden. Es ergab sich ein ähnliches Expressionsmuster wie in der Mausniere.

3.1.2 Expression von Arap1 auf Proteinebene

Die Lokalisierung der Arap1-Expression auf Proteinebene wurde in der Niere durch Immunhistochemie durchgeführt.

3.1.2.1 Expression von Arap1-Protein in der Mausniere

Auf Paraffinschnitten der Mausniere wurde mit Hilfe eines Arap1-spezifischen Antikörpers in Kombination mit spezifischen Gewebemarkern die Expressionsorte von Arap1

identifiziert. Abbildung 7 zeigt die negative Färbung des Arap1-Antikörpers auf Nierenschnitten von Arap1-defizienten Mäusen.

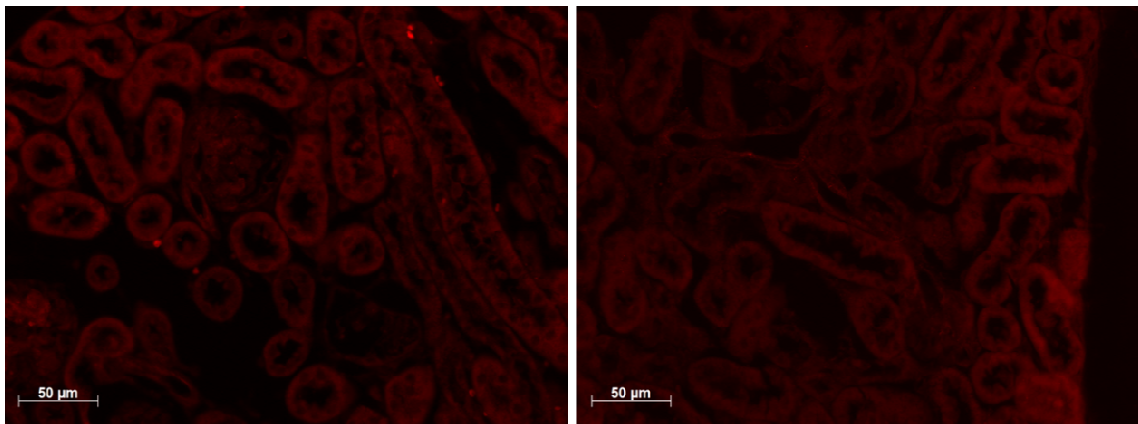


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung von renalen Paraffinschnitten einer Arap1-defizienten Maus.

Es zeigte sich ebenfalls, dass Arap1 größtenteils im Kortex exprimiert wurde (Abbildung 8 A) und zu einem geringeren Anteil in der Medulla (Abbildung 8 B).

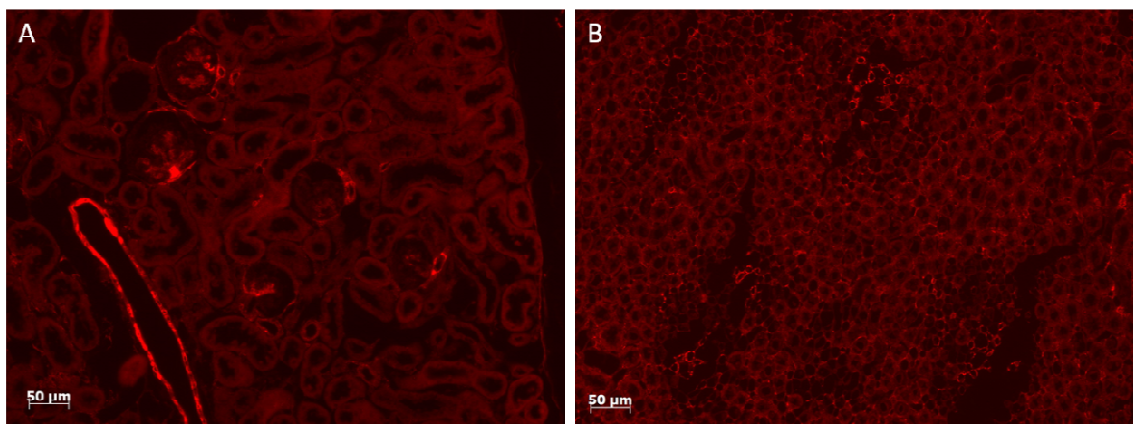


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein (rot) in der Mausniere: A) Cortex, B) Medulla.

Im Kortex legte die Kofärbung mit dem Marker für glatte Gefäßmuskelzellen, anti- α -Aktin, dar, dass Arap1 (rot) mit α -Aktin (blau) kolokalisierte. Das heißt, die glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten Arap1 (Abbildung 9 A, B, C). Bei Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle erschienen die Blutgefäße daher rosa (Abbildung 9 C). Es war zu erkennen, dass kleine Widerstandsgefäße wie afferente Arteriolen sowie große kortikale Blutgefäße Arap1 exprimierten (Abbildung 8 und Abbildung 9).

Das Endothel der Blutgefäße zeigte jedoch keine Expression von Arap1. Die Färbung mit anti-Arap1 (rot) überlappte nicht mit der des Endothelmarkers anti-CD31 (grün) (Abbildung 9 J, K, L; Pfeil). Auch in den renin-positiven juxtaglomerulären Zellen wurde Arap1 nicht gebildet. Der Antikörper gegen Renin (blau) und Arap1 (rot) färbten unterschiedliche Zellen an. So kam es zu keiner Überlappung (Abbildung 9 D, E, F). Arap1 färbte deutlich die Glomeruli an. Durch die Kofärbung mit anti-Desmin (grün), einem Antikörper gegen den Mesangialzellmarker Desmin, konnte die glomeruläre Färbung von Arap1 (rot) den Mesangialzellen zugeordnet werden. Nach Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (rot und grün) erschienen die Kolokalisationsstellen gelblich (Abbildung 9 G, H, I). In den glomerulären Kapillaren, die mit CD31 angefärbt wurden, war keine Überlappung mit der Arap1-Färbung zu erkennen. Die grüne Färbung von anti-CD31 schien die von anti-Arap1 (rot) zu umrahmen (Abbildung 9 L).

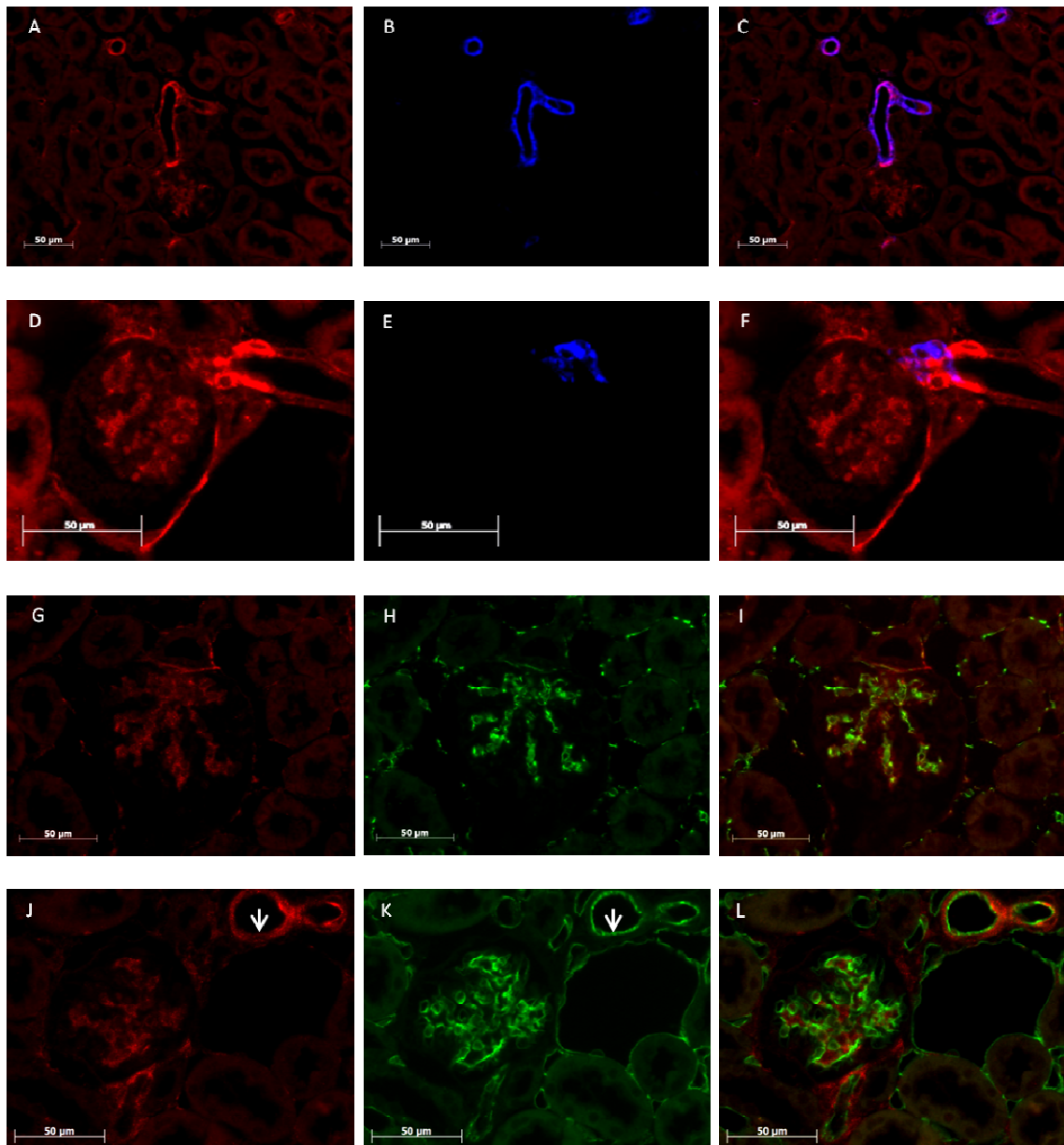


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein im renalen Kortex der Maus (linke Spalte: Arap1; mittlere Spalte: Gewebemarker; rechte Spalte: Überlappung): (A, B, C) Arap1 (rot) wurde in den kortikalen Blutgefäßen lokalisiert und aufgrund der Überlappung mit α -Aktin (blau) den glatten Gefäßmuskelzellen zugeordnet. (D, E, F) Arap1 (rot) wurde nicht in den renin (blau)-positiven juxtaglomerulären Zellen lokalisiert. (G, H, I) In den Glomeruli konnte Arap1 den Mesangialzellen zugeordnet werden, da Arap1 (rot) mit Desmin (grün) kolokalisierte. (J, K, L) Der Endothelmarker CD31 (grün) zeigte, dass Arap1 (rot) weder im Endothel der Blutgefäße innerhalb noch außerhalb der Glomeruli exprimiert wurde.

In der renalen Medulla der Maus zeigten die Gefäßbündel der Vasa recta eine Arap1-positive Färbung (Abbildung 10). Diese überlappte mit α -Aktin, dem Marker für die glat-

te Gefäßmuskulatur der Blutgefäße. Die Sammelrohre, die mit dem Antikörper gegen den Marker Aquaporin-2 identifiziert werden konnten, zeigten keine Färbung für Arap1.

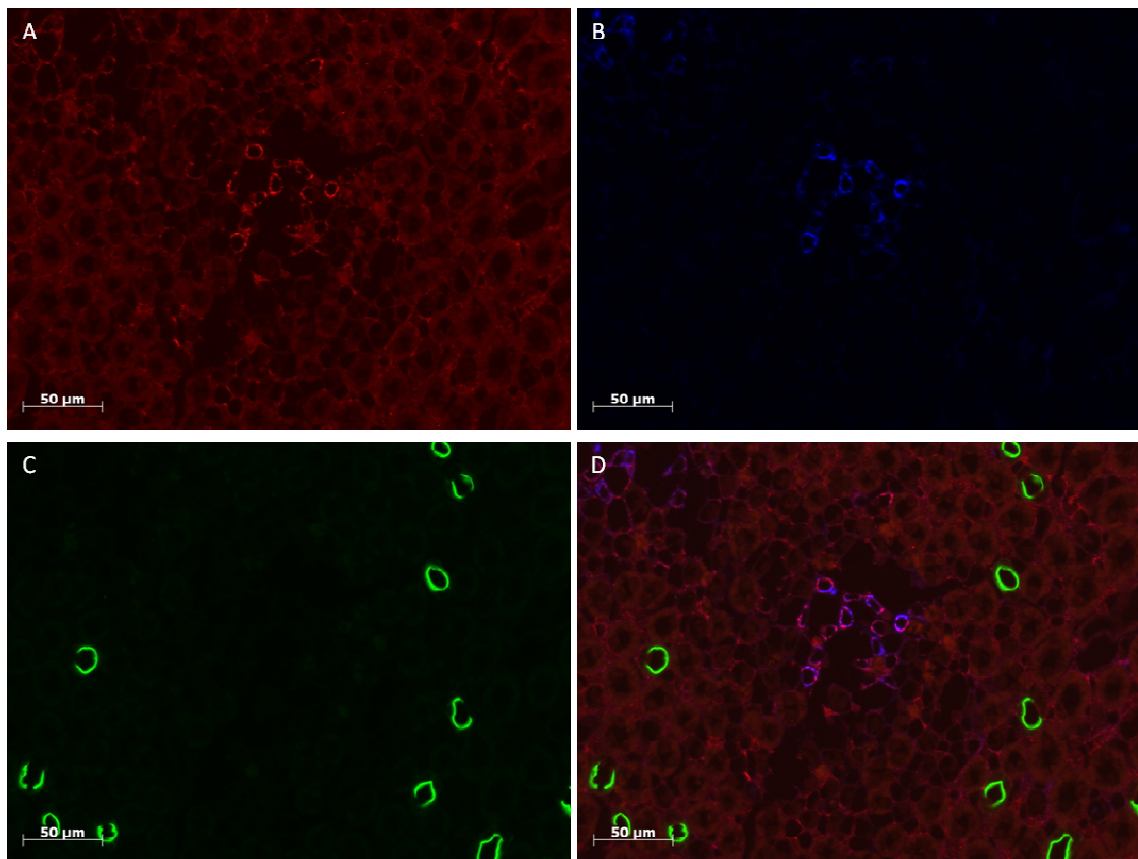


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein in der renalen Medulla der Maus: Arap1 (A; rot) wurde ausschließlich in den glatten Gefäßmuskulaturzellen (B; blau) der medullären Blutgefäße exprimiert (D; Überlappung von Arap1 mit α -Aktin). Die medullären Aquaporin-2-positiven Sammelrohre (C; grün) zeigten keine Färbung mit anti-Arap1 (rot) (D; keine Überlappung von Arap1 mit Aquaporin-2).

3.1.2.2 Expression von Arap1-Protein in der menschlichen Niere

Immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten der humanen Niere zeigten, dass Arap1 (Abbildung 11 A, B; rot) hier ebenfalls in den glatten Gefäßmuskulaturzellen des Kortex und der Medulla zu finden war. Wieder konnte dies durch eine Überlappung (Abbildung 11 E, F) mit dem Marker für glatte Gefäßmuskulaturzellen, α -Aktin (Abbildung 11 C, D; blau), veranschaulicht werden. Im Gegensatz zu den Nierenschnitten der Maus war keine Färbung der Glomeruli zu erkennen.

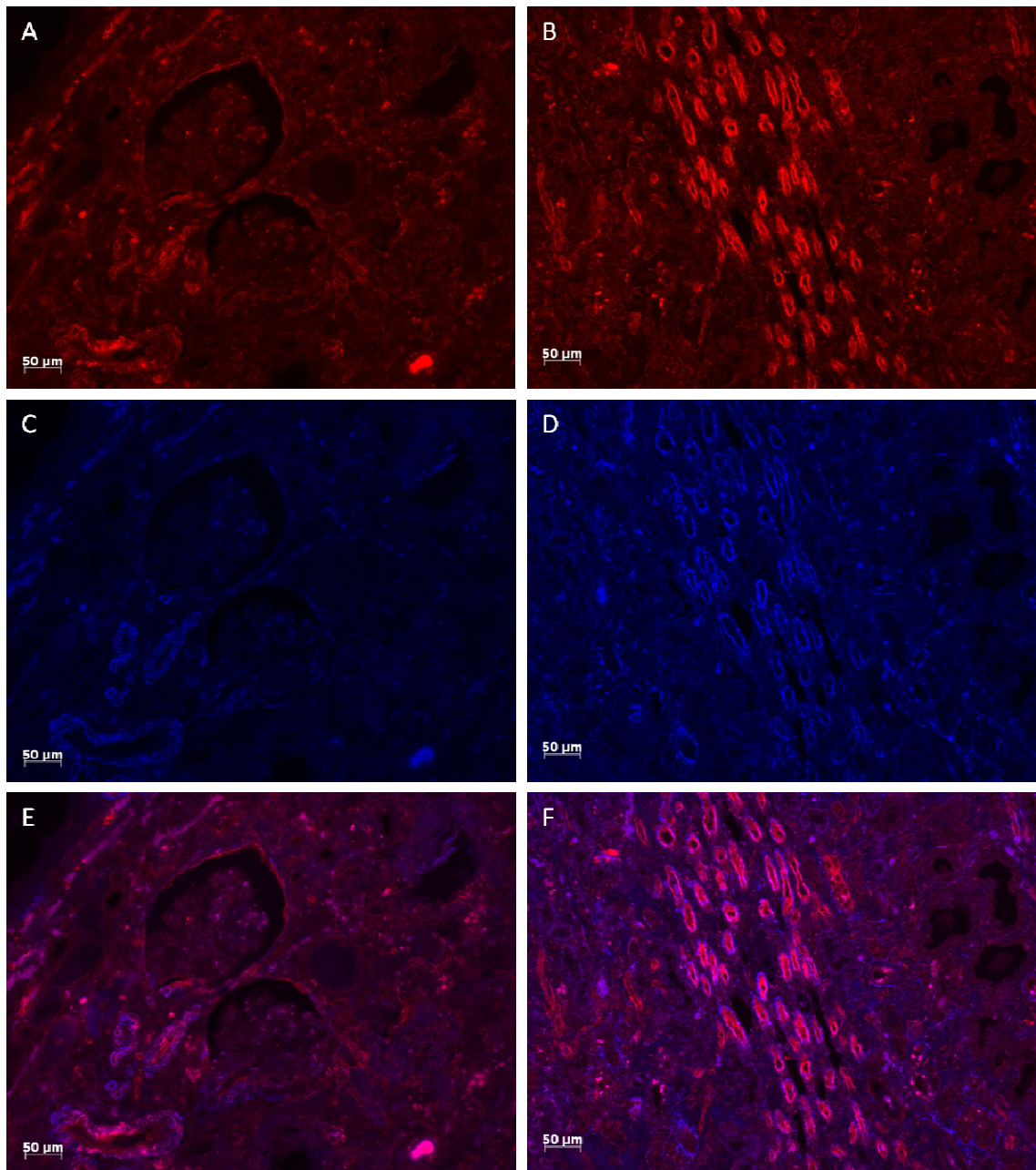


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein in der humanen Niere (linke Spalte: Kortex; rechte Spalte: Medulla): Arap1 (rot) wurde in den α -Aktin-positiven glatten Gefäßmuskelzellen (blau) des humanen Kortex (A bzw. C) und der Medulla (B bzw. D) exprimiert. In den Glomeruli war keine Färbung zu erkennen. Die Arap1-positive Färbung überlappte mit α -Aktin (rosa, E bzw. F).

In der Niere war Arap1 damit sowohl im Kortex als auch in der Medulla hauptsächlich in den glatten Gefäßmuskelzellen der Blutgefäße lokalisiert. Zusätzlich wurde in der Mausniere Arap1 in den glomerulären Mesangialzellen exprimiert.

