

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

**Angiotensin-(1-7) normalisiert die
gesteigerte vaskuläre Reaktivität in ApoE-defizienten Mäusen
durch Regulation der p38 MAP-Kinase**

Dissertation

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

vorgelegt von

Tilman Clasen
2016

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

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda

Jede Zeit hat ihre Aufgabe, und durch die Lösung
derselben rückt die Menschheit weiter.

-Heinrich Heine-

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

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

Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I, Mergia E, Clasen T, Friedrich S, Vonend O, Woznowski M, Königshausen E, Sellin L, Rump LC (2011),
Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoproteinE-deficient mice.
British Journal of Pharmacology 163(5):974-83.

I. Zusammenfassung

Apolipoprotein E-defiziente Mäuse entwickeln eine ausgeprägte Hypercholesterinämie und stellen ein geeignetes Tiermodell für die Entwicklung von Arteriosklerose dar. In den renalen Widerstandsgefäßen der Mäuse ist die Ang II-induzierte Vasokonstriktion gesteigert. Bei der Pathogenese von Arteriosklerose und Bluthochdruck spielt die gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle, da diese die Zellmigration und Proliferation von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur steigern. Angiotensin II kann, über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die p38 MAP-Kinase aktivieren und aktuelle Studien zeigen, dass die p38 MAP-Kinase die vaskuläre Reaktivität beeinflussen kann. Ang-(1-7), ein aktiver Metabolit des Renin-Angiotensin Systems, aktiviert den Mas-Rezeptor und gilt als endogener Antagonist von Angiotensin II. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung die bestehende endotheliale Dysfunktion in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen verbessern kann, indem sie die Bioverfügbarkeit von Stickstoff erhöht und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies reduziert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Ang-(1-7) auf die gesteigerte vaskuläre Reaktivität in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen zu untersuchen und den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies und MAP-Kinasen in diesem Zusammenhang zu klären. Folgende Fragen sollten hierbei bearbeitet werden: Lässt sich eine gesteigerte vaskuläre Reaktivität in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung normalisieren? Senkt Ang-(1-7) die vaskuläre Reaktivität durch eine Erniedrigung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies? Beeinflusst eine chronische Behandlung mit Ang-(1-7) die Expression und den Aktivitätsgrad der p38-MAP-Kinase?

Wildtyp- und Apolipoprotein E-defiziente-Mäuse wurden über zwölf Wochen mit einer lipidreichen Nahrung gefüttert. Von der 12. bis zur 18. Lebenswoche wurden die Mäuse mittels osmotischer Minipumpen mit Ang-(1-7) oder physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Zur Klärung der Fragestellung wurde die vaskuläre Reaktivität in isolierten perfundierten Nieren gemessen, die p38-Aktivierung und NAD(P)H-Oxidase-Expression im Westernblot bestimmt und die Isoprostan-8-Exkretion im Mäuseurin ermittelt.

Eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung normalisiert die vaskuläre Reaktivität über eine verminderte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Dies führt zu einer geringeren Aktivierung der p38-MAPK. Die Daten dieser Arbeit präsentieren einen neuen Wirkmechanismus von Ang-(1-7) in der Gefäßregulierung bei gesteigerter vaskulärer Reaktivität in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen.

II. Abkürzungsverzeichnis:

Δ	Differenz	ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	g	Gramm
μg	Mikrogramm	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
μl	Mikroliter	h	Stunde
μm	Mikrometer	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
A.	Arteria	HSP	Hitze Schock Protein
Aa.	Arteriae	i.p.	intraperitoneal
Abb.	Abbildung	JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
ACE	Angiotensine-Converting-Enzyme	KCl	Kaliumchlorid
ACE2	Angiotensine-Converting-Enzyme 2	kDa	Kilodalton
Ang I	Angiotensin I	kg	Kilogramm
Ang II	Angiotensin II	KG	Körpergewicht
Ang III	Angiotensin III	M	Mol
Ang IV	Angiotensin IV	mA	Milliampere
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)	MAP	Mitogen-activated-protein
ApoE	Apolipoprotein E	MAPK	Mitogen-activated-protein Kinase
ApoE (-/-)	Apolipoprotein-E-Knockout	MAPKAP	MAP-kinase-aktivated protein
AT₁	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1	μg	Mikrogramm
AT₂	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 2	mg	Milligramm
Ca⁺⁺	Kalzium	min	Minute
CO₂	Kohlenstoffdioxid	ml	Milliliter
DWK	Dosis-Wirkungskurve	MLC	Myosin Leichte Kette
eNOS	endotheliale NO-Synthase	μm	Mikrometer
		mm	Millimeter
		mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mRNA	messenger- Ribonukleinsäure
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin- Dinukleotid-Phosphat
nM	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
O₂	Sauerstoff
p	Druck
p38	p38-MAPK
PBS	Phosphate Buffered Saline
pM	Pikomol
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SHR	spontaneously hypertensive rats
SOD	Superoxiddismutase
V	Volt
V.	Vena
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen
Vv.	Venae
WD	Western Diet
WT	Wildtyp
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SD	Standardabweichung

III. Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Renin-Angiotensin-System.....	1
1.2	Angiotensin-(1-7).....	2
1.3	Mitogen-activated-protein Kinasen.....	6
1.4	Apolipoprotein-E-Knockout-Mausmodell und reaktive Sauerstoff Spezies..	8
2	Ziele der Arbeit	10
3	Methoden	11
3.1	Versuchstiere	11
3.2	Blutdruckmessung.....	12
3.3	Isolierte perfundierte Niere	12
3.3.1	<i>Isolierung der Nieren</i>	14
3.3.2	<i>Allgemeiner Versuchsablauf</i>	15
3.3.3	<i>Auswertung der Druckkurven</i>	17
3.4	Westernblot.....	17
3.4.1	<i>Proteinisolierung aus dem Nierenkortex</i>	17
3.4.2	<i>Isolierung von präglomerulären Gefäßen</i>	18
3.4.3	<i>Allgemeiner Versuchsablauf</i>	19
3.4.4	<i>Densitometrische Auswertung</i>	20
3.5	Bestimmung von 8-Isoprostane im Mäuseurin	20
3.6	Quantifizierung arteriosklerotischer Plaques in Mauseorten	20
3.6.1	<i>Präparation der Mauseorten</i>	20
3.6.2	<i>Färbung der Mauseorten</i>	21
3.6.3	<i>Fotografie und Auswertung der gefärbten Mauseorten</i>	21
4	Material	22
4.1	Behandlung der Versuchstiere	22
4.2	Isolierte perfundierte Niere	22
4.2.1	<i>Geräte und Hilfsmittel</i>	22
4.2.2	<i>Reagenzien und Lösungen</i>	23
4.2.3	<i>Isolierung von präglomerulären Gefäßen</i>	23
4.3	Westernblot.....	24
4.3.1	<i>Antikörper</i>	24
4.3.2	<i>Gele und Puffer</i>	25

4.3.3	Geräte	26
4.3.4	Reagenzien	27
4.4	Isoprostan-8-Enzymimmunoassay	27
4.5	Quantifizierung arteriosklerotischer Plaques in Mausaorta	27
5	Ergebnisse	28
5.1	Einfluss von Ang-(1-7) auf den systolischen Blutdruck	28
5.2	Erhöhte renale Druckantwort auf Ang II in ApoE (-/-)-Mäusen.	29
5.3	Chronische Angiotensin-(1-7)-Behandlung reduziert die renale Druckantwort in ApoE (-/-)-Mäusen.....	30
5.4	MLC(20)-Phosphorylierung in präglomerulären Gefäßen	31
5.5	Ang-(1-7) reduziert ROS Produktion durch einen p47phox-abhängigen Mechanismus	32
5.6	Chronische Ang-(1-7)-Behandlung normalisiert die vaskuläre Reaktivität durch eine Reduktion der p38-Aktivierung	35
5.7	p38-Phosphorylierung im renalen Kortex	37
5.8	p38-phosphorylierung in präglomerulären Gefäßen.....	39
5.9	Inhibition der ERK1/2 MAP-Kinase durch PD 98059.....	40
5.10	Quantifizierung arteriosklerotischer Plaques in der Mausaorta	42
6	Diskussion	44
6.1	Vergleich der Blutdrücke	45
6.2	Angiotensin-(1-7) normalisiert die renale Druckantwort	46
6.3	MLC(20)-Phosphorylierung	47
6.4	Gesteigerte ROS-Menge und gesteigerte NAD(P)H-Oxidase-Expression	48
6.5	Die Rolle von p38 und ERK1/2 bei der gesteigerten vaskulären Reaktivität in ApoE(-/-) Mäusen.....	50
6.6	Einfluss von Ang-(1-7) auf die Entwicklung von Arteriosklerose	54
7	Schlussfolgerung	55
8	Quellenverzeichnis	57
9	Anhang	68

1 Einleitung

1.1 Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein endokrines System, welches eine zentrale Rolle im kardiovaskulären System einnimmt, indem es den Blutdruck reguliert. Dieser wird direkt durch eine Vasokonstriktion in den Widerstandsgefäßen gesteigert, zudem steigert das RAS den Blutdruck über die Beeinflussung des sympathischen Nervensystems, der Aldosteronfreisetzung und der Natriumrückresorption in der Niere. Das RAS spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von kardiovaskulären Erkrankungen: Angiotensin II (Ang II), der Haupteffektor des RAS, fördert die Entwicklung von Arteriosklerose, endothelialer Dysfunktion und gesteigerter vaskulärer Reaktivität in Apolipoprotein E-defizienten [ApoE (-/-)]-Mäusen.¹ Die herausragende Bedeutung von Ang II bei der Entstehung von Arteriosklerose wird durch Arbeiten unterstrichen, die zeigten, dass in ApoE (-/-)-Mäusen bei denen der Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT₁) ausgeschaltet wurde, die Entwicklung von Arteriosklerose und endothelialer Dysfunktion abgeschwächt war.^{2 3} Es konnte zudem gezeigt werden, dass bei Hypercholesterinämie die Aktivität des RAS erhöht ist.⁴

Ang I wird in einer Kaskade aus dem Vorläuferprotein Angiotensinogen gebildet. Dabei wird zuerst Angiotensinogen durch Renin, einer Aspartyl-Protease aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere, zu Angiotensin I (Ang I), einem Decapeptid gespalten. Danach wird Ang I durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), zwei Aminosäuren am Carboxyende abgespaltet, wodurch das Octapeptid Ang II entsteht.

Ang II bindet sowohl an den AT₁- als auch an den Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 2 (AT₂). Seine Effekte werden hauptsächlich über die Aktivierung des AT₁-Rezeptors vermittelt: So führt Ang II in den Widerstandsgefäßen zur Vasokonstriktion und somit zu einer Blutdrucksteigerung.^{5 6} Diese starke Vasokonstriktion wird über den AT₁-Rezeptor auf den glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) vermittelt.⁷ Zudem steigert Ang II durch die Bindung an den AT₁-Rezeptor die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), was zu einem Stickstoffmonoxid (NO)-Abbau führt.⁸ Ang II

fördert darüber hinaus die Hypertrophie und Hyperplasie von VSMC, ein maßgeblicher Schritt in der Pathogenese von Arteriosklerose.⁹

Die Rolle des AT₂-Rezeptor in der Blutdruckregulation ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Der AT₂-Rezeptor ist in der Lage den AT₁-Rezeptor-induzierten Effekten entgegen zu wirken und wird deshalb in der Literatur häufig als Gegenspieler des AT₁-Rezeptors beschrieben.¹⁰⁻¹² In Ratten konnte gezeigt werden, dass über den AT₂-Rezeptor die Renin-Biosynthese reduziert und die NO-Freisetzung stimuliert wird.^{13 14} Zudem konnte gezeigt werden, dass über den AT₂-Rezeptor die Natrium-Ausscheidung gesteigert wird.^{15 16} Aktuelle Studien weisen jedoch darauf hin, dass der AT₂-Rezeptor in der Gefäßregulation eine untergeordnete Rolle spielt.^{17 18}

1.2 Angiotensin-(1-7)

Seit kurzem ist bekannt, dass neben dem klassischen RAS auch andere wichtige biologisch wirksame Metabolite entstehen können.^{17 19} Viele Gewebe verfügen über ein lokales RAS, bei welchem Ang I oder Ang II durch ACE, Angiotensine-Converting-Enzyme 2 (ACE2) oder Aminopeptidasen gespalten werden. Es entstehen die Metabolite Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], des-Asp-Angiotensin I, Angiotensin III (Ang III) und Angiotensin IV (Ang IV).²⁰ Die Metabolite besitzen sehr unterschiedliche biologische Funktionen und Wirksamkeiten, sie können im Vergleich zu Ang I oder Ang II gleich oder entgegengesetzt wirken, oder deren Wirkung modulieren.^{17 21}

Der Metabolit Ang-(1-7) ist besonders interessant, da er im direkten Abbau aus Ang II entsteht und bei Therapie mit ACE-Hemmern und AT₁-Blockern im Serum ansteigt.²² Die biologische Rolle und Relevanz von Ang-(1-7) blieb bis zur Entdeckung von ACE2 unbeachtet. Zwei voneinander unabhängige Forschungsgruppen beschrieben im Jahr 2000 in ihren Arbeiten die Entdeckung des ACE-Homologes, welches in Folge ACE2 genannt wurde.^{23 24} Bei der Synthese von Ang-(1-7) nimmt ACE2 eine übergeordnete Rolle ein, Ang-(1-7) kann aber auch durch andere Peptidasen entstehen (Propylcarboxypeptidase, Neutral-Endopeptidase, Aminopetidasen A und M). ACE2 spaltet von seinen Substraten, Ang II und Ang I, eine Aminosäure am Carboxyende ab, während es Ang-(1-7) bzw. Angiotensin-(1-9), ein direktes Vorläuferpeptid von

Ang-(1-7), generiert (s. Abb. 1). ACE2 spaltet Ang I und Ang II hochspezifisch und Ang II gegenüber Ang I mit 400-fach erhöhter katalytischer Aktivität.²⁵ Ungleich zum ACE spaltet ACE2 jedoch nicht Bradykinin, eine vasodilativ wirkende Substanz, dafür aber des-Arg⁹-Bradykinin, ein proinflammatorisch wirkendes Kinin.²⁵

Ang II spielt in der Pathophysiologie vieler Krankheitsmodelle eine wichtige Rolle und ist Angriffspunkt verschiedener medikamentöser Therapien. Durch die Entdeckung des Abbauwegs über ACE2, stellt nun auch Ang-(1-7) einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt in den verschiedenen Krankheitsmodellen dar.

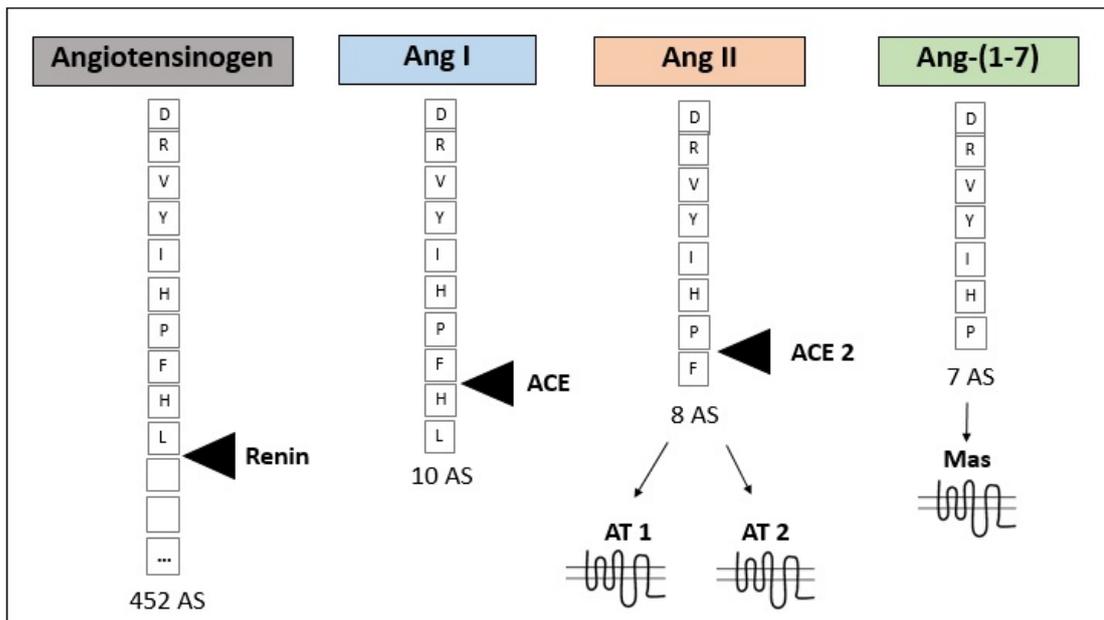


Abb. 1: Vereinfachtes Schema des Renin-Angiotensin-System. Die Peptide werden als Aminosäureketten im Einbuchstabencode dargestellt. Die Enzyme zeigen mittels eines Dreiecks auf die jeweilige Spaltstelle im Peptid; Die Zahlen unterhalb den der Kästen zeigen an, aus wie vielen Aminosäuren (AS) das jeweilige Peptid besteht; Gerade Pfeile, die auf die Rezeptoren gerichtet sind, stehen für eine Peptid-Rezeptor-Interaktion.

Lange Zeit war nicht bekannt wie Ang-(1-7) seine Wirkung vermittelt. Erst im Jahre 2004 konnte gezeigt werden das Ang-(1-7) seinen eigenen Rezeptor aktiviert, den G-Protein-gekoppelten-Rezeptor MAS:^{26 27} Sowohl Ang-(1-7) als auch MAS-Rezeptor-Agonist AVE0991 riefen einen erhöhten NO-Anstieg in MAS-transfizierten *Chinese Hamster Ovary*-Zellen hervor. Dieser Effekt ließ sich durch den MAS-Antagonisten A-779, jedoch nicht durch AT₁- oder AT₂-Antagonisten, aufheben.

Das Mas-Protoonkogen kodiert für ein Proteinprodukt von 324 Aminosäuren und bildet sieben hydrophobe Aminosäure-Domänen aus.^{28 29} Diese Transmembrandomänen sind charakteristisch für die Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, die sich durch exogene und endogene Liganden aktivieren lassen. Das Tiermodell der MAS-defizienten-Mäuse, bei denen das Mas-Protoonkogen ausgeschaltet ist, bietet neue Möglichkeiten in der Forschung an Ang-(1-7) und ist daher inzwischen weit verbreitet.

Der Mas-Rezeptor wird häufig als Gegenspieler zum AT₁-Rezeptor beschrieben, da die Effekte von Ang-(1-7) denen von Ang II scheinbar entgegenwirken.³⁰ Anzeichen hierfür sind, dass Ang-(1-7) die vaskuläre Druckantwort, die sympathische Neurotransmitterfreisetzung und die glomeruläre Filtrationsrate beeinflusst.^{31 32} Auch in Bezug auf die Entwicklung von Arteriosklerose spielt Ang-(1-7) eine wichtige Rolle.³³

Im Endothel führt Ang-(1-7), über eine NO- und Bradykinin-Kaskade, zur Vasodilatation, es konnte gezeigt werden, dass Ang-(1-7) die endotheliale Dysfunktion in ApoE (-/-)-Mäusen abschwächen kann indem es die Produktion von ROS beeinflusst.³⁴ Zudem führt es zu einer Verbesserung der kardialen Funktion nach Myokardinfarkt und hemmt das kardiale Remodelling.³⁵⁻³⁷ Untersuchungen zu möglichen Effekten von Ang-(1-7) auf eine gesteigerte Vasokonstriktion und die zugrundeliegenden Mechanismen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt und Gegenstand dieser Arbeit.

In VSMC wird ACE2 und Mas exprimiert und entsprechend findet in VSMC ein Ang-(1-7)-Metabolismus statt. Eine Studie an Rattenaorten zeigte, dass eine erniedrigte ACE2-Expression in VSMC, eine reduzierte Menge an zellulärem Ang-(1-7) als Folge hat.³⁸ Erst kürzlich konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass MAS-Rezeptor-Agonist AVE0991 die Ang II-induzierte Proliferation von VSMC, über die MAS/heme oxygenase-1/p38 MAPK-Signalkaskade, abschwächen konnte.³⁹ Zudem konnte AVE0991 in VSMC die Ang II-vermittelte Produktion von ROS verringern.³⁹ In der Gefäßwand unterstützt Ang-(1-7) vasoprotektive Effekte.⁴⁰⁻⁴³ Zudem führt, in ApoE (-/-)-Mäusen, eine genetische ACE2-Defizienz zu einer verstärkten Entwicklung von Arteriosklerose.⁴⁴ Entsprechend konnte gezeigt werden,

dass eine pharmakologische Stimulation des MAS-Rezeptors die Entwicklung von Arteriosklerose abschwächen kann.⁴⁵ Die Aktivierung des am Endothel lokalisierten MAS-Rezeptors führt, durch die Synthese von NO und Prostaglandinen, zur Vasodilatation.⁴⁶ Entsprechend wurde in der Zellkultur von bovinen Endothelzellen eine, durch Ang-(1-7) ausgelöste, NO-Freisetzung festgestellt.⁴⁷ In Mas-Rezeptor-defizienten Mäusen zeigte sich eine erhöhte Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-[NAD(P)H]-Oxidase-Aktivität, was folglich über die Entwicklung von ROS zur endothelialen Dysfunktion und Bluthochdruck führt.⁴⁰

Die Wirkungen von Ang-(1-7) auf den Gefäßtonus werden kontrovers diskutiert, sowohl vasokonstriktorische als auch vasodilative Wirkungen werden beschrieben.^{6 34 48 49} Die vasodilatativen Eigenschaften scheinen jedoch zu überwiegen: Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Ang-(1-7) in Endothelzellen der menschlichen Aorta die endotheliale NO-Synthase (eNOS) über einen Mas-Rezeptor-Akt-Signalweg stimuliert.⁵⁰ In verschiedenen Tiermodellen und in verschiedenen Gefäßbetten konnten die vasodilatativen Effekte von Ang-(1-7) bestätigt werden: Dazu gehören Mauseaorta^{27 51}, Rattenaorta⁵², Koronargefäße und A.cerebri media vom Hund^{53 54} sowie Mesenterialgefäße von normotensiven und *spontaneously hypertensive* (SHR) Ratten.^{49 55} Die Einflüsse von Ang-(1-7) auf den Gefäßtonus beim Menschen sind nicht vollständig geklärt: Eine Studie zeigt, dass Ang-(1-7) in Unterarmgefäßen des Menschen vasodilativ wirkt, während in gleichen Gefäßen bei Patienten, die mit ACE-Blockern behandelt wurden, kein vergleichbarer Effekt zu erkennen war.^{56 57} Im Gegensatz zu den gut dokumentierten vasodilatativen Effekten von Ang-(1-7), gibt es nur sehr wenige Untersuchungen die gegenteiliges zeigen.⁵⁷

Auch die Effekte auf den Blutdruck sind Bestandteil intensiver Forschung.⁵⁸⁻⁶⁰ In aktuellen Studien werden die Effekte auf den Blutdruck bei Mas-Rezeptor-defizienten Mäusen mit verschiedenem genetischen Hintergrund verglichen: Während Mas-defiziente Mäuse mit FVB/N-Hintergrund signifikant erhöhten Blutdruck entwickeln, bleiben Mas-defiziente Mäuse mit C57Bl/6-Hintergrund normotensiv.^{40 61} Die Ursache hierfür ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Ein Hinweis könnte in der unterschiedlichen ROS-Produktion der verschiedenen Mausstämme zu finden sein.⁶²

Während eine kurzfristige Gabe von Ang-(1-7) keinen Einfluss auf den Blutdruck hat, oder ihn nur gering ändert, konnte bei Mas-defizienten Mäusen eine geringere periphere

Durchblutung festgestellt werden.⁶³ Zudem wurde bei Ratten unter Ang-(1-7)-Gabe ein erhöhter kardialer Auswurf als Folge eines erniedrigten Total-Periphereren-Widerstands beobachtet.^{64 65}

Interessanterweise zeigte sich in einer Arbeit, dass die antihypertensiven Effekte einer kombinierten Behandlung aus ACE-Hemmern und AT₁-Blockern, mit hohen Ang-(1-7)-Plasmaspiegeln einhergehen.⁵⁹ Zudem besitzt laut einer Studie Ang-(1-7) einen blutdrucksenkenden Effekt, da die Behandlung mit Antikörpern gegen Ang-(1-7) ein signifikantes Ansteigen des systolischen Blutdrucks zur Folge hat.⁶⁶

Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, dass Ang-(1-7) seine Effekte über Mitogen-activated-Protein (MAP)-Kinasen vermittelt: Es konnte gezeigt werden, dass Ang-(1-7) die Ang II-induzierte Aktivierung der extracellular-signal-regulated kinases (ERK) 1/2 in VSMC reduzieren konnte.⁶⁷ Arbeiten an Ratten-Cardiomyozyten zeigten ein ähnliches Ergebnis.⁶⁸ Ebenfalls konnte in proximalen Tubuluszellen der Ratte gezeigt werden, dass eine Ang II-vermittelte Aktivierung der drei wichtigsten MAP-Kinasen [ERK 1/2, c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), und p38-MAPK (p38)] durch Ang-(1-7) abgeschwächt werden konnte. Zudem konnte durch eine Ang-(1-7)-Behandlung eine Reduzierung des vaskulären Remodeling in autologen Jugularvenen-Transplantaten festgestellt werden, welche über eine verminderte ERK1/2- und p38-Aktivität vermittelt wurde.⁶⁹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass über eine Beteiligung der MAP-Kinasen an den vaskulären Effekten von Ang-(1-7), bisher noch wenig bekannt ist. Diese Arbeit soll einen möglichen Zusammenhang weiter untersuchen.

1.3 Mitogen-activated-protein Kinasen

MAP-Kinasen sind intrazelluläre Serin/Threonin-Kinasen, die im Allgemeinen extrazelluläre Signale weiterleiten. MAP-Kinasen werden in allen eukaryonten Zellen exprimiert. Zu den wichtigsten Aktivatoren der MAP-Kinasen gehören Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Hormone und zellulärer Stress:

Ang II aktiviert über die Bindung an den AT₁-Rezeptor heterotrimere G-Proteine, die zur Stimulation der Phospholipasen C und D und Inhibition der Adenylylcyclase führen.⁷⁰ Diese biochemischen Reaktionen aktivieren auf direktem und indirektem Weg (über die Bildung von ROS) Serin/Threonin-Kinasen. Ebenfalls führt die Ang II-AT₁-

Rezeptor-Interaktion zu einer Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase, welche über die Produktion von ROS zu einer Aktivierung der p38-MAPK führt.⁷¹

Die zellulären Aufgaben von MAP-Kinasen sind vielfältig: Sie spielen wichtige Rollen in der zellulären Proteinsynthese, Genexpression, Volumenregulation, Proliferation, Migration, im zellulären Transport und Zellwachstum.^{8 72 73}

Drei Subtypen der MAP-Kinasen sind besonders gut charakterisiert: ERK1/2, JNK und p38:⁷⁴⁻⁷⁶ ERK1/2 werden durch extrazelluläre, JNK und p38 von zellulären Stresssignalen aktiviert. Zu den Aktivatoren von JNK und p38 gehören: endotoxische Lipopolysaccharide, inflammatorisch wirksame Zytokine und chemotaktische Peptide.⁷⁷ ROS werden beim Mechanismus der zur Aktivierung von p38 führt eine besondere Rolle zugeteilt. Es konnte festgestellt werden, dass Antioxidantien die Ang II-induzierte p38-Aktivierung in VSMC der Ratte abschwächen können.⁷⁸

Die p38-MAPK verfügt über verschiedene intrazelluläre Rollen: Sie reguliert den Zelltod, die Apoptose und Differenzierung, ist aber auch an der Ang II-induzierten Inflammation der Gefäßwand beteiligt.^{79 80} Die physiologischen Substrate, über die p38 seine zahlreichen zellulären Wirkungen vermittelt, sind die MAP-kinase-aktiviert-protein (MAPKAP)-kinase-2, MAPKAP-kinase-3, und die Transkriptionsfaktoren DNA-damage-inducible protein 153 und E twenty-six-like transcription factor 1.^{74 75} Eine Phosphorylierung von p38 führt zu einer Aktivitätssteigerung, welche konsekutiv zur Differenzierung, Inflammation, Apoptose und Regulierung von Zelltod führt.⁸¹ Aktuelle Studien konnten zeigen, dass bei der Ang II-induzierten erhöhten vaskulären Reaktivität, neben der klassischen Kalzium-/Calmodulin-vermittelten Vasokonstriktion, auch die Aktivierung der p38-MAPK eine Rolle spielt.^{73 82} In Arbeiten an Rattenaorten konnte gezeigt werden, dass die Ang II-induzierte p38-Aktivierung durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ausgelöst und durch Antioxidantien blockiert werden konnte.⁸³ In weiteren Versuchen konnte festgestellt werden, dass p38-Inhibitor SB 203580 eine, durch G-Protein gekoppelte Rezeptoraktivierungen ausgelöste, Kontraktion von VSMC hemmt, was vermuten lässt, dass aktiviertes p38 die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur steigert.^{83 84} Dieses wird vermutlich nicht über die Phosphorylierung von Caldesmon, sondern über die MAPKAP-2-Kaskade und folgende Phosphorylierung des

Hitze Schock Proteins (HSP) 27 vermittelt.^{85 86} Der genaue Mechanismus, mit dem HSP27 die Kontraktion in der glatten Gefäßmuskulatur auslöst, ist noch nicht endgültig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass es seine Wirkung in der Stabilisierung oder Formation von Aktinpolymeren ausübt.⁸⁷ Diese Annahme wird durch einen Versuch unterstützt, bei dem Antikörper, die gegen HSP27 gerichtet waren, eine durch Endothelin-1 ausgelöste Vasokonstriktion, in Pulmonalarterienringen von Hunden, inhibieren konnten.⁸⁸

1.4 Apolipoprotein-E-Knockout-Mausmodell und reaktive Sauerstoff Spezies

Das ApoE (-/-)-Mausmodell, ein Modell für ausgeprägte Hypercholesterinämie, ist ein ausgezeichnetes und weit verbreitetes Modell für die Entstehung Arteriosklerose. ApoE (-/-)-Mäuse zeigen eine ausgeprägte Hypercholesterinämie und entwickeln frühzeitig arteriosklerotische Läsionen.⁸⁹⁻⁹¹ In ApoE (-/-)-Mäusen ist eine gesteigerte vasokonstriktorische Antwort auf Ang II zu beobachten.⁹²⁻⁹⁴ ApoE ist ein Glykoprotein, welches hauptsächlich in der Leber und im Gehirn synthetisiert wird und in allen Lipoproteinen, bis auf low-density Lipoproteinen, zu finden ist. Es dient als Rezeptorligand und führt zum vermehrten Abbau von Chylomicronen und very-low-density Lipoproteinen. Durch die Fütterung mit lipidreicher *Western Diet* (WD) kann eine vierfache Erhöhung des Cholesterinspiegels erreicht werden.^{89 95} ApoE (-/-)-Mäuse entwickeln das vollständige Spektrum an Läsionen, die sich auch beim Menschen in den verschiedenen Stadien der arteriosklerotischen Veränderung zeigen.⁹⁰

Die endotheliale Dysfunktion ist mit der Entwicklung von Arteriosklerose assoziiert oder geht dieser voraus. Sie ist charakterisiert durch eine verminderte Vasodilatation in Antwort auf Acetylcholin.⁹⁶ Die Menge an biologisch aktivem NO besitzt eine Schlüsselrolle in der vaskulären Homöostase und ist durch das Gleichgewicht zwischen NO-Biosynthese und NO-Abbau bestimmt. Dieses Gleichgewicht wird unter anderem durch ROS beeinflusst.⁹⁷

Seit längerem ist bekannt, dass eine Hypercholesterinämie die ROS-Produktion in Gefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen steigert. Intrazellulär erhöhte ROS entstehen durch erhöhte ROS-Produktion oder verminderten ROS-Abbau: Einen wichtigen Synthesort

für ROS stellt die membranständige NAD(P)H-Oxidase dar. Ang II führt zu einer erhöhten NAD(P)H-abhängigen Superoxid-Produktion.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Zudem kann eine entkoppelte eNOS Syntheseort für ROS sein. Bei Hypercholesterinämie können Lipide in das Endothelium aufgenommen werden und zu einem Entkoppeln der eNOS führen, ROS selbst können zum Entkoppeln der eNOS beitragen, indem sie Tetrahydrobiopterin, ein Kofaktor in der NO-Synthese, abbauen.^{101 102} Die Superoxiddismutase (SOD) und die Katalase sind biologisch wichtig für den Schutz vor oxidativem Stress. Es konnte festgestellt werden, dass die SOD-Aktivität in ApoE (-/-)-Mäusen, reduziert ist.⁹³ Obwohl die SOD-Protein-Expression in Aorten von ApoE (-/-)-Mäusen nicht verändert ist, senken SOD-Mimetika die Superoxid-Produktion und normalisieren die Acetylcholin-induzierte Relaxation in Aorten und Karotiden von ApoE (-/-)-Mäusen.^{94 103 104}

Neben der beobachteten endothelialen Dysfunktion, gibt es bei ApoE (-/-)-Mäusen Hinweise, dass die gesteigerte vasokonstriktorische Antwort auf Ang II nicht ausschließlich auf die verminderte NO-Bioverfügbarkeit zurückzuführen ist.³⁴

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob der zelluläre Mechanismus, der zu einer verstärkten vaskulären Reaktivität in renalen Widerstandsgefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen, führt, über eine Beteiligung von ROS und MAPK vermittelt wird und ob dieser durch die chronische Behandlung mit Ang-(1-7) moduliert werden kann.

2 Ziele der Arbeit

Der Entstehungsweg von Ang-(1-7) und die Zuordnung zum Mas-Rezeptor gelten als geklärt, die Effekte auf den Blutdruck sind Bestandteil aktueller Forschungen und die Ergebnisse werden kontrovers diskutiert. In ApoE (-/-)-Mäusen ist eine verstärkte vaskuläre Reaktivität bei Ang II-Gabe zu beobachten.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu klären, welchen Einfluss Ang-(1-7) auf die verstärkte vaskuläre Reaktivität in ApoE (-/-) Mäusen hat und wie dieser zellulär vermittelt wird. Folgende Fragen sind in diesem Zusammenhang zu klären:

1. Lässt sich eine gesteigerte vaskuläre Reaktivität bei Hypercholesterinämie im ApoE (-/-) Mausmodell durch eine langfristige Ang-(1-7)-Gabe normalisieren?
2. Über welche Mechanismen vermindert Ang-(1-7) die gesteigerte vaskuläre Druckantwort in der Niere von hypercholesterinämischen ApoE (-/-)-Mäusen?
 - welchen Einfluss hat Ang-(1-7) auf die ROS-Produktion?
 - Welche Rolle spielt dabei die p38 MAP-Kinase?
3. Führt eine 6-wöchige Behandlung von ApoE (-/-) Mäusen mit Ang-(1-7) zu einer reduzierten Entwicklung von arteriosklerotischen Plaques in der Mauseorta?

3 Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden ApoE (-/-)-Mäuse (C57BL6 Hintergrund) und Wildtyp (WT)-Mäuse (C57BL6) verwendet. Die Tiere wurden von den Jackson laboratories (Bar Harbor, USA) bezogen und unter konventionellen Bedingungen in der Tierversuchsanlage Düsseldorf gezüchtet. Die Untersuchungen stimmen mit den Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) überein.¹⁰⁵

Vor dem Beginn der Dissertation hat der Autor dieser Arbeit an einem, in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf veranstalteten, Kurs der Versuchstierkunde teilgenommen und diesen mit einer Prüfung erfolgreich absolviert. Die Aktenzeichen für Organentnahme bei der Tierversuchsanlage der HHU lauten O68/08 und G250/12, eine Tierversuchsgenehmigung hat vorgelegen. Die Tiere wurden in Käfigen bei 45% Luftfeuchtigkeit, 20-22 °C und einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Mäuse erhielten lipidreiche Western Diet (42% Fett, 0,15% Cholesterol) und Wasser ad libitum. Die Tierversuche wurden gemeinsam mit dem Betreuer der Doktorarbeit durchgeführt.

Zum Beginn der 12. Lebenswoche wurden den Versuchstieren beider Mausstämme subkutan liegende osmotische Minipumpen implantiert (s. Abb. 2). Sie wurden unter Anästhesie mit Ketamin (100 mg/kgKG, i.p.) und Xylazin (5mg/kgKG, i.p.) subkutan platziert und nach drei Wochen ersetzt. Bei der Hälfte der ApoE (-/-)-Mäuse waren sie mit Ang-(1-7), bei der anderen Hälfte und bei den WT-Mäusen mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Sie ermöglichten eine, 6-wöchige, kontinuierliche Behandlung der Mäuse mit Ang-(1-7) (82µg/kgKG/h), beziehungsweise mit physiologischer Kochsalzlösung.

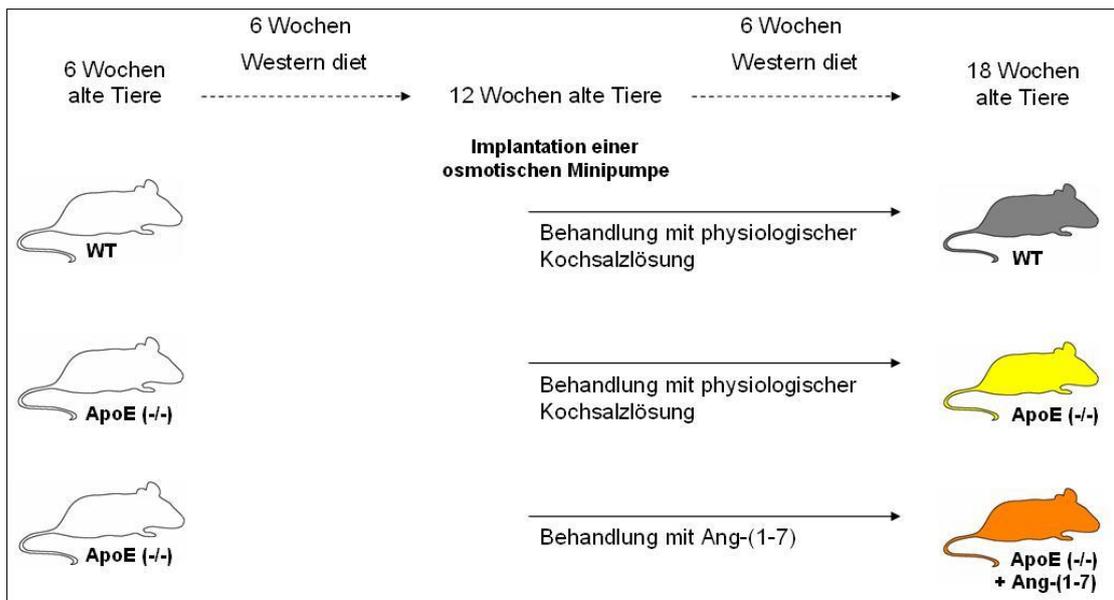


Abb. 2: Behandlungsschema der Mausgruppen. Gestrichelte Pfeile: Ernährungszeitraum, für alle 3 Mausgruppen gültig; Durchgezogene Pfeile: Behandlungszeitraum, für die jeweilige Mausgruppe gültig.

3.2 Blutdruckmessung

Der systolische Blutdruck wurde mittels *Tail-cuff*-Plethysmograph bestimmt. Hierfür wurden die 18 Wochen alten Mäuse, um Artefakte zu vermeiden, durch vier aufeinander folgende Tage Übung, an den die Blutdruckmessungen gewöhnt. Anschließend wurde an zwei folgenden Tagen zehn Blutdruckmessungen in stündlichen Abständen durchgeführt.

3.3 Isolierte perfundierte Niere

Bei dem Versuch wurde ein System verwendet (s. Abb. 3), in dem die isolierte Mausnieren in einer beheizbaren Glaskammer aufgehängt war und in konstanter Flussgeschwindigkeit mit einer Krebs-Henseleit-Lösung (s. Tabelle 2) perfundiert wurde.

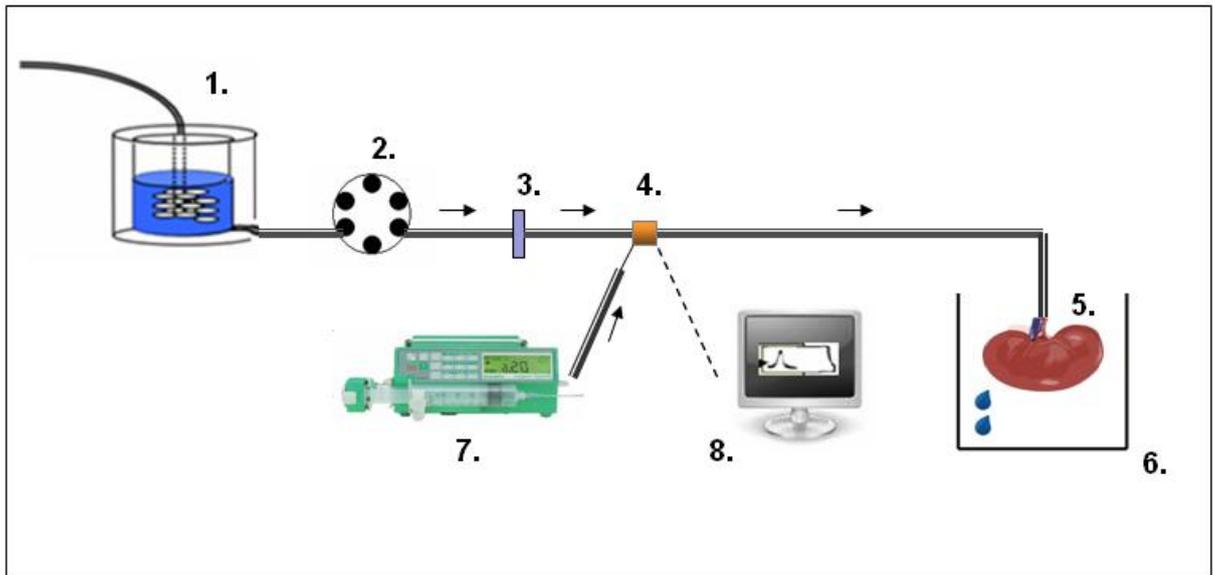


Abb. 3: Versuchsaufbau der isolierten perfundierten Niere. Die schwarzen Pfeile zeigen die Flussrichtung an; 1. Doppelwand-Glasbehälter als Reservoir mit Carbogen-gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung; 2. Planetengetriebene Pumpe; 3. Filter; 4. Stechmembran; 5. Mausnieren; 6. Doppelwand-Glasbehälter zur Aufhängung der Nieren; 7. Perfusor; 8. Druckaufnehmer und Datenanalysesystem.

Hierbei wurde die Krebs-Henseleit-Lösung in einer doppelwandigen Glaskammer auf 37°C erwärmt und mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) gesättigt. Eine planetengetriebene Pumpe war dafür zuständig, dass die Flüssigkeit von der Glaskammer über einen Filter in das Schlauchsystem eingebracht wurde. Durch einen zwischengeschalteten Druckaufnehmer war es möglich den zur Perfusion der Niere aufgebrauchten Druck zu registrieren. Diesem System konnte man zusätzlich Wirkstoffe der Krebs-Henseleit-Lösung beifügen, indem man sie entweder in gewünschter Konzentration in die doppelwandige Glaskammer gab oder sie mit einem Perfusor (0,158 ml/min), über eine zwischengeschaltete Stechmembran, hinzufügte.

Der Perfusionsdruck wurde während des folgenden Experimentes durch einen Druckaufnehmer in ein elektronisches Signal übersetzt und durch ein Datenerfassungssystem am Computer aufgezeichnet. Das System wurde in regelmäßigen Abständen kalibriert.