3.1.2.3 Expression von Arap1-Protein in weiteren Organen der Maus

Die Expression von Arap1 in weiteren Organen wird in Abbildung 12 veranschaulicht. Arap1-Protein war auch in der Gefäßwand der Aorta nachweisbar. Hier trat die Färbung von Arap1 vor allem in der Tunica media auf, die glatte Gefäßmuskulatur besitzt. Genauso war Arap1-Protein in der Lunge wie im Herz in den Blutgefäßen zu finden.

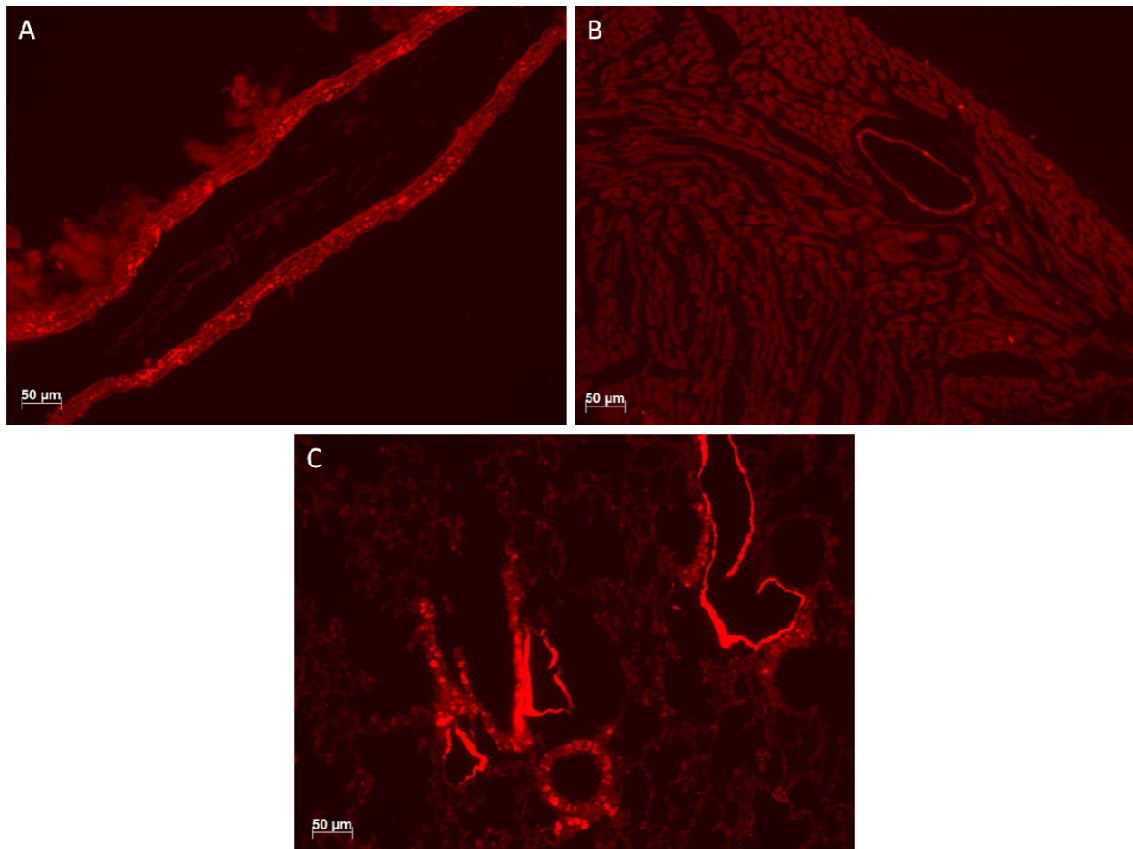


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein in der Aorta (A), im Herz (B) und in der Lunge (C). In der Aorta (A) war Arap1 (rot) in der Tunica media sichtbar. Im Herz (B) und in der Lunge (C) war Arap1 in den Blutgefäßen exprimiert.

Die Lokalisationsdaten zeigen, dass Arap1 hauptsächlich im vaskulären Gewebe exprimiert wurde.

3.2 Regulation der Expression von Arap1 in der Niere bei verschiedenen Aktivitätszuständen des Renin-Angiotensin-Systems

Um die Frage zu beantworten, ob Arap1 als lokaler Regulator des Renin-Angiotensin-Systems wirkt, indem es die Oberflächenexpression des AT1-Rezeptors erhöht, haben wir die Expression von Arap1 bei verschiedenen Situationen *in-vivo* untersucht, in denen die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems unterschiedlich ausgeprägt ist.

3.2.1 Expression von Arap1 bei hoher und niedriger Kochsalzaufnahme

So beeinflusst, wie in 1.1 erklärt, die Kochsalzaufnahme über die Reninsekretion die Aktivität des RAS und damit die Höhe der Angiotensin II-Spiegel in der Zirkulation. Im Versuch bekamen Mäuse für eine Woche Futter mit entweder niedrigen (0,02% NaCl [w/w]), regulären (0,6% NaCl [w/w]) oder hohen (4% NaCl [w/w]) Salzgehalt. Die Quantifizierung der renalen Arap1-Expression ergab folgendes Ergebnis (Abbildung 13). Nach einwöchiger Hochsalzdiät war die Arap1-Expression in der Niere signifikant um $47 \pm 14\%$ höher als bei regulärer Salzdiät ($p = 0,03$). Bei Nidrigsalzdiät stieg die Arap1-Expression ebenfalls an ($21 \pm 11\%$), jedoch war der Unterschied zur Kontrollgruppe nicht signifikant ($p = 0,5$).

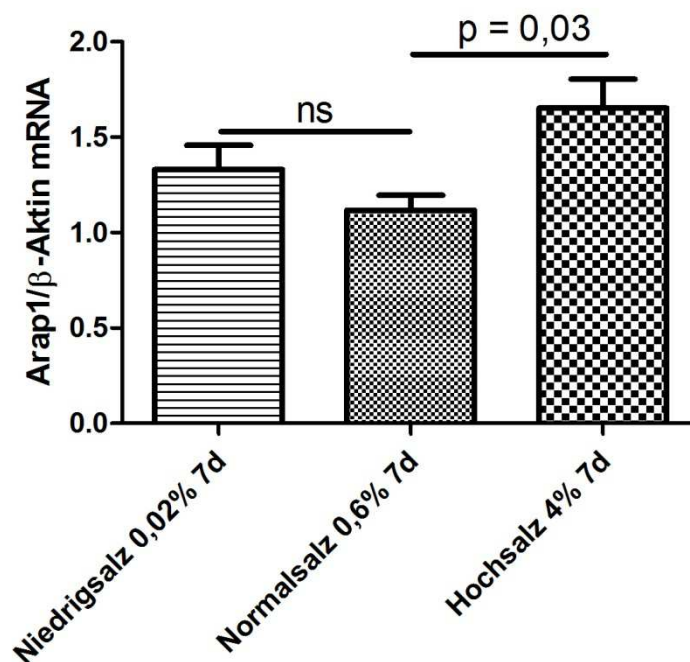


Abbildung 13: Arap1-mRNA-Expression bei Modulation der Kochsalzaufnahme. Renale Arap1-Expression nach einwöchiger Niedrigsalz (0,02% NaCl [w/w])-, Normalsalz

(0,6% NaCl [w/w])- und Hochsalzdiät (4% NaCl [w/w]). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).

3.2.2 Expression von Arap1 bei Wassermangel

Bei Wassermangel erfolgt wegen der Notwendigkeit Salz und Wasser zu resorbieren eine starke Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems [Di Nicolantonio, R. et al., 1986]. Mäuse, die 48 Stunden keinen Zugang zu Wasser hatten, zeigten eine signifikant niedrigere renale Arap1-mRNA-Expression als Mäuse einer Kontrollgruppe. Im Kortex war die Arap1-mRNA-Expression um $25\pm3\%$, in der äußeren Medulla um $53\pm5\%$ und in der inneren Medulla um $72\pm4\%$ gesunken (Abbildung 14). Parallel dazu zeigte die Arap1-Protein Expression ebenfalls eine Erniedrigung nach 48 Stunden Wassermangel. Diese betrug $46\pm12\%$ der Proteinexpression bei Mäusen mit Wasserzugang (Abbildung 15).

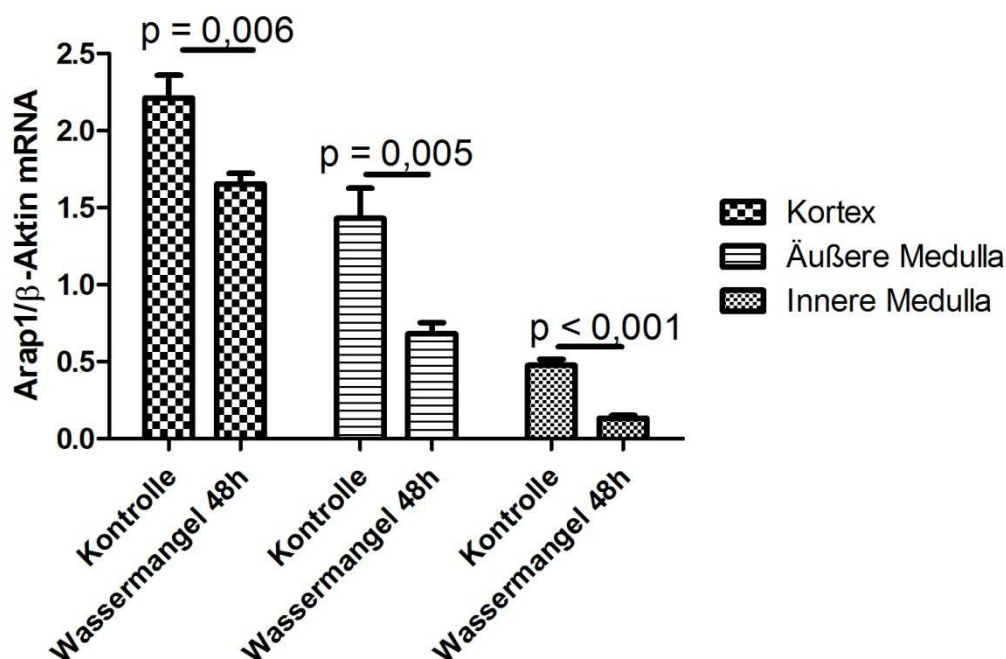


Abbildung 14: Renale Arap1-mRNA-Expression in den Nierenzonen der Maus nach 48 Stunden Wassermangel. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).

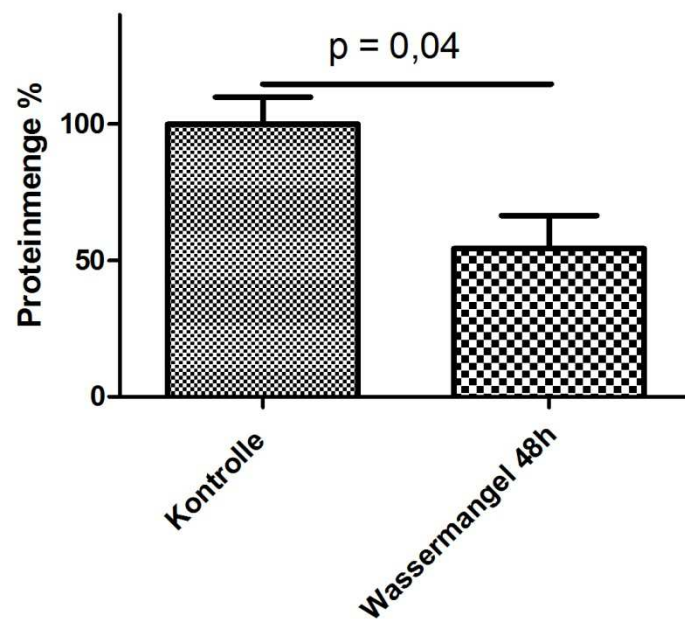


Abbildung 15: Renale Arap1-Proteinexpression nach 48 Stunden Wassermangel. Die Proteinmenge wurde durch Quantifizierung der Bandenintensität anhand Bio1D ermittelt (n = 3).

3.2.3 Expression von Arap1 bei unilateraler Nierenarterienstenose

Ebenfalls hohe Angiotensin II-Spiegel werden durch unilaterale Nierenarterienstenose (*2-kidney-1-clip*, 2k-1c) hervorgerufen. Aufgrund der verengten Nierenarterie ist der Perfusionsdruck in der betroffenen Niere stark herabgesetzt. Das führt zu einer gesteigerten Reninsekretion. Die Folge sind hohe Angiotensin II-Spiegel, die auch die zweite Niere, deren Perfusionsdruck erhöht ist, erreichen. Quantifizierung in beiden Nieren ergab eine signifikante Verminderung der Arap1-mRNA-Expression um $64 \pm 6\%$ und $62 \pm 2\%$ in der betroffenen bzw. in der kontralateralen Niere verglichen mit Nieren von sham-operierten Mäusen (Abbildung 16).

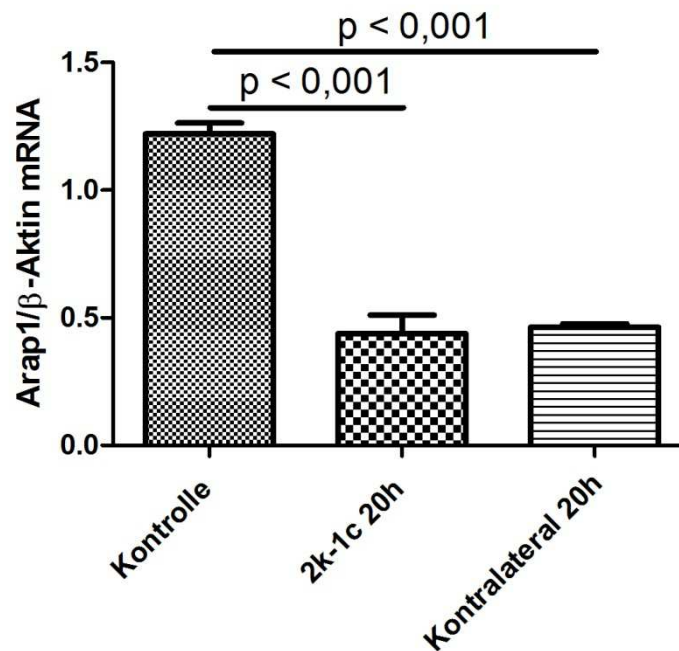


Abbildung 16: Renale Arap1-mRNA-Expression in Mäusen nach unilateraler Nierenarterienstenose (2k-1c-Modell). Der Kontrollwert ergibt sich aus dem Mittelwert der Arap1-Expression beider Nieren von sham-operierten Mäusen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).

3.2.4 Expression von Arap1 bei chronischer Infusion von Angiotensin II

Sowohl bei Wassermangel als auch bei unilateraler Nierenarterienstenose kommt es zu erhöhten Angiotensin II-Konzentrationen in der Zirkulation. In beiden Situationen führt dies zu einer Verminderung der Arap1-Expression in der Niere. Um einen möglichen direkten Effekt von Angiotensin II auf die Expressionsrate von Arap1 zu untersuchen, haben wir Mäusen osmotische Minipumpen implantiert, die kontinuierlich hohe Mengen an Angiotensin II abgaben. Der arterielle Blutdruck wurde während dieser Zeit gemessen und mit einer Kontrollgruppe verglichen, denen osmotische Minipumpen mit dem Trägerstoff (Vehikel), aber ohne Angiotensin II, implantiert wurden. Angiotensin II löste einen starken Blutdruckanstieg aus. Angiotensin II-behandelte Mäuse hatten im Durchschnitt einen arteriellen Blutdruck von 158 ± 2 , die Kontrollgruppe 116 ± 2 mm Hg ($p < 0,01$). Nach sieben Tagen Angiotensin II-Infusion ($2 \mu\text{g/kg/min}$ Angiotensin II) wurde die Arap1-Expression in der Niere quantifiziert und mit der Kontrollgruppe verglichen (Abbildung 17). Chronische Angiotensin II-Infusion verringerte die Arap1-mRNA-Expression um $29 \pm 1,4\%$ und $24 \pm 8\%$ im Kortex bzw. in der äußeren Medulla (n = 10, $p < 0,001$ und $p < 0,003$). In der inneren Medulla zeigte sich kein Unterschied in der Arap1-Expression, wobei hier auch die Expression der Kontrolle im Vergleich zu den anderen Nierenzonen gering war.

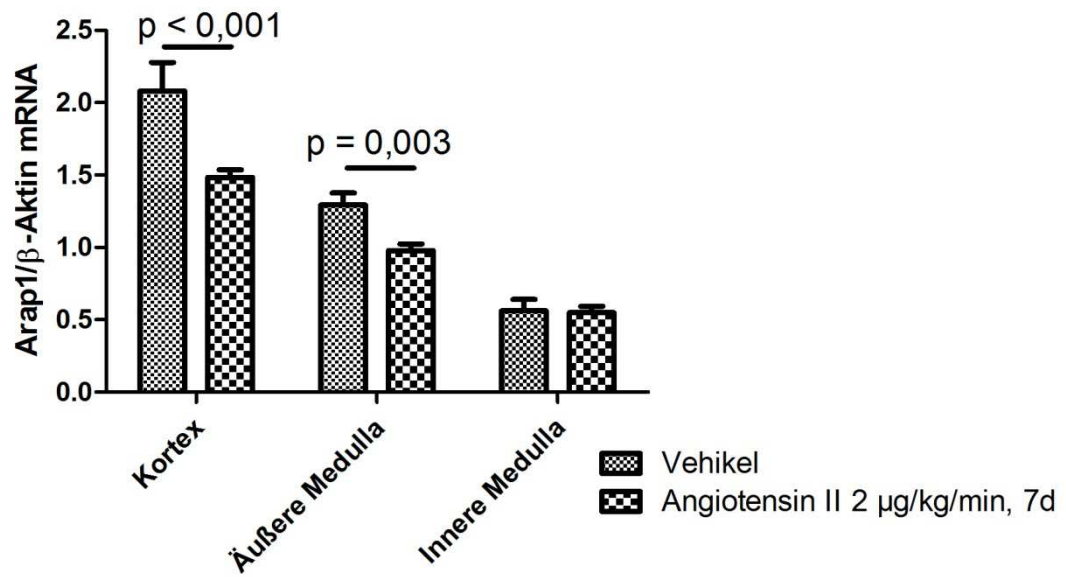


Abbildung 17: Arap1-mRNA-Expression in Mäusen nach chronischer Angiotensin II-Infusion (2 µg/kg/min, 7 Tage) in den Nierenzonen. Die Kontrollgruppe bestand aus Mäusen, die mit dem Trägerstoff (Vehikel) ohne Angiotensin II behandelt wurden. Werte sind relativ im Verhältnis zu β-Aktin angegeben (n = 10).

Auch die Menge des Arap1-Proteins in der Niere war nach Angiotensin II-Infusion um $25 \pm 7\%$ signifikant geringer als in der Kontrollgruppe ($p = 0,02$) (Abbildung 18).