3.3.1 Isolierung der Nieren

Die 18 Wochen alten ApoE (-/-)- und WT-Mäuse wurden mit Ketamin (100 mg/kg i.p.) und Xylazin (5 mg/kg i.p.) anästhesiert. Mit einem Reflextest wurde die Narkosetiefe überprüft und bei ausreichender Anästhesie mit der Isolierung der Nieren begonnen.

Die gesamte Operation erfolgte unter einem Mikroskop. Mit einer Präparierschere wurde ein medianer Hautschnitt durchgeführt, bei der die Haut mit einer kleinen Pinzette bis zur Wirbelsäule abpräpariert und die Bauchhöhle in der Linea Alba eröffnet wurde. Als nächstes wurde beidseitig nach lateral, auf mittlerer Höhe der medianen Eröffnung, ein Entlastungsschnitt durchgeführt. Durch diesen Schnitt erhielt man eine kreuzförmige Eröffnung der Bauchhöhle. Mit den Klammern wurden die vier Lappen, die diese kreuzförmige Eröffnung bilden, zurückgezogen und fixiert. Dieses ermöglicht den Bauchraum während der ganzen Operation eröffnet zu halten.

Als nächstes wurde, mit Hilfe eines Tupfers, der Darm des Tieres nach rechts cranial verschoben und alle Strukturen im Bauchraum von Fettgewebe befreit, so dass die Nieren, ihre Nierengefäße, Ureteren, sowie Aorta und V. Cava gut sichtbar wurden.

Anschließend wurde eine Schlinge aus Seidenfaden vorbereitet, die der späteren Ligatur diene. Sie wurde um die abdominale Aorta direkt cranial des Abgangs der A. renalis dextra gelegt. Zur kurzfristigen Unterbrechung des Blutflusses wurde, zwischen Abgang der A. renalis sinistra und der iliakalen Bifurkation, ein Mini-Gefäßclip auf die Aorta gesetzt. Dadurch war es möglich, distal des Gefäßclips, die Aorta mit einer Strabismus-Federschere zu eröffnen und mit einem Polyethylenschlauch zu kanülieren. Dieser Polyethylenschlauch wurde mit der vorbereiteten Ligatur in dieser Position abgedichtet und fixiert.

Die Maus wurde direkt anschließend unter Eröffnung beider Jugularvenen und Exartikulation im Occipitalgelenk mit Durchtrennung des Rückenmarkes euthanasiert.

Danach wurde, schnell aufeinander folgend, die Aorta cranial der A. renalis dextra mit der vorbereiteten Schlinge unterbunden, die V. Cava zum Blutabfluss eröffnet, der Mini-Gefäßclip entfernt und die Nieren über den Polyethylenschlauch zur Blutausschwemmung perfundiert.

Bei der Perfusionslösung handelte es sich um, auf 37 °C erwärmte, mit Carbogen gesättigte, Krebs-Henseleit-Lösung. Die Perfusion wurde durch eine planetengetriebenen Pumpe, über einen 0.45 µm Filter, bei 7.25 ml/min/g Niere konstant gehalten.

Anschließend wurde die Aorta jeweils gegenüber dem Nierenarterienabgang inzidiert. Beide Aa.renales wurden über diesen Schnitt mit einem Polyethylenschlauch kanüliert und im Lumen der Arterie, mit einer vorbereiteten Ligatur um die entsprechende A. renalis, fixiert.

Danach wurden die von den Aa. renales abgehenden Gefäße mit Ligaturen verschlossen, um eine spätere Dichtigkeit der Aa. renales zu gewährleisten, und distal der Ligaturen durchtrennt. Dann wurden die Vv. renales, die Aa. renales (proximal der Kanülierungen) und die Ureteren durchtrennt. Die Nierenkapseln wurden mit anatomischen Pinzetten eröffnet und diese von der Niere abgetrennt.

Die Nieren konnten nun entnommen, in einer Aufhängung positioniert, und mit dem vorbereiteten Schlauchsystem verbunden werden. Dabei musste sichergestellt sein, dass der Polyethylenschlauch gut in der A.renalis fixiert war. Der Zufluss der Krebs-Henseleit-Lösung wurde weiter über den Polyethylenschlauch sichergestellt. Die Niere wurde anschließend in eine beheizte Glaskammer (37°C) gehängt.

3.3.2 Allgemeiner Versuchsablauf

Der basale Perfusionsdruck der Niere durch die Carbogen gesättigte Krebs-Henseleit-Lösung wurde durch die planetengetriebene Pumpe (7.25 ml/min/g Niere) sichergestellt. Dieser wurde am Beginn jedes Versuchs bestimmt (p basal). Anschließend wurde der Druck, der durch eine zusätzliche Gabe von Krebs-Henseleit-Lösung durch den zwischengeschalteten Perfusor (0,158 ml/min) erreicht wurde (nachfolgend Perfusordruck genannt), ermittelt (p perfusor). Dann wurde die regelrechte Funktion der präparierten Nieren durch eine Gabe von Kaliumchlorid (KCl) (0,001 M) durch den Perfusor (0,158 ml/min) überprüft. Der, durch die Depolarisierung der Gefäßmuskulatur ausgelöste, Druckanstieg wurde solange verfolgt, bis er ein Maximum erreichte (p KCl). Dann wurde die KCl-Zufuhr durch den Perfusor beendet und in einer 20-minütigen Auswasch- und Erholungsphase gewartet, bis der Druck auf wieder Ausgangsniveau

abfiel. Der entsprechende Druckanstieg wurde errechnet, indem man vom maximalen Druck unter KCl-Gabe (p_{KCl}) den basalen Perfusordruck subtrahiert: ($\Delta p_{\text{KCl}} = p_{\text{KCl}} - p_{\text{perfusor}}$). Nieren die einen Druckanstieg unter KCl-Gabe (Δp_{KCl}) von mindestens 60 mmHg zeigten wurden in die Wertung genommen.

Nach Ablauf der Erholungsphase wurden bei den Versuchen ohne Zugabe von Inhibitoren (s. 5.2 und 5.3) nach 30 Minuten mit dem Schreiben der Dosis-Wirkungskurve (DWK) begonnen. Bei den Inhibitionsversuchen, wurden im Anschluss an die Erholungsphase die entsprechenden Inhibitoren dem Reservoir hinzugefügt und die Nieren 30 min mit ihnen perfundiert. Anschließend wurde mit dem Schreiben der DWK begonnen.

In den DWKs der isolierten perfundierten Niere wurden die Nieren mit Ang II in aufsteigenden Konzentrationen perfundiert:

Ang II (10 pM); Ang II (30 pM); Ang II (100 pM); Ang II (300 pM); Ang II (1 nM); Ang II (3 nM) ; Ang II (10 nM); Ang II (30 nM).

Ang II wurde zur Perfusion der Nieren in gewünschter Konzentration über den zwischengeschalteten Perfusor (0,158 ml/min) in das System gebracht und jeweils vier Minuten lang perfundiert. Die nächste höhere Konzentration wurde jeweils direkt im Anschluss gegeben, so dass die Dosis-Wirkungskurve aus acht, aufeinander folgenden, vier-minütigen, Ang II-Gaben bestand (s. Abb. 4).

Schließlich wurde Ang II abgesetzt und Krebs-Henseleit-Lösung durch den zwischengeschalteten Perfusor (0,158 ml/min) gegeben. Es wird überprüft ob sich p_{perfusor} nach dem Schreiben der DWK wiedereinstellte. War dies nicht der Fall wurde die DWK nicht in die Wertung einbezogen.

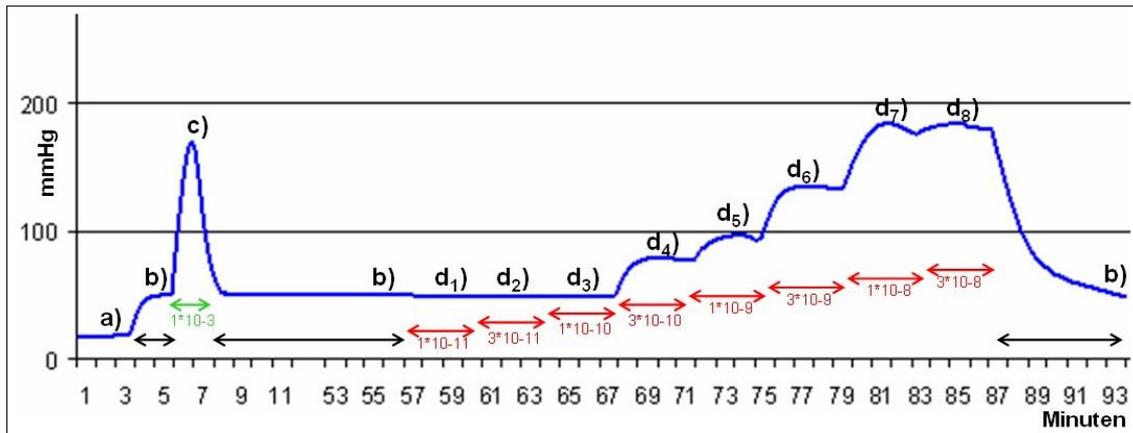


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. a) p basal; b) p perfusor; c) p KCl; d1)-d8) p Ang II₁₋₈ für die Konzentrationen $1 \cdot 10^{-11}$ M - $3 \cdot 10^{-8}$ M; schwarze Pfeile: Krebs-Henseleit-Gaben über Perfusor (0,158 ml/Min); grüner Pfeil: KCl-Gabe ($1 \cdot 10^{-3}$ M) über Perfusor (0,158 ml/Min); rote Pfeile: Ang II-Gaben ($1 \cdot 10^{-11}$ M – $3 \cdot 10^{-8}$ M) über den Perfusor (0,158 ml/Min).

3.3.3 Auswertung der Druckkurven

Die renale Druckantwort wurde in jedem Versuch für alle acht Ang II-Konzentration (p Ang II₁₋₈) ermittelt. Die Druckantworten errechneten sich aus dem maximalen Anstieg des Perfusionsdruckes über p perfusor.

3.4 Westernblot

3.4.1 Proteinisolierung aus dem Nierenkortex

Die Anästhesie der Tiere, sowie die ersten Schritte der Operation zur Isolierung der Nieren, entsprachen dem Vorgehen bei den Versuchen der isolierten perfundierten Niere (s. 2.2.1). Die Nieren wurden dabei zur Blutausschwemmung nicht mittels Krebs-Henseleit-Lösung sondern mit Phosphate Buffered Saline (PBS)-Lösung perfundiert. Die Nieren wurden wie oben beschrieben von ihrer Kapsel befreit und nahe des Hilus von den Ureteren, Vv. und Aa. renales abgetrennt. Nun wurden die Nieren isoliert und direkt danach, unter sterilen und eisgekühlten Bedingungen, mit einem sterilen Skalpell die Nierenpole abgetrennt. Diese wurden in vier gleich große Stücke geschnitten und in SafeSeal Reagiergefäß gegeben. Zur Gewebezerkleinerung wurde jeweils ein

Nierenstück zusammen mit 150 µl PBS-Lösung in einen 2 ml-Eppendorfbehälter überführt und mit dem TissueRuptor zerkleinert.

Bei der Lysierung wurde das zerkleinerte Gewebe mit einer Zentrifuge (15,000 x g; 10min) abzentrifugiert. Der Eppendorfbehälter wurde von außen mit Eis gekühlt und die Flüssigkeit über dem Homogenisat abgesaugt. Danach wurde dem Homogenisat Triton 1%-Lysispuffer (s. Tabelle 4) beigefügt, und es wurde damit für 30 min inkubiert. Schließlich wurde die Suspension erneut abzentrifugiert und das Lysat in einen frischen, eisgekühlten Eppendorfbehälter überführt.

3.4.2 Isolierung von präglomerulären Gefäßen

Die ersten Schritte bei der Isolierung von präglomerulären Gefäßen aus Mäusenieren entsprachen dem Vorgehen bei den Versuchen der isolierten perfundierten Niere.

Die Aorta wurde kanüliert und der Kreislauf über 5 min mit eisgekühlter PBS-Lösung perfundiert, bis die Nieren blass wurden. Darauf folgend wurde der Kreislauf mit 50 ml Perfusionslösung (s. Tabelle 2) perfundiert. Anschließend wurde die Nierenkapsel eröffnet und die Nieren dem Situs entnommen. Nun wurden mit einem Skalpell die Nierenpole abgetrennt und das Nierenmark verworfen. Dazu wurden die Nieren längs in zwei gleich große Hälften geschnitten, der Kortex vorsichtig von dem Nierenmark getrennt und in eine gläserne Petrischale gegeben. Anschließend wurde er über 4 min mit der Bügelklinge zerkleinert, bis eine breiige Masse entstanden war. Dann wurde diese Masse in 20 ml PBS-Lösung gelöst und in ein 50 ml Gefäß überführt. Der Inhalt wurde anschließend dreimal mittels einer 20 ml-Spritze aufgezogen und durch eine 0,90 x 70 mm Kanüle gedrückt. Nun wurde gefäßanteiliges Gewebe von Gewebe ohne Gefäßanteil getrennt, indem man einen starken Magneten an die Wand des Probengefäßes hielt. Somit konnte man die mit Eisenpartikeln geladenen Gefäßabschnitte zur Seite halten, während man das restliche Gewebe abgießen und verwerfen konnte. Danach wurden die magnetisierten Teilchen erneut mit 20 ml PBS-Lösung suspendiert und siebenmal mittels einer neuen 20 ml-Spritze durch eine 0,60 x 25 mm Kanüle gedrückt. Mittels des Magneten wurden erneut die magnetisierten Teilchen zurückgehalten und der Überstand abgekippt. Anschließend wurden die Teilchen ein weiteres Mal mit PBS-Lösung versetzt und danach mittels einer neuen 20ml-Spritze durch das vorbereitete Porensieb gespritzt. Das Netz wurde danach von

unten mit einem Papiertuch getrocknet und die gewonnenen Teilchen wurden auf dem Netz mit einem Skalpell abgekratzt. Die magnetisch isolierten präglomerulären Gefäße wurden in Westernblot-Versuchen verwendet.

3.4.3 Allgemeiner Versuchsablauf

Es wurde zuerst das Trenngel (s. Tabelle 5), dann das Sammelgel (10% SDS) (s. Tabelle 6) nach Protokoll zwischen zwei Glasplatten gegossen und darin mit einem Plastikkamm Taschen für die Probenfüllung freigehalten. Dann wurden die Glasplatten mitsamt den Gelen in eine hierfür vorgesehene Trennkammer eingespannt, die mit Laufpuffer (s. Tabelle 7) gefüllt war.

Die Proben wurden mit Lämmli Sample Buffer versetzt und darauf folgend wurden die Taschen des Gels mit jeweils 15 µg Protein pro Probe und eine Tasche mit 10 µl Proteinmarker gefüllt. Danach wurde die Gelelektrophorese, mit einer Sammelphase von 70 V über 30 min und einer Trennphase von 20 mA über 90 min, durchgeführt.

Sobald die Gelelektrophorese beendet war, wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel auf eine in Transferpuffer (s. Tabelle 8) getränkte Nitrocellulosemembran gelegt. Anschließend wurde das Gel, samt der Nitrocellulosemembran, zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Papieren auf den Blotter gelegt. Der anschließende Blottvorgang bei 12 V dauerte 50 min. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran nach dem Blotten bei 4 °C auf einem Shaker (Frequenz 50/min), für zwölf Stunden in 5%, in Protein-Waschpuffer gelöst, Bovinen Serum Albumin inkubiert. Als nächster Schritt wurde über weitere zwölf Stunden, bei 4 °C auf einem Shaker (Frequenz 50/min), die Membran mit dem Primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran in Protein-Waschpuffer (s. Tabelle 9) dreimal, für jeweils 5 min auf einem Shaker (Frequenz 80/min), gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit Antikörpern inkubiert die gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder Alpha-Actin gerichtet waren. Dies geschah für 60 min auf einem Shaker (Frequenz 50/min) bei 20 °C. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschvorgängen in Protein-Waschpuffer wird die Membran mit Sekundär-Antikörpern, für 60 min auf einem Shaker (Frequenz 50/min) bei 20 °C,

inkubiert. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschkvorgängen in Protein-Waschpuffer wurde die Membran im Dunkeln für eine Minute mit der Chemilumineszenz Meerrettich Peroxidase-Substrat für Westernblots inkubiert und anschließend mit der Kamera abfotografiert. Die Fotos wurden bei 5-minütiger Belichtungszeit bei maximal geöffneter Blende (F 1,8) angefertigt.

3.4.4 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der AlphaEase-Software am PC, mit deren Hilfe die optische Dichte der Banden bestimmt werden konnte. Dabei wurde die jeweilige Bande mit einer GAPDH- oder Alpha-Aktin-Bande auf der gleichen Membran ins Verhältnis gesetzt.

3.5 Bestimmung von 8-Isoprostane im Mäuseurin

Für die Bestimmung von 8-Isoprostane wurden die Mäuse in metabolische Käfige gesetzt, und während 24 Stunden Urin gesammelt. Die 8-Isoprostane Konzentrationen im Urin wurde mittels eines Enzyme-Immunoassay-Kits bestimmt und zum Urin-Kreatinin ins Verhältnis gesetzt.

3.6 Quantifizierung arteriosklerotischer Plaques in Mauseaorten

3.6.1 Präparation der Mauseaorten

Nachdem die Versuchstiere beim Versuch der isolierten perfundierten Niere (s. 2.3.1) durch Eröffnung beider Jugularvenen und Exartikulation im Occipitalgelenk mit Durchtrennung des Rückenmarkes euthanasiert wurden, konnte unter dem Mikroskop die Aorta aus dem Maussitus entnommen werden. Hierzu wurde die Aorta proximal, am Herz, und distal, am Zwerchfell, mit einer Federschere durchtrennt. Anschließend wurde die Aorta mittels Federschere und Pinzette vorsichtig von prävertebral liegenden Strukturen abpräpariert und in eine Petrischale mit PBS-Lösung gegeben. Anschließend

wurde unter dem Mikroskop vorsichtig, mittels spitzen Pinzetten, die Adventitia von der Media abgetrennt und mit einer Federschere längs eröffnet.

3.6.2 Färbung der Mauseorten

Oil Red O ist ein fettlöslicher Diazofarbstoff, der zum Anfärben von Lipiden und Triglyceriden in Geweben und Zellen geeignet ist. Die arteriosklerotischen Plaques der Mauseorta wurden angefärbt, indem die präparierte Mauseorta bei Raumtemperatur für 5 min in 78 % Methanol äquilibriert wurde. Danach wurde sie in die Oil-Red-O-Färbelösung gegeben, und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde sie für 15 min in frisches 78 % Methanol gegeben.

3.6.3 Fotografie und Auswertung der gefärbten Mauseorten

Die gefärbte Aorta wurde auf einem Objektträger, der leicht mit PBS-Lösung benetzt war, durch Adhäsionskräfte in längs eröffneter Position positioniert, wobei das Endothel nach oben zeigte. Anschließend wurde ein Deckglas auf die Aorta platziert und darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Aorta und Deckglas befinden. Danach wurde der Objektträger mit Aorta auf einem Auflicht-Mikroskop platziert und mit einer am trinokularem Aufsatz befestigten Mikroskopkamera fotografiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass bei 10-facher Vergrößerung die Beleuchtung und die Belichtungszeit konstant gehalten werden.

Die Fotos der gefärbten Aorten wurden mit einem Computerprogramm ausgewertet, indem die rotgefärbten Flächen der Aorta erkannt und als Anteil der Fläche der Gesamtaorta angegeben wurden.

4 Material

4.1 Behandlung der Versuchstiere

Western diet (Sniff, Soest, BRD)

Osmotische Minipumpe: Model 1004 (Alzet, Cupertino, USA)

Ang-(1-7) (Bachem, Bubendorf, Schweiz)

Blutdruckmessgerät: BP-98A (Softron, Tokyo, Japan)

Käfige: Typ III Makrolon-Polycarbonat (Bioscape, Castrop-Rauxel, BRD)

4.2 Isolierte perfundierte Niere

4.2.1 Geräte und Hilfsmittel

Doppelwand-Glasbehälter (Harvard Apparatus, Holliston, USA)

Wärmebad mit Pumpe: Umwälzthermostat DC10-P5/U (Roth, Karlsruhe, BRD)

Planetengetriebene Pumpe: Minipuls 2 (Gilson, Middleton, USA)

Pumpenschlauch (Gilson, Middleton, USA)

Filter: 0.45 µm, Filtropur S 0.2 (Sarstedt, Nümbrecht, BRD)

Perfusor: Harvard Pump 11Plus Dual Syringe (Harvard Apparatus, Holliston, USA)

Stechmembran (Gilson, Middleton, USA)

Druckaufnehmer: APT 300 (Harvard Apparatus, Holliston, USA)

Datenerfassungs- und -analysesystem: Powerlab (ADInstruments, Sydney, Australien)

Mikroskop: Olympus CO11 (Olympus, Tokio, Japan)

Seidenfaden: Seraflex ®,1 EP (Serag Wiessner, Naila, BRD)

Mini-Gefäßclip: nach Biemer 9 mm (KLS Martin, Tuttlingen, BRD)

Strabismus-Federschere: gerade, 11.5 cm (KLS Martin, Tuttlingen, BRD)

Präparierschere (KLS Martin, Tuttlingen, BRD)

Kleine Pinzette (Aesculab AG, Tuttlingen, BRD)

Anatomischen Pinzetten: fein, gebogen, 10.5 cm (KLS Martin, Tuttlingen, BRD)

Pinzetten: fein, gebogen, 10,5 cm (KLS Martin, Tuttlingen, BRD)

Mosquitoklemme: gebogen, 12,5cm, (KLS Martin, Tuttlingen, BRD)

Polyethylenschlauch: ID 0.40 mm, AD 0.80 mm (Portex, Kent, UK)

Polyethylenschlauch: ID 0.28 mm, AD 0.61 mm (Portex, Kent, UK)

4.2.2 Reagenzien und Lösungen

Krebs-Henseleit-Lösung: Die Lösung hatte einen pH zwischen 7.38 und 7.41.

NaCl	Merck, Darmstadt, BRD	6,895 g/l
KCl	Merck, Darmstadt, BRD	0,35 g/l
MgSO ₄	Merck, Darmstadt, BRD	0,11 g/l
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, BRD	2,10 g/l
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, BRD	0,14 g/l
Glucose	Merck, Darmstadt, BRD	1,9997 g/l
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, BRD	0,37 g/l
EDTA	Merck, Darmstadt, BRD	0,0249 g/l
Ascorbinsäure	Riedel-de-Haen, Selze, BRD	0,012 g/l

Tabelle 1: Krebs-Henseleit-Lösung.

Angiotensin II (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

PD 98059 (Merck, Darmstadt, BRD)

SB 203580 (Merck, Darmstadt, BRD)

4.2.3 Isolierung von präglomerulären Gefäßen

PBS-Lösung (Biochrom, Berlin, BRD)

Bügelklinge (Roth, Karlsruhe, BRD)

Skalpellklinge (Roth, Karlsruhe, BRD)

Chirurgische Pinzette (KLS Martin, Tuttlingen, BRD)

Glas-Petrishale (Roth, Karlsruhe, BRD)

Spritzen 20 ml (Braun, Melsungen, BRD)

Kanüle 0,90 x 70 mm (Braun, Melsungen, BRD)

Kanüle 0,60 x 25 mm (Braun, Melsungen, BRD)

Netz mit 100 µm Porengröße (Merck, Darmstadt, BRD)

Dewargefäß (Roth, Karlsruhe, BRD)

Eppendorf Safe-Lock Gefäß (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD)

Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

PBS-Lösung	Biochrom, Berlin, BRD	50 ml
Eisen(II,III)-oxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	0,5 g
BSA Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, BRD	0,5 g

Tabelle 2: Perfusionslösung

4.3 Westernblot

4.3.1 Antikörper

Bei den Versuchen wurden verschiedene Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (s. Tabelle 1):

p38 MAP Kinase Antibody	Rabbit	Cell Signalling Technology ®	1:750
Phospho-p38 MAPK (Thr10/Tyr182) Antibody	Rabbit	Cell Signalling Technology ®	1:1300
GAPDH (FL-335) IgG	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology ®	1:200
Anti-phospho-MLC(20)-Ab	Rabbit	Acris Antibodys GmbH	1:500
Anti-p47-phox-Ab	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology ®	1:500
ECL Anti-rabbit IgG, HRP-Linked F(ab') ₂	Donkey	GE Healthcare®	1:15000 bei p38
ECL Anti-rabbit IgG, HRP-Linked F(ab') ₂	Donkey	GE Healthcare®	1:12000 bei p-p38

Tabelle 3: Im Westernblot verwendete Antikörper.

4.3.2 Gele und Puffer

1M Tris pH 7,5	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1 ml
3M KCl	Merck, Darmstadt, BRD	2,5 ml
0,5M EDTA	Merck, Darmstadt, BRD	0,1 ml
Destilliertes H ₂ O	-	71,4 ml
1% Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	5 ml
1mM Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	500 µl
Complete mini [®]	Roche, Basel, Schweiz	1 Tablette

Tabelle 4: Triton 1% Lysispuffer.

Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe, BRD	3 ml
Destilliertes H ₂ O	-	2,535 ml
Tris HCl 2M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	0,81 ml
Tris Base 2M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	2,265 ml
Sodium dodecyl sulfat 20%	Biomol, Hamburg, BRD	0,09 ml
Ammoniumpersulfat 10%	Biomol, Hamburg, BRD	0,09 ml
Temed	Roth, Karlsruhe, BRD	0,015 ml

Tabelle 5: Trenngel

Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe, BRD	0,535 ml
Destilliertes H ₂ O	-	2,35045 ml
Tris HCl 2M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	0,40293 ml
Tris Base 2M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	0,01332 ml
Sodium dodecyl sulfat 20%	Biomol, Hamburg, BRD	0,0333 ml
Ammoniumpersulfat 10%	Biomol, Hamburg, BRD	0,040 ml
Temed	Roth, Karlsruhe, BRD	0,005 ml

Tabelle 6: Sammelgel.

Tris Base (Trizma ® base)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	29g
Glycin	AppliChem, Darmstadt, BRD	144g
Sodium dodecyl sulfate	Biomol, Hamburg, BRD	10g
Destilliertes H ₂ O	-	Auf 1 Liter aufgießen

Tabelle 7: Laufpuffer.

Tris Base (Trizma ® base)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	6g
Glycin	AppliChem, Darmstadt, BRD	28,8 g
Methanol	Roth, Karlsruhe, BRD	400 ml
Destilliertes H ₂ O	-	Auf 2 Liter aufgießen

Tabelle 8: Transferpuffer.

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

Tabelle 9: Protein-Waschpuffer

4.3.3 Geräte

Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, BRD)

TissueRuptor (Qiagen, Hilden, BRD)

SafeSeal Reagiergefäß 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, BRD)

Glasplatten, Kamm, Schaumstoff, Plastikklemmen, Plastikgestell, Laufkammer: Mini-Protean® Tetra System (BIORAD, Hercules, USA)

Powersupply: PowerPac Universal (BIORAD, Hercules, USA)

Zentrifuge: Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg, BRD)

Blotter: Trans-Blot®, SD (BIORAD, Hercules, USA)

Shaker: HS 260 (IKA, Staufen im Breisgau, BRD)

Kamera: FluorChem® Western Blot Imaging (Cell Biosciences, Santa Clara, USA)

Software: AlphaEase® FC Software (Alpha Innotech Cooperation, San Leandro, USA)

Thermostat: Bio TDB-100 (Biosan, Riga, Lettland)

4.3.4 Reagenzien

Probenpuffer: Laemmli 2× Konzentrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

PBS-Lösung (Biochrom, Berlin, BRD)

Nitrocellulosemembran: 0,45µm Porengröße (Protran®, Whatman, Dassel, BRD)

Bovines Serum Albumin 5%, Proteasefrei, pH 7,0 (Prolabo®, Radnor, USA)

Proteinmarker: Broad Range (New England BioLabs, Ipswich, USA)

Chemilumineszenz: Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche, Basel, Schweiz)

4.4 Isoprostan-8-Enzymimmunoassay

Die 8-Isoprostane Konzentrationen im Urin wurden mittels eines *Enzyme-Immunoassay-Kits* (Cayman Chemical Company) bestimmt.

4.5 Quantifizierung arteriosklerotischer Plaques in Mauseorta

Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Oil-Red-O-Stammlösung: 0,4g Oil-Red-O in 80 ml MeOH techn.

Oil-Red-O-Färbelösung: 10 ml 1M NaOH und 35 ml Oil-Red-O-Stammlösung

Auflicht-Mikroskop Advance ICD (Bresser, Rhede, BRD)

Mikroskopkamera MikroCam 5.0 (Bresser, Rhede, BRD)

Software: ImageJ

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von Ang-(1-7) auf den systolischen Blutdruck

Um einen möglichen Einfluss der chronischen Ang-(1-7)-Behandlung auf den Blutdruck zu untersuchen, wurden die systolischen Blutdrücke der drei Mausgruppen erfasst und verglichen. Die erhobenen Werte wurden für jedes Tier gemittelt. In der systolischen Blutdruckmessung zeigten sich zwischen WT- und ApoE (-/-)-Mäusen, sowie zwischen ApoE (-/-)-Mäusen mit und ohne Ang-(1-7)-Behandlung, keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 5).

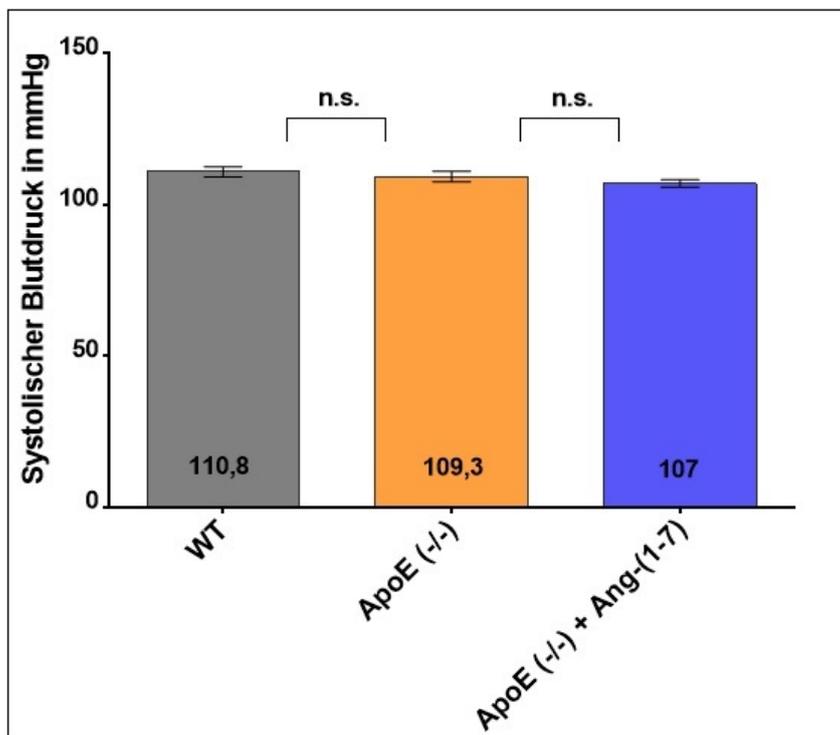


Abb. 5: Systolischer Blutdruck: Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den systolischen Blutdrücken der 3 Mausgruppen. Mittelwerte für WT-Mäuse, ApoE (-/-)-Mäuse und mit Ang-(1-7) behandelte ApoE (-/-)-Mäuse. WT (n=5); ApoE (-/-) (n=5); ApoE (-/-) + Ang-(1-7) (n=6). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert + SD. n.s.= kein signifikanter Unterschied (ungepaarter t-Test nach Student, $P < 0,05$)

WT n=5 vs. ApoE n=5 vs. ApoE (-/-) + Ang-(1-7) n=6 (Mittelwert in mmHg \pm Standardabweichung): 110,8 \pm 3,75 vs. 109,3 \pm 3,88 vs. 107 \pm 3.

5.2 Erhöhte renale Druckantwort auf Ang II in ApoE (-/-)-Mäusen.

Im Versuch der isolierten perfundierten Niere galt es zu untersuchen, ob sich die Ang II-induzierte renale Druckantwort von WT und ApoE (-/-)-Mäusen unterscheidet. Die Ang II-induzierte Druckantwort war in ApoE (-/-)-Mäusen, im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht (s. Abb. 6), daraus lässt sich schließen, dass bei ApoE (-/-)-Mäusen unter Ang II- Gabe die vaskuläre Reaktivität in Widerstandsgefäßen gesteigert ist.

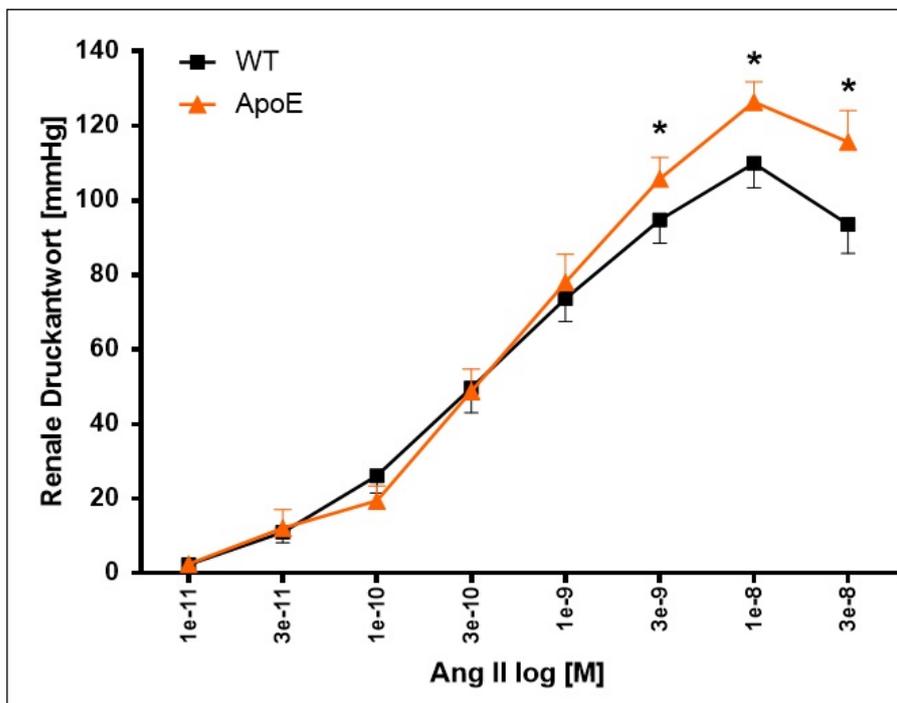


Abb. 6: Ang II-Dosis-Wirkungs-Kurven für WT- und ApoE (-/-)-Mäuse: In ApoE (-/-)-Mäusen ist die Ang II-induzierte renale Druckantwort signifikant gesteigert. WT (n=19); ApoE (-/-) (n=14). Ang II wurde alle 4 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM. * zeigt einen signifikanten Unterschied (One-way ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von ungepaarten t-Test nach Student, $P < 0,05$; [erfolgte in gemeinsamer Analyse mit ApoE (-/-) +Ang-(1-7), s. 5.3]).

WT n=19 vs. ApoE (-/-) n=14 (Mittelwert in mmHg \pm SEM): 1x10-11 M (2,3 \pm 0,96 vs. 2,6 \pm 0,94); 3x10-11 M (11 \pm 2,75 vs. 11,4 \pm 4,79); 1x10-10 M (26,13 \pm 4,61 vs. 18,2 \pm 3,8); 3x10-10 M (49,7 \pm 6,49 vs. 52,45 \pm 5,74); 1x10-9 M (73,64 \pm 6,02 vs. 83,6 \pm 7,17); 3x10-9 M (94 \pm 6,09 vs. 111,16 \pm 5,57); 1x10-8 M (110 \pm 6,43 vs. 132,2 \pm 5,24); 3x10-8 M (93,6 \pm 7,51 vs. 115,7 \pm 7,83)

5.3 Chronische Angiotensin-(1-7)-Behandlung reduziert die renale Druckantwort in ApoE (-/-)-Mäusen

Aktuelle Studien beschreiben Ang-(1-7) als endogenen Gegenspieler zu Ang II. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob Ang-(1-7) in der Lage ist, die erhöhte Ang II-induzierte Druckantwort bei ApoE (-/-)-Mäusen zu normalisieren. Um dies zu testen wurde im Versuch der isolierten perfundierten Niere die Ang II-Dosis-Wirkungskurven von chronisch Angiotensin-(1-7)-behandelten mit unbehandelten ApoE (-/-)-Mäusen verglichen. Eine chronische Behandlung von ApoE (-/-)-Mäusen mit Ang-(1-7) (82µg/kgKG/h) führt zu einer signifikant abgeschwächten Ang II-induzierten renalen Druckantwort im Vergleich zu unbehandelten ApoE (-/-)-Mäusen (s. Abb 7).

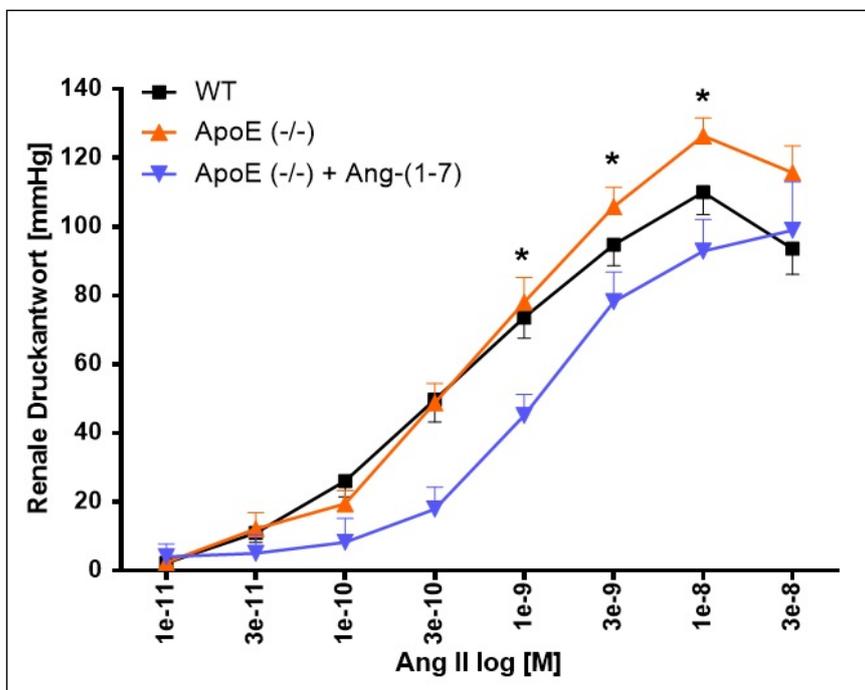


Abb. 7: Ang II-Dosis-Wirkung-Kurve für mit Ang-(1-7) behandelte ApoE (-/-)-Mäuse: Eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung normalisiert die renale Druckantwort auf Ang II in ApoE (-/-)-Mäusen. WT (n=19); ApoE (-/-) (n=14); ApoE (-/-) + Ang-(1-7)

[82µg/kgKG/h] (n=5). Ang II wurde alle 4 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert ± SEM. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen ApoE (-/-) und ApoE (-/-) + Ang-(1-7) (One-way ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von ungepaarten t-Test nach Student, P<0,05)

ApoE (-/-) + Ang-(1-7) n=5 vs. ApoE (-/-) n=14 (Mittelwert in mmHg ± SEM):
1x10⁻¹¹ M (4,1±9,47 vs. 2,6±0,94); 3x10⁻¹¹ M (5,1±13,7 vs. 11,4±4,79); 1x10⁻¹⁰ M

($8,3 \pm 17,32$ vs. $18,2,4 \pm 3,8$); 3×10^{-10} M ($17,9 \pm 15,89$ vs. $52,45 \pm 5,74$); 1×10^{-9} M + ($45,2 \pm 15,48$ vs. $83,6 \pm 7,17$); 3×10^{-9} M ($78,2 \pm 21,67$ vs. $111,16 \pm 5,57$); 1×10^{-8} M + ($92,88 \pm 23,07$ vs. $132,2 \pm 5,24$); 3×10^{-8} M ($99 \pm 28,28$ vs. $115,7 \pm 7,83$)

5.4 MLC(20)-Phosphorylierung in präglomerulären Gefäßen

Eine Erhöhung des zytosolischen Ca^{++} -Levels bewirkt zusammen mit Calmodulin eine Aktivierung der MLC-Kinase, welche die MLC(20) phosphoryliert. Die phosphorylierte MLC(20) steigert die ATPase-Aktivität des Myosins und ist daher ein geeigneter Marker für die gesteigerte vaskuläre Reaktivität.

Der folgende Versuch dient der Untersuchung, ob die gesteigerte renale Druckantwort in ApoE (-/-)-Mäusen mit einem erhöhten Phosphorylierungsgrad der 20 kDa regulatory myosin light chain [MLC(20)] einhergeht und ob dieser durch eine chronische Behandlung mit Ang-(1-7) reduziert werden kann.

In der Tat konnte in präglomerulären Gefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen, im Vergleich zu WT-Mäusen, eine signifikant stärkere MLC(20)-Phosphorylierung im Vergleich zu WT Mäusen gemessen werden. Diese können durch eine Behandlung mit Ang-(1-7) signifikant gesenkt werden (s. Abb 8 und 9). Dieses Ergebnis steht somit im Einklang mit den vorhergehenden Ergebnissen aus der isolierten perfundierten Niere (s. Abb 7), bei denen die vaskuläre Reaktivität bei ApoE (-/-)-Mäusen gesteigert ist und durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung normalisiert werden kann.

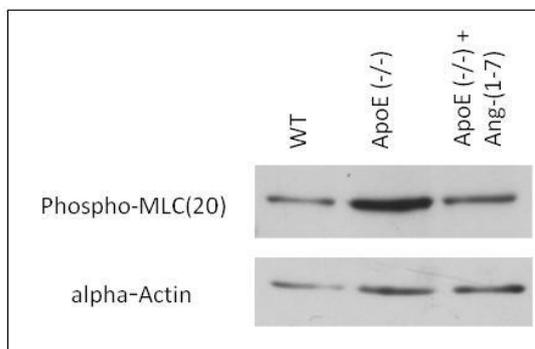


Abb. 8: Westernblot aus präglomerulären Gefäßen von phospho-MLC(20). Repräsentative Westernblotbanden für phospho-MLC(20) bezogen auf alpha-Actin als „Housekeeper“.

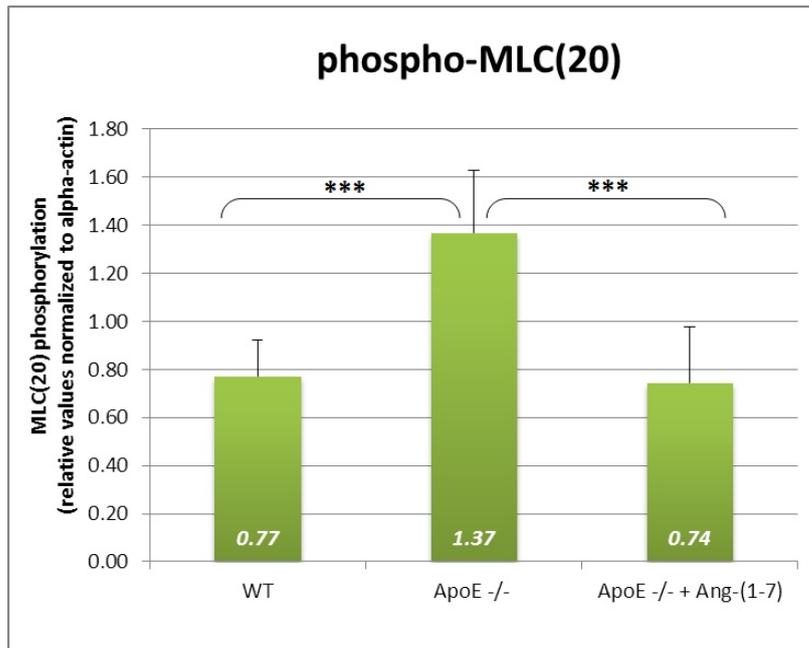


Abb. 9: Westernblot: MLC(20)-Phosphorylierung in präglomerulären Gefäßen: Eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung reduziert die erhöhte MLC(20)-Phosphorylierung in präglomerulären Gefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen. WT (n=8); ApoE (-/-) (n=7); ApoE (-/-) + Ang-(1-7) (n=7). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und mit einem internen Standard (Alpha-Aktin) verglichen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SD. (ungepaarter t-Test nach Student, *** zeigt einen signifikanten Unterschied $p < 0,001$).