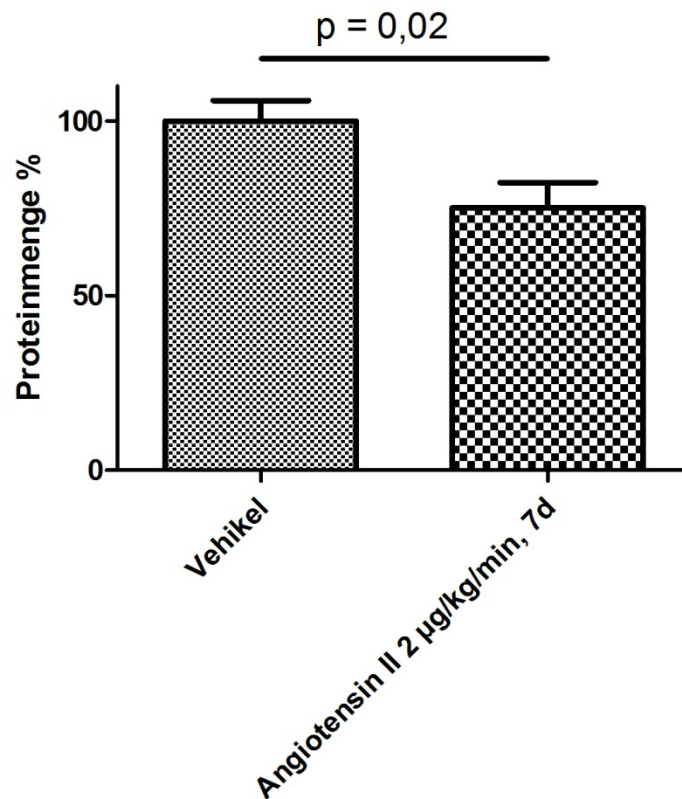


Abbildung 18: Renale Arap1-Proteinmenge nach chronischer Angiotensin II-Infusion (2 µg/kg/min, 7 Tage). Die Kontrollgruppe bestand aus Mäusen, die mit dem Trägerstoff, ohne Angiotensin II, behandelt wurden. Die Proteinmenge wurde nach Western Blotting durch Quantifizierung der Bandenintensität anhand Bio1D ermittelt (n = 7).

3.2.5 Expression von Arap1 bei Behandlung mit dem AT1 Rezeptor Antagonisten Losartan

Zur Überprüfung des möglichen direkten Effekts von Angiotensin II auf die Arap1-Expression, wurden Mäuse mit dem AT1 Rezeptor Antagonisten, Losartan, behandelt. Durch Losartan wird die Bindung von Angiotensin II an die Rezeptoren unterbunden. Angiotensin II kann seine Wirkung damit nicht auf die Zellen übertragen. Losartan-behandelte Mäuse (30 mg/kg/d im Trinkwasser, 7 Tage) zeigten eine signifikant erhöhte renale Arap1-Expression im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Der Anstieg betrug $52 \pm 15\%$ ($p < 0,01$) (Abbildung 19). Ebenso stieg die Menge an Arap1-Protein um mehr als das siebenfache der Arap1-Proteinmenge von unbehandelten Mäusen an ($p = 0,009$) (Abbildung 20).

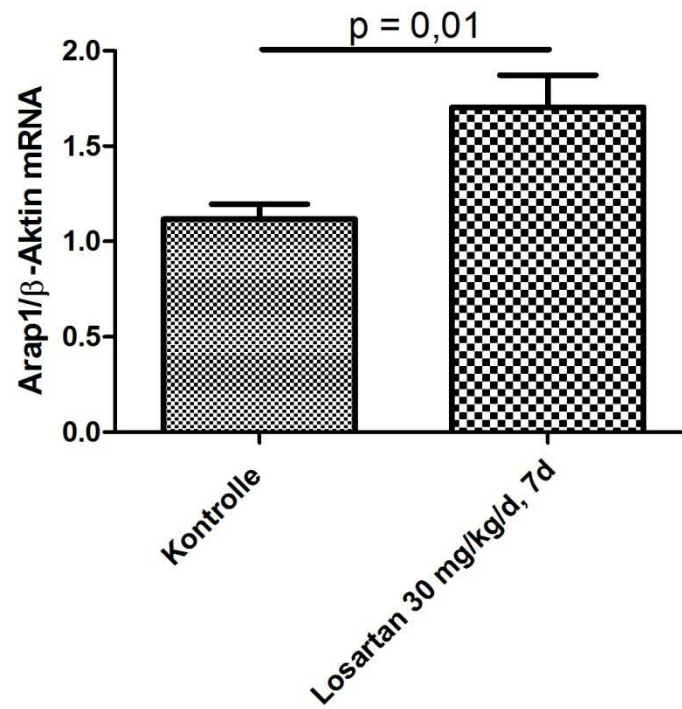


Abbildung 19: Renale Arap1-mRNA-Expression nach Behandlung mit Losartan (30 mg/kg/d im Trinkwasser) für 7 Tage. Die Kontrollgruppe besteht aus unbehandelten Mäusen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 5).

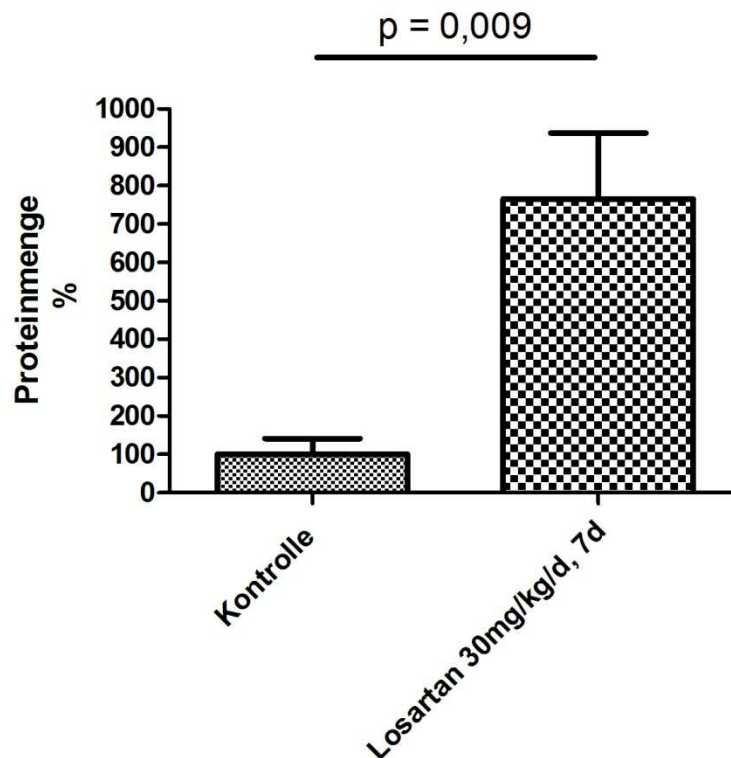


Abbildung 20: Renale Arap1-Proteinexpression nach Behandlung mit Losartan (30 mg/kg/d im Trinkwasser) für 7 Tage. Die Kontrollgruppe besteht aus unbehandelten Mäusen. Die Proteinmenge wurde aus der Bandenintensität nach Western Blotting anhand Bio1D ermittelt (n = 4).

3.3 Expression von Arap1 und arterieller Blutdruck

3.3.1 Expression von Arap1 bei eNOS-defizienten Mäusen

Die Ergebnisse der beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass die Expression von Arap1 von Angiotensin II abhängig ist. Während hohe Angiotensin II-Spiegel eine Reduktion auslösen, bewirken niedrige Angiotensin II-Spiegel eine Erhöhung der Arap1-Expression sowohl auf mRNA- wie auf Proteinebene. Um zu untersuchen, ob ausschließlich Angiotensin II oder auch der Blutdruck Einfluss auf die Arap1-Expression hat, wurde die Arap1-Expression von eNOS^{-/-}-Mäusen ermittelt. eNOS bezeichnet die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) in den Endothelzellen. Sie katalysiert die Bildung von NO aus der Aminosäure Arginin. NO wirkt stark gefäßerweiternd und bewirkt damit eine Blutdrucksenkung. eNOS-defiziente Mäuse sind hypertensiv, haben jedoch keinen veränderten Plasmareninspiegel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen [Beierwaltes, W.H. et al., 2002]. Folglich sind vermutlich auch die Angiotensin II-

Spiegel gleich. Die renale Expression von Arap1 in eNOS-defizienten Mäusen ergab keinen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-Mäusen ($p = 0,14$) (Abbildung 21).

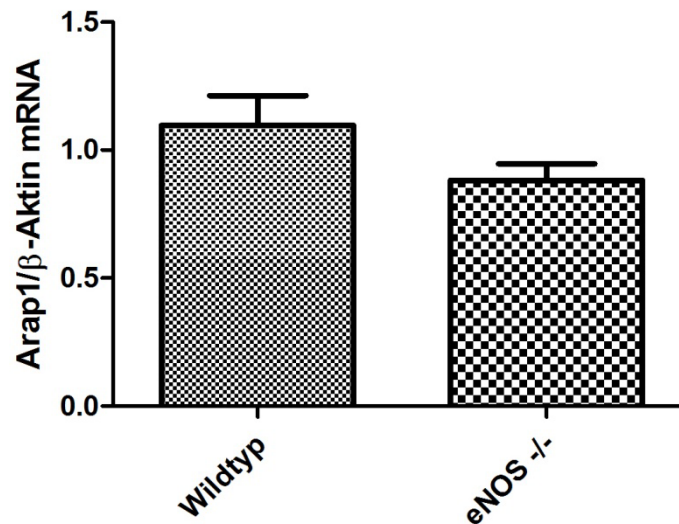


Abbildung 21: Renale Arap1-mRNA-Expression in eNOS-defizienten und Wildtyp-Mäusen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 5$).

3.3.2 Expression von Arap1 bei Behandlung mit Hydralazin

Weiterhin wurde die renale Arap1-Expression in Mäusen untersucht, die mit Hydralazin behandelt wurden. Hydralazin wirkt gefäßerweiternd, senkt also den arteriellen Blutdruck. Das Renin-Angiotensin-System wird dadurch aktiviert, Renin wird vermehrt sezerniert, die Angiotensin II-Spiegel in der Zirkulation sind erhöht [Pettinger, W.A. et al., 1973]. Mäusen wurde Hydralazin (50 mg/kg/d) im Trinkwasser für drei Tage verabreicht. Die renale Arap1-Expression in diesen Mäusen wurde vermessen und mit der in nicht-behandelten Mäusen verglichen. In den Nieren, der mit Hydralazin behandelten Mäuse, betrug die Expression von Arap1 $81 \pm 2\%$ der renalen Expression in unbehandelten Mäusen, und war damit signifikant niedriger ($p = 0,01$) (Abbildung 22).

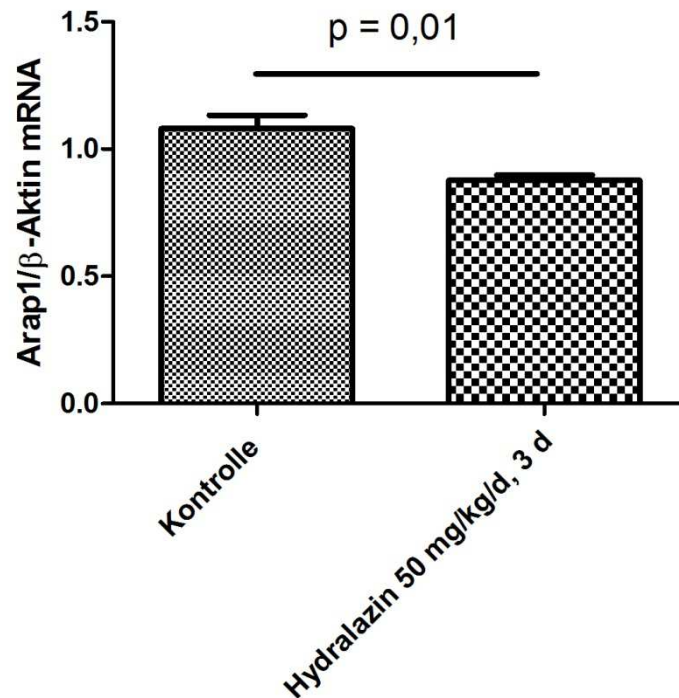


Abbildung 22: Renale Arap1-mRNA-Expression in Hydralazin-behandelten Mäusen (Hydralazin 50 mg/kg/d, 3 d) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (Kontrolle). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 4$).

3.4 Regulation der Expression von Arap1 in weiteren Organen

Um zu analysieren, ob die Regulation der Arap1-Expression gewebespezifisch ist, wurde sie nach Angiotensin II-Infusion auch im Herz, der Aorta und in den Nebennieren bestimmt. Im Gegensatz zur Niere zeigte die Arap1-Expression nach Angiotensin II-Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe im Herz (Abbildung 23) und in der Aorta keinen Unterschied. Die Arap1-Expression in der Nebenniere war hingegen signifikant um $85 \pm 18\%$ höher als in der Kontrollgruppe (Abbildung 24).

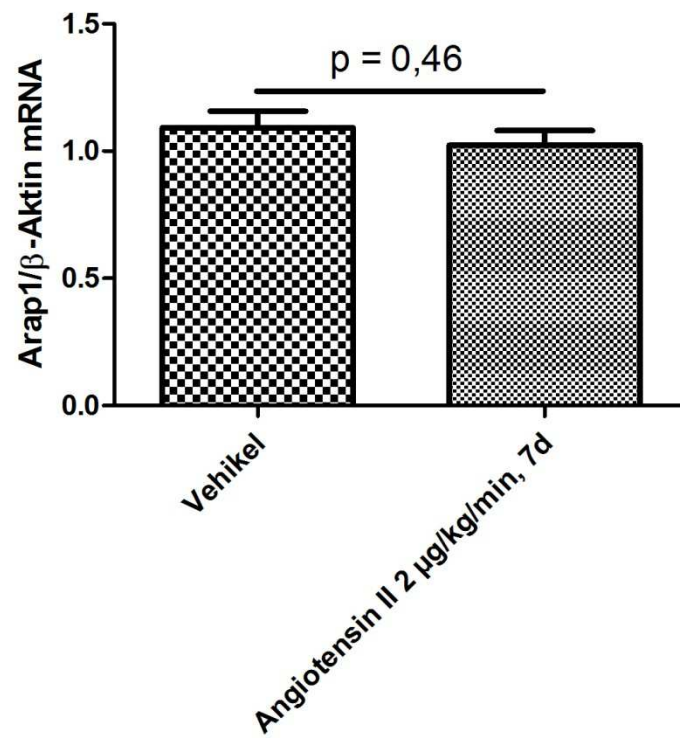


Abbildung 23: Arap1-mRNA-Expression nach Angiotensin II-Infusion (2 µg/kg/min, 7 Tage) im Herz (linker Ventrikel). Werte sind relativ im Verhältnis zu β-Aktin angegeben (n = 10).

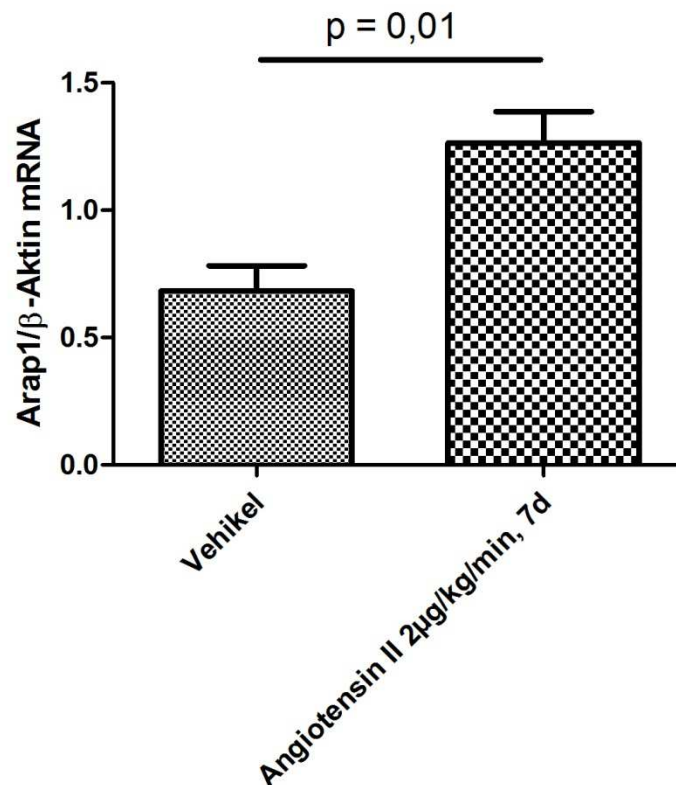


Abbildung 24: Arap1-mRNA-Expression nach Angiotensin II-Infusion (2 µg/kg/min, 7 Tage) in der Nebenniere. Werte sind relativ im Verhältnis zu β-Aktin angegeben (n = 5).

Alle *in-vivo*-Experimente lassen erkennen, dass die Expression von Arap1 vom Aktivitätszustand des Renin-Angiotensin-Systems abhängig ist. Angiotensin II scheint direkt die Arap1-Expression der Niere zu hemmen.

3.5 Regulation der Expression von Arap1 *in-vitro*

Um die Mechanismen der Regulation der Arap1-Expression unter kontrollierteren Bedingungen zu untersuchen, wurden *in-vitro*-Studien durchgeführt. Dafür wurde eine Zelllinie glomerulärer Mesangialzellen aus der Ratte gewählt, die konstitutiv Arap1 exprimiert.

3.5.1 Expression von Arap1 in Gegenwart von Angiotensin II

In diesen Zellen sank die Arap1-Expression nach Inkubation mit Angiotensin II. Diese Reduktion der Arap1-Expression bei Inkubation mit Angiotensin II war sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. So verminderte sich die Arap1-mRNA um 29 ± 4 , 32 ± 2 , 56 ± 2 bzw. $75 \pm 2\%$ nach 16-stündiger Inkubation mit 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} bzw. 10^{-4} M

Angiotensin II ($p < 0,001$) im Vergleich zur Arap1-mRNA in Zellen ohne Zugabe von Angiotensin II (Abbildung 25). In einem Zeitverlauf erreichte Arap1 nach 8 Stunden Inkubation mit Angiotensin II (10^{-4} M) die niedrigste Expressionsrate, die sich auch nach 16 Stunden nicht mehr verringerte (Abbildung 26).

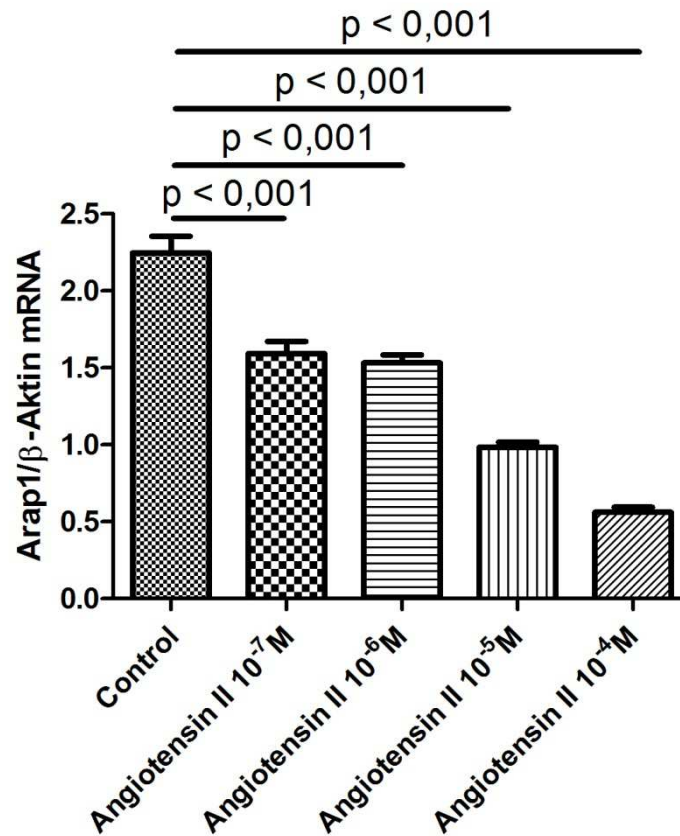


Abbildung 25: Arap1-mRNA-Expression glomerulärer Mesangialzellen der Ratte nach 16-stündiger Inkubation mit Angiotensin II in verschiedenen Konzentrationen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 6$).