WT n=8 vs. ApoE n=7 vs. ApoE (-/-) + Ang-(1-7) n=7 (Mittelwert im Verhältnis zu Alpha-Aktin \pm SD): $0,77 \pm 0,15$ vs. $1,37 \pm 0,26$ vs. $0,47 \pm 0,23$.

5.5 Ang-(1-7) reduziert ROS Produktion durch einen p47phox-abhängigen Mechanismus

Hypercholesterinämie steigert die Produktion von ROS in ApoE (-/-)-Mäusen, eine erhöhte Menge an ROS in Gefäßen führt zu Arteriosklerose, endothelialer Dysfunktion und Gefäßverletzung. Um zu klären, ob Ang-(1-7) die ROS-Produktion beeinflusst, wurde im folgenden Versuch die Isprostane-8-Exkretion im Urin der drei Mausgruppen gemessen.

Isoprostane sind eine Familie von Eicosanoiden nicht-enzymatischer Herkunft. Sie entstehen infolge zufälliger Oxidierung von Gewebephospholipiden durch

Sauerstoffradikale. Isoprostane sind im Mäuseurin messbar und spiegeln den oxidativen Stress in der Niere sehr gut wider.

In Ang-(1-7)-behandelten ApoE (-/-)-Mäusen ist die Isoprostane-8-Exkretion sowohl im Vergleich zu unbehandelten ApoE (-/-)-Mäusen, als auch zu WT-Mäusen signifikant erniedrigt (s. Abb 10). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Behandlung mit Ang-(1-7) die Produktion von ROS in ApoE (-/-)-Mäusen reduziert. Erstaunlicherweise zeigte sich zwischen ApoE (-/-)- und WT-Mäusen kein signifikanter Unterschied. Die Ursache für diese Beobachtung ist bisher nicht erklärbar.

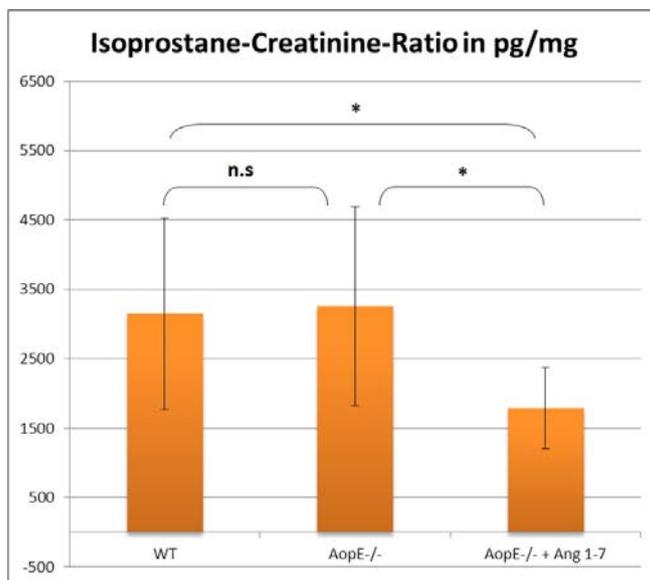


Abb. 10: Enzymimmunoassay - Isoprostane-8-Exkretion im Mäuseurin: Eine chronische Ang (1-7)-Behandlung führt zu einer signifikant reduzierten Isoprostane-8-Exkretion bei ApoE (-/-)-Mäusen. WT (n=10); ApoE (-/-) (n=10); ApoE (-/-) + Ang-(1-7) (n=9). Isoprostane-Creatinin-Verhältnis im Mäuseurin. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SD. * zeigt einen signifikanten Unterschied (Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Mann-Whitney-U-Test, $P < 0,05$).

WT n=10 vs. ApoE n=10 vs. ApoE (-/-) + Ang-(1-7) n=9 (Mittelwert Isoprostane-Creatinin-Ratio im Mäuseurin in pg/mg \pm Standardabweichung): 3147,8 \pm 1382 vs. 3258,5 \pm 1431,3 vs. 1786,4 \pm 583,8.

Die NAD(P)H-Oxidase ist ein wichtiger Synthesort für intrazellulär produzierte ROS, welche in der Lage sind vasoaktives NO abzubauen und somit die NO-Bioverfügbarkeit

herabzusetzen. Die p47-Phox ist eine wichtige Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase und nimmt bei der Produktion von ROS eine Schlüsselrolle ein.

Im Westernblot aus dem Nierenkortex von ApoE (-/-)-Mäusen (s. Abb 11) konnte im Vergleich zu WT-Mäusen eine signifikant erhöhte p47-Phox-Expression gemessen werden. Diese erhöhte p47-Phox Expression ließ sich durch die Behandlung von ApoE (-/-) mit Ang-(1-7) signifikant senken (s. Abb 12). Aus diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass die chronische Ang-(1-7)-Behandlung die Synthese von p47-Phox in der Niere signifikant reduziert, was schließlich zu einer signifikant verminderten ROS-Produktion durch die NAD(P)H-Oxidase führt.

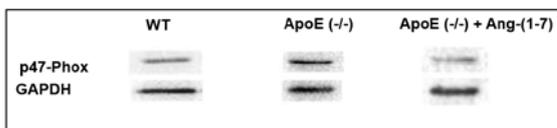


Abb. 11: Westernblot von p47-Phox im renalen Kortex. Repräsentative Westernblotbanden für p47-Phox bezogen auf GAPDH als „Housekeeper“.

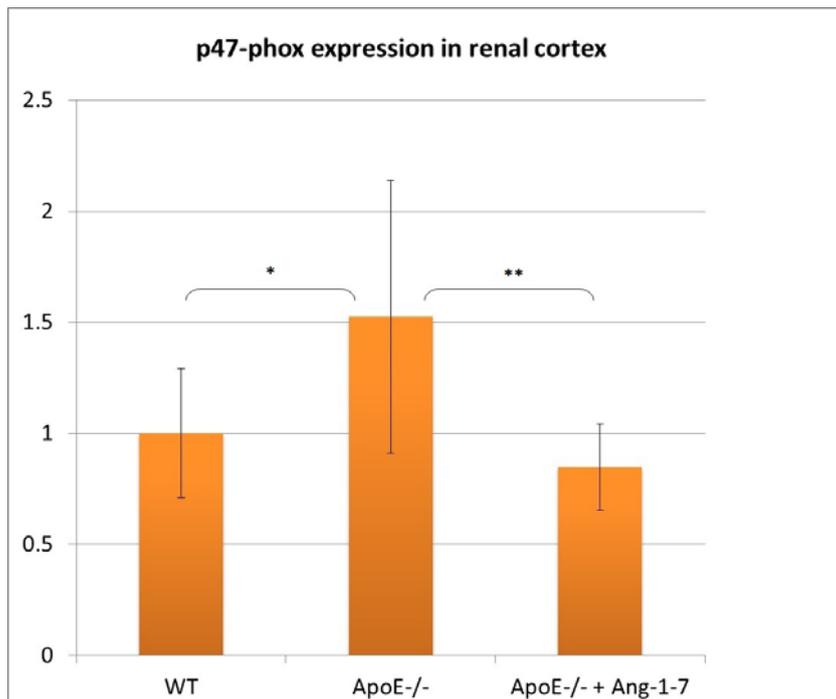


Abb. 12: Westernblot: Expression von p47-Phox im renalen Kortex: Eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung reduziert die gesteigerte p47-phox-Expression in ApoE (-/-)-Mäusen. WT (n=4); ApoE (-/-) (n=4); ApoE (-/-) + Ang-(1-7) (n=4). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und mit einem internen Standard (GAPDH) verglichen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SD. * und ** zeigen signifikante Unterschiede (ungepaarter t-Test nach Student, $P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$).

WT n=4 vs. ApoE n=4 vs. ApoE (-/-) + Ang-(1-7) n=4 (Mittelwert der p47-Phox-GAPDH-Ratio im Verhältnis zu WT \pm Standardabweichung): $1\pm 0,29$ vs. $1,52\pm 0,61$ vs. $0,85\pm 0,19$.

5.6 Chronische Ang-(1-7)-Behandlung normalisiert die vaskuläre Reaktivität durch eine Reduktion der p38-Aktivierung

Die p38-MAPK ist bei Hypercholesterinämie vermehrt aktiviert und es ist bekannt, dass ROS in der Lage sind diese zu aktivieren. Über eine Rolle von p38 bei der Regulation des Gefäßtonus ist jedoch bisher noch wenig bekannt. SB 203580 ist ein spezifischer Inhibitor der p38-MAPK. Es hemmt die Homologe p38 α , p38 β und p38 β 2 kompetitiv an der Adenosintriphosphat-Bindungsstelle. Im vorausgegangenen Versuch (s. 5.5) konnte gezeigt werden, dass p47-Phox, eine Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase, im renalen Kortex von ApoE (-/-)-Mäusen verstärkt exprimiert wird. Da ROS die p38-MAPK aktivieren, war es interessant zu untersuchen, ob in ApoE (-/-)-Mäusen die p38-MAPK bei der gesteigerten renalen vaskulären Reaktivität auf Ang II eine Rolle spielt.

Als erstes wurde der Einfluss einer p38-MAPK-Inhibition (SB203580 5 μ M) auf die renale Druckantwort in der isoliert perfundierten Niere von WT Mäusen untersucht: Eine akute p38-Inhibition zeigte keinen Effekt auf die Ang II-induzierte Druckantwort in der isoliert perfundierten Niere von WT Mäusen (s. Abb. 13).

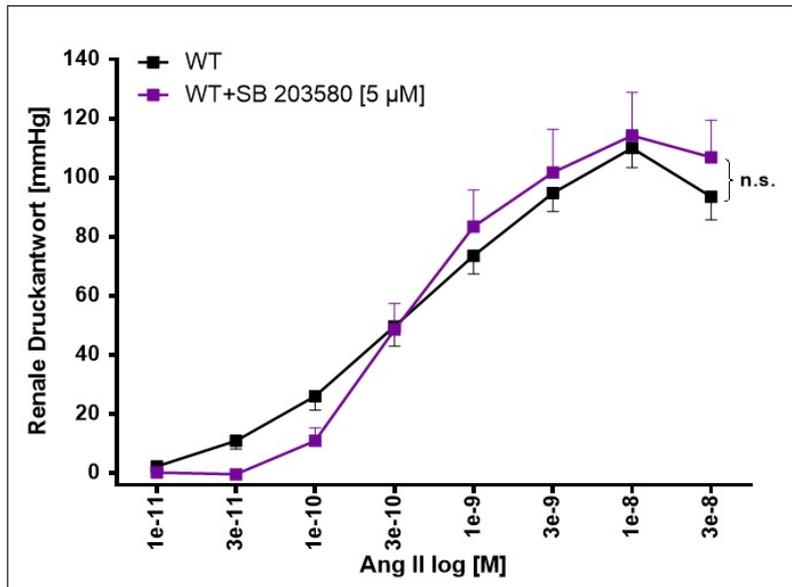


Abb. 13: Ang II-DWK bei WT-Mäusen mit Inhibition der p38: In WT-Mäusen führt eine akute p38-Inhibition zu keiner signifikanten Änderung der Ang II-induzierten renalen Druckantwort. WT (n=19); WT + SB 203580 (n=10). Ang II wurde alle 4 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert ± SEM. n.s. = kein signifikanter Unterschied (One-way ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von ungepaarten t-Test nach Student; [erfolgt in gemeinsamer Analyse mit den in Abb.14 dargestellten Daten]).

WT vs. WT + SB203580 5µM: 1x10-11 M (2,3±0,96 vs. 0,3±0,81); 3x10-11 M (11±2,75 vs. -0,3±1,11); 1x10-10 M (26,13±4,61 vs. 11±4,18); 3x10-10 M (49,7±6,49 vs. 48,6±8,4); 1x10-9 M (73,64±6,02 vs. 83,5±11,76); 3x10-9 M (101,8±13,88 vs. 111,16±5,57); 1x10-8 M (110±6,43 vs. 114,3±13,82); 3x10-8 M (93,6±7,51 vs. 106,9±11,95).

Im Gegensatz dazu reduzierte die akute Gabe von SB 203580 in ApoE (-/-)-Mäusen die Ang II-induzierte Druckantwort signifikant (s. Abb 14). Aus diesen Versuchen läßt sich schlussfolgern, dass in renalen Widerstandsgefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen, die p38-MAPK eine wichtige Rolle bei der Vasokonstriktion unter Ang II -Gabe spielt.

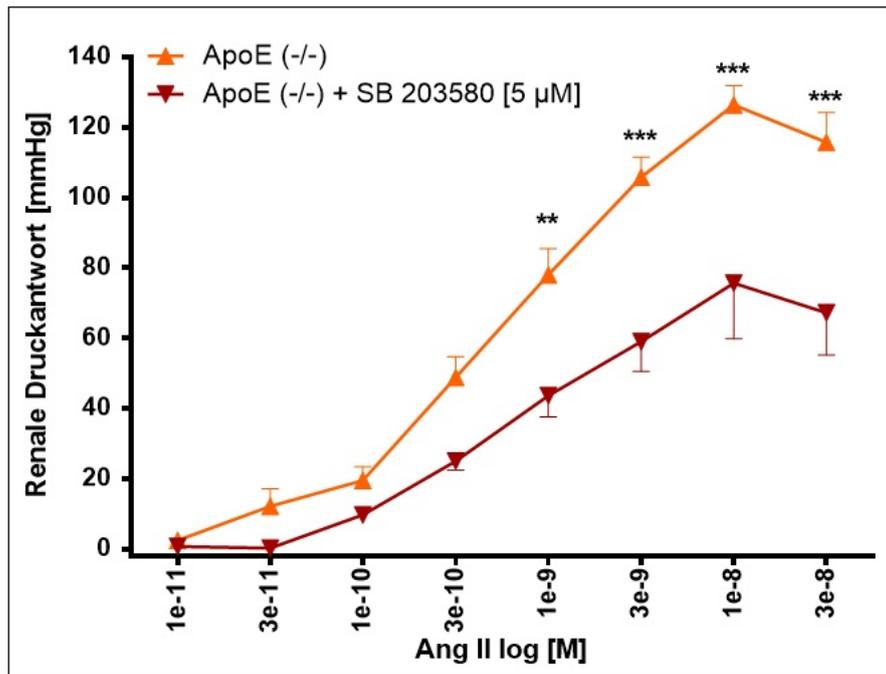


Abb. 14: Ang II-DWK bei WT-Mäusen mit Inhibition der p38: Die akute p38-Inhibition führt in ApoE (-/-)-Mäusen zu einer signifikant reduzierten Ang II-induzierten renalen Druckantwort. ApoE (-/-) (n=12); ApoE (-/-) + SB203580 (n=8). Ang II wurde alle 4 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM. ** und *** zeigen signifikante Unterschiede (One-way ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von ungepaarten t-Test nach Student, $P < 0,01$ bzw. $P < 0,001$; [erfolgt in gemeinsamer Analyse mit den in Abb.13 dargestellten Daten]).

ApoE (-/-) + SB203580 5µM vs. ApoE (-/-) (Mittelwert in mmHg \pm SEM): 1x10-11 M (0,8 \pm 0,74 vs. 2,6 \pm 0,94); 3x10-11 M (0,3 \pm 1,52 vs. 11,4 \pm 4,79); 1x10-10 M (9,8 \pm 1,64 vs. 18,2,4 \pm 3,8); 3x10-10 M (25 \pm 2,41 vs. 52,45 \pm 5,74); 1x10-9 M (43,6 \pm 5,68 vs. 83,6 \pm 7,17); 3x10-9 M (59 \pm 7,93 vs. 111,16 \pm 5,57); 1x10-8 M (75,6 \pm 14,86 vs. 132,2 \pm 5,24); 3x10-8 M (67,3 \pm 11,22 vs. 115,7 \pm 7,83).

5.7 p38-Phosphorylierung im renalen Kortex

Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob sich die in ApoE (-/-)-Mäusen gezeigten Auswirkungen auf die Vasokonstriktion (s. 5.6) in den renalen Widerstandsgefäßen zusätzlich in einem veränderten Verhältnis aus phosphoryliertem zu unphosphoryliertem p38 im renalen Kortex widerspiegeln. ROS und verschiedene Proteinkaskaden können zu einer Phosphorylierung von p38 führen, dabei entspricht eine Phosphorylierung an Threonin180 und an Thyrosin182 einem höheren

Aktivitätsgrad der Kinase. Im Einklang mit den Inhibitionsversuchen mit SB 203580 im Versuch der isolierten perfundierten Niere, zeigt sich im Westernblot (s. Abb. 15) ein signifikant erhöhter Phosphorylierungsgrad von p38 in ApoE (-/-)-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Dieser lässt sich durch die chronische Behandlung mit Ang-(1-7) signifikant senken (s. Abb. 16). Eine chronische Behandlung mit Ang-(1-7) reduziert demnach den Aktivitätsgrad der p38-MAP-Kinase.

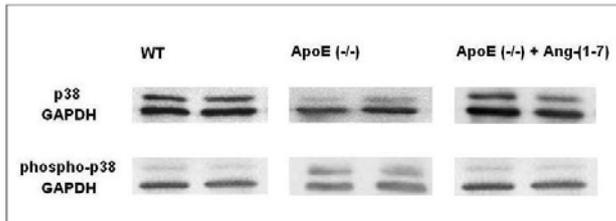


Abb. 15: Westernblot renaler Kortex. Repräsentative Westernblotbanden für p38 und phospho-p38 über GAPDH als „Housekeeper“.

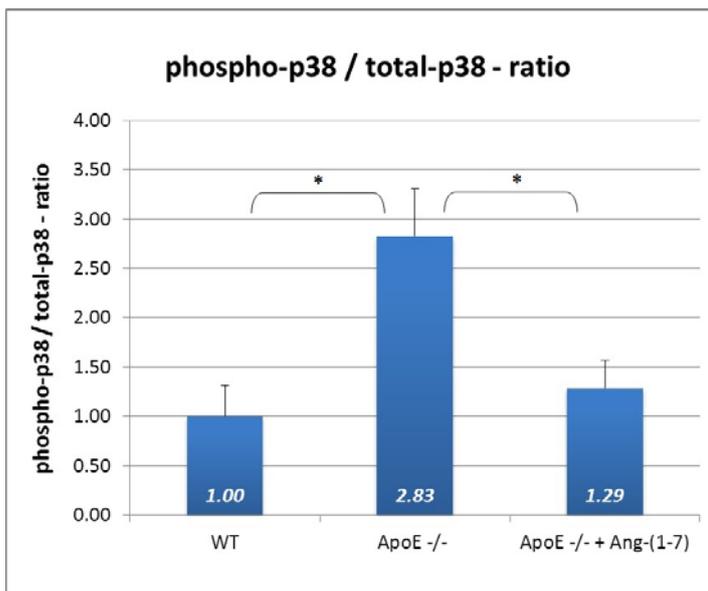


Abb. 16: Auswertung Westernblot renaler Kortex: Ein gesteigerter Phosphorylierungsgrad bei ApoE (-/-)-Mäusen lässt sich durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung signifikant senken. WT (n=4); ApoE (-/-) (n=4); ApoE (-/-) + Ang-(1-7) (n=4). Ratio aus p38 und p-p38, densitometrisch ermittelt. Angegeben als Vielfaches von WT. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SD. (ungepaarter t-Test nach Student, * zeigt einen signifikanten Unterschied $P < 0,05$).

WT n=4 vs. ApoE n=4 vs. ApoE (-/-) + Ang-(1-7) n=4 (phospho-p-38 im Verhältnis zu p38, als vielfaches von WT \pm Standardabweichung): $1 \pm 0,08$ vs. $2,83 \pm 0,48$ vs. $1,29 \pm 0,19$.

5.8 p38-phosphorylierung in präglomerulären Gefäßen

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der p38-Phosphorylierung zwischen den Mausgruppen nicht nur im Nierenkortex (s. 5.7), sondern explizit auch in den präglomerulären Gefäßen zu finden sind, wurden diese Gefäße isoliert. Anschließend wurde im Westernblot (s. Abb. 17) die phospho-p38-MAP-Kinase densitometrisch quantifiziert.

Konkordant zu den Ergebnissen im Nierenkortex, zeigt dieser Versuch, dass im Vergleich zu WT-Mäusen, in präglomerulären Gefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen phospho-p38-MAPK signifikant erhöht ist. Zudem führt die Ang-(1-7)-Behandlung in ApoE (-/-)-Mäusen zu einem signifikanten Abfall der phosphorylierten p38-MAPK in präglomerulären Gefäßen (s. Abb. 18).

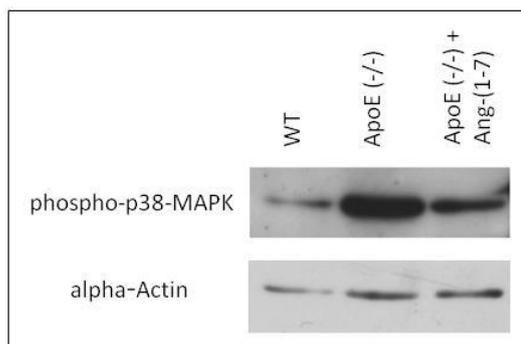


Abb. 17: Westernblot aus präglomerulären Gefäßen. Repräsentative Westernblotbanden für Phospho-p38 und Alpha-Actin als „Housekeeper“.

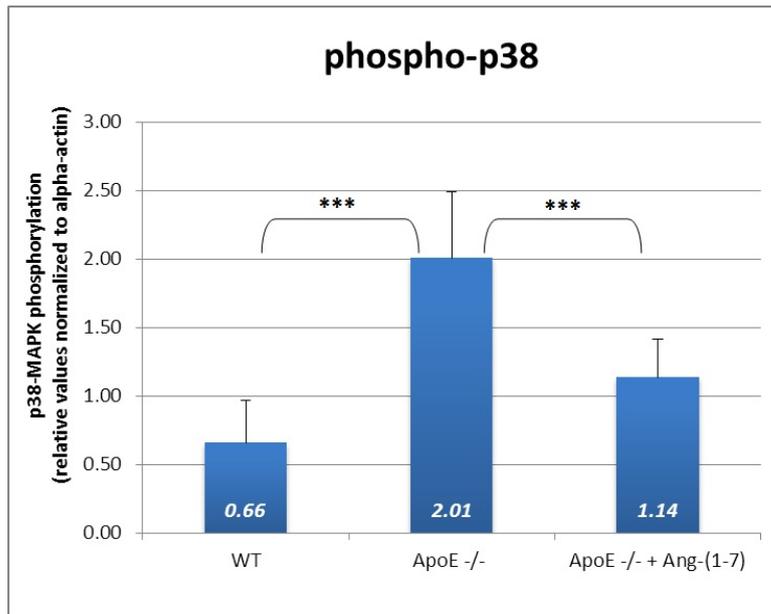


Abb. 18: Westernblot: p38-Phosphorylierung in präglomerulären Gefäßen: Ein gesteigerter Phosphorylierungsgrad bei ApoE (-/-)-Mäusen lässt sich durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung signifikant senken. WT (n=4); ApoE (-/-) (n=4); ApoE (-/-) + Ang-(1-7) (n=4). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und mit dem internen Standard (Alpha-Aktin) verglichen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SD (ungepaarter t-Test nach Student, *** zeigt einen signifikanten Unterschied $p < 0,001$).

WT n=8 vs. ApoE n=7 vs. ApoE (-/-) + Ang-(1-7) n=7 (Mittelwert im Verhältnis zu Alpha-Aktin \pm Standardabweichung): $0,66 \pm 0,31$ vs. $2,01 \pm 0,48$ vs. $1,14 \pm 0,28$.

5.9 Inhibition der ERK1/2 MAP-Kinase durch PD 98059

ERK1/2 gehört ebenfalls zu den MAPK und wird durch extrazelluläre Signale aktiviert, was letztendlich zu verschiedenen zellulären Effekten, wie zum Beispiel Mitose, Differenzierung, Proliferation oder Apoptose führt. Über eine mögliche Beteiligung der ERK1/2 MAP-Kinase an der Vasokonstriktion ist bisher nur wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass ERK1/2 durch Ang II aktiviert wird und an der Vasokonstriktion beteiligt sein könnte. Daher war es interessant zu untersuchen, ob neben p38 auch ERK1/2 für die verstärkte renale Vasokonstriktion in ApoE (-/-)-Mäusen verantwortlich ist. Bei PD 98059 handelt es sich um einen spezifischen ERK1/2-Inhibitor. Es zeigten sich weder zwischen WT und WT + PD 98059 noch zwischen ApoE (-/-) und ApoE (-/-) + PD 98059 signifikante Unterschiede (s. Abb. 19).

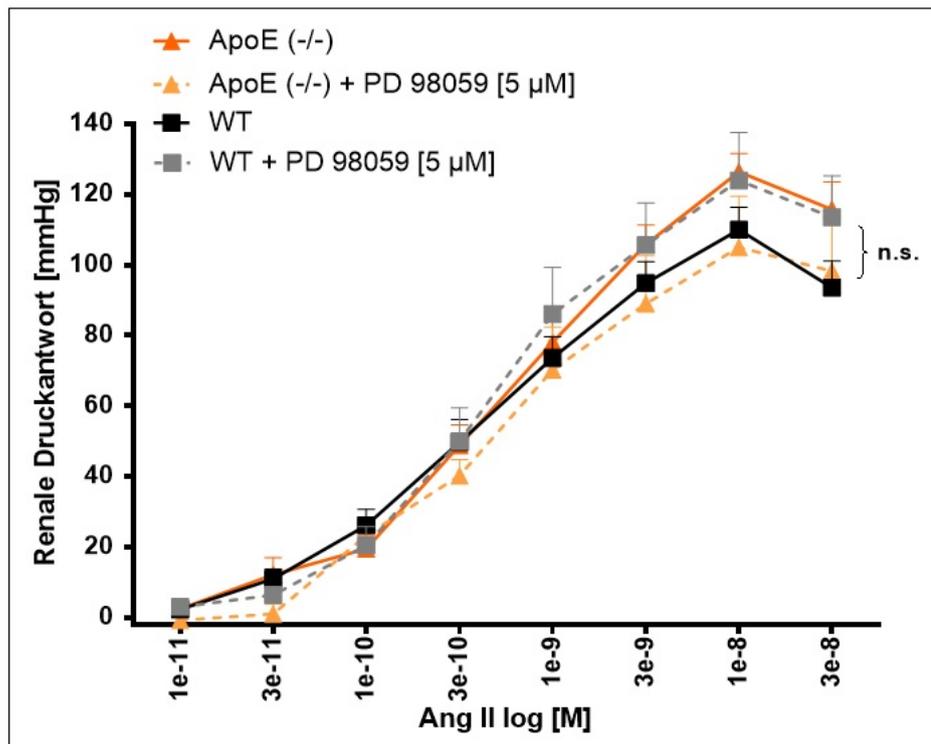


Abb. 19: Ang II-DWK mit Inhibition der ERK1/2 MAP-Kinase: Eine akute Inhibition der ERK1/2 MAP-Kinase führte zu keiner signifikanten Änderung der Ang II-induzierten renalen Druckantwort bei WT- und ApoE (-/-)-Mäusen. WT (n=19); WT + PD98059 (n=11) ApoE (-/-) (n=12); ApoE (-/-) + PD98059 (n=4). Ang II wurde alle 4 min in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzugefügt und jeweils die maximale Druckantwort gemessen. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM. n.s.= kein signifikanter Unterschied zwischen WT und WT + PD98059 bzw. ApoE (-/-) und ApoE (-/-) + PD98059 (One-way ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von ungepaarten t-Test nach Student).

WT n=19 vs. WT +PD 98059 5μM n=11 und ApoE (-/-) + PD 98059 5μM n=4 vs. ApoE (-/-) n=12 (Mittelwert in mmHg/ \pm SEM), es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (ungepaarter t-Test nach Student, $P < 0,05$): 1×10^{-11} M ($2,3 \pm 0,96$ vs. $3 \pm 1,55$ und $0,8 \pm 4,03$ vs. $2,6 \pm 0,94$); 3×10^{-11} M ($11 \pm 2,75$ vs. $6,4 \pm 2,38$ und $1 \pm 6,38$ vs. $11,4 \pm 4,79$); 1×10^{-10} M ($26,13 \pm 4,61$ vs. $20,4 \pm 5,28$ und $23,3 \pm 8,54$ vs. $18,2,4 \pm 3,8$); 3×10^{-10} M ($49,7 \pm 6,49$ vs. $50 \pm 9,45$ und $40,3 \pm 10,5$ vs. $52,45 \pm 5,74$); 1×10^{-9} M ($73,64 \pm 6,02$ vs. $86 \pm 13,32$ und $70,3 \pm 28,09$ vs. $83,6 \pm 7,17$); 3×10^{-9} M ($94 \pm 6,09$ vs. $105,6 \pm 11,94$ und $89 \pm 31,44$ vs. $111,16 \pm 5,57$); 1×10^{-8} M ($110 \pm 6,43$ vs. $123 \pm 13,7$ und $105 \pm 33,42$ vs. $132,2 \pm 5,24$); 3×10^{-8} M ($93,6 \pm 7,51$ vs. $113,5 \pm 11,74$ und $98,3 \pm 29,37$ vs. $115,7 \pm 7,83$).

5.10 Quantifizierung arteriosklerotischer Plaques in der Mauseorta

Um festzustellen ob sich eine 6-wöchige Behandlung von ApoE (-/-)-Mäusen mit Ang-(1-7) nicht nur in einer Normalisierung der renalen Druckantwort äußert, sondern sich auch auf die Entwicklung von Arteriosklerose auswirkt, wurden die Aorten der drei Mausgruppen verglichen.

In den Versuchen wurde ausschließlich der thorakale Anteil der Mauseorta verwendet, die fotografierten Aorten wurden mit einem Computerprogramm optisch ausgewertet (s. Abb. 20) und der durchschnittliche Plaquesflächenanteil, zu ApoE (-/-)-Mäusen, ins Verhältnis gesetzt.

In den Aorten von ApoE (-/-) Mäusen war eine signifikant erhöhte Plaquesfläche festzustellen, eine 6-wöchige Behandlung von ApoE (-/-) Mäusen mit Ang-(1-7) führte zu einer Reduktion der durchschnittlichen Plaquesfläche um 14,77%, die jedoch nicht die Signifikanzgrenze erreichte (s. Abb. 21).

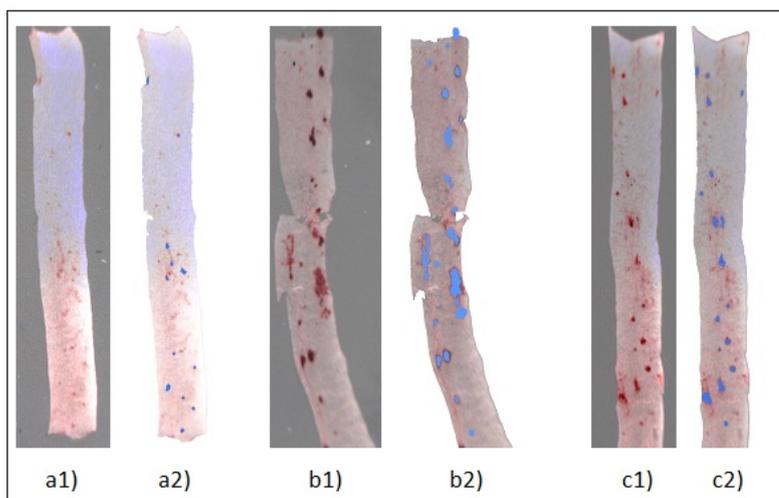


Abb. 20: Fotografien von gefärbten Mauseorten und deren optischen Auswertungen.

Repräsentative Abbildungen in 10-facher Vergrößerung; a1): Fotografie einer gefärbten WT-Mauseorta. b1): Fotografie einer gefärbten ApoE (-/-)-Mauseorta. c1): Fotografie einer gefärbten Mauseorta einer ApoE (-/-) Maus, die über 6 Wochen mit Ang-(1-7) behandelt wurde. a2); b2); c2): optische Auswertungen der entsprechenden Mauseorten. Blau markierte Flächen wurden als arteriosklerotische Plaques gewertet, die Aortenfläche als Fläche vor dem weißen Hintergrund erfasst.

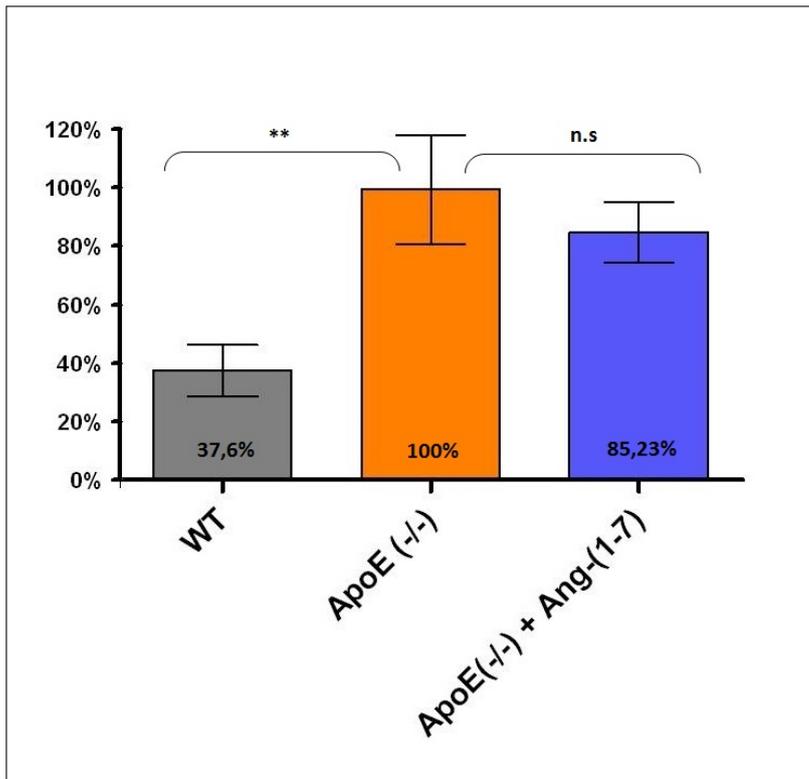


Abb. 21: Durchschnittliche arteriosklerotische Plaquesfläche anteilig an der durchschnittlichen ApoE (-/-)-Plaquesfläche. Eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung führt zu einem nicht signifikanten Rückgang von 14,77% bei ApoE (-/-)-Mäusen. WT (n=14); ApoE (-/-) (n=12); ApoE (-/-) + Ang-(1-7) (n=18). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SD. (ungepaarter t-Test nach Student, ** zeigt einen signifikanten Unterschied, $P < 0,01$; n.s.= kein signifikanter Unterschied).

WT n=14 vs. ApoE n=12 vs. ApoE (-/-) + Ang-(1-7) n=18 (durchschnittliche Aortenplaquesfläche, als Anteil von ApoE (-/-) \pm Standardabweichung): $0,376 \pm 0,011$ vs. $1 \pm 0,025$ vs. $0,852 \pm 0,015$.

6 Diskussion

Die gesteigerte vaskuläre Reaktivität bei endothelialer Dysfunktion im ApoE (-/-)-Mausmodell lässt sich durch eine langfristige Ang-(1-7)-Gabe normalisieren. Diese Beobachtung spiegelt sich auf zellulärer Ebene in einer erhöhten Phosphorylierung der MLC(20) wider. Die Ang-(1-7)-Behandlung von ApoE (-/-)-Mäusen erniedrigt die Produktion von ROS. Die p38 MAPK spielt bei der gesteigerten vaskulären Reaktivität im ApoE (-/-)-Mausmodell eine wichtige Rolle, die Behandlung mit Ang-(1-7) kann die Expression und den Aktivitätsgrad der p38 MAPK senken. Eine 6-wöchige Behandlung von ApoE (-/-) Mäusen mit Ang-(1-7) führt zu einer nicht-signifikanten Reduktion der durchschnittlichen Plaquesfläche um 14,8% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der Normalisierung der renalen Druckantwort im ApoE (-/-) Mausmodell unter Ang-(1-7)-Behandlung liegen somit zwei wesentliche Ursachen zu Grunde: Zum einen eine Reduktion der ROS-Produktion durch eine verminderte p47-Phox-Expression und zum anderen eine erniedrigte p38 MAPK-Expression und erniedrigten –Aktivitätsgrad (s. Abb. 22).

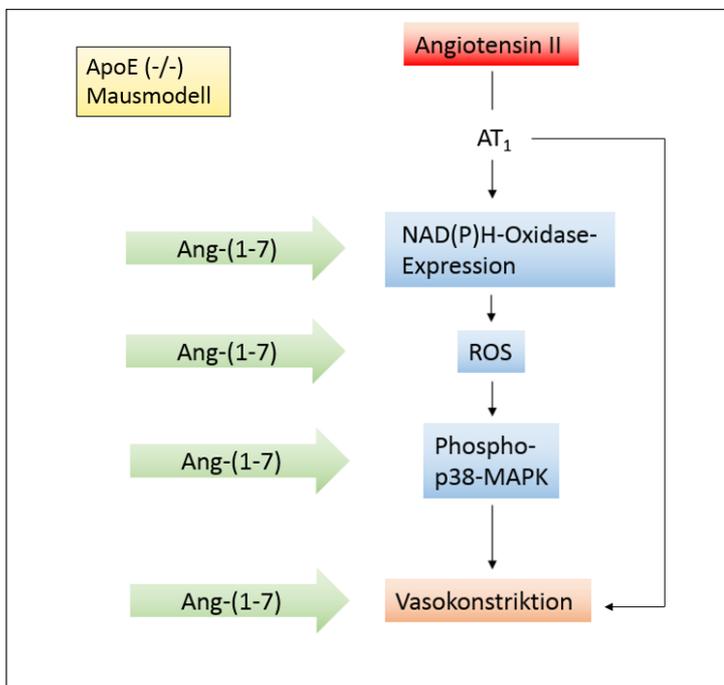


Abb. 22: Das Schaubild zeigt die Normalisierung der Ang II-induzierten renalen Druckantwort durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung in ApoE (-/-)-Mäusen, sowie deren zugrunde liegenden zellulären Mechanismus. Grüne Pfeile stellen eine Abschwächung durch Ang-(1-7) dar.

6.1 Vergleich der Blutdrücke

Es wird davon ausgegangen, dass ApoE (-/-)-Mäuse, durch das Vorliegen von arteriosklerotischen Veränderungen und endothelialer Dysfunktion, anfällig für die Entwicklung von Ang II-induziertem Bluthochdruck sind.¹

Trotz gesteigerter vaskulärer Reaktivität konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Blutdruckunterschied zwischen WT- und ApoE (-/-)-Mäusen festgestellt werden (s. Abb. 5). Dieses steht im Widerspruch mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, bei denen in 7,5 Monate alten ApoE (-/-)-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen ein um 15% erhöhter mittlerer arterieller Druck zu finden war.¹⁰⁶ Die Ursache für diese Diskrepanz ist nicht vollständig geklärt. Es könnte jedoch zum einen mit der der Tail-Cuff-Methode erklärbar sein, welche Nachteile in der Erkennung geringer Blutdruckunterschiede hat. Zum anderen könnte sie auch mit dem Alter oder genetischen Hintergrund der Tiere zusammenhängen.^{40 61}

Die Blutdrucksenkende Wirkung von Ang-(1-7) ist bei normotensiven Tieren limitiert.¹⁰⁷ Entsprechend konnte auch in unserer Arbeit bei ApoE (-/-)-Mäusen keine zusätzliche Blutdrucksenkung durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung erreicht werden. Bei hypertensiven SHR hingegen konnte gezeigt werden, dass eine 14-tägige Infusion von Ang-(1-7) in die Jugularvene, den Blutdruck kurzfristig normalisieren kann.¹⁰⁸ Entsprechend konnte in mehreren Tiermodellen für Bluthochdruck, zum Beispiel in SHR stroke-prone- und SABRA-Ratten, gezeigt werden, dass die ACE 2-messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) und -Proteinexpression im Vergleich zu Kontrollgruppen erniedrigt war.¹⁰⁹ In transgenen SHR stroke-prone-Ratten, die menschliches ACE 2 in VSMC exprimierten, konnten normalisierte Blutdruckwerte und eine verminderte vasokonstriktorische Antwort auf Ang II beobachtet werden. In diesen Tieren waren, entsprechend der transgenen ACE 2-Expression, die Serumspiegel für Ang-(1-7) erhöht.¹¹⁰

Das ApoE (-/-)-Mausmodell zeichnet sich als hervorragendes Tiermodell zur Erforschung von Arteriosklerose und endothelialer Dysfunktion aus, ein signifikant veränderter Blutdruck ist in dieser Arbeit in 18 Wochen alten ApoE (-/-) Mäusen nicht festzustellen. Dieses Ergebnis stellt eine wichtige Voraussetzung für die weiteren Versuche dieser Arbeit dar, da somit die Effekte von Ang-(1-7) auf die vaskuläre Reaktivität Blutdruck-unabhängig sind.

6.2 Angiotensin-(1-7) normalisiert die renale Druckantwort

Die isolierte perfundierte Niere ist ein ideales Modell zur Untersuchung der vaskulären Reaktivität von Widerstandsgefäßen. Es konnte in unseren Versuchen gezeigt werden, dass die vaskuläre renale Druckantwort in ApoE (-/-)-Mäusen unter Ang II-Gabe, im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht ist (s. Abb. 6). Durch die chronische Ang-(1-7)-Behandlung normalisierte sich die renale vaskuläre Reaktivität von ApoE (-/-)-Mäusen. Interessanter Weise zeigte sich selbst im Vergleich zu WT-Mäusen eine niedrigere Druckantwort auf Ang II (s. Abb. 7). Auch in afferenten Arteriolen von New Zealand white rabbits konnte Ang-(1-7), bei Vorkontraktion mit Noradrenalin, zu einer Vasorelaxation führen.¹¹¹ In unserer Arbeit erfolgte die Ang-(1-7)-Behandlung der ApoE (-/-) Mäuse über einen Zeitraum von 6 Wochen, eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bereits eine 60-minütige akute Ang-(1-7)-Infusion eine Vasodilatation verstärken kann.¹¹² Welcher Mechanismus am meisten zur Abschwächung der Vasokonstriktion beiträgt ist von der Spezies abhängig und variiert mit der Lokalisation des Gefäßbettes.¹¹³

In dieser Arbeit konnte die Beteiligung anderer Rezeptoren an den beobachteten Effekten nicht ausgeschlossen werden. In einer aktuellen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch festgestellt werden, dass sich die Normalisierung der vaskulären Reaktivität unter Ang-(1-7)-Behandlung bei einer Mas-defizienz in ApoE (-/-)-Mäusen nicht zeigte, was eine klare Zuordnung der Wirkung von Ang-(1-7) am Mas-Rezeptor erlaubt.¹¹⁴ In weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe an isolierten perfundierten Nieren konnte bereits gezeigt werden, dass eine spezifische Mas-Rezeptor-Inhibition mit D-Ala-Ang-(1-7) die Ang-(1-7)-induzierte Verbesserung der endothelialen Dysfunktion aufhebt.³⁴ Die alleinige Behandlung mit dem Mas-Rezeptor-Antagonisten führte zu keiner Beeinflussung der Vasorelaxation. Zudem konnte in ApoE (-/-)-Mäusen gezeigt werden, dass weder die RNA-Expression des Mas-Rezeptors, noch die des AT₁-Rezeptors, durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung beeinflusst werden.³⁴ Es sprechen zudem die Ergebnisse anderer Arbeiten für die Beteiligung des Mas-Rezeptors: In Mausearten war eine Ang-(1-7)-induzierte Vasorelaxation in Mas-defizienten Mäusen nicht auslösbar.²⁷ Eine ähnliche Arbeit zeigt, dass in Mas-defizienten, sowie mit dem Ang-(1-7)-Antagonisten A-779 behandelten Mäusen, die

Angiotensin-(1-7)-induzierte Vasorelaxation in isolierten Mesenterialarterien abgeschwächt war.¹¹⁵

6.3 MLC(20)-Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von MLC(20) nimmt eine Schlüsselrolle in der Kontraktion von glatten Muskelzellen ein. Die Ca^{++} /Calmodulin-abhängige Myosin-Leichte-Kette-Kinase und die Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase werden als Regulatoren der MLC(20)-Phosphorylierung betrachtet.

Eine höhere basale MLC(20)-Phosphorylierung steigert die Kontraktion bei einer gegebenen Ca^{++} -Konzentration. Da der p38 MAPK/MK2-Signalweg zu einer MLC(20)-Phosphorylierung führt und ROS die p38-MAPK aktiviert, lässt sich annehmen, dass die ROS-induzierte p38-MAPK-Aktivierung die Gefäßkontraktilität über die MLC(20)-Phosphorylierung regulieren kann.

Während die Ca^{++} - und Calmodulin-vermittelte Phosphorylierung der MLC(20) oft als essenzielle Voraussetzung für die Initiierung einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beschrieben wird¹¹⁶, scheinen für die Aufrechterhaltung der Muskelkraft alternative Signalwege verantwortlich zu sein.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Man vermutet zudem eine Beteiligung alternativer Wege an der Entwicklung einer Maximalkraft in glatter Muskulatur.⁸⁸

Zwar wird in einigen Arbeiten beschrieben, dass eine aktivierte p38-MAPK MLC(20) phosphorylieren kann, jedoch wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass eine p38-MAPK-Inhibition weder in normotensiven noch in hypertensiven Ratten eine durch Endothelin-1 ausgelöste Phosphorylierung von MLC(20) beeinflussen konnte.^{82 83 88 120}

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass in präglomerulären Gefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen, im Vergleich zu WT-Mäusen, signifikant erhöhte Mengen an phosphorylierter MLC(20) vorliegen. Diese können durch eine Behandlung mit Ang-(1-7) signifikant gesenkt werden (s. Abb. 9). Dieses Ergebnis spiegelt sehr gut den Vergleich der Druckkurven (s. Abb. 7) auf zellulärer Ebene wider: Wir konnten zeigen, dass die gesteigerte vaskuläre Reaktivität in ApoE (-/-)-Mäusen mit einer gesteigerten Menge an phosphorylierten MLC(20) korreliert. Ebenso korreliert die Normalisierung

der vaskulären Reaktivität unter einer chronischen Ang-(1-7)-Behandlung in ApoE (-/-)-Mäusen mit dem Rückgang an phosphoryliertem MLC(20) in präglomerulären Gefäßen.

6.4 Gesteigerte ROS-Menge und gesteigerte NAD(P)H-Oxidase-Expression

Da ROS die Proliferation und Migration von VSMC beeinflussen, spielen sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheitsmodelle. Arteriosklerose und Bluthochdruck sind durch eine gesteigerte ROS-Produktion in den Gefäßen gekennzeichnet. Um der Frage nachzugehen, ob die chronische Behandlung mit Ang-(1-7) die ROS-Menge beeinflusst und darüber hinaus die vaskuläre Reaktivität steigert, wurde im Enzymimmunoassay die Isoprostane-8-Exkretion im Mäuseurin gemessen. In unserem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Ang-(1-7) die Produktion von ROS in ApoE (-/-)-Mäusen senkt: Die Isoprostane-8-Exkretion ist in Ang-(1-7)-behandelten ApoE (-/-)-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten ApoE (-/-)-Mäusen signifikant erniedrigt (s Abb. 10).

Isoprostane finden sich physiologisch Bedingungen im Mäuseurin und sind bei oxidativen Stress erhöht. Die 8-Isoprostane-Messung stellt daher eine Möglichkeit dar, oxidativen Stress indirekt zu messen. In ApoE (-/-)-Mäusen ist der Abbau von LDL-Partikeln reduziert, was dazu führt dass diese vermehrt oxidiert werden. Die gesteigerte Anwesenheit oxidierter Partikel in den Gefäßen führt zu einer gesteigerten Entwicklung von oxidativem Stress und Arteriosklerose. Dieses führt zu einer gesteigerten ROS-Menge und verringerten ROS-Abbaumechanismen in ApoE (-/-)-Mäusen.² In einer anderen Studie konnten erhöhte ROS-Mengen in Gefäßbetten von ApoE (-/-) Mäusen nachgewiesen werden.¹²¹ Entsprechend konnte Tempol, ein Radikalfänger der ROS abbaut, die endothelabhängige Vasorelaxation dieser Tiere verbessern.^{34 122} Analog zu unseren Ergebnissen, konnte eine andere Studie zeigen, dass der MAS-Rezeptor-Agonist AVE0991 in VSMC der Ratte die ROS-Produktion signifikant senken konnte.³⁹ In Mas-defizienten Mäusen konnten Isoprostane ebenfalls signifikant erhöht im 24-Stunden-Urin gemessen werden.⁶¹ Zusätzlich konnte in VSMC von Mas-Rezeptor-defizienten Mäusen eine erhöhte ROS-Produktion nachgewiesen werden.^{40 115} Zudem waren Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), welche weit verbreitet

als sensitive und stabile Biomarker für Lipid-Peroxidation eingesetzt werden, in Mas-defizienten Mäusen erhöht nachgewiesen worden.⁴⁰

Bei den durch Ang-(1-7) gesenkten Isoprostane-8-Spiegeln muss man zusätzlich in Erwägung ziehen, dass Ang-(1-7) nicht nur die ROS-Produktion in den Gefäßen erniedrigt, sondern auch zu einem gesteigerten ROS-Abbau führen kann. ROS werden kontinuierlich in allen Zellen, zum Beispiel durch die Atmungskette an den Mitochondrien, produziert. Entsprechend gibt es auch zelluläre Mechanismen, die für den Abbau von ROS zuständig sind: Die SOD ist eine Gruppe von Enzymen, die Superoxid-Anionen zu H_2O_2 umwandeln können. H_2O_2 kann vom Enzym Katalase weiter zu H_2O und O_2 abgebaut werden. Es konnte in Aortenbögen von 6-Wochen alten ApoE (-/-)-Mäusen gezeigt werden, dass die Expression von SOD und Katalase im Vergleich zu WT-Mäusen gesteigert war.¹²³ Die erhöhte Expression von antioxidativen Enzymen in ApoE (-/-) Mäusen, könnte man als Reaktion der Gefäßzellen auf vermehrten Oxidativen Stress interpretieren. Interessanterweise waren in einer anderen Arbeit sowohl die SOD- als auch die Katalase-Aktivität in Mas-defizienten WT-Mäusen mit FVB/N-Hintergrund, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant erniedrigt.⁴⁰ Dieser Unterschied zeigte sich in Mäusen mit C57Bl/6-Hintergrund nicht.⁶¹ Der Frage, ob Ang-(1-7) in VSMC von ApoE (-/-) Mäusen auch die antioxidativ wirkenden Enzyme reguliert, wird in dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen, bietet aber ein interessanten Ansatz für weitere Studien.

Die klassische Renin/Ang II/AT₁-Achse ist ein stark prooxidativ wirkendes System in Gefäßbetten: Die NAD(P)H-Oxidase in VSMC wird von Ang II stimuliert.¹²⁴ In verschiedenen Studien konnte belegt werden, dass die NAD(P)H-Oxidase eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalverarbeitung spielt, indem sie oxidativen Stress generiert.¹²⁵⁻¹²⁸ Dabei nimmt die NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit p47-Phox bei der ROS-Produktion im Gefäßbett und der Entwicklung von Arteriosklerose eine Schlüsselrolle ein. Im Einklang mit diesen Beobachtungen konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass eine p47-Phox-Deletion in Mäusen zu einer abgeschwächten Vasokonstriktion in afferenten Arteriolen und einer erniedrigten ROS-Produktion im Nierenkortex führte.¹²⁹ In einer aktuellen Studie konnte in Aorten von diet-induced-obesity-Mäusen eine gesteigerte p47-Phox-Menge nachgewiesen werden, welche sich durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung reduzieren ließ.¹³⁰ Um der Frage nachzugehen, ob die gesteigerte ROS-Menge in den Nieren von

ApoE (-/-)-Mäusen auf eine gesteigerte NAD(P)H-Oxidase zurückzuführen ist wurde die Expression von p47-Phox im Westernblot untersucht: Es zeigte sich eine signifikant erhöhte p47-Phox-Expression im renalen Kortex von ApoE (-/-)-Mäusen, welche sich durch die Behandlung mit Ang-(1-7) signifikant senken ließ (s. Abb. 11 und Abb. 12). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Ang-(1-7) die Synthese der NAD(P)H-Oxidase im renalen Kortex erniedrigt. Ang-(1-7) verbessert demnach die gesteigerte vaskuläre Reaktivität durch eine Senkung der ROS-Produktion.

Dieses Ergebnis wird durch eine Studie ergänzt, die zeigen konnten, dass, Ang-(1-7) die von Ang II ausgelöste Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase abschwächen konnte.⁶⁷ Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer Arbeit, in der ACE2-defiziente Mäuse chronisch mit Ang-(1-7) behandelt wurden.¹²³ Auch im Tiermodell der diabetischen hypertensiven Ratte konnte Ang-(1-7) die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und -Expression senken.¹²² In der Mauseorta von Mas-defizienten WT-Mäusen konnte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, im Westernblot eine signifikant erhöhte Konzentration für NOX2, eine weitere katalytischen Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase, gefunden werden. Entsprechend war die mRNA für NOX2 in diesen Tieren höher als in der Kontrollgruppe⁶¹.

6.5 Die Rolle von p38 und ERK1/2 bei der gesteigerten vaskulären Reaktivität in ApoE(-/-) Mäusen

In den Perfusionsversuchen konnte festgestellt werden, dass die spezifische Inhibition der p38-MAPK die gesteigerte renale Druckantwort auf Ang II in ApoE (-/-)-Mäusen signifikant reduziert (s. Abb. 14). Kein signifikanter Unterschied ließ sich hingegen in WT-Mäuse feststellen (s. Abb. 13). Die Inhibition von ERK1/2 zeigte sowohl in ApoE (-/-)- als auch in WT-Mäusen keinen Effekt (s. Abb. 19). Diese Ergebnisse lassen daher die Schlussfolgerung zu, dass im ApoE (-/-)-Mausmodell, die p38-MAP-Kinase eine wichtige Rolle bei der gesteigerten vaskulären Reaktivität spielt.

Es konnten in anderen Arbeiten gezeigt, dass neben der Aktivierung des klassischen IP₃-Signalweges auch andere Signalkaskaden einen entscheidenden Einfluss bei der Ang II-induzierten Vasokonstriktion haben: Der Aktivierung der p38-MAPK scheint dabei eine wichtige Rolle zuzukommen.¹⁹ Dabei wird die Beteiligung der p38-MAPK an der Kontraktion von VSMC im engen Zusammenhang mit einer erhöhten ROS-Produktion und folglich p38-Aktivierung beschrieben. Ang II ist, über die Interaktion

mit dem AT₁-Rezeptor, in der Lage, die NAD(P)H-Oxidase zu aktivieren und zur Produktion von ROS anzuregen. ROS können die Phosphorylierung von p38, ERK1/2 und JNK begünstigen, wobei die ROS-Sensitivität bei p38 und JNK größer ist als bei ERK1/2.¹³¹ Entsprechend führte in einer Arbeit die Gabe von Tempol, einem SOD-Mimetikum, zu einer reduzierten Aktivierung der vaskulären MAPK durch Ang II.¹³²

p38-MAP-Kinase

In der isolierten perfundierten Niere konnte im Inhibitionsversuch mit SB203580 gezeigt werden, dass p38 eine wesentliche Rolle bei der gesteigerten vaskulären Reaktivität im ApoE (-/-)-Mausmodell spielt (s. Abb. 14). Ebenso konnte im Westernblot ein signifikant erhöhter p38-Phosphorylierungsgrad im Nierenkortex und eine erhöhte Phospho-p38-MAPK-Menge in präglomerulären Gefäßen festgestellt werden (s. Abb. 16 und 18). Die beiden genannten Veränderungen, lassen sich durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung auf WT-Niveau normalisieren.

Ähnlich zu unseren Versuchen konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass die p38-MAPK, welche bei Hypercholesterinämie verstärkt aktiviert ist, eine wichtige Rolle in der Regulierung des Gefäßtonus und der ROS-Produktion einnimmt.¹³³ Zudem konnte in isolierten VSMC aus der Rattenaorta eine Ang II-induzierte p38-MAPK-Phosphorylierung durch AVE0991, ein Ang-(1-7)-Agonist, abgeschwächt werden.³⁹ In proximalen Tubuluszellen der Ratte konnte Ang-(1-7) eine Ang II-induzierte p38-Aktivierung signifikant senken.¹³⁴ Wir folgern aus unseren Versuchen, dass die p38-Aktivierung mit der verstärkten vaskulären Reaktivität im ApoE (-/-)-Mausmodell einhergeht und durch Ang-(1-7) beeinflusst wird.

Zusammenhang zwischen p38 und ROS

Die p38-MAPK wird durch Oxidativen Stress aktiviert. Umgekehrt erhöht die aktivierte p38-MAPK die Expression der NAD(P)H-Oxidase, die dadurch vermehrt ROS produziert. Die p38-MAPK nimmt daher die Rolle eines Verstärkers ein.¹³⁵ Wir konnten in dieser Arbeit sowohl zeigen, dass durch die Ang-(1-7)-Behandlung in ApoE (-/-) Mäusen die Expression der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit p47-Phox reduziert wird, als auch das die Isoprostane-8-Exkretion im Mäuseurin, ein indirekter Marker für oxidativen Stress, gesenkt wird. Dass der, durch die Ang-(1-7)-Behandlung, gesenkte oxidative Stress zu der gezeigten verminderten p38-Aktivierung in

präglomerulären Gefäßen führt, ist anzunehmen, da sich die Normalisierung unter Ang-(1-7)-Behandlung in Richtung des WT-Zustands, in den verschiedenen Versuchen dieser Arbeit wiederholt (s. Abb. 12, 16 und 18).

Zusammenhang zwischen p38, Vasokonstriktion und Hypertonie

Ein Zusammenhang zwischen p38 und der Regulation des Gefäßtonus wurde bereits in anderen Arbeiten *in vitro* und *in vivo* beschrieben.^{135 136} Zudem konnte gezeigt werden, dass Ang II seine langfristigen vasokonstriktorisches Effekte über den p38-MAPK-Signalweg vermittelt.¹³⁷ In einer aktuellen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nicht nur die akute p38-Inhibition mit SB 203580, sondern ebenfalls die chronische p38-MAPK-Inhibition mit BIRB796 zu einer Normalisierung der gesteigerten Vasoreaktivität in ApoE (-/-) Mäusen führt.¹¹⁴ In einer aktuellen Studie an diabetischen Ratten konnte gezeigt werden, dass die p38-MAPK in der Gefäßwand verstärkt aktiviert ist und eine p38-MAPK-Inhibition zu einer Senkung des mittleren arteriellen Drucks und des renalen Blutfluss führt.¹³⁸ Ebenfalls konnte eine p38-MAPK-Inhibition die Abschwächung der späten Kontraktionsphase bei der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion in Ratten bewirken und eine p38-MAPK-Stimulation die Vasodilatation der Pulmonalarterien abschwächen.¹³⁶ In anderen Versuchen konnte in Aorten von Ratten eine Endothelin-induzierte Vasokonstriktion durch eine p38-MAPK-Inhibition abgeschwächt werden.⁸² Die Inkubation von vorkontrahierten renalen Arterien diabetischer Ratten mit einem p38-MAPK-Inhibitor führte zu einer signifikanten Vasorelaxation.¹³⁸ Ähnlich wie in unserem Versuch führte eine SB 203580-Behandlung in Rattenaorten zu einer signifikant geringeren Vasokonstriktion unter Ang II-Gabe, wobei der zugrundeliegende Mechanismus die Aktivierung von HSP27 beinhaltet.⁸³ Auch andere Arbeiten konnten den Zusammenhang zwischen p38-MAPK, HSP27 und Vasokonstriktion herstellen.^{86 88 139}¹⁴⁰ Aktiviertes HSP27 erhöht die Stabilität von polymeren Aktin-Mikrofilamenten, welche die Kontraktion von glatter Muskulatur regulieren.^{87 139} Ob die, durch die p38-MAPK-Inhibition ausgelöste, gesenkte Druckantwort ebenfalls über eine verminderte Aktivierung von HSP27 vermittelt wird, wird in dieser Arbeit nicht weiter geklärt. In Gefäßen von hypertensiven Tieren konnte in anderen Arbeiten molekularbiologisch eine verstärkte Aktivierung der p38-MAPK nachgewiesen werden. Entsprechend führte umgekehrt eine p38-MAPK-Aktivierung zur endothelialen Dysfunktion in Tiermodellen

für Bluthochdruck.^{141 142} In der Aorta von spontaneously SHR stroke-prone-Ratten konnte phospho-p38-MAPK mittels Immunohistochemie detektiert werden, während es in Aorten von normotensiven Ratten nicht zu auffindbar war.¹⁴¹ Wir konnten in dieser Arbeit bei ApoE (-/-)-Mäusen phospho-p38-MAPK in präglomerulären Gefäßen nachweisen.

Die Zusammenschau dieser Studien entspricht den Beobachtung in unserer Arbeit, bei denen eine chronische Gabe von Ang-(1-7) die gesteigerte vaskuläre Reaktivität, durch eine Verminderung der p38-MAPK-Aktivität, in den renalen Widerstandsgefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen normalisieren kann.

ERK 1/2

ERK1/2 ist eines der drei wichtigen Mitglieder der MAPK-Familie und stellt einen wichtigen Schritt in der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, Mitogenen, Neurotransmittern und Hormonen dar. Über die Beteiligung an der Regulation des Gefäßtonus ist bislang wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb neben dem Einfluss der p38-MAPK auch die Rolle von ERK1/2 bei der gesteigerten vaskulären Reaktivität in ApoE (-/-)-Mäusen untersucht werden. Ein Einfluss von ERK1/2 auf die gesteigerte vaskuläre Reaktivität im ApoE (-/-)-Mausmodell konnte, im Versuch der isolierten perfundierten Niere, durch eine Inhibition durch PD 98059 ausgeschlossen werden (s. Abb. 19).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte in zwei unabhängigen Arbeiten in hypertensiven Ratten gezeigt werden, dass Ang II über eine NAD(P)H-Aktivierung den ERK1/2-Signalweg aktiviert und dadurch an der Vasokonstriktion beteiligt ist.^{143 144} In bovinen Koronararterien und Pulmonalararterien konnte durch einen Dehnungsreiz oder Peroxidapplikation, eine Vasokonstriktion ausgelöst werden, die über die Aktivierung der ERK1/2 vermittelt war.^{145 146} Zudem zeigte ein Versuch *in vitro*, dass PD 98059 eine Ang II-induzierte Vasokonstiktion in humanen Widerstandsgefäßen blockiert.¹⁴⁷ Der Grund für die Diskrepanz zwischen unseren Erbnissen und den Beobachtungen anderer Studien lässt sich in dieser Arbeit nicht klären.

6.6 Einfluss von Ang-(1-7) auf die Entwicklung von Arteriosklerose

Endotheliale Dysfunktion ist mit den frühen Stadien der Arteriosklerose assoziiert und gilt als ein wichtiger Faktor beim Fortschreiten von Arteriosklerose. In unseren Versuchen wurde gezeigt, dass eine Ang-(1-7)-Behandlung die vaskuläre Funktion in ApoE (-/-) Mäusen verbessert. Daher war es interessant zu untersuchen, ob eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung das Fortschreiten arteriosklerotischer Veränderungen verlangsamen kann.

Eine sechswöchige Behandlung von ApoE (-/-) Mäusen mit Ang-(1-7) führt in unserem Versuch zu einem Rückgang der durchschnittlichen Plaquesfläche um 14,77% (s. Abb. 20 und Abb. 21), welcher jedoch nicht signifikant war.

In einer aktuellen Studie konnte in ApoE (-/-)-Mäusen ebenfalls gezeigt werden, dass eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung dosisabhängig die Bildung von arteriosklerotischen Läsionen abschwächen, sowie die VSMC-Proliferation und -Migration über einen p38-MAPK-abhängigen Mechanismus hemmen konnte.¹⁴⁸ In einer anderen Studie, konnte in ApoE (-/-) Mäusen, die kürzer und mit einer geringeren Ang-(1-7)-Dosis als in unserem Versuch behandelt wurden, eine signifikante Abschwächung der arteriosklerotischen Veränderung beobachtet werden.³³ In einer weiteren Studie wurde zudem gezeigt, dass eine ACE2-Überexpression, welche zu einer gesteigerten Ang-(1-7)-Produktion führt, die Entwicklung von Arteriosklerose in ApoE (-/-)-Mäusen senken kann.¹⁴⁹ Bei Ratten, welchen Stents implantiert wurden, konnte Ang-(1-7) die Neointimabildung abschwächen.¹⁵⁰

Welche Rollen die Ang-(1-7)-Behandlungsdauer und -Behandlungsdosis, im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, spielen, bleibt unklar. Ebenfalls liegen methodische Unterschiede vor: In dieser Arbeit wurde ausschließlich die thorakale Aorta untersucht, zudem unterscheiden sich Alter der Tiere und die Fallzahlen in den Studien.

In dieser Arbeit konnte in ApoE (-/-)-Mäusen durch die Ang-(1-7)-Behandlung eine Reduktion der durchschnittlichen Plaques-Fläche um 14,77% gezeigt werden.

7 Schlussfolgerung

Das ApoE (-/-)-Mausmodell ist ein ausgezeichnetes Tiermodell für die Forschung an Hypercholesterinämie, endothelialer Dysfunktion und Arteriosklerose. Zunächst wurde überprüft, ob sich die systolischen Blutdrücke zwischen WT-Mäusen, ApoE-(-/-)-Mäusen und Ang-(1-7)-behandelten ApoE(-/-)-Mäusen unterscheiden. Unser Ergebnis zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Mausgruppen besteht, was eine wichtige Voraussetzung für die weiteren Versuche ist. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass sich durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung von ApoE (-/-)-Mäusen die gesteigerte vaskuläre Reaktivität bei Ang II-Gabe normalisieren kann. Dieses Ergebnis spiegelt sich auf zellulärer Ebene in Form einer erhöhten Phosphorylierung von MLC(20), und deren Normalisierung durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung wider. Anschließend wurde untersucht, über welche zellulären Mechanismen Ang-(1-7) die Normalisierung der vaskulären Reaktivität in ApoE (-/-)-Mäusen vermittelt.

Wir konnten in dieser Arbeit feststellen, dass die chronische Ang-(1-7)-Behandlung die Isoprostane-8-Urinexkretion, ein Marker für ROS, in ApoE (-/-)-Mäusen erniedrigt und die p47-Phox-Expression im renalen Kortex senkt. Es stellte sich die Frage, ob gesteigerte ROS-Mengen in der Niere, über die Aktivierung von MAP-Kinasen, zu der gesteigerten vaskulären Reaktivität in ApoE (-/-)-Mäusen beitragen.

Entsprechend wurde untersucht, welchen Einfluss die, von ROS aktivierbare, p38-MAPK auf die gesteigerte vaskuläre Reaktivität im ApoE (-/-)-Mausmodell hat: Wir konnten in dieser Arbeit im Nierenkortex und präglomerulären Gefäßen von ApoE (-/-)-Mäusen zeigen, dass die p38-MAPK verstärkt aktiviert ist und sich dies durch chronische Ang-(1-7)-Behandlung zum WT-Zustand zurückführen lässt. Es zeigte sich zudem, dass eine p38-Inhibition zu einer Normalisierung der gesteigerten vaskulären Reaktivität bei ApoE (-/-)-Mäusen führt. Dieses lässt den Schluss zu, dass die aktivierte p38-MAPK die gesteigerte vaskuläre Reaktivität in den renalen Widerstandsgefäßen aufrecht erhält und dass Ang-(1-7) seinen positiven Einfluss über die Erniedrigung der p38-Aktivität vermittelt. Schließlich wurde der Einfluss der chronischen Ang-(1-7) Behandlung auf die Arteriosklerose-Entwicklung in der thorakalen Aorta von ApoE (-/-)-Mäusen untersucht. Hierbei ließ sich in Aorten von ApoE (-/-)-Mäusen durch eine chronische Ang-(1-7)-Behandlung eine Reduktion der

durchschnittlichen Plaques-Fläche um 14,77% feststellen, die aber in unserem Versuch nicht signifikant war.

Ang-(1-7) ist ein neuer und bisher wenig erforschter Metabolit im RAS, der einen vasoprotektiven Effekt bei endothelialer Dysfunktion besitzt. Möglicherweise kann es einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen ausüben, so dass Ang-(1-7) ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt im RAS werden könnte.

8 Quellenverzeichnis

1. Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* 2001;103(3):448-54.
2. Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Bohm M, Nickenig G. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* 2004;110(19):3062-7.
3. Rateri DL, Moorleghen JJ, Balakrishnan A, Owens AP, 3rd, Howatt DA, Subramanian V, et al. Endothelial cell-specific deficiency of Ang II type 1a receptors attenuates Ang II-induced ascending aortic aneurysms in LDL receptor^{-/-} mice. *Circ Res* 2011;108(5):574-81.
4. Daugherty A, Rateri DL, Lu H, Inagami T, Cassis LA. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor. *Circulation* 2004;110(25):3849-57.
5. Timmermans PB, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD. Angiotensin II receptor subtypes. *Am J Hypertens* 1992;5(6 Pt 1):406-10.
6. van Rodijnen WF, van Lambalgen TA, van Wijhe MH, Tangelder GJ, Ter Wee PM. Renal microvascular actions of angiotensin II fragments. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283(1):F86-92.
7. Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens* 2009;3(2):84-95.
8. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292(1):C82-97.
9. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988;62(4):749-56.
10. Speth RC, Thompson SM, Johns SJ. Angiotensin II receptors. Structural and functional considerations. *Adv Exp Med Biol* 1995;377:169-92.
11. Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, et al. Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* 1996;14(5):S95-103.
12. Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med* 1996;334(25):1649-54.
13. Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 1997;100(2):264-9.
14. Siragy HM, Xue C, Abadir P, Carey RM. Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation. *Hypertension* 2005;45(1):133-7.
15. Padia SH, Howell NL, Siragy HM, Carey RM. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat. *Hypertension* 2006;47(3):537-44.

16. Padia SH, Kemp BA, Howell NL, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Carey RM. Conversion of renal angiotensin II to angiotensin III is critical for AT2 receptor-mediated natriuresis in rats. *Hypertension* 2008;51(2):460-5.
17. Stegbauer J, Vonend O, Oberhauser V, Rump LC. Effects of angiotensin-(1-7) and other bioactive components of the renin-angiotensin system on vascular resistance and noradrenaline release in rat kidney. *J Hypertens* 2003;21(7):1391-9.
18. Patzak A, Steege A, Lai EY, Brinkmann JO, Kupsch E, Spielmann N, et al. Angiotensin II response in afferent arterioles of mice lacking either the endothelial or neuronal isoform of nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294(2):R429-37.
19. Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(9):1716-22.
20. Chansel D, Ardaillou R. [Active metabolites derived from angiotensin II]. *Nephrologie* 1998;19(7):427-32.
21. Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) and antihypertensive mechanisms. *J Nephrol* 1998;11(6):278-83.
22. Iusuf D, Henning RH, van Gilst WH, Roks AJ. Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol* 2008;585(2-3):303-12.
23. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000;275(43):33238-43.
24. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;87(5):E1-9.
25. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 2008;93(5):519-27.
26. Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, et al. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 2004;44(4):490-6.
27. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(14):8258-63.
28. Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett* 1995;357(1):27-32.
29. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986;45(5):711-9.
30. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005;111(14):1806-13.

31. Santos RA, Simoes e Silva AC, Magaldi AJ, Khosla MC, Cesar KR, Passaglio KT, et al. Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension* 1996;27(4):875-84.
32. Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1996;28(1):104-8.
33. Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(8):1606-13.
34. Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I, Mergia E, Clasen T, Friedrich S, et al. Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoproteinE-deficient mice. *Br J Pharmacol* 2011;163(5):974-83.
35. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(2):H736-42.
36. Loot AE, Roks AJ, Henning RH, Tio RA, Suurmeijer AJ, Boomsma F, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation* 2002;105(13):1548-50.
37. Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, et al. Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res* 2008;103(11):1319-26.
38. Igase M, Strawn WB, Gallagher PE, Geary RL, Ferrario CM. Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(3):H1013-9.
39. Sheng-Long C, Yan-Xin W, Yi-Yi H, Ming F, Jian-Gui H, Yi-Li C, et al. AVE0991, a Nonpeptide Compound, Attenuates Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via Induction of Heme Oxygenase-1 and Downregulation of p-38 MAPK Phosphorylation. *Int J Hypertens* 2012;2012:958298.
40. Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension* 2008;51(2):574-80.
41. Rabelo LA, Alenina N, Bader M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertens Res* 2011;34(2):154-60.
42. Tallant EA, Clark MA. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2003;42(4):574-9.
43. Ferreira AJ, Santos RA, Bradford CN, Mecca AP, Sumners C, Katovich MJ, et al. Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension* 2010;55(2):207-13.
44. Thomas MC, Pickering RJ, Tsorotes D, Koitka A, Sheehy K, Bernardi S, et al. Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. *Circ Res* 2010;107(7):888-97.
45. Toton-Zuranska J, Gajda M, Pyka-Fosciak G, Kus K, Pawlowska M, Niepsuj A, et al. AVE 0991-angiotensin-(1-7) receptor agonist, inhibits

- atherogenesis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2010;61(2):181-3.
46. Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension* 2005;46(4):937-42.
47. Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension* 2001;37(1):72-76.
48. Almeida AP, Frabregas BC, Madureira MM, Santos RJ, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(6):709-13.
49. Oliveira MA, Fortes ZB, Santos RA, Kosla MC, De Carvalho MH. Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin arteriolar dilation in vivo. *Peptides* 1999;20(10):1195-201.
50. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 2007;49(1):185-92.
51. Savergnini SQ, Beiman M, Lautner RQ, de Paula-Carvalho V, Allahdadi K, Pessoa DC, et al. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension* 2010;56(1):112-20.
52. le Tran Y, Forster C. Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;30(5):676-82.
53. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 1996;27(3 Pt 2):523-8.
54. Feterik K, Smith L, Katusic ZS. Angiotensin-(1-7) causes endothelium-dependent relaxation in canine middle cerebral artery. *Brain Res* 2000;873(1):75-82.
55. Fernandes L, Fortes ZB, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, Catelli De Carvalho MH. Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension* 2001;37(2 Pt 2):703-9.
56. Sasaki S, Higashi Y, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Hypertension* 2001;38(1):90-4.
57. Davie AP, McMurray JJ. Effect of angiotensin-(1-7) and bradykinin in patients with heart failure treated with an ACE inhibitor. *Hypertension* 1999;34(3):457-60.
58. Braga AN, da Silva Lemos M, da Silva JR, Fontes WR, dos Santos RA. Effects of angiotensins on day-night fluctuations and stress-induced changes in blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282(6):R1663-71.
59. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* 2000;91(1-3):45-62.

60. Santos RA, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole-Santos MJ, et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* 2004;17(3):292-9.
61. Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgereit J, Bader M, et al. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens* 2008;2(6):418-24.
62. Bendall JK, Heymes C, Wright TJ, Wheatcroft S, Grieve DJ, Shah AM, et al. Strain-dependent variation in vascular responses to nitric oxide in the isolated murine heart. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(10):1325-33.
63. Botelho-Santos GA, Bader M, Alenina N, Santos RA. Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2012;6(5):201-11.
64. Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(6):H1985-94.
65. Botelho-Santos GA, Sampaio WO, Reudelhuber TL, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Souza dos Santos RA. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(5):H2485-90.
66. Iyer SN, Chappell MC, Averill DB, Diz DI, Ferrario CM. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension* 1998;31(2):699-705.
67. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension* 2007;50(6):1093-8.
68. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(4):H1560-6.
69. Wu JG, Tang H, Liu ZJ, Ma ZF, Tang AL, Zhang XJ, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular remodelling in rat jugular vein grafts via reduced ERK1/2 and p38 MAPK activity. *The Journal of international medical research* 2011;39(6):2158-68.
70. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 1997;29(1 Pt 2):366-73.
71. Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2004;22(6):1141-9.
72. Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 1997;9(5):337-51.
73. Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, et al. Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(2):C494-9.
74. Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 1997;7(9):353-61.

75. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996;74(10):589-607.
76. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999;79(1):143-80.
77. Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 1996;271(40):24313-6.
78. Wang X, Loutzenhiser R. Determinants of renal microvascular response to ACh: afferent and efferent arteriolar actions of EDHF. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282(1):F124-32.
79. Kudoh S, Komuro I, Mizuno T, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, et al. Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Circ Res* 1997;80(1):139-46.
80. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(8):1263-73.
81. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22(2):153-83.
82. Kwon S, Fang LH, Kim B, Ha TS, Lee SJ, Ahn HY. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci* 2004;95(2):267-72.
83. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(2):H741-51.
84. Bolla M, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, et al. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane- induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res* 2002;39(4):353-60.
85. Hedges JC, Oxhorn BC, Carty M, Adam LP, Yamboliev IA, Gerthoffer WT. Phosphorylation of caldesmon by ERK MAP kinases in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278(4):C718-26.
86. Larsen JK, Yamboliev IA, Weber LA, Gerthoffer WT. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 1):L930-40.
87. Gerthoffer WT, Gunst SJ. Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001;91(2):963-72.
88. Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT. Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(6):H1899-907.
89. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992;71(2):343-53.

90. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994;14(1):133-40.
91. Osada J, Joven J, Maeda N. The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2000;11(1):25-9.
92. Arruda RM, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension* 2005;46(4):932-6.
93. Yaghoubi M, Oliver-Krasinski J, Cayatte AJ, Cohen RA. Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36(6):751-7.
94. d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice. *Stroke* 2001;32(11):2658-64.
95. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258(5081):468-71.
96. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31(1):23-37.
97. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87(10):840-4.
98. Wolf G. Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep* 2000;2(2):167-73.
99. Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, Da Cunha V, Wilson DW, Athanassios CN, et al. Angiotensin II injures the arterial wall causing increased aortic stiffening in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283(6):R1442-9.
100. Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, et al. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension* 2004;44(3):277-82.
101. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997;99(1):41-6.
102. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103(9):1282-8.
103. d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, et al. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(6):1017-22.
104. Jiang F, Guo Y, Salvemini D, Dusting GJ. Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein(E)-deficient mice. *Br J Pharmacol* 2003;139(6):1127-34.
105. Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). *Guide for the care and use of laboratory animals*. [7th ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.

106. Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara AK, Dybdal N, Bunting S, Ohneda O, et al. Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(11):2762-8.
107. Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimaraes D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ, et al. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension* 2010;55(1):153-60.
108. Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1995;269(1 Pt 2):H313-9.
109. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002;417(6891):822-8.
110. Rentzsch B, Todiras M, Iliescu R, Popova E, Campos LA, Oliveira ML, et al. Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension* 2008;52(5):967-73.
111. Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension* 2002;39(3):799-802.
112. Faria-Silva R, Duarte FV, Santos RA. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension* 2005;46(4):948-52.
113. Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14(8):1019-31.
114. Potthoff SA, Fahling M, Clasen T, Mende S, Ishak B, Suvorava T, et al. Angiotensin-(1-7) modulates renal vascular resistance through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension* 2014;63(2):265-72.
115. Peiro C, Vallejo S, Gembardt F, Azcutia V, Heringer-Walther S, Rodriguez-Manas L, et al. Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens* 2007;25(12):2421-5.
116. Hai CM, Murphy RA. Ca²⁺, crossbridge phosphorylation, and contraction. *Annu Rev Physiol* 1989;51:285-98.
117. Walsh MP. Smooth muscle caldesmon. *Prog Clin Biol Res* 1990;327:127-40.
118. Zhang Y, Moreland S, Moreland RS. Regulation of vascular smooth muscle contraction: myosin light chain phosphorylation dependent and independent pathways. *Can J Physiol Pharmacol* 1994;72(11):1386-91.
119. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996;76(4):967-1003.
120. Harnett KM, Biancani P. Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. *Am J Med* 2003;115 Suppl 3A:24S-30S.
121. Doran DE, Weiss D, Zhang Y, Griendling KK, Taylor WR. Differential effects of AT1 receptor and Ca²⁺ channel blockade on atherosclerosis, inflammatory gene expression, and production of reactive oxygen species. *Atherosclerosis* 2007;195(1):39-47.

122. Benter IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. *Am J Nephrol* 2008;28(1):25-33.
123. t Hoen PA, Van der Lans CA, Van Eck M, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJ, Twisk J. Aorta of ApoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circ Res* 2003;93(3):262-9.
124. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74(6):1141-8.
125. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004;44(3):248-52.
126. Kamper M, Tsimpoukidi O, Chatzigeorgiou A, Lymberi M, Kamper EF. The antioxidant effect of angiotensin II receptor blocker, losartan, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Transl Res* 2010;156(1):26-36.
127. Wong WT, Tian XY, Xu A, Ng CF, Lee HK, Chen ZY, et al. Angiotensin II type 1 receptor-dependent oxidative stress mediates endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. *Antioxid Redox Signal* 2010;13(6):757-68.
128. Paravicini TM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits. *Circ Res* 2002;91(1):54-61.
129. Lai EY, Solis G, Luo Z, Carlstrom M, Sandberg K, Holland S, et al. p47(phox) is required for afferent arteriolar contractile responses to angiotensin II and perfusion pressure in mice. *Hypertension* 2012;59(2):415-20.
130. Beyer AM, Guo DF, Rahmouni K. Prolonged treatment with angiotensin 1-7 improves endothelial function in diet-induced obesity. *J Hypertens* 2013;31(4):730-8.
131. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* 2005;45(3):438-44.
132. Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Abe Y. ROS during the acute phase of Ang II hypertension participates in cardiovascular MAPK activation but not vasoconstriction. *Hypertension* 2004;43(1):117-24.
133. Cheriyan J, Webb AJ, Sarov-Blat L, Elkhawad M, Wallace SM, Maki-Petaja KM, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase improves nitric oxide-mediated vasodilatation and reduces inflammation in hypercholesterolemia. *Circulation* 2011;123(5):515-23.
134. Su Z, Zimpelmann J, Burns KD. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int* 2006;69(12):2212-8.
135. Goettsch C, Goettsch W, Muller G, Seebach J, Schnittler HJ, Morawietz H. Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 MAPK

- in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380(2):355-60.
136. Morrell ED, Tsai BM, Wang M, Crisostomo PR, Meldrum DR. p38 mitogen-activated protein kinase mediates the sustained phase of hypoxic pulmonary vasoconstriction and plays a role in phase I vasodilation. *J Surg Res* 2006;134(2):335-41.
137. Patzak A, Lai EY, Fahling M, Sendeski M, Martinka P, Persson PB, et al. Adenosine enhances long term the contractile response to angiotensin II in afferent arterioles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(6):R2232-42.
138. Komers R, Schutzer W, Xue H, Oyama TT, Lindsley JN, Anderson S. Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on blood pressure, renal hemodynamics, and renal vascular reactivity in normal and diabetic rats. *Transl Res* 2007;150(6):343-9.
139. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 1997;110 (Pt 3):357-68.
140. Muller E, Burger-Kentischer A, Neuhofer W, Fraek ML, Marz J, Thureau K, et al. Possible involvement of heat shock protein 25 in the angiotensin II-induced glomerular mesangial cell contraction via p38 MAP kinase. *J Cell Physiol* 1999;181(3):462-9.
141. Ju H, Behm DJ, Nerurkar S, Eybye ME, Haimbach RE, Olzinski AR, et al. p38 MAPK inhibitors ameliorate target organ damage in hypertension: Part 1. p38 MAPK-dependent endothelial dysfunction and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(3):932-8.
142. Widder J, Behr T, Fraccarollo D, Hu K, Galuppo P, Tas P, et al. Vascular endothelial dysfunction and superoxide anion production in heart failure are p38 MAP kinase-dependent. *Cardiovasc Res* 2004;63(1):161-7.
143. Laplante MA, Wu R, El Midaoui A, de Champlain J. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2003;21(5):927-36.
144. Ding L, Chapman A, Boyd R, Wang HD. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(6):H2997-3005.
145. Oeckler RA, Kaminski PM, Wolin MS. Stretch enhances contraction of bovine coronary arteries via an NAD(P)H oxidase-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade. *Circ Res* 2003;92(1):23-31.
146. Oeckler RA, Arcuino E, Ahmad M, Olson SC, Wolin MS. Cytosolic NADH redox and thiol oxidation regulate pulmonary arterial force through ERK MAP kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288(6):L1017-25.
147. Garcha RS, Sever PS, Hughes AD. Mechanism of action of angiotensin II in human isolated subcutaneous resistance arteries. *Br J Pharmacol* 2001;134(1):188-96.
148. Yang JM, Dong M, Meng X, Zhao YX, Yang XY, Liu XL, et al. Angiotensin-(1-7) dose-dependently inhibits atherosclerotic lesion formation and

-
- enhances plaque stability by targeting vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(8):1978-85.
149. Lovren F, Pan Y, Quan A, Teoh H, Wang G, Shukla PC, et al. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295(4):H1377-84.
150. Langeveld B, van Gilst WH, Tio RA, Zijlstra F, Roks AJ. Angiotensin-(1-7) attenuates neointimal formation after stent implantation in the rat. *Hypertension* 2005;45(1):138-41.

9 Anhang

Danksagung:

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. L.C. Rump, meinem Betreuer Dr. Johannes Stegbauer und Dr. Sebastian Potthoff, ohne deren Unterstützung und großartigen Ideen diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen wäre. Ich möchte mich auch ausdrücklich bei Blanka Duvnjak und dem restlichen Team der Experimentellen Nephrologie für die guten Ratschläge und den Support bei der Durchführung von Experimenten bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Amélie, meine Eltern und meine Geschwister: Ich bedanke mich für die vielen Aufmunterungen, für eure große Unterstützungen und für all die Freiheiten die ihr mir in allen Lebenslagen entgegenbringt und -brachtet. Ich liebe Euch.

Ich möchte mich auch bei meinen lieben Freunden bedanken: insbesondere bei Anna K. Jasper, Till Elsässer, Kira Pohlmeier, Moritz Broja, Marian Pott und Marcus Lohmann, mit denen ich zusammengewohnt/ -gearbeitet habe und weit gereist bin: Ich bedanke mich für Eure unzähligen Durchhalteparolen, das Korrekturlesen und die wunderbare Zeit die wir gemeinsam verbracht haben! Ich freue mich auf viele weitere schöne Jahre und neue Abenteuer!

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift