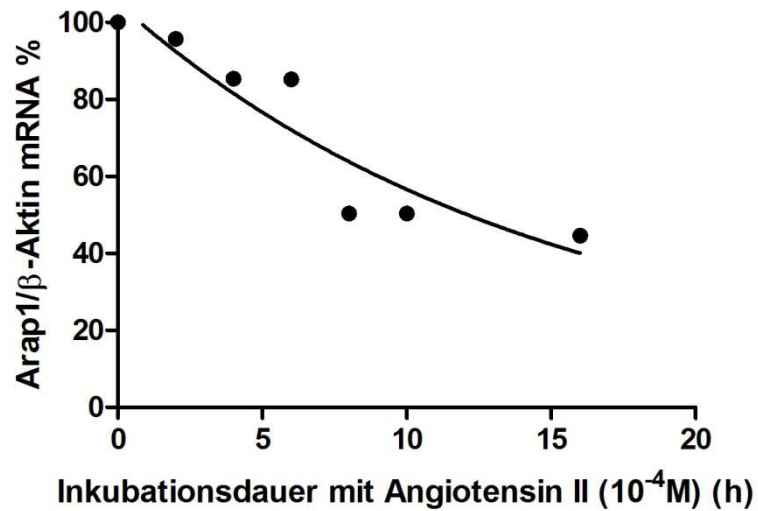


Abbildung 26: Arap1-mRNA-Expressionsverlauf glomerulärer Mesangialzellen der Ratte bei Inkubation mit Angiotensin II (10^{-4} M). Die Werte sind jeweils auf Kontrollwerte ohne Inkubation mit Angiotensin II bezogen und relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 6$).

Auf Proteinebene zeigte sich ebenfalls die inhibierende Wirkung von Angiotensin II (10^{-4} M, 16 Stunden) auf die Arap1-Expression. Sie verringerte sich um 50% im Vergleich zur Kontrolle ohne Zugabe von Angiotensin II (Abbildung 27).

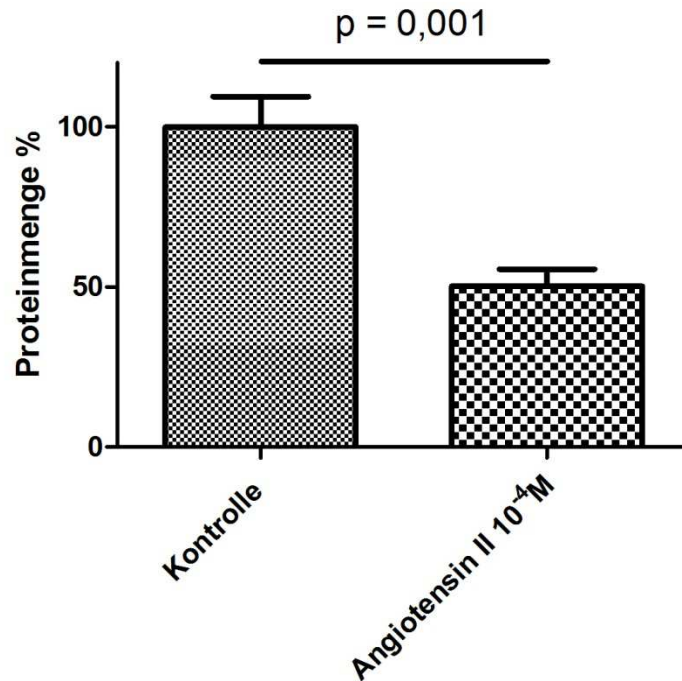


Abbildung 27: Arap1-Proteinexpression nach 16-stündiger Inkubation mit Angiotensin II (10^{-4} M) und ohne Angiotensin II (Kontrolle). Werte wurden durch Quantifizierung der Bandenintensität nach Western Blotting durch Bio1D ermittelt (n = 6).

3.5.2 Expression von Arap1 in Gegenwart von Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten und Angiotensin II

Zur Identifizierung des Rezeptors, der die Hemmung der Arap1-Expression vermittelt, wurde der Effekt des AT1-Rezeptorantagonisten Losartan auf die Arap1-Expression von Mesangialzellen mit Koinkubation mit Angiotensin II untersucht. Nachdem Zellen mit Losartan (10^{-4} M) vorbehandelt wurden, konnte Angiotensin II (10^{-5} M) bei 20-stündiger Inkubation die Arap1-Expression nicht mehr reduzieren. Hier betrug die Expressionsrate $96 \pm 4\%$ der der Kontrolle ($p = 0,13$). Im Gegensatz dazu wurde die Arap1-Expression in Gegenwart von Angiotensin II (10^{-5} M) ohne Losartan um $35 \pm 4\%$ des Kontrollwerts abgesenkt ($p = 0,0005$) (Abbildung 28).

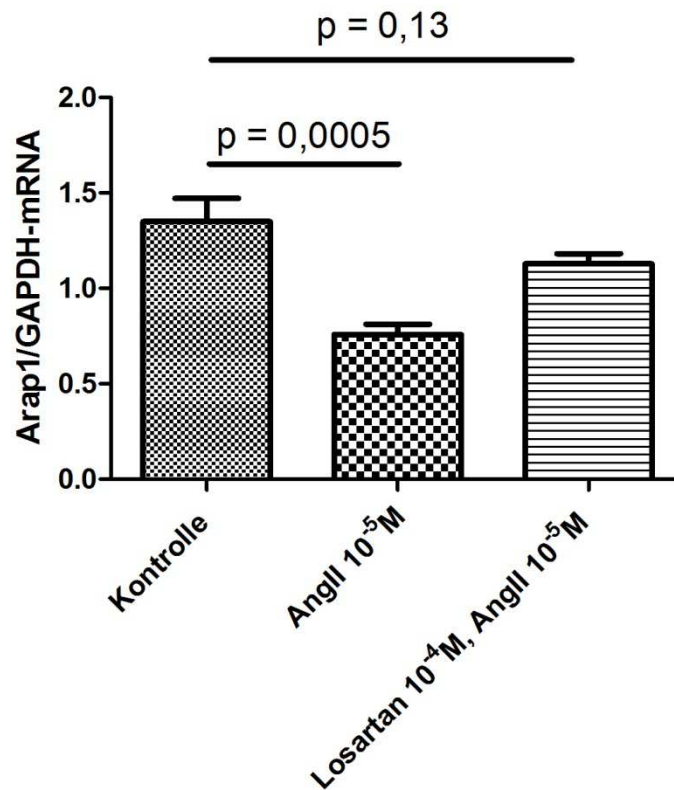


Abbildung 28: Arap1-mRNA-Expression nach Koinkubation von Losartan (10^{-4} M) und Angiotensin II (10^{-5} M) sowie alleiniger Inkubation von Angiotensin II (10^{-5} M) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Angiotensin II). Werte sind relativ im Verhältnis zu GAPDH angegeben ($n = 6$).

Die Koinkubation mit Angiotensin II (10^{-4} M) und dem AT₂-Rezeptorantagonisten PD123319 (10^{-6} M) führte, wie die Inkubation ausschließlich mit Angiotensin II (10^{-4} M), zu einer Reduktion der Arap1-Expression. PD123319 hatte also keinen Effekt auf die Wirkung von Angiotensin II (Abbildung 29).

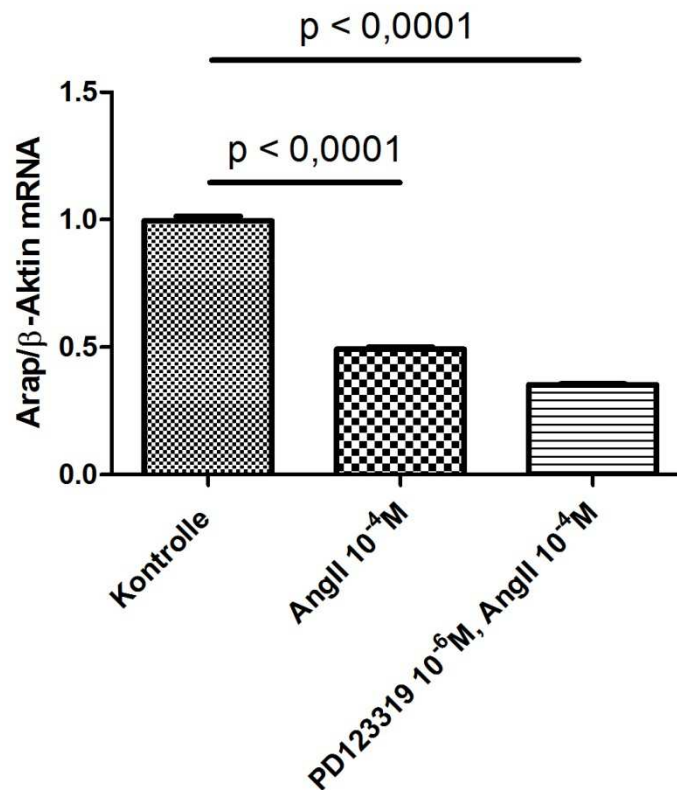


Abbildung 29: Arap1-mRNA-Expression nach Koinkubation von Angiotensin II (10^{-4} M) und PD123319 (10^{-6} M) sowie nach Inkubation mit Angiotensin II (10^{-4} M) im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).

3.5.3 Expression von Arap1 bei Aktivierung der Proteinkinase C

Für die weitere Untersuchung der Signalübertragung, die zur Regulation der Arap1-Expression in Abhängigkeit von Angiotensin II führt, wurde die Wirkung eines Agonisten der Proteinkinase C analysiert. Wie Abbildung 30 zeigt, wurde die Arap1-Expression durch Aktivierung der PKC durch PMA (10^{-5} M und 10^{-7} M) um $52 \pm 2\%$ bzw. $43 \pm 4\%$ runterreguliert. Damit bewirkt PMA einen ähnlich starken Abfall der Arap1-Expression wie Angiotensin II (10^{-5} M um $46 \pm 2\%$) ($p < 0,0001$).

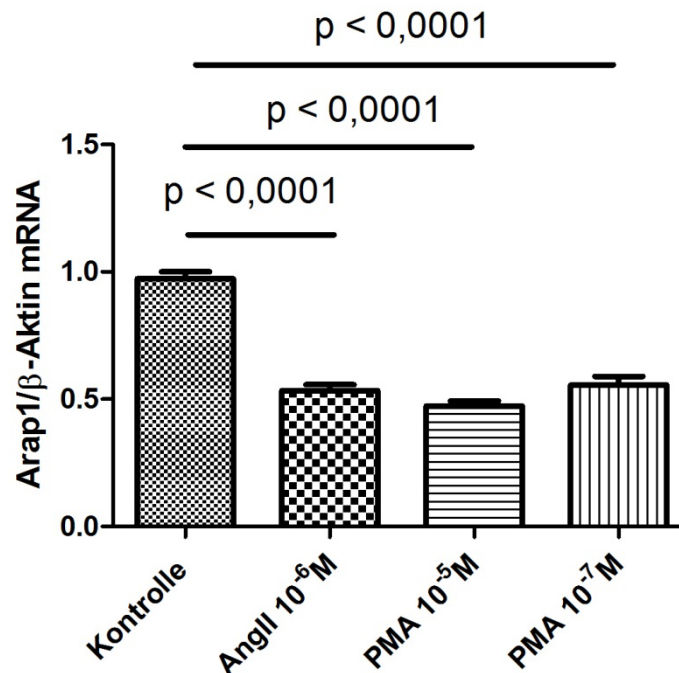


Abbildung 30: Arap1-mRNA-Expression in Mesangialzellen nach Inkubation mit Angiotensin II (10^{-6} M), PMA (10^{-5} bzw. 10^{-7} M) im Vergleich zur Kontrolle (weder Angiotensin II noch PMA). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 6$).

3.6 Regulation der Expression von Arap1 in der Sepsis

Um die Frage zu beantworten, ob Arap1 im Krankheitsbild der Sepsis eine Rolle spielt, wurde untersucht, ob hier die Expression von Arap1 reguliert wird. Eine Sepsis hat einen drastischen Blutdruckabfall zur Folge. Trotz einer Hyperaktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und damit hoher Angiotensin II-Konzentrationen kommt es zu keiner Vasokonstriktion, vielmehr bleiben die Blutgefäße erweitert. Man vermutet, dass ein Grund für diese scheinbare Resistenz gegen Angiotensin II in der Sepsis eine verminderte vaskuläre Reaktivität ist [Schaller, M.D. et al., 1985].

Für die Klärung der drastischen physiologischen Veränderungen, haben sich zwei Versuchsmodelle etabliert. Im CLP (*cecal ligation and puncture*)-Modell kommt es durch Einschnürung (Ligation) und anschließende Punktion des Blinddarms zu einer Kontamination der Bauchhöhle mit Bakterien und Pilzen des Darminhalts. Dies löst nach kurzer Zeit eine schwere Sepsis mit hohen Zytokinspiegeln und Blutdruckabfall aus. Ähnliche Folgen hat das LPS (Lipopolysaccharid)-Modell, in dem LPS intraperitoneal injiziert wird [Remick, D.G. et al., 2000]. *In-vitro* kann die direkte Wirkung der verschiedenen Zytokine analysiert werden.

3.6.1 Expression von Arap1 *in-vivo* nach CLP

Die Expression von Arap1 in der Niere wurde in Mäusen quantifiziert, die 6, 12 bzw. 20 bis 24 Stunden nach einem CLP-Eingriff getötet wurden. Man beobachtete eine Reduktion der Arap1-Expression, die nach 12 Stunden ihren tiefsten Wert erreichte. Die Arap1-Expression nach 6 Stunden war nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, nach 12 Stunden betrug sie noch $47 \pm 5\%$ und nach 20-24 Stunden noch $52 \pm 9\%$ ($p \leq 0,05\%$) (Abbildung 31).

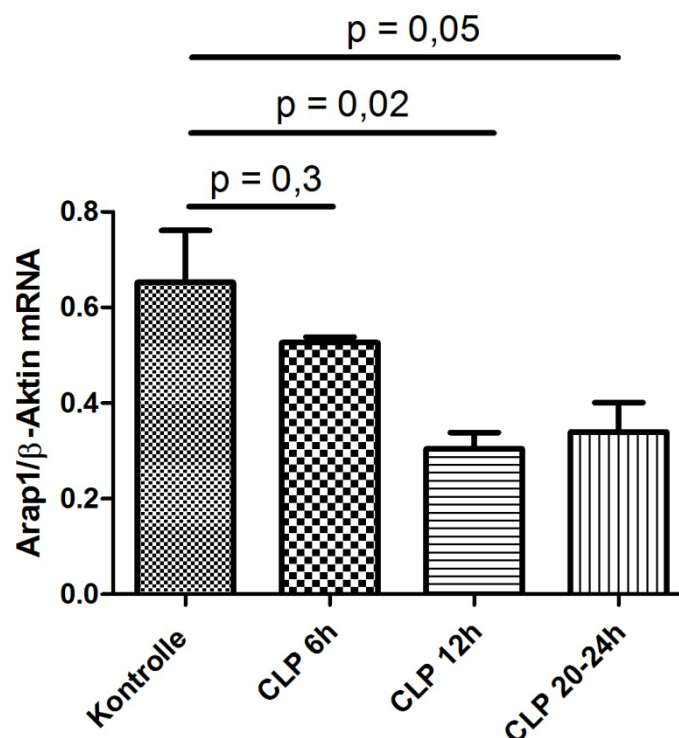


Abbildung 31: Arap1-mRNA-Expression in Mäusenieren 6, 12 bzw. 20 bis 24 Stunden nach einer CLP (*cecal ligation and puncture*) im Vergleich zur Kontrolle (sham-operiert). Werte sind relativ im Verhältnis zu β-Aktin angegeben ($n = 4$).

Ebenfalls kam es im Herz, in der Lunge, in der Leber, in der Aorta und in der Nebenniere zu einer Verminderung der Arap1-Expression. Diese war in der Lunge, Aorta und Nebenniere schon 6 Stunden nach der CLP signifikant, wohingegen im Herz die Arap1-Expression nach 12 Stunden signifikant minimiert war (Abbildung 32) ($p < 0,04$).

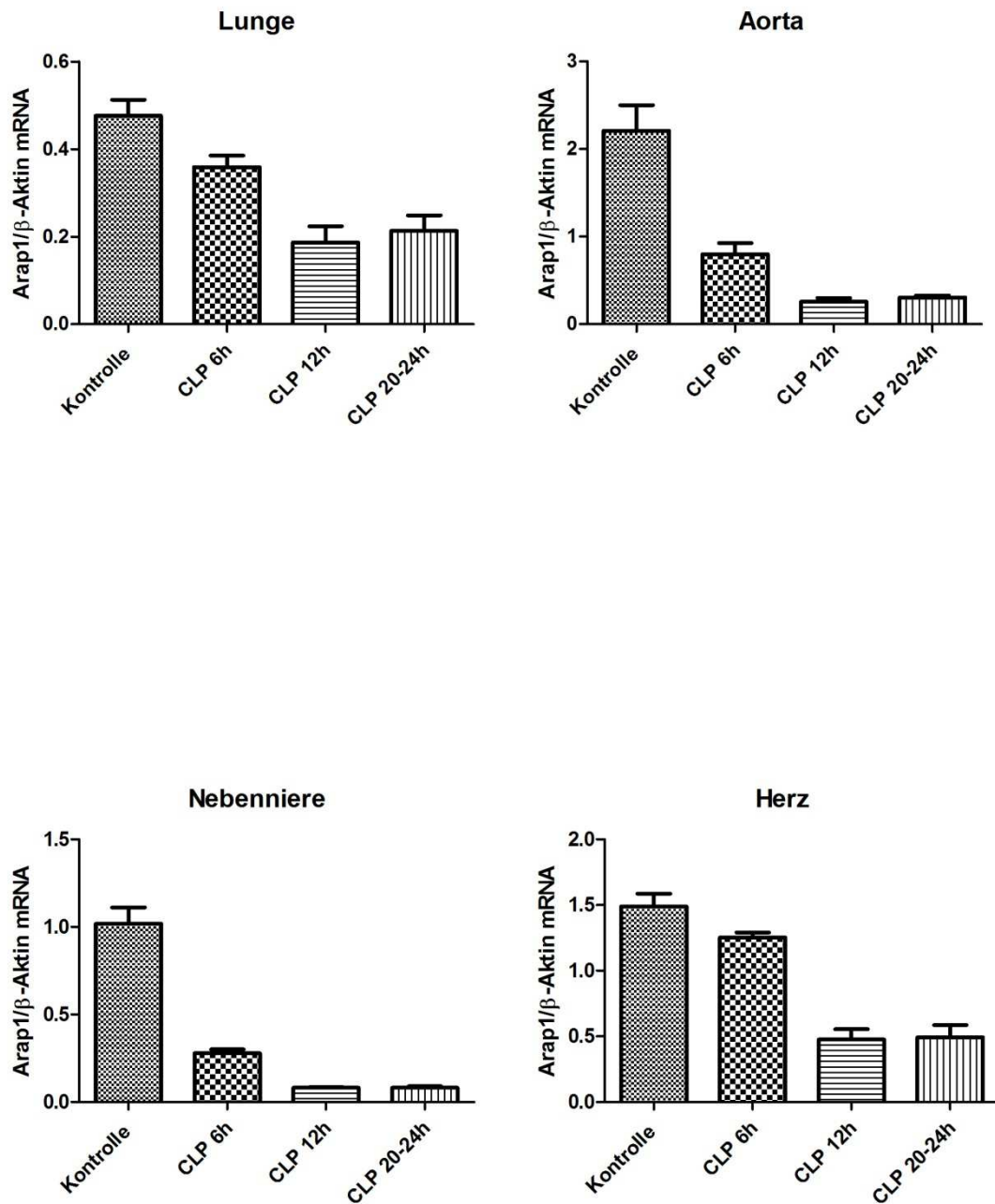


Abbildung 32: Arap1-mRNA-Expression in der Lunge, Aorta, Nebenniere und im Herz nach 6, 12 bzw. 20 bis 24 Stunden CLP (*cecal ligation and puncture*) im Vergleich zur Kontrolle (sham-operiert) (n = 4).

3.6.2 Expression von Arap1 *in-vivo* nach Injektion von LPS

Im Sepsismodell LPS-Injektion ergaben sich ähnliche Effekte auf die Arap1-Expression wie bei CLP. In der Niere war die Arap1-Expression signifikant erniedrigt. Sie betrug 3 Stunden nach Injektion von LPS noch $33 \pm 10\%$, nach 6 Stunden noch $9 \pm 1\%$ bzw. $8 \pm 0,2\%$ nach 12 Stunden (Abbildung 33) ($p < 0,003$).

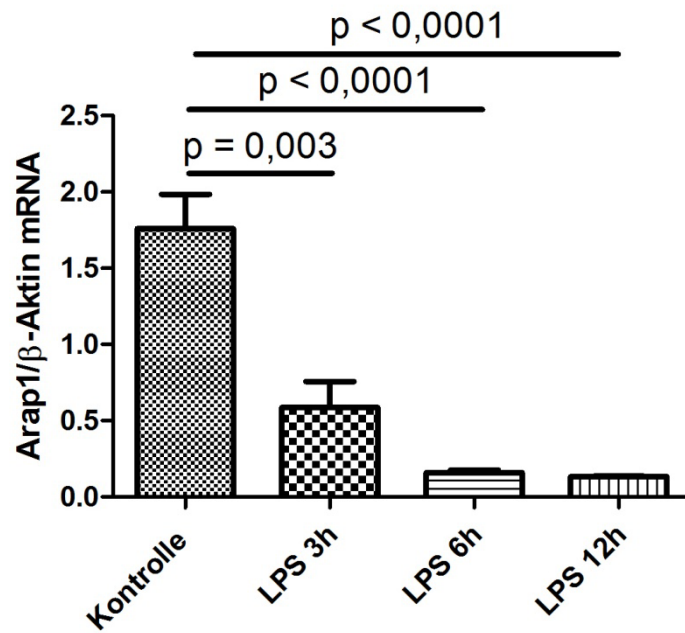


Abbildung 33: Arap1-mRNA-Expression in der Niere 3, 6 bzw. 12 Stunden nach Injektion von LPS im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelt). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 3).

Auch in weiteren Organen ergab sich hier ein ähnliches Bild wie in der Niere. Bereits 3 Stunden nach der Injektion von LPS war die Arap1-Expression signifikant erniedrigt (Abbildung 34) ($p < 0,04$).

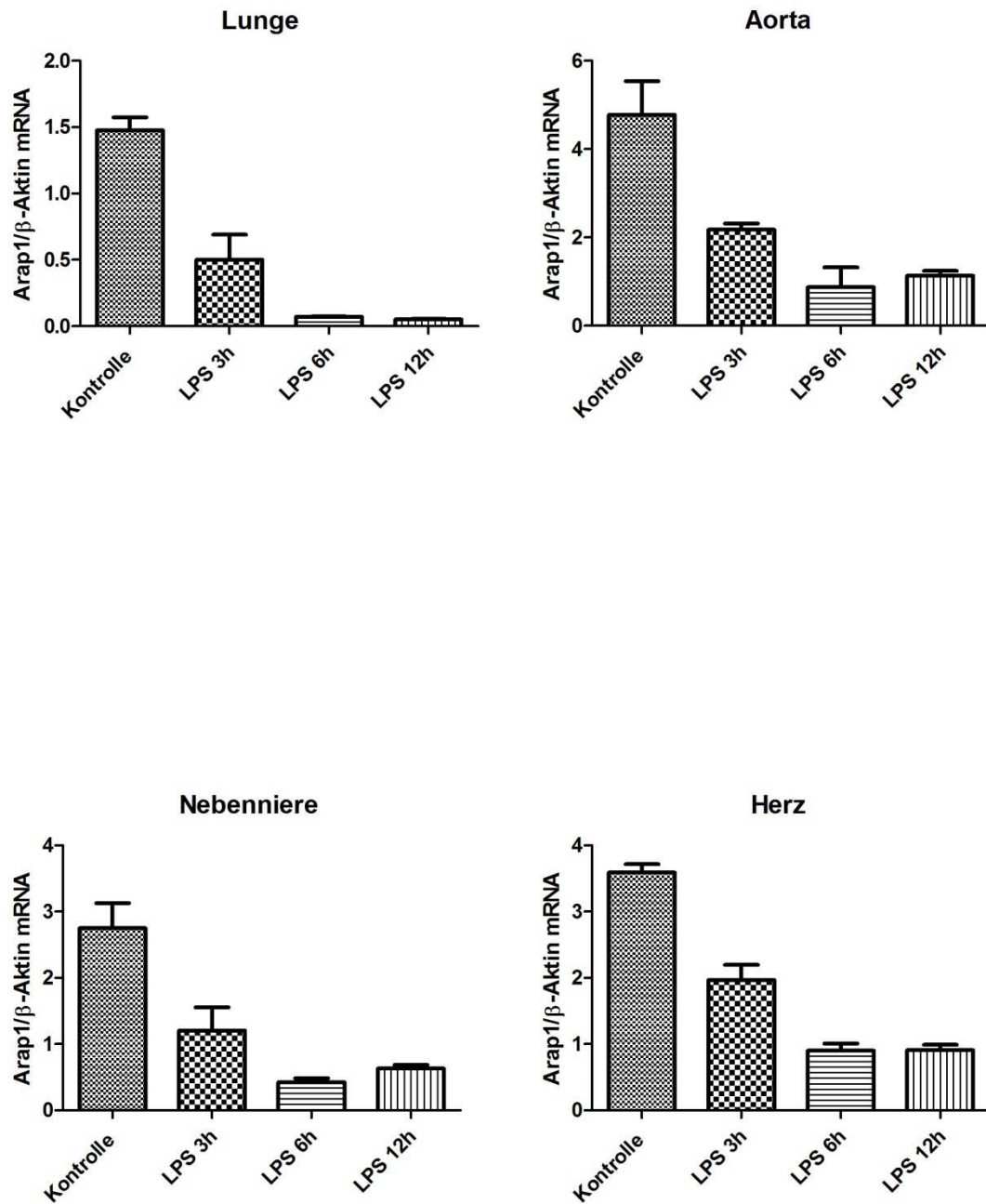


Abbildung 34: Arap1-Expression in der Lunge, Aorta, Nebenniere und im Herz 3, 6 bzw. 12 Stunden nach Injektion von LPS. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 3$).

In diesen *in-vivo* Sepsis-Modellen findet somit eine starke Verminderung der Arap1-Expression in der Niere und in weiteren Organen statt.

3.6.3 Expression von Arap1 *in-vitro* in Gegenwart von Zytokinen

Die *in-vivo* Befunde wurden daraufhin *in-vitro* genauer analysiert. Dabei wurde die Zelllinie glomerulärer Mesangialzellen der Ratte mit einem Zytokin-Mix für 20 Stunden inkubiert. Der Zytokin-Mix bestand aus Interleukin-1 β (Interleukin-1 β , 50 ng/ml), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α , 100 ng/ml) und Interferon- γ (IFN- γ , 100 ng/ml). Die Arap1-Expression wurde durch die Zytokine um $40\pm 7\%$ erniedrigt (Abbildung 35) ($p = 0,004$).

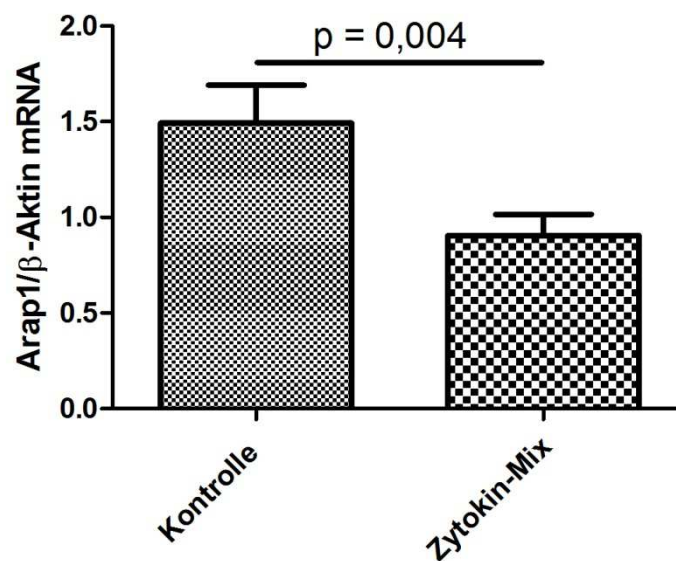


Abbildung 35: Arap1-mRNA-Expression glomerulärer Mesangialzellen der Ratte nach Inkubation mit einem Zytokin-Mix (IL-1 β 50 ng/ml; TNF- α 100 ng/ml; IFN- γ 100 ng/ml) für 20 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben ($n = 12$).

Die Wirkung einzelner Zytokine auf die Arap1-Expression wurde im folgenden Experiment untersucht. Mesangialzellen wurden 20 Stunden mit 50 ng/ml Interleukin-1 β (IL-1 β), 100 ng/ml Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder 100 ng/ml Interferon- γ (IFN- γ) inkubiert. Anschließend wurde die Expression von Arap1 untersucht und mit unbehandelten Zellen verglichen. Die Einwirkung von IL-1 β hatte zwar tendenziell eine Verringerung der Arap1-Expression ($85\pm 16\%$ des Kontrollwerts) zur Folge, allerdings war diese nicht signifikant ($p = 0,4$). Die Zytokine TNF- α und IFN- γ riefen eine Reduktion der Arap1-Expression um $51\pm 7\%$ bzw. $38\pm 3\%$ hervor ($p \leq 0,002$) (Abbildung 36).

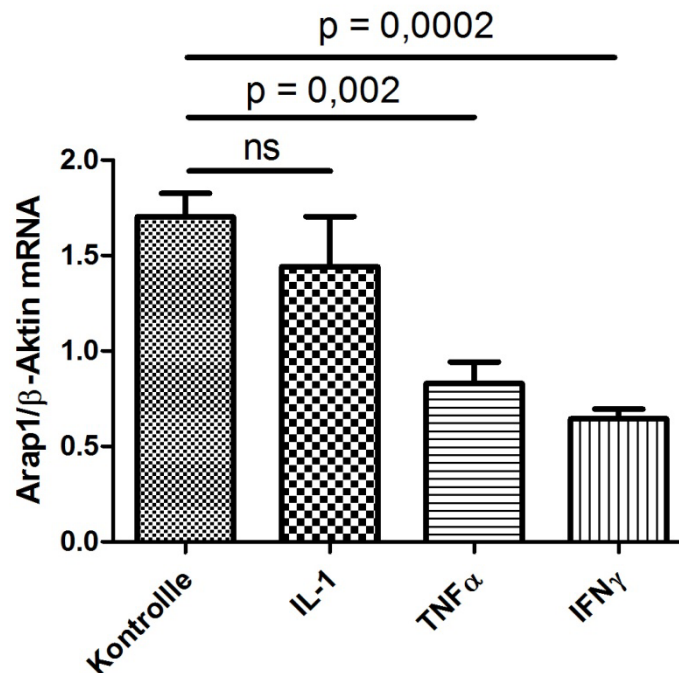


Abbildung 36: Arap1-mRNA-Expression nach 20h Inkubation glomerulärer Mesangialzellen der Ratte mit IL-1 (50 ng/ml), TNF-α (100 ng/ml) und IFN-γ (100 ng/ml) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). Werte sind relativ im Verhältnis zu β-Aktin angegeben (n = 4).

3.6.4 Expression von Arap1 *in-vitro* in Gegenwart von Zytokinen und Angiotensin II

Es stellt sich die Frage, ob die Zytokine über den gleichen Signalweg wie Angiotensin II die Arap1-Expression regulieren. Wären verschiedene Signalwege beteiligt, würde eine Koinkubation von Angiotensin II und Zytokinen die Arap1-Expression stärker reduzieren als dies bei einem gemeinsamen Weg der Signaltransduktion der Fall wäre.

Um dies zu untersuchen, wurden Mesangialzellen mit einem Zytokin-Mix (IL-1β 50 ng/ml; TNF-α 100 ng/ml; IFN-γ 100 ng/ml) mit Angiotensin II (10^{-4} M) für 20 Stunden koinkubiert. Der Rückgang der Arap1-Expression war sowohl im Fall der Koinkubation mit Angiotensin II und dem Zytokin-Mix als auch bei Inkubation mit entweder Angiotensin II oder Zytokin-Mix ähnlich stark. So betrug die Expression in Gegenwart von Angiotensin II und den Zytokinen $46 \pm 15\%$, mit Angiotensin II $33 \pm 6\%$ und in Gegenwart der Zytokine $48 \pm 3\%$ der Arap1-Expression der Kontrolle. (Abbildung 37).

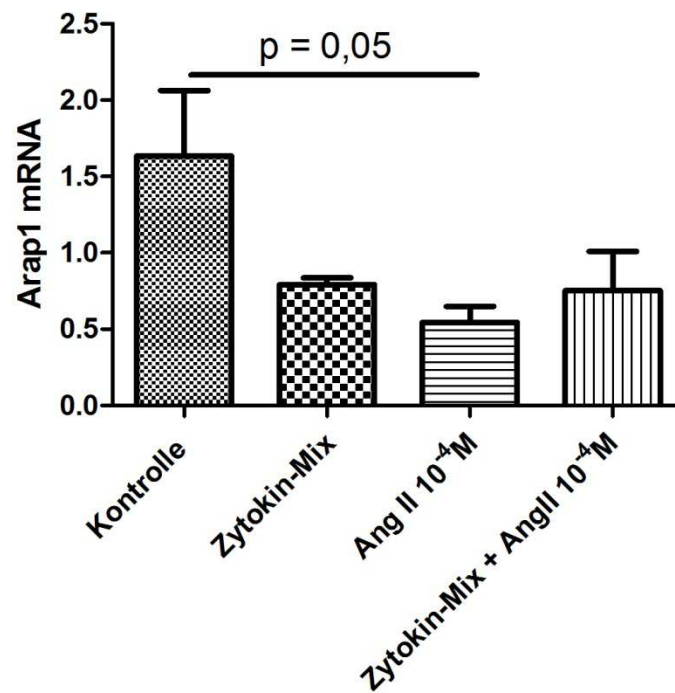


Abbildung 37: Arap1-mRNA-Expression nach 20 h Inkubation von glomerulären Mesangialzellen mit einem Zytokin-Mix (IL-1 β 50 ng/ml; TNF- α 100 ng/ml; IFN- γ 100 ng/ml) bzw. Angiotensin II (10⁻⁴ M) und Koinkubation von Zytokin-Mix und Angiotensin II (IL-1 β 50 ng/ml; TNF- α 100 ng/ml; IFN- γ 100 ng/ml; Ang II 10⁻⁴ M) (n = 4).

4 Diskussion

AT1-Rezeptoren vermitteln die klassischen Effekte des RAS. Damit sind sie die wichtigsten letzten Stellglieder im RAS. Ihre Regulierung ermöglicht eine Modulation der Effektivität des RAS. AT1-Rezeptoren lassen sich potenziell durch ihre Expression, durch Modifikationen (wie Phosphorylierung) und Veränderung der Oberflächenexpression regulieren. In diesem Zusammenhang wurden Interaktionsproteine beschrieben, die durch ihre Assoziierung mit dem Rezeptor die Rezeptordichte an der Zelloberfläche modulieren können.

In dieser Arbeit wurde die Lokalisierung und Regulation eines solchen AT1 Rezeptor-assoziierten Proteins, Arap1, fokussiert auf die Niere, untersucht. In der Literatur wird Arap1 als positiver Regulator der Oberflächenexpression des AT1-Rezeptors beschrieben. *In-vitro* Studien zeigten, dass bei Überexpression von Arap1 der AT1-Rezeptor nach Bindung von Angiotensin II und darauffolgender Internalisierung ins Zellinnere, schneller wieder an die Plasmamembran zurückkehrt als in Abwesenheit von Arap1. Das bedeutet, dass Arap1 die Zelle bzw. das Gewebe sensibler gegenüber Angiotensin II macht. Die Ergebnisse zur Lokalisation und Regulation von Arap1 *in-vivo* und *in-vitro* in dieser Arbeit sprechen für eine Rolle von Arap1 als lokalen Regulator des RAS.

4.1 Lokalisation von Arap1

Anhand der Lokalisationsstudie konnte demonstriert werden, dass viele Organe der Maus Arap1 exprimieren. Dabei ist die Expressionsrate im Herz und in der Niere am höchsten. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein, die darlegen, dass Arap1 mRNA im Herz, im Gehirn, in der Lunge, in der Leber, in der Niere und im Hoden exprimiert wird, wobei dies im Herzen am stärksten der Fall ist [Guo, D.F. et al., 2003].

Eine genauere Analyse der Lokalisation von Arap1 in der Mausniere ergab, dass Arap1 vor allem in den Blutgefäßen vorkommt, und hier speziell in den glatten Gefäßmuskelzellen. Da hier auch AT1-Rezeptoren exprimiert werden [Miyata, N. et al., 1999; Harrison-Bernard, L.M. et al., 1997; Gasc, J.M. et al., 1994], bedeutet das, dass Arap1 und AT1-Rezeptoren in diesem Gewebe mit zentraler Funktion für die Niere interagieren können. Die AT1-Rezeptoren der Blutgefäße können den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate steuern [Arendshorst, W.J. et al., 1999]. Arap1 könnte also in den glatten Gefäßmuskelzellen über eine Regulation des AT1-Rezeptors den Tonus der renalen Blutgefäße und damit die renale Natriumausscheidung mitgestalten.

Im Gegensatz zur glatten Gefäßmuskulatur konnte Arap1 in den juxtaglomerulären reninbildenden Zellen nicht nachgewiesen werden. Auch hier werden aber AT1-Rezeptoren exprimiert. Angiotensin II bewirkt durch Aktivierung dieser AT1-Rezeptoren direkt eine Hemmung der Reninsekretion. Dieser direkte negative Rückkopplungsmechanismus erlaubt, dass hohe Angiotensin II-Spiegel selbst die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems wieder reduzieren. Dieser Effekt würde durch Arap1 abgeschwächt werden. Die Abwesenheit von Arap1 könnte also den direkten negativen Rückkopplungsmechanismus im Renin-Angiotensin-System bewahren.

Weiterhin zeigte die Lokalisationsstudie, dass das glomeruläre Mesangium mit den Mesangialzellen einen weiteren Expressionsort von Arap1 darstellt. Auch hier erfüllen die AT1-Rezeptoren wesentliche Funktionen. Die glomerulären Mesangialzellen regulieren die glomeruläre Filtration in Abhängigkeit von Angiotensin II [Gasc, J.M. et al., 1994]. Durch Arap1 ist folglich auch hier eine Möglichkeit vorhanden, die Aktivität der AT1-Rezeptoren zu modulieren.

Dagegen konnte Arap1 nicht im Endothel der Blutgefäße festgestellt werden. Angiotensin II kann durch Bindung an die AT1-Rezeptoren der Endothelzellen Zellalterung aufgrund oxidativen Stress verursachen [Savoia, C. et al., 2011]. Arap1 würde hier eine potenziell schädigende Wirkung von Angiotensin II fördern.

Ebenfalls wurde Arap1 nicht in den proximalen Tubuli lokalisiert. Die AT1-Rezeptoren des proximalen Tubulus treiben die Natriumresorption an, indem sie zwei Natriumtransporter stimulieren, den luminalen Natrium-Protonen-Antiporter und die basolateralen Natrium-Kalium-ATPase [Schuster, V.L. et al., 1984; Geibel, J. et al., 1990]. Hier scheint Arap1 also keine Rolle zu spielen. Möglich ist aber auch, dass die tubuläre Arap1-Expression gering ist und damit unter dem Detektionslimit des Antikörpers liegt. Im Vergleich zur deutlichen Detektion in renalen Blutgefäßen, muss die tubuläre Arap1-Expression damit aber so schwach sein, dass sie nur sehr unwahrscheinlich großen Einfluss auf die Funktion der tubulären AT1-Rezeptoren ausüben kann.

Der proximale Tubulus ist jedoch der Hauptexpressionsort von ATRAP, einem weiteren wichtigen AT1-Rezeptor-assoziierten Protein [Oppermann, M. et al., 2010]. ATRAP senkt im Gegensatz zu Arap1 die Sensitivität des Gewebes auf Angiotensin II, da es die Oberflächenexpression der AT1-Rezeptoren reduziert [Azuma, K. et al., 2007]. Da Arap1 und ATRAP in der Niere jedoch nicht kolokalisiert sind, sind sie keine direkten Gegenspieler. Vielmehr könnten sie gemeinsam die Wirkung von Angiotensin II, um eine optimale Funktion der renalen Gewebe zu ermöglichen (siehe 4.2.4).

Im humanen Nierengewebe wird Arap1 ebenfalls in den kortikalen und medullären Blutgefäßen, insbesondere in den glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Dies steht im

Einklang mit der Expression von Arap1 in der Mausniere und impliziert eine vergleichbare Relevanz in beiden Spezies. Allerdings zeigte sich im humanen Gewebe keine Expression von Arap1 in den Glomeruli. Ob die Lokalisation von Arap1 in der Niere speziesabhängig ist oder die Färbung aufgrund unterschiedlicher Vorbehandlung der Gewebe keine übereinstimmenden Ergebnisse zeigte, ist unklar.

Arap1-Protein Expression konnte auch in weiteren Organen nachgewiesen werden. Im Herz, in der Aorta und in der Lunge exprimieren die glatten Gefäßmuskelzellen Arap1. Auch hier wird der AT1-Rezeptor exprimiert [Paxton, W.G. et al., 1993].

Es zeigte sich, dass Arap1 gemeinsam mit dem AT1-Rezeptor auftritt. Dies ermöglicht, die in früheren *in-vitro* Studien belegte Interaktion der beiden Proteine auch *in-vivo*.

4.2 Regulation der Arap1-Expression

4.2.1 Wirkung von Angiotensin II auf die Arap1-Expression in der Niere

Die Ergebnisse zur Regulation von Arap1 bei unterschiedlichen Aktivitätszuständen des Renin-Angiotensin-Systems *in-vivo* deuten darauf hin, dass die Expression von Arap1 direkt von den zirkulierenden Angiotensin-Spiegeln im Blut abhängig ist.

Die orale Kochsalzaufnahme ist ein wesentlicher Faktor, der unmittelbar die Reninsekretion und damit die Höhe der Angiotensin II-Konzentration in der Zirkulation bestimmt [Wagner, C. et al., 1998]. Eine erhöhte orale Kochsalzaufnahme hat damit niedrige Angiotensinwerte zur Folge. In dieser Situation vermindert sich die Expression von Arap1 in der Niere signifikant im Vergleich zur normalen Kochsalzaufnahme. Eine zu niedrige Kochsalzaufnahme wie bei der Niedrigsalzdiät erhöht indes die Reninsekretion und folglich die Bildung von Angiotensin II. Im vorliegenden Experiment unterschied sich die Arap1-Expression in diesem Fall nicht signifikant von jener bei normaler Kochsalzaufnahme. Bei einer Niedrigsalzdiät ist zu erwarten, dass der Plasmaprenin Spiegel um ca. 50% im Vergleich zur Normalsalzdiät erhöht ist [Kim, S.M. et al., 2008; Wang, Q. et al., 2001]. Wir vermuten, dass hier die erhöhten Angiotensin II-Spiegel nicht ausreichen, um die Arap1-Expression signifikant zu verändern.

Im folgenden Fall „Wassermangel“ können Mäuse für 48 Stunden kein Wasser zu sich nehmen. Durch die Kontraktion des Plasmavolumens wird das Renin-Angiotensin-System aktiviert, Angiotensin II wird vermehrt gebildet. In dieser Situation sinkt die Expression von Arap1 sowohl auf mRNA wie auf Proteinebene deutlich ab. Aus anderen Studien ist bekannt, dass ein Volumenverlust durch Wassermangel oft stärkere Auswirkungen auf den Plasmaprenin Spiegel hat als eine Niedrigsalzdiät mit normaler Wasseraufnahme [Lantelme, P. et al., 2002]. Die Erhöhung der Plasmapreninaktivität kann

bei Wassermangel mehr als das Sechsfache des Anstiegs der Plasmapareninaktivität bei Nidrigsalzdiät betragen [DeLuca, L.A. et al., 2002]. So sind in diesem Fall hohe Angiotensin II-Spiegel erreicht, die die Arap1-Expression negativ beeinflussen.

Sehr deutlich ist diese Beziehung im Fall der unilateralen Nierenarterienstenose. Auch hier sind bekanntlich eine stark erhöhte Plasmapareninaktivität und erhöhte Angiotensin II-Spiegel vorhanden [Pickering, T.G. et al., 1989]. Die Arap1-Expression wird dementsprechend in der ischämischen wie auch in der kontralateralen Niere verringert.

In so unterschiedlichen Versuchsmodellen wie Salzdiät, Wassermangel und unilaterale Nierenarterienstenose schien immer ein aktives RAS hemmend auf die Expression von Arap1 zu wirken und umgekehrt. Wir vermuten, dass die Arap1-Expression direkt von Angiotensin II gesteuert wird. Denkbar wäre auf den ersten Blick auch, dass Angiotensin II indirekt beispielsweise über den Perfusionsdruck bzw. Blutdruck die Expression von Arap1 kontrolliert. Dass der renale Perfusionsdruck die Hauptursache der veränderten Arap1-Expression darstellt, erscheint im Fall der Nierenarterienstenose unwahrscheinlich. Denn dieser sollte sich in der ischämischen und kontralateralen Niere deutlich unterscheiden. Die Stenose hat eine mangelhafte Durchblutung in der Niere zur Folge, damit ist auch der Perfusionsdruck niedrig. Dagegen ist die kontralaterale Niere gut durchblutet und weist einen erhöhten Perfusionsdruck auf. Jedoch kommt es aufgrund des niedrigen Perfusionsdrucks der ischämischen Niere zu einer verstärkten Reninsekretion. Folglich entsteht mehr Angiotensin II, das auch die kontralaterale Niere wahrnimmt. Die Tatsache, dass auch die kontralaterale Niere eine ähnlich starke Verminderung in der Arap1-Expression zeigt, legt nahe, dass der hemmende Faktor beide Nieren erreichen muss, und diese Eigenschaft hat Angiotensin II.

Dazu passen auch die Ergebnisse der darauffolgenden Versuche. Eine direkte Erhöhung der Plasma-Angiotensin II-Konzentration durch chronische Angiotensin II-Infusion hat wieder eine Reduktion der Arap1-Expression zur Folge. Die Hemmung der AT1-Rezeptoren erhöht dagegen die Arap1-Expression. Im letzteren Fall kann Angiotensin II aufgrund der Blockade der AT1-Rezeptoren durch Losartan seine Wirkung auf die Zelle nicht ausüben. Angiotensin II scheint also direkt auf die Expression von Arap1 zu wirken.

4.2.2 Wirkung des Blutdrucks auf die Arap1-Expression in der Niere

Die Vermutung der Blutdruck könne die Expression von Arap1 steuern, wurde in zwei weiteren Experimenten widerlegt. In eNOS-defizienten Mäusen ist durch die fehlende endotheliale NO-Synthase der Blutdruck stark erhöht, das Renin-Angiotensin-System verhält sich jedoch normal wie im Wildtyp [Beierwaltes, W.H. et al., 2002; Ortiz, P.A. et

al., 2003]. Folglich sind trotz Bluthochdrucks die Angiotensinwerte im Normalbereich. Da auch die Arap1-Expression bei eNOS-defizienten Mäusen keinen Unterschied zu Wildtyp-Mäusen aufweist, spricht dies gegen einen Einfluss des Blutdrucks, sondern für eine direkte Abhängigkeit von Angiotensin II.

Dagegen bewirkt Hydralazin eine Absenkung des Blutdrucks. Daraus folgt eine Aktivierung des RAS und eine Erhöhung der Angiotensin II-Spiegel in der Zirkulation [Pettinger, W.A. et al., 1973]. Würde man einen Einfluss des Blutdrucks vermuten, sollten die Arap1-Expression in diesem Fall ansteigen. Tatsächlich verringert sich jedoch die Arap1-Expression in den Hydralazin-behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Diese Versuche legen nahe, dass der entscheidende Mediator der Arap1-Expression Angiotensin II ist und dass Angiotensin II einen hemmenden Effekt ausübt.

4.2.3 Wirkung von Angiotensin II auf die Arap1-Expression in weiteren Organen

Dieser inhibierende Einfluss von Angiotensin II auf die Arap1-Expression scheint gewebespezifisch zu sein. Erste Untersuchungen in anderen Organen wie im Herz und in der Nebenniere ergaben, dass Angiotensin II keinen Effekt bzw. einen stimulierenden Effekt auf die Expression von Arap1 zu haben scheint. In der Nebenniere könnte dies möglicherweise dazu beitragen, dass bei hohen Angiotensinwerten die Aldosteronsekretion lange aufrechterhalten werden kann [Castrop, H. et al., 2010].

4.2.4 Arap1 als Modulator der Oberflächenexpression des AT1-Rezeptors *in-vivo*

In der Literatur findet man viele Arbeiten zur Expression der AT1-Rezeptoren und renale Angiotensin II-Bindungsstudien bei verschiedenen Aktivitätszuständen des RAS. So gibt es unterschiedliche Ergebnisse zur renalen AT1-Rezeptor-Expression und Bindungskapazität von Angiotensin II bei niedriger oraler Kochsalzaufnahme. Einige zeigen dabei eine Reduktion [Ruan, X. et al., 1997; Schmid, C. et al., 1997], andere zeigen eine erhöhte Expression der AT1-Rezeptoren [Du, Y. et al., 1995; Wang, D.H. et al., 1995]. Eine chronische Infusion von Angiotensin II zeigte einer weiteren Studie zufolge keine veränderte AT1-Rezeptor Expression, jedoch eine verminderte Bindungskapazität für Angiotensin II. Es wurde vermutet, dass die geringere AT1-Rezeptordichte aufgrund eines posttranskriptionellen Regulierungsmechanismus zustande kommt [Sechi, L.A. et al., 1996]. Dieser Mechanismus könnte unseren Ergebnissen nach durch die Wirkung von Arap1 bewerkstelligt werden. Die erhöhte Plasma-Angiotensin II-Konzentration bewirkt eine verminderte Expression von Arap1. Damit wird der Rück-

transport der AT1-Rezeptoren zur Plasmamembran vermindert, und die Rezeptordichte verringert. Arap1 könnte damit auch *in-vivo* als Modulator der Oberflächenexpression des AT1-Rezeptors fungieren.

Diese Funktion und die Lokalisation von Arap1 in der Niere machen es möglich, dass Arap1 und ATRAP, ein negativer Modulator der AT1-Rezeptordichte [Azuma, K. et al., 2007], gemeinsam die Wirkung von Angiotensin II steuern können (Abbildung 38). Wie in 3.1.2.1 beschrieben, sind Arap1 und ATRAP in der Niere nicht kolokalisiert. Während Arap1 hauptsächlich in den Blutgefäßen exprimiert wird, findet die Bildung von ATRAP in den proximalen Tubuli statt [Oppermann, M. et al., 2010]. Wie bei Arap1, verringert sich die Expression von ATRAP in Gegenwart von hohen Angiotensin II-Spiegeln [Wakui, H. et al., 2010]. Folglich bewirken hohe Plasma-Angiotensin II-Konzentrationen eine verminderte Expression von vaskulären Arap1 und tubulären ATRAP. Daraus folgt eine verringerte Rezeptordichte in der Plasmamembran der renalen Blutgefäße, die dort die Wirkung von Angiotensin II vermindert, sowie eine gesteigerte Oberflächenexpression der AT1-Rezeptoren in den proximalen Tubuli, die dort die Wirkung von Angiotensin II erhöht. Auf diese Weise würde die glomeruläre Filtrationsrate aufrechterhalten und die tubuläre Resorption gefördert werden. Es liegt also nahe, dass das gemeinsame Wirken von Arap1 und ATRAP eine optimale Funktion der renalen Gewebe erlauben.

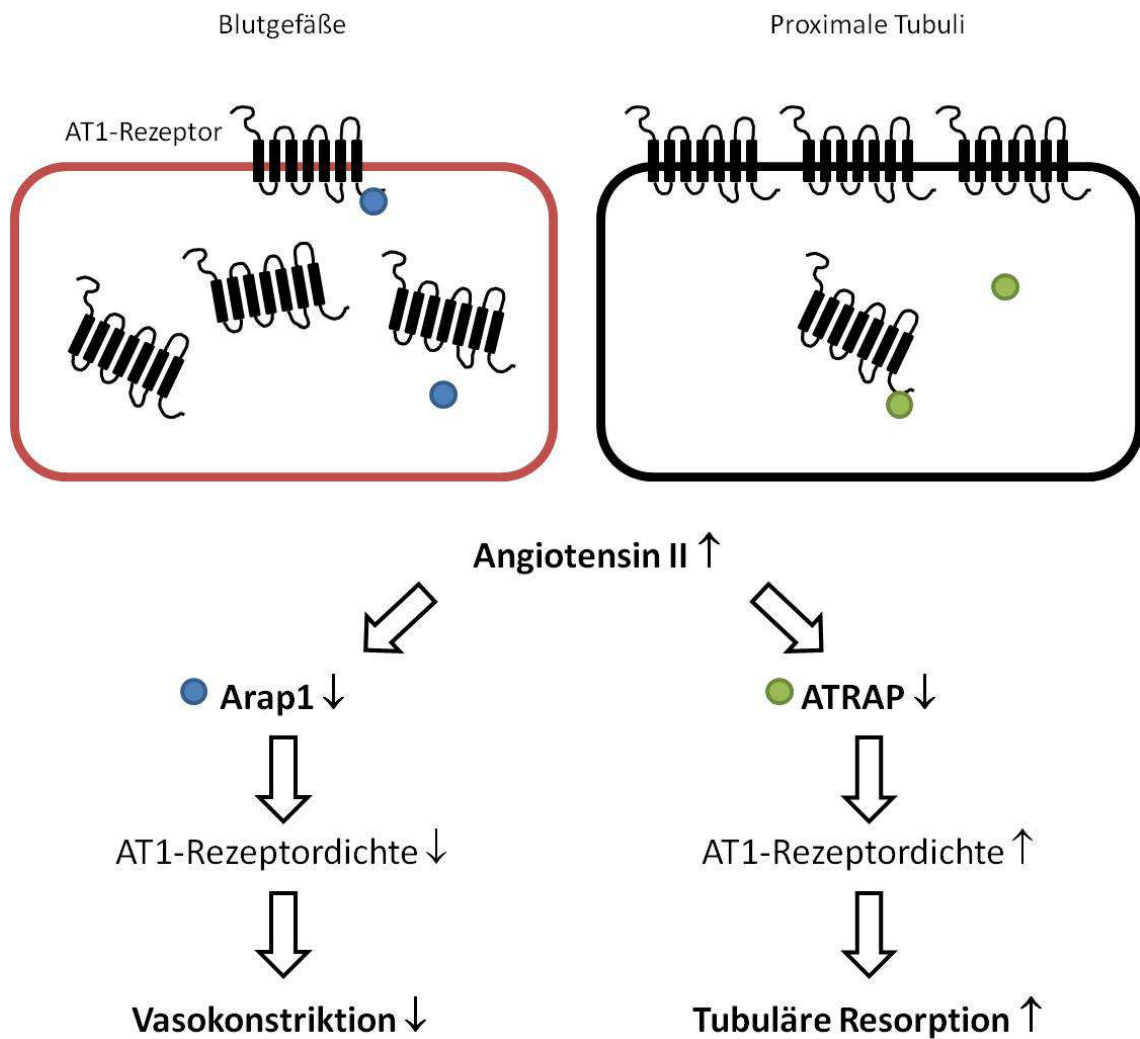


Abbildung 38: Schematische Darstellung der gemeinsamen Regulation der renalen Effekte von Angiotensin II durch Arap1 und ATRAP bei hohen Angiotensin II-Spiegeln.

4.2.5 Mechanismen der Regulation der Arap1-Expression *in-vitro*

Die *in-vivo* festgestellten Befunde wurden in *in-vitro*-Studien bestätigt. Angiotensin II hat auch auf glomeruläre Mesangialzellen aus der Ratte eine inhibierende Wirkung, die zeit- und dosisabhängig ist. Der Effekt von Angiotensin II kann durch den AT1-Antagonisten Losartan gehemmt werden. Angiotensin II hat in der Gegenwart von Losartan somit keine inhibierende Wirkung auf die Arap1-Expression mehr. Dies legt eine Beteiligung des AT1-Rezeptors bei der Regulation der Arap1-Expression nahe. AT2-Rezeptoren werden auch von den glomerulären Mesangialzellen exprimiert, deren Inhibition durch PD123319 hat jedoch keine Auswirkung auf den Effekt von Angiotensin II bezüglich der Arap1-Expression. Die Verringerung der Arap1-Expression durch den Aktivator der Proteinkinase C, PMA, impliziert eine Beteiligung der Proteinkinase C bei der Signalübertragung. Für die Identifizierung des Signalwegs, der vermutlich nach Aktivierung des AT1-Rezeptors die Expression von Arap1 antreibt, ist dieses Ergebnis

nur ein erster Anhaltspunkt. Grundsätzlich scheint aber die Expression von Arap1 hauptsächlich unter transkriptioneller Kontrolle zu stehen, da sie sowohl auf mRNA- wie auf Proteinebene analog reguliert wird.

4.2.6 Rolle von Arap1 in pathologischen Situationen wie der Sepsis

In bestimmten pathologischen Situationen bleibt die Blutdruckregulation des RAS wirkungslos. So ist in der Sepsis das RAS stark hyperaktiviert, die Angiotensin-Spiegel sind deutlich erhöht [Schaller, M.D. et al., 1985]. Dies geschieht in Folge des Blutdruckabfalls, der im Rahmen einer Sepsis charakteristisch ist. Zytokine stimulieren die Bildung von NO und Prostaglandinen, die eine Vasodilatation der Blutgefäße und damit einen verminderten vaskulären Widerstand bewirken [Landry, D.W. et al., 2001]. Trotz der hohen Angiotensin II-Konzentrationen kann der Blutdruck nicht mehr auf ein normales Niveau stabilisiert werden. Die hohen Angiotensin II-Spiegel selbst und die aus der Hypotonie resultierende Minderdurchblutung der Organe tragen dazu bei, dass eine Sepsis immer noch eine lebensbedrohliche Situation darstellt. Die Hypotonie, trotz hoher Konzentration von Vasokonstriktoren, wird auf eine verminderte vaskuläre Empfindlichkeit zurückgeführt [Schaller, M.D. et al., 1985]. Es wird immer noch spekuliert, woraus sich diese ergibt. *In-vitro* Studien zeigten bereits eine mögliche verminderte Expression von vasokonstriktorisches Rezeptoren (z.B. AT1-Rezeptor) oder einer erhöhten Präsenz des vasodilatatorisch wirkenden AT2-Rezeptors [Maquigussa, E. et al., 2010].

In ersten Experimenten zur Expression von Arap1 bei Sepsis *in-vivo*, zeigte sich in vielen Organen eine verminderte Expression von Arap1. Diese steht im Einklang mit der Hypothese, dass hohe Angiotensin II-Spiegel hemmend auf die Expression von Arap1 wirken.

Dieser Befund wirft außerdem den Gedanken auf, dass die verminderte Expression von Arap1 und die damit reduzierte AT1-Rezeptordichte in der Plasmamembran zur herabgesetzten vaskulären Empfindlichkeit auf Angiotensin II beitragen könnte.

Wie andere Organe wird auch die Niere bei einer Sepsis minderdurchblutet, und es folgt eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate. Die glomerulären Mesangialzellen regulieren per Kontraktion bzw. Relaxation die sogenannte glomeruläre Oberfläche (*glomerular surface area*), die den glomerulären Ultrafiltrationskoeffizienten K_f bestimmt. Dieser trägt wiederum zur glomerulären Filtrationsrate (GFR) bei. In Sepsis-Studien mit Ratten wurde allerdings ein unveränderter K_f festgestellt [Lugon, J.R. et al., 1989]. Es ist denkbar, dass, in Folge der hohen Angiotensin II-Spiegel, die geringere Expression von Arap1 die Wirkung von Angiotensin II auf die Mesangialzellen redu-

ziert, so dass eine Kontraktion der Mesangialzellen nicht zum Tragen kommt und der K_f konstant bleibt. Die verringerte GFR ergibt sich bei Sepsis wohl vielmehr durch den veränderten Perfusionsdruck.

Arap1 könnte also auch bei der verringerten Wirkung von Angiotensin II in Folge einer Sepsis eine Rolle spielen.

4.2.7 Wirkung von Zytokinen auf die Arap1-Expression *in-vitro*

Nicht nur die Konzentration von Angiotensin II ist in der Sepsis stark erhöht, auch andere Mediatoren werden vermehrt gebildet. So steigen auch die Zytokin-Spiegel in einer Sepsis an.

Ihre Wirkung auf die Expression von Arap1 wurde *in-vitro* untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Zytokine einen hemmenden Effekt auf die Arap1-Expression ausüben. Vor allem scheinen TNF- α und IFN- γ an der Reduktion beteiligt zu sein. Jedoch ist es denkbar, dass auch IL-1 α bei einer entsprechenden Konzentration die Arap1-Expression beeinflusst. Die Frage, ob Angiotensin II und Zytokine dieselben Signalwege aktivieren, um die Arap1-Expression zu reduzieren, wurde durch Koinkubation von Angiotensin II und einem Zytokin-Mix untersucht. Dabei scheint es, als ob beide Agonisten denselben Signalweg aktivieren, da es zu keiner additiven Verringerung der Arap1-Expression kam. Um die Rolle von Arap1 bei Sepsis genauer zu beleuchten, sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

Die Expression des AT1-Rezeptor-assoziierten Proteins Arap1 wird somit direkt von Angiotensin II sowie von Zytokinen gehemmt. Es ist naheliegend, dass es durch die Regulation der AT1-Rezeptordichte lokal die Wirkung von Angiotensin II moduliert und so als lokaler Regulator des RAS fungiert. Bei einer Sepsis könnte Arap1 zur reduzierten vaskulären Reaktivität beitragen.

5 Zusammenfassung

Alle klassischen Effekte des Renin-Angiotensin-Systems werden durch die Wirkung von Angiotensin II vermittelt. Angiotensin II erhöht direkt und indirekt die Resorption von Natrium in der Niere und stimuliert die Ausschüttung von Aldosteron in der Nebennierenrinde. Dies führt zu einer Zunahme des Extrazellulärvolumens. Außerdem ruft Angiotensin II eine Vasokonstriktion der Blutgefäße hervor und steigert somit den peripheren Widerstand. Zusammen erfolgt daraus ein Anstieg des Blutdrucks. Diese Wirkungen werden im Wesentlichen über die Aktivierung von Angiotensin II Typ1-Rezeptoren vermittelt. Die Aufgabe des RAS besteht somit darin, den Blutdruck bei sich ändernden physiologischen Bedingungen zu stabilisieren. Diese Funktion ist bei bestimmten Krankheitsbildern, wie z.B. im Rahmen eines septischen Kreislaufversagens, gestört. Auch hohe Angiotensin II-Spiegel reichen in diesem Fall nicht aus, um einen kritischen Blutdruckabfall entgegenzuwirken.

Angiotensin II erreicht als Hormon durch den Blutkreislauf alle zugänglichen Gewebe. Folglich sind alle Zellen mit Angiotensin II-Rezeptoren den Wirkungen von Angiotensin II ausgesetzt. Um trotzdem lokal begrenzt auf sich ändernde Angiotensin II-Spiegel in der Zirkulation reagieren zu können, haben sich Mechanismen entwickelt, die es ermöglichen, lokal den Effekt von Angiotensin II zu regulieren. Eine Möglichkeit hierfür sind Angiotensin II Rezeptor-assoziierte Proteine, die die Oberflächenexpression der Rezeptoren modulieren können.

Arap1 (*Angiotensin II-receptor-associated protein 1*) ist ein Vertreter dieser Proteine. Es bindet an die C-terminale Domäne des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors. Funktionell konnten Guo et. al. zeigen, dass Arap1 *in-vitro* den Rücktransport des Rezeptors zur Plasmamembran nach dessen Internalisierung katalysiert.

Zur Untersuchung der Relevanz von Arap1 als lokalen Regulator des Renin-Angiotensin-Systems *in-vivo*, wurde die Lokalisation von Arap1 in der Maus sowie im Menschen ermittelt und die Expression von Arap1 bei verschiedenen Aktivitätszuständen des Renin-Angiotensin-Systems analysiert. So konnte gezeigt werden, dass Arap1 hauptsächlich im Herz und in der Niere exprimiert wird. In der Niere ist der Großteil von Arap1 im Cortex zu finden, ein geringerer Teil in der Medulla. Im Cortex ist Arap1 in den glatten Gefäßmuskelzellen von sowohl großen Arterien als auch kleinen Widerstandsgefäßen, insbesondere der afferenten Arteriolen, lokalisiert. Arap1 ist weder im vaskulären Endothelium noch in den juxtaglomerulären Zellen nachweisbar. In den Glomeruli wird Arap1 von den Mesangialzellen exprimiert, im Gegensatz zu Podozyten

und glomerulären Kapillaren. In der renalen Medulla ist die Expression von Arap1 auf die glatten Gefäßmuskelzellen der Vasa recta begrenzt. Die Zellen des Sammelrohrs und das Tubulussystem zeigen keine Expression von Arap1. In der humanen Niere liegt eine ähnliche Verteilung entlang der kortiko-medullären Achse vor wie in der Mausniere. Auch hier ist Arap1 in den glatten Gefäßmuskelzellen der kortikalen und medullären Blutgefäße lokalisiert. Folglich wird Arap1 in Geweben exprimiert, die auch AT1-Rezeptoren besitzen.

Die Untersuchung einer möglichen Regulation der Arap1-Expression in der Niere ergab, dass in der Mausniere die Expression von Arap1 direkt von den Angiotensin II-Spiegeln in der Zirkulation abhängt. Unter Bedingungen eines nicht aktivierten Renin-Angiotensin-Systems und damit bei niedrigen Angiotensin II-Konzentrationen im Blut, war in der Niere eine Erhöhung der Arap1-Expression zu erkennen. Im Gegensatz dazu, war bei aktiviertem Renin-Angiotensin-System und damit hohen Angiotensin II-Spiegeln, wie bei einer unilateralen Nierenarterienstenose oder bei Wassermangel, die Arap1-Expression in der Niere supprimiert. Eine experimentelle direkte Erhöhung der Angiotensin II-Konzentration in der Zirkulation führte ebenfalls zu einer Verringerung, während eine Blockade der AT1-Rezeptoren die Expression von Arap1 in der Niere stimulierte. Analog zur Situation *in-vivo*, unterdrückte Angiotensin II auch in kultivierten glomerulären Mesangialzellen die Arap1-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration und Inkubationszeit.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Arap1 als lokaler vaskulärer Regulator des Renin-Angiotensin-Systems wirkt. So kann bei hohen Angiotensin II-Spiegeln und damit verminderter vaskulärer Expression von Arap1 eine adäquate renale Durchblutung aufrechterhalten werden, die Natriumresorption im tubulären System jedoch gleichzeitig stimuliert werden.

Im Rahmen einer Sepsis kommt es trotz hoher Angiotensin II-Spiegel in der Zirkulation zu einem starken Blutdruckabfall bis hin zum Kreislaufversagen. Die Expression von Arap1 wurde während einer experimentellen Sepsis *in-vivo* sowie durch Zytokine *in-vitro* deutlich vermindert. Die daraus folgende reduzierte Oberflächenexpression der AT1-Rezeptoren könnte ursächlich für das während einer Sepsis beobachtete weitgehende Ausbleiben einer vasokonstriktorischen Reaktion auf Angiotensin II sein.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die während der letzten drei Jahre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hayo Castrop für die Vergabe des Themas sowie für die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmittel und Geräte. Seine kompetente Betreuung, seine fachliche Unterstützung, die stets „offene Tür“ bei Fragen und das vertrauensvolle Verhältnis waren ideale Bedingungen für die Anfertigung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Richard Warth für seine Bereitschaft als erster Mentor im Rahmen der Graduiertenschule diese Arbeit mit Tipps und Anregungen zu unterstützen.

Herrn PD Dr. Klaus Höcherl möchte ich für die hilfreichen Ideen und Ratschläge sowie für die Bereitstellung von Reagenzien und von Probenmaterial bedanken.

Bei meinen Arbeitsgruppenkolleginnen Vroni und Isabel möchte ich mich für das Korrekturlesen bedanken.

Frau Dr. Birgül Kurt und Anna M`Bangui möchte ich für die Bereitstellung von Antikörpern und für die Ratschläge zur Immunhistochemie danken.

Sehr wichtig war mir das perfekte kollegiale Klima, das sich nicht nur auf die Arbeit beschränkte. Vielen Dank für die schöne Zeit an meine Arbeitsgruppe Vroni, Isabel, Bernhard, Katharina und Ina sowie an Andrea, Gerda, Christian, Käthe, Julia, Katharina, Björn, Dominik, Meli, Ramona, Birgül und die Kollegen aus dem zweiten Stock.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts bedanke ich mich ebenfalls für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester Anna, meinen Freunden und ganz besonders Markus für die mentale Unterstützung danken.

Anhang A: Literaturverzeichnis

- Apfeldorf, W.J. et al.**, Simultaneous determination of intracellular free calcium and aldosterone production in bovine adrenal zona glomerulosa, 1988, *Cell Calcium*, 9, 71-80
- Arendshorst, W.J. et al.**, Actions of angiotensin II on the renal microvasculature, 1999, *J Am Soc Nephrol*, 10, 149-161
- Azuma, K. et al.**, Novel regulatory effect of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule on vascular smooth muscle cells, 2007, *Hypertens*, 50, 926-932
- Bader, M. et al.**, Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: targets of pharmacological therapy, 2010, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 439-465
- Basso, N. et al.**, History about the discovery of the renin-angiotensin-system, 2001, *Hypertens*, 38, 1246-1249
- Bautista, R. et al.**, Angiotensin II type AT(2) receptor mRNA expression and renal vasodilation are increased in renal failure, 2001, *Hypertension*, 38, 669-673
- Becherer, K.A. et al.**, Novel syntaxin homologue, PEP12b, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast, 1996, *Mol Biol Cell*, 7, 579-594
- Beierwaltes, W.H. et al.**, Renal baroreceptor-stimulated renin in the eNOS knockout mouse, 2002, *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, 59-64
- Brock, T.A. et al.**, Angiotensin increases cytosolic free calcium in cultured vascular smooth muscle cells, 1985, *Hypertens*, 7, 1105-1109
- Brown, R. et al.**, Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice, 2001, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281, 1362-1367
- Bucher, M. et al.**, Downregulation of angiotensin II type 1 receptor during sepsis, 2001, *Hypertens*, 38, 177-182
- Carraro-Lacroix, L.R. et al.**, Signaling pathways involved with the stimulatory effect of Angiotensin II on vacuolar H⁺-ATPase in proximal tubule cells, 2006, *Eur J Physiol*, 452, 728-736

- Cassis, L.A. et al.**, Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. Angiotensin receptors in adipose tissue, 1996, Adv Exp Med Biol, 396, 39-47
- Cassis, L.A. et al.**, Local adipose renin-angiotensin system, 2008, Curr Hypertens Rep, 10(2), 93-98
- Castrop, H. et al.**, Physiology of Kidney Renin, 2010, Physiol Rev, 90, 607-673
- Cook, J.L. et al.**, The trafficking protein GABARAP binds to and enhances plasma membrane expression and function of the angiotensin II type 1 receptor, 2008, Circ Res, 102, 1539-1547
- Cuadra, A.E. et al.**, A current view of brain renin-angiotensin-system: is the (pro)renin receptor the missing link?, 2010, Pharmacol Ther, 125, 27-38
- Cui, T.X. et al.**, ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth, 2000, Biochem Biophys Res Commun, 279, 938-941
- Culman, J. et al.**, Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis, 1995, Clin Exp Hypertens, 17, 281-293
- Darsow, T. et al.**, Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the vam3p vacuolar t-SNARE, 1998, J Cell Biol, 142, 913-922
- Daviet, L. et al.**, Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor, 1999, J Biol Chem, 274, 17058-17062
- De Luca, L.A. et al.**, Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes, 2000, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 282, 552-559
- DiBona, G.F. et al.**, Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers, 2000, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 279, 1517-1524
- Douglas, J.G. et al.**, Signaling mechanisms coupled to the angiotensin receptor of proximal tubular epithelium, 1990, Kidney Int, 30, 43-47
- Du, Y. et al.**, Differential regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat kidney by low dietary sodium, 1995, Hypertension, 25, 872-877
- Dzau, V.J. et al.**, Molecular biology of the renin-angiotensin system, 1988, Am J Physiol, 255, F563-F573

- Ferrario, C.M. et al.**, Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7), 1997, *Hypertension*, 30, 535-541
- Friis, U.G. et al.**, Prostaglandin E₂ EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells, 2005, *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, 989-997
- Gasc, J.M. et al.**, Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes, 1994, *Hypertens*, 24, 531-537
- Gasc, J.M. et al.**, Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study, 1994, *Hypertension*, 24, 531-537
- Geibel, J. et al.**, Angiotensin II stimulates both Na⁺-H⁺ exchange and Na⁺/HCO₃⁻ cotransport in the rabbit proximal tubule, 1990, *Proc Natl Acad Sci*, 87, 7917-7920
- Giacchetti, G. et al.**, Angiotensin II and the adrenal, 1996, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23, 119-124
- Grady, E.F. et al.**, Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus, 1991, *J Clin Invest*, 88(3), 921-933
- Griendling, K.K. et al.**, Angiotensin receptors and their therapeutic implications, 1996, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 281-306
- Griendling, K.K. et al.**, Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells, 1986, *J Biol Chem*, 261, 19-25
- Gunther, S. et al.**, Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells, 1982, *J Cell Biol*, 92, 289-298
- Guo, D.F. et al.**, Development of hypertension and kidney hypertrophy in transgenic mice overexpressing Arap1 gene in the kidney, 2006, *Hypertens*, 48, 453-459
- Guo, D.F. et al.**, Epidermal growth factor-enhanced human angiotensin II type 1 receptor, 1994, *Hypertens*, 23(2), 1032-1035
- Guo, D.F. et al.**, The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins, 2001, *Cell Res*, 11(3), 165-180
- Guo, D.F. et al.**, Type 1 angiotensin II receptor-associated protein Arap1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane, 2003, *Biochem Biophys Res Commun*, 310(4), 1254-1265
- Hackenthal, E. et al.**, Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion, 1990, *Physiol Rev*, 70(4), 1067-1116

- Hackenthal, E. et al.**, Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion, 1990, 70, 1067-1116
- Hamming, I. et al.**, The emerging role of ACE2 in physiology and disease, 2007, J Pathol, 212(1), 1-11
- Harrison-Bernard, L.M. et al.**, Immunohistochemical localization of ANGII AT₁ receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody, 1997, Am J Physiol, 273, F170-F177
- Harrison-Bernard, L.M. et al.**, Immunohistochemical localization of ANG II AT₁ receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody, 1997, Am J Physiol Renal Physiol, 273, 170-177
- Hein, L. et al.**, Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT₁ and AT₂ receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand, 1997, Mol Endocrinol, 11, 1266-1277
- Hickey, M.J. et al.**, Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia, 1997, FASEB J, 11, 955-964
- Höcherl, K. et al.**, Inhibition of NF-κB ameliorates sepsis-induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in-vivo, 2010, Am J Physiol Renal Physiol, 298, F196-204
- Horie, S. et al.**, Long-term activation of protein kinase C causes chronic Na/H antiporter stimulation in cultured proximal tubule cells, 1992, J Clin Invest, 89, 365-372
- Horiuchi, M. et al.**, Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system, 1999, Hypertension, 33, 613-621
- Hunyady, L. et al.**, Identification of a cytoplasmic ser-thr-leu motif that determines agonist-induced internalization of the at1 angiotensin receptor, 1994, J Biol Chem, 269(50), 31378-31382
- Jaggard, J.H. et al.**, Calcium sparks in smooth muscle, 2000, Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278, 235-256
- Johnson, R.A. et al.**, Renin release in rats during blockade of nitric oxide synthesis, 1994, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 266, 1723-1729
- Kagiyama, S. et al.**, Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense, 2002, Circulation, 106, 909-912

- Kim, S.M. et al.**, Salt sensitivity of blood pressure in NKCC1-deficient mice, 2008, *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, 1230-1238
- Landry, D.W. et al.**, The pathogenesis of vasodilatory shock, 2001, *N Engl J Med*, 345(8), 588-595
- Lantelme, P. et al.**, Effects of dietary sodium and genetic background on angiotensinogen and renin in mouse, 2002, *Hypertension*, 39, 1007-1014
- Lehoux, J.G. et al.**, Both low sodium and high potassium intake increase the level of adrenal angiotensin-II receptor type 1, but not that of adrenocorticotropin receptor, 1994, *Endocrinol*, 134, 776-782
- Lopez-Illasaca, M. et al.**, The angiotensin II type 1 receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling, 2003, *Mol Cell Biol*, 14, 5038-5050
- Lugon, J.R. et al.**, Renal function and glomerular hemodynamics in male endotoxemic rats, 1989, *Kidney Int*, 36, 570-575
- MacMicking, J.D. et al.**, Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase, 1995, *Cell*, 81, 641-650
- Maquigussa, E. et al.**, Escherichia coli lipopolysaccharide impairs the calcium signaling pathway in mesangial cells: role of angiotensin II receptors, 2010, *Exp Biol Med*, 235, 761-767
- Marrero, M.B. et al.**, Direct stimulation of JAK/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor, 1995, *Nature*, 375, 247-250
- Mehta, P.K. et al.**, Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system, 2007, *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C82-C97
- Middleton, J.P. et al.**, Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/K-ATPase in kidney epithelial cells, 1993, *J Biol Chem*, 15958-15964
- Miyata, N. et al.**, Distribution of angiotensin AT₁ and AT₂ receptor subtypes in the rat kidney, 1999, *Am J Physiol Renal Physiol*, 277, 437-446
- Mogi, M. et al.**, New insights into the regulation of angiotensin receptors, 2008, *Hypertens*, 18, 138-143
- Nguyen, G. et al.**, The biology of the (pro)renin receptor, 2010, *J Am Soc Nephrol*, 21, 18-23
- Nickening, G. et al.**, Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression, 1994, *Mol Pharmacol*, 46, 653-659

- Nielsen, S. et al.**, Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine, 2002, *Physiol Rev*, 82, 205-244
- Ohkubo, N. et al.**, Angiotensin II receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myoblastic hamster hearts and inhibit cells growth and fibrillar collagen metabolism, 1997, *Circulation*, 96(11), 3954-3962
- Oliverio, M.I. et al.**, Regulation of sodium balance and blood pressure by the AT_{1A} receptor for angiotensin II, 2000, *Hypertens*, 35, 550-554
- Oppermann, M. et al.**, Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume, 2010, *J Am Soc Nephrol*, 21, 468-477
- Oppermann, M. et al.**, Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C, 1996, *J Biol Chem*, 271, 13266-13272
- Ortiz, P.A. et al.**, Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models, 2003, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, 628-638
- Oshita, A. et al.**, Attenuation of inflammatory vascular remodelling by angiotensin II type 1 receptor-associated protein, 2006, *Hypertens*, 48, 671-676
- Parillo, J.E. et al.**, Pathogenetic mechanisms of septic shock, 1993, *N Engl J Med*, 328(20), 1471-1477
- Paxton, W.G. et al.**, Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT₁ receptor, 1993, *Am J Physiol*, 264, 989-995
- Persson, P. et al.**, Renin: origin, secretion and synthesis, 2003, *J Physiol*, 552.3, 667-671
- Persson, P.B. et al.**, Endothelium-derived NO stimulates pressure-dependent renin release in conscious dogs, 1993, *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 264, 943-947
- Pettinger, W.A. et al.**, Adrenergic component of renin release induced by vasodilating antihypertensive drugs in the rat, 1973, *Circ Res*, 33(1), 82-86
- Pfeilschifter, J. et al.**, Platelet-derived growth factor inhibits cytokine induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells, 1991, *Eur J Pharmacol*, 208, 339-340
- Pickering, T.G. et al.**, Renovascular hypertension: etiology and pathophysiology, 1989, *Semin Nucl Med*, 19(2), 79-88

- Remick, D.G. et al.**, Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture, 2000, *Shock*, 13, 110-116
- Ruan, X. et al.**, Regulation of angiotensin II receptor AT1 subtypes in renal afferent arterioles during chronic changes in sodium diet, 1997, *J Clin Invest*, 99, 1072-1081
- Savoia, C. et al.**, Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension, 2011, *Expert Rev Mol Med*, 13, e11
- Saxena, P.R. et al.**, Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems, 1992, *J Cardiovasc Pharmacol*, 19, 80-88
- Schaller, M.D. et al.**, Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia, 1985, *Am J Physiol*, 249, 1086-92
- Schelling, J.R. et al.**, Angiotensin II-dependent proximal tubule sodium transport is mediated by cAMP modulation of phospholipase C, 1994, *Am J Physiol*, 267, 1239-1245
- Schmid, C. et al.**, Dietary salt intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression, 1997, *Hypertens*, 25, 923-929
- Schmid, C. et al.**, Dietary sodium intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression, 1997, *Hypertension*, 29, 923-929
- Schmidt, C. et al.**, Role of nuclear factor-kappaB-dependent induction of cytokines in the regulation of vasopressin V1A receptors during cecal ligation and puncture-induced circulatory failure, 2008, 36, 2363-2372
- Schuster, V.L. et al.**, Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules, 1984, *J Clin Invest*, 73, 507-515
- Schweda, F. et al.**, Stimulation of renin release by prostaglandin E₂ is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys, 2004, *Am J Physiol Renal Physiol*, 287, 427-433
- Schweda, F. et al.**, Substitution of connexin40 with connexin45 prevents hyperreninemia and attenuates hypertension, 2009, *Kidney Int*, 75, 482-489
- Sechi, L.A. et al.**, Tissue-specific regulation of type 1 angiotensin II receptor mRNA levels in the rat, 1996, *Hypertension*, 28, 403-408
- Shivakumar, B.R. et al.**, EP24.15 interacts with the angiotensin II type 1 receptor and bradykinin B₂ receptor, 2005, *Cell Biochem Funct*, 23, 195-204

- Skeggs, L.T. et al.**, Preparation and function of hypertensin-converting enzyme, 1956, J Exp Med, 103, 295-299
- Skott, O. et al.**, Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion, 1987, Science, 237, 1618-1620
- Smith, R.D. et al.**, Agonist-induced phosphorylation of the endogenous AT₁ receptor in bovine adrenal glomerulosa cells, 1998, Mol Endocrinol, 12, 634-644
- Steckelings, U.M. et al.**, The AT₂ receptor – a matter of love and hate, 2005, Peptides, 26(8), 1401-1409
- Sugden, P.H. et al.**, Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors, 1997, Cell Signal, 9, 337-351
- Surks, H.K. et al.**, Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α , 1999, Science, 286, 1583-1587
- Szaszák, M. et al.**, Identification of the invariant chain (CD74) as an angiotensin AGTR1-interacting protein, 2008, J Endocrinol, 199, 165-176
- Tanaka, Y. et al.**, The novel angiotensin II type 1 receptor (AT₁R)-associated protein ATRAP downregulates AT₁R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy, 2005, FEBS Lett, 579(7), 1579-1586
- Taniyama, Y. et al.**, Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells, 2004, Am J Physiol Cell Physiol, 287, C494-499
- Thatcher, S. et al.**, The adipose renin-angiotensin system: role in cardiovascular disease, 2009, Mol Cell Endocrinol, 302, 111-117
- Thekkumkara, T.J. et al.**, Angiotensin (AT_{1A}) receptor-mediated increases in transcellular sodium transport in proximal tubule cells, 1998, Am J Physiol Renal Physiol, 274, 897-905
- Thiemermann, C. et al.**, Nitric oxide and septic shock, 1997, Gen Pharmacol, 29, 159-166
- Thomas, W.G. et al.**, Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of cytoplasmic tail, 1995, J Biol Chem, 270(38), 22153-22159
- Thomas, W.G. et al.**, Stable expression of a truncated AT_{1A} receptor in CHO-K1 cells, 1995, J Biol Chem, 270(1), 207-213

- Tse, C. et al.**, Functional characteristics of cloned epithelial Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C, 1993, Proc Natl Acad Sci USA, 90, 9110-9114
- Tsuda, T. et al.**, Angiotensin II- and endothelin-induced protein phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells, 1993, J Vasc Res, 30, 241-249
- Tsurumi, Y. et al.**, Interacting molecule of AT1 receptor, ATRAP, is colocalized with AT1 receptor in the mouse renal tubules, 2006, Kidney Int, 69, 488-494
- Vaajanen, A. et al.**, Does the renin-angiotensin system also regulate intra-ocular pressure?, 2008, Ann Med, 40, 418-427
- Velasquez, M.T. et al.**, Angiotensin II receptor blockers-a new class of antihypertensive drugs, 1996, Arch Farm Med, 351-356
- Wagner, C. et al.**, Regulation of renal renin release, 1998, Curr Opin Nephrol Hypertens, 7, 437-441
- Wagner, C. et al.**, Regulation of renal renin release, 1998, Curr Opin Nephrol Hypertens, 7, 437-441
- Wakui, H. et al.**, Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice, 2010, Am J Renal Physiol, 299, 991-1003
- Wang, D.H. et al.**, Distinct mechanisms of upregulation of type 1A angiotensin II receptor gene expression in kidney and adrenal gland, 1995, Hypertension, 26, 1134-1137L
- Wang, P. et al.**, Is prostacyclin responsible for producing the hyperdynamic response during early sepsis, 2000, 28, 1534-1539
- Wang, Q. et al.**, Compensatory up-regulation of angiotensin II subtype 1 receptors in α ENaC knockout heterozygous mice, 2001, Kidney Int, 59, 2216-2221
- Weihprecht, H. et al.**, Effect of adenosine1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus, 1990, J Clin Invest, 85, 1622-1628
- Yan, C. et al.**, Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator, 2003, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 23, 26-36

Anhang B: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über das klassische Renin-Angiotensin-System. ACE: Angiotensin I-konvertierendes Enzym (Angiotensin I-converting enzyme)	6
Abbildung 2: Überblick über neue Komponenten des RAS.....	7
Abbildung 3: Intrazelluläre Signaltransduktion nach Aktivierung des AT1-Rezeptors. G _{q11} : G-Protein mit Phospholipase C als Effektor; G _{i0} : inhibitorisches G-Protein; PLC: Phospholipase C; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; IP ₃ : Inositoltrisphosphat; DAG: Diacylglycerin; PKC: Proteinkinase C; MLKK: Myosin-Leichte-Ketten-Kinase; MEK: Mitogen-aktivierte Kinase Kinase; ERK: <i>Extracellular signal regulated kinase</i> ; PLD: Phospholipase D; Shc-GRB2-Sos: Proteinkomplex mit <i>Src homology and collagen, growth factor receptor-bound 2</i> und <i>Son of Sevenless</i> ; JNK: c-Jun N-terminale Kinase; p38-MAPK: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; JAK: Januskinase; STAT: <i>signal transducers and activators of transcription</i> ; EGFR: <i>epidermal growth factor-Rezeptor</i> ; c-Fos, c-Jun: Transkriptionsfaktoren im Zellkern.....	14
Abbildung 4: Schema zur Internalisierung des AT1-Rezeptors mit Beispiel eines Rezeptor-assoziierten Proteins (Arap1, siehe 1.3.2).	16
Abbildung 5: Arap1-mRNA-Expression in verschiedenen Organen der Maus. Daten wurden durch Anwendung der quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt und sind als relative Werte im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 5).....	26
Abbildung 6: Arap1-mRNA-Expression in mikrodisssezierten Nierenzonen der Maus. Daten wurden durch quantitative Echtzeit-PCR bestimmt und sind als relative Werte im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 5).....	27
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung von renalen Paraffinschnitten einer Arap1-defizienten Maus.	28
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein (rot) in der Mausniere: A) Cortex, B) Medulla.	28
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein im renalen Kortex der Maus (linke Spalte: Arap1; mittlere Spalte: Gewebemarker; rechte Spalte: Überlappung): (A, B, C) Arap1 (rot) wurde in den kortikalen Blutgefäßen lokalisiert und aufgrund der Überlappung mit α -Aktin (blau) den glatten Gefäßmuskelzellen zugeordnet. (D, E, F) Arap (rot) wurde nicht in den renin (blau)-positiven juxtaglomerulären Zellen lokalisiert. (G, H, I) In den Glomeruli konnte Arap1 den Mesangialzellen zugeordnet werden, da Arap1 (rot) mit Desmin (grün) kolokalisierte. (J, K, L) Der Endothelmarker CD31 (grün) zeigte, dass Arap1 (rot) weder im Endothel der Blutgefäße innerhalb noch außerhalb der Glomeruli exprimiert wurde.	30
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein in der renalen Medulla der Maus: Arap1 (A; rot) wurde ausschließlich in den glatten Gefäßmuskelzellen (B; blau) der medullären Blutgefäße exprimiert (D; Überlappung von Arap1 mit α -Aktin). Die medullären Aquaporin-2-positiven Sammelrohre (C; grün) zeigten keine Färbung mit anti-Arap1 (rot) (D; keine Überlappung von Arap1 mit Aquaporin-2).....	31
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein in der humanen Niere (linke Spalte:	

Kortex; rechte Spalte: Medulla): Arap1 (rot) wurde in den α -Aktin-positiven glatten Gefäßmuskelzellen (blau) des humanen Kortex (A bzw. C) und der Medulla (B bzw. D) exprimiert. In den Glomeruli war keine Färbung zu erkennen. Die Arap1-positive Färbung überlappte mit α -Aktin (rosa, E bzw. F).	32
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten zur Lokalisierung von Arap1-Protein in der Aorta (A), im Herz (B) und in der Lunge (C). In der Aorta (A) war Arap1 (rot) in der Tunica media sichtbar. Im Herz (B) und in der Lunge (C) war Arap1 in den Blutgefäßen exprimiert.	33
Abbildung 13: Arap1-mRNA-Expression bei Modulation der Kochsalzaufnahme. Renale Arap1-Expression nach einwöchiger Niedrigsalz (0,02% NaCl [w/w])- , Normalsalz (0,6% NaCl [w/w])- und Hochsalzdiät (4% NaCl [w/w]). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).	34
Abbildung 14: Renale Arap1-mRNA-Expression in den Nierenzonen der Maus nach 48 Stunden Wassermangel. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).	35
Abbildung 15: Renale Arap1-Proteinexpression nach 48 Stunden Wassermangel. Die Proteinmenge wurde durch Quantifizierung der Bandenintensität anhand Bio1D ermittelt (n = 3).	36
Abbildung 16: Renale Arap1-mRNA-Expression in Mäusen nach unilateraler Nierenarterienstenose (2k-1c-Modell). Der Kontrollwert ergibt sich aus dem Mittelwert der Arap1-Expression beider Nieren von sham-operierten Mäusen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).	37
Abbildung 17: Arap1-mRNA-Expression in Mäusen nach chronischer Angiotensin II-Infusion (2 μ g/kg/min, 7 Tage) in den Nierenzonen. Die Kontrollgruppe bestand aus Mäusen, die mit dem Trägerstoff (Vehikel) ohne Angiotensin II behandelt wurden. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 10).	38
Abbildung 18: Renale Arap1-Proteinmenge nach chronischer Angiotensin II-Infusion (2 μ g/kg/min, 7 Tage). Die Kontrollgruppe bestand aus Mäusen, die mit dem Trägerstoff, ohne Angiotensin II, behandelt wurden. Die Proteinmenge wurde nach Western Blotting durch Quantifizierung der Bandenintensität anhand Bio1D ermittelt (n = 7).	39
Abbildung 19: Renale Arap1-mRNA-Expression nach Behandlung mit Losartan (30 mg/kg/d im Trinkwasser) für 7 Tage. Die Kontrollgruppe besteht aus unbehandelten Mäusen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 5).	40
Abbildung 20: Renale Arap1-Proteinexpression nach Behandlung mit Losartan (30 mg/kg/d im Trinkwasser) für 7 Tage. Die Kontrollgruppe besteht aus unbehandelten Mäusen. Die Proteinmenge wurde aus der Bandenintensität nach Western Blotting anhand Bio1D ermittelt (n = 4).	41
Abbildung 21: Renale Arap1-mRNA-Expression in eNOS-defizienten und Wildtyp-Mäusen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 5).	42
Abbildung 22: Renale Arap1-mRNA-Expression in Hydralazin-behandelten Mäusen (Hydralazin 50 mg/kg/d, 3 d) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (Kontrolle). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 4).	43
Abbildung 23: Arap1-mRNA-Expression nach Angiotensin II-Infusion (2 μ g/kg/min, 7 Tage) im Herz (linker Ventrikel). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 10).	44
Abbildung 24: Arap1-mRNA-Expression nach Angiotensin II-Infusion (2 μ g/kg/min, 7 Tage) in der Nebenniere. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 5).	45

Abbildung 25: Arap1-mRNA-Expression glomerulärer Mesangialzellen der Ratte nach 16-stündiger Inkubation mit Angiotensin II in verschiedenen Konzentrationen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).	46
Abbildung 26: Arap1-mRNA-Expressionsverlauf glomerulärer Mesangialzellen der Ratte bei Inkubation mit Angiotensin II (10^{-4} M). Die Werte sind jeweils auf Kontrollwerte ohne Inkubation mit Angiotensin II bezogen und relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).	47
Abbildung 27: Arap1-Proteinexpression nach 16-stündiger Inkubation mit Angiotensin II (10^{-4} M) und ohne Angiotensin II (Kontrolle). Werte wurden durch Quantifizierung der Bandenintensität nach Western Blotting durch Bio1D ermittelt (n = 6).	48
Abbildung 28: Arap1-mRNA-Expression nach Koinkubation von Losartan (10^{-4} M) und Angiotensin II (10^{-5} M) sowie alleiniger Inkubation von Angiotensin II (10^{-5} M) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Angiotensin II). Werte sind relativ im Verhältnis zu GAPDH angegeben (n = 6).	49
Abbildung 29: Arap1-mRNA-Expression nach Koinkubation von Angiotensin II (10^{-4} M) und PD123319 (10^{-6} M) sowie nach Inkubation mit Angiotensin II (10^{-4} M) im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).	50
Abbildung 30: Arap1-mRNA-Expression in Mesangialzellen nach Inkubation mit Angiotensin II (10^{-6} M), PMA (10^{-5} bzw. 10^{-7} M) im Vergleich zur Kontrolle (weder Angiotensin II noch PMA). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 6).	51
Abbildung 31: Arap1-mRNA-Expression in Mäusenieren 6, 12 bzw. 20 bis 24 Stunden nach einer CLP (<i>cecal ligation and puncture</i>) im Vergleich zur Kontrolle (sham-operiert). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 4).	52
Abbildung 32: Arap1-mRNA-Expression in der Lunge, Aorta, Nebenniere und im Herz nach 6, 12 bzw. 20 bis 24 Stunden CLP (<i>cecal ligation and puncture</i>) im Vergleich zur Kontrolle (sham-operiert) (n = 4).	53
Abbildung 33: Arap1-mRNA-Expression in der Niere 3, 6 bzw. 12 Stunden nach Injektion von LPS im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelt). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 3).	54
Abbildung 34: Arap1-Expression in der Lunge, Aorta, Nebenniere und im Herz 3, 6 bzw. 12 Stunden nach Injektion von LPS. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 3).	55
Abbildung 35: Arap1-mRNA-Expression glomerulärer Mesangialzellen der Ratte nach Inkubation mit einem Zytokin-Mix (IL-1 β 50 ng/ml; TNF- α 100 ng/ml; IFN- γ 100 ng/ml) für 20 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 12).	56
Abbildung 36: Arap1-mRNA-Expression nach 20h Inkubation glomerulärer Mesangialzellen der Ratte mit IL-1 (50 ng/ml), TNF- α (100 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). Werte sind relativ im Verhältnis zu β -Aktin angegeben (n = 4).	57
Abbildung 37: Arap1-mRNA-Expression nach 20 h Inkubation von glomerulären Mesangialzellen mit einem Zytokin-Mix (IL-1 β 50 ng/ml; TNF- α 100 ng/ml; IFN- γ 100 ng/ml) bzw. Angiotensin II (10^{-4} M) und Koinkubation von Zytokin-Mix und Angiotensin II (IL-1 β 50 ng/ml; TNF- α 100 ng/ml; IFN- γ 100 ng/ml; Ang II 10^{-4} M) (n = 4).	58
Abbildung 38: Schematische Darstellung der gemeinsamen Regulation der renalen Effekte von Angiotensin II durch Arap1 und ATRAP bei hohen Angiotensin II-Spiegeln.	65